

Aus dem Physiologischen Institut
Lehrstuhl Physiologische Genomik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. M. Götz

**Aspekte der Chemosensibilität isolierter menschlicher
C-Faseraxone**

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

vorgelegt von
Wolfgang Sippel

aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Grafe

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. E. A. Auerswald
Prof. Dr. K. Beyer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2006

für

meine Eltern Edith und Karl Otto Sippel, meine Oma Herta
Sippel und meine Freundin Andrea Bartsch

Gliederung

1. Vorwort – Themenstellung	S.7
2. Grundlagen	S.10
2.1 Nozizeption und Schmerz	S.10
2.1.1 Aufbau und Funktionsweise peripherer nozizeptiver Strukturen	S.10
2.1.1.1 Nozizeptive Nervenfasertypen und Nozizeptoren	S.12
2.1.1.2 Spannungsabhängige Ionenkanäle	S.13
2.1.1.3 Mechanismen der bioelektrischen Signalbildung an primären Afferenzen	S.13
2.1.1.4 Chemosensibilität nozizeptiver Afferenzen	S.14
2.1.1.5 Hyperalgesie und Allodynie	S.15
2.1.1.6 Efferente Funktionen nozizeptiver Afferenzen	S.16
2.1.2 Pathophysiologie chronischer Schmerzen	S.17
2.1.2.1 Neuropathischer Schmerz – schädigende Einflüsse und Entstehungsorte ektooper Aktivität	S.17
2.1.2.2 Neuropathischer Schmerz – Entstehungsmechanismen ektooper Aktivität	S.20
2.2 Untersuchte Chemorezeptoren	S.24
2.2.1 TRPV1 und Capsaicin	S.24
2.2.2 Rezeptoren für Nukleotide und Nukleoside	S.30
2.2.3 Nikotinischer Acetylcholinrezeptor	S.35

3. Methoden und Materialien	S.40
3.1 Nervenpräparate	S.40
3.2 Messanordnung	S.41
3.3 Threshold Tracking	S.42
3.4 Intrazelluläre Calciummessung	S.44
3.5 Verwendete Chemikalien	S.45
4. Ergebnisse	S.47
4.1 Agonisten und Antagonisten von TRPV1 Rezeptoren	S.47
4.2 P2X und P2Y Rezeptor vermittelte Effekte an isolierten menschlichen peripheren Nerven – Unterschiede zwischen N. suralis und N. vagus	S.49
4.2.1 Messungen an N. suralis Präparaten	S.49
4.2.2 Messungen an N. vagus Präparaten	S.52
4.2.3 Unterschiede zwischen N. suralis und N. vagus Präparaten	S.54
4.3 Charakterisierung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren an unmyelinisierten, menschlichen C-Faseraxonen	S.55
4.3.1 Agonisten an nAChRs – ein pharmakologisches Profil humaner C-Faseraxone	S.56
4.3.2 Antagonisten an nAChRs – ein pharmakologisches Profil humaner C-Faseraxone	S.59
4.3.3 Antagonisierende Wirkung von α -Conotoxin Vc1.1 an unmyelinisierten Axonen	S.61

5. Diskussion	S.64
5.1 TRPV1 an isolierten menschlichen C-Faseraxonen	S.64
5.2 Nukleotid und Nukleosid Rezeptoren an isolierten menschlichen C-Faseraxonen	S.67
5.3 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren in der Membran unmyelinisierter menschlicher C-Faseraxone	S.70
5.4 Axonale Chemosensibilität und neuropathischer Schmerz	S.77
6. Zusammenfassung	S.79
7. Quellenverzeichnis	S.81
8. Verzeichnis der Publikationen	S.93
9. Lebenslauf	S.94
10. Danksagung	S. 96

1. Vorwort – Themenstellung

Schmerz der von Verletzungen und Erkrankungen die das Nervensystem direkt betreffen herrührt, wird als neuropathisch bezeichnet. Dem heutigen Verständnis nach sind ektope afferente Entladungen eine der primären Ursachen spontanen neuropathischen Schmerzes sowie zentraler Sensibilisierung. Für die Entstehung ektoper Aktivität werden derzeit verschiedene Modelle diskutiert. Wichtig scheinen dabei durch Nervenverletzungen bedingte Fehler im ansonsten streng regulierten Expressionsmuster neuronaler, membrangebundener Ionenkanäle und Rezeptoren zu sein. Einen Überblick über die normale und die diskutierten Mechanismen der abnormalen (ektopen) Erregungsbildung zeigt Abb. 1.

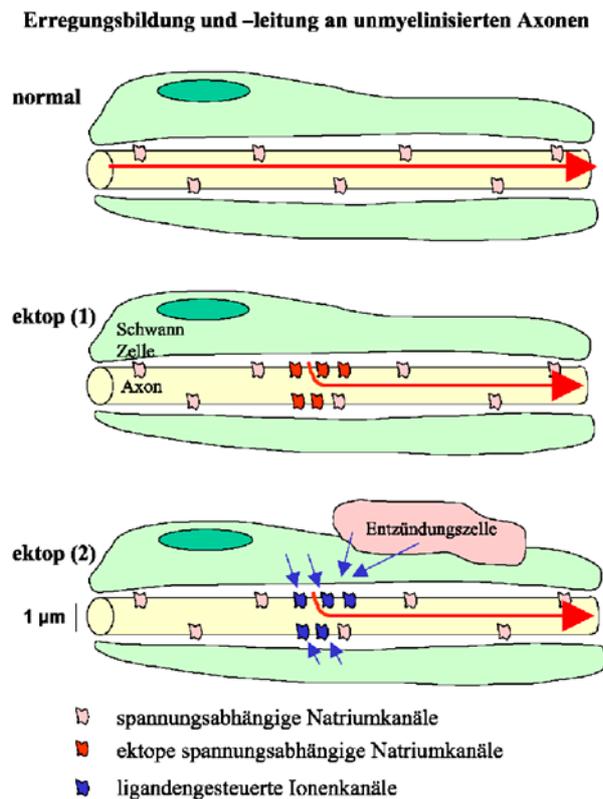


Abbildung 1

Schematische Darstellung der Erregungsbildung und -leitung an unmyelinisierten Axonen. Oben ist die normale kontinuierliche Erregungsleitung dargestellt. Abbildung 1 Mitte zeigt eine diskutierte Möglichkeit wie ektope Erregungsbildung entstehen kann. Über die Akkumulation spannungabhängiger Natriumkanäle z.B. nach Nervenverletzung (siehe hierzu Kapitel 2.1.2) werden Axone abnormal erregbar. Unten ist ein Modell gezeigt, das die Grundlage dieser Dissertation verdeutlicht. Ein inflammatorischer Zustand macht über physiologisch vorhandene Chemorezeptoren das Axon abnormal erregbar.

So ist es z.B. bekannt, daß spannungsabhängige Na⁺ Kanäle in der axonalen Membran von Neurom Endkolben, von demyelinisierten Bereichen und regenerierenden Sprossen von Neuriten akkumulieren und diese abnorm leicht erregbar machen (England 1991, 1996), (Novakovic 1998). Es erscheint dabei durchaus wahrscheinlich, daß ähnliche Veränderungen auch für membrangebundene Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle bestehen. Diese Vorgänge könnten die im Rahmen neuropathischer Schmerzen häufig bestehende Hyperexzitabilität auf mechanische, thermische und chemische Reize erklären. Somit ist in jüngster Zeit die neuronale Membran und speziell deren elektrophysiologischen Eigenschaften in zunehmendem Maße in den Fokus möglicher zukünftiger therapeutischer Ansätze bei der Behandlung neuropathischer Schmerzen gelangt (Wall 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit sollen Aspekte der Chemosensibilität menschlicher C-Faser Axone mit pharmakologischen Methoden untersucht werden, mit dem Ziel, membrangebundene Rezeptoren in puncto Subtyp, Ligandenaffinität, Kinetik und soweit möglich Funktion genauer zu charakterisieren. Ein Großteil des Wissens über Chemosensibilität peripherer Nerven sowie viele Modelle über neuropathischen Schmerz basiert auf tierexperimentell gewonnenen Erkenntnissen. Genauere Daten über neuronale membrangebundene Rezeptoren am Menschen existieren oft nicht, außerdem ist deren Funktion häufig weitgehend unbekannt. Eine eins zu eins Übertragung des Tiermodells auf die Physiologie bzw. Pathologie des Menschen ist womöglich nicht korrekt und daher grundsätzlich kritisch zu hinterfragen. In vivo Untersuchungen am Menschen ermöglichen meist nur eine begrenzte phänomenologische Beschreibung ohne die Möglichkeit zur genaueren pharmakologischen Charakterisierung des Beobachteten. Zudem sind solche Experimente durch die Zumutbarkeit an den Probanden eingeschränkt. Um die zuvor genannten Problematiken gering zu halten und dennoch der Zielsetzung dieser Arbeit gerecht werden zu können, wurden in vitro Messungen an isolierten menschlichen peripheren Nervenfasern durchgeführt. Verwendet wurden durch Biopsien und Amputationen gewonnene Nn. suralis, sowie von Magenkarzinomresektaten präparierte Nn. vagi.

Da eine komplette Untersuchung der Chemosensibilität auf alle bekannten Neuroliganden den Rahmen dieser Arbeit bei weitem überschritten hätte, ergab sich die Notwendigkeit für eine sinnvolle Beschränkung auf einige klinisch interessante

Gruppen. Hilfreich zur Eingrenzung des Themas wirkte sich dabei die Tatsache aus, daß nur für wenige der zuvor genannten Gruppen potente und zugleich ausreichend spezifische Agonisten bzw. Antagonisten zur Verfügung stehen. Einer der am besten untersuchten Chemorezeptoren des nozizeptiven Systems, ist der durch Capsaicin aktivierbare, unselektive Kationenkanal Vanilloidrezeptor VR1 (TRPV1), der eine hohe Strukturverwandtschaft mit transient receptor potential (TRP) Rezeptoren aufweist (Benham 2002). Eine Untersuchung isolierter menschlicher C-Faseraxone des N. vagus und N. suralis auf Capsaicinsensibilität erschien daher aufgrund der großen, bereits vorhandenen Informationsfülle über TRPV1 Rezeptoren sowie der Verfügbarkeit spezifischer Agonisten und Antagonisten sinnvoll.

Eine weitaus weniger gut untersuchte Chemorezeptorgruppe bilden dagegen die purinergen P2X und P2Y Rezeptoren. Die Nachweisführung für Subtypen der letztgenannten Rezeptoren an menschlichen C-Faseraxonen wurde gewählt, um dieses interessante, relativ neue Gebiet etwas genauer zu beleuchten.

Um den Bezug dieser Arbeit zu klinischen Fragestellungen herzustellen, wurden zudem Untersuchungen der Sensibilität isolierter menschlicher C-Faseraxone für Acetylcholin (ACh) durchgeführt. Zur Bewertung der C-Faser Funktion bei Patienten mit Neuropathien kann z.B. eine Iontophorese von ACh auf der Haut durchgeführt werden. Via eines ACh induzierten Axonreflexes kommt es dabei zu einer Rötung in einem Hautareal, das keinen direkten Kontakt zu ACh besaß. Anhand weiterer Untersuchungen ist hierbei die Beteiligung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren sehr wahrscheinlich (Benarroch 1991). Eine genaue Analyse der vorliegenden Subtypen, der an der Generierung des Axonreflexes beteiligten nikotinischen Acetylcholinrezeptoren, erschien daher von Interesse.

Aus oben genannten Gründen wurden deshalb im Rahmen dieser Arbeit purinerge P2X / P2Y Rezeptoren, der Vanilloidrezeptor VR1 (TRPV1) sowie nikotinische Acetylcholin Rezeptoren und deren Expressierung auf isolierten unmyelinisierten menschlichen C-Faseraxonen genauer untersucht. Um den Einstieg in die stellenweise recht komplexe Thematik zu erleichtern, bei gleichzeitiger Verdeutlichung der klinischen Relevanz, und um zelluläre Mechanismen nachvollziehbar zu halten, ist dieser Dissertation im Kapitel Grundlagen je ein Unterkapitel über Nozizeption und Schmerz sowie über Rezeptoren, im Speziellen jene der oben genannten Gruppen, hinzugefügt.

2. Grundlagen

2.1 Nozizeption und neuropathischer Schmerz

Der menschliche Organismus ist ständig Reizen aus seiner Umwelt ausgesetzt, die er adäquat verarbeiten muß, um möglichst effizient reagieren zu können. Die zentrale Rolle hierbei übernimmt das Nervensystem. Vereinfachend kann man dieses in einen efferenten und einen afferenten Schenkel unterteilen. Unter Efferenzen versteht man Erregungen, die von Nervenzellen über ihre Axone zu effektorischen Systemen geleitet werden. Im engeren Sinn ist mit dem Begriff Efferenz aber die entsprechende Leitungsbahn vom Neuron, mit Sitz im Zentralnervensystem (ZNS), zum Effektor in der Peripherie gemeint. Analog läßt sich der Begriff Afferenz erklären, mit dem Unterschied, daß hier der Informationsfluß aus der Peripherie zum ZNS gerichtet ist.

Eine der zentralen Aufgaben des afferenten Systems ist, den menschlichen Organismus vor schädigenden Einflüssen aus seiner Umwelt zu warnen sowie bei Eintritt von Schädigungen ein angemessenes, den Heilungsprozeß unterstützendes Verhalten zu bewirken. Die Wahrnehmung von Schmerz trägt wesentlich zu dieser Aufgabe bei. Zunächst ist es wichtig, eine Trennung der Begriffe Nozizeption und Schmerz zu treffen. Während man unter Nozizeption die Transduktion und Transformation eines schädigenden Reizes in bioelektrische Signale versteht, ist mit Schmerz ein Bewusstseinszustand gemeint. Die folgenden Kapitel sollen einen Überblick über Aufbau, grundlegende Arbeitsweisen, Mechanismen des nozizeptiven peripheren Nervensystems und pathologische Veränderungen bei Neuropathien vermitteln.

2.1.1 Aufbau und Funktionsweise peripherer nozizeptiver Strukturen

Periphere Nervenzellen, die auf Nozizeption spezialisiert sind, werden häufig auch einfach nur als nozizeptive Afferenzen (Sherrington 1906) oder Nozizeptoren bezeichnet. Es handelt sich hierbei um primäre Sinneszellen, deren Zellkörper in den Spinalganglien sowie dem Ganglion trigeminale liegen. Die Axone dieser Zellen teilen sich nach einer kurzen gemeinsamen Strecke in einen peripheren Ast, der Rezeptoren (Mechanozeptor, Thermozeptor, Propriozeptor, Nozizeptor und Chemozeptor) in einem

entsprechenden Zielorgan (Haut, Gefäß etc.) trägt sowie einen zentralen Ast, der im Hinterhorn des Rückenmarks an Hinterhornneuronen endet (Abb.2).

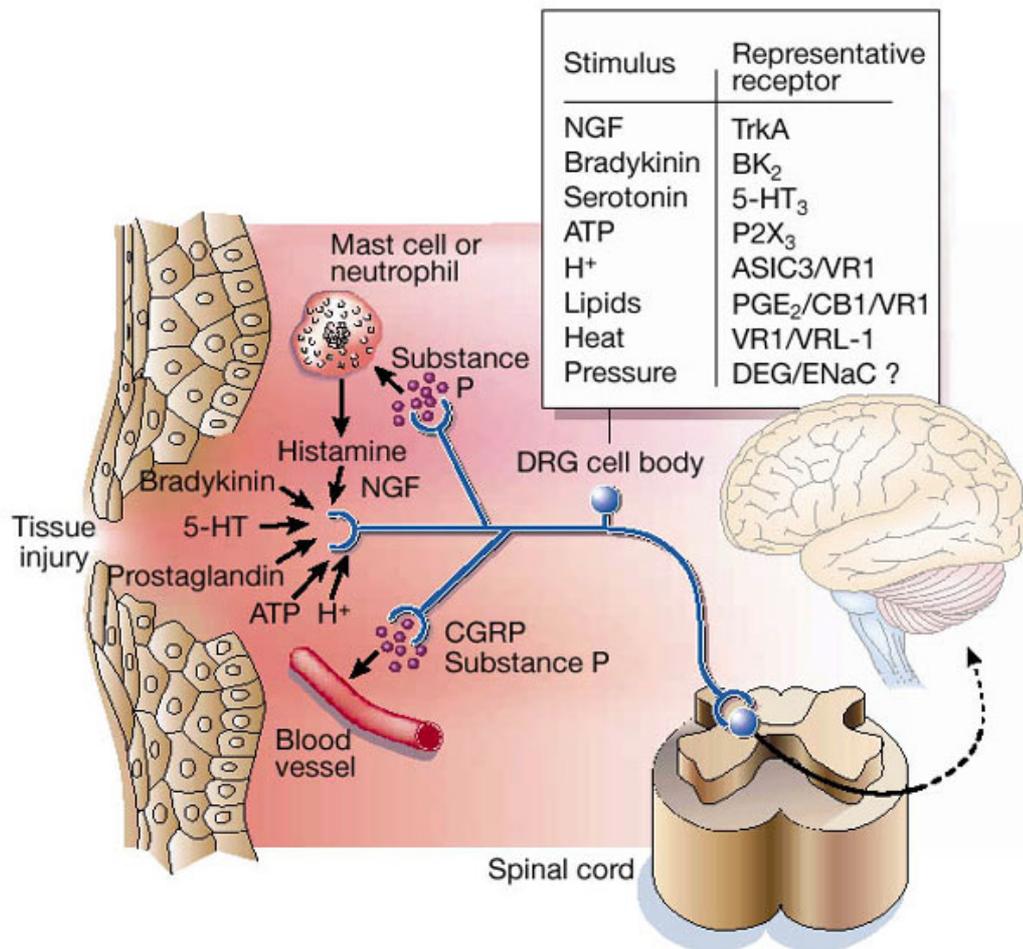


Abbildung 2

Darstellung einer nozizeptiven Afferenz (blau) mit Umschaltung auf ein zweites Neuron im Hinterhorn des Rückenmarks. Die wichtigsten, im Rahmen einer Verletzung (tissue injury) freigesetzten, Entzündungsmediatoren sowie deren Rezeptoren sind zudem gesondert aufgeführt. Jeder dieser Faktoren kann nozizeptive Terminalen sensibilisieren oder erregen. Efferente Funktionen des Nozizeptors sind anhand der Freisetzung von Substanz P und CGRP verdeutlicht (Abb. aus Julius, Basbaum 2001 Fig.3).

Ein gemeinsames Merkmal nozizeptiver Afferenzen ist eine relativ hohe Aktivierungsschwelle. Das heißt, sie reagieren erst auf noxische Stimuli. Komplizierend ist die Tatsache, daß es nicht nur eine universelle Nozizeptorarchitektur gibt, die ubiquitär verbreitet ist. Vielmehr lassen sich Subtypen anhand des vorliegenden Fasertyps, eines unterschiedlichen Antwortverhaltens und verschiedener Stimulusmodalitäten, die zu Aktionspotentialen führen, abgrenzen.

2.1.1.1 Nozizeptive Nervenfasertypen und Nozizeptoren

Die für Nozizeption verantwortlichen Nervenfasertypen werden nach Erlanger und Gasser als Typ C und A δ beziehungsweise Typ IV und III Faser nach Lloyd und Hunt bezeichnet. C-Fasern sind unmyelinisiert und haben einen geringen Durchmesser von 0,5-1,5 μm . Die daraus resultierenden elektrischen Eigenschaften ergeben eine niedrige Nervenleitungsgeschwindigkeit (NLG) von ca. 1 m/s. Die Fläche der zu C-Faser Afferenzen gehörigen rezeptiven Felder wird für den Menschen mit ca. 100 mm² angegeben (Schmidt 1997). Sensorische Untersuchungen mit überschwelligem Reizen zeigten, daß Aktionspotentiale in C-Fasern zu einem langsam einsetzenden brennenden Schmerz mit geringer diskriminativer Information führen. A δ -Fasern sind schwach myelinisiert und besitzen einen Durchmesser von 2-5 μm . Ihre NLG beträgt ca. 10-30 m/s. Die Größe ihrer rezeptiven Felder stimmt in etwa mit der für C-Faser Afferenzen überein. Sie werden für einen ersten, hellen, scharfen Schmerz mit größerer diskriminativer Information gegenüber C-Faser Nozizeptoren verantwortlich gemacht. Vereinzelt findet man für Nozizeptoren noch die Bezeichnungen CMH (c-fibre-mechano-heat sensitive) und AMH (a-fibre-mechano-heat sensitive). Letztgenannte stammen aus einer Zeit, als man zum Studium dieser Afferenzen ausschließlich mechanische und thermische Stimuli verwendete. Erst später konnte gezeigt werden, daß Nozizeptoren, die durch mechanische oder thermische Reize erregbar sind, in den meisten Fällen ebenfalls Chemosensibilität aufweisen (Davis 1993). Es handelt sich also in der Regel um polymodale Nozizeptoren. Unterschiede im Antwortverhalten bestehen in einer höheren Entladungsfrequenz auf Seiten der A δ -Faser Afferenzen. Mittels physiologischer Untersuchungsmethoden lassen sich zwei A δ -Faser Afferenzen Typ I und II charakterisieren (Treede 1998). Typ I Afferenzen zeigen eine niedrige Aktivierungsschwelle für mechanische Stimuli und können als klassische AMH's angesehen werden. Typ II A δ -Faser Nozizeptoren weisen dagegen hohe mechanische Aktivierungsschwellen auf. Ferner bestehen Unterschiede z.B. in Lokalisation und Antwortverhalten.

2.1.1.2 Spannungsabhängige Ionenkanäle

Vereinfachend kann man sagen, daß zwischen Nozizeption und Schmerzwahrnehmung drei Abläufe liegen. Transduktion und Transformation des noxischen Stimulus in bioelektrische Signale sowie Konduktion dieser Information über einen peripheren Nerv an zentrale afferente Neurone im Hinterhorn des Rückenmarks. Von dort aus gelangt diese Information über spezielle Bahnen in das Gehirn. Ein elementarer Baustein dieser oben genannten Vorgänge sind spannungsabhängige Ionenkanäle. Für einwärts gerichtete Membranströme sind im wesentlichen spannungsabhängige Natrium (Na^+) und Calcium (Ca^{2+}) Kanäle verantwortlich, während Auswärtsströme hauptsächlich durch Kalium (K^+) Kanäle generiert werden.

