

Aus dem Physiologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Bestimmung der Chemosensitivität unmyelinisierter Axone mittels  
schwellenorientierter Erregbarkeitsmessung**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnheilkunde  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Johannes Polten

aus  
Bernburg

München  
2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. P. Grafe

Mitberichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. K. Bötzel

Dekan:

Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung:

30.03.2004

# Inhalt

	<b>Seite</b>
1. Einleitung	3
2. Fragestellung und Ziel	8
3. Material und Methode	9
- Methode	9
- Präparate	11
- Setup	12
- Substanzen	14
- Durchführung	14
4. Ergebnisse	18
5. Diskussion	41
- Ergebnisse	41
- Verfahren	52
6. Zusammenfassung	56
7. Abkürzungen und Synonyme der verwendeten Substanzen	58
8. Literaturverzeichnis	59
9. Anhang	67
- Formular zur Patientenaufklärung	



## 1. Einleitung

Die peripheren Nervenendigungen von unmyelinisierten, primär afferenten Nervenfasern sind entscheidend für die Transduktion und Transformation von thermischen und nozizeptiven Sinnesreizen. Wegen der geringen Größe dieser Strukturen sind sie für konventionelle elektrophysiologische Untersuchungstechniken nicht zugänglich. Deshalb werden bei experimentellen Studien in der Regel die relativ großen Zellkörper von unmyelinisierten Afferenzen in Hinterwurzelganglien als Modellmembran für die peripheren Nervenendigungen verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen untersucht, ob evtl. auch an der axonalen Membran von unmyelinisierten Nervenfasern im peripheren Nervenstamm entsprechende Eigenschaften von Nervenendigungen gefunden werden können. Isolierte Segmente von peripheren Nerven können auch von Patienten gewonnen werden und funktionelle Untersuchungen an den unmyelinisierten Nervenfasern in diesen Präparaten sind möglicherweise für das Verständnis der Pathophysiologie von Neuropathien hilfreich. Spezifisch wurde untersucht, ob die axonale Membran eine Chemosensitivität für Purine besitzt. Freisetzung von ATP aus verletzten Zellen erregt die peripheren Endigungen von nozizeptiven Afferenzen.

Die vorliegende Arbeit widmet sich somit der Methodik zur Bestimmung der Erregungsleitungsbeeinflussung von unmyelinisierten Axonen in isolierten Nervsegmenten *in vitro*. Sie zeigt anhand einer computergesteuerten Analyse das Vorhandensein erregungsleitungsbeeinflussender Rezeptoren an der axonalen Membran nozizeptiver Nervenfasern und legt hierbei bestehende Gemeinsamkeiten und Unterschiede verschiedener Präparatgruppen unterschiedlicher Spezies dar.

Dabei wird verdeutlicht, dass die Möglichkeit der Potentialableitung an einzelnen unmyelinisierten Nerven und die computergestützte Verarbeitung durch das Programm QTRAC<sup>®</sup> gut verifizierbare Ergebnisse liefert und somit eine sehr gute Ergänzung zu den bisher verfügbaren *In-vivo*-Studien und Patch-Clamp-Versuchen darstellt.

## ***Aktionspotential und Stimulation von Nervenfasern***

Grundlage für die Erregungsleitung an Nervenfasern stellt das Ruhemembranpotential dar, welches hauptsächlich auf einem Diffusionspotential für Kaliumionen beruht. Es beträgt etwa  $-80\text{ mV}$ .

Durch verschiedene Einflüsse, z.B. Rezeptoraktivierung, Verletzung, Anlegen von elektrischem Strom, kann dieses Potential positiv (Depolarisation) oder negativ (Hyperpolarisation) verändert werden. Bis zu einem gewissen Grenzwert erfolgt diese Veränderung lokal, d.h. es erfolgt keine Weiterleitung der Potentialänderung entlang der Membran. Für menschliche Nervenfasern beträgt diese Schwelle etwa  $-60\text{ mV}$ . Kommt es durch einen Reiz zu einer Depolarisation, welche diese Schwelle überschreitet, so entsteht ein Aktionspotential, das sich entlang der Membran stets mit gleicher Struktur und Amplitude im Sinne einer „Alles oder Nichts“-Reaktion ausbreitet. Hierbei werden kurzzeitig  $\text{Na}^+$ -Kanäle aktiviert, Natrium strömt in die Nervenfasern ein, das Membranpotential bricht zusammen bzw. wird sogar positiv (Overshoot). Dieser Einstrom lässt sich linear steigern durch eine vorherige Membranhyperpolarisation bis  $-100\text{ mV}$ . Durch einen allmählichen Anstieg der  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit kommt es nachfolgend wieder zur Repolarisation, wobei wiederum eine kurzzeitige Hyperpolarisation entstehen kann. Die  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -Pumpe sorgt indes für einen ständigen Ausgleich der Ionenverteilung.

Durch die in Folge eines lokalen Aktionspotentials entstehende Ladungsdifferenz zu den benachbarten Membranabschnitten kommt es entlang der Membran zu entsprechenden Ionenströmen zum Ausgleich dieser Differenzen. Diese Umverteilungen führen an unmyelinisierten Nervenfasern wiederum zu einer Depolarisation der angrenzenden Bereiche, welche bei ausreichender Stärke auch hier wieder neue Aktionspotentiale erzeugen kann. Somit kommt es durch eine immer neue Auslösung von Aktionspotentialen zur Weiterleitung einer einmal erzeugten Erregung über die gesamte Länge der Nervenfasern.

## ***Purinozeptoren***

Neben der mechanischen Reizauslösung spielt die chemische Aktivierung von sensorischen Neuronen eine wichtige Rolle im somatosensorischen System. In der Vergangenheit konnte eine Vielzahl von entsprechenden Rezeptoren identifiziert werden. Neben Rezeptoren für Acetylcholin, Adrenalin, Aminosäuren, Bradykinin,

Capsaicin, Serotonin etc. scheinen hierbei nach neueren Beobachtungen auch solche für ATP und weitere Adenosinnukleotide eine ernstzunehmende Rolle vor allem im Schmerzgeschehen zu spielen. Diese Rezeptoren werden als Purinozeptoren bezeichnet.

Erste Hinweise auf eine Wirkung von ATP an sensorischen Neuronen gab es bereits vor über 40 Jahren [32]. Bis dahin existierte eine dogmatische Einteilung von Nerven hinsichtlich ihrer Transmittersubstanzen in adrenerg und cholinerg. Der Nachweis von ATP als Neurotransmitter erfolgte allerdings erst 1970 [16]. Zwei Jahre später wurde der Begriff "purinerg" Nerven geprägt [11]. Eine Vielzahl von Versuchen mit sehr unterschiedlichen Ergebnissen folgte in den Jahren darauf, was zeigte, dass die Gruppe der Purinozeptoren sehr umfangreich und vielgestaltig ist. Als Konsequenz erfolgte 1978 eine Unterteilung in durch Adenosin aktivierte P1-Rezeptoren und P2-Rezeptoren, welche vorwiegend durch ATP stimuliert werden [12]. Weitere notwendige Differenzierungen innerhalb der P2-Gruppe führten 1985 zur Benennung der Typen P2X und P2Y [17]. Basis für diese Einteilung war zum damaligen Zeitpunkt die durch P2X initiierte Vasokonstriktion und Kontraktion glatter Muskulatur im Gegensatz zu der via P2Y hervorgerufenen Vasodilatation und Muskelrelaxation. In der Folge konnten weitere P2-Rezeptoren mit unterschiedlichen physiologischen Wirkungsmustern und Affinität zu verschiedenen Purinen bestimmt werden, und diesen wurden verschiedene Buchstaben zugeordnet: P2T und P2Z [28], P2U [58] und P2D [64]. Bei genaueren Untersuchungen all dieser Gruppen zeigte sich aber, dass diese teils spezifische Gemeinsamkeiten aufweisen, welche eine andere, systematische Einteilung sinnvoll machen. Aus diesem Grunde wurde 1994 eine neue Nomenklatur und Klassifikation verabschiedet, welche bis heute Gültigkeit besitzt [25]. In dieser existieren nur zwei Hauptgruppen von P2-Rezeptoren: P2X und P2Y. Alle weiteren, oben genannten Gruppen wurden diesen zugeordnet. Grundlage für die Differenzierung zwischen diesen beiden Gruppen bildet der Mechanismus der Kanalaktivierung, welche bei P2X durch direkte Ligandenbindung an die Kationkanäle erfolgt ("ionotrop"), während er bei P2Y über G-Protein-Aktivierung mit cAMP als second messenger vermittelt wird ("metabotrop"). Aktivierung von P2X-Rezeptoren resultiert somit in einer relativ schnellen, kurzen Reaktion, während die via P2Y vermittelte Antwort einen vergleichsweise trägen Verlauf zeigt. Derzeit gibt es innerhalb der P2X-Gruppe 7 bekannte Subtypen, in der P2Y-Gruppe 8. Bei den P1-Rezeptoren sind zudem 4 Subtypen bekannt (A1, A2a, A2b, A3) [8].

Die P2X-Subtypen bestehen aus glykosylierten Proteinen mit intrazellulären C- und N-Termini, zwei transmembranalen Anteilen und einer extrazellulären Schleife [18, 86]. Ein Ionenkanal wird dabei aus 3 oder 4 solcher Proteine gebildet [15, 18]. Hierbei kann es sich sowohl um Homomere als auch um Heteromere der P2X-Subeinheiten handeln [81]. Diese Kanäle sind durchlässig für mono- und divalente Kationen [86].  $\alpha,\beta$ -meATP gilt als effektiver Agonist an P2X-Rezeptoren [14].

Einen besonderen Status im Hinblick auf die Thematik dieser Arbeit nimmt der Subtyp P2X3 ein, da seine Präsenz als spezifisch für dünne und mittlere sensorische Neuronen gilt [20, 46]. Es konnten aber auch die Subtypen 1 bis 6 in sensorischen Neuronen des Ganglion spinale, Ganglion trigeminale und Ganglion inferius nervi vagi nachgewiesen werden [87]. Neben P2X3 gilt P2X2 als wichtigster für die Vermittlung nozizeptiver Stimuli verantwortlicher Subtyp. Beide scheinen dabei sowohl als Homomere als auch als Heteromere vorzukommen [75, 80, 81]. Im Gegensatz zu reinen P2X3-Rezeptoren zeigen in Oozyten geformte P2X2/3-Rezeptoren eine dem P2X2-Subtyp entsprechende deutlich langsamere Desensibilisierung und ausgeprägte pH-Abhängigkeit [46, 57, 79]. Allerdings scheint es doch deutliche Unterschiede in den Reaktionsmustern rekombinanter und nativer P2X-Rezeptoren zu geben [56].

Die P2Y-Subtypen besitzen einen intrazellulären C-Terminus, 7 transmembranale Anteile mit entsprechenden intra- und extrazellulären Schleifen sowie einen extrazellulären N-Terminus. Die P2Y-Rezeptor-vermittelten Reaktionen erfolgen auf Grund der Wirkungsweise über ein second-messenger-System deutlich langsamer als die durch P2X hervorgerufenen [14]. Als stärkster Agonist gilt 2-Methylthio-ATP [14].

### ***Threshold Tracking***

Das konventionelle Verfahren zur Messung der Erregbarkeit von Nervenfasern besteht darin, den zu untersuchenden Nerven mit fester supramaximaler Reizstärke und –dauer zu stimulieren. Über Elektroden wird das Summenaktionspotential abgeleitet und quantitative sowie qualitative Parameter des Antwortsignals bestimmt. Die dieser Arbeit zu Grunde liegende Methode des „Threshold Tracking“ wurde erstmals 1970 von Joseph Bergmans beschrieben [3]. Sie ist dem herkömmlichen Verfahren insofern überlegen, als die gewonnenen Ergebnisse unabhängig von der



Anzahl der erregten Nervenfasern sowie der Länge und der Leitungsgeschwindigkeit der Nerven sind. Der physiologische Hintergrund dieses Verfahrens besteht darin, dass die einzelnen Fasern eines Nerven unterschiedliche Schwellen zur Auslösung eines Aktionspotentials besitzen. Wird nun mit einer geringeren als der zur Auslösung eines maximalen Summenaktionspotentials notwendigen Stromstärke gereizt, so ist die Stärke des erzeugten Summenaktionspotentials proportional zur Anzahl der aktivierten Nervenfasern. Somit kann trotz der Alles-oder-Nichts-Antwort einer singulären Nervenfasers das SAP auf prozentuale Anteile der Maximalreaktion reduziert werden.

Ein solcher prozentualer Anteil wird willkürlich als Schwelle (Threshold) festgelegt. Kommt es nun durch verschiedenartige Einflüsse (Reizung des Nerven, Rezeptorreaktionen, pathologische Veränderungen etc.) zu einer Änderung der Erregungsschwellen der Nervenfasern, so ist eine Änderung des Stimulationsstromes (oder der Stimulationsdauer) notwendig, um die Reizantwort konstant zu halten. Die nötige Stromänderung ist somit ein sehr guter Indikator zur Bestimmung der Erregbarkeitsänderung des Nerven.

Anfänglich verhinderten allerdings technische Schwierigkeiten die routinemäßige Umsetzung des von Bergmans entwickelten Verfahrens. Erst 1979 konnte mit dem „Threshold tracker“ erstmals ein Gerät vorgestellt werden, welches den regeltechnischen Anforderungen dieser Methode gerecht wurde [69]. In den 80er und 90er Jahren wurde die Technik des Threshold Tracking vor allem von Bostock weiterentwickelt und durch die moderne Computertechnik einem breiteren Anwendungsspektrum zugänglich gemacht. Die Verfahren von Bostock und das von ihm entwickelte MS-DOS-Programm QTRAC<sup>®</sup> liegen der Methode dieser Arbeit zu Grunde.

## 2. Fragestellung und Ziel

Ziel der Untersuchung war es, die Beeinflussung der Erregungsleitung unmyelinisierter Axone durch verschiedene Substanzgruppen, insbesondere durch Purine, zu bestimmen und dabei Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen den einzelnen Präparateklassen festzustellen. Hierzu wurde die Wirkung verschiedener körpereigener Substanzen als auch Fremdsubstanzen auf die Präparate untersucht und die Möglichkeit zur Blockade dieser Wirkungen bestimmt. Auf diesem Wege sollte zudem der Versuch einer Charakterisierung der vorhandenen Rezeptoren erfolgen.

Mit dem Verfahren des „in vitro Threshold Tracking“ kam hierbei eine gänzlich neue Technik zum Einsatz. Es sollte untersucht werden, inwiefern dieses Verfahren der gestellten Fragestellung gerecht werden kann, und ob es eine Verbesserung zu den bisher verwendeten Methoden darstellt.

Die umfassende Auseinandersetzung mit der hierzu bislang verfügbaren Literatur dient der Einordnung der dabei gewonnenen Erkenntnisse in den aktuellen Stand des zu dieser Thematik verfügbaren Wissens.

### **3. Material und Methode**

#### ***Methode***

Als zur Bestimmung der Beeinflussbarkeit der Erregungsleitung von Nervenfasern zu Grunde liegendes Verfahren wurde die von Bostock beschriebene Methode des in vivo Threshold Tracking mittels des Programmes QTRAC für die Untersuchung an Nervenfasern in vitro modifiziert.

Abbildung 1 verdeutlicht die Durchführung des Threshold Tracking und die dabei erzielten Auswirkungen der genutzten Versuchsparameter. Als Beispiel dient die Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP (20  $\mu$ M) an einem Präparat des N. vagus der Ratte.

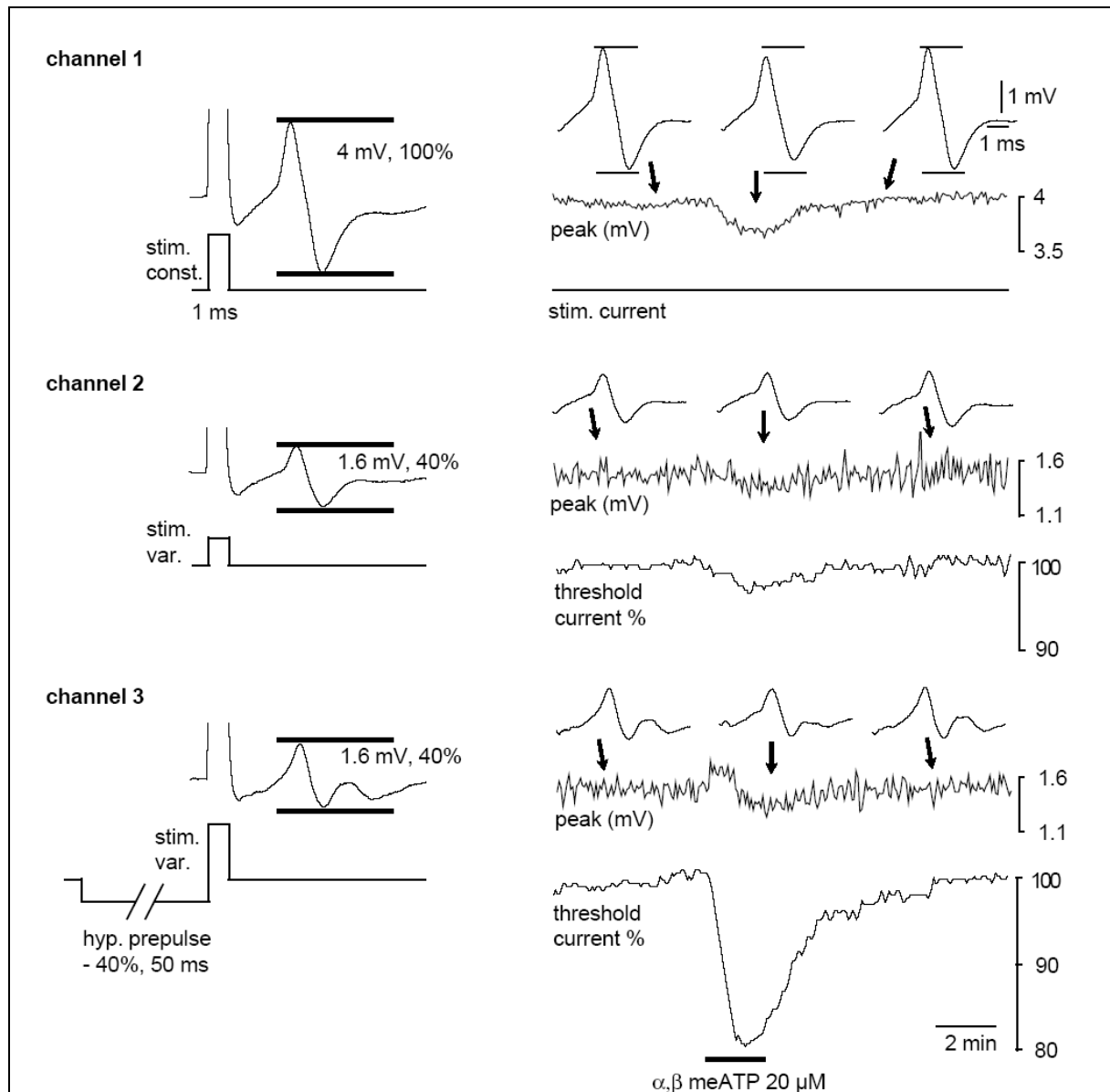


Abb. 1: Threshold Tracking am N. vagus der Ratte

Die Abbildung zeigt verschiedene Kurvenverläufe eines Threshold-Tracking-Messdurchganges an einem Vagus-Präparat der Ratte, alle aufgezeichnet mit dem Programm QTRAC. Hierbei wurden 3 Stimulus-Konditionen getestet und durch 3 entsprechende Kanäle des Programmes QTRAC gesteuert und dargestellt.

In Kanal 1 wurde durch einen regelmäßigen supramaximalen Stimulus die Maximalamplitude des C-Faser-Summenaktionspotentials erzeugt. Der hierzu erzeugte Stimulationsstrom blieb stets konstant. Die Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP führte dabei zu einer geringfügigen Änderung der Peak-Amplitude.

In Kanal 2 wurde die Zielamplitude des Summenaktionspotentials auf 40% der in Kanal 1 erzeugten Maximalamplitude festgelegt („Schwelle“). Der erzeugte Stimulationsstrom wurde vom Computer so geregelt, dass dieser Wert weitgehend konstant blieb („Schwellenstrom“). Im dargestellten Beispiel reduzierte  $\alpha,\beta$ -meATP den Strom, welcher zum Erreichen der Schwelle benötigt wurde.

In Kanal 3 wurde das gleiche Protokoll wie für Kanal 2 genutzt, dem Testimpuls ging jedoch zusätzlich ein hyperpolarisierender Präpuls mit einer Stärke von 40% des Testimpulses und einer Dauer von 50 ms voran. Hierdurch wurde die durch  $\alpha,\beta$ -meATP hervorgerufene Reduktion des notwendigen Schwellenstromes noch weiter verstärkt. Derartige hyperpolarisierende Präpulse wurden in allen im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente genutzt.

### **Präparate**

Die Untersuchung wurde durchgeführt an 86 Nervpräparaten, welche folgenden Gruppen entstammten:

- Ratten-Vagus: 30 Präparate
- Ratten-Suralis: 26 Präparate
- humaner Suralis: 30 Präparate

Die Rattenpräparate wurden entnommen von Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 250 und 450 g. Die Entnahme der Nerven erfolgte am lebenden Objekt nach Vollanästhesie mit Chlorhydrat (50 mg / 100 g Körpergewicht, i.p.). Nach der Entnahme wurden die Ratten durch eine intrakardiale Überdosis Chlorhydrat getötet.

Die humanen Nerven stammen von Patienten der chirurgischen Poliklinik des Klinikums Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München. Das Alter der Patienten betrug 35 bis 89 Jahre, der Mittelwert lag bei 63 Jahren. Die Entnahme der Nerven erfolgte im direkten Anschluss an eine Amputation von Ober- bzw. Unterschenkel noch während der Operation. Operationsindikation war in allen Fällen eine periphere arterielle Verschlusskrankheit. Die Genehmigung für die Nervenentnahme erfolgte durch die Ethikkommission der LMU München. Die Aufklärung der Patienten und eine schriftliche Einverständniserklärung erfolgte am Vortag der Operation. Eine Kopie des Aufklärungsbogens befindet sich im Anhang.

Bei allen Präparaten wurde das Epi- und Perineurium entfernt und isolierte Segmente von etwa 25 mm Länge gewonnen. Die humanen Nerven sowie der Ratten-Suralis wurden zusätzlich in mehrere einzelne Faszikel dissoziiert.

Die Lagerung der Präparate erfolgte in HEPES-Nährlösung bei einer Temperatur von 5°C. Diese enthielt 118mM NaCl, 3mM KCl, 1.5mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl, 25mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 5mM Glucose. Die maximale Lagerungsdauer bis zur Durchführung der Versuche betrug 36 Stunden.