Spannungsabhängige Na^+ Kanäle öffnen schnell und transient auf Membrandepolarisationen von ca. 30 mV. Der daraus resultierende Na^+ Influx in die Zelle bewirkt eine weitergehende schlagartige Membrandepolarisation und generiert so im wesentlichen das Aktionspotential und dessen Konduktion. Auch Calcium Influx durch spannungsabhängige Ca^{2+} Kanäle führt zu einer direkten Membrandepolarisation. Ferner können resultierende Anstiege der intrazellulären Ca^{2+} Ionenkonzentration eine Vielzahl weiterer zellulärer Prozesse, wie z.B. Transmitterfreisetzung, Enzymregulation und die Aktivierung anderer Membrankanäle bewirken. K^+ Kanäle dienen hauptsächlich der Stabilisierung des Ruhemembranpotentials und der Terminierung eines ausgelösten Aktionspotentials. So öffnen z.B. verzögerte Gleichrichter (delayed rectifier) K^+ Kanäle bei Depolarisation und führen auf diesem Wege zu einer raschen Repolarisation, die das Aktionspotential terminiert.

2.1.1.3 Mechanismen der bioelektrischen Signalbildung an primären Afferenzen

Die Bildung sensorischer Impulse beginnt, nach klassischer Lehrmeinung, an den für die Reizaufnahme spezialisierten Endigungen der peripheren Axonäste primärer sensorischer Afferenzen. Die Einwirkung eines adäquaten Reizes bewirkt zunächst eine Aktivierung der entsprechenden Transduktionsmechanismen. Dabei entsteht eine kontinuierliche, sich zur Reizstärke proportional verhaltende Änderung des Membranpotentials, die meist in einer Depolarisation besteht. Diese Potentialänderung, auch Generatorpotential genannt, führt, falls sie ausreichend groß ist, zur Aktivierung spannungsabhängiger Ionenkanäle. Wie unter 2.1.1.2 gezeigt, sind hierbei, ein zuvor

bestehendes Ruhemembranpotential vorausgesetzt, überwiegend spannungsabhängige Na^+ Kanäle beteiligt. Die Positivierung des Membranpotentials führt zur Öffnung weiterer spannungsabhängiger Na^+ Kanäle und endet letztendlich in einer explosionsartigen Membrandepolarisation, dem Aktionspotential. Nachdem also Transduktion des Reizes und Transformation des Signals in ein Aktionspotential abgelaufen sind, kann nun die Konduktion dieser Information an das Zentralnervensystem erfolgen.

2.1.1.4 Chemosensibilität nozizeptiver Afferenzen

Wie unter 2.1.1.2 gezeigt, bedarf es zur Bildung neuronaler Aktivität der Aktivierung von spannungsabhängigen Ionenkanälen. Transmitter und Entzündungsmediatoren können hier auf zweierlei Weise eingreifen. Über ligandenaktivierbare Ionenkanäle, meist mit Leitfähigkeit für Kationen, kann das axonale Ruhemembranpotential durch einen Na^+ und eventuell vorhandenen Ca^{2+} Einwärtsstrom an die Aktivierungsschwelle spannungsabhängiger Ionenkanäle herangeführt werden und ein Aktionspotential auslösen. Das bei einer Verletzung, z.B. einer Schnittwunde, aus Thrombozyten und Mastzellen freigesetzte 5-Hydroxytryptamin (5-HT) kann dies über den 5-HT_3 Rezeptorkanal bewirken. Auch ATP, dessen extrazelluläre Konzentration bei Zellschäden ansteigt, aber auch durch Kofreisetzung mit Noradrenalin aus sympathischen Efferenzen (Burnstock 1996) freigesetzt wird, kann über P2X Rezeptorkanäle den oben genannten Effekt erzielen. Capsaicin, der stechend scharfe Inhaltsstoff der Pfefferschote, entfaltet ebenso auf diesem Weg seine Wirkung. Und nicht zuletzt, auch Acetylcholin wirkt u.a. über ligandenaktivierbare Ionenkanäle.

Eine zweite Möglichkeit zur Einflußnahme auf die Aktivität nozizeptiver Afferenzen verläuft via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren. Diese Rezeptoren bestehen aus einer heptahelikalen Transmembrandomäne, deren cytoplasmatisches Ende mit einem heterotrimeren (α , β , γ Untereinheiten) G-Protein interagiert. Anhand der vorliegenden α -Untereinheit unterteilt man G-Proteine in G_s (Adenylatcyclase Weg), G_q (Phospholipase Weg) und $G_{i/o}$ (inhibitorisch auf Adenylatcyclase Weg). Über einen nachgeschalteten Signaltransduktionsprozeß (Abb. 3) erfolgt die Phosphorylierung spezieller Aminosäuren an Schlüsselstrukturen spannungsabhängiger Ionenkanäle, wodurch deren Öffnungswahrscheinlichkeit modifiziert werden kann (Wall 1999).

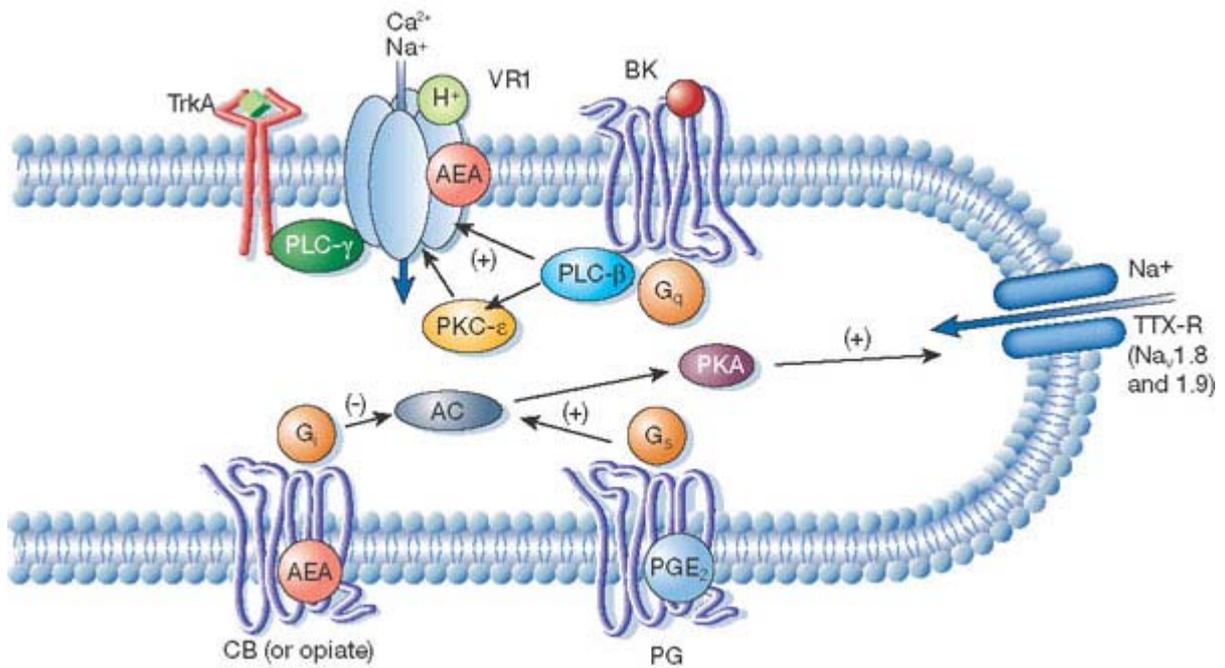


Abbildung 3

Schema zur Verdeutlichung des Zusammenspiels ligandenaktivierbarer Ionenkanäle sowie G-Protein gekoppelter Rezeptoren mit spannungsabhängigen Ionenkanälen (hier NaV1.8 und NaV1.9). TrkA=Tyrosinkinase A; VR1=Vanilloidrezeptor 1; BK=Bradykininrezeptor; CB=Cannabinoidrezeptor; PG=Prostaglandinrezeptor; G=G-Protein; PLC=Phospholipase C; AC=Adenylatcyclase; PKC=Phosphokinase C; PKA=Phosphokinase A; (Abb. aus Julius, Basbaum 2001 Fig.4).

Eine auf diese Art bewirkte Steigerung der Empfindlichkeit von Nozizeptoren wird als periphere Sensibilisierung bezeichnet. Mediatoren, die typischer Weise im Rahmen von Entzündungen und Verletzungen entstehen bzw. freigesetzt werden, z.B. Bradykinin, 5-HT (hier Wirkung über 5-HT_{1B/D}, 5-HT₄ Rezeptoren) und Prostaglandine, wirken über diesen Weg und können so zur Erregung nozizeptiver Afferenzen beitragen.

2.1.1.5 Hyperalgesie und Allodynie

Eine Vielzahl von Entzündungsmediatoren, z.B. Produkte aus dem Arachidonsäuremetabolismus, wie Prostaglandine und Leukotriene, können eine gesteigerte Mechano- sowie Thermosensibilität durch periphere Rezeptorsensibilisierung bewirken (Davis 1993). Ein typisches Beispiel hierfür stellt die durch einen Sonnenbrand geschädigte Haut dar, die ein deutlich gesteigertes Schmerzempfinden auf mechanische und thermische Reize aufweist. Solche Phänomene werden durch die Begriffe Hyperalgesie und Allodynie beschrieben.

Hyperalgesie ist als eine Linksverschiebung der Stimulus-Antwort-Kurve definiert. Dies bedeutet, daß ein zuvor bereits schmerzhafter Reiz nun noch schmerzhafter empfunden wird. Während Allodynie durch ein Schmerzempfinden auf zuvor nicht schmerzhafte Reize definiert ist. Der Begriff Hyperalgesie darf dabei nicht mit peripherer Sensibilisierung gleichgesetzt werden. Periphere Sensibilisierung bezieht sich nur auf Vorgänge am Nozizeptor selbst, erteilt jedoch keine Auskunft darüber, ob dessen Aktivität auch zu einer schmerzhaften Empfindung führt, wie es bei Hyperalgesie im allgemeinen der Fall ist. Ferner wird eine primäre von einer sekundären Hyperalgesie unterschieden. Primäre Hyperalgesie ist auf das verletzte Gewebeareal beschränkt und entsteht durch eine periphere Sensibilisierung nozizeptiver Afferenzen (vgl. Kapitel 2.1.1.4). Der Reiz, der im Zustand der primären Hyperalgesie zu einem gesteigerten Schmerzempfinden führt, wird dabei in einer erhöhten Aktionspotentialfrequenz codiert. Sekundäre Hyperalgesie bezeichnet dagegen einen Zustand verstärkten Schmerzempfindens ausschließlich auf mechanische Reize im intakten Gewebe in der Umgebung der Verletzung (Ali 1996). Letztgenannte Form der Hyperalgesie scheint dabei durch zentrale Sensibilisierung sowie durch Veränderungen der Verarbeitung niederschwelliger A β -Mechanorezeptorerregungen zu entstehen.

2.1.1.6 Efferente Funktionen nozizeptiver Afferenzen

Auf den ersten Blick erscheint es paradox, daß afferente nozizeptive Nervenfasern auch efferente Funktionen übernehmen. Dennoch wurden inzwischen einige Phänomene, wie z.B. Hautrötung oder Ödembildung im Rahmen neurogener Entzündungen, unter anderem auf dieses Prinzip zurückgeführt. Verletzungsbedingte Aktivität primärer Afferenzen führt zur Freisetzung vasoaktiver Neuropeptide, wie Substanz P (SP) oder Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), aus den erregten Nervenmembranabschnitten in der betroffenen Körperregion. Diese Peptide führen zu Vasodilatation und einer gesteigerten Plasmaextravasation. Eine chronische Freisetzung dieser Substanzen könnte zudem für einige Symptome des komplexen regionalen Schmerzsyndroms (CRPS) verantwortlich sein, das als lokal begrenzte Rötung, Schwellung, Schmerz sowie gesteigerte Schweißsekretion und verstärktes Haarwachstum in der betroffenen Region auftritt bzw. sich bemerkbar macht (Birklein 2003). Ferner wird angenommen, daß afferente Neurone auch trophische Funktionen in somatischen und viszerale Strukturen übernehmen. Dies könnte z.B. in der lokalen

Regulation der Aktivität autonomer Ganglien oder viszeraler glatter Muskelzellen der Fall sein (Wall 1999).

2.1.2 Pathophysiologie chronischer Schmerzen

Ereignisse wie Trauma, Operation oder Entzündung führen zu akutem Schmerz. Dieser warnt vor drohender Gefahr oder ist bereits Ausdruck einer eingetretenen Gewebeschädigung. In der Regel klingen diese akut auftretenden Schmerzen nach Beendigung der Schädigung innerhalb von wenigen Stunden bis Tagen wieder ab. Wie bereits in den vorangehenden Kapiteln beschrieben, bestehen die Mechanismen, die zu akutem Schmerz führen, in der Erregung und Sensibilisierung nozizeptiver Afferenzen durch schädigende physikalisch-chemische Reize sowie in der Verarbeitung dieser Information im Zentralnervensystem. Irreversible strukturelle Veränderungen entstehen dabei in aller Regel nicht. Von chronischen Schmerzen spricht man bei einer ununterbrochenen oder ständig wiederkehrenden Schmerzsymptomatik und Beeinträchtigungen auf kognitiv-emotionaler, sozialer und physiologisch-organischer Ebene von drei bis sechs Monaten Dauer (Thieme's Innere Medizin TIM 1999). Die Ursachen für chronischen Schmerz können dabei sowohl peripher als auch zentral lokalisiert sein. Im Gegensatz zum akuten Schmerz kommt es aber im chronifizierten Zustand zu einer Vielzahl von teilweise irreversiblen strukturellen Veränderungen, die in diesem Kapitel näher beleuchtet werden sollen.

2.1.2.1 Neuropathischer Schmerz – schädigende Einflüsse und Entstehungsorte ektoper Aktivität

Trauma oder Erkrankungen, die das Nervensystem direkt betreffen, führen häufig zu chronischen Schmerzen. Derartige Zustände werden als neuropathische Schmerzsyndrome bezeichnet. Der Begriff neuropathischer Schmerz umfasst dabei sowohl Schmerz durch Läsionen des peripheren als auch des zentralen Nervensystems. Das Spektrum potentiell schädigender, zu Läsionen führender Ereignisse ist dabei groß und reicht von metabolischen Erkrankungen über Schlaganfall bis zur Amputation einer Extremität. Neuropathischer Schmerz tritt oftmals paroxysmal auf. Er wird von Patienten meist als stromstoßartig, prickelnd, brennend oder stechend beschrieben. Dabei scheinen eine gesteigerte elektrische Erregbarkeit sensorischer Neurone sowie

das Auftreten ektooper repetitiver Erregungen ein grundlegendes Substrat des neuropathischen Schmerzes zu sein (Wall 1999). Im folgenden sollen nun Entstehungsorte und Mechanismen dieser, zu neuropathischen Dysästhesien führenden, ektooper Erregungen vorgestellt werden.

Oben genannte, ektop gebildete, Aktionspotentiale entstehen häufig spontan oder im Rahmen einer abnormen Antwort auf Reize im Sinne einer Übererregbarkeit auf mechanische, thermische oder chemische Stimuli. Wall und Gutnik beobachteten 1974 diese spontane Erregungsbildung sowie die zuvor beschriebene Hyperexzitabilität an experimentell ausgelösten Neuomen des N. ischiadicus. Wann immer eine Verletzung eines peripheren Nervs mit einer Durchtrennung des Perineuriums einhergeht, entsteht ein Neurom. Selbst bei einer neurochirurgischen Wiederherstellung der Kontinuität des Perineuriums als Leitstruktur für neue Axonsprossen gibt es einen gewissen Prozentsatz an Fasern, die Neuome an der Läsionsstelle oder disseminierte Mikroneuome im Verlauf des distalen Nervenstammes ausbilden (Wall 1999). Neuombildung ist somit regelmäßig bei der Amputation einer Extremität der Fall und scheint eine plausible Erklärung für Dysästhesien am Amputationsstumpf zu sein. Weitere Experimente zeigen, daß spontane ektope Erregungen nicht nur an Neuomen sondern auch an den distalen regenerativen Axonsprossen entstehen.

Untersuchungen der Mechanosensibilität von Hautregionen nahe ehemaliger Läsionsstellen wiesen kleine Areale gesteigerter mechanischer Erregbarkeit, sogenannter „Hotspots“, in der Zone starker Neuromkonzentrierung und Axonsprossen auf, die als Quelle ektooper Erregungsbildung angesehen werden. Letztgenannte Sprossen scheinen z.B. Ursprung für das mechanisch provozierbare, Regeneration anzeigende Tinel-Hoffmann-Zeichen zu sein. Des weiteren entstehen solche mechanosensiblen Hotspots bevorzugt an Stellen wo Nerven in ihrem Verlauf einen engen Kontakt zu Strukturen wie Knochen, Sehnen oder Faszien besitzen. An solchen physiologischen Engstellen kann es leicht zu einer Kompression und damit zur Schädigung eines peripheren Nervs kommen. Derartige Erkrankungen werden unter dem, zu neuropathischen Schmerzsyndromen zählenden, Überbegriff Engpasssyndrome zusammengefasst. Als Beispiel dafür sei hier der Verlauf des N. medianus im Karpaltunnel genannt.

Auch Temperaturveränderungen haben Auswirkungen auf Neuome. Eine Erhöhung der Temperatur führt zu einer gesteigerten Aktivität in myelinisierten Fasern, während Kühlung diese unterdrückt. Neuome von unmyelinisierten Axonen weisen dagegen ein

genau umgekehrtes Verhalten auf (Matzner 1987). Diese Beobachtung könnte die von Amputationspatienten häufig als schmerzhaft berichtete Kälteintoleranz erklären. Und nicht zuletzt, scheint auch in punkto Chemosensibilität eine, neuropathischen Schmerz verursachende, Übererregbarkeit an Neuromen zu bestehen, die im Rahmen dieser Arbeit von besonderem Interesse ist.

Das zuvor erwähnte Engpasssyndrom legt bereits nahe, daß für die Entstehung ektooper Erregungen keineswegs immer eine komplette Kontinuitätsunterbrechung mit Degeneration von Axonen und Neurombildung Voraussetzung ist. Der wesentliche Punkt scheint vielmehr in einer traumatischen oder erkrankungsbedingten Dysmyelinisierung der Axone zu liegen (Calvin 1982), (Baker 1992). Und in der Tat läßt sich auch die an Neuromen vorkommende Ektopie zumindest teilweise auf Dysmyelinisierungen nahe der Verletzungsstelle zurückführen (Wall 1999). Das Gros der schmerzhaften Neuropathien ist jedoch durch metabolische Erkrankungen, wie Diabetes mellitus, chronische Nierenerkrankungen, Leber und Schilddrüsenfunktionsstörungen sowie Vitaminmangelzustände bedingt (Böcker 2001). Die Art und Weise des Schädigungsvorganges ist nach wie vor nicht genau bekannt. Morphologisch finden sich hierbei axonal degenerative und demyelinisierende Mischbilder aller Nervenfaserklassen. Bei der diabetischen Polyneuropathie, die circa 30% aller Polyneuropathien ausmacht, können jedoch C und A δ -Fasern besonders schwer betroffen sein. Ferner seien hereditäre Erkrankungen des peripheren Nervensystems erwähnt, wie z.B. die hereditär-motorisch-sensorischen Neuropathien (HMSN Typen I-VII), die morphologisch ebenfalls mit Dysmyelinisierungen einhergehen. Der Vollständigkeit halber seien auch entzündlich-immunologische Neuropathien, wie die postzosterische Neuralgie, das Guillain-Barré-Syndrom sowie toxische Neuropathien, die neben den metabolisch bedingten einen nicht unerheblichen ätiologischen Anteil ausmachen, genannt.

Neben den peripheren gibt es auch zentral lokalisierte Schädigungen, die zu dem Bild eines neuropathischen Schmerzsyndroms führen können. Erkrankungen, wie die fokal demyelinisierende Multiple Sklerose, können zu den zuvor beschriebenen Übererregbarkeiten an zentralen Axonen führen (Nordin 1984) und neuropathischen Schmerz auslösen. Die genauen zugrunde liegenden Vorgänge bei der Entstehung zentraler Schmerzsyndrome sind jedoch noch immer weitestgehend unverstanden. Notwendig scheint jedoch eine Läsion bestimmter Areale des Thalamus oder eine extrathalamische Schädigung des Tractus spinothalamicus zu sein (Diener 1997).

2.1.2.2 Neuropathischer Schmerz – Entstehungsmechanismen ektooper Aktivität

Wie bereits zuvor erwähnt, stellen ektope, häufig repetitive, afferente Erregungen eine Quelle neuropathischen Schmerzes dar. Sie sind zugleich ein wichtiger Faktor für die Auslösung und Aufrechterhaltung einer, durch den starken afferenten Erregungseingang bedingten, zentralen Sensibilisierung, die ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Entstehung neuropathischen Schmerzes einnimmt. Die Frage ist nun, wie diese peripheren ektope Erregungsbildungen zustande kommen.

Ein Überbegriff für die zu ektope afferenten Erregungen führenden Entstehungsmechanismen könnte „Umgestaltung der axonalen Membran“ lauten. Denn von deren elektrophysiologischen Eigenschaften hängt die Fähigkeit zur Erregungsbildung ab. Die Beobachtung, daß die Halbwertszeit spannungsabhängiger Natriumkanäle ungefähr ein bis drei Tage beträgt (Brismar 1987), kann vielleicht einen Eindruck vermitteln, welchen dynamischen Umbauprozessen die normale axonale Membran täglich unterliegt. Neue Ionenkanäle, Rezeptoren, Transduktionsmoleküle etc. werden an den Ribosomen im neuronalen Zellkörper synthetisiert und anschließend, in Vesikeln verpackt, entlang des Axons transportiert und am Zielort in die Membran durch Exozytose eingebaut. Zugleich werden alte, bereits in die Membran integrierte Moleküle erneut aufgenommen und abgebaut. Die Folge ist also ein Fließgleichgewicht der in die Membran integrierten Moleküle. Es liegt nahe, daß diese hochsensiblen Vorgänge einem fein regulierten Kontrollmechanismus unterliegen müssen, der jedoch bis heute nur äußerst bruchstückhaft bekannt ist. In diese Kontrolle scheinen aber neben dem Neuron selbst auch Zellen wie Gliazellen und Merkelzellen involviert zu sein (Wall 1999). Die Arbeitshypothese besagt nun, daß eine Nervenverletzung zu einer Störung dieses Kontrollmechanismus führt. Die daraus resultierende Entgleisung des zuvor erwähnten Fließgleichgewichtes zieht dann gravierende Änderungen der elektrischen Membraneigenschaften nach sich. Solche Veränderungen bestehen z.B. in einer Akkumulation spannungsabhängiger Natriumkanäle. Diese Akkumulation ist bereits seit längerem in Neuomen, an demyelinisierten Axonbereichen und an regenerierenden Axonsprossen bekannt (England 1991), (Black 1991). Die erhöhte Dichte an membrangebundenen, spannungsabhängigen Natriumkanälen macht diese Membranabschnitte äußerst leicht erregbar (Omana-Zapata 1997). Begünstigend auf diese Akkumulation scheint sich dabei zudem das durch die Läsion bedingte

Verschwinden des Myelins auszuwirken. Letztgenanntes scheint normalerweise einen, den „Membran-Einbau verhindernden“, Effekt auf die zugehörige Axonmembran auszuüben (Waxman 1985). Bis jetzt unbewiesen, aber dennoch plausibel, erscheint die Vermutung, daß eine ähnliche Akkumulation auch für andere Ionenkanäle, Transduktionsmoleküle und Rezeptoren zutrifft. Dies könnte die im Rahmen von neuropathischen Dysästhesien häufig auftretenden abnormen Mechanosensibilitäten, Thermosensibilitäten und Chemosensibilitäten erklären. Zugleich beinhaltet die letztgenannte Vermutung auch eine Arbeitshypothese für diese Dissertation, denn mit der Bestimmung von Rezeptorsubtypen an menschlichen C-Faseraxonen könnte in Zukunft deren Akkumulation an Nervenläsionsstellen leichter nachgewiesen werden.

Doch nicht nur der Kontrollmechanismus zur Regelung des Ein- und Ausbavorgangs membrangebundener Moleküle scheint nach einer Nervenverletzung gestört zu sein. Auch die Synthese von Ionenkanälen und Rezeptoren unterliegt Veränderungen, die teilweise deutlichen Einfluß auf die Erregbarkeit der axonalen Membran haben. So wird z.B. der Natriumkanal Typ III in seiner Expression heraufreguliert, während die Natriumkanäle NaV1.8 (SNS/PN3), NaV1.9 (NaN) sowie Kaliumkanäle herunterreguliert werden (Novakovic 1998), (Everill 1998). Die zuletzt genannten Veränderungen im Expressionsmuster könnten ebenfalls zur Ektopie und Übererregbarkeit der Membran beitragen. Auf der Suche nach Signalen, die diese Veränderungen nach einer Nervenverletzung bewirken, sind in den letzten Jahren Neurotrophine, wie Nerve Growth Factor (NGF), in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Es wird angenommen, daß NGF im innervierten Gewebe gebildet wird, unter normalen Umständen vom zugehörigen Axon in der Peripherie aufgenommen und retrograd in den Zellkörper transportiert wird. Dieser Transport scheint sowohl für das Überleben als auch für die funktionelle Differenzierung des Neurons von Bedeutung zu sein. Eine Unterbrechung dieses Signals, z.B. durch eine Nervenläsion, könnte der Hypothese nach der Auslöser für einen geänderten Phänotyp, sprich eine geänderte Ionenkanalexpression des Neurons, sein. Nicht zuletzt könnten auch Entzündungsmediatoren, via an den Signaltransduktionsprozeß gekoppelter Phosphorylierung, die Eigenschaften von Ionenkanälen verändern und somit ebenfalls zur Ektopie und Übererregbarkeit beitragen (Wall 1999). Derartige Mediatoren sind regelmäßig an Nervenläsionsstellen vorhanden. Der wohl am längsten bekannte Mechanismus zur Entstehung ektooper Aktivität wurde jedoch 1945 von Granit und Skoglund anhand akuter Nervendurchtrennungen entdeckt. In diesen Fällen schienen

benachbarte Axone in den verbliebenen Nervenstümpfen kurzgeschlossen zu sein. Die Aktivität eines Axons konnte somit auf benachbarte Axone überspringen. Dies wird heute als ephaptische Erregung bezeichnet. Als Ursache dieses Kurzschließens von Axonen wird ein verletzungsbedingtes Verschwinden der normalen elektrischen Isolierung durch Gliazellen angenommen (Rasminsky 1978), (Fried 1993). Ephaptische Erregung tritt dabei sowohl in afferenten und efferenten Fasern als auch gemischt auf und wird in Neuomen, regenerierenden Sprossen sowie demyelinisierten Bereichen beobachtet (Rasminsky 1978). Über diesen Weg kann z.B. die Aktivität einer niederschweligen Afferenz auf eine nozizeptive Faser übergreifen und eine normalerweise nicht schmerzhaft Berührungsempfindung wird als schmerzhaft empfunden.

Zu Ektopien führende Veränderungen finden sich auch in anderen Bereichen. Ein gutes Beispiel liefert das zum neuropathischen Formenkreis gerechnete komplexe regionale Schmerzsyndrom (CRPS). Man unterscheidet das durch Gewebeschädigung ohne größere Nervenverletzung entstandene CRPS I (Synonyme: Algodystrophie, Morbus Sudeck, sympathische Reflexdystrophie) von einem nach Nervenläsionen auftretenden CRPS II (Synonym: Kausalgie) (Treede 1998). Bei manchen Patienten mit CRPS I oder II werden neuropathische Dysästhesien durch Aktivität in sympathischen Efferenzen verstärkt. Derartige Dysästhesien lassen sich durch eine intravenöse regionale Sympathikusblockade (IVRSB) mit Guanethidin verringern (Gehling 2003). Hier wird von einem sympathikusabhängigen Schmerz (sympathetically maintained pain, SMP) gesprochen. Eine wirksame IVRSB kann somit zur Abgrenzung derjenigen Patienten mit einem sympathikusunabhängigen Schmerz (sympathetically independant pain, SIP) dienen. Im Zusammenhang mit Entstehungsmechanismen neuropathischer Schmerzen sei hier die CRPS Erkrankung mit SMP etwas ausführlicher erwähnt. Aus experimentellen Untersuchungen ist bekannt, daß Aktivität in nozizeptiven Afferenzen zu einer ebenfalls gesteigerten Aktivität in sympathischen Nervenfasern führt. Der generelle Umkehrschluß ist jedoch unzulässig (Wall 1999). Dennoch scheinen unter gewissen pathologischen Situationen, wie z.B. dem zuvor genannten CRPS mit SMP, nozizeptive Afferenzen unter dem Einfluß des sympathischen Nervensystems zu stehen (Jänig 1996). Die alte Annahme, daß SMP durch eine gesteigerte sympathische Aktivität bedingt ist, gilt mittlerweile als überholt. Jüngste Untersuchungen zeigen, daß bei SMP die Aktivität sympathischer Efferenzen sogar vermindert ist (Jänig 1996). Zudem sprechen normale, ungeschädigte nozizeptive Afferenzen allenfalls minimal auf

Katecholamine an (Wall 1999) und eine lokale Gabe von Noradrenalin wird von gesunden Probanden nicht als schmerzhaft empfunden (Treede 1998). Viel wahrscheinlicher ist daher, daß eine gesteigerte Katecholaminsensibilität auf Seiten der betroffenen sensorischen Afferenzen für SMP verantwortlich ist (Treede 1998). Unterstützt wird diese Vermutung durch die Beobachtung, daß in Hautbiopsien von Patienten mit SMP die Dichte von α -adrenergen Rezeptoren gegenüber Gesunden erhöht war (Drummond 1996). Diese Sensibilitätssteigerung scheint dabei überwiegend durch die gesteigerte Expression von α_1 -adrenergen Rezeptoren bedingt zu sein (Wall 1999). Im Blut zirkulierende oder aus sympathischen Efferenzen freigesetzte Katecholamine können so bei CRPS mit SMP, über eine gesteigerte adrenerge Sensibilität sensorischer Afferenzen, ektope Erregungen auslösen.

2.2 Untersuchte Chemorezeptoren

Damit Zellen auf Signale reagieren können, müssen sie mit für deren Aufnahme spezialisierten Strukturen ausgestattet sein. Dies sind Rezeptoren, deren Spezifität die Zelle in die Lage versetzt zwischen einer Vielzahl verschiedener Stimuli zu unterscheiden. Anhand der Art des Signals lassen sich Thermorezeptoren und Mechanorezeptoren, auf die hier nicht näher eingegangen werden soll, von Chemorezeptoren abgrenzen. Wie bereits in der Themenstellung erwähnt, bedurfte es bei der Untersuchung der Chemosensibilität isolierter menschlicher C-Faseraxone einer Beschränkung auf einige interessante Gruppen. Im folgenden soll daher auch nur auf diese eingegangen werden.

2.2.1 TRPV1 und Capsaicin

Das Alkaloid Capsaicin, die scharfe Substanz der Pfefferschote, hielt bereits vor Jahrhunderten Einzug in die Gastronomie (Szallasi 1999). Bei Menschen und Säugetieren führt die Exposition nozizeptiver Terminalen gegenüber Capsaicin zur Erregung der betroffenen Neurone und somit zu einer stechend brennenden Schmerzwahrnehmung einhergehend mit der lokalen Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Nach einer längeren Expositionszeit desensibilisieren jedoch diese Nozizeptoren gegenüber Capsaicin Stimuli und anderen noxischen Reizen (Szolcsányi 1993). Neben der Verwendung als scharfes Gewürz fand Capsaicin daher Gebrauch als eine Art frühes Analgetikum (Dasgupta 1997) und erlebt in dieser Funktion derzeit eine gewisse Renaissance in der Behandlung schmerzhafter Zustände wie Neuropathien oder rheumatoide Arthritis (Szallasi 1996). Die Isolierung von Capsaicin erfolgte 1846 durch Thresh, der zugleich für die Namensgebung verantwortlich zeichnet. Dennoch bedurfte es weiterer 73 Jahre, bis Nelson 1919 die exakte chemische Struktur von Capsaicin entdeckte. Capsaicin, das Vanillylamid der 8-Methylnon-6-ensäure, besteht aus einer aromatischen sowie einer aliphatischen Region, die über eine Amidbrücke verbunden sind (Abb.4). Lange Zeit ungeklärt blieb dagegen der Mechanismus, auf dem Capsaicin seine Wirkung entfaltet. Szolcsányi und Jancsó-Gábor stellten 1975 anhand der ihnen vorliegenden Daten die inzwischen bestätigte Vermutung auf, daß die Wirkung von Capsaicin über einen Rezeptor vermittelt wird. 1991 beschrieb Holzer den bis dato nicht näher bekannten Vanilloidrezeptor (VR) anhand einer Capsaicin vermittelten

Ionenleitfähigkeit. Erst 1997 gelang die Identifizierung eines durch Capsaicin aktivierbaren Ionenkanals aus cDNA sensorischer Rattenneurone sowie die anschließende Klonierung dieses Rezeptors, der als Vanilloidrezeptor 1 (VR1) bezeichnet wurde (Caterina 1997).

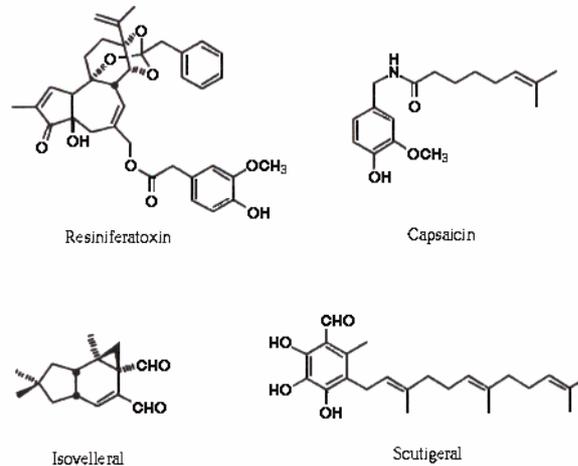


Abbildung 4

Die Abbildung zeigt Strukturformeln von Vertretern der vier chemischen Klassen (Resiniferanoide, Capsaicinoide, ungesättigte Dialdehyde und Triprenyl Phenole) natürlich vorkommender Vanilloide. (Abb. aus Szallasi 1999)

Im Jahr 2000 klonierten Hayes et al. das humane Pendant (hVR1) des Ratten-Vanilloidrezeptors 1 (rVR1), der eine 92% Homologie mit rVR1 aufweist (Hayes 2000). Da jedoch weitere Vanilloidrezeptoren, wie z.B. VRL-1, VRL-2, ECaC1 und ECaC2 existieren, die keinerlei Aktivierbarkeit durch Vanilloide wie Capsaicin aufweisen, ist diese Namensgebung etwas verwirrend. Um dieser Unstimmigkeit in der Vanilloidrezeptornomenklatur zu entgehen, wird heute die Bezeichnung TRPV statt Vanilloidrezeptor verwendet.

Rezeptor	TRPV	Agonisten	Antagonisten
VR1	TRPV1	Capsaicin, pH<5,9, T>43°C, Anandamid, Phorbole, 12-HPETE	Capsazepine, Ruthenium red

Tabelle 1

Aktivatoren und Inhibitoren des Vanilloidrezeptors 1 (modifiziert aus Gunthorpe 2002 Tab.1, Benham 2002 Tab.1 und Xu 2002).

Wie bereits zuvor erwähnt, erregt Capsaicin primär sensorische Neurone, deren Somata in den Hinterwurzelganglien bzw. im Ganglion trigeminale und Ganglion nodosum liegen. Diese vanilloidsensiblen Neurone sind überwiegend peptiderg und ihre Zellkörper besitzen meist nur einen geringen Durchmesser, so daß es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um unmyelinisierte C-Faserneurone handeln dürfte (Holzer 1991). Es sei jedoch angemerkt, daß einerseits nicht alle Neurone kleinen Durchmessers vanilloidsensibel sind, sich andererseits aber auch Nervenzellen größeren Durchmessers, mit einer derartigen Sensibilität, in einem Hinterwurzelganglion nachweisen lassen. Bei letztgenannten handelt es sich überwiegend um Neurone vom A δ -Typ (Szallasi 1999). Zusammenfassend kann man somit sagen, daß sich Nozizeptoren, neben den unter Kapitel 2.1 genannten Kriterien, auch durch eine Capsaicinsensibilität charakterisieren lassen (Caterina 1997), (Tominaga 1998).

Die 1997 von Caterina et al. untersuchte rVR1-cDNA kodiert 838 Aminosäuren mit einem errechneten Molekulargewicht von circa 95 kD (Caterina 1997). Untersuchungen der Hydrophilie von rVR1 und hVR1 legen eine Proteinstruktur bestehend aus sechs Transmembrandomänen (TM) mit einer erwarteten, überwiegenden β -Faltblattstruktur nahe (Caterina 1997). Sowohl das C- als auch das N-terminale Ende kommen dabei auf der zytoplasmatischen Seite zu liegen. Zwischen TM5 und TM6 befindet sich eine weitere hydrophobe Aminosäuresequenz (P-Loop), die vermutlich an der Porenbildung beteiligt ist. Ferner existieren am N-terminalen Ende drei Ankyrin Domänen (Caterina 1997). Die am besten dokumentierte Funktion von Ankyrin-Wiederholungen ist die Vermittlung von Protein-Protein Interaktionen (Sedgwick 1999). Eine mögliche Funktion letztgenannter VR1 Region könnte z.B. die Bindung von Proteinen des Zytoskeletts sein, wodurch der Rezeptor an seiner korrekten plasmalemalen Stelle gebunden wird (Benham 2002). Der komplette TRPV1 existiert wahrscheinlich in einer tetrameren Anordnung dieser aus sechs Transmembrandomänen bestehenden Untergruppen (Benham 2002).

Daß auch Vanilloidrezeptoren, wie TRPV1, als Unterfamilie unselektiver Kationenkanäle einzuordnen sind, ergab sich aus experimentell gewonnenen Strom-Spannungs-Beziehungen von Zellen in Zellbädern unterschiedlicher Ionenzusammensetzung. TRPV1 unterscheidet dabei nicht zwischen verschiedenen monovalenten Kationen, zeigt jedoch eine gewisse Präferenz für divalente Kationen.

Die Reihenfolge der Leitfähigkeiten ergab folgendes Bild, in abnehmender Anordnung: $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ \approx \text{K}^+ \approx \text{Cs}^+$ (Caterina 1997).

Bis heute ist eine Vielzahl chemischer TRPV1-Aktivatoren bekannt. Neben Capsaicin sind dies das wesentlich potentere Resiniferatoxin (RTX) sowie weitere Vanilloide wie Olvanil und Zingerone (Szallasi 1999). Lange Zeit stand in der Diskussion, ob Capsaicin extrazellulär oder, aufgrund seiner Lipophilie nach Diffusion durch die Zellmembran, intrazellulär an TRPV1 bindet. Untersuchungen mit wasserlöslichen Capsaicinanaloga wie DA-5018 konnten bestätigen, daß die Bindungsstelle intrazellulär liegt (Jung 1999), (Szallasi 1999). Da bis heute kein Hinweis darauf besteht, das Capsaicin oder andere Vanilloide von Säugetieren synthetisiert werden, begann bereits kurze Zeit nach der Entdeckung von TRPV1 die Suche nach weiteren, möglicherweise endogenen Agonisten. Caterina et al. konnten 1997 zeigen, das rasche Temperaturerhöhungen von 22°C auf 45°C in der Lage sind TRPV1 zu aktivieren (Caterina 1997). Neben Hitze stellt auch eine moderate Reduktion des pH Wertes von 7,6 auf 5,5 einen aktivierenden Reiz für TRPV1 dar. Diese Aktivierung ist jedoch äußerst gering. Nach der zuvor genannten pH-Absenkung wiesen weniger als 10% von experimentell untersuchten, TRPV1 exprimierenden Oozyten größere Einwärtsströme auf. Erst die Kombination von pH 5,5 mit 300 nM Capsaicin oder eine drastischere pH-Absenkung unter 5,0 zeigten eine deutliche Rezeptoraktivierung (Caterina 1997). Ein niedriger pH verstärkt zudem die Rezeptorantwort auf thermische Reize (Caterina 1997), (Jordt 2000). Aus diesen und anderen Untersuchungen, gelangten einige Forschergruppen zu der Vermutung, daß sowohl Capsaicin als auch Protonen eher die Schwelle für Hitzereize reduzieren, als selbst zur Rezeptoraktivierung zu führen. Ansonsten harmlose Temperaturen, wie 37°C Körpertemperatur, könnten somit zur Öffnung von TRPV1 und letztendlich zu einer schmerzhaften Empfindung führen (Tominaga 1998).

Neben Hitze und Gewebeazidose stellen auch das endogene Cannabinoid Anandamid sowie einige Lipoxygenaseprodukte wie 12- und 15-(S)-HPETE (Hydroperoxyeicosatetraenonsäure), 5- und 15-(S)-HETE (Hydroxyeicosatetraenonsäure) sowie das Leukotrien LTB4 direkte Agonisten für TRPV1 dar (Zygmunt 1999), (Hwang 2000), (Smart 2000). Die seit längerem bekannten vasodilatatorischen Eigenschaften von Anandamide lassen sich demnach auf eine durch TRPV1-Aktivierung bedingte Freisetzung von CGRP zurückführen (Zygmunt 1999). Einige Entzündungsmediatoren wie z.B. Bradykinin (BK) könnten über ihre Rezeptoren zu einer gesteigerten Bildung

von Lipoxygenase-Metaboliten führen und so über eine Aktivierung von TRPV1 zu Schmerz und Hyperalgesie an Stellen der Entzündung beitragen (Shin 2002). Gleichzeitig vermögen einige dieser an geschädigten Gewebearealen freigesetzten Substanzen wie BK aber auch Neurotrophine wie NGF, TRPV1 zu sensibilisieren. Dies geschieht nach derzeitigem Kenntnisstand über einen Proteinkinase C (PKC) abhängigen, sowie einen von PKC unabhängigen Weg. Die zuletzt genannte Signaltransduktion erfolgt durch eine Phospholipase C bedingte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), das an TRPV1 in der Region 777-820 gebunden ist, und die Sensibilität des Rezeptors vermindert (Abb. 5). Der PKC abhängige Weg läuft via Kanalphosphorylierung von TRPV1 an Position 800 durch PKC (Chuang 2001), (Prescott 2003).

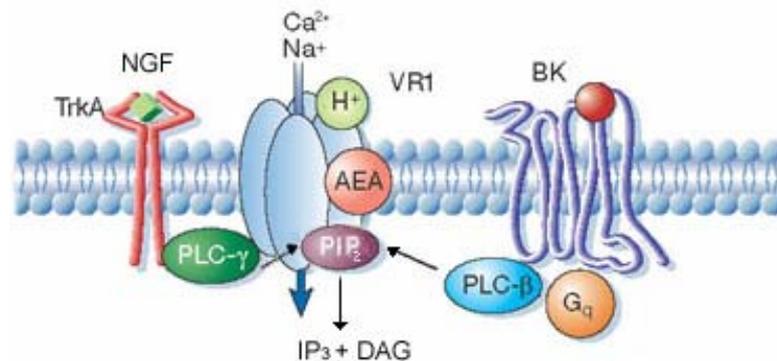


Abbildung 5

Darstellung des PKC unabhängigen Weges zur Sensibilisierung von TRPV1. Bradykinin (BK) führt über den G_q gekoppelten BK2-Rezeptor zur Aktivierung der Phospholipase C- β (PLC- β). Nerve growth factor (NGF) aktiviert die PLC- γ über den Tyrosinkinaserzeptor A (TrkA). Sowohl PLC- β als auch PLC- γ hydrolysieren an TRPV1 gebundenes Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-4,5,6-trisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG), wodurch die Sensibilität von TRPV1 deutlich erhöht wird (Abb. modifiziert aus Julius 2001 Fig.4).