### **Setup**

Die gewonnenen Präparate wurden im Anschluss bis maximal 36 Stunden nach ihrer Entnahme in die Versuchsanordnung eingegliedert. Zur Lagerung und Versorgung der Nerven während der Versuche diente hierbei eine Kunststoffkammer, welche 3 ml Organbad enthielt. Der Nerv wurde an beiden Enden in eine Saugelektrode eingeführt (Abstand ca. 5 mm) und die Elektrode am Übergang zum Organbad mit Vaseline isoliert. Eine der Elektroden diente hierbei als Stimulationselektrode, die andere als Messelektrode zur Ableitung der Membranpotentiale [29]. Eine indifferente Elektrode war am Rand der Kunststoffkammer angebracht.

Die Kammer war integriert in einen Perfusionskreislauf mit einer Fließgeschwindigkeit von 12 ml/min. Das als Perfusionslösung dienende Organbad entsprach in seiner Zusammensetzung der zur Lagerung der Präparate verwendeten Nährlösung. Es erfolgte eine Durchgasung mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub>, die Temperatur des Organbades betrug für alle hier dargestellten Messdurchgänge 37°C.

Die elektrische Stimulation erfolgte durch ein Elektrostimulationsgerät des Typs A395 der Firma WPI (Sarasota, USA), welches durch eine Steuerkarte Typ DT2812 (Data Translation) angesteuert wurde.

Die computergestützte Regelung des Eingangssignals nach Modulation durch einen Verstärker sowie die Auswertung des abgeleiteten Membranpotentials und die Aufzeichnung und Darstellung der Messwerte wurde mittels des Computerprogramms QTRAC<sup>®</sup> durchgeführt (© Institute of Neurology, London).

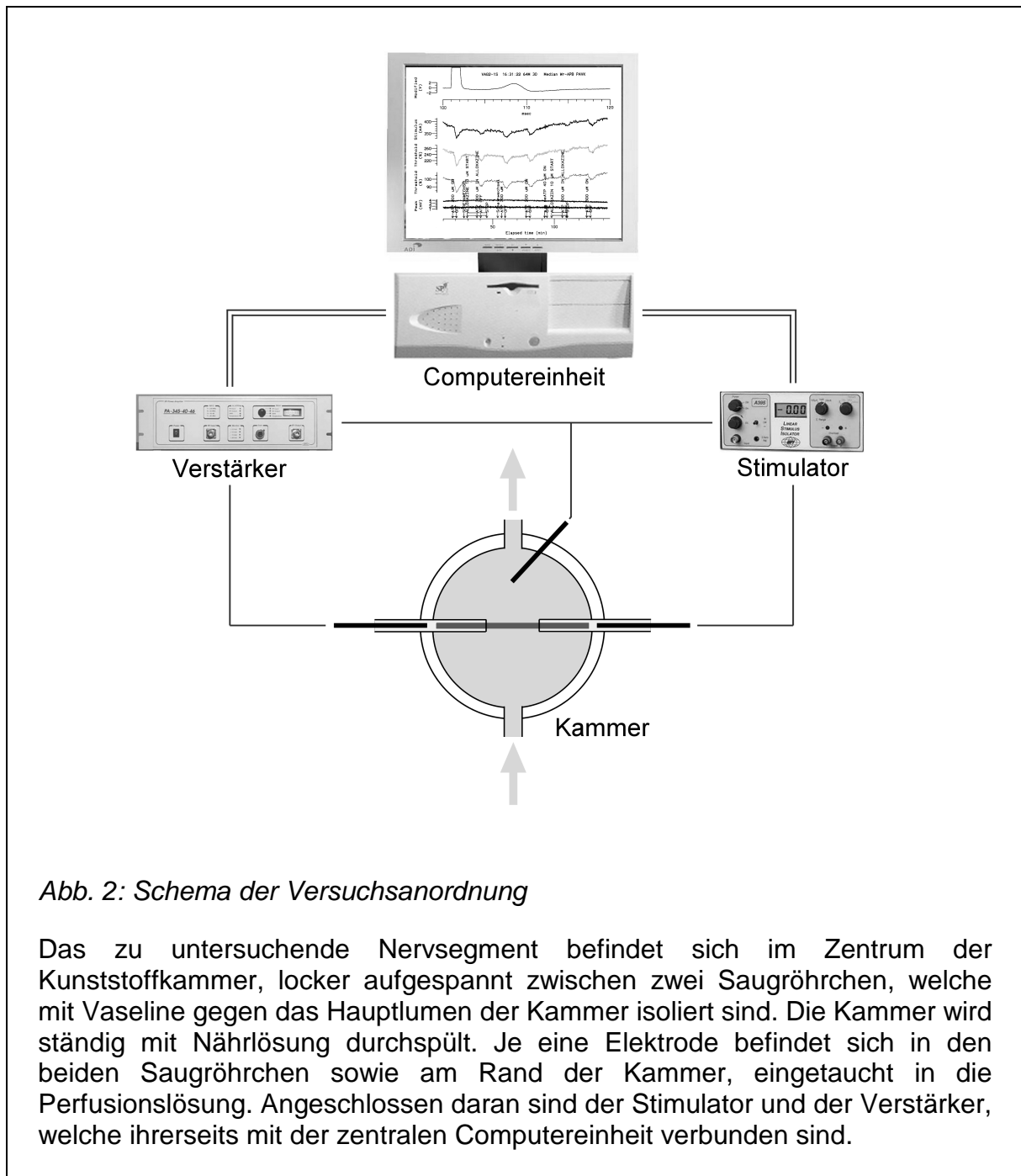


Abb. 2: Schema der Versuchsanordnung

Das zu untersuchende Nervsegment befindet sich im Zentrum der Kunststoffkammer, locker aufgespannt zwischen zwei Saugröhrchen, welche mit Vaseline gegen das Hauptlumen der Kammer isoliert sind. Die Kammer wird ständig mit Nährlösung durchspült. Je eine Elektrode befindet sich in den beiden Saugröhrchen sowie am Rand der Kammer, eingetaucht in die Perfusionslösung. Angeschlossen daran sind der Stimulator und der Verstärker, welche ihrerseits mit der zentralen Computereinheit verbunden sind.

QTRAC ist ein MS-DOS-basiertes Programm, welches am Londoner Institute of Neurology speziell für Threshold-Tracking-Experimente in vivo entwickelt wurde. Dieses ist jedoch ohne softwareseitige Modifikationen auch für In-vitro-Studien nutzbar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Version 4.4 eingesetzt. Die Software gestattet die simultane Darstellung verschiedener Messwerte, wie des generierten Summenaktionspotentials, der Schwellenwertkurven und der Peak-Kurven. Hierbei können mehrere Kanäle mit unterschiedlichen Stimulationsparametern (Stärke des

Präpulses, Ausmaß der Stromstärkeänderung etc.) definiert werden und diese gemeinsam oder getrennt in unterschiedlichen Spuren dargestellt werden. Diese Parameter können zudem auch während der laufenden Messungen jederzeit modifiziert werden.

Die Dauer der Versuche betrug zwischen 36 und 446 Minuten, Gründe für die Beendigung waren in der Regel ein deutliches Absinken des Peak-Wertes oder eine signifikant verminderte Reaktionsfähigkeit auf regelmäßig applizierte Kontrollsubstanzen. Auch Probleme mit dem Perfusions- oder Stimulations- und Messsystem führten in einigen Fällen zum Abbruch der Versuche.

### ***Prüfsubstanzen***

Die auf ihre Rezeptorwirkung hin untersuchten und im Rahmen dieser Arbeit berücksichtigten Substanzen waren  $\alpha,\beta$ -Methylen-ATP ( $\alpha,\beta$ -meATP),  $\beta,\gamma$ -Methylen-ATP ( $\beta,\gamma$ -meATP), Adenosin, Adenosindiphosphat (ADP), Adenosintriphosphat (ATP), CGS-21680, Cyclopentyladenosin (CPA), Diadenosinpentaphosphat (Ap5A) und N-Ethylcarboxamido-Adenosin (NECA).

Als Rezeptorblocker / Antagonisten der erzielten Nervantworten kamen Alloxazin, 1,3-Dipropyl-8-Cyclopentaxanthin (DPCPX), MRS-1220, Pyridoxalphosphat-Disulfonsäure (PPADS) und Trinitrophenyl-ATP (TNP-ATP) zum Einsatz.

Erworben wurden die verwendeten Substanzen von den Firmen Biotrend (Köln, Deutschland), Molecular Probes (Leiden, Niederlande) und Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Die Lagerung erfolgte den Herstellervorschriften entsprechend.

### ***Durchführung***

Nach Vorbereitung des Setup (Aufbau des Perfusionssystems, Auffüllen der Perfusionslösung und Regulierung der Durchflussmenge, Einstellen der Temperatur und der Durchgasung) erfolgte die Entnahme der Faszikel aus der Nährlösung und die Eingliederung in die Kunststoffkammer. Hierzu wurden die Enden der Faszikel mittels einer Pipette in die Saugelektrodenröhrchen ca. 5-10 mm eingesogen und die in die Lösung reichenden Enden der Röhrchen mit Vaseline abgedichtet. Anschließend erfolgte der Anschluss des Messsystems. Je eine Elektrode wurde an



den Enden der Faszikel in die Elektrodenröhrchen eingebracht (Reizelektrode, Messelektrode). Eine indifferente Elektrode wurde am Rand der Kunststoffkammer in die Perfusionslösung eingetaucht. Nach Konnektierung aller elektrischen Verbindungen, Einschalten von Computer, Verstärker und Elektrostimulationsgerät sowie Wahl der Vorverstärkung und Offseteinstellung wurde das Programm QTRAC gestartet.

Der erste Schritt nach dem Laden einer Konfigurationsdatei zur Voreinstellung gebräuchlicher Programmparameter diente hierbei der Optimierung des Grundsignals, um ein Rauschen und auftretende Artefakte zu minimieren. Hierzu wurde gegebenenfalls die Isolierung der Saugelektroden nochmals optimiert und die Empfindlichkeit der voreingestellten Messparameter moduliert.

Nach Einstellung des Stimulationsgerätes, Stimulation des Nerven und grafischer Darstellung des Summenaktionspotentials erfolgte die Festlegung des Messbereichs zur Bestimmung der Amplitude. Hierzu wurde ein zeitliches Messfenster definiert (Fensterstart und -breite), innerhalb welchen das Programm Minimum und Maximum der Messwerte bestimmt.

Jetzt wurde der Nerv mittels manueller Festlegung der Reizstärke wiederholt stimuliert, um die zum Erreichen des maximalen Summenaktionspotentials notwendige Stromstärke zu definieren. Abschließend zur Voreinstellung der Programmparameter erfolgte die Festlegung der Stimulationsdauer (Testwidth), welche zwischen 0,7 ms und 2 ms betrug. Gegebenenfalls konnte bei einer hohen Schwankungsbreite des Antwortsignals eine zusätzliche Signalglättung durch Bestimmung des Mittelwertes einer beliebigen Anzahl von Summenaktionspotentialen erreicht werden. Dies war jedoch nur selten erforderlich, und es mussten auch nie mehr als 3 Signale hierfür hinzugezogen werden, um somit eine ausreichend schnelle Verfolgung der Messschwelle zu gewährleisten.

Nach der Definition aller genannten Parameter wurde die Messreihe gestartet und die für die Messung genutzte Schwellenamplitude festgelegt. Diese konnte für jeden Messkanal beliebig eingestellt und auch während des Testverlaufs stets verändert werden. Standardfestlegung für die zu dieser Auswertung hinzugezogenen Daten waren 30 - 40% der eingangs definierten Maximalamplitude.

Das Programm QTRAC bietet die Möglichkeit, eine Anzahl von Messkanälen festzulegen, welchen verschiedene Messparameter zugewiesen werden können. In den durchgeführten Messungen wurden in der Regel 3 Kanäle genutzt, die sich

durch die Stärke des verwendeten Präpulses unterschieden. Hintergrund hierbei ist die Beobachtung, dass bei Einsatz eines hyperpolarisierenden Stromes vor der Auslösung des Testimpulses die Erregungsfähigkeit des Nerven erhöht wird [29]. Die genutzten Präpulse der 3 Messkanäle betragen 0%, 20% und 40% der Stimulationsamplitude und besaßen eine Dauer von 50 ms.

Weitere genutzte fakultative Einstellparameter waren die Festlegung des „Tracking Error“, d.h. der notwendigen Abweichung von der gewünschten Schwellenamplitude, bei welcher eine Änderung des Stimulationsstromes durch des Programm QTRAC ausgelöst werden sollte, sowie eines Schrittmusters, mit welchem festgelegt wurde, in welchen Schritten diese Stromstärkenänderung erfolgen sollte (in der Regel 1, 4, 8, 16).

Nach dem Erreichen der Schwellenamplitude für alle Messkanäle wurden nochmals etwa 5 Minuten abgewartet, um einen ausgewogenen Verlauf der Messkurven im Sinne eines „steady state“ zu erreichen.

Die zu nutzenden Prüfsubstanzen wurden in entsprechender Menge bereitgestellt, um mit dem in den jeweils vorgesehenen Messzylindern enthaltenen Volumen die gewünschte Konzentration zu ergeben. Pulverförmige Substanzen wurden hierzu mittels einer elektronischen Laborwaage abgewogen und mit einer geringen Menge Perfusionsflüssigkeit gelöst.

Bei erster Nutzung einer Prüfsubstanz wurde 3 – 5 Minuten vor Messbeginn ein Scheinwechsel durchgeführt, bei welchem Zu- und Abfluss des Perfusionssystems aus dem Hauptperfusionbehälter in den für die entsprechende Substanz zu nutzenden Messzylinder mit vortemperierter Perfusionslösung umgesetzt wurden. Eine signifikante Änderung des Antwortsignals sollte hierbei nicht erfolgen, anderenfalls wurde Durchgasung und Temperatur der Lösung kontrolliert und korrigiert und im Anschluss ein erneuter Scheinwechsel durchgeführt. Nach erfolgreichem Scheinwechsel, welcher in der Dokumentation und im Programmprotokoll zeitlich festgehalten wurde, wurde die Prüfsubstanz mit einer Eppendorf-Pipette in den Messzylinder pipettiert.

Der Zeitpunkt der Zugabe wurde wiederum sowohl im Programmprotokoll als auch in der Versuchsdokumentation protokolliert. Wurde eine Prüfsubstanz erneut getestet, so wurde bei Testbeginn der Zulauf des Perfusionssystems in den die Testsubstanz enthaltenden Messzylinder umgesetzt, der Ablauf erfolgte für 2 Minuten in das Abfallgefäß, um eine Verdünnung der Testsubstanz zu verhindern. Im Anschluss

wurde der Ablauf ebenfalls in den Messzylinder mit der Testsubstanz umgesetzt. Die Zeit bis zum Erreichen der Nervkammer durch die Prüfsubstanz betrug rund 30 Sekunden. Die Dauer einer Messung betrug in der Regel 3 - 5 Minuten. Dieser Zeitraum wurde bei positiver Reaktion durch das Vorhandensein eines Peaks im Kurvenverlauf bestimmt. Zur Beendigung einer Messung wurde wiederum der Zeitpunkt protokolliert, der Zulauf des Perfusionssystems in den HEPES-Vorratsbehälter und der Ablauf in das Abfallgefäß umgesetzt. Nach 3 Minuten Auswaschzeit wurde der Ablauf ebenfalls in den HEPES-Vorratsbehälter umgesetzt.

## 4. Ergebnisse

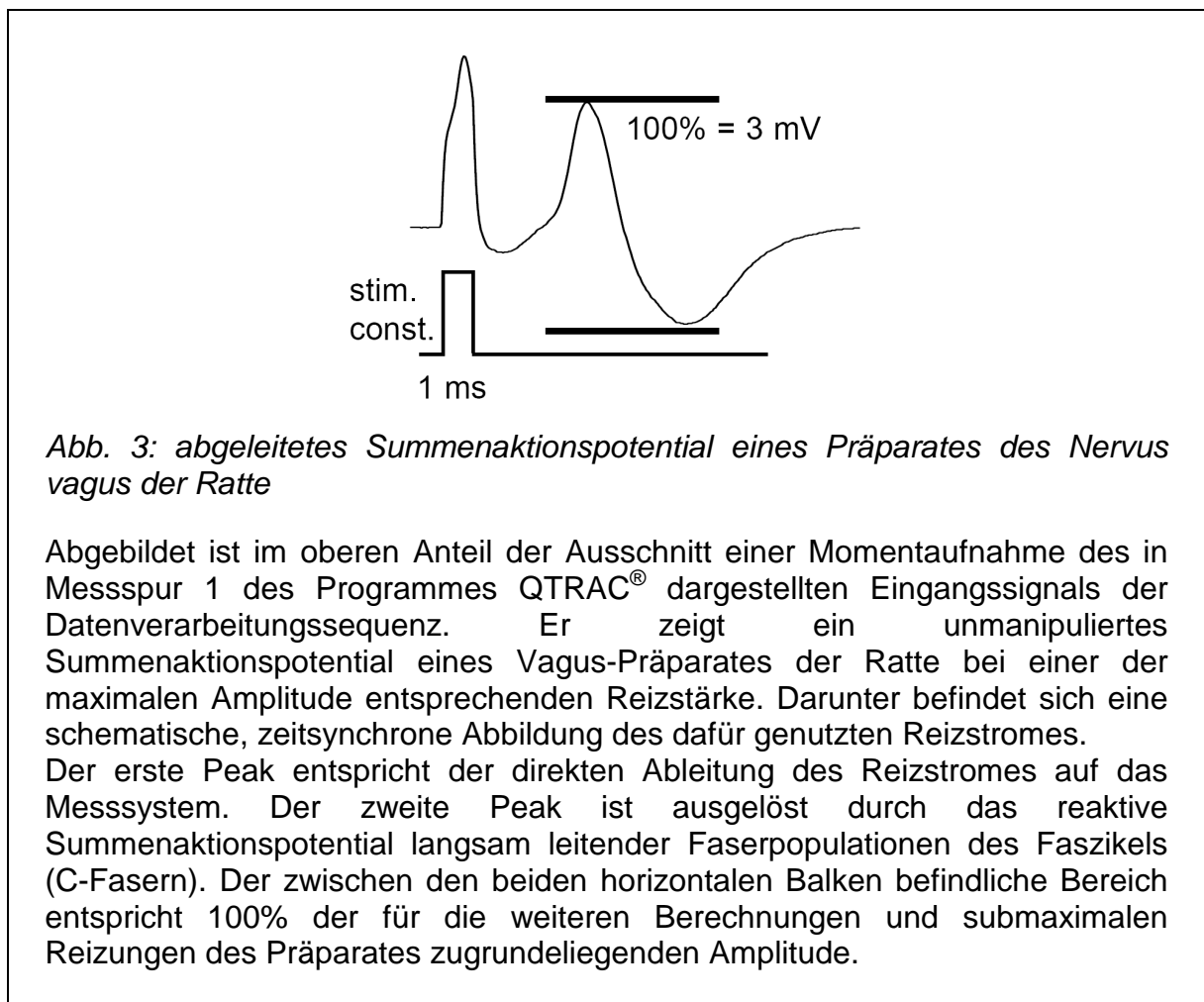
In allen Präparatgruppen ist eine klare Abhängigkeit der Erregbarkeit der Axone von der Zugabe verschiedener Substanzen erkennbar.

Hierbei konnten jedoch starke Reaktionsunterschiede zwischen den einzelnen Präparatgruppen in Bezug auf die jeweiligen Substanzgruppen dargestellt werden. Die Ergebnisse sind daher sowohl nach Präparattypen als auch nach Substanzgruppen einzeln aufgeführt.

Die Methode des Threshold Tracking, abgewandelt für die Arbeit mit in-vitro-Präparaten erwies sich bei einem Schwellenstrom von 40% des Maximalstromes als sehr verlässlich. Insbesondere das Verfahren mit hyperpolarisierenden Präpulsen lieferte gute Ergebnisse. Abbildung 1 macht dies am Beispiel der Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP (20  $\mu$ M) an einem Präparat des N. suralis der Ratte deutlich. In den folgenden Abbildungen des Ergebnisteils wird daher zumeist auf die Darstellung aller Kanäle verzichtet, und es werden in der Regel nur Messungen mit derartigen Präpulsen dargestellt.

### ***Nervus vagus der Ratte:***

Die den Wistar-Ratten entnommenen Vagus-Präparate erwiesen sich für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche als am besten geeignet. Sie zeichneten sich durch ein sehr stabiles und wenig störanfälliges Antwortsignal aus, welches die geringsten Schwankungen aufwies. Die durchgeführten Messungen unterlagen an den einzelnen Präparaten somit auch der besten Reproduzierbarkeit.



Zwischen verschiedenen Präparaten des Nervus vagus der Ratte kam es jedoch auch hier in Bezug auf die jeweiligen Prüfsubstanzen zu starken Unterschieden hinsichtlich der Ausprägung der Schwellenwertänderung. Die typischen Reaktionsunterschiede zwischen den verschiedenen genutzten Substanzen waren aber bei allen Präparaten gleichermaßen ausgeprägt.

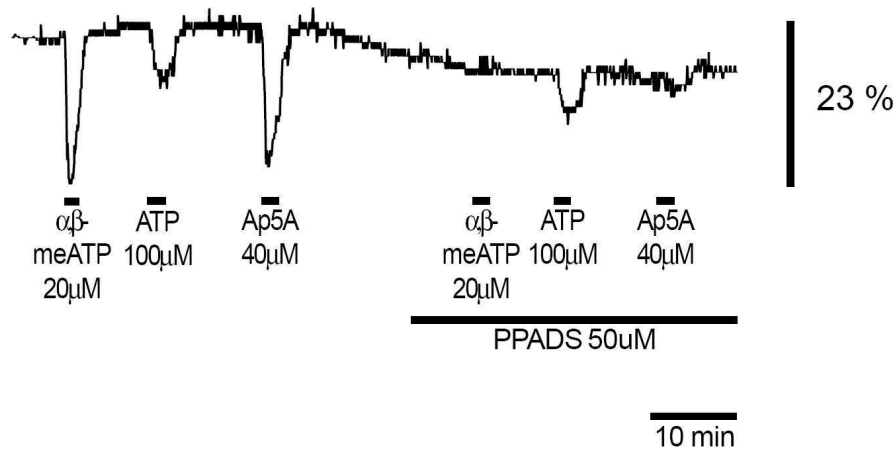


Abb. 4: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus vagus der Ratte unter Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP, ATP, Ap5A sowie Blockade durch iso-PPADS

Dargestellt ist der Kurvenverlauf des erzeugten Reizstromes notwendig zur Erzeugung eines Summenaktionspotentials der C-Fasern des Ratten-Vagus-Präparates, welches in seiner Amplitude 40% der Maximalamplitude der selben Faserpopulation entspricht. Zur Optimierung des Signals wurde ein hyperpolarisierender Präpuls mit einer Stärke von 20% des eigentlichen Reizstromes und einer Dauer von 50 ms vorgeschaltet.