Die Gruppe der TRPV1 Antagonisten ist dagegen nach wie vor klein. In der praktischen Anwendung findet im wesentlichen die 1993 von Sandoz (heute Novartis), Institute for Medical Research, entwickelte Substanz Capsazepin Gebrauch. Capsazepin blockiert durch Capsaicin, RTX, Hitze, niedrigen pH sowie durch Anandamide induzierte Ströme (Tominaga 1998). Diese Vielfältigkeit legt entgegen früherer Annahmen nahe, daß Capsazepin nicht die Capsaicin Bindungsstelle blockiert, sondern durch Bindung an eine nicht näher spezifizierte Rezeptorregion die Konformation von TRPV1 in der geschlossenen Form stabilisiert (Benham 2002).

Vanilloidbindung an TRPV1 initiiert eine Reihe von Vorgängen, die man grob in die drei im Folgenden genannten Bereiche unterteilen kann. 1) Erregung, 2) Desensibilisierung, 3) Zelltoxizität (Szallasi 1999). Das Binden eines Agonisten bedingt die Öffnung der TRPV1 Pore wodurch ein Kationeneinwärtsstrom, überwiegend aus Calciumionen bestehend, resultiert und die Membran depolarisiert. Ist die Depolarisation stark genug können auf diese Weise Aktionspotentiale entstehen (vgl. Kap. 2.1.1.3) die zum Gehirn weitergeleitet werden und so zur Schmerzwahrnehmung führen können. Die Erregung peripherer sensorischer Nervenendigungen durch Vanilloide führt des Weiteren zur Freisetzung proinflammatorischer Neuropeptide wie CGRP und Substanz P (Holzer 1988).

Auf die Phase der Erregung nach Vanilloidapplikation folgt eine Art refraktärer Zustand, in dem Neurone weder auf weitergehende Vanilloidgabe noch auf andere Reize, wie noxische Hitze, ansprechen, was wie bereits zuvor beschrieben, dazu führte, das Capsaicin als Analgetikum seit geraumer Zeit Gebrauch findet. Dieses Phänomen läßt sich durch Desensibilisierung von TRPV1 erklären, d.h. einer Veränderung der Kinetik von TRPV1, die offenbar nicht nur durch einen einzelnen Vorgang bedingt ist. Ursächlich könnte eine durch die Agonistenbindung induzierte Konformationsänderung des Rezeptors verantwortlich sein, die zum Verschluß der Kanalpore führt (Szallasi 1999).

Ferner konnte gezeigt werden, daß Capsaicin und somit die Aktivierung von TRPV1 den retrograden axonalen Transport einiger Makromoleküle, wie z.B. Nerve Growth Factor (NGF), blockiert (Gamse 1982), (Taylor 1984). Wie bereits in Kapitel 2.1.3.2 gezeigt, ist NGF sowohl für die Differenzierung als auch das Überleben von Neuronen von essentieller Bedeutung. Für die Unterbrechung des NGF Transportes scheint der Calciuminflux via aktivierter TRPV1 bedeutsam. Eine Entfernung des extrazellulären Calciums sowie eine Blockierung Calcium aktivierbarer Proteasen, wie Calpin durch E64, verhindern den Capsaicin induzierten Zelltod in vitro (Winter 1990), (Chard 1995). Die Unterbrechung des NGF Signals an den Zellkörper sowie die Aktivierung Calcium aktivierbarer Proteasen könnte daher, wenn auch nicht ausschließlich, die Neurotoxizität von Vanilloiden erklären (Szallasi 1999).

2.2.2 Rezeptoren für Nukleotide und Nukleoside

Extrazelluläre Nukleotide, wie ADP, ATP, UDP und UTP sowie Dinukleotide, sind wichtige Signalstoffe mit einem breiten Spektrum an Wirkungen auf verschiedene Gewebe und biologische Prozesse. Darunter fallen Vorgänge wie z.B. die Kontraktion glatter Muskelzellen, Neurotransmission, Immunantwort und Thrombozytenaggregation (Ralevic 1998). Diese Effekte werden über Nukleotid spezifische, membrangebundene, ionotrope (P2X), metabotrope (P2Y) und, im Falle der Dinukleotide durch A_p_nA Rezeptoren vermittelt. Ähnliches, in punkto Beeinflussung biologischer Abläufe, trifft auch für das Nukleosid Adenosin zu, das über metabotrope Adenosin (P1) Rezeptoren wirkt.

Die Überlegung, daß extrazelluläre Purine (Adenosin, ADP und ATP) wichtige Signalstoffe sein könnten, ist dabei keinesfalls eine Idee der Forschung in jüngster Zeit. Bereits 1929 wurden derartige Überlegungen und Versuche von Drury und Szent-Györgyi aufgestellt. Im Jahr 1934 konnte Gillespie zeigen, daß Adenosin und ATP unterschiedliche Effekte auf den Blutdruck von Hasen und Katzen vermitteln. Wenn man so will, war dies die erste Arbeit, in der zwei verschiedene Rezeptorfamilien und somit Wirkmechanismen für Nukleotide und Nukleoside nahe gelegt werden. 1978 beschrieb Burnstock purinerge Rezeptoren und schlug, basierend auf pharmakologischen Untersuchungen, eine Einteilung in P1-Purinozeptoren mit Sensibilität für Adenosin sowie P2-Purinozeptoren mit ADP und ATP als natürliche Liganden vor (Ralevic 1998). Da jedoch an manchen P2-Purinozeptoren auch Pyrimidine, wie UDP und UTP, als Agonisten fungieren, ist die Bezeichnung Purinozeptor nicht gänzlich korrekt und sollte besser durch die von Fredholm et al. 1996 (Fredholm 1996) vorgeschlagene Nomenklatur, die in P1 Rezeptoren und P2 Rezeptoren unterteilt, abgelöst werden.

Die Liste von Zellen oder Geweben, die als Quellen der Purinfreisetzung unter physiologischen aber auch pathophysiologischen Bedingungen dienen, ist lang, und reicht von Endothelzellen über Fibroblasten bis hin zu Mastzellen und Cardiomyozyten. Sehr viel weniger ist dagegen über die Orte der Pyrimidinfreisetzung bekannt (Ralevic 1998). Das Nukleotide auch im peripheren Nervensystem von Bedeutung sind, wird durch mehrere Arbeiten angezeigt. Holton zeigte 1953 und 1959, daß ATP von

sensorischen Nervenendigungen freigesetzt werden kann und somit eine mögliche Funktion als Neurotransmitter besitzt (Holton 1953), (Holton 1959). Auch Schwannzellen, die Glia des peripheren Nervensystems, werden durch ATP aktiviert. Dies zeigt sich in einer transienten Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration (Verkhatsky 1998). Extrazellulär appliziertes ATP wirkt erregend auf Hinterwurzelganglienzellen (Jahr 1983). Eine Iontophorese von ATP auf der Haut menschlicher Probanden wird von diesen als schmerzhaft empfunden (Hamilton 2000). Insbesondere die letztgenannten Punkte legen eine Rolle von ATP in der Signaltransduktion von Schmerz nahe. Die Blockade der Wirkung von ATP könnte daher in Zukunft ein mögliches therapeutisches Konzept in der Bekämpfung von Schmerzzuständen darstellen.

P2 Rezeptoren werden in zwei Hauptgruppen unterteilt. Dies sind ionotrope P2X Rezeptoren und G-Protein gekoppelte, metabotrope P2Y Rezeptoren. P2X Rezeptoren sind Kationenkanäle mit einer Leitfähigkeit für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} Ionen. Bis heute sind sieben P2X-Proteinuntereinheiten (P2X₁ bis P2X₇) bekannt (Ralevic 1998) (vgl. Tab.2). Diese aus 379 bis 472 Aminosäuren aufgebauten Proteine besitzen zwei hydrophobe Transmembrandomänen (M₁ und M₂), die über hydrophile Schleifen verbunden sind (Abb. 6). Derzeit wird vermutet, daß der komplette P2X Rezeptor als Trimer dieser Proteinuntereinheiten oder als Vielfaches solcher Trimere existiert. P2X Rezeptoren können dabei sowohl in homomerer als auch heteromerer Form auftreten. Eine Ausnahme hierbei bildet die P2X₇ Proteinuntereinheit, die ausschließlich homomere Rezeptorformen ausbildet (King 2003). Anhand ihrer pharmakologischen und biophysikalischen Eigenschaften wurden bis heute sieben homomere P2X Rezeptorformen (P2X₁ bis P2X₇) sowie fünf heteromere P2X Rezeptoren (P2X₁/P2X₂, P2X₁/P2X₅, P2X₂/P2X₃, P2X₃/P2X₆ und P2X₄/P2X₆) charakterisiert (King 2003).

Ausgehend von einem normalen Ruhemembranpotential erlaubt die Aktivierung von P2X Rezeptoren einen schnellen Kationeneinwärtsstrom, der zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumionenkonzentration und zu einer Depolarisation der Zellmembran führt (Bean 1992). P2X vermittelte Ströme zeigen dabei eine Abhängigkeit von Protonenkonzentrationen. Ein saurer pH steigert die ATP Affinität, während ein alkalischer pH diese vermindert. Letztgenannter Punkt könnte somit in pathophysiologischen Zuständen wie Gewebeazidose bei Entzündungsreaktionen etc. von Bedeutung sein (Ralevic 1998).

Subtyp	Agonisten (pEC ₅₀)	Antagonisten (pIC ₅₀)	Desensibilisierung
P2X ₁	2MeSATP (7,0) ATP (7,0) ATP γ S (6,2), α,β -meATP (5,5) CTP (4,4) >> ADP	NF 449 (9,5) TNP-ATP (9,0) MRS 2159 (8,0) PPADS (6,9) RB-2 (5,7) Suramin (5,7)	sehr rasch (100 ms)
P2X ₂	ATP (5,3) 2MeSATP (5,1) ATP γ S (5,1) α,β -meATP (3,0)	RB-2 (6,4) TNP-ATP (5,9) PPADS (5,8) Suramin (5,0)	gering bis gar nicht
P2X ₃	2MeSATP (6,7) ATP (5,9) ATP γ S (5,9) α,β -meATP (5,7) Ap ₅ A (5,5) UTP (4,0)	TNP-ATP (9,5) MRS 2159 (6,9) PPADS (6,7) Suramin (5,4) RB-2 (4,3)	sehr rasch (< 100 ms)
P2X ₄	ATP (5,4) 2MeSATP (3,6) <u>Partieller Agonist:</u> α,β -meATP	TNP-ATP (4,8) PPADS (4,6)	gering
P2X ₅	ATP γ S (6,5) 2-MeSATP (6,4) ATP (6,4) α,β -meATP (6,0)	PPADS (6,7) TNP-ATP (6,3) Suramin (5,8) RB-2 (4,7)	gering
P2X ₆	ATP (6,2)	-	-
P2X ₇	2-MeSATP (5,0) ATP (3,4) ADP (2,7)	PPADS (4,3) TNP-ATP (4,3)	gering

Tabelle 2

Auflistung wichtiger bzw. in dieser Arbeit verwendeter P2X Agonisten und Antagonisten. Alle Angaben beziehen sich auf P2X Rezeptoren der Ratte (rP2X). Die Potenz der Agonisten bzw. Antagonisten (pEC₅₀ bzw. pIC₅₀) ist als -log EC₅₀ bzw. -log IC₅₀ jeweils in Klammern angegeben. (Tab. modifiziert aus King 2003 Tab.1 und Ralevic 1998).

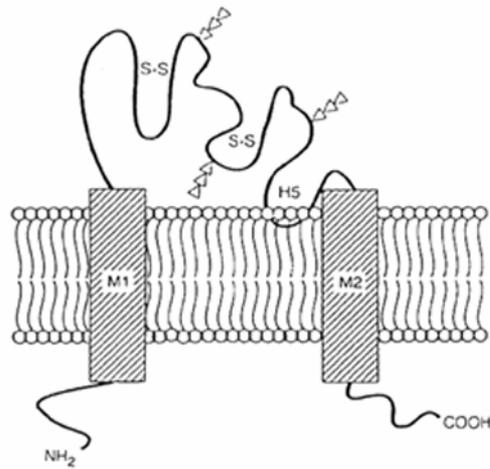


Abbildung 6

Darstellung einer P2X Rezeptoruntereinheit bestehend aus zwei Transmembrandomänen (M1 und M2), den intrazellulär gelegenen N- und C-terminalen Enden sowie der hydrophilen, extrazellulären Domäne, die zwei Disulfidbrücken ausbildet und drei Glykosidketten (Dreiecke) trägt (Abb. aus Ralevic 1998 Fig.8).

P2Y Rezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die aus 308 bis 377 Aminosäuren aufgebaut sind. Bis heute sind acht dieser Rezeptorproteine bekannt (P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃ und P2Y₁₄). Ungereimtheiten in der Numerierung von P2Y Rezeptoren sind dabei zum Teil auf inzwischen korrigierte Fehlinterpretationen von Rezeptoren, die nicht zur P2Y Familie gehören, zurückzuführen. P2Y Proteine bestehen aus einem extrazellulären N-Terminus, der über sieben Transmembrandomänen (TM I - TM VII), die vermutlich in einer α -helikalen Tertiärstruktur vorliegen, mit dem intrazellulär gelegenen C-terminalen Ende verbunden ist (King 2003).

Die nachfolgende Signalkoppelung über G-Proteine erfolgt dabei streng spezifisch. P2Y₁, 2, 4, 6 und 11 koppeln über G_{q/11} und führen so, durch Aktivierung des Phospholipase β (PLC β) / IP₃ Weges, zu einer Freisetzung von intrazellulär gespeicherten Ca²⁺ Ionen. P2Y₂, 4 und 6 koppeln zusätzlich über das Pertussistoxin sensible, inhibitorische G_{i/o} zur Inaktivierung von Kationenkanälen. P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ aktivieren G_i, ein inhibitorisches G-Protein, das intrazelluläre cAMP Spiegel durch eine Hemmung der membrangebundenen Adenylatcyclase senkt (King 2003).

Subtyp	Agonisten (pEC ₅₀)	Antagonisten (pIC ₅₀)	Desensibilisierung
P2Y ₁	2MeSATP (8,5-6,9) ATP (6,5-5,0) ATP γ S (6,4)	MRS2179 (6,5) PPADS (5,4) Suramin (5,8)	gering
P2Y ₂	UTP (7,7-6,2) ATP (7,1-6,6) ATP γ S (6,2-5,8)	Suramin (4,9-4,3)	gering
P2Y ₄	UTP (7,6-5,6) ATP (5,4-4,4)	PPADS (4,8)	langsam
P2Y ₆	UDP (7,0-6,5) UTP (5,2-5,0) ADP (4,5-4,4)	RB-2 (4,5)	gering
P2Y ₁₁	ATP γ S (5,5-4,6) ATP (4,9-4,2) 2MeSATP (4,6-4,3) α , β -meATP (4,1-3,9)	Suramin (4,8)	-
P2Y ₁₂	2MeSATP (10-8,5) ATP (6,2-5,9)	RB-2 (5,9) Suramin (5,4)	-
P2Y ₁₃	2MeSATP (7,1) ATP (6,6)	-	-
P2Y ₁₄	UDP-Glucose (7,1) UDP-Galaktose (6,4)	-	-

Tabelle 3

Auflistung wichtiger bzw. in dieser Arbeit verwendeter P2Y Agonisten und Antagonisten. Alle Angaben beziehen sich auf humane P2Y Rezeptoren (hP2Y). Die Potenz der Agonisten bzw. Antagonisten (pEC₅₀ bzw. pIC₅₀) ist als -log EC₅₀ bzw. -log IC₅₀ jeweils in Klammern angegeben. (Tab. modifiziert aus King 2003 Tab.2 und Ralevic 1998).

Ein möglicher Abbaumechanismus für purinerge Nukleotide als Signalstoffe könnte durch membrangebundene Ektonukleotidasen erfolgen. ATP würde so zu dem Nukleosid Adenosin hydrolysiert, das jedoch wiederum über P1 Rezeptoren eigene Wirkungen vermitteln kann. Da derartige P1 vermittelte Effekte auch zu den Ergebnissen in dieser Dissertation mit beigetragen haben könnten, soll an dieser Stelle auch die Familie der P1 Rezeptoren kurz beschrieben werden. Vier P1 Rezeptorsubtypen A₁, A_{2A}, A_{2B} und A₃ sind derzeit bekannt. Jeder dieser Rezeptoren ist

ein aus 318 bis 412 Aminosäuren bestehender GPCR, und besitzt eine den P2Y Rezeptoren ähnliche Struktur, dessen heptahelikale Anordnung ein typisches Merkmal der GPCR-Familie ist. A₁ und A₃ koppeln via G_{i/o} inhibitorisch an die Adenylatcyclase, während A_{2A} und A_{2B} letztgenannte über G_s aktivieren (King 2003). Für A_{2B} Rezeptor ist zudem ein über G_{q/11} positiv auf den Phospholipase C Weg einwirkender Kopplungsmechanismus beschrieben (Linden 1999).

Subtyp	Agonisten (pEC ₅₀)	Antagonisten (pIC ₅₀)	Desensibilisierung
A ₁	CCPA (9,1) NECA (7,9) Adenosin (6,5)	DPCPX (9,1) ZM241385 (6,6) MRS1754 (6,4)	nach längerer Agonistenexposition
A _{2A}	NECA (7,7) Adenosin (6,2) CCPA (5,6)	ZM241385 (9,1) DPCPX (6,9) MRS1754 (6,3)	stärker als bei A ₁ Rezeptor
A _{2B}	NECA (6,4-6,5) Adenosin (4,6) CCPA (4,4)	MRS1754 (8,7) ZM241385 (7,5) DPCPX (7,3)	ähnlich A _{2A} Rezeptor
A ₃	NECA (8,2) CCPA (7,4) Adenosin (6,5)	MRS1754 (6,2) DPCPX (5,4) ZM241385 (5,0)	rasch

Tabelle 4

Auflistung wichtiger bzw. in dieser Arbeit verwendeter P1 Agonisten und Antagonisten. Alle Angaben beziehen sich auf humane P1 Rezeptoren. Die Potenz der Agonisten bzw. Antagonisten (pEC₅₀ bzw. pIC₅₀) ist als -log EC₅₀ bzw. -log IC₅₀ jeweils in Klammern angegeben. (Tab. modifiziert aus King et al. 2003 Tab.3 und Ralevic, Burnstock 1998).

2.2.3 Nikotinischer Acetylcholinrezeptor

Die Theorie der neurohumoralen Transmission sowie die Entdeckung von Acetylcholin (ACh) als endogener Transmitter sind auf Otto Loewi und Henry Dale in den frühen 1920-iger Jahren zurückzuführen. Dale differenzierte bereits zwischen Nikotin und Muskarin vermittelten Wirkungen, was letztendlich zur Unterteilung der Rezeptoren für ACh in zwei, pharmakologisch völlig unterschiedliche Gruppen führte. Einerseits die Familie der muskarinergen ACh-Rezeptoren, auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll, andererseits die Gruppe der nikotinischen ACh-Rezeptoren (nAChR), die

Gegenstand dieses Kapitels sind. Bei letztgenannten unterscheidet man zudem einen an muskulären Endplatten vorkommenden Typ von der Gruppe der neuronalen nAChR.

nAChRs sind ligandenaktivierbare Kationenkanäle, die aus fünf Untereinheiten aufgebaut sind. Jede dieser Untereinheiten besteht aus vier Transmembrandomänen (M1-M4), mit einem extrazellulär gelegenen C- und N-Terminus sowie einer ausgedehnten zytoplasmatisch gelegenen Schleife zwischen M3 und M4, deren Aminosäuresequenz für die jeweilige Untereinheit spezifisch ist. Des Weiteren besitzen alle nAChR-Untereinheiten eine aus 13 Aminosäuren bestehende extrazelluläre Schleife zwischen zwei Cysteinresten in der Nähe des N-Terminus (Abb.7).

Derzeit sind zehn α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 10$), vier β -Untereinheiten ($\beta 1$ - $\beta 4$) sowie je eine γ -, ϵ - und δ -Untereinheit bekannt. nAChRs existieren dabei sowohl in homomerer sowie heteromerer Form. $\alpha 1$, $\beta 1$ sowie γ , ϵ und δ sind dem an muskulären Endplatten vorkommenden muskulären nAChR zuzuordnen. Am fetalen Skelettmuskel existiert letztgenannter Rezeptor in der Zusammensetzung $(\alpha 1)_2\beta 1\gamma\delta$, am adulten Skelettmuskel dagegen in der Form $(\alpha 1)_2\beta 1\epsilon\delta$ (Lukas 1999). Am Aufbau neuronaler nAChRs sind folglich nur noch die Untereinheiten ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) sowie ($\beta 2$ - $\beta 4$) beteiligt, wobei $\alpha 8$ bis jetzt nur bei Hühnern nachgewiesen werden konnte.

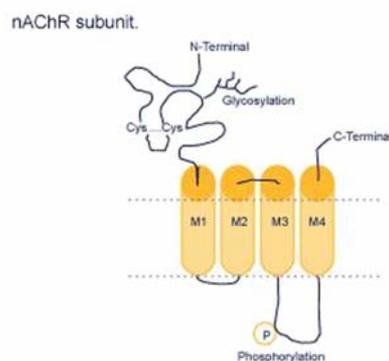


Abbildung 7

Struktur einer nAChR-Untereinheit, bestehend aus den vier Transmembrandomänen M1-M4, den extrazellulär gelegenen C- und N-terminalen Endigungen sowie einer ausgedehnten intrazellulären Schleife zwischen M3 und M4. (Abb. aus Sharples 2001 Fig.1)

Paarweise Kombinationen von $\alpha 2$, $\alpha 3$ oder $\alpha 4$ können mit $\beta 2$ und $\beta 4$ Untereinheiten funktionsfähige nAChRs z.B. der Form $(\alpha 4)_2(\beta 2)_3$ bilden, während $\alpha 5$ und $\beta 3$ nur singular in Verbindung mit anderen Untereinheiten existieren. $\alpha 7$, $\alpha 8$ und $\alpha 9$ sind durch ihre Fähigkeit, homomere nAChRs auszubilden, charakterisiert. Die unlängst entdeckte $\alpha 10$ Untereinheit bildet nur in Kombination mit $\alpha 9$ funktionsfähige nAChR (Sharples 2001). Für das zentrale und periphere Nervensystem sind jedoch vor allem die

Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ sowie $\beta 2$ und $\beta 4$ in der Zusammensetzung $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\alpha 5\beta 4$ und $(\alpha 7)_5$ von Bedeutung (Lukas 1999), (Paterson 2000). Eine genaue Charakterisierung der Vorkommen bestimmter Kombinationen einzelner nAChR-Untereinheiten, z.B. an C-Faseraxonen humaner peripherer Nerven, existiert jedoch noch nicht.