Applikation von 20  $\mu$ M  $\alpha,\beta$ -meATP, 100  $\mu$ M ATP und 40  $\mu$ M Ap5A für jeweils 2 Minuten resultierte in einer signifikanten Reduktion des benötigten Stromes zur Konstanthaltung des Antwortsignals.  $\alpha,\beta$ -meATP und Ap5A erzeugten hierbei eine sehr heftige Reaktion mit steilem Verlauf sowohl der Onset- als auch der Return-Phase und einer großen Amplitude von 22,3% für  $\alpha,\beta$ -meATP und 19,8% für Ap5A. Der Verlauf bei Applikation von ATP hingegen stellte sich in allen Anteilen wesentlich langsamer und weniger stark ausgeprägt dar. Die Schwellenreduktion für ATP betrug 8,6%. Durch gleichzeitige Applikation von iso-PPADS in einer Konzentration von 50  $\mu$ M konnte die Wirkung von  $\alpha,\beta$ -meATP und Ap5A nahezu vollständig blockiert werden, wohingegen die ATP-Wirkung kaum beeinflusst wurde.

Die stärkste Reaktion an den Ratten-Vagus-Präparaten zeigte sich, wie in Abb. 4 dargestellt, bei Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP, einem Agonisten von P2X-Rezeptoren. Die dabei zu verzeichnende Steigerung der Erregbarkeit war am Vagus der Ratte außerdem deutlich größer als bei den anderen Präparaten. Die mittlere Schwellenänderung betrug 18,8% für die  $\alpha,\beta$ -meATP-Standardkonzentration von 20  $\mu$ M (n=14), mit einem Maximum von 34,4%. Für die verwendeten Konzentrationen 1, 5, 10, 20 und 40  $\mu$ M zeigte sich hierbei eine nahezu lineare Konzentrationsabhängigkeit (vgl. Abb. 5).

Der unspezifische P2X-Purinozeptor-Antagonist **iso-PPADS** konnte die erzeugte  $\alpha,\beta$ -meATP-Wirkung in den verwendeten Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  deutlich reduzieren (Abb. 4). Die durchschnittliche Reduktion betrug etwa 85%. **TNP-ATP**, ein spezifischerer Antagonist für P2X1-, P2X3- und heteromere P2X2/3-Rezeptoren, erzeugte jedoch darüber hinaus in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  stets eine nahezu komplette Blockade der  $\alpha,\beta$ -meATP-Wirkung.

**Ap5A** (Diadenosinpentaphosphat, 5 bis 40  $\mu\text{M}$ ) zeigte am Ratten-Vagus ebenfalls die von allen Präparatetypen stärkste Reaktion. Die Senkung der Reizschwelle war geringfügig schwächer als die in den entsprechenden Konzentrationen durch  $\alpha,\beta$ -meATP erzeugte und deutlich stärker als die durch ATP (100 bis 300  $\mu\text{M}$ ) hervorgerufenen. Hierbei zeigte sich, wie in Abb. 5 dargestellt, wiederum eine deutliche lineare Konzentrationsabhängigkeit für die getesteten Konzentrationen zwischen 5 und 40  $\mu\text{M}$ . Die Schwellenwertreduktion lag für 5  $\mu\text{M}$  bei 2,8%, für 10  $\mu\text{M}$  bei 5,5%, für 20  $\mu\text{M}$  bei 13,2% und für 40  $\mu\text{M}$  bei 24,1%. Ebenfalls ähnlich wie bei  $\alpha,\beta$ -meATP konnte diese Reaktion auch bei Ap5A durch **iso-PPADS** sowie **TNP-ATP** (je 10  $\mu\text{M}$ ) deutlich reduziert werden, wenngleich nicht ganz so stark (jeweils etwa 60%).

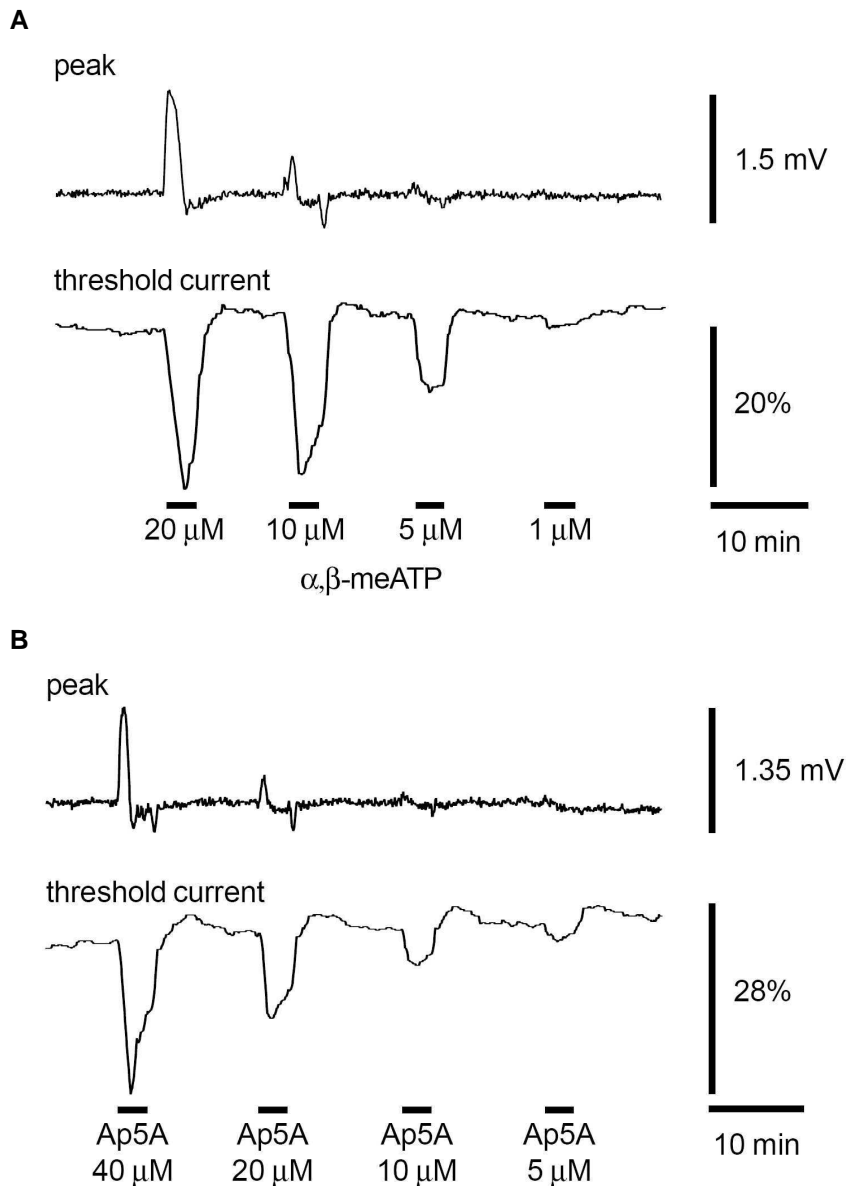


Abb. 5: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus vagus der Ratte unter Applikation von (A)  $\alpha,\beta$ -meATP und (B) Ap5A in verschiedenen Konzentrationen

Die Abbildung zeigt in beiden Teilen zwei zur gleichen Zeit registrierte Spuren des QTRAC-Programmes. Alle 4, in (A) und (B) dargestellten Kurvenabschnitte entstammen dem selben Präparat und Messvorgang. Jeweils die obere und die untere Kurve beider Abbildungsteile entsprechen hierbei der selben Spur mit entsprechend identischen Messparametern.

Die untere Kurve der beiden Abbildungen zeigt analog zu Abbildung 4 den Verlauf des Schwellenstromes, welcher zur Erzeugung eines C-Faser-Summenaktionspotentials einer Stärke von 40% des maximalen Summenaktionspotentials verantwortlich ist. Auch hier ist ein hyperpolarisierender Präpuls von 40% des Schwellenstromes mit einer Dauer von 50 ms vorgeschaltet.



In der jeweils oberen Kurve ist der entsprechende Peak-Wert des als Reaktion auf den Reizstrom erzeugten Summenaktionspotentials dargestellt.

(A) zeigt vier aufeinander folgende Applikationsvorgänge von  $\alpha,\beta$ -meATP mit Konzentrationen von 20  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$ . Appliziert wurde jeweils für 3 Minuten im Abstand von 10 Minuten.

Deutlich erkennbar ist wiederum der sehr heftig einsetzende und steile Verlauf der erzeugten Erregbarkeitsänderung sowie die ebenfalls sehr steile Rückkehrphase mit einem geringfügig über das Ausgangsniveau überschießenden Verlauf.

(B) stellt eine entsprechende Messreihe mit Ap5A in Konzentrationen von 40, 20, 10 und 5  $\mu\text{M}$ , wiederum mit einer Applikationsdauer von je 3 Minuten und Abständen von 12 Minuten, dar. Die Onset-Phase ist hierbei sogar noch steiler ausgeprägt als bei  $\alpha,\beta$ -meATP, die Return-Phase nur unwesentlich kürzer. Gut sichtbar ist auch wieder die überschießende Reaktion bei Rückkehr zum Normalniveau.

In beiden Schwellenwertkurven ist die Konzentrationsabhängigkeit der Erregbarkeitsänderung gut zu erkennen.

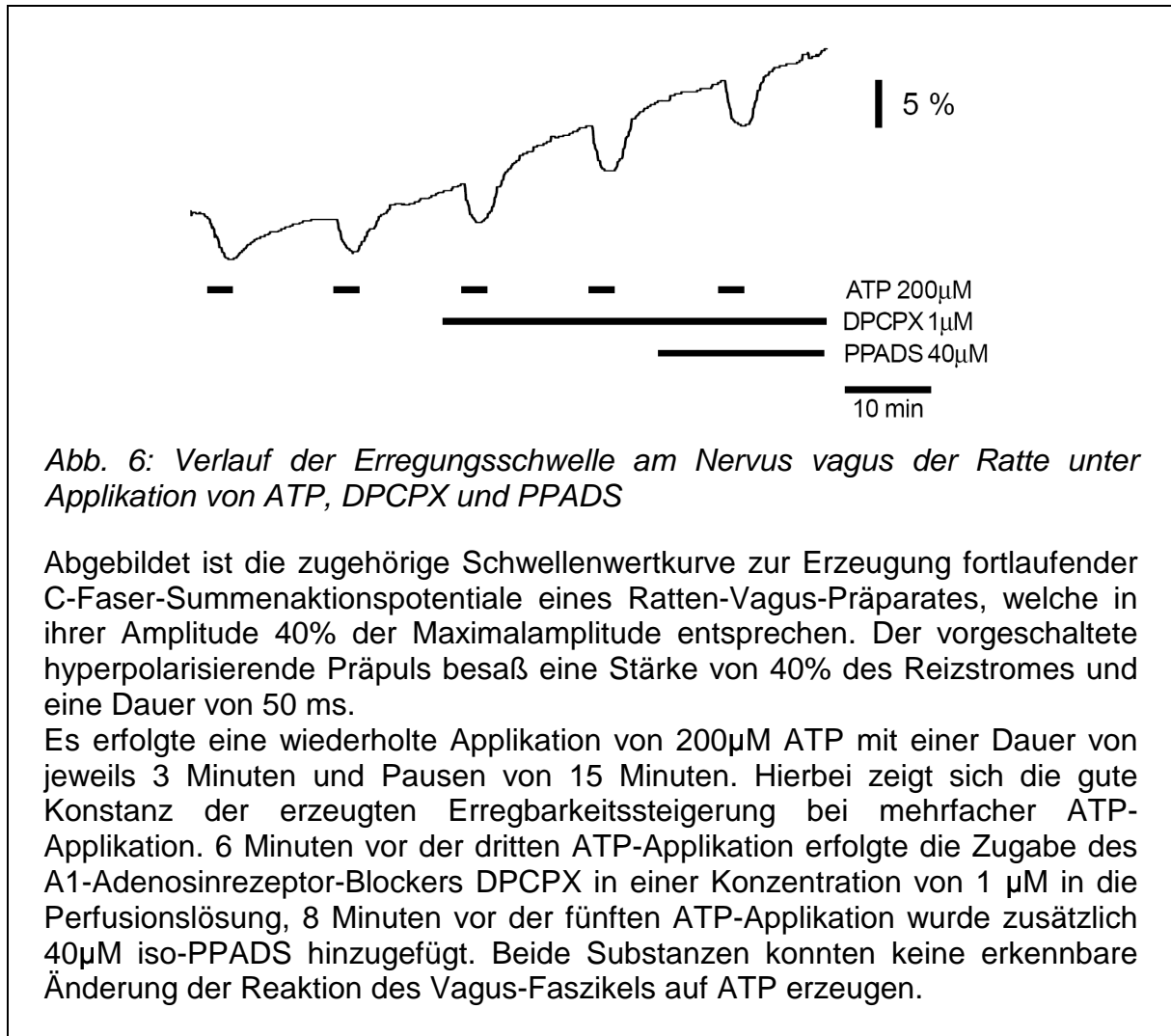
Der in der jeweils oberen Kurve dargestellte Peak-Verlauf zeigt jedoch, dass diese Darstellung der Schwellenreduktion noch nicht ideal ist: die reaktive Regelung des Reizstromes durch die Versuchsapparatur ist für solche vor allem bei den höheren Konzentrationen sehr heftigen Reaktionen nicht schnell genug, um den Peak-Wert konstant halten zu können. Daraus resultieren die deutlichen Ausschläge in den Peak-Kurven, welche wiederum in einer ungenügenden Auslenkung der Schwellenwert-Kurve resultieren.

**ATP** zeigte in allen getesteten Konzentrationen (100 bis 300  $\mu\text{M}$ ) deutlich geringere Effekte als die durch  $\alpha,\beta$ -meATP und Ap5A hervorgerufenen. Hierbei konnte jedoch auf Grund der starken Bandbreite zwischen den einzelnen untersuchten Faszikeln für die getesteten Konzentrationen keine direkte Konzentrationsabhängigkeit festgestellt werden. Die mittlere Schwellenwertreduktion betrug für 100  $\mu\text{M}$  5,4% (n=24), für 200  $\mu\text{M}$  4,8% (n=6) und für 300  $\mu\text{M}$  4,6% (n=3).

Im Gegensatz zur Wirkung von  $\alpha,\beta$ -meATP und Ap5A zeigten die mittels ATP erzeugten Reaktionen eine sich relativ langsam entwickelnde Senkung der Erregungsschwelle. Des Weiteren wurde diese Schwellenreduktion durch **TNP-ATP** nur geringfügig reduziert (<20% bei 10  $\mu\text{M}$ ). Der durch TNP-ATP hervorgerufene Effekt auf die Wirkung der an den Ratten-Vagus-Präparaten getesteten Substanzen war teilweise reversibel nach einer Auswaschzeit von 15 Minuten.

Anders als die Wirkung von  $\alpha,\beta$ -meATP und Ap5A ließ sich die erzielte ATP-Wirkung durch **iso-PPADS** (10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) nicht reduzieren (Abb. 4 und 6).

Auch bei der gleichzeitigen Applikation des selektiven A1-Adenosinrezeptor-Blockers **DPCPX** (1  $\mu$ M) zeigte sich keinerlei Änderung (Abb. 6).



Eine gleichartige Reaktion wie die durch ATP hervorgerufene zeigte sich am Ratten-Vagus auch bei Applikation von **Adenosindiphosphat**, wie in Abb. 7 dargestellt ist. Die erzeugte Schwellenreduktion von 7,7% für 100  $\mu$ M (n=2) lag dabei ebenfalls auf vergleichbarem Niveau.

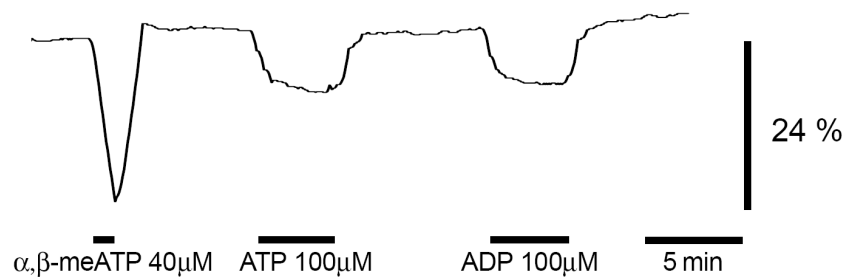


Abb. 7: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus vagus der Ratte unter Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP, ATP und ADP

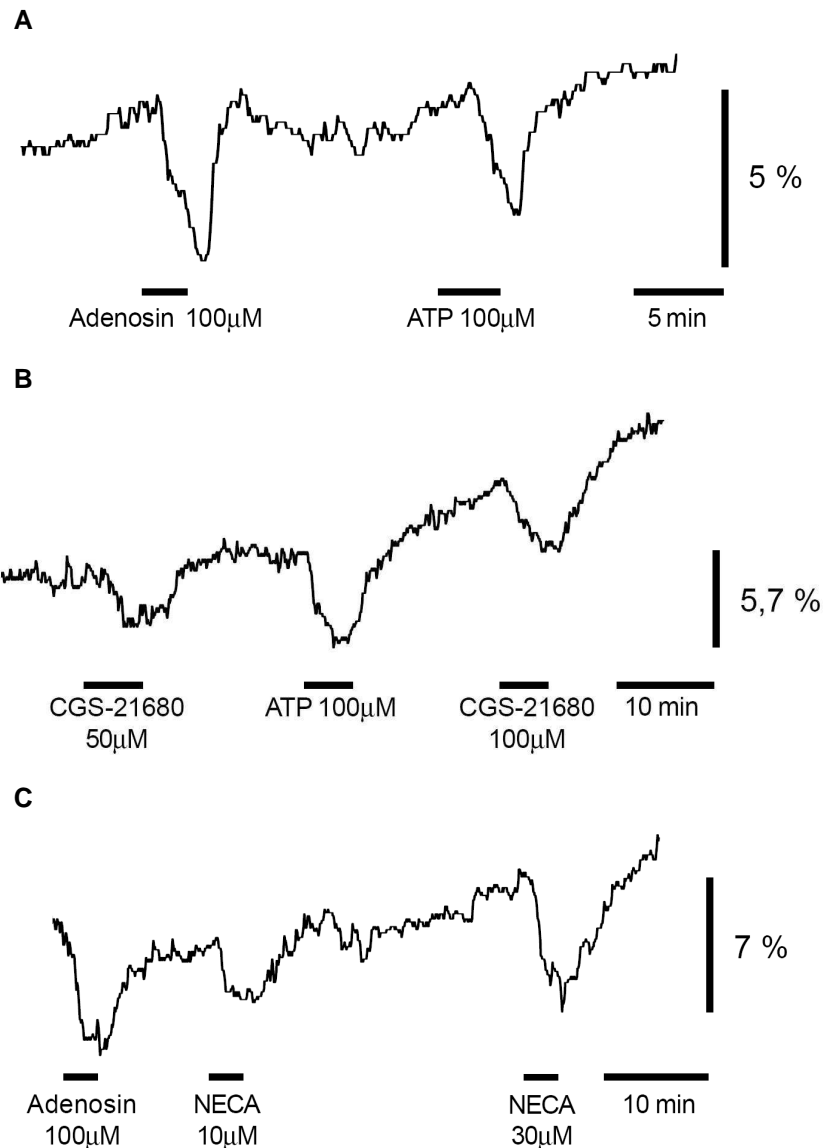
Die Abbildung zeigt den Kurvenverlauf des erzeugten Reizstromes notwendig zur Auslösung von Summenaktionspotentialen der C-Fasern des Ratten-Vagus-Präparates, welche in ihrer Amplitude 40% der Maximalamplitude entsprechen. Es wurde ein hyperpolarisierender Präpuls mit einer Stärke von 40% des eigentlichen Reizstromes und einer Dauer von 50 ms vorgeschaltet.

Appliziert wurden nacheinander  $\alpha,\beta$ -meATP (40  $\mu$ M; 1 min; 24,3%), ATP (100  $\mu$ M; 4 min; 9,0%) und ADP (100  $\mu$ M; 4 min; 8,2%). Gut erkennbar ist hierbei der im Gegensatz zu der kurzen, heftigen und stark ausgeprägten Reaktion auf  $\alpha,\beta$ -meATP nahezu identische Verlauf der Schwellenwertkurven bei Applikation von ATP und ADP mit einer vergleichsweise langsamen Steigerung der Erregbarkeit, deutlicher Sättigungskinetik und langer Konstanz des erreichten Niveaus sowie trotz der höheren Konzentration wesentlich geringeren Amplitude.

Auch **Adenosin** zeigte am Ratten-Vagus-Präparat eine Reaktion, die bei gleicher Konzentration sowohl vom Verlauf als auch nahezu vom Ausmaß der durch ATP erzeugten entsprach (Abb. 8A). Es wurde eine mittlere Schwellenwertreduktion von 3,4% für 100  $\mu$ M (n=12) sowie 4,4% für 200  $\mu$ M (n=4) erzielt.

Durch Applikation des A<sub>2</sub>-Adenosinrezeptor-Agonisten **CGS-21680** konnte mit einer mittleren Schwellenwertreduktion von 3,6% für 100  $\mu$ M ein mit der Adenosinreaktion für diese Konzentration vergleichbarer Wert festgestellt werden. Auch das Profil der Reaktion zeigte die gleiche Charakteristik (Abb. 8B).

Die Werte für den A<sub>2</sub>-Adenosinrezeptor-Agonisten **NECA** lagen mit 3,8% für 10  $\mu$ M leicht und mit 6,7% für 30  $\mu$ M deutlich über dem 100 $\mu$ M-Adenosin-Referenzwert. Jedoch wurde diese Messung für beide Konzentrationen nur je einmal durchgeführt. Der 100 $\mu$ M-Adenosin-Wert hatte mit 5,8% für diesen Faszikel ebenfalls deutlich über dem entsprechenden Mittelwert gelegen (Abb. 8C).



*Abb. 8: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus vagus der Ratte unter Applikation von Adenosin und Adenosinrezeptor-Agonisten sowie ATP*

Abgebildet ist in allen Teilen der Ausschnitt der Schwellenwertkurve einer Erregbarkeitsmessung an verschiedenen Präparaten des Ratten-Vagus. Hierzu wurden in allen drei Fällen Summenaktionspotentiale der langsam leitenden Faserpopulationen erzeugt, deren Stärke 40% des maximal erzeugbaren SAP dieser Fasern betrug. Der hyperpolarisierende Präpuls betrug in (A) und (C) 40%, in (B) 30%.

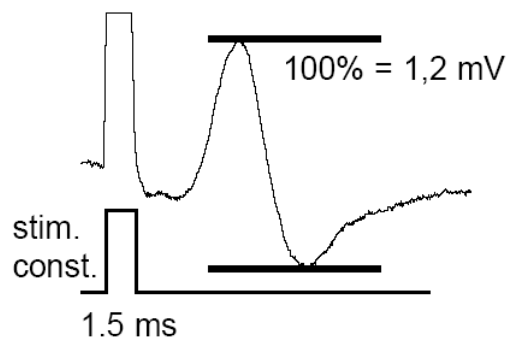
In (A) ist im direktem Vergleich die Applikation von Adenosin und ATP in identischer Konzentration von 100 µM dargestellt. Hier zeigt sich, dass der Verlauf beider Schwellenwertreduktionen sowohl quantitativ (Schwellenreduktion Adenosin 4,6% / ATP 3,6%) als auch qualitativ nahezu identisch ist. Beide zeigen über den Zeitraum der Applikation einen moderaten, relativ gleichmäßig verlaufenden Anstieg der Erregbarkeit der Nervenfasern, welche sich nach Beendigung der Applikation schnell wieder bis zum Ausgangswert verringert.