Die extrazellulär gelegene Bindungsstelle für Acetylcholin wird aus sechs kleineren Schleifen (A-F) zwischen zwei benachbarten Untereinheiten gebildet (Abb.8). A, B und C stammen dabei ausschließlich von α -Untereinheiten. D, E und F können hingegen von allen Untereinheiten bereitgestellt werden (Grutter 2001). Unter der Berücksichtigung, daß nAChRs in pentamerer Form existieren, wird somit klar, daß jeder dieser Rezeptoren zwei komplette ACh Bindungsstellen besitzen muß. Am Aufbau der Kanalpore, mit einem Durchmesser von ca. 25Å, sind alle fünf Untereinheiten beteiligt, wobei jeweils ihre M2-Transmembrandomäne lumenseitig zu liegen kommt (Corringer 2000).

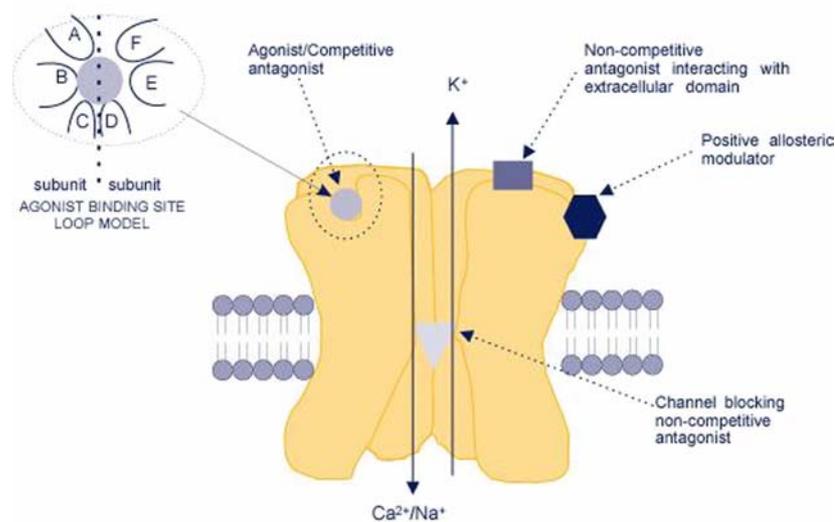


Abbildung 8

Schematische Darstellung eines nAChR, dessen Kanalpore durch die Entfernung einer Rezeptoruntereinheit einsehbar wird. Die Bindungsstelle für Agonisten ist besonders hervorgehoben. A, B und C stammen dabei ausschließlich von α -Untereinheiten, während D, E und F von allen Untereinheiten bereitgestellt werden können. Des Weiteren sind Bindungsstellen für kompetitive Antagonisten, nicht-kompetitive Antagonisten sowie für allosterische Modulatoren dargestellt. (Abb. aus Sharples 2001 Fig.1)

Durch die Bindung von ACh an oben beschriebene Rezeptorstrukturen gehen nAChRs von einer geschlossenen inaktiven Form in einen offenen aktivierten Zustand, mit Ionenleitfähigkeit für Na^+ , K^+ und Ca^{2+} , über. Eine länger andauernde ACh Exposition

über mehrere Sekunden bis Minuten führt dagegen zu Rezeptordesensibilisierung und Refraktärität gegenüber erneuter Aktivierung. Dabei zeigen sich, abhängig von den zugrunde liegenden Untereinheiten, teilweise deutliche Unterschiede in der Rezeptorkinetik und dem pharmakologischen Profil bezüglich Bindungsaffinität und Wirkungspotenz verschiedener Agonisten und Antagonisten. So weist der homomere ($\alpha 7$)₅ nAChR eine äußerst rasche Desensibilisierung auf, während ($\alpha 4$)₂($\beta 2$)₃ nAChRs nahezu unbeeindruckt von andauernder Agonistenexposition in einem aktivierten Zustand verbleiben (Sharples 2001). Dies bietet die Möglichkeit, nAChR Untereinheiten funktionell, anhand des pharmakologischen Profils, genauer zu charakterisieren.

Tabelle 5 stellt einige Agonisten sowie deren Bindungsaffinitäten und Wirkungspotenzen an verschiedenen nAChRs vor. Kompetitive Antagonisten interagieren reversibel mit der Agonisten Bindungsstelle oder in deren Nähe und stabilisieren den Rezeptor in einer inaktiven, geschlossenen Konformation. Tabelle 6 stellt nAChR Antagonisten und ihre Bindungsaffinitäten an verschiedenen nAChRs vor.

	Bindungsaffinität K_D (nM)			Wirkungspotenz EC_{50} (μ M)		
	$\alpha 4\beta 2$	$\alpha 7$	$\alpha 3\beta 4$	$\alpha 4\beta 2$	$\alpha 7$	$\alpha 3\beta 4$
Cholin	112000	2380000	-	-	1600	-
ACh	6,8-57	4000-10830	560-881	0,48-3	79-316	53-210
(-)Nikotin	1-11	400-8900	300-475	0,3-15	18-91	5-410
(-)Cytisine	0,14-2,7	1400-3883	56-195	0,019-71,4	-	72-134
DMPP	9,4-400	160-2300	1300	0,07-18	19-75	10-92
(+)Epibatidine	0,01-0,05	20,6-233	0,38	0,005-0,01	1,2-2	0,02-0,07
A-85380	0,05	148	73,6	0,7	8,9	-
RJR 2403	26	36000	-	0,73-16	240	-

Tabelle 5

Bindungsaffinitäten (K_D) und Wirkungspotenzen (halbmaximale Wirkungskonzentration EC_{50}) einiger nAChR-Agonisten an nativen oder rekombinanten $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 7$ sowie an rekombinanten $\alpha 3\beta 4$ AChRs. ACh=Acetylcholin, DMPP=Dimethylphenylpiperazin, RJR 2403=trans-meta-Nikotin. Dabei gilt: $K_D = ([A_f][R_f])/[AR]$ mit $[A_f]$ =freie Agonistenkonzentration, $[R_f]$ =freie Rezeptorkonzentration und $[AR]$ =Agonisten-Rezeptor-Komplex. (Tab. modifiziert aus Sharples 2001 Tab.1).

Anhand der in Tabelle 5 und 6 aufgeführten Daten für die einzelnen nAChR Agonisten bzw. Antagonisten kann ein pharmakologisches Konzentrations-Wirkungsprofil erstellt werden. In dieser Dissertation konnte so eine Charakterisierung von nAChR-Untereinheiten auf peripheren unmyelinisierten menschlichen Axonen erfolgen (vgl. Kap. 4.3 und 5.3).

	Bindungsaffinität K_D (nM)		
	$\alpha 4\beta 2$	$\alpha 7$	$\alpha 3\beta 4$
DH β E	13,9-1900	25000-57900	218622
d-Tubocurarin	1000-25000	3400-7700	22929
MLA	3700-6100	0,69-10,3	3700
Hexamethonium	28000-1000000	800000-880000	> 1000000
Mecamylamin	822000-1000000	> 1000000	> 1000000

Tabelle 6

Bindungsaffinitäten (K_D) einiger nAChR-Antagonisten an nativen oder rekombinanten $\alpha 4\beta 2$ und $\alpha 7$ sowie an rekombinanten $\alpha 3\beta 4$ nAChRs. DH β E=Dihydro- β -erythroidine, MLA=Methyllycaconitine. (Tab. modifiziert aus Sharples 2001 Tab.2)

3. Methoden und Materialien

3.1 Nervenpräparate

Die Experimente dieser Arbeit wurden an isolierten Faszikeln menschlicher Nn. surales und Nn. vagi durchgeführt. Die Genehmigung hierfür wurde durch die Ethikkommission der Universität München erteilt. Des Weiteren gaben die Patienten ihr schriftliches Einverständnis. Die einzelnen Faszikel besaßen im Mittel eine Länge von 15-30 mm und wurden unter dem Mikroskop aus dem Operationspräparat isoliert.

Die Untersuchungen mit TRPV1 Agonisten und Antagonisten wurden an insgesamt 18 isolierten Faszikeln (N. suralis n = 16, N. vagus n = 2) von 9 Patienten durchgeführt. Zum Operationszeitpunkt hatten die Patienten (männlich n = 7, weiblich n = 2) ein medianes Alter von 62 Jahren (47-82 Jahre).

P2X bzw. P2Y vermittelte Effekte an Nn. surales wurden an 36 isolierten Faszikeln von 13 Patienten (männlich n = 8, weiblich n = 5) untersucht. Die Patienten hatten ein medianes Alter von 63 Jahren (35-89 Jahre). Bei 6 Patienten erfolgte eine Biopsie des N. suralis, die häufig im Rahmen der Diagnosestellung neurologischer Erkrankungen (z.B. Polyneuropathie unklarer Genese) durchgeführt wird. Bei den übrigen 7 Patienten erfolgte eine Unterschenkelamputation überwiegend infolge peripherer vaskulärer Erkrankungen. Die Messungen an Nn. vagi wurden an 12 isolierten Faszikeln von vier Patienten (männlich n = 4) im Alter von 49, 55, 66 und 69 Jahren durchgeführt. Alle vier Patienten unterzogen sich einer kompletten Magenresektion, bei diagnostisch gesichertem Magenkarzinom. Für die Experimente wurde jeweils ein ca. 2-3 cm langes Nervenpräparat des Truncus vagalis anterior im Bereich des distalen Ösophagus entfernt.

Die Charakterisierung neuronaler nikotinischer Acetylcholinrezeptoren wurde an insgesamt 81 Faszikeln von 18 Patienten (männlich n = 14, weiblich n = 4) mit einem medianen Alter von 68 Jahren (47-86 Jahre) durchgeführt. Bei sieben Patienten erfolgte eine N. suralis Biopsie, bei den restlichen 11 Patienten wurde eine Unterschenkelamputation (9 Amputationen infolge peripherer vaskulärer Erkrankungen, 2 sonstige) durchgeführt.

Die antagonistische Wirkung des α -Conotoxins Vc1.1 wurde an 26 Faszikeln von 10 Patienten (männlich $n = 7$, weiblich $n = 3$) mit einem medianen Alter von 66 Jahren (53-86 Jahre) durchgeführt.

3.2 Messanordnung

Die isolierten menschlichen Nervenfaszikel wurden an jedem Ende über eine Saugelktrode fixiert und in ein Bad gehalten (Abb. 9). Eine der beiden Elektroden wurde dazu benützt Aktionspotentiale in dem Nervenfaszikel auszulösen, die andere diente als Ableitungselektrode. Der Abstand zwischen den Elektroden betrug 3-4 mm. Das Bad, mit einem Volumen von ungefähr 1 ml, wurde während der Messung, kontinuierlich mit 6-8 ml/min einer 32 °C warmen Lösung (pH 7,4) perfundiert. Diese Perfusionslösung enthielt: NaCl 118,0 mM, KCl 3,0 mM, CaCl₂ 1,5 mM, MgCl₂ 1,0 mM, D-Glucose 5,0 mM, NaHCO₃ 25 mM, NaH₂PO₄ 1,2 mM und wurde ständig mit 95% O₂ / 5% CO₂ durchgast. Die Applikation von Agonisten bzw. Antagonisten erfolgte über die Badperfusion.

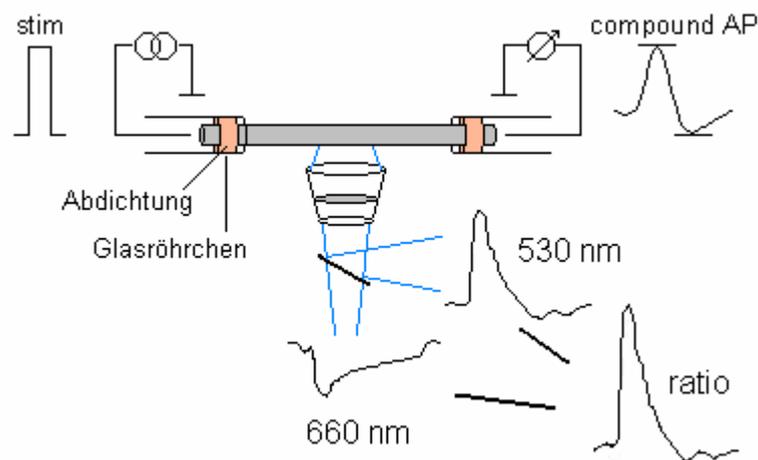


Abbildung 9

Schematische Abbildung der Messanordnung. Dargestellt ist der über zwei Saugelktroden, an seinen Endigungen, gehaltene Nervenfaszikel (grau). Die elektrische Stimulierung (stim) erfolgt über die linke Elektrode, die Ableitung des Summenaktionspotentials (compound AP) über die rechte. Intrazelluläre Calciumkonzentrationen ($[Ca^{2+}]_i$) werden von unten über ein Mikroskop, das emittiertes Fluoreszenzlicht nach Anregung mit 485 nm auffängt, gemessen. Die hier abgebildete Änderung der Ratio von emittiertem Fluoreszenzlicht (ratio) berechnet sich aus dem Quotienten der Emissionen bei den entsprechenden Wellenlängen $e(530\text{ nm})/e(660\text{ nm})$. In dieser Abbildung deutet die Änderung der Ratio auf einen Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ hin (Lang 2002 Fig.1).

3.3 Threshold Tracking

In dieser Arbeit wurde die axonale Erregbarkeit peripherer C-Fasern mittels Threshold Tracking Technik gemessen. Dies bedeutet eine ständige computergestützte Bestimmung der Erregbarkeitsschwelle zur Auslösung von C-Faser Summenaktionspotentialen (SAP). Stimulierung sowie Datenerfassung und deren Wiedergabe erfolgten durch QTRAC (Prof. Hugh Bostock, Institute of Neurology, London). QTRAC ist ein vielseitiges Computerprogramm, das der Erfassung von Reiz-Antwort-Daten dient. Ursprünglich wurde QTRAC für in vivo Untersuchungen an menschlichen Nerven geschrieben. Daß QTRAC auch zur Datenerfassung im Rahmen elektrophysiologischer Experimente geeignet ist, wurde jedoch bereits mehrfach gezeigt (Grafe 1997), (Irnich 2002). Die Generierung der Reizströme erfolgte durch einen Stimulusgenerator (A395, WPI, Sarasota, FL, USA) mit einem maximalen Ausgangsstrom von 500 μ A. Die Kontrolle des Stimulusgenerators erfolgte computergesteuert, über eine Datenerfassungsschnittstelle (Data Translation DT2812, Marlboro, MA, USA).

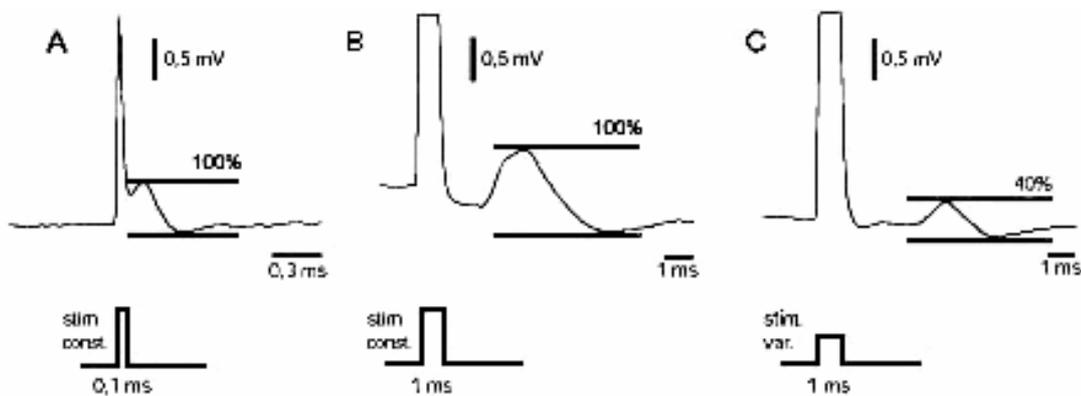


Abbildung 10

Exemplarische Abbildung von Reiz-Antwort-Daten (Abb. 10 zeigt den Reizstrom unten, die zugehörige Antwort oben) an Nervensegmenten des menschlichen N. suralis, die durch QTRAC ermittelt wurden. Bei **A** und **B** erzeugt ein konstanter supramaximaler Stimulus (stim const) eine maximale Antwort-Peak-Amplitude. Die Stimulusdauer beträgt bei **A** 0,1 ms. Dies reicht nicht aus um C-Fasern zu erregen. Die Antwort besteht daher überwiegend aus dem Summenaktionspotential (SAP) von myelinisierten A-Fasern. Erst bei einer Stimulationsdauer von ca. 1ms werden C-Fasern des Nervenfaszikels miterregt (vgl. **B**). Die A-Faserkomponente projiziert sich dabei in das nun breitere, durch den Stimulus bedingte, Antwortsignal und ist daher nicht zu erkennen. Bei **C** wurde die Antwort-Amplitude des C-Faser SAP auf 40% der maximalen Amplitude von **B** gesetzt. Da hier also nicht mehr supramaximal stimuliert wird, ist entsprechend der Erregbarkeit der Axone, der Stimulusstrom (threshold current) variabel (stim var) und wird computergestützt mit einem zugebilligten Fehler von 3% angepasst.

Die axonale Erregbarkeit wurde mit einer Wiederholungsfrequenz von 1 Hz durch Strompulse von 1 ms Dauer getestet, deren Stromstärke automatisch reguliert wurde, um das C-Faser SAP bei einer konstanten Amplitude von 40% (definiert als Erregbarkeitsschwelle) der maximal möglichen Amplitude zu halten. QTRAC stellt dabei mehrere Messkanäle zur Verfügung. Für diese Arbeit wurden im Allgemeinen die ersten 4 Kanäle verwendet. Kanal 1 verwendet konstante, supramaximale Stimulusströme und generiert so die maximal erzeugbaren SAP-Antworten. Kanal 2 benützt variable, durch den Computer angepasste Stimulusströme, um 40% der Antwort von Kanal 1 zu erzielen (threshold tracking). 40% der maximalen Antwort haben sich als günstig erwiesen, da in diesem Bereich die erregbarkeitsabhängigen Änderungen des Stimulusstromes (threshold current) am deutlichsten sind (sigmoider Kurvenverlauf für SAP als Funktion des Stimulusstroms).

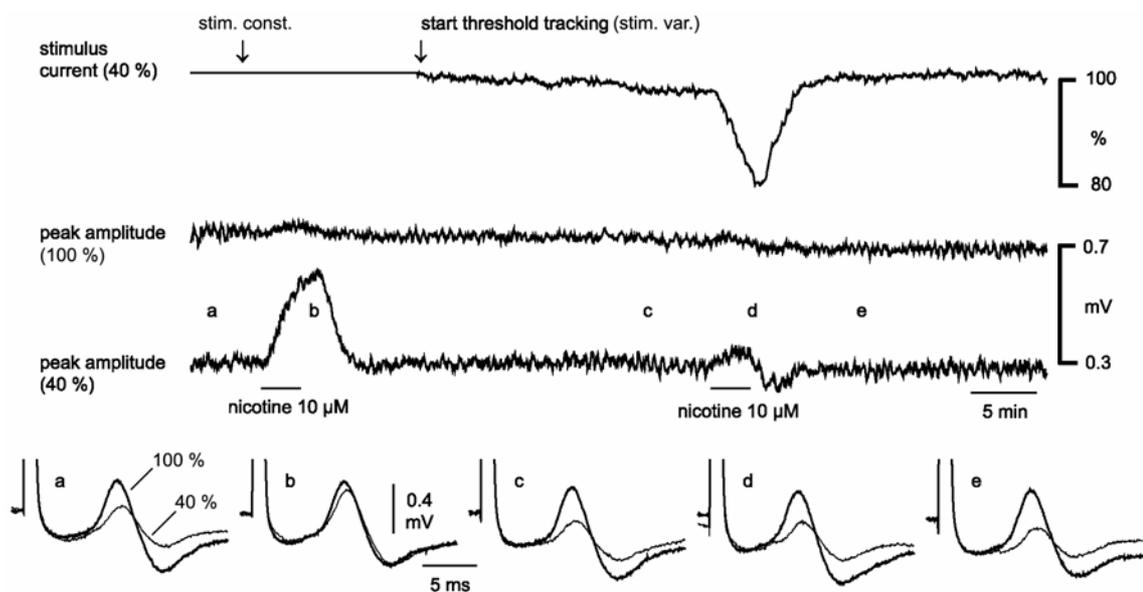


Abbildung 11

Gezeigt ist ein Vergleich von Messungen bei konstant gepulster Reizstromstärke (stim. const.) mit Messungen unter Threshold Tracking (stim. var.) an einem isolierten menschlichen N.suralis Präparat. Sowohl das supramaximal (peak amplitude 100%) stimulierte C-Fasersummenaktionspotential (C-Faser SAP) als auch das auf 40% (peak amplitude 40%) der maximal erzeugbaren Amplitude angepasste C-Faser SAP wurde dabei kontinuierlich aufgezeichnet. Die Messung wurde zunächst mit konstant gepulster Reizstromstärke begonnen. Die Applikation von Nikotin führte zu keinen signifikanten Veränderungen der supramaximalen Amplitude, erzeugte jedoch einen starken Anstieg in der submaximal stimulierten Antwort **b**. Nach Umstellung der Messung auf Threshold Tracking führt die durch Nikotin induzierte Erregbarkeitssteigerung zu einer Abnahme des benötigten Reizstroms **d**. In Abb.11 unten sind Momentaufnahmen des C-Faser SAP (supramaximal bzw. 40%) zu den Zeitpunkten a bis e dargestellt.

Kanal 3 und 4 verwenden das gleiche Protokoll wie Kanal 2, setzen aber vor dem eigentlichen Stimulus einen hyperpolarisierenden Präpuls (-40% bzw. -20% des Stimulusstroms von Kanal 2) über 50 ms. Dies erzeugt unter Umständen deutlichere Antwortsignale. Zur besseren Auswertung der Messergebnisse bietet QTRAC die Option den Stimulusstrom (threshold current) als Funktion der Zeit grafisch auszugeben. Auf diese Weise kann aus den Momentaufnahmen einer Reiz-Antwort Messung, wie sie in Abb.10 bzw. Abb. 11 unten gezeigt sind, ein Graph, entsprechend Abb. 11 oben, erzeugt werden. In gleicher Weise bietet QTRAC die Möglichkeit, den SAP-Amplitudenverlauf der jeweiligen Kanäle sowie die entsprechenden Latenzzeiten zwischen Reiz und Antwort-SAP aufzuzeichnen und diese als Extraspur auszugeben. Bei konstantem Verlauf der SAP-Amplitude wird ein Abfall des Stimulusstroms üblicherweise als eine Zunahme der axonalen Erregbarkeit interpretiert. Umgekehrt deutet ein Anstieg des benötigten Stimulusstromes auf eine Abnahme der Erregbarkeit hin.

3.4 Intrazelluläre Calciummessung

Axone und Zellen des Nervenfaszikels wurden mit den calciumabhängigen, membrangängigen Fluoreszenzfarbstoffen Calcium Green-1 und Fura Red über eine Badapplikation beladen. Die Notwendigkeit, zwei unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zu verwenden, ergab sich aus mechanischen Problemen der Messanordnung. Der sich in der Badlösung befindende Nervenfaszikel konnte aufgrund der ständigen Perfusion der Badlösung nicht absolut ruhig zwischen den Saugelektroden fixiert werden. Lageveränderungen des Präparates aus dem Objektivfokus hätten sich somit in fehlerhaften Veränderungen des gemessenen emittierten Fluoreszenzlichtes geäußert. Durch die Verwendung zweier Fluoreszenzfarbstoffe, deren Absolutbetrag an emittiertem Licht stets in der gleichen Weise auf Veränderungen reagiert, konnte, durch Berechnung der Fluoreszenzlicht-Ratio, oben genanntes mechanisches Messproblem eliminiert werden (Abb. 9). Nach der Beladung wurden die Faszikel gewaschen und anschließend über einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 35, Zeiss Jena, Deutschland) mit einem photometrischen Zusatz montiert. Die Lichtanregung erfolgte in Pulsen von 10 ms Dauer mit einer Xenonlampe (485 nm) bei einer Wiederholungsfrequenz von 0,33 Hz. Nach Filterung wurde das emittierte Fluoreszenzlicht von zwei Photodioden bei 530 nm (Calcium Green-1) und 660 nm (Fura Red) gemessen (Abb. 9) und über das

QTRAC Programm aufgezeichnet. Die Ratio der beiden Emissionsintensitäten wurde anschließend off-line, als Maß für die intrazelluläre Calciumkonzentration, berechnet. Alle mit dieser Technik gewonnenen Daten über Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration sind somit relativ zur Ausgangsratio der jeweiligen Messung zu verstehen. Somit erübrigt sich die Eichung des Meßverfahrens auf eine intrazelluläre Ausgangscalciumkonzentration.

3.5 Verwendete Chemikalien

Acetylcholin, Adenosin, ATP (Adenosin-5'-triphosphat), α,β -meATP (α,β -methylenadenosin-5'-diphosphat), 2-MeSADP (2-methylthio-adenosin-5'-diphosphat), Ap5A (diadenosin-pentaphosphat), Cholin, DMPP (1-1-dimethyl-4-phenyl-piperazin), DPCPX (8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin), DH β E (dihydro- β -erythroidin), Mecamylamine, NECA (5'-(N-ethylcarboxamido)-adenosin), Nikotin und Phosphatpuffer stammen von Sigma (Taufkirchen, Deutschland).

Capsazepin, MRS 2179 (2'-deoxy-N⁶-methyladenosin-3',5'-bisphosphat), iso-PPADS (pyridoxalphosphat-6-azophenyl-2'-5'-disulfonsäure) und ZM 241385 (4-(2-[7-amino-2-(2-furyl)[1,2,4]triazol[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ylamino]ethyl)phenol) wurden von Tocris (Bristol, UK) erworben.

5-iodo-A-85380, (-)-Cytisin, (\pm)-Epibatidin und Methyllcacontin stammen von Biotrend (Köln, Deutschland).

Capsaicin wurde bei Roth (Karlsruhe, Deutschland) gekauft.

Calcium Green-1 AM, Fura Red AM und TNP-ATP (2'(oder 3')-o-trinitrophenyladenosin-5'-triphosphat) stammen von Molecular Probes (Leiden, Niederlande).

α -Conotoxin Vc1.1 (Synonym: ACV1 oder H-Gly-Cys-Cys-Ser-Asp-Pro-Arg-Cys-Asn-Tyr-Asp-His-Pro-Glu-Ile-Cys-NH₂) wurde von Metabolic Pharmaceuticals Ltd. (Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt.

Agonisten an purinergen Rezeptoren wurden für 2-4 min, Agonisten an nAChRs für 3 min und TRPV1-Agonisten für 5 min über Badapplikation verabreicht. Applikationsfreie Intervalle betragen mindestens 10 min. Rezeptorantagonisten wurden in der Regel 10 min vor Verabreichung des Agonisten in die Badperfusion appliziert.

4. Ergebnisse

4.1 Agonisten und Antagonisten von TRPV1 Rezeptoren

Effekte des TRPV1-Agonisten Capsaicin und des entsprechenden Antagonisten Capsazepin (CPZ) wurden mittels QTRAC sowie photometrischen Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ an isolierten menschlichen Nervenfaszikeln des N. suralis sowie des N. vagus bestimmt. Durch die entsprechende Einstellung der Stimulationsparameter (vgl. Kapitel 3) wurden durch Threshold Tracking die Summenaktionspotentiale (SAP) unmyelinisierter C-Faseraxone gemessen. Eine typische Registrierung ist in Abb. 10 dargestellt.

Zunächst wurde Capsaicin (1 μ M) über die perfundierende Badlösung appliziert. Capsaicin führte dabei zu einem Anstieg der Emissionsratio (Calcium Green / Fura Red), entsprechend einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (Mittel \pm SEM), ($3,9 \pm 0,6\%$, $n=14$), der auch nach dem Auswaschen des Agonisten über längere Zeit nachweisbar blieb (Abb. 12A). Gleichzeitig zeigte sich eine zum Teil deutliche Abnahme der Amplitude des C-Faser SAP ($-25,9 \pm 5,5\%$, $n=3$), die ebenfalls lang andauernd bzw. nicht komplett reversibel war. Änderungen der Erregbarkeit menschlicher C-Faseraxone unter Capsaicineinfluß wurden mittels Threshold Tracking gemessen. Die Erregbarkeitsschwelle sank dabei unter Capsaicineinfluß leicht ab ($-5,7 \pm 2,3\%$, $n = 7$). Da jedoch unter Capsaicin zumeist auch das durch supramaximale Stimulation (Kanal 1) ausgelöste C-Faser SAP abnahm, sollte in diesem Punkt nicht von einer Erregbarkeitssteigerung der C-Faseraxone gesprochen werden. Denn letztere wird erst durch eine Abnahme des Reizstromes (threshold current) in Kombination mit einem konstanten supramaximalem SAP (Kanal 1) sowie einer Zunahme der Amplitude des auf 40% von Kanal 1 gesetzten SAP (Kanal 2) klar angezeigt.

In einem zweiten Schritt wurde nun die Wirkung des TRPV1-Antagonisten Capsazepin (CPZ) untersucht, dessen Applikation ebenfalls über die Badperfusion erfolgte. CPZ (10 μ M) führte zu einer Reduktion der Capsaicin bedingten intrazellulären Calciumkonzentrationserhöhung auf das Ausgangsniveau bzw. verhinderte einen Anstieg, je nachdem ob CPZ vor oder nach Capsaicin Gabe in die Badlösung

eingewaschen wurde. Des weiteren bedingte CPZ eine gänzliche oder zumindest teilweise Erholung des C-Faser SAP (Abb. 12B).

Bezüglich TRPV1 konnten, mit den zur Verfügung stehenden Mitteln, zwischen *N. suralis* und *N. vagus* Präparaten keinerlei Unterschiede in Punkto elektrophysiologischem Verhalten und intrazellulärer Calciumkonzentration festgestellt werden.

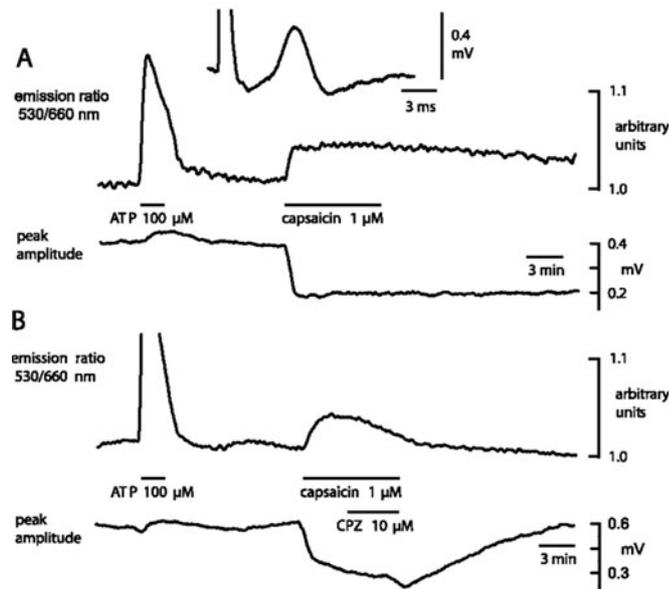


Abbildung 12

A und **B** zeigen jeweils die photometrisch ermittelte Ratio der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$; sowie den Verlauf des C-Faser SAP (peak amplitude) von Messungen an isolierten menschlichen Faszikeln des *N. suralis*. Ferner ist eine Momentaufnahme (Abb.12 oben) des C-Faser SAP mit vorangehendem Stimulus dargestellt. Um insbesondere die Signalgröße der Calciummessung besser abschätzen zu können, wurde vor Gabe von Capsaicin (1 μM) jeweils ATP (100 μM) appliziert. Beachtenswerte Unterschiede zwischen beiden Agonisten bestehen dabei vor allem in der Antwortkinetik (mehr Information über ATP Messungen vgl. Kapitel 4.2). Ein Anstieg der Ratio der Emissionsintensitäten bei 530 bzw. 660 nm deutet dabei auf eine Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ hin. Dargestellt wird auch die klare Abnahme der peak amplitude unter Capsaicineinfluß. **B** verdeutlicht die antagonistischen Eigenschaften von Capsazepin (CPZ), die sich sowohl in der Calciummessung als auch in der Registrierung der peak amplitude niederschlagen.

4.2 P2X und P2Y Rezeptor vermittelte Effekte an isolierten, menschlichen peripheren Nerven – Unterschiede zwischen N. suralis und N. vagus

Effekte von ATP und strukturanalogen Substanzen, wie z.B. α,β -me-ATP, wurden anhand der Erregbarkeit von C-Faseraxonen sowie Änderungen der freien intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ an isolierten menschlichen Präparaten des N. suralis und N. vagus untersucht. Dabei zeigten sich zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den zuvor genannten Nerven, die im weiteren noch speziell hervorgehoben werden.

4.2.1 Messungen an N. suralis Präparaten

Wie bereits in vorangehenden Arbeiten (Irnich 2002) gezeigt wurde, steigern sowohl ATP als auch Adenosin die Erregbarkeit unmyelinisierter C-Faseraxone in menschlichen Nn. surales. Neu ist dagegen die Beobachtung, daß sich diese Erregbarkeitssteigerung in Gegenwart von ZM 241385 wirkungsvoll antagonisieren läßt. Abb. 13 gibt die repräsentativen Ergebnisse zweier, an unterschiedlichen N. suralis Präparationen durchgeführten, Messungen wieder. Badapplikationen sowohl von Adenosin als auch ATP führten zu einer deutlichen Reduktion des Reizstroms (Mittel \pm SEM), ($-5,5 \pm 2,6\%$, n=14) für Adenosin (100 μ M) bzw. ($-7,8 \pm 5,0\%$, n=32) für ATP (100 μ M) bei konstanter supramaximaler Amplitude des C-Faser SAP (channel 1). In Anwesenheit des Adenosin A_2 Rezeptor Antagonisten ZM 241385 (1 μ M bis 3 μ M) wurde dieser erregende Effekt unterdrückt und durch einen erregbarkeithemmenden Effekt ersetzt. Letztgenannter äußerte sich in Form einer Erhöhung des benötigten Reizstroms ($2,9 \pm 2,5\%$, n=14) für ZM 241385 und Adenosin (100 μ M) bzw. ($1,5 \pm 2,6\%$, n=17) für ZM 241385 und ATP (100 μ M).

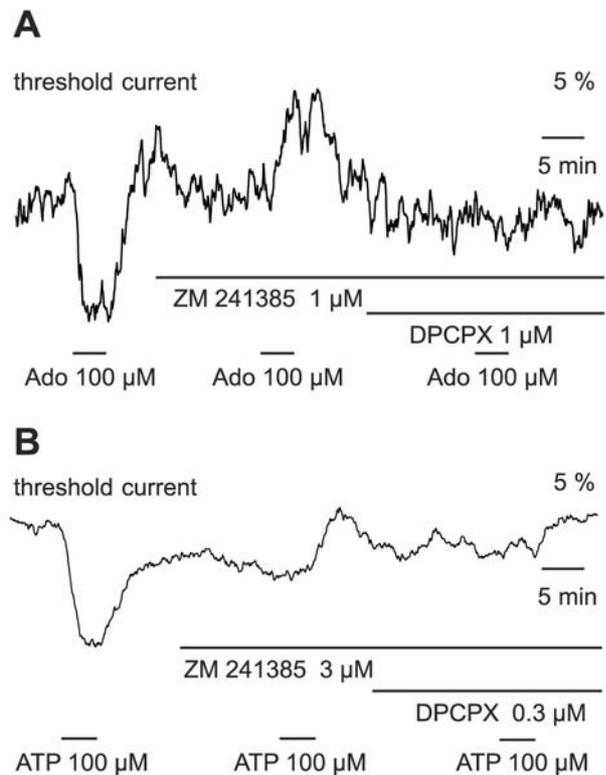


Abbildung 13

Die erregbarkeitssteigernde Wirkung von Adenosin (Ado) bzw. ATP läßt sich durch Applikation von ZM 241385 in einen inhibitorischen Effekt umkehren. In Gegenwart des A_1 Rezeptor Antagonisten DPCPX läßt sich auch letztgenannter Effekt blockieren.

Unter der Arbeitshypothese, das dieser hemmende Effekt durch die Aktivierung von Adenosin A_1 Rezeptoren vermittelt sein könnte, wurde in einem nächsten Schritt zusätzlich der A_1 Rezeptor Antagonist DPCPX (0,3 μ M bis 1 μ M) in die Badlösung appliziert. Dabei ließ sich in Gegenwart von DPCPX der erregbarkeitshemmende Effekt von Adenosin bzw. ATP unter ZM 241385 vollständig blockieren; mit n=5 für Adenosin bzw. n=4 für ATP.

Des weiteren wurde mit photometrischen Messungen untersucht, ob sich Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ durch die Badapplikation von ATP bzw. Adenosin beobachten lassen. Hierfür wurden isolierte Faszikel menschlicher Nn. surales, vor dem Experiment, mit den calciumsensiblen Fluoreszenzfarbstoffen Calcium Green und Fura Red beladen. ATP (100 μ M) führte dabei zu einem raschen transienten Anstieg der Emissionsratio (Calcium Green / Fura Red) (Mittel \pm SEM) ($20,6 \pm 16,5\%$, n=7), der von dem oben beschriebenen erregbarkeitssteigernden Effekt begleitet wurde. Die Kinetik der Veränderung der freien intrazellulären Calciumkonzentration unterschied sich dabei deutlich von der, die bei Messungen mit Capsaicin ermittelt wurde (vgl. Abb. 12). Und

in der Tat dürfte es sich bei ATP bedingten, intrazellulären Calciumkonzentrationsanstiegen zum überwiegenden Teil nicht um axonale Signale handeln. Vielmehr kommen hierfür Calciumkonzentrationsanstiege in Schwannzellen in Frage, die benachbart zu unmyelinisierten Axonen liegen (Irnich 2001). Die Applikation von Adenosin (100 μM) führte dagegen zu keinerlei Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, obwohl sich auch hier die nukleosidbedingte erregbarkeitssteigernde Wirkung feststellen ließ (vgl. Abb. 14).

In einem zweiten Schritt konnte mit dem P2Y₁ Rezeptor spezifischen Antagonisten MRS 2179 der ATP vermittelte Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fast gänzlich auf ($2,5 \pm 2,6\%$, n=7) reduziert werden. Die erregbarkeitssteigernde Wirkung blieb jedoch weiterhin erhalten.

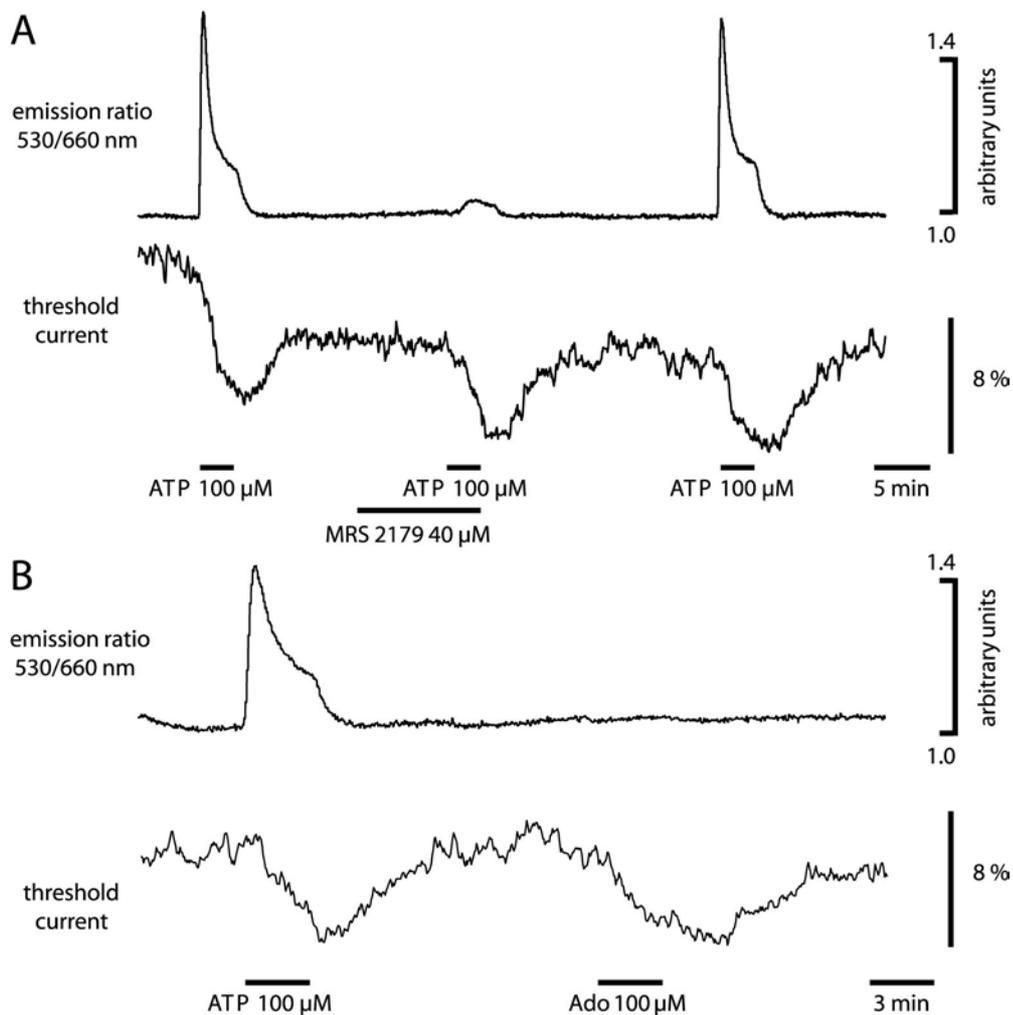


Abbildung 14

Kombinierte Messung der freien intrazellulären Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowie der C-Faser-Erregbarkeit (threshold current) an einem menschlichen N. suralis Faszikel. **A** ATP bewirkt einen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ sowie der axonalen Erregbarkeit. MRS2179 antagonisiert die ATP abhängige Veränderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, läßt jedoch die axonale Erregbarkeitssteigerung unbeeinflusst. **B** Adenosin (Ado) verursacht keine Änderung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, obwohl sich auch hier eine Steigerung der axonalen Erregbarkeit beobachten läßt.

4.2.2 Messungen an N. vagus Präparaten

Das Ergebnis eines typischen Experiments, das durch Messungen an einem menschlichen N. vagus Präparat gewonnen wurde, ist in Abb. 15 wiedergegeben. α,β -methyladenosin5'-triphosphat (α,β -me-ATP), ein unselektiver P2X Agonist, wurde in aufsteigender Konzentration von 1 bis 30 μM via Badlösung an den stets gleichen Faszikel appliziert und Änderungen der Amplitude des C-Faser SAP aufgezeichnet. In einer Konzentration von 1 μM ließ α,β -me-ATP die Amplitude unverändert. Erst ab einer Konzentration von 3 μM und mehr konnte eine Abnahme der Amplitude beobachtet werden. Quantitativ betrug diese Abnahme (Mittel \pm SEM) für α,β -me-ATP der Konzentration 3 μM ($-9,6 \pm 4,8\%$, $n=3$), 10 μM ($-18,6 \pm 10,3\%$, $n=3$), 20 μM ($-12,3 \pm 3,3\%$, $n=9$) und für 30 μM ($-20,1 \pm 9,7\%$, $n=3$). Eine vergleichbare Reduktion der Amplitude des C-Faser SAP isolierter menschlicher Vagusfaszikel konnte auch für eine Reihe weiterer P2X Agonisten, wie z.B. das ektonukleotidastabile $\text{ATP}\gamma\text{S}$ (100 μM) oder den P2X₃ Agonisten Ap5A (45 μM), festgestellt werden.