(B) zeigt den Verlauf der durch den A<sub>2</sub>-Adenosinrezeptor-Agonisten CGS-21680 in einer Konzentration von 50 µM vor und 100 µM nach vergleichender Applikation von 100 µM Adenosin erzeugten Schwellenreduktion. Auch der Kurvenverlauf von CGS-21680 besitzt die für (A) beschriebenen Eigenschaften. Das Ausmaß der Schwellenreduktion unterscheidet sich geringfügig für beide Applikationen (3,2% / 4,1%), es ist etwas geringer als das durch ATP erzeugte (5,7%).

In (C) ist der direkte Vergleich der Erregbarkeitssteigerung bei Applikation des A<sub>2</sub>-Adenosinrezeptor-Agonisten NECA in Konzentrationen von 10 µM und 30 µM mit der durch 100µM Adenosin erzeugten abgebildet. Auch für NECA zeigt sich der zuvor beschriebene moderate Anstieg der Erregbarkeit mit ausgeprägter Sättigungskinetik. Die Rückkehr zum Ausgangsniveau nach Beendigung der Applikation ist geringgradig langsamer ausgeprägt als bei Adenosin. Das Ausmaß der Schwellenreduktion ist für 10 µM deutlich geringer (3,5%), für 30 µM geringfügig stärker (6,9%) als bei Adenosin-Applikation (5,3%).

### ***Nervus suralis der Ratte:***

Die Resultate am Ratten-Suralis unterschieden sich deutlich von den am Ratten-Vagus gesehenen. Der zeitliche Verlauf der Reizung und der resultierenden Summenaktionspotentiale glich dem der Nervus-vagus-Präparate, die Maximalamplitude der C-Faser-SAPs war aber nur etwa halb so groß. Insgesamt betrachtet waren die durch die Suralen generierten Signale deutlich unruhiger, die Schwellenwertkurven zeigten somit einen wesentlich zackenförmigeren Verlauf.



*Abb. 9: abgeleitetes Summenaktionspotential eines Präparates des Nervus suralis der Ratte*

Abgebildet ist analog zu Abbildung 3 im oberen Anteil der Ausschnitt einer Momentaufnahme des in Messspur 1 des Programmes QTRAC<sup>®</sup> dargestellten Eingangssignals der Datenverarbeitungssequenz. Er zeigt ein unmanipuliertes Summenaktionspotential eines Suralis-Präparates der Ratte bei einer der maximalen Amplitude entsprechenden Reizstärke. Darunter befindet sich eine schematische, zeitsynchrone Abbildung des dafür genutzten Reizstromes.

Der erste Peak entspricht der direkten Ableitung des Reizstromes auf das Messsystem und ist in der Abbildung nach oben abgeschnitten. Der zweite Peak ist ausgelöst durch das reaktive Summenaktionspotential langsam leitender Faserpopulationen des Faszikels (C-Fasern). Der zwischen den beiden horizontalen Balken befindliche Bereich entspricht 100% der für die weiteren Berechnungen und submaximalen Reizungen des Präparates zugrundeliegenden Amplitude.

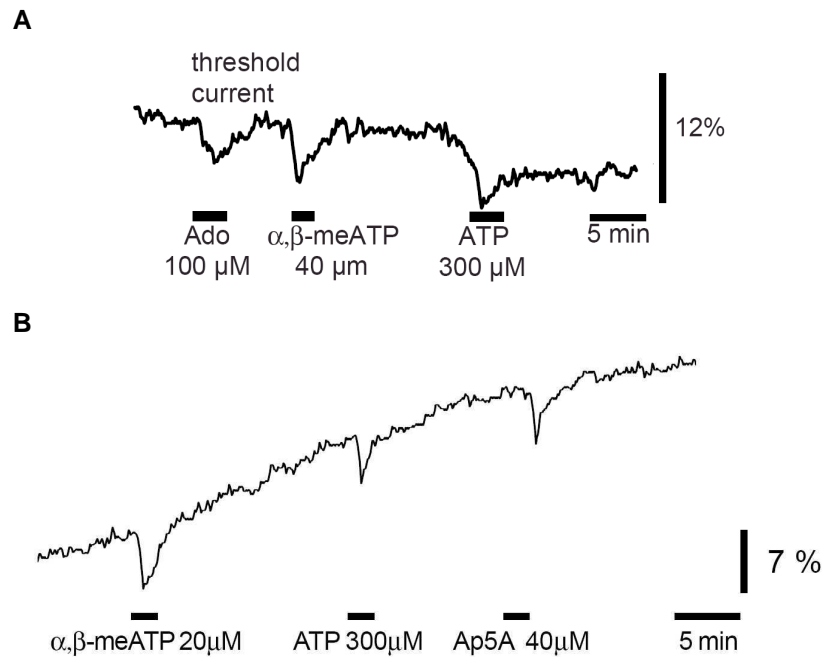


Abb. 10: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus suralis der Ratte unter Applikation von Adenosin,  $\alpha,\beta$ -meATP, ATP und Ap5A

Beide Abbildungen zeigen typische Ausschnitte aus Schwellenwertmessungen an zwei verschiedenen Präparaten des Nervus suralis der Ratte. Es wurden Summenaktionspotentiale der langsam leitenden Axone der Nerven erzeugt, welche 40% der maximalen Summenaktionspotentiale der selben Fasern entsprechen. Der verwendete hyperpolarisierende Präpuls betrug 40% der genutzten Reizstromstärke.

Es zeigt sich in beiden Kurven der im Vergleich zum Vagus der Ratte typische unruhigere Signalverlauf. Die durch Applikation der Purinrezeptor-Agonisten  $\alpha,\beta$ -meATP, ATP und Ap5A erzeugten Kurvenauschläge zeigen alle nahezu die gleiche Gestalt. Sie sind gekennzeichnet durch eine rapide Zunahme der Erregbarkeit und eine kurze Dauer sowie eine rasche Rückkehr zum Ausgangsniveau.

Die Reaktion auf Adenosin-Applikation hingegen kennzeichnet ein vergleichbar langsamer Verlauf mit wesentlich flacherer Gestalt sowohl der Onset- als auch der Return-Phase.

Applikation von **ATP** induzierte in einigen Fällen eine Zunahme der C-Faser-Erregbarkeit. Im Gegensatz zum Ratten-Vagus-Präparat konnte diese Reaktion jedoch nicht immer erzielt werden.

Der Verlauf der positiven ATP-Reaktionen zeigte ein deutlich anderes Profil als im Vagus-Präparat. Die Onset-Phase war wesentlich steiler und der Peak bereits nach einer deutlich kürzeren Zeitspanne erreicht. Die Dauer der Schwellensenkung betrug bis zu fünf Minuten.

Durch Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP konnte regelmäßig eine Schwellenreduktion erzielt werden. Diese Änderungen besaßen eine gute Konzentrationsabhängigkeit für jeweils am selben Präparat durchgeführte Messungen, wie in Abbildung 11 dargestellt.

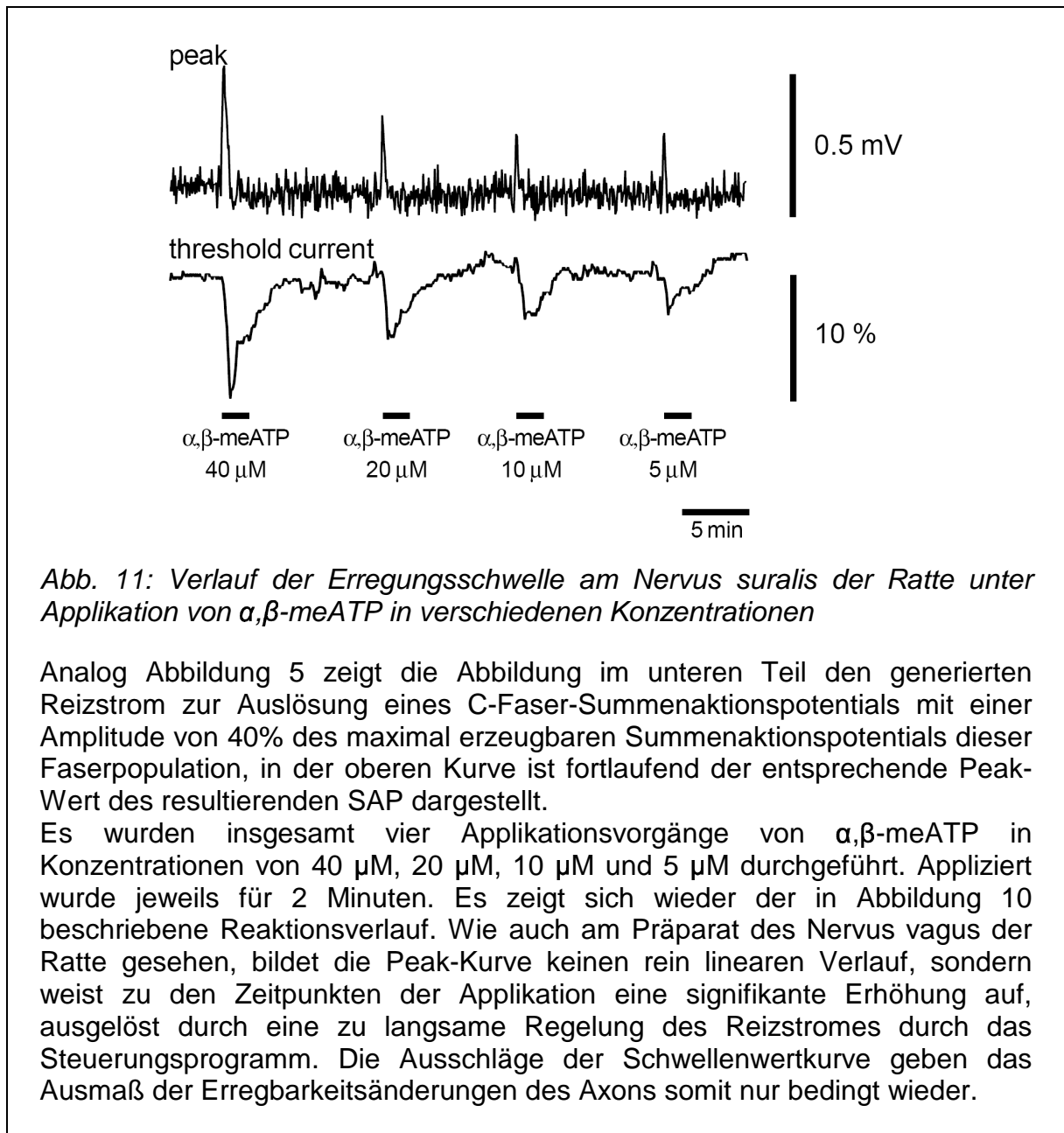


Abb. 11: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus suralis der Ratte unter Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP in verschiedenen Konzentrationen

Analog Abbildung 5 zeigt die Abbildung im unteren Teil den generierten Reizstrom zur Auslösung eines C-Faser-Summenaktionspotentials mit einer Amplitude von 40% des maximal erzeugbaren Summenaktionspotentials dieser Faserpopulation, in der oberen Kurve ist fortlaufend der entsprechende Peak-Wert des resultierenden SAP dargestellt.

Es wurden insgesamt vier Applikationsvorgänge von  $\alpha,\beta$ -meATP in Konzentrationen von 40  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 10  $\mu$ M und 5  $\mu$ M durchgeführt. Appliziert wurde jeweils für 2 Minuten. Es zeigt sich wieder der in Abbildung 10 beschriebene Reaktionsverlauf. Wie auch am Präparat des Nervus vagus der Ratte gesehen, bildet die Peak-Kurve keinen rein linearen Verlauf, sondern weist zu den Zeitpunkten der Applikation eine signifikante Erhöhung auf, ausgelöst durch eine zu langsame Regelung des Reizstromes durch das Steuerungsprogramm. Die Ausschläge der Schwellenwertkurve geben das Ausmaß der Erregbarkeitsänderungen des Axons somit nur bedingt wieder.

Die Wirkungen von  $\alpha,\beta$ -meATP zeigten stets einen schnellen Beginn und eine relativ kurze Dauer. Die Änderung der Erregungsleitung war so rapide, dass es initial zu einer deutlichen Erhöhung des Peaks kam, bevor dieser durch die Regulation des



Stimulationsstromes wieder auf 40% des maximalen Summenaktionspotentials reduziert werden konnte. Die Rückkehr zum Ausgangsniveau zeigte hierbei häufig einen deutlich zweiphasigen Charakter, bestehend aus einer schnellen und einer langsamen Komponente.

Blockieren ließen sich diese Reaktionen durch vorherige Applikation von **iso-PPADS** in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  (Abb. 12A) sowie durch Applikation von **TNP-ATP** in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  (Abb. 12B). Diese Effekte zeigten eine gute Reversibilität.

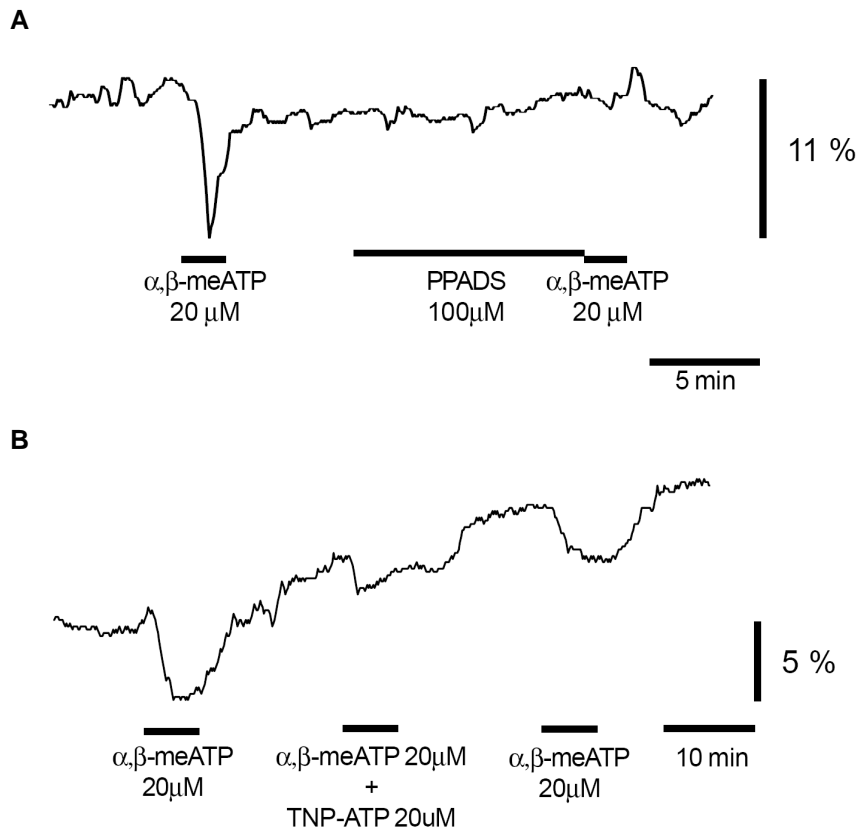


Abb. 12: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus suralis der Ratte unter Applikation von  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  sowie Antagonisierung durch  $\text{PPADS}$  und  $\text{TNP-ATP}$

Beide Abbildungen zeigen den Kurvenverlauf des erzeugten Reizstromes notwendig zur Auslösung von C-Faser-Summenaktionspotentialen der Ratten-Suralis-Präparate, welche in ihrer Amplitude 40% der Maximalamplitude entsprechen. Es wurde bei beiden Versuchen ein hyperpolarisierender Präpuls mit einer Stärke von 40% des eigentlichen Reizstromes und einer Dauer von 50 ms vorgeschaltet. In beiden Fällen konnte durch  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  in einer Konzentration von  $20\ \mu\text{M}$  eine deutliche Reduktion der Erregungsschwelle herbeigeführt werden. (B) zeigt hierbei aber einen für  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  eher untypischen Verlauf mit relativ langsamer Reaktion des Faszikels.

Dargestellt in (A) ist die vollständige Blockade der Reaktion auf  $20\ \mu\text{M}$   $\alpha,\beta\text{-meATP}$  durch iso-PPADS in einer Konzentration von  $100\ \mu\text{M}$ . 6 Minuten nach Applikation von  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  mit einer deutlichen Schwellenstromsenkung wurde  $\text{PPADS}$  für 10 Minuten appliziert. Die direkt im Anschluss erfolgte erneute Applikation von  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  erzeugte keine signifikante Reaktion.

(B) zeigt die teilweise Antagonisierung der  $\alpha,\beta\text{-meATP}$ -Wirkung durch  $\text{TNP-ATP}$ . 8 Minuten nach dreiminütiger Applikation von  $20\ \mu\text{M}$   $\alpha,\beta\text{-meATP}$  wurde über einen Zeitraum von 3 Minuten gleichzeitig  $20\ \mu\text{M}$   $\text{TNP-ATP}$  und  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  in gleicher Konzentration appliziert. Die hierdurch erzeugte Schwellenänderung war mit 2,3% deutlich geringer als die durch  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  allein ausgelöste (5,1%). Bei erneuter alleiniger Applikation von  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  nach weiteren 8 Minuten zeigte sich eine zumindest teilweise Reversibilität dieses Effektes (Schwellenänderung 3,0%).

Die Applikation von **ADP** (100  $\mu\text{M}$ ) sowie von  **$\beta,\gamma\text{-meATP}$**  (100  $\mu\text{M}$ , P2X1-Agonist) lieferte keine Reaktion.

**Adenosin** erzeugte ebenso wie ATP nur gelegentliche Anstiege der C-Faser-Erregbarkeit. Diese zeigten einen relativ langsamen Verlauf (Abb. 10), welcher in seinem Profil dem der bereits am Ratten-Vagus beschriebenen Reaktion auf Adenosin entsprach, mit einer allmählichen Senkung der Erregungsschwelle, einem Peak nach etwa 3 Minuten und langsamer Rückkehr zum Ausgangsniveau.

Die Wirkung von **Ap5A** am Ratten-Suralis-Präparat ist dargestellt in Abb. 13. Sie ist vergleichbar der durch  $\alpha,\beta\text{-meATP}$  induzierten, der Anstieg der Erregungsleitung war jedoch nicht ganz so rapide und konnte somit durch das Threshold Tracking besser verfolgt werden, was sich in einer geringeren Peak-Änderung ausdrückt. Auch das Ausmaß der Schwellenreduktion war geringer mit einer durchschnittlichen Änderung von 2,2% für 20  $\mu\text{M}$  (n=1), 2,4% für 40  $\mu\text{M}$  (n=4), 6% für 50  $\mu\text{M}$  (n=7) und 5,3% für 100  $\mu\text{M}$  (n=1). Die zweiphasige Gestalt der Desensibilisierung war aber auch hier meist gut erkennbar.

**TNP-ATP** konnte die durch Ap5A erzielte Reaktion in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  um 76,9%, in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  um 86,3% reduzieren.

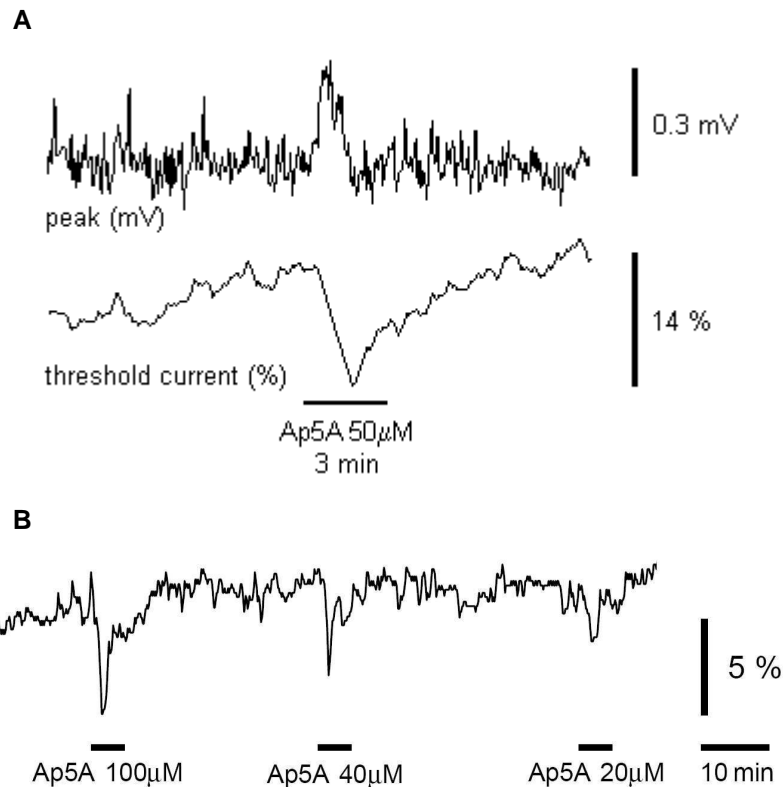


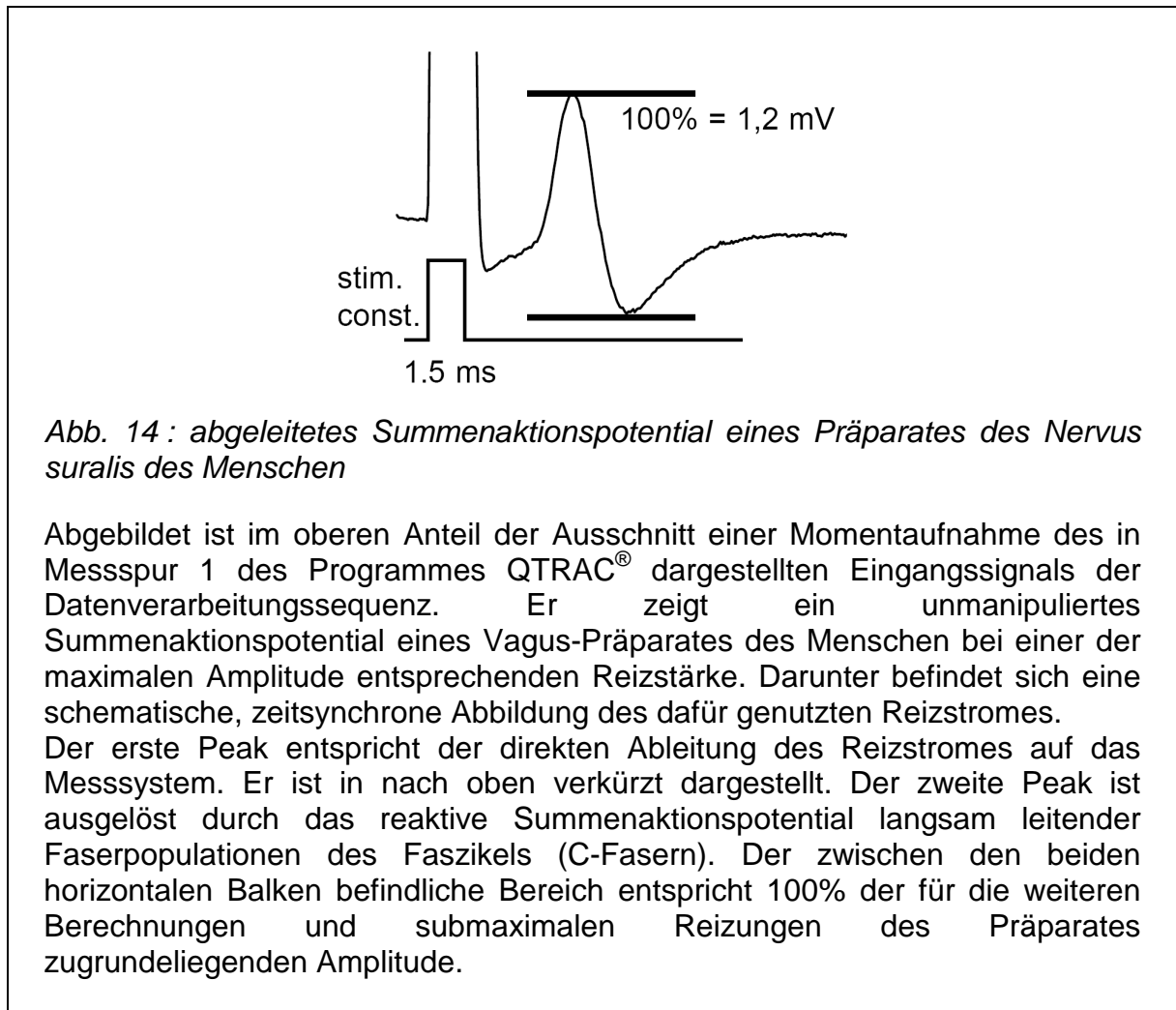
Abb. 13: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus suralis der Ratte unter Applikation von Ap5A

Dargestellt ist wiederum in beiden Teilen der Ausschnitt der Schwellenwertkurve einer Erregbarkeitsmessung an verschiedenen Präparaten des Ratten-Suralis. Hierzu wurden in beiden Fällen Summenaktionspotentiale der C-Fasern erzeugt, deren Stärke 40% des maximal erzeugbaren SAP dieser Fasern entsprach. Der hyperpolarisierende Präpuls betrug jeweils 40%. Im oberen Anteil von (A) ist zusätzlich der zeitgleiche Verlauf des Peak-Wertes des resultierenden Summenaktionspotentials der C-Fasern bei der Applikation von 50µM Ap5A dargestellt. Hierbei wird wieder deutlich, dass auf Grund der sehr schnellen Senkung der Erregungsschwelle der Regelkreis der Steuerungssoftware den Reizstrom nicht schnell genug anpassen kann, was zu einer deutlichen Änderung des SAP und somit zu einer ungenügenden Auslenkung der Schwellenwertkurve führt. Dennoch zeigt die im unteren Anteil von (A) dargestellte Schwellenwertkurve bei einmaliger Applikation von Ap5A in einer Konzentration von 50 µM über 3 Minuten sehr schön die Charakteristik des Verlaufes der Erregbarkeitssteigerung mit einer kurzen, linearen Onset-Phase und einer raschen Rückkehr zum Ausgangsniveau.

In (B) abgebildet ist der Schwellenwertverlauf bei aufeinander folgenden Applikationen von Ap5A in Konzentrationen von 100 µM, 40 µM und 20 µM über einen Zeitraum von jeweils 3 Minuten. Die Schwellenänderungen betrugen 5,3% (100 µM), 4,1% (40 µM) und 2,2% (20 µM).

### ***Nervus suralis des Menschen:***

Die Gestalt und Größe der am humanen Suralis erzeugten Summenaktionspotentiale sowie der erhaltenen Kurvenverläufe unterscheidet sich grundsätzlich kaum von den am Suralis der Ratte gesehenen. Dennoch gibt es bezüglich der spezifischen Reaktionen auf die applizierten Testsubstanzen deutliche Unterschiede.



*Abb. 14 : abgeleitetes Summenaktionspotential eines Präparates des Nervus suralis des Menschen*

Abgebildet ist im oberen Anteil der Ausschnitt einer Momentaufnahme des in Messspur 1 des Programmes QTRAC<sup>®</sup> dargestellten Eingangssignals der Datenverarbeitungssequenz. Er zeigt ein unmanipuliertes Summenaktionspotential eines Vagus-Präparates des Menschen bei einer der maximalen Amplitude entsprechenden Reizstärke. Darunter befindet sich eine schematische, zeitsynchrone Abbildung des dafür genutzten Reizstromes. Der erste Peak entspricht der direkten Ableitung des Reizstromes auf das Messsystem. Er ist in nach oben verkürzt dargestellt. Der zweite Peak ist ausgelöst durch das reaktive Summenaktionspotential langsam leitender Faserpopulationen des Faszikels (C-Fasern). Der zwischen den beiden horizontalen Balken befindliche Bereich entspricht 100% der für die weiteren Berechnungen und submaximalen Reizungen des Präparates zugrundeliegenden Amplitude.

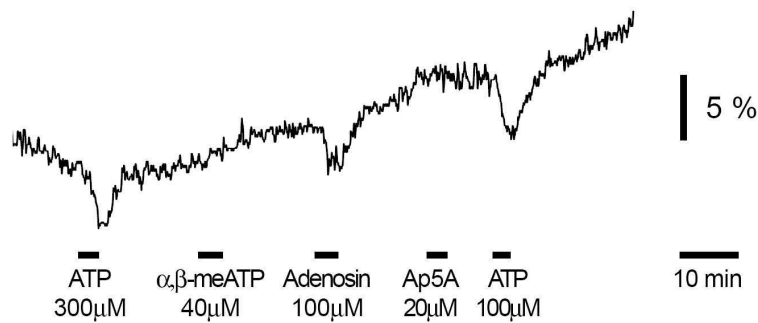


Abb. 15: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus suralis des Menschen unter Applikation von ATP,  $\alpha,\beta$ -meATP, Adenosin und Ap5A

Die Abbildung zeigt einen charakteristischen Ausschnitt der Schwellenwertkurve eines Präparates des Nervus suralis des Menschen, aufgezeichnet bei der Erzeugung von fortlaufenden Summenaktionspotentialen der C-Faser-Population, welche 40% der maximalen Summenaktionspotentiale dieser Fasern entsprechen. Den eigentlichen Testimpulsen wurde jeweils ein hyperpolarisierender Präpuls von 40% der genutzten Reizstromstärke und einer Dauer von 50 ms vorgeschaltet.

Der Kurvenverlauf weist den für diesen Präparattyp typischen unruhigen Charakter auf.

Der menschliche Nervus vagus reagiert, wie abgebildet, mit einer deutlichen Erregbarkeitssteigerung auf die Applikation der Adenosinrezeptor-Agonisten ATP (300  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) und Adenosin (100  $\mu$ M), während sich bei der Zugabe der P2X-Agonisten  $\alpha,\beta$ -meATP (40  $\mu$ M) und Ap5A (20  $\mu$ M) keine Reaktion zeigt.

Durch die Applikation des P2X-Agonisten  **$\alpha,\beta$ -meATP** konnte in nahezu allen Fällen (11 von 12; 20-80  $\mu$ M) keine Änderung der Erregbarkeit produziert werden (Abb. 15).

**ATP** konnte am menschlichen Suralis die von allen Substanzen größte Schwellenänderung erzeugen. Diese war auch deutlich größer als die ATP-induzierte Schwellenänderung an den anderen Präparatetypen. Der Mittelwert für 100  $\mu$ M betrug 7,4% (n=30). Hierbei zeigte sich ebenfalls eine deutliche lineare Konzentrationsabhängigkeit, dargestellt in Abb. 16A.

Im Vergleich zu den anderen Präparaten hatte die Zunahme der Erregbarkeit am humanen Suralis einen relativ langsamen Verlauf und eine lange Dauer, welche bis zu 10 Minuten betrug. Besonders die Onset-Phase besaß eine ausgesprochen flache Gestalt. Die Reaktion zeigte in der Regel auch bei wiederholter Applikation eine gute Reproduzierbarkeit (Abb. 16B), nur in wenigen Fällen kam es bei erneuter ATP-Applikation zu einer verminderten Schwellenreduktion.

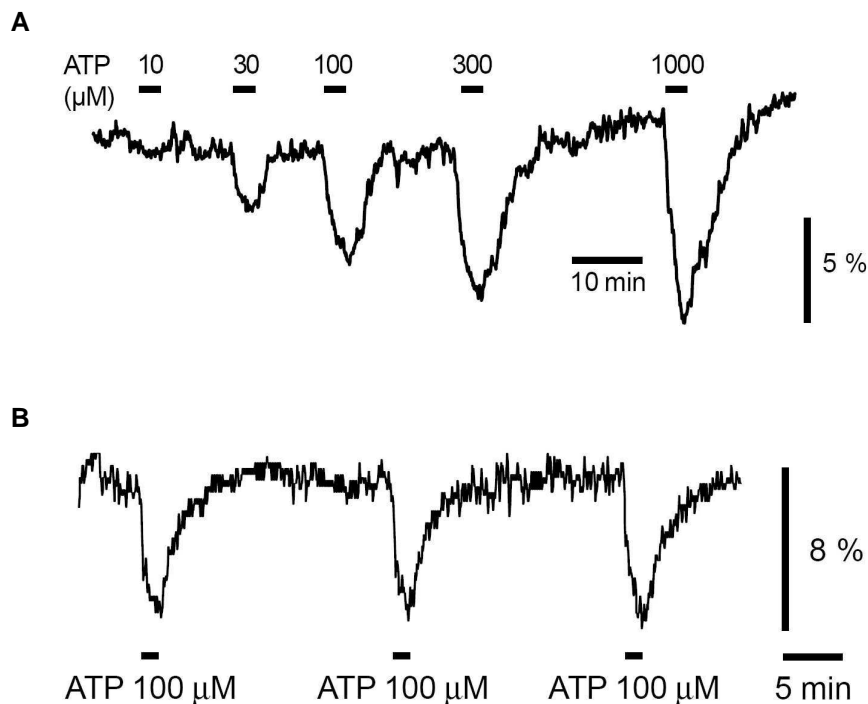


Abb. 16: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus suralis des Menschen bei Applikation von ATP

Beide Schwellenwertkurven entstammen der gleichen Spur der genutzten Software, aufgenommen an verschiedenen Präparaten humaner Suralen. Als Schwelle wurde in (A) ein Summenaktionspotential von 40% , in (B) von 33% des maximalen C-Faser-SAP festgelegt. Die Stärke des hyperpolarisierenden Präpulses betrug 20% des Reizstromes bei einer Dauer von 50 ms.

In beiden Kurven deutlich sichtbar ist der für die ATP-Applikation am humanen Suralis typische langsame Verlauf der Onset- und der Return-Phase und die lange Dauer der Erregbarkeitssteigerung der C-Fasern.

(A) zeigt gut die im Verlauf eines Einzelversuches feststellbare Konzentrationsabhängigkeit der ATP-induzierten Schwellenreduktion des Nerven bei Konzentrationen zwischen 10 µM und 1000 µM.

Der Kurvenverlauf in (B) verdeutlicht die gute Konstanz der bei wiederholter ATP-Gabe jeweils erzeugten Reaktion, welche in den meisten Fällen festgestellt werden konnte. Hier wurde drei mal ATP in einer Konzentration von 100 µM über einen Zeitraum von 1:30 Minuten appliziert. Die zwischen den Applikationsvorgängen liegenden Abstände betragen je 18:30 Minuten.

Die Wirkung von ATP auf die C-Faser-Summenaktionspotentiale konnte, wie in Abb. 17A dargestellt, durch **iso-PPADS** (P2X-Antagonist, 50 µM) nicht beeinflusst werden. **Alloxazin** (A2-Antagonist, 10 µM) hingegen reduzierte jedoch stets deutlich die ATP-Wirkung oder blockierte sie teilweise sogar vollständig (Abb. 17B).

Auch der A1-Antagonist **DPCPX** (1  $\mu\text{M}$ ) konnte eine Reduktion der ATP-Reaktionen hervorrufen.

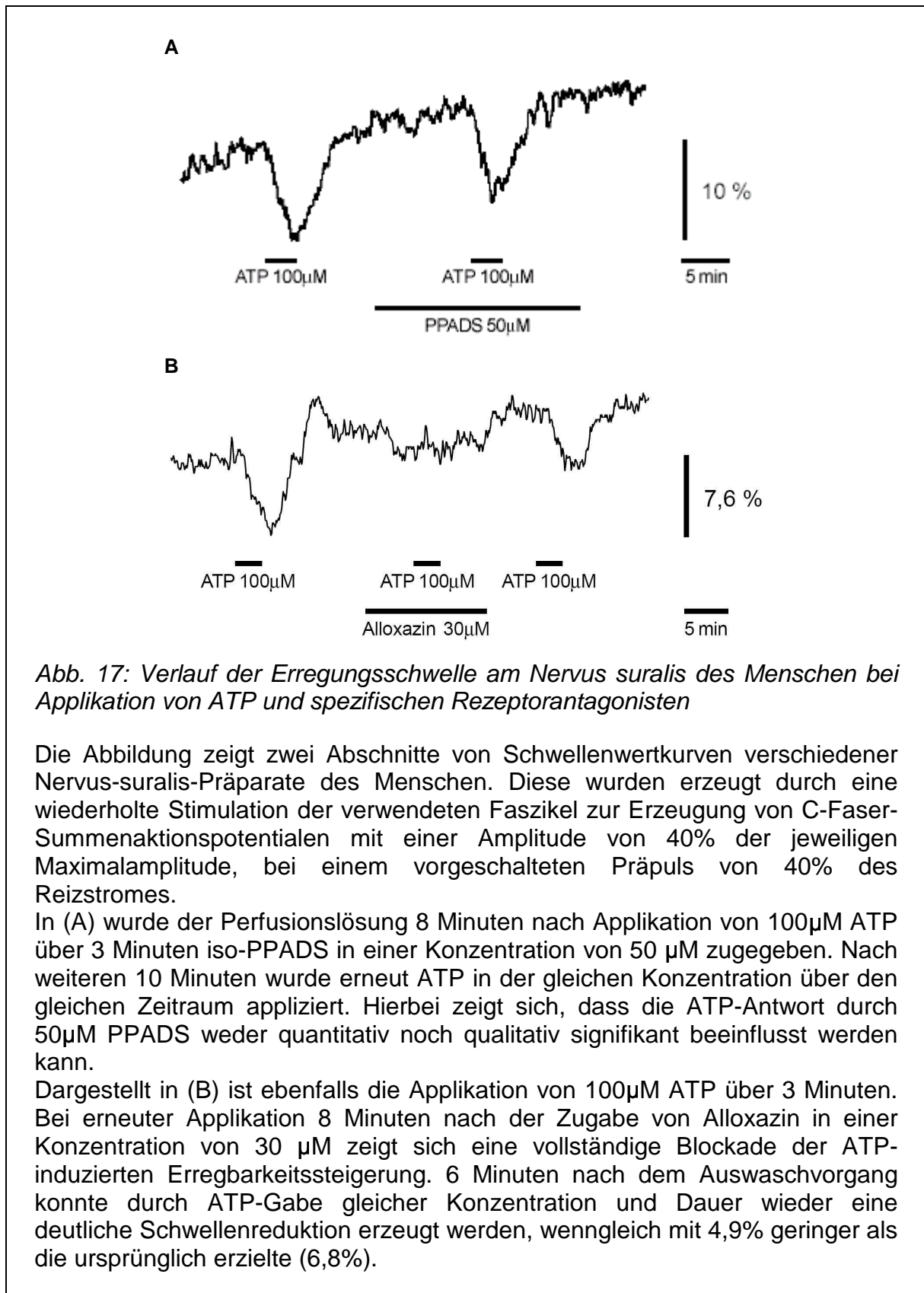


Abb. 17: Verlauf der Erregungsschwelle am Nervus suralis des Menschen bei Applikation von ATP und spezifischen Rezeptorantagonisten

Die Abbildung zeigt zwei Abschnitte von Schwellenwertkurven verschiedener Nervus-suralis-Präparate des Menschen. Diese wurden erzeugt durch eine wiederholte Stimulation der verwendeten Faszikel zur Erzeugung von C-Faser-Summenaktionspotentialen mit einer Amplitude von 40% der jeweiligen Maximalamplitude, bei einem vorgeschalteten Präpuls von 40% des Reizstromes.

In (A) wurde der Perfusionslösung 8 Minuten nach Applikation von 100  $\mu\text{M}$  ATP über 3 Minuten iso-PPADS in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zugegeben. Nach weiteren 10 Minuten wurde erneut ATP in der gleichen Konzentration über den gleichen Zeitraum appliziert. Hierbei zeigt sich, dass die ATP-Antwort durch 50  $\mu\text{M}$  PPADS weder quantitativ noch qualitativ signifikant beeinflusst werden kann.

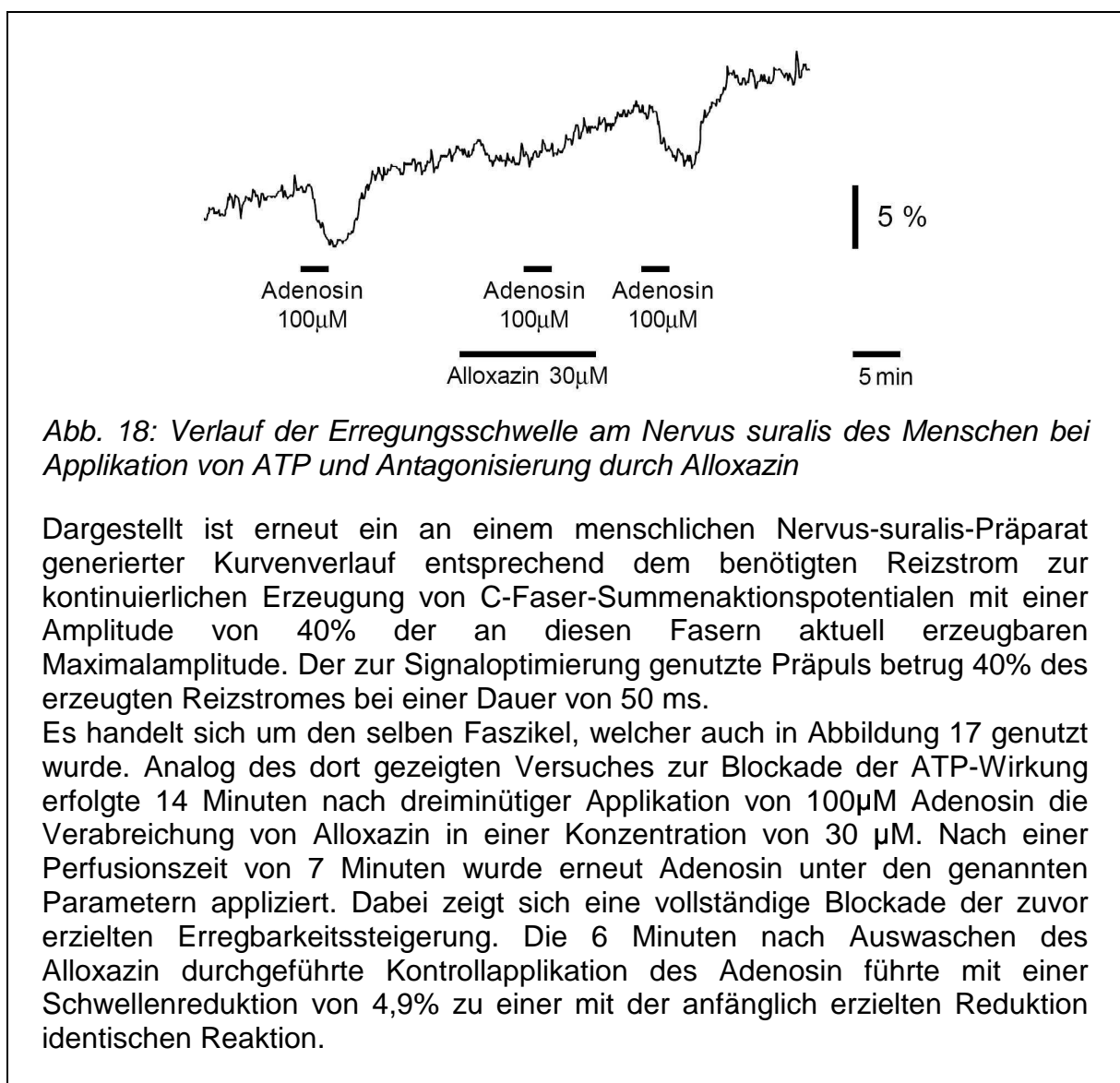
Dargestellt in (B) ist ebenfalls die Applikation von 100  $\mu\text{M}$  ATP über 3 Minuten. Bei erneuter Applikation 8 Minuten nach der Zugabe von Alloxazin in einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  zeigt sich eine vollständige Blockade der ATP-induzierten Erregbarkeitssteigerung. 6 Minuten nach dem Auswaschvorgang konnte durch ATP-Gabe gleicher Konzentration und Dauer wieder eine deutliche Schwellenreduktion erzeugt werden, wenngleich mit 4,9% geringer als die ursprünglich erzielte (6,8%).



**Adenosin** senkte den Schwellenwert für das Auslösen eines Summenaktionspotentials einer Stärke von 40% des Maximalwertes in ähnlicher Weise wie ATP und damit gleichfalls stärker als in allen anderen Präparateklassen (Abb. 15). Die mittlere Schwellenreduktion betrug für 100  $\mu\text{M}$  5,5%.

Auch hier konnte durch den A2-Adenosinrezeptor-Antagonisten **Alloxazin** wieder ebenso wie bei ATP die Verminderung des Schwellenwertes blockiert werden (Abb. 18).

Der A3-Adenosinrezeptor-Antagonist **MRS-1220** produzierte hingegen weder eine Änderung der Reaktion auf ATP noch der auf Adenosin.



Vergleichbare Schwellenänderungen wie ATP und Adenosin rief ebenfalls der A2B-Adenosinrezeptor-Agonist **NECA** hervor, mit einer mittleren Amplitude von 7,6% für 30  $\mu\text{M}$ .

Andererseits konnten jedoch durch den selektiven A1-Adenosinrezeptor-Agonisten **CPA** sowie den spezifischen A2A-Adenosinrezeptor-Agonisten **CGS-21680** (beide 30  $\mu\text{M}$ ) keine Änderungen der Erregbarkeit erzielt werden.

Die Ergebnisse für **Ap5A** zeigten sich recht uneinheitlich. Für eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  ließ sich nur in 2 von 5 Fällen eine Reaktion erzielen, der Mittelwert dieser beiden Schwellenreduktionen betrug 2,5%. Mit einer Konzentration von 40  $\mu\text{M}$  wurden nur 2 Versuche durchgeführt, beide mit positiver Reaktion und einem Mittelwert von 5,1%. Die einmalige Applikation in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  erzeugte eine Kurvenänderung von 3%, die zweimalige Applikation von 60  $\mu\text{M}$  resultierte in einer mittleren Änderung von 2,5%. Der qualitative Vergleich der positiven Ap5A-Reaktionen zeigte zumeist relativ langsam verlaufende Kurvenänderungen sowohl hinsichtlich der Onset- als auch der Return-Phase.