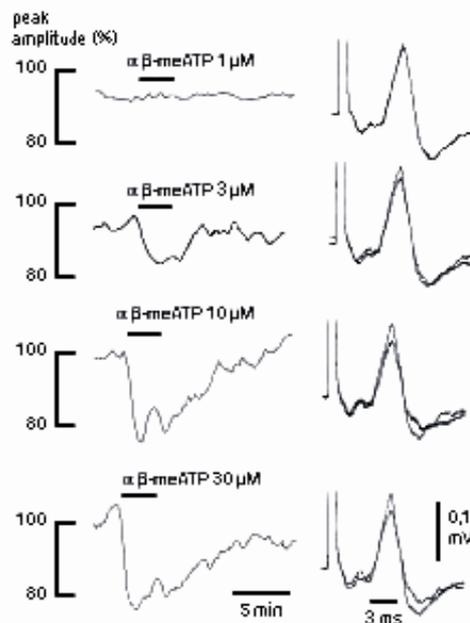


Abbildung 15

Effekte von α,β -me-ATP in ansteigender Konzentration von 1 bis 30 μM auf die Amplitude des C-Faser SAP eines einzelnen, isolierten menschlichen N. vagus Faszikels. Die linke Seite zeigt den kontinuierlichen Verlauf der Amplitude, während rechts übereinander projizierte Momentaufnahmen der Amplitude, jeweils vor und nach Applikation von α,β -me-ATP in die Badlösung, dargestellt sind.

In weiteren Experimenten wurde, analog dem Vorgehen an N. suralis Präparaten, mit dem unter 3.4 beschriebenen photometrischen Verfahren, die freie intrazelluläre Calciumkonzentration bestimmt. Die Badapplikation von ATP (100 μM) führte zu einem deutlichen, raschen und transienten Anstieg der Emissionsratio (Calcium Green / Fura Red) ($19,4 \pm 10,8\%$, $n=7$) (Abb. 16), deren Kinetik sich nicht von Messungen, die an Faszikeln menschlicher Nn. surales gewonnen wurden, unterschied. Somit dürfte es sich auch hier, mit großer Wahrscheinlichkeit um Calciumkonzentrationsanstiege in Schwanzzellen handeln, die sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu unmyelinisierten Axonen befinden.

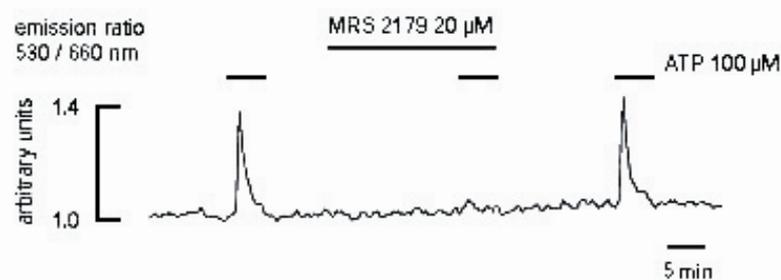


Abbildung 16

Darstellung von Änderungen der freien intrazellulären Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in einem isolierten menschlichen Vagusfaszikel. Die Faszikel wurden vor der Messung mit den calciumsensiblen Fluoreszenzfarbstoffen Calcium Green und Fura Red beladen. Ein Anstieg der Emissionsratio 530 nm / 660 nm entspricht dabei einem Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Die Applikation von ATP erzeugt einen transienten Anstieg von $[\text{Ca}^{2+}]_i$, der durch MRS 2179 komplett reversibel blockierbar war.

Wie unter 1.2.2 gezeigt, existiert eine große Vielfalt an P2X bzw. P2Y Rezeptorsubtypen, die für derartige Effekte verantwortlich sein könnten. Der nächste Schritt bestand nun darin, mit den zur Verfügung stehenden Methoden, eine Möglichkeit zur genaueren Rezeptorcharakterisierung zu finden. Hierzu wurden weitere Experimente an humanen Vagusfaszikeln mit dem P2X₁, P2X₃ bzw. heteromeren P2X₂/P2X₃ Rezeptor selektiven Antagonisten TNP-ATP sowie dem P2Y₁ Antagonisten MRS 2179 durchgeführt.

In Gegenwart von TNP-ATP (20 μM) ließ sich die Wirkung der P2X Agonisten α,β -me-ATP ($n=4$), Ap5A ($n=2$) und ATP γ S ($n=1$) komplett blockieren (Abb. 17). In ähnlicher Weise wurde mit dem P2Y₁ Antagonisten MRS 2179 verfahren. Dabei antagonisierte MRS 2179 (20 μM) den ATP bedingten Anstieg der freien intrazellulären

Calciumkonzentration komplett. Dieser blockierende Effekt zeigte sich nach dem Auswaschen von MRS 2179 aus der Badlösung reversibel. Eine zweite Applikation von ATP führte sodann erneut zu einem Anstieg der Emissionsratio.

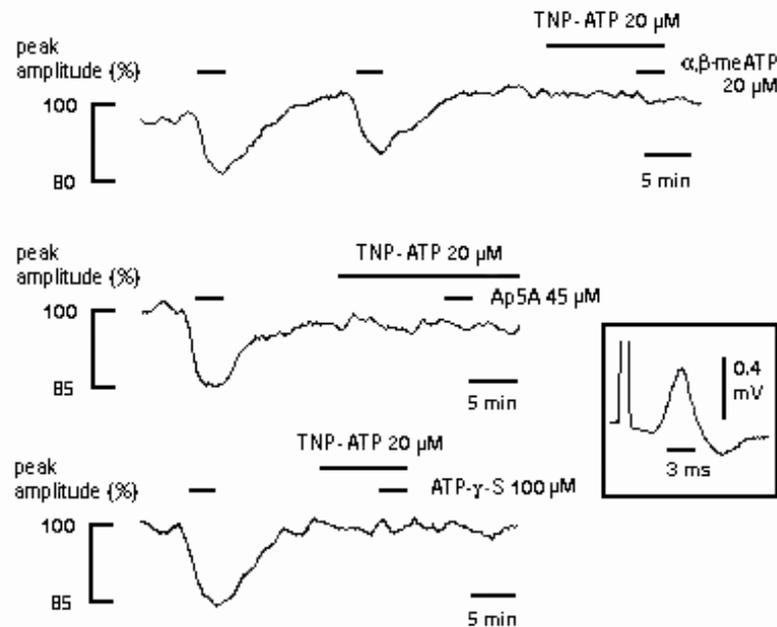


Abbildung 17

Darstellung des pharmakologischen Profils von P2X Rezeptoren unmyelinisierter Axone isolierter, menschlicher Vagusnerven. Auch hier sind Effekte in Form von Änderungen der Amplitude des C-Faser SAP abgebildet. Wie zuvor im Text erwähnt, reduzieren die P2X Agonisten α,β -me-ATP, Ap5A und ATP γ S die Amplitude des SAP. Diese Wirkung läßt sich durch vorherige Badapplikation des P2X₃ bzw. P2X₂/P2X₃ Antagonisten TNP-ATP aufheben. Ferner ist im kleinen Fenster rechts eine zugehörige Momentaufnahme des C-Faser-SAP, mitsamt des 1 ms andauernden Stimulusartefakts dargestellt.

4.2.3 Unterschiede zwischen N. suralis und N. vagus Präparaten

Wie zuvor erwähnt, ließen sich, in Abhängigkeit von den verwendeten P2X Agonisten, Unterschiede zwischen N. suralis und N. vagus Präparaten ermitteln. An C-Faseraxonen des N. suralis bewirkte ATP (100 μ M) eine deutliche Abnahme des Reizstromes (threshold current), ($-7,8 \pm 5,0\%$, n=32) sowie eine Reduktion der zugehörigen SAP-Amplitude, während α,β -me-ATP (20 μ M) keinen Effekt zu haben scheint. Ein genau gegensätzliches Verhalten konnte für C-Faseraxone menschlicher Vagusnerven festgestellt werden. In Gegenwart von ATP (100 μ M) trat eine allenfalls geringe Abnahme des Reizstromes auf. Die SAP Amplitude blieb unverändert. Dagegen wies α,β -me-ATP hier deutliche Effekte im Sinne einer Reduktion von Reizstrom und SAP-Amplitude auf (Abb. 18).

Photometrisch konnten jedoch keinerlei Unterschiede bezüglich Veränderungen der freien intrazellulären Calciumkonzentration zwischen N. suralis und N. vagus Präparaten ermittelt werden.

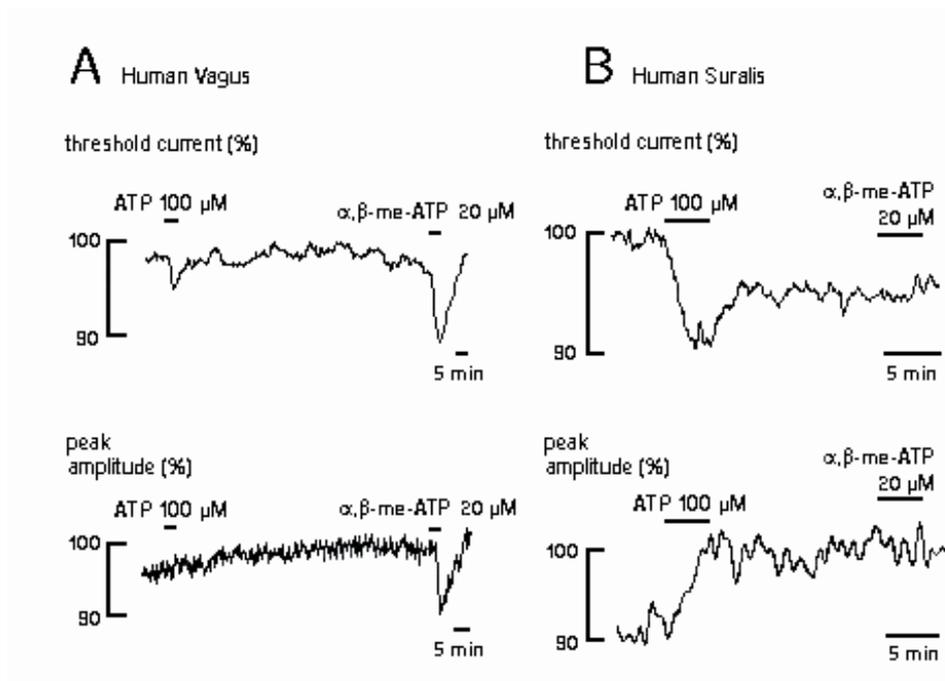


Abbildung 18

Abbildung zur Verdeutlichung des unterschiedlichen Antwortverhaltens isolierter, menschlicher C-Faseraxone von N. vagus bzw. N. suralis Präparaten, auf verschiedene P2X Agonisten. **A** ATP bewirkte nahezu keine Reduktion von Reizstrom (threshold current) und C-Faser SAP-Amplitude (peak amplitude) an C-Faseraxonen des N. vagus, während sich in Anwesenheit von α,β -me-ATP deutliche Effekte beobachten ließen. **B** Ein genau umgekehrtes Verhalten auf die Badapplikation von ATP bzw. α,β -me-ATP wiesen dagegen C-Faseraxone menschlicher Nn. surales auf.

4.3 Charakterisierung nikotinischer Acetylcholinrezeptoren an unmyelinisierten, menschlichen C-Faseraxonen

Die Iontophorese von Acetylcholin (ACh) durch die Haut, im Rahmen der Abklärung von Neuropathien der gering bis unmyelinisierten Nervenfasern, wird klinisch bereits seit längerer Zeit durchgeführt. Genauere Kenntnisse über die Zusammensetzung der Untereinheiten von nikotinischen Acetylcholinrezeptoren (nAChR) an humanen C-Faseraxonen sowie ein detailliertes pharmakologisches Profil liegen derzeit jedoch nicht vor. Zur Charakterisierung bzw. zur Erstellung eines pharmakologischen Profils von nAChRs an C-Faseraxonen menschlicher Nn. surales wurden Erregbarkeitsänderungen mittels Threshold Tracking erfasst. Die dabei möglicherweise

auftretenden Änderungen der freien intrazellulären Calciumkonzentration wurden mit photometrischen Messungen überwacht.

4.3.1 Agonisten an nAChRs – ein pharmakologisches Profil humaner

C-Faseraxone

Zur Profilerstellung wurden, in einer Vielzahl an Experimenten, nAChR-Agonisten in verschiedenen Konzentrationen via Badperfusion appliziert. Eine Reduktion des Reizstromes (threshold current), bei konstantem supramaximalen C-Faser Summenaktionspotential, deutet dabei klar auf einen erregbarkeitssteigernden Effekt des Agonisten hin. Abb. 19 zeigt ein hierfür typisches Experiment, das Erregbarkeitsänderungen in Abhängigkeit aufsteigender ACh-Konzentrationen von 3 μ M bis 100 μ M verdeutlicht.

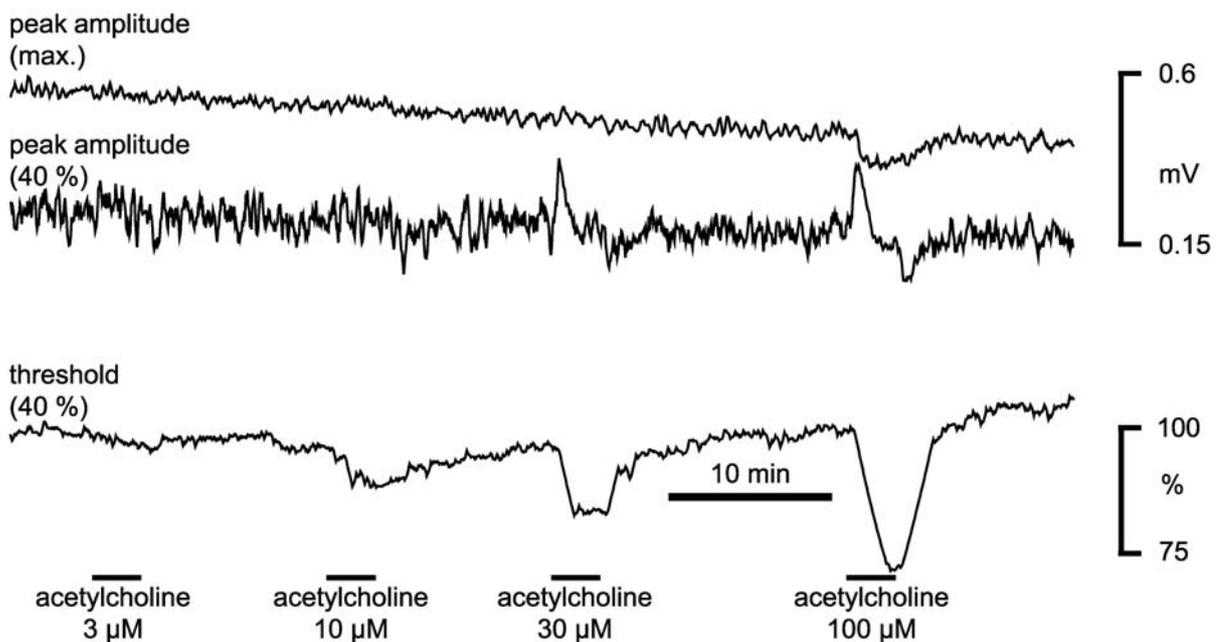


Abbildung 19

Darstellung der konzentrationsabhängigen, durch Acetylcholin (ACh) bedingten Erregbarkeitssteigerungen an menschlichen C-Faseraxonen des N. suralis. Ab einer Konzentration von 10 μ M führt ACh zu einer deutlichen Abnahme der Erregbarkeitsschwelle (threshold). Abgebildet sind ferner ACh Effekte auf die Amplitude des C-Faser Summenaktionspotentials (peak amplitude) bei supramaximaler Stimulierung (peak amplitude max.) sowie bei submaximaler Stimulierung auf 40% der maximalen Amplitude (peak amplitude 40%). Zu beachten ist, daß ab einer Acetylcholinkonzentration von 30 μ M, ein Anstieg der submaximalen Amplitude nicht schnell genug durch threshold tracking kompensiert werden konnte, so daß es hier zu einer kurzfristigen submaximalen Amplitude von über 40% kam.

In gleicher Weise wurde mit Nikotin als nAChR Agonist vorgegangen (Abb. 20). Nikotin zeigte sich in der erregenden Wirkung deutlich potenter als ACh, so daß die verwendeten Konzentrationen hier, mit einer Spanne von 1 μM bis 30 μM , geringer ausfielen. Abb. 21 zeigt Messergebnisse des nAChR Agonisten 5-Iodo-A85830. Die hohe Rezeptorbindungsaffinität sowie die geringe EC50 dieser Substanz (vgl. Kapitel 2) spiegelt sich dabei in den verwendeten nanomolaren Konzentrationen wider.

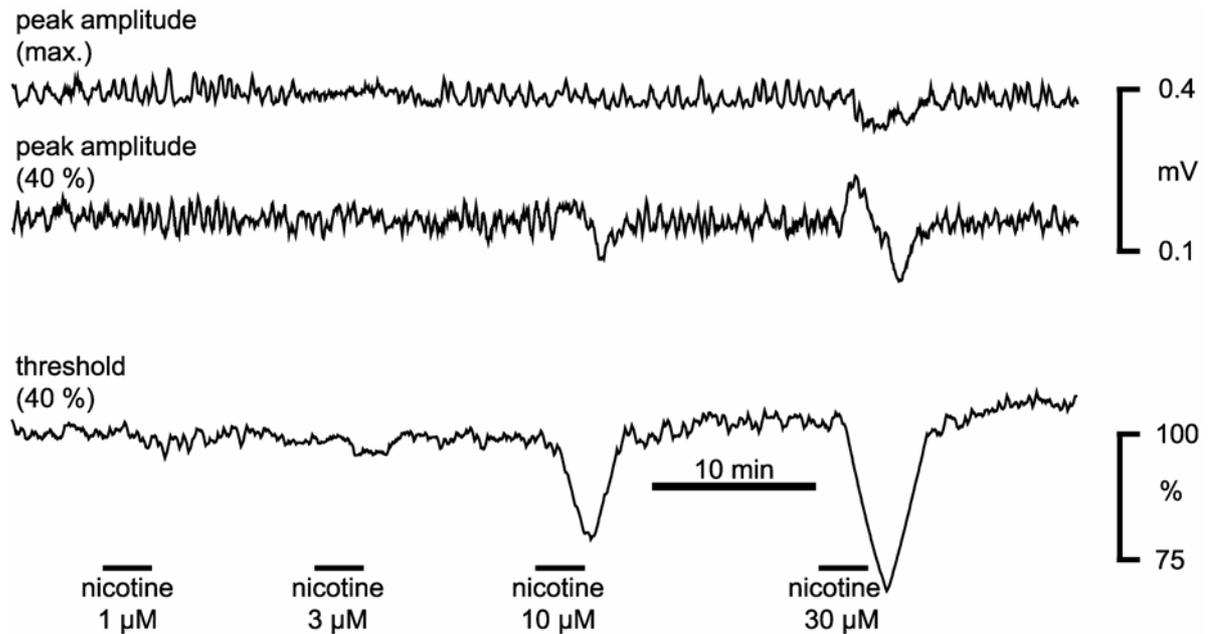


Abbildung 20

Darstellung des konzentrationsabhängigen, erregenden Effekts von Nikotin an isolierten menschlichen C-Faseraxonen des *N. suralis*. Die Abnahme des Reizstromes (threshold current) bei weitestgehend konstantem Summenaktionspotential (peak amplitude max.) kennzeichnet dabei die erregende Wirkung von Nikotin. Ähnlich wie bereits in Abb. 19 gezeigt, kam es auch hier, bei hohen Nikotinkonzentrationen von 30 μM zu einem kurzfristigen Anstieg der submaximalen Amplitude (peak amplitude 40%) über 40%, da threshold tracking den Reizstrom nicht schnell genug an die veränderte Erregbarkeit anpassen konnte.

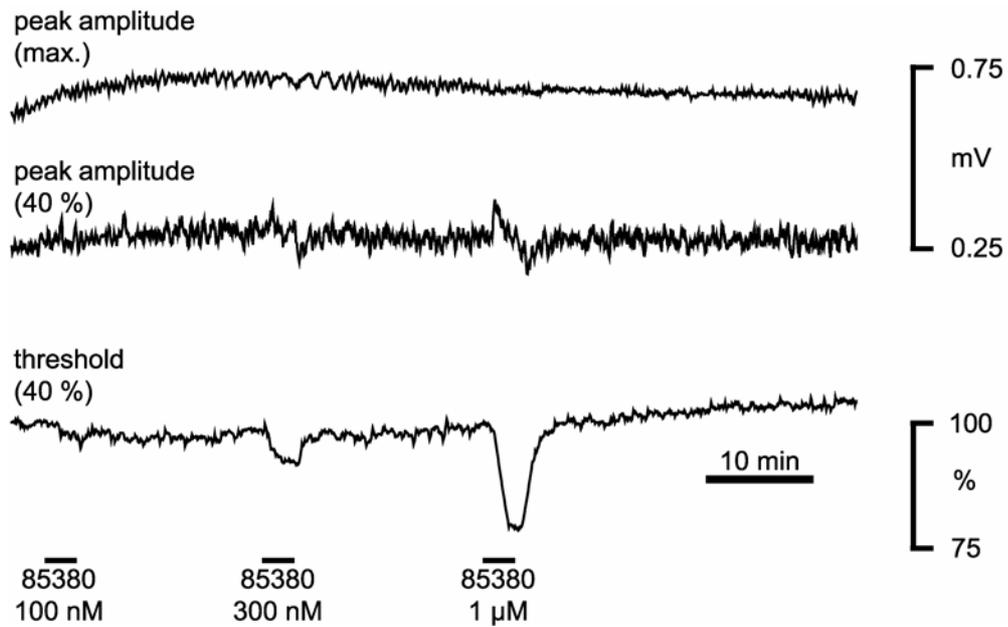


Abbildung 21

Darstellung des konzentrationsabhängigen, erregenden Effekts des nAChR Agonisten 5-Iodo-A85830 (85380). Auffällig ist die gegenüber ACh und Nikotin deutlich höhere Wirkungspotenz von 5-Iodo-A85830, welche sich in wirksamen Konzentrationen von bereits 300 nM widerspiegelt.