## 5. Diskussion

### *Ergebnisse*

Mit der vorliegenden Methode des Threshold Tracking lassen sich sehr gute quantitative und qualitative Aussagen zur Möglichkeit der in vitro Beeinflussung der Erregbarkeit von peripheren unmyelinisierten Nervenfasern sowohl unter physiologischen als auch nichtphysiologischen Bedingungen treffen.

Hierbei ist vor allem deutlich geworden, dass diese Erregbarkeitsänderungen sich nicht nur an den Nervenendigungen, sondern auch im axonalen Verlauf des Nerven erzeugen lassen. Bei der vorliegenden Arbeit kamen stets nur Präparate zum Einsatz, welche axonalen Abschnitten der Nerven entstammten, eine Wirkung der genutzten Substanzen und Parameter an den Nervertermini wurde somit ausgeschlossen. Entsprechende Ergebnisse für verschiedene Arten von Rezeptoren gab es bereits in vergangenen Studien [8, 55, 72], so wurde beispielsweise ein Wandern von Adenosin-A1-Rezeptoren durch axoplasmatischen Fluss entlang der Ratten-vagus-Fasern beobachtet [42]. Auch für P2X3 konnte durch immunohistochemische Untersuchungen bereits ein Transport in zentrale und periphere neuronale Fortsätze festgestellt werden [83]. Die meisten sich mit P2X-Rezeptoren befassenden Arbeiten betreffen jedoch Somata oder Termini der untersuchten Neuronen.

Des Weiteren zeigten sich bei den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Versuchen signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen untersuchten Präparatgruppen hinsichtlich der Reaktion auf die zur Anwendung gekommenen Substanzgruppen. Daraus lässt sich auf Unterschiede bezüglich der abzuleitenden Verteilung der unterschiedlichen Rezeptortypen oder auf verschiedene pharmakologische Profile der einzelnen Rezeptortypen an verschiedenen Spezies schließen. So konnten in der Vergangenheit zum Beispiel für P2X4 bereits unterschiedliche Reaktionsmuster für Präparate an Menschen und Ratten festgestellt werden [36].

## ***N. vagus der Ratte***

Der Nervus vagus enthält Fasern peripherer sensorischer Neurone, deren Zellkörper sich im Ganglion inferius nn. vagi befinden. Diese entsprechen einem Anteil von etwa 80% der ca. 30000 im zervikalen Vagus enthaltenen Fasern. Etwa 70% dieser sensiblen Fasern gehören zu unmyelinisierten Neuronen abdominaler Viszera [31].

Ein depolarisierender Effekt am isolierten N. vagus der Ratte konnte am Beispiel von ATP in der Vergangenheit vor allem festgestellt werden für die im Ggl. inf. nn. vagi enthaltenen Somata [38, 48, 49, 75]. Einzelne Studien weisen aber auch bereits auf mögliche Rezeptoren an der axonalen Membran hin [76, 77].

Aus den vorliegenden Daten der Präparate des N. vagus der Ratte wird deutlich, dass an den untersuchten Faszikeln die applizierten Prüfsubstanzen  $\alpha,\beta$ -meATP und Ap5A auch in deutlich niedrigeren Konzentrationen wesentlich stärkere Schwellenstromsenkungen hervorrufen konnten als beispielsweise ATP, ADP und Adenosin. Selbst in einer Konzentration von 300  $\mu$ M konnten durch ATP nur vergleichsweise geringe Änderungen erzeugt werden. Dies erscheint interessant, da ATP als wahrscheinlichster natürlicher Agonist für die mit der Erregung nozizeptiver Neurone hauptsächlich assoziierten P2X-Rezeptoren angesehen wird [7, 13, 14, 18, 45, 53, 68], bei welchen es sich neben dem Subtyp P2X2 in erster Linie um den Subtyp P2X3 zu handeln scheint [7, 14, 15, 18, 21, 26, 68, 87]. Es gibt aber auch vermehrt Hinweise darauf, dass aus beiden Untereinheiten bestehende Heteromultimere in die Erregung peripherer sensibler Neurone involviert seien [21, 23, 45, 75, 80, 82]. Hierbei scheint es jedoch spezifische Unterschiede sowohl zwischen verschiedenen Spezies als auch zwischen verschiedenen sensiblen Neuronen innerhalb eines Individuums zu geben [82, 87].

**$\alpha,\beta$ -meATP** gilt als klassischer Agonist an P2X-Purinozeptoren [14]. Die gute Wirksamkeit dieser Substanz an den verwendeten Präparaten impliziert somit das Vorhandensein dieser Rezeptoren am axonalen Anteil der Neuronen. Bestätigt wird dies durch die Antagonisierung der  $\alpha,\beta$ -meATP-Wirkung mittels 10-50  $\mu$ M iso-PPADS, einem unspezifischen Antagonisten der P2X-Rezeptoren [43, 57] (vgl. Abb. 4). Dieses Ergebnis harmoniert mit dem einer Arbeit von Tresize et al. aus dem Jahre 1994 [77]. Die im Gegensatz zu Tresize gemachte Feststellung, dass PPADS keine

komplette Blockade der  $\alpha,\beta$ -meATP-Wirkung erzielen kann, ließe sich durch eine partielle Wirkung über P2X4-Rezeptoren erklären, welche deutlich weniger PPADS-sensitiv sind als die übrigen Subtypen der P2X-Klasse [57, 67].

TNP-ATP wurde jedoch beschrieben als spezifischerer P2X-Agonist mit einer bevorzugten Wirkung an P2X1-, P2X3- und P2X2/3-Rezeptoren [57, 81]. Die an den verwendeten Präparaten erzielte vollständige Blockade der durch  $\alpha,\beta$ -meATP erzielten Reaktion durch diese Substanz engt somit das mögliche Wirkungsspektrum von  $\alpha,\beta$ -meATP am Ratten-Vagus auf diese 3 Unterklassen von P2X-Purinozeptoren ein.

Gegen eine Involvierung von P2X1-Rezeptoren spricht dabei allerdings, dass am isolierten Ratten-Vagus eine Wirkungslosigkeit von  $\beta,\gamma$ -meATP beschrieben wurde [78], welches als relativ spezifischer Agonist an dieser Rezeptorgruppe gilt [57]. Auch Virginio et al. konnten am Ggl. inferius der Ratte keine P2X1-Rezeptoren feststellen [80].

Für die Aktivierung von P2X3-Rezeptoren spricht auch die Gestalt der erzeugten Schwellenwertänderung, mit einer sehr raschen Desensibilisierung und kurzen Dauer [23, 51, 57, 75], wohingegen aktuelle Untersuchungen für heteromere P2X2/3-Rezeptoren eine im Vergleich zu homomeren P2X1- und P2X3-Rezeptoren eher langsame Desensibilisierung feststellen konnten [46, 57, 75].

Als möglicher selektiver Antagonist zur Diskriminierung zwischen homomeren P2X3- und heteromeren P2X2/3-Rezeptoren in sensorischen Neuronen der Ratte wurde Diinosin-Pentaphosphat (Ip(5)I) vorgeschlagen [23]. Dieses stand jedoch bei der Durchführung der geschilderten Versuche nicht zur Verfügung. Bisherige Studien am Ganglion inferius deuten zum einen auf ein Vorhandensein von P2X3-Rezeptoren [7, 26], anderen Veröffentlichungen zufolge könnte aber der native  $\alpha,\beta$ -meATP-sensitive Rezeptor hier durchaus auch ein P2X2/3-Heteromer sein [21, 23, 75, 80].

Liu et al. stellten folgende Rangordnung von Agonisten für die Erregung heteromerer P2X2/3-Rezeptoren an sensorischen Neuronen auf: Ap5A >  $\alpha,\beta$ -meATP >>  $\beta,\gamma$ -meATP > UTP [51]. TNP-ATP wurde hierbei als sehr guter Antagonist beurteilt. Außerdem erwies sich  $\alpha,\beta$ -meATP in diesem Zusammenhang als ineffektiv an rekombinanten homomeren P2X2-Rezeptoren [51, 56, 57]. Allerdings konnten verschiedene Autoren in kultivierten Neuronen des Ggl. inferius durchaus Immunreaktivität für P2X2-Rezeptoren nachweisen [75, 80, 82, 87].

Das gesamte Spektrum der Rezeptoraffinität von **Ap5A** und anderen Diadenosinpolyphosphaten ist derzeit noch nicht vollständig geklärt, diskutiert wird eine Wirkung an P2X- und P2Y-Rezeptoren [63, 65, 85], A1-Adenosinrezeptoren [71] sowie spezifischen Dinukleotidrezeptoren [27, 62]. Die starke Wirkung von Ap5A auf die in den geschilderten Versuchen genutzten Vagus-Präparate weist auf eine mögliche physiologische Rolle des Nukleotids bei der Transduktion schmerzauslösender Reize hin. Die verwendeten Konzentrationen erscheinen jedenfalls in diesen Größenordnungen auch in vivo möglich [10].

Ähnlich der  $\alpha,\beta$ -meATP-Wirkung konnten auch die durch Ap5A erzeugten Reaktionen sowohl durch iso-PPADS als auch durch TNP-ATP deutlich reduziert werden, was wiederum eine Hauptwirkung an P2X1-, P2X3- und P2X2/3-Rezeptoren nahe legt, mit der gleichen Einschränkung für P2X1, wie oben genannt. Gleiches gilt auch für die Form der erzeugten Änderung der Schwellenwertkurve, welche mit ihrer rapiden Änderung und ihrer kurzen Dauer diese Rezeptorzuordnung bestätigen kann. Zudem konnten Liu et al. für Ap5A ebenso wie für  $\alpha,\beta$ -meATP geschildert eine Ineffektivität an P2X2-Rezeptoren nachweisen [51].

Mögliche Quellen für Ap5A in Säugetieren wurden bereits in einigen Studien beschrieben [40, 54], als wahrscheinlichste Hauptquelle für die Erregung nozizeptiver Neurone scheinen hierbei aber nur aktivierte Thrombozyten eine ernstzunehmende Rolle zu spielen, in welchen Diadenosinpolyphosphate aus ATP synthetisiert und in serotoninergen dichten Granula gespeichert werden [24, 10].

Die Tatsache, dass PPADS und TNP-ATP die Ap5A-Wirkung an den Vagus-Axonon zwar deutlich reduzieren, aber dennoch nicht gänzlich blockieren konnten, leitet zu der Vermutung, dass neben P2X-Purinozeptoren noch weitere Rezeptoren in die Wirkung des Dinukleotids involviert sind. Tatsächlich wurde, wie bereits erwähnt, in der Vergangenheit über eine Reihe möglicher weiterer Diadenosinpolyphosphat-sensibler Rezeptoren berichtet. So wurde beispielsweise am Hippocampus der Ratte neben einer P2X- auch eine A1-Adenosin-Rezeptor-vermittelte Wirkung nachgewiesen [40]. An humanen zerebrokortikalen Synapsen wurden außerdem spezifische Dinukleotidrezeptoren als Vermittler der Ap5A-Reaktion identifiziert [62]. Allerdings scheint der Anteil dieser Rezeptoren an der Gesamtwirkung im Ratten-Vagus nur relativ gering zu sein, sonst hätte der Verlauf der aufgezeichneten Schwellenwertkurve eine andere Struktur, und die Wirkung der verwendeten P2X-Rezeptor-Antagonisten wäre deutlich geringer. Dies allein lässt jedoch keine

definitiven Rückschlüsse über die physiologische in-vivo-Bedeutsamkeit beispielsweise von Adenosinrezeptoren zu.

Die **ATP**-vermittelte Reaktion unterscheidet sich am N. vagus der Ratte deutlich von den für  $\alpha,\beta$ -meATP und AP5A beschriebenen. Dies betrifft, wie oben bereits erwähnt, das Ausmaß der erzielten Schwellenreduktion, aber auch der Verlauf der Kurve zeigt erhebliche Unterschiede. Im Gegensatz zu der kurzen, heftigen Reaktion, welche neben weiteren Faktoren auf eine Wirkung an P2X-Purinozeptoren deutet, zeigt sich bei der Applikation von ATP eine deutlich langsamere, flachere Gestalt. Diese erweist sich im direkten Vergleich als nahezu identisch mit der durch Adenosin in gleicher Konzentration vermittelten Reaktion.

Auch die Tatsache, dass die ATP-Wirkung an den verwendeten Ratten-Vagus-Präparaten durch TNP-ATP kaum und durch den unspezifischen P2X-Rezeptor-Antagonisten PPADS gar nicht beeinflusst werden konnte, spricht gegen eine Übertragung der Theorie von einer in erster Linie über P2X-Purinozeptoren vermittelten Wirkung des ATP an unmyelinisierten sensorischen Neuronen auf den Ratten-Vagus. Speziell an homomeren P2X3-Rezeptoren der Ratte wurde zudem in der Vergangenheit eine stärkere Potenz von ATP im Vergleich zu  $\alpha,\beta$ -meATP festgestellt [20, 26], während in den hier beschriebenen Versuchen  $\alpha,\beta$ -meATP stets eine wesentlich stärkere Reaktion erzeugte. (Jedoch nehmen Brouns et al. durchaus eine ATP-Wirkung auf P2X3-Rezeptoren an sensiblen Nervenendigungen der Ratten-Lunge an, deren Ursprung im Ganglion inferius des N. vagus zu liegen scheint [7]. Thomas et al. beschreiben außerdem auch eine Wirkung von ATP auf P2X2- und P2X2/3-Rezeptoren in kulturierten Neuronen des Ggl. inferius [75].)

Die im Vergleich mit ATP und Adenosin nahezu identische Wirkung der A2-Adenosinrezeptor-Agonisten CGS-21680 (A2a) und – wenngleich bei geringerer Konzentration – NECA (A2b) [52] verstärkt aber zudem den bereits gewonnenen Eindruck einer in erster Linie über Adenosinrezeptoren erzielten Vermittlung der ATP-Wirkung. Adenosin-A2-Rezeptoren gelten als Hauptvermittler der Adenosinantwort an peripheren sensorischen Neuronen [18, 22]. Ihr Vorhandensein konnte bereits nachgewiesen werden für Somata und zentrale Termini des Nervus vagus der Ratte, allerdings konnten in dieser Studie Reaktionen auf den Adenosin-A2a-Agonisten CGS-21680 nur bei gleichzeitiger Präsenz des A1-Agonisten PACPX beobachtet werden [19].

Die Ursache für eine nur geringgradige Vermittlung der ATP-Reaktion über P2X-Rezeptoren bei dafür möglicherweise fast gänzlicher Wirkung über Adenosin-Rezeptoren in den verwendeten Präparaten könnte in einem Abbau des ATP zu Adenosin liegen [18]. Über die Existenz von hierfür verantwortlichen Ektonukleotidasen wurde in der Vergangenheit mehrfach berichtet [6, 18, 27, 44, 45, 50, 73, 89, 90, 91]. Hierbei entwickelte sich des Weiteren die Erkenntnis, dass sowohl  $\alpha,\beta$ -meATP als auch Ap5A diesem Abbau in wesentlich geringerem Maße als ATP zu unterliegen scheinen, was die deutlich stärkere Wirksamkeit dieser beiden Substanzen erklären könnte [10, 84, 85]. Entsprechende Inhibitoren zur Überprüfung des Einflusses solcher Enzyme kamen jedoch im Rahmen der beschriebenen Versuche nicht zum Einsatz.

Die möglichen Quellen extrazellulären ATPs sind vielfältig, identifiziert werden konnten beispielsweise sympathische Nerven, Endothelzellen, Tumorzellen [13] und Merkel-Zellen [18].

Nimmt man an, dass die ATP-Reaktion in erster Linie über eine Wirkung an Adenosinrezeptoren ausgelöst wird, so ist natürlich im Umkehrschluss davon auszugehen, dass **Adenosin** in vivo in der Lage sein sollte, eine ähnliche stimulierende Potenz auf die Neurone des Ratten-Vagus ausüben. Die nahezu identischen Kurvenverläufe in den hier vorgestellten Messungen weisen darauf hin.

Inzwischen ist in einer an isolierten Nervenfasern des Ratten-Vagus durchgeführten Studie berichtet worden, dass auch eine ATP-Wirkung an P2Y-Rezeptoren von Schwann-Zellen wesentlich zu dem an unmyelinisierten Axonen beobachteten erregenden Effekt von ATP beitragen könnte [34].

### ***N. suralis der Ratte***

An den Präparaten des N. suralis der Ratte waren die Unterschiede zwischen den einzelnen getesteten Substanzen nicht so gravierend wie am N. vagus gesehen, die erzielten Schwellenreduktionen waren zudem meist deutlich geringer. Aber auch hier zeigte sich bei Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP trotz geringerer Dosierung die im direkten Vergleich zu den anderen Substanzen stärkste Reaktion. In Kombination mit einer



wiederum sehr rapiden Senkung der Erregungsschwelle deutet dies auf das dominierende Vorhandensein von ionotropen P2X-Rezeptoren auch am Rattensuralis. Unterstützen lässt sich diese Feststellung weiterhin durch die vollständige Blockade der erzielten Reaktionen mittels des P2X-Antagonisten iso-PPADS.

Ähnlich den Beobachtungen am Vagus-Präparat lässt sich die durch  $\alpha,\beta$ -meATP erzielte Reaktion auch am Suralis durch Applikation von TNP-ATP deutlich reduzieren, wenngleich nicht zu 100 Prozent. Dies weist wiederum auf einen hohen Anteil von dem TNP-ATP-Wirkungsspektrum entsprechenden Rezeptoren der Gruppen P2X1, P2X3 oder P2X2/3 hin. Die Involvierung weiterer Rezeptoren der P2X-Gruppe in die  $\alpha,\beta$ -meATP-Antwort bleibt aber auf Grund der verbliebenen Restsensibilität wahrscheinlich. Tatsächlich konnten in vorangegangenen immunohistochemischen Studien an Hinterwurzel-Ganglionzellen neben dominierenden P2X3-Reaktionen durchaus Nachweise der Gruppen P2X1, P2X2, P2X4, P2X5 und P2X6 erbracht werden [1, 87]. Eine erst kürzlich veröffentlichte Studie zeigte für die P2X-Purinozeptor-mRNA in L5-Hinterwurzel-Ganglienzellen gesunder adulter Ratten folgende Ausprägung: P2X3 >> P2X4 > P2X6 > P2X5  $\approx$  P2X2 > P2X1 [39].

Eine Hauptwirkung über P2X1-Rezeptoren kann auch in den hier beschriebenen Versuchen auf Grund der fehlenden Reaktion auf den selektiven P2X1-Agonisten  $\beta,\gamma$ -meATP ausgeschlossen werden. Allerdings konnte in verschiedenen von Petruska et al. veröffentlichten Studien an Spinalganglien P2X1-Immunoreaktivität primär in kleinen Neuronen festgestellt werden [59, 60, 61]. Diese trat sowohl allein als auch in Kombination mit P2X3-Reaktivität auf, wobei ATP stets schnelle elektrophysiologische Reaktionen erzeugen konnte.

Im Gegensatz zu der am N. vagus beobachteten sehr raschen Desensibilisierung der durch  $\alpha,\beta$ -meATP erzielten Reaktionen zeigte die Rückkehr der Schwellenwertkurve zum Normalniveau an den Präparaten des N. suralis häufig einen zweiphasigen Charakter, bestehend aus einer schnellen und einer langsameren Komponente (vgl. Abb. 11). Ursache hierfür könnte das Vorhandensein von beiden verbleibenden möglichen Haupt-Rezeptortypen, sowohl homomeren P2X3-Rezeptoren mit schneller Desensibilisierung als auch heteromeren P2X2/3-Rezeptoren mit verhältnismäßig langsamerer Desensibilisierung, sein. Tatsächlich wurde in der Vergangenheit bereits häufig über eine entsprechende Präsenz beider Rezeptortypen an Hinterwurzel-Neuronen von Ratten berichtet [21, 26, 59, 60, 82, 87], wobei P2X3-Rezeptoren

vorwiegend an kleinen und P2X2/3-Rezeptoren an mittelgroßen Neuronen lokalisiert werden konnten [5, 79]. Sowohl Grubb et al. als auch Burgard et al. identifizierten in Hinterwurzel-Ganglien drei Neuronentypen: langsam desensitisierende mit P2X2/3-Rezeptoren, schnell desensitisierende mit P2X3-Rezeptoren und „gemischte“ mit den Eigenschaften beider Rezeptortypen [9, 30]. Andere Autoren hingegen konnten mittels immunohistochemischer Versuche an Hinterwurzel-Ganglionzellen nur eine geringe Heteropolymerisation von P2X-Rezeptoren nachweisen [1]. Die Tatsache, dass  $\alpha,\beta$ -meATP bei den Versuchen am Ratten-Suralis eine deutlich stärkere Potenz aufwies als ATP, könnte auch hier gegen ein Überwiegen von P2X3-Rezeptoren sprechen [26].

**Ap5A** konnte an den Suralis-Präparaten der Ratte ebenso wie an den Vagus-Präparaten die zweitstärkste Reaktion erzeugen. Im Gegensatz zum Vagus war diese Reaktion im Vergleich mit der durch  $\alpha,\beta$ -meATP erzielten deutlich geringer, aber trotzdem in den verwendeten Konzentrationen dennoch ausreichend, um auch hier eine physiologische Rolle im Schmerzgeschehen möglich erscheinen zu lassen. Durch TNP-ATP konnte hier ebenfalls der Großteil der erzeugten Schwellenreduktion blockiert werden, was erneut eine Dominanz von Rezeptoren der Gruppen P2X1, P2X3 und P2X2/3 belegt, mit der oben beschriebenen Einschränkung für P2X1. Die verbliebene Reaktion deutet aber auch hier wiederum darauf hin, dass noch weitere Rezeptoren in die Vermittlung der erzeugten Erregung involviert sind.

Die zweiphasige, auf eine Wirkung sowohl an P2X3- als auch an P2X2/3-Rezeptoren hinweisende Struktur der Desensitierung konnte meist auch bei der Reaktion auf Ap5A beobachtet werden, wenngleich nicht gar so deutlich ausgeprägt wie bei  $\alpha,\beta$ -meATP.

Obgleich **ATP** auch am Suralis-Präparat der Ratte eine selbst in wesentlich höheren Konzentrationen zumeist nur deutlich geringere Reaktion erzielen konnte als  $\alpha,\beta$ -meATP und Ap5A, so war der qualitative Verlauf diesen Reaktionen hier doch ähnlicher. Die wahrscheinlich vorwiegende Wirkung über Adenosinrezeptoren, wie sie am N. vagus ja auf Grund des langsamen Kurvenverlaufs anzunehmen war, scheint am N. suralis also nicht in gleichem Maße vorzuliegen. Möglicherweise ist die Aktivität von ATP-spaltenden Ektonukleotidasen in dieser Region ja geringer ausgeprägt. So finden sich in veröffentlichten Studien zum Ganglion spinale

ebenfalls zahlreiche Hinweise auf eine Wirkung von ATP an P2X-Rezeptoren [z.B. 15, 23, 59, 68]. Hierbei konnten 3 Reaktionsmuster - schnell, langsam und „gemischt“ - unterschieden werden [9, 30, 66]. Andererseits konnte in der hier präsentierten Studie PPADS die ATP-vermittelte Schwellenänderung aber nicht immer vollständig blockieren, was ebenso wie die teilweise lange Reaktionsdauer wiederum nicht für eine ausschließlich P2X-Rezeptor-vermittelte Reaktion spricht.

Ein ähnliches Ergebnis hinsichtlich der unterschiedlichen Potenzen von ATP und  $\alpha,\beta$ -meATP konnte auch eine Studie am Nervus lingualis der Ratte verzeichnen, mit einer zehnmal größeren minimalen Wirkkonzentration von ATP [70]. Auch hier zeigten sich schnelle und langsame Komponenten der erzielten Reaktionen. Demgegenüber stellten sowohl Chen et al. als auch Garcia-Guzman et al. an P2X3-Rezeptoren der Ratten-Hinterwurzel eine stärkere Potenz von ATP im Vergleich zu  $\alpha,\beta$ -meATP fest [20, 26], und Rae et al. zeigten auch im Vergleich zu Ap5A eine stärker ausgeprägte ATP-Reaktion [68].

Unklar bleibt außerdem die Ursache für das gelegentliche vollständige Ausbleiben einer Reaktion auf ATP. Die Angaben bisher veröffentlichter Studien zur ATP-Sensitivität von Neuronen im Ganglion spinale der Ratte schwanken zwischen 35 und 96 Prozent [2, 15, 30]. Li et al. konnten in Patch-Clamp-Versuchen an Hinterwurzel-Zellen der Ratte für kleine Neuronen eine hohe ATP-Sensitivität mit schneller Desensitisierung und für mittlere Neuronen eine geringe ATP-Affinität mit langsamer Desensitisierung feststellen, wohingegen große Neuronen keinerlei ATP-Affinität aufwiesen [47].

Ähnliche Beobachtungen wie für ATP gelten in dieser Hinsicht auch für **Adenosin**, welches ebenso nur gelegentliche Schwellenreduktionen induzieren konnte. Bei positiver Reaktion waren die erzielten Änderungen der Threshold-Kurve ähnlich groß wie die durch ATP erzielten, der Verlauf zeigte aber im Gegensatz dazu stets die für P1-Rezeptoren typische langsame Struktur sowohl der Onset- als auch der Return-Phase.

Eine generelle signifikante Präsenz von Adenosinrezeptoren am Nervus suralis der Ratte bleibt somit zumindest vorerst zweifelhaft und bedarf weiterer Untersuchungen. Kaelin-Lang et al. fanden beispielsweise für A2a-Rezeptoren kodierende Gene

lediglich in großen Neuronen des Ganglion spinale [37], welche nicht zu den langsamen C-Faser-Potentialen der hier vorgestellten Versuche beitragen.

### ***humaner N. suralis***

Die Ergebnisse der an den Präparaten des Nervus suralis des Menschen gemachten Untersuchungen zeigten teilweise gravierende Unterschiede zu den an den oben beschriebenen Präparatetypen erzielten.

So legt vor allem das nahezu vollständige Ausbleiben jeglicher Reaktion auf die Applikation von  **$\alpha,\beta$ -meATP** den Schluss nahe, dass P2X-Rezeptoren am humanen Suralis keine Rolle für die Transduktion nozizeptiver Stimuli spielen.

Zu einem entsprechenden Ergebnis kam auch eine kürzlich veröffentlichte Studie von Lang et al. [45]. Garcia-Guzman et al. konnten am Menschen zwar cDNA finden, welche eine Übereinstimmung von 93% mit der für Ratten-P2X3-Rezeptoren kodierenden besitzt, allerdings konnte entsprechende mRNA nur nachgewiesen werden im Rückenmark und im Herzen, nicht an peripheren Nerven [26]. Im Gegensatz dazu konnten aber Yiangou et al. mittels spezifischer Antikörper durchaus P2X3-Immunoreaktivität an etwa 60% von kleinen und mittleren Neuronen humaner Hinterwurzel-Ganglienzellen nachweisen [88].

Auch der langsame Verlauf der positiven Reaktionen auf **Ap5A** deutet darauf hin, dass diese Schwellenänderungen nicht durch P2X-Rezeptoren vermittelt sind. Hier scheinen andere, weiter oben bereits aufgeführte Rezeptoren eine entsprechende Rolle zu spielen.

Auf Grund der sehr inhomogenen Reaktionen wurde auf eine weitere Untersuchung der Ap5A-Reaktion mittels Rezeptor-spezifischer Antagonisten jedoch verzichtet. Die Ursache für das teilweise vollständige Ausbleiben einer Reaktion auf Ap5A bleibt unklar. Möglich wäre eine Hauptwirkung über Rezeptortypen, welche nur an einer geringen Zahl der im Nervus suralis vorhandenen Axone ausgeprägt ist.

Die Annahme eines Fehlens von P2X-Rezeptoren am Nervus suralis der Ratte kann auch durch die unter Applikation von **ATP** durchgeführten Messreihen nicht widerlegt

werden. Der langsame Verlauf sowohl der Onset- als auch der Return-Phase spricht gegen eine Vermittlung dieser Reaktion über ionotrope P2X-Rezeptoren. Bestätigt wird dies durch die Tatsache, dass der unspezifische P2X-Antagonist PPADS keinerlei Änderung der ATP-Reaktion hervorrufen konnte.

Im direkten Vergleich erwies sich die ATP-Reaktion als sowohl quantitativ als auch qualitativ sehr ähnlich der durch Adenosin in gleichen Konzentrationen erzeugten. Dies lässt im Zusammenhang mit der Blockade der ATP-Wirkung durch die verwendeten Adenosinrezeptor-Antagonisten auf eine dominierende Wirkung des ATP am humanen Suralis über entsprechende Adenosinrezeptoren schließen.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie [45] legte ebenfalls dar, dass die durch ATP an humanen Suralen erzielte Reaktion über Adenosin-A1-, Adenosin-A2- und P2Y-Nukleotid-Rezeptoren, jedoch nicht über P2X-Rezeptoren vermittelt wird.

Allerdings sind im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit gleichartige Ergebnisse für ATP ja bereits am N. vagus der Ratte beobachtet worden, welcher sich aber durchaus als im Besitz von P2X-Rezeptoren erwies. Die alleinige Wirkung von ATP über Adenosinrezeptoren ist also zwar als mögliches Indiz, jedoch nicht als unbedingter Beleg für ein Fehlen von P2X-Purinozeptoren am menschlichen Suralis zu werten, vielmehr könnten diese Ergebnisse auch durch die bereits für den Ratten-Vagus aufgeführten Gründe wie beispielsweise den ATP-Abbau durch Ektonukleotidasen hervorgerufen sein.

Die gute Wirksamkeit von **Adenosin** belegt die dominierende Präsenz von P1-Rezeptoren am humanen N. suralis und deutet auf eine physiologische Rolle natürlicher Agonisten dieser Rezeptoren in der Vermittlung nozizeptiver Stimuli hin. Die Tatsache, dass der A2-Adenosinrezeptor-Agonist Alloxazin [4, 67] die Adenosinwirkung ebenso wie die ATP-Wirkung vollständig blockieren konnte, deutet auf ein Überwiegen dieses Subtyps innerhalb der Gruppe der Adenosinrezeptoren hin. Diese Annahme wird dadurch verstärkt, dass sich sowohl der A1-Agonist CPA [41] als auch der A3-Antagonist MRS-1220 als wirkungslos erwiesen. Weiter spezifizieren lässt sich die Wirkung an den A2-Rezeptoren noch dahingehend, dass das vorwiegend an A2b-Rezeptoren agierende NECA vergleichbare Schwellenänderungen wie ATP und Adenosin hervorrufen konnte, während CGS-21680 (A2a-Agonist, [4, 52] ) keine Reaktion hervorrief.

## **Verfahren**

Die Methode des Threshold Tracking, abgewandelt für die Arbeit mit in-vitro-Präparaten, erwies sich bei einem Schwellenstrom von 40% des Maximalstromes an allen Präparattypen als sehr verlässlich. Insbesondere das Verfahren mit hyperpolarisierenden Präpulsen lieferte gute Ergebnisse mit einem schwankungsarmen Signalverlauf und konstanten, reproduzierbaren Messverläufen. Durch die Wahl des geeigneten Präpulses konnte sowohl die Quantität der Schwellenänderungen als auch die Qualität des Signalverlaufs positiv beeinflusst werden (vgl. Abb. 1).

Die an einem Präparattyp durch eine bestimmte Substanz erzielte Reaktion erwies sich zumeist als gut reproduzierbar. Jedoch konnte auch festgestellt werden, dass es zwischen den einzelnen Präparaten eines Typs eine teilweise starke interindividuelle Variabilität hinsichtlich des Ausmaßes der durch die jeweiligen Substanzen erzeugten Schwellenwertreduktion gab. Dies spiegelt sich in mitunter sehr großen Standardabweichungen wieder. Hierbei konnte aber keine Abhängigkeit durch offensichtliche iatrogen verursachte Faktoren, wie beispielsweise die Lagerungsdauer der Nervpräparate in der Nährlösung, festgestellt werden. Primär ist natürlich eine unterschiedliche Verteilung der Rezeptoren an den untersuchten axonalen Segmenten denkbar. Des Weiteren ist, in erster Linie bei den humanen Präparaten, eine krankheitsbedingte Schädigung der Nerven in Erwägung zu ziehen. So stellten Horn et al. bei Diabetes-Patienten eine geringere Membranleitfähigkeit von Neuronen des Nervus medianus fest [33]. Die Bedingungen bei der Präparation, Lagerung und Eingliederung in die Versuchsanordnung wurden soweit möglich für alle Präparate gleich gehalten. Eine gewisse mechanische Traumatisierung insbesondere bei der Separation der Faszikel sowie beim Entfernen der bindegewebigen Anteile ist jedoch nicht auszuschließen. Der kritischste Punkt ist sicherlich die Eingliederung der Nervsegmente in die Kunststoffkammer. Hierbei sind in erster Linie Abweichungen bei der Isolierung der Saugelektroden, ein nicht identischer elektrischer Widerstand innerhalb der Saugelektroden und eine unterschiedliche Umspülung mit Nähr- und Prüflösung denkbar. Auch können eventuell verbliebene Bindegewebsanteile auf den

Axonen die Oberfläche sowohl für die Nährstoffversorgung als auch für die zur Reaktion zur Verfügung stehenden Rezeptoren reduziert haben.

Weitere mögliche Fehlerquellen nach Fertigstellung des Setup könnten beispielsweise in einer unterschiedlichen Zusammensetzung der Spüllösung oder Abweichungen in der Gassättigung liegen. Zur Minderung dieser Einflussfaktoren wurden vor der ersten Applikation einer Substanz stets Scheinwechsel durchgeführt. Um den Effekt eines anfangs nur gering konzentrierten Erreichens der Nervkammer durch die Prüfsubstanz mit langsamem Anstieg bis zur gewünschten Konzentration zu minimieren, wurde das Volumen der Nährlösung im Applikationsgefäß entsprechend gering gehalten (50 bis 100 ml). Der Ablauf der Spüllösung in das Abfallgefäß nach Applikationsbeginn betrug mit 2 Minuten ein Mehrfaches der Durchlaufzeit des Perfusionssystems, was die Gefahr einer Verwässerung der gewählten Konzentration minimierte. Die Überprüfung der Abhängigkeit der Schwellenänderungen von der Temperatur der Lösung zeigte in der untersuchten Bandbreite (30°C bis 38°C) nur einen unsignifikanten Zusammenhang. Alle in dieser Arbeit einbezogenen Messungen wurden bei einer Solltemperatur von 37°C durchgeführt.

Der Verlauf der durch eine bestimmte Substanz erzeugten Reaktionen war aber dennoch auch bei verschiedenen Präparaten stets reproduzierbar. Bei größeren Abweichungen hinsichtlich der Quantität musste zur Bestimmung eines verlässlichen Mittelwertes die Anzahl der durchgeführten Versuche entsprechend groß gewählt werden. Dem direkten Vergleich zweier oder mehrerer Substanzen dienten außerdem idealerweise aufeinander folgende Messungen an ein und demselben Präparat. Die dabei beobachteten prozentualen Unterschiede konnten meist auch an anderen Präparaten in ähnlichem Ausmaß beobachtet werden. Vor allem zur bestmöglichen Beurteilung der durch einen bestimmten Antagonisten erzielten Blockade beziehungsweise Reduktion einer Schwellensenkung erwies sich dies als vorteilhaft. Ebenso wurde oftmals die gute Konzentrationsabhängigkeit der Messergebnisse einer Prüfsubstanz bei der Auswertung der Mittelwerte nicht so gut deutlich. Auch hier konnten direkt auf einander folgende Messungen am gleichen Präparat wesentlich aussagekräftigere Resultate liefern.

Ein direkter Zusammenhang zwischen den Messergebnissen und der Lagerungsdauer der Nervsegmente in der gekühlten HEPES-Nährlösung unter den angegebenen Bedingungen konnte nicht festgestellt werden. Anders war dies hinsichtlich der Versuchsdauer. Hier wurde bei langen Versuchen teilweise sichtbar, dass die Amplituden der Summenaktionspotentiale (Peak-Kurve der erzeugten Antwortsignale) zum Ende der Versuche leicht abfielen. Dies resultierte aber nicht zwangsweise in einer entsprechenden Änderung des Verlaufs der Schwellenwert-Kurve, da diese ja stets auf einem prozentualen Anteil der maximalen Amplitude des registrierten Signals beruhte.

Unabhängig davon zeigten aber in den meisten Fällen auch die Schwellenwert-Kurven keinen komplett horizontalen Verlauf, sondern einen leichten Anstieg oder Abfall bzw. bei längeren Versuchen auch Kombinationen von Beidem. Als ursächlich erwies sich oft ein leichter Drift des Ausgangssignals des verwendeten Stimulators. Dies hatte jedoch generell keinen signifikanten Einfluss auf das Ausmaß der durch die verwendeten Substanzen erzeugten Ausschläge im Kurvenverlauf. Lediglich bei steiler ansteigenden oder abfallenden Kurven musste der Bezugspunkt zur Bestimmung der Maxima der erzeugten Schwellenwertänderungen durch Verbindung der Werte vor und nach der erzeugten Reaktion interpoliert werden.

Trotzdem, wenn auch nicht in Zusammenhang mit dem generellen Verlauf der Schwellenwert-Kurve, konnte gelegentlich die Beobachtung gemacht werden, dass bei wiederholter Verwendung einer Testsubstanz nach einer gewissen Zeit die durch diese erzielte Schwellenwertreduktion deutlich geringer wurde (Tachyphylaxie). Als Ursachen hierfür sind natürlich zum Einen die Ausbildung einer Rezeptortoleranz gegenüber den spezifischen wirksamen reaktiven Gruppen der Testsubstanzen, zum Anderen aber auch eine mögliche generelle Reduktion der Reaktionsfähigkeit der Nerven zu diskutieren.

Problematisch erscheint derzeit noch die richtige Einstellung der Trackingparameter (v.a. „Tracking Time“, „Tracking Error“, Schrittmodus), um ein ideales Ergebnis für die gewünschten Darstellungen zu erzielen. Hierbei ist festzustellen, dass das Tracking bei sehr heftigen Änderungen des Schwellenwertes zu langsam ist, um die Maximalamplitude solcher Reaktionen genau genug darstellen zu können. Eine



deutliche Änderung des stets zusätzlich zum Schwellenwert aufgezeichneten erzeugten Peak-Wertes weist auf diese Fälle hin (vgl. Abb. 5A). Eine entsprechende Gegenmaßnahme bestünde in einer Modifizierung der Reizänderungsparameter dahingehend, dass auf eine Abweichung des Reaktionssignals aus dem festgelegten Fensterbereich hinaus mit einer stärkeren Adjustierung des Reizstromes zu Kompensation dieser Abweichung reagiert würde. Dies führt jedoch andererseits bei allen Schwellenwertänderungen, die vom vorgegebenen Fensterbereich nur leicht abweichen oder sehr langsam ablaufen, in einer im Protokoll deutlich stärkeren und heftigeren Darstellung der Schwellenwertänderung, als dies eigentlich der Fall ist.

Eine weitere mögliche Ursache, welche die richtige Darstellung sehr schnell ablaufender Reaktionen behindern könnte, liegt im Flüssigkeitsvolumen der Nervkammer begründet. Hierdurch besteht die Möglichkeit, dass die applizierte Prüfsubstanz die Nervsegmente initial nur in sehr starker Verdünnung erreicht und die gewünschte Konzentration am Wirkungsort nur mit entsprechender Verzögerung erzielt wird. Dies käme beispielsweise als Grund dafür in Betracht, dass eine eventuell vorhandene sehr rapide ablaufende Reaktion auf P2X-Rezeptor-Agonisten am humanen Suralis in Folge einer zu langen Zeitspanne zwischen der Rezeptor-Kopplung der ersten Agonisten und dem Erreichen der gewünschten Konzentration nicht aufgezeichnet werden würde. Dies stünde auch im Einklang mit den Ergebnissen von Rong et al. am N. lingualis der Ratte, wo Bolus-Applikation von P2X3-Agonisten an nozizeptiven Fasern stets eine deutliche Reaktion hervorrufen konnte, während intra-arterielle Perfusion kaum positive Resultate lieferte [70]. Allerdings erwies sich für die Präparate der Ratte die vorgestellte Methode ja auch für P2X-Agonisten als praktikabel, hier stellte wie beschrieben eher das elektronische System einen limitierenden Faktor dar.

Das Maß der Übertragbarkeit der in dieser Arbeit auf Grund der verwendeten Methode gewonnenen Ergebnisse auf intakte Nervenfasern in vivo bleibt letztendlich noch offen. Stebbing et al. konnten bei einer vergleichenden Studie zwischen der Wirkung von P2X-Rezeptor-Agonisten an mittels Hochwiderstands-Mikroelektroden gereizten in toto isolierten Neuronen des Ggl. spinale der Ratte und Patch-Clamp-Versuchen an entsprechenden akut dissoziierten Ganglienzellen nur eine geringe Übereinstimmung feststellen (14% zu 87% positive Reaktionen) [74].

## 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wirkungen von Neuroliganden, insbesondere von Agonisten an purinergen Rezeptoren, auf die Erregbarkeit unmyelinisierter Axonen in peripheren Nerven verschiedener Spezies untersucht. Unmyelinisierte Axone sind wegen ihrer geringen Größe für intrazelluläre elektrophysiologische Techniken nicht zugänglich. Deshalb wurden Effekte der applizierten Agonisten und Antagonisten über Erregbarkeitsveränderungen der Axone mit Hilfe von extrazellulären Schwellenwertbestimmungen (threshold tracking) gemessen.

In allen Präparatgruppen konnten dabei deutliche Reaktionen auf die Applikation von Purinozeptor-Agonisten eine Existenz von entsprechenden Rezeptoren am axonalen Verlauf der peripheren Neuronen belegen.

Die Ergebnisse am Nervus vagus der Ratte zeigen vor allem eine Präsenz von P2X-Rezeptoren an den zum C-Faser-Summenaktionspotential beitragenden Axonen. Die durch  $\alpha,\beta$ -meATP und Ap5A erzeugten Reaktionen weisen hierbei auf eine dominierende Wirkung an P2X3-Rezeptoren hin, aber auch P2X2/3-Rezeptoren könnten einen möglichen Beitrag leisten. Ein Einfluss weiterer P2X-Subtypen erscheint denkbar, spielt aber offenbar keine signifikante Rolle.

ATP erreicht seine deutlich geringere Wirkung an Ratten-Vagi nicht vordergründig via P2X-Rezeptoren. Vielmehr scheint hier nach Abbau zu Adenosin eine Stimulation von Adenosin-A2a- und -A2b-Rezeptoren den hauptsächlichen Faktor darzustellen, wobei eine geringe Wirkung auch an A1-Rezeptoren nicht auszuschließen ist.

Auch die Ergebnisse an den Präparaten des Ratten-Suralis stehen im Einklang mit dem Vorhandensein von P2X- und möglicherweise auch Adenosinrezeptoren. Das mittels der an P2X-Purinozeptoren wirksamen Substanzen aufgestellte Wirkungsprofil ähnelt dabei prinzipiell dem des N. vagus. Der größte Unterschied liegt hier offenbar in der neben der P2X3-Wirkung deutlich stärker ausgeprägten Wirkung von  $\alpha,\beta$ -meATP und Ap5A an heteromeren P2X2/3-Rezeptoren.

Einen weiteren wesentlichen Unterschied zum Vagus-Nerven stellt die Reaktion auf Applikation von ATP dar. Hier zeigten sich zumeist Anzeichen für eine

vordergründige Rolle von P2X-Rezeptoren in der Vermittlung der ATP-Wirkung. Dies deutet auf eine deutlich geringere Hydrolyse durch Ekto-ATPasen hin.

Einzelne Faszikel gaben ebenfalls Hinweise auf eine Aktivierung von Adenosinrezeptoren. In den meisten Fällen lieferte die Applikation von Adenosin jedoch keine Reaktion.

Die am humanen Suralis-Präparat erzielten Resultate unterschieden sich deutlich von denen der Ratte. Ein signifikanter Einfluss von P2X-Rezeptoren auf die erzeugten C-Faser-Summenaktionspotentiale konnte hier nicht nachgewiesen werden. So lieferte die Applikation von  $\alpha,\beta$ -meATP keine positiven Reaktionen, und auch das Profil der durch Ap5A erzielten Wirkung zeigte keine Hinweise auf eine Vermittlung über P2X-Purinozeptoren. Indessen gibt es im Unterschied zum Suralis der Ratte starke Indizien für die überwiegende Präsenz von Adenosinrezeptoren. Diese erwiesen sich als hauptverantwortlich für die Wirkung von ATP auf Axone menschlicher Suralis-Nerven.

Hinsichtlich der für die beschriebenen Versuche gewählten Methode lässt sich abschließend festhalten, dass sich die Technik des in vitro Threshold Tracking als eine sehr gute Grundlage zur Untersuchung der Erregbarkeit von unmyelinisierten Axonen erwies. Sie stellt somit eine sehr hilfreiche Erweiterung der herkömmlichen elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden an peripheren Nerven dar.

## 7. Abkürzungen und Synonyme der verwendeten Substanzen

### **Abkürzungen**

$\alpha,\beta$ -meATP	Adenosin-5'( $\alpha,\beta$ -Methylen)-Diphosphat
$\beta,\gamma$ -meATP	Adenosin-5'( $\beta,\gamma$ -Methylen)-Diphosphat
ADP	Adenosindiphosphat
Ap5A	P1,P5-Di(-Adenosin-5')-Pentaphosphat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bz-ATP	2'-3'-O-(4-Benzoylbenzoyl-)Adenosin-5'-Triphosphat
CGS-21680	2-p-(2-Carboxyethyl)Phenethylamino-5'-N-Ethylcarboxamidoadenosin
CPA	N6-Cyclopentyladenosin
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-Dipropylxanthin / 1,3-Dipropyl-8-Cyclopentaxanthin
MRS 1220	9-Chloro-2-(2-furanyl)-5-([Phenylacetyl]Amino)[1,2,4]- Triazolo[1,5-c]Quinazolin
NECA	5'-(N-Ethylcarboxamido)Adenosin
PPADS	Pyridoxalphosphat-6-Azo-(Benzen-2,4-Disulfonsäure-) Tetrasodiumsalz
TNP-ATP	2',3'-O-(2,4,6-Trinitrophenyl)ATP

### **Synonyme**

Alloxazin	Benzo[g]Pteridin-2,4(1H,3H)-Dion
-----------	----------------------------------

## 8. Literaturverzeichnis

1. Barden JA, Bennett MR, 2000. Distribution of P2X purinoceptor clusters on individual rat dorsal root ganglion cells. *Neurosci lett.* 287, 183-6
2. Bean BP, 1990. ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics. *J Neurosci.* 10, 1-10
3. Bergmans J, 1970. The physiology of single human nerve fibres. Vander, Belgium, University of Louvain
4. Brackett LE, Daly JW, 1994. Functional characterization of the A2b adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. *Biochem Pharmacol.* 47, 801-814.
5. Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB, 1998. The expression of P2X3 purinoreceptors in sensory neurons: effects of axotomy and glial-derived neurotrophic factor. *Mol Cell Neurosci.* 12, 256-268.
6. Braun N, Sevigny J, Robson SC, Zimmermann H, 2001. Expression of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (NTPDase2) in non-myelinating Schwann cells. *Soc Neurosci Abstr* 27, 157-
7. Brouns I, Adriaensen D, Burnstock G, Timmermanns JP, 2000. Intraepithelial vagal sensory nerve terminals in rat pulmonary neuroepithelial bodies express P2X(3) receptors. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23, 52-61
8. Brown DA, Marsh S, 1978. Axonal GABA-receptors in mammalian peripheral nerve trunks. *Muscle Nerve* 21, 137-158
9. Burgard EC, Niforatos W, van Biesen T, Lynch KJ, Touma E, ..., 1999. P2X receptor-mediated ionic currents in dorsal root ganglion neurons. *J Neurophysiol.* 82, 1590-8
10. Burgstahler R, Grafe P, 2001. Diadenosine pentaphosphate is more potent than ATP at P2X receptors in isolated rat vagus nerve. *Neuroreport.* 12, 679-82
11. Burnstock G, 1972. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 24, 509-81
12. Burnstock G, 1978. A basis for distinguishing two types of purinergic receptor. In: Straub RW, Bolis L, eds. *Cell Membrane Receptors for Drugs and Hormones: A Multidisciplinary Approach.* New York: Raven Press 107-18
13. Burnstock G, 1996. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain.

- Lancet. 347, 1604-1605.
14. Burnstock G, 2000. P2X receptors in sensory neurones. *Br J Anaesth.* 84, 476-488.
  15. Burnstock G, 2001. Purine-mediated signalling in pain and visceral perception. *Trends Pharmacol Sci.* 22, 182-188.
  16. Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A, 1970. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol.* 40, 668-88
  17. Burnstock G, Kennedy C, 1985. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol* 16, 433-40
  18. Burnstock G, Wood JN, 1996. Purinergic receptors: their role in nociception and primary afferent neurotransmission. *Curr Opin Neurobiol* 6, 526-532
  19. Castillo-Melendez M, Krstew E, Lawrence AJ, Jarrott B, 1994. Presynaptic A2a receptors on soma and central terminals of rat vagal afferent neurons. *Brain Res.* 652, 137-44
  20. Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN, 1995. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature.* 377, 428-431.
  21. Cheung KK, Burnstock G, 2002. Localization of P2X3 receptors and coexpression with P2X2 receptors during rat embryonic neurogenesis. *J Comp Neurol.* 443, 368-82
  22. Doak GJ, Sawynok J, 1995. Complex role of peripheral adenosine in the genesis of the response to subcutaneous formalin in the rat. *Eur J Pharmacol* 281, 311-8
  23. Dunn PM, Liu M, Zhong Y, King BF, Burnstock G, 2000. Diinosine pentaphosphate: an antagonist which discriminates between recombinant P2X(3) and P2X(2/3) receptors and between two P2X receptors in rat sensory neurones. *Br J Pharmacol.* 130, 1378-84
  24. Flores NA, Stavrou BM, Sheridan DJ, 1999. The effects of diadenosine polyphosphates on the cardiovascular system. *Cardiovasc Res.* 42, 15-26
  25. Fredholm BB, Abbracchio MP, Burnstock G, Daly JW, Harden TK, Jacobson KA, Leff P, Williams M, 1994. Nomenclature and classification of

- purinoceptors. *Pharmacol Rev.* 46, 143-56
26. Garcia-Guzman M, Stuhmer W, Soto F, 1997. Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X<sub>3</sub> purinoceptor. *Brain Res Mol Brain Res.* 47, 59-66
  27. Gomez-Villafuertes R, Gualix J, Miras-Portugal MT, Pintor J, 2000. Adenosine 5'-tetrphosphate (Ap(4)), a new agonist on rat midbrain synaptic terminal P2 receptors. *Neuropharmacology* 39, 2381-90
  28. Gordon JL, 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem J* 233, 309-19
  29. Grafe P, Quasthoff S, Grosskreutz J, Alzheimer C, 1997. Function of the hyperpolarization-activated inward rectification in nonmyelinated peripheral rat and human axons. *J Neurophysiol.* 77, 421-426.
  30. Grubb BD, Evans RJ, 1999. Characterization of cultured dorsal root ganglion neuron P2X receptors. *Eur J Neurosci.* 11, 149-154.
  31. Higashi H, 1986. Pharmacological aspects of visceral sensory receptors. *Prog Brain Res.* 67, 149-62
  32. Holton P, 1959. The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves. *J Physiol.* 145, 494-504
  33. Horn S, Quasthoff S, Grafe P, Bostock H, Renner R, Schrank B, 1996. Abnormal axonal inward rectification in diabetic neuropathy. *Muscle Nerve* 19, 1268-75
  34. Irnich D, Burgstahler R, Bostock H, Grafe P, 2001. ATP affects both axons and Schwann cells of unmyelinated C fibres. *Pain.* 92, 343-350.
  35. Irnich D, Burgstahler R, Grafe P, 2001. P2 nucleotide receptors in peripheral nerve trunk. *DrugDevelopmentRes* 52, 83-88
  36. Jones CA, Chessell IP, Simon J, Barnard EA, Miller KJ, Michel AD, Humphrey PP, 2000. Functional characterization of the P2X<sub>4</sub> receptor orthologues. *Br J Pharmacol.* 129(2): 388-94
  37. Kaelin-Lang A, Lauterburg T, Burgunder JM, 1998. Expression of adenosine A<sub>2a</sub> receptor gene in rat dorsal root and autonomic ganglia. *Neurosci Lett.* 246, 21-4
  38. Khakh BS, Humphrey PP, Surprenant A, 1995. Electrophysiological properties of P2X-purinoceptors in rat superior cervical, nose and guinea-pig coeliac

- neurones. *J Physiol.* 484, 385-95
39. Kim C, Chung JM, Chung K, 2003. Changes in the gene expression of six subtypes of P2X receptors in rat dorsal root ganglion after spinal nerve ligation. *Neurosci Lett.* 337, 81-4
  40. Klishin A, Lozovaya N, Pintor J, Miras-Portugal MT, Krishtal O, 1994. Possible functional role of diadenosine polyphosphates: negative feedback for excitation in hippocampus. *Neuroscience* 58, 235-6
  41. Klotz KN, 2000. Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 362, 382-391.
  42. Krstew E, Jarrott B, Lawrence AJ, 1998. Autoradiographic visualisation of axonal transport of adenosine A1 receptors along the rat vagus nerve and characterisation of adenosine A1 receptor binding in the dorsal vagal complex of hypertensive and normotensive rats. *BrainRes.* 17, 61-8
  43. Lambrecht G, 1996. Design and pharmacology of selective P2-purinoceptor-antagonists. *J Auton Pharmacol.* 16,341-4
  44. Lambrecht G, 2000. Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362, 340-350
  45. Lang PM, Tracey DJ, Irrnich D, Sippel W, Grafe P, 2002. Activation of adenosine and P2Y receptors by ATP in human peripheral nerve. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 366, 449-57
  46. Lewis C, Neidhard S, Holy C, North RA, Buell G, Surprenant A, 1995. Coexpression of P2X2 and P2X3 receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377, 432-435
  47. Li C, Peoples RW, Lanthorn TH, Li ZW, Weight FF, 1999. Distinct ATP-activated currents in different types of neurons dissociated from rat dorsal root ganglion. *Neurosci Lett.* 263, 57-60
  48. Li C, Peoples RW, Weight FF, 1996. Proton potentiation of ATP-gated ion channel responses to ATP and Zn<sup>2+</sup> in rat nodose ganglion neurones. *J Neurophysiol* 76, 3048-58
  49. Li C, Peoples RW, Weight FF, 1996. Acid pH augments excitatory action of ATP on a dissociated mammalian sensory neuron. *Neuroreport* 7, 2151-4
  50. Linden J, 2001. Molecular approach to adenosine receptors: receptor-



- mediated mechanisms of tissue protection. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 41, 775-787.
51. Liu M, King BF, Dunn PM, Rong W, Townsend-Nicholson A, Burnstock G, 2001. Coexpression of P2X(3) and P2X(2) receptor subunits in varying amounts generates heterogeneous populations of P2X receptors that evoke a spectrum of agonist responses comparable to that seen in sensory neurones. *J Pharmacol Exp Ther.* 296, 1043-50
  52. Lupica CR, Cass WA, Zahniser ZR, Dunwiddie TV, 1990. Effects of the selective adenosine A2 receptor agonist CGS 21680 on in vitro electrophysiology, cAMP formation and dopamine release in rat hippocampus and striatum. *J Pharmacol Exp Ther.* 252, 11
  53. Marchenko SM, Obukhov AG, 1987. Kinetics of the ATP-activated ionic currents in the sensory neurons of the rat. *Neurofiziologija* 19, 839-41
  54. Miras-Portugal MT, Gualix J, Mateo J, Diaz-Hernandez M, Gomez-Villafuertes R, Castro E, Pintor J, 1999. Diadenosine polyphosphates, extracellular function and catabolism. *Prog Brain Res.* 120, 397-409
  55. Neto FR, 1978. The depolarising action of 5-HT on mammalian non-myelinated nerve fibres. *Eur J Pharmacol.* 49, 351-356
  56. Nörenberg W, Illes P, 2000. Neuronal P2X-receptors: localisation and functional properties. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 362, 324-339
  57. North RA, Surprenant A, 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 40, 563-80
  58. O'Connor SE, Dainty IA, Leff P, 1991. Further subclassification of ATP receptors based on agonist studies. *Trends pharmacol Sci* 12, 137-41
  59. Petruska JC, Cooper BY, Gu JG, Rau KK, Johnson RD, 2000. Distribution of P2X1, P2X2, and P2X3 receptor subunits in rat primary afferents: relation to population markers and specific cell types. *J Chem Neuroanat.* 20, 141-162.
  60. Petruska JC, Mena N, Nakatsuka T, Cooper By, Johnson RD, Gu JG, 2000. P2X1 receptor subunit immunoreactivity and ATP-evoked fast currents in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroreport* 11, 3589-92
  61. Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Cooper By, 2002. Chemical responsiveness and histochemical phenotype of electrophysiologically classified cells of the adult rat dorsal root ganglion. *Neuroscience* 115, 15-30

62. Pintor J, Diaz-Hernandez M, Bustamante C, Gualix J, de Terreros FJ, Miras-Portugal MT, 1999. Presence of dinucleotide and ATP receptors in human cerebrocortical synaptic terminals. *Eur J Pharmacol.* 366, 159-65
63. Pintor J, Diaz-Hernandez M, Gualix J, Gomez-Villafuertes R, Miras-Portugal MT, 2000. Diadenosine polyphosphate receptors. from rat and guinea-pig brain to human nervous system. *Pharmacol Ther.* 87, 103-15
64. Pintor J, Miras-Portugal MT, 1993. Diadenosine polyphosphates (ApxA) as new neurotransmitters. *Drug Dev Res* 28: 259-62
65. Pintor J, Miras-Portugal MT, 1995. P2 purinergic receptors for diadenosine polyphosphates in the nervous system. *Gen Pharmacol* 26, 229-35
66. Piper AS, Docherty RJ, 2000. One-way cross-desensitization between P2X purinoceptors and vanilloid receptors in adult rat dorsal root ganglion neurones. *J Physiol.* 523, 685-96
67. Ralevic V, Burnstock G, 1998. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 50, 413-492.
68. Rae MG, Rowan EG, Kennedy C, 1998. Pharmacological properties of P2X3-receptors present in neurones of the rat dorsal root ganglia. *Br J Pharmacol.* 124, 176-80
69. Raymond SA, 1979. Effects of nerve impulses of threshold of frog sciatic nerve fibres. *JPhysiol.* 290, 273-303
70. Rong W, Burnstock G, Spyer KM, 2000. P2X purinoceptor-mediated excitation of trigeminal lingual nerve terminals in an in vitro intra-arterially perfused rat tongue preparation. *J Physiol.* 524, 891-902.
71. Rubino A, Burnstock G, 1996. Possible role of diadenosine pentaphosphates as modulators of cardiac sensory-motor neurotransmission in guinea-pigs. *J Physiol.* 495, 515-23
72. Sauer SK, Bove GM, Averbeck B, Reeh PW, 1999. Rat peripheral nerve components release calcitonin gene-related peptide and prostaglandin E2 in response to noxious stimuli evidence that nervi nervorum are nociceptors. *Neuroscience* 92, 319-325
73. Sneddon P, Westfall TD, Todorov LD, Mihaylova-Todorova S, Westfall DP, Kennedy C, 1999. Modulation of purinergic neurotransmission. *Prog Brain Res.* 120, 11-20

74. Stebbing MJ, McLachlan EM, Sah P, 1998. Are there functional P2X receptors on cell bodies in intact dorsal root ganglia of rats? *Neuroscience*. 86, 1235-1244.
75. Thomas S, Virginio C, North RA, Surprenant A, 1998. The antagonist trinitrophenyl-ATP reveals co-existence of distinct P2X receptor channels in rat nodose neurones. *J Physiol*. 509, 411-7
76. Trezise DJ, Kennedy I, Humphrey PP, 1993. Characterization of purinoceptors mediating depolarization of rat isolated vagus nerve. *Br J Pharmacol*. 110, 1055-1060.
77. Trezise DJ, Kennedy I, Humphrey PP, 1994. The use of antagonists to characterize the receptors mediating depolarization of the rat isolated vagus nerve by alpha, beta-methylene adenosine 5'-triphosphate. *Br J Pharmacol*. 112, 282-288.
78. Trezise DJ, Michel AD, Grahames CB, Khakh BS, Surprenant A, Humphrey PP, 1995. The selective P2X receptor agonist, beta,gamma-methylene-L-adenosine 5'-triphosphate, discriminates between smooth muscle and neuronal P2X purinoceptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 351, 603-9.
79. Ueno S, Tsuda M, Iwanaga T, Inoue K, 1999. Cell type-specific ATP-activated responses in rat dorsal root ganglion neurons. *Br J Pharmacol*. 126, 429-436.
80. Virginio C, North RA, Surprenant A, 1998. Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurones. *J Physiol* 510, 27-35
81. Virginio C, Robertson G, Surprenant A, North RA, 1998. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X1, P2X3, and heteromeric P2X2/3 receptors. *Mol Pharmacol*. 53, 969-73
82. Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R, 1997. Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals. *Neuropharmacology*. 36, 1229-124
83. Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, Stone LS, Hargreaves KM, Buell G, Surprenant A, North RA, Elde R, 1998. P2X3 is expressed by DRG neurons that terminate in inner lamina II. *Eur J Neurosci*. 10, 3470-3478.
84. Westfall TD, Kennedy C, Sneddon P, 1996. Enhancement of sympathetic

- purinergic neurotransmission in the guinea-pig isolated vas deferens by the novel ecto-ATPase inhibitor ARL 67156. *Br J Pharmacol* 117, 867-72
85. Westfall TD, McIntyre Ca, Obeid S, Bowes J, Kennedy C, Sneddon P, 1997. The interaction of diadenosine polyphosphates with P2X-receptors in the guinea-pig isolated vas deferens. *Br J Pharmacol.* 121, 57-62
  86. Wood JN, Docherty R, 1997. Chemical activators of sensory neurones. *Ann Rev Physiol* 59, 457-82
  87. Xiang Z, Bo X, Burnstock G, 1998. Localization of ATP-gated P2X receptor immunoreactivity in rat sensory and sympathetic ganglia. *Neurosci Lett.* 256, 105-8
  88. Yiangou Y, Facer P, Birch R, Sangameswaran L, Eglen R, Anand P, 2000. P2X3 receptor in injured human sensory neurons. *Neuroreport.* 11, 993-996.
  89. Zimmermann H, 1996. Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol.* 49, 589-618.
  90. Zimmermann H, 2000. Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362, 299-309
  91. Zimmermann H, Braun N, 1999. Ecto-nucleotidases -- molecular structures, catalytic properties, and functional roles in the nervous system. *Prog Brain Res.* 120, 371-85

## **9. Anhang: Formular zur Patientenaufklärung**



MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN  
Klinikum der Universität München      Physiologisches Institut  
Klinik für Anaesthesiologie            Lehrstuhl für Neurophysiologie  
Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. K. Peter      Vorstand: Prof. Dr. G. ten Bruggencate

\_\_\_\_\_ **LMU**  
Ludwig \_\_\_\_\_  
Maximilians—  
Universität \_\_\_\_\_  
München \_\_\_\_\_

**Patienteninformation und  
Einwilligungserklärung  
zu Untersuchungen über die Schmerzleitung  
von Nervenfasern  
  
(Chemosensitivität isolierter humaner  
nozizeptiver Nervenfasern)**

Prof. Dr. P. Grafe  
Physiologisches Institut  
Pettenkoferstr. 12  
80336 München  
Tel: 089-5996-221 (-241)  
Fax: 089-5996-216

Dr. D. Irnich  
Klinik für Anaesthesiologie  
z.Zt. Physiologisches  
Institut  
Pettenkoferstr. 12  
80336 München  
Tel: 089-5996-258 (-241)  
Fax: 089-5996-216

München, 7.12.2000

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

leider musste bei Ihnen wegen nicht zu beseitigender krankhafter Veränderungen der Gefäße, der Nerven oder anderer Gewebe die ärztliche Entscheidung getroffen werden, einen Teil einer Extremität (Beine, Arm) zu entfernen.

Dieses Vorgehen ist medizinisch notwendig um weitere Krankheitsfolgen wie die Ausbreitung der Erkrankung, massive Infektionen oder unerträgliche Schmerzen zu vermeiden.

Da chronische Schmerzen - wie Sie vielleicht selber gemerkt haben - nicht immer zufriedenstellend behandelt werden können, untersuchen wir die Schmerzleitung über Nerven und deren Reaktion auf verschiedene Substanzen. Ein besseres Verständnis der Schmerzentstehung und –aufrechterhaltung könnte dann zur Entwicklung neuer Medikamente und Methoden für eine erfolgreichere Schmerzbekämpfung führen.

Für unsere Untersuchungen benötigen wir Nervenfasern, die nur wenige Zentimeter lang sind. Aus diesem Grund möchten wir Sie bitten, dass wir von dem bereits abgetrennten Teil der Extremität nach der Operation ein Stück Nervenfasern herausnehmen und untersuchen dürfen.

Die Entnahme der Nervenfasern beeinflusst in keinerlei Hinsicht den Ablauf der Operation, der Narkose oder Ihre sonstige medizinische Versorgung, da sie erst nach der Operation stattfindet. Aufgrund der Bestimmungen für Forschungen an menschlichem Gewebe bedarf es aber Ihrer schriftlichen Zustimmung für dieses Vorgehen. Vorausgesetzt Sie sind einverstanden

möchten wir Sie zusätzlich bitten einige wenige Fragen zur Intensität und Qualität Ihrer Schmerzen und über die bisher erfolgte Schmerztherapie zu beantworten.

### **Datenschutz**

**Nur die zuständigen Wissenschaftler und autorisierte Personen der Gesundheitsbehörden haben im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften Zugang zu den gesammelten Daten. Diese Personen unterliegen der Schweigepflicht und sind zur Beachtung des Datenschutzes verpflichtet. Die Bearbeitung der Daten erfolgt ausschließlich zu statistischen und wissenschaftlichen Zwecken und sie werden ausnahmslos darin nicht namentlich genannt.**

**Auch in etwaigen Veröffentlichungen der Daten werden Sie nicht namentlich genannt.**

Wir möchten Sie darauf hinweisen, dass Ihre Zustimmung zur Entnahme des Nervenmaterials eine freie Willensentscheidung sein sollte. Eine Ablehnung hat keinerlei nachteilige Folgen für Sie. Sie können darüber hinaus zu jedem Zeitpunkt ohne Angabe von Gründen und ohne nachteilige Folgen Ihre Zustimmung widerrufen.

Wir danken Ihnen für Ihre Mitarbeit

Dr. D. Irnich

Prof. Dr. P. Grafe

Ich erkläre mich mit der Teilnahme an der Studie einverstanden.

---

Ort, Datum

Unterschrift

Der Patient \_\_\_\_\_ wurde von mir schriftlich und mündlich ausführlich und unter Einräumung einer ausreichenden Bedenkzeit über die Studie informiert.

---

Ort, Datum

Unterschrift







## Lebenslauf

**Name:** Johannes Polten

**Geburtsdatum:** 25. April 1976

**Geburtsort:** Bernburg

**Staatsangehörigkeit:** deutsch

**Schulbildung:** Grund- und Oberschule in Leipzig  
09.1982 – 01.1992

High School in Camden (Australien)  
01.1992 – 12.1992

Gymnasium in Leipzig  
01.1993 – 06.1994

Schulabschluss: Abitur 06.1994

**Wehrdienst:** Soldat im Sanitätsdienst  
10.1994 – 09.1995

**Studium:** Hochschulstudium Zahnmedizin, Universität Leipzig  
10.1995 – 09.2000

Abschluss: Staatsexamen 09.2000

**Beruf:** wissenschaftlicher Angestellter des Physiologischen  
Institutes der Ludwig- Maximilians-Universität München  
12.2000 – 03.2001

wissenschaftlicher Angestellter der Klinik und Poliklinik  
für Zahnärztliche Prothetik und Werkstoffkunde des  
Universitätsklinikums Leipzig  
03.2001 – 02.2003

Assistent in privater Zahnarztpraxis in Leipzig  
seit 03.2003



Mein Dank gilt den Mitarbeitern der Neurophysiologie der Universität München, welche mich bei meiner Arbeit begleitet haben, für die herzliche Aufnahme und die stets angenehme Zeit, die ich mit ihnen verbringen durfte. Besonders erwähnen möchte ich hierbei Frau Christa Müller, Herrn Dr. Ralf Burgstahler, Herrn Dr. Dominik Irnich, Herrn Prof. David Tracey und allen voran Herrn Prof. Peter Grafe für die freundliche Betreuung, die intensive fachliche Unterstützung, das Vertrauen und die Geduld, welche mir entgegengebracht wurden.

Speziellen Dank schulde ich auch meiner Familie, die meiner Arbeit viel Zeit opfern musste und mich trotzdem immer tatkräftig unterstützt hat.