Auf Basis vieler Messungen mit verschiedenen nAChR Agonisten in unterschiedlichen Konzentrationen konnte Abb. 22 erstellt werden. Diese ermöglicht die Bestimmung der minimalen effektiven Konzentration, d.h. die geringste nAChR Agonistenkonzentration, bei der sich lediglich eine Abnahme des Reizstromes beobachten läßt. Ferner ist daraus ein pharmakologisches Agonisten Wirkungsprofil in der Wirksamkeitsreihenfolge: Epibatidin >> 5-Iodo-A85830 > DMPP > Nikotin > Cytisin > ACh ersichtlich.

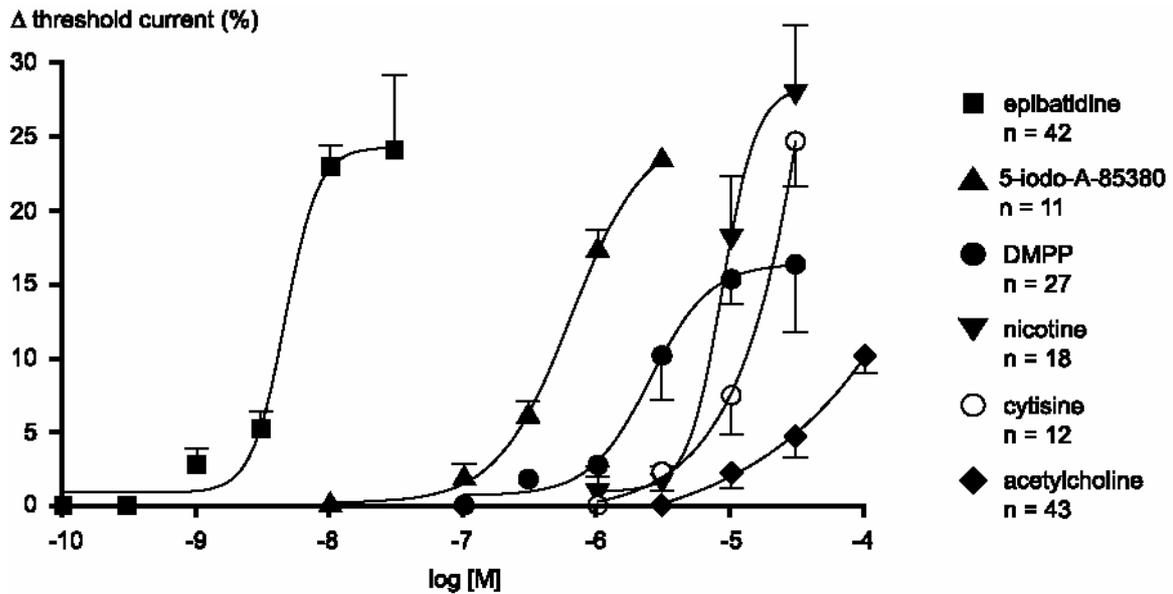


Abbildung 22

Darstellung der Konzentrationswirkungsbeziehungen verschiedener nAChR Agonisten an isolierten menschlichen C-Faseraxonen. Die jeweils geringste Konzentration, die zu einem Δ Reizstrom (Δ threshold current) führt, entspricht der minimalen effektiven Konzentration. Da es bei hohen Agonistenkonzentrationen neben den Reizstromveränderungen auch zu Veränderungen des C-Faser Summenaktionspotentials kam (vgl. Text zu Abb. 19 und Abb. 20), zeigen die Kurven keine kompletten Konzentrationswirkungsbeziehungen, sondern beschränken sich auf den jeweiligen Anfangsbereich der Effekte. Alle Agonisten wurden für 3 Minuten in die Badlösung appliziert. Die der Grafik zugrunde liegenden Daten bestehen aus Mittelwert \pm SEM, die Anzahl der Messungen **n** ist für jeden Agonisten gesondert am rechten Rand mit aufgeführt.

4.3.2 Antagonisten an nAChRs – ein pharmakologisches Profil humaner C-Faseraxone

Wie unter Kapitel 2.2.3 beschrieben, existieren nAChRs in den verschiedensten pentameren Kombinationen an Untereinheiten. Mit dem Ziel, die an isolierten C-Faseraxonen menschlicher Nn. surales dominierende nAChR Form genauer einzugrenzen, wurde daher neben dem Agonistenprofil (vgl. Kapitel 4.3.1) auch ein Antagonistenprofil erstellt. Hierfür wurden die blockierenden Effekte der Substanzen Dihydro- β -erythroidine (kurz: DH β E, ein Antagonist an α 4/ β 2), Mecamylamin (ein Antagonist an α 3/ β 4) sowie Methyllycaconitine (kurz: MLA, ein Antagonist an α 7) gegenüber der erregenden Wirkung einer Epibatidinkonzentration von jeweils 10 nM getestet.

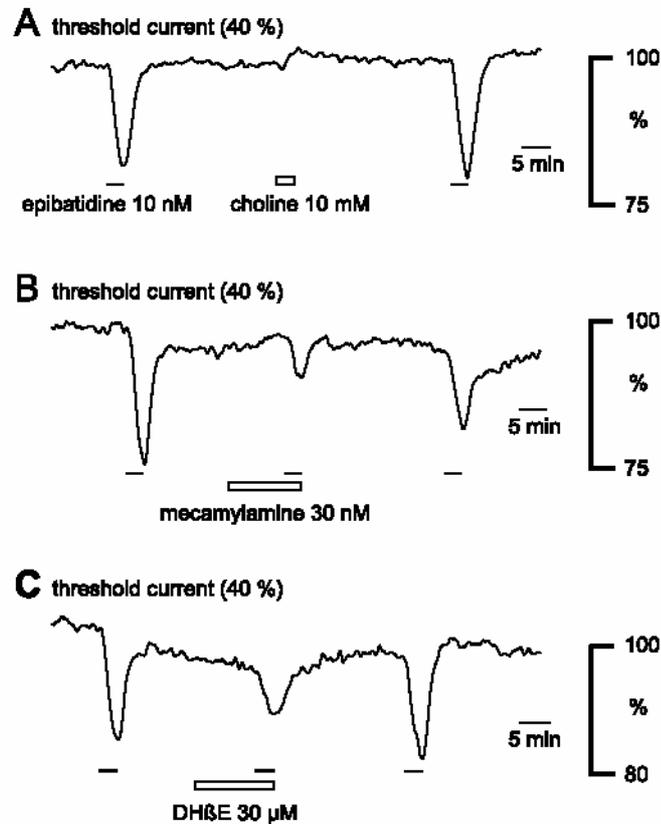


Abbildung 23

Darstellung von Messreihen an isolierten menschlichen C-Faseraxonen des N. suralis, die zur Erstellung eines Antagonistenprofils geführt haben. **A** verdeutlicht den erregbarkeitssteigernden Effekt von Epibatidin (10 nM), während Cholin (10 mM) keinen Effekt zu haben scheint. **B**, **C** zeigen den antagonisierenden Effekt von Mecamylamin (30 nM) und DHβE (30 μM). Die Applikation von Epibatidin (10 nM) führte zunächst zu einer Reduktion des Reizstromes um ca. 20%. Unter Anwesenheit von Mecamylamin bzw. DHβE fiel diese durch Epibatidin bedingte Abnahme des Reizstromes deutlich geringer aus. Nach dem Auswaschen des Antagonisten aus der Badperfusionslösung führte die erneute Gabe von Epibatidin wiederum zu einer Reduktion des Reizstromes von ca. 20%. Somit läßt sich eine Rezeptordesensibilisierung durch geringe Konzentrationen von Epibatidin (10 nM) weitestgehend ausschließen.

Es ergab sich, daß Mecamylamin bereits ab Konzentrationen von 3 nM den Epibatidineffekt wirkungsvoll antagonisierte. DHβE bedurfte dagegen einer 1000-fach höheren Konzentration, um blockierende Eigenschaften zu zeigen. Gleiches gilt für MLA, dessen antagonisierende Wirkung ebenfalls erst bei Konzentrationen oberhalb derer für Mecamylamin zu beobachten war.

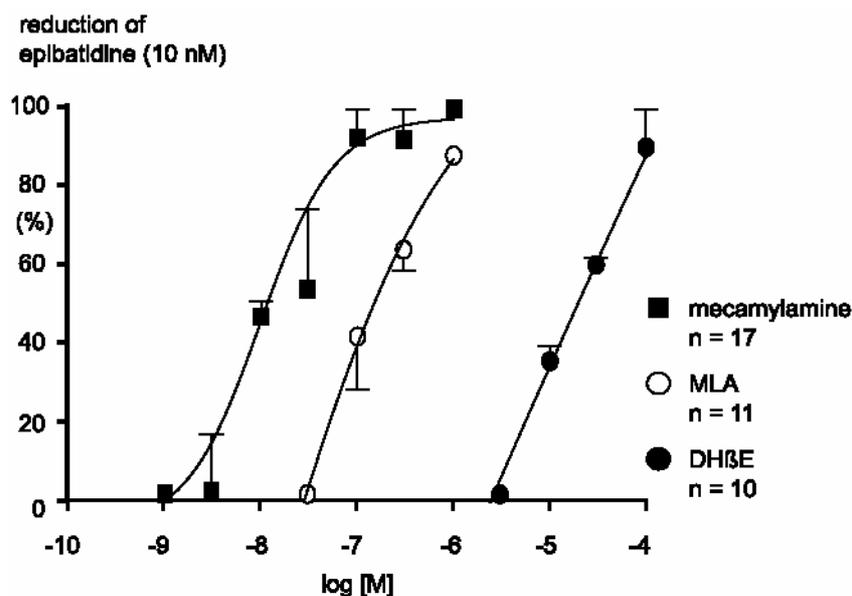


Abbildung 24

Darstellung der Konzentrations-Wirkungsbeziehungen verschiedener nAChR Antagonisten mit unterschiedlicher Spezifität für nAChR Untereinheiten. Die antagonistische Wirkung ist als Reduktion der erregbarkeitssteigernden Wirkung von Epibatidin (10 nM) auf der Ordinate abzulesen. Alle Antagonisten befanden sich über mindestens 10 Minuten in der Badperfusion, bevor Epibatidin appliziert wurde. Die der Grafik zugrunde liegenden Daten bestehen aus Mittelwerten \pm SEM. Die Anzahl der jeweiligen Messungen n ist in der Legende rechts enthalten.

4.3.3 Antagonisierende Wirkung von α -Conotoxin Vc1.1 an unmyelinisierten

Axonon

α -Conotoxine sind eine Gruppe von Peptiden, mit der Eigenschaft nAChRs zu blockieren. Stellvertretend für diese Substanzklasse wurde in dieser Arbeit das Peptid α -Conotoxin Vc1.1 verwendet. Die antagonistische Wirkung von α -Conotoxin Vc1.1, wurde dabei als Reduktion der erregbarkeitssteigernden Wirkung von Nikotin gemessen.

Wie in Abb. 25 gezeigt, begann jede Messreihe mit der Gabe von Nikotin (10 μ M) über drei Minuten. Nach Auswaschen des Agonisten aus der Badlösung wurde sodann α -Conotoxin Vc1.1 über mindestens 10 Minuten, via Badperfusion, an die isolierten Nervenfaszikel appliziert. Die alleinige Perfusion mit α -Conotoxin Vc1.1 wies dabei keine deutlichen Eigeneffekte auf. Die erneute Applikation von Nikotin (10 μ M), jetzt unter Anwesenheit von α -Conotoxin Vc1.1, führte zu deutlich geringeren erregbarkeitssteigernden Effekten.

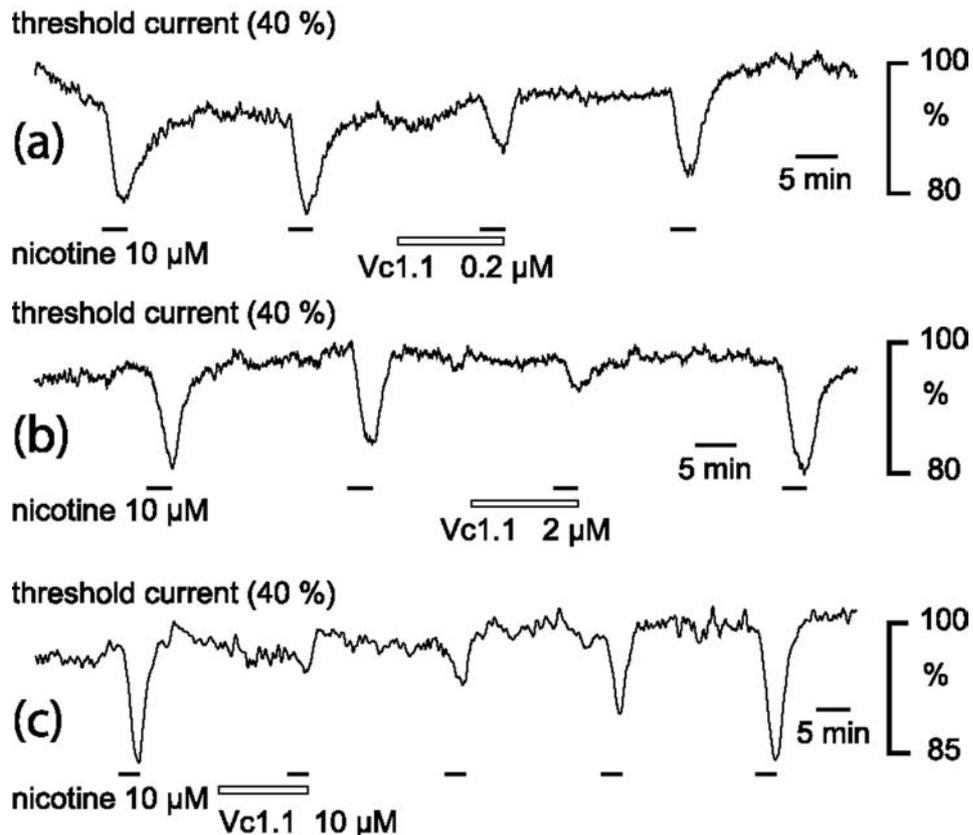


Abbildung 25

Darstellung der antagonistischen Wirkung von α -Conotoxin Vc1.1. Abgebildet ist jeweils die Reizstromstärke (threshold current), die für ein submaximales C-Faser Summenaktionspotential von 40% des maximal möglichen benötigt wurde. Als erregende Substanz wurde jeweils Nikotin ($10 \mu\text{M}$) über 3 min in die Badperfusion appliziert. Von (a) nach (c) wurde α -Conotoxin Vc1.1 in jeweils höherer Konzentration appliziert. Die erneute, auf die Applikation von Nikotin folgende Erregbarkeitssteigerung nach dem Auswaschen des Antagonisten aus der Badlösung, verdeutlicht die Reversibilität der blockierenden Wirkung von α -Conotoxin Vc1.1.

α -Conotoxin Vc1.1 führte in den folgenden verwendeten Konzentrationen $0,2 \mu\text{M}$, $2,0 \mu\text{M}$ und $10,0 \mu\text{M}$ zu einer Abnahme des erregbarkeitssteigernden Nikotineffekts um $26,7\% \pm 11,1\%$ ($n=4$), $61,0\% \pm 8,4\%$ ($n=7$) und $92,7\% \pm 4,9\%$ ($n=4$) (Mittelwert \pm SEM). Die blockierende Wirkung von α -Conotoxin Vc1.1 zeigte sich dabei konzentrationsabhängig und reversibel. Die volle Reversibilität war für geringe Konzentrationen an α -Conotoxin Vc1.1 bereits nach wenigen Minuten erreicht. Im Falle der höchsten, verwendeten Konzentration von $10 \mu\text{M}$ wurden hierfür jedoch Zeiten von bis zu 60 Minuten und länger benötigt (vgl. Abb. 25 Teil (c)).

Nach Durchführung mehrerer Messreihen, analog zu Abb.25 ließ sich, wie bereits in Kapitel 4.3.2 gezeigt, auch für α -Conotoxin Vc1.1 eine Konzentrationswirkungsbeziehung erstellen. Als Wirkung wurde dabei die Reduktion des erregbarkeitssteigernden Effekts von Nikotin (10 μ M) definiert.

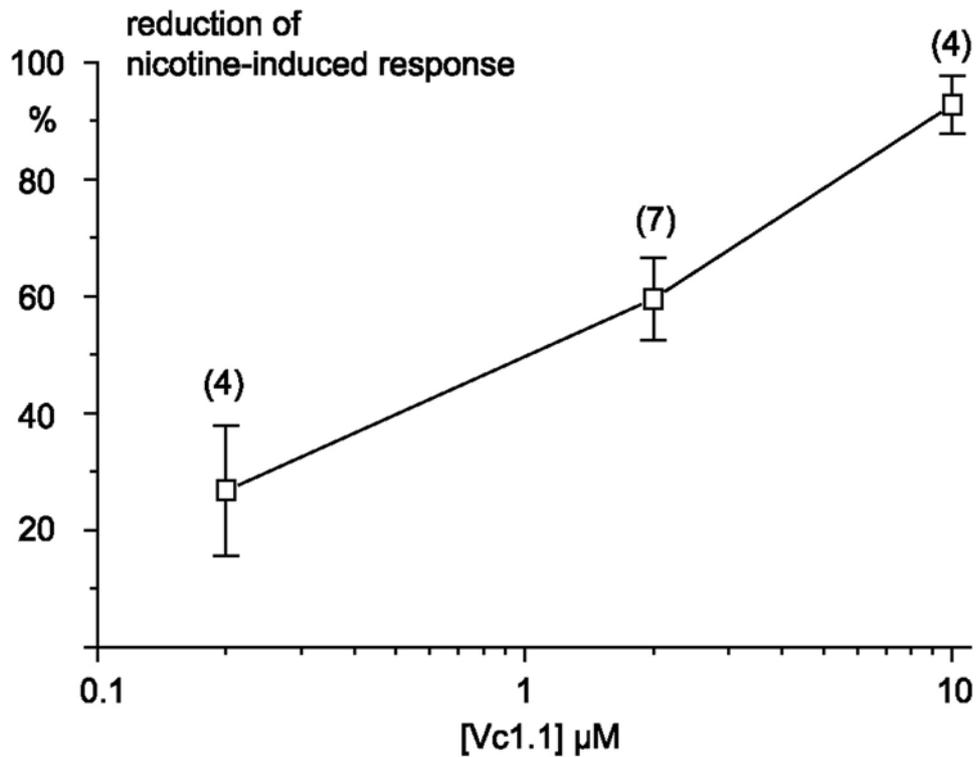


Abbildung 26

Halblogarithmische Darstellung der Konzentrationswirkungsbeziehung für α -Conotoxin Vc1.1 in den Konzentrationen 0,2 μ M, 2,0 μ M und 10,0 μ M. Als Wirkung ist dabei die Reduktion des erregbarkeitssteigernden Effekts von Nikotin (10 μ M) in Prozent auf der Ordinate angegeben. Die der Grafik zugrunde liegenden Daten bestehen aus Mittelwert \pm SEM, die jeweilige Anzahl der Messungen ist in Klammern der Grafik zu entnehmen.

5. Diskussion

5.1 TRPV1 an isolierten, menschlichen C-Faseraxonen

Elektrophysiologische Effekte von TRPV1 Rezeptoren an neuronalen Membranen sind bereits seit längerer Zeit bekannt und zahlreich dokumentiert (Holzer 1991), (Tominaga 1998). Die Bedeutung von TRPV1 Rezeptoren in der Vermittlung nozizeptiver Information ist heute allgemein akzeptiert. Dennoch existieren nur wenige Daten über Untersuchungen an menschlichen Präparaten. Das gleichzeitige Vorhandensein spezifischer Agonisten und Antagonisten ließ somit TRPV1 als idealen Kandidaten bei der Untersuchung der Chemosensibilität isolierter, menschlicher C-Faseraxone erscheinen.

TRPV1 Rezeptoren lassen sich sowohl auf C-Faserneuronen als auch auf A δ -Faserneuronen nachweisen (Szallasi 1999). Untersuchungsobjekte dieser Dissertation waren jedoch nicht, wie in der oben genannten Arbeit von Szallasi et al. und zahlreichen anderen Veröffentlichungen zuvor, neuronale Zellkörper oder nozizeptive Nervenendigungen, sondern die Axone peripherer Nervenstämmen in ihrem Verlauf. Die Untersuchungsergebnisse zeigen, daß auch hier eine Chemosensibilität besteht. Klassische Sensibilitätsmodelle, die der axonalen Membran lediglich konduktorische Eigenschaften zubilligen, verlieren somit an Gültigkeit. Die Frage, warum jedoch Neurone z.B. mit Lokalisation im Spinalganglion, oder Axone in ihrem Verlauf, Chemorezeptoren wie TRPV1 exprimieren, ist dagegen nur schwer zu beantworten und bleibt spekulativ. Möglicherweise existieren auf dem Weg von der Rezeptorsynthese im Zellkörper bis zum Rezeptor-Einbau in die neuronale Membran der peripheren Nervenendigung mehrere, bereits funktionsfähige, membrangebundene Zwischenzustände des Rezeptors.

Eine TRPV1 Rezeptor Aktivierung kann über Capsaicin und strukturverwandte Substanzen, durch pH-Wert Abfall, durch Hitze sowie über Produkte des Lipidmetabolismus erfolgen (vgl. Kapitel 2.2.1). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit führte die Badapplikation von Capsaicin zu einem Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Nach den Befunden in einer früheren Arbeit (Mayer 1999) dürfte es sich hierbei mit hoher Wahrscheinlichkeit um axonale Calciumkonzentrationsanstiege handeln. Die Funktion des durch Capsaicin induzierten intraaxonalen

Calciumanstiegs ist dabei nicht geklärt. Es konnte aber von anderen Autoren gezeigt werden, daß auf die Applikation von Capsaicin eine vermehrte intrazelluläre Freisetzung von Calcitonine Gene Related Peptide (CGRP) erfolgt (Sauer 2003). Elektrophysiologisch führte die Applikation von Capsaicin zu einer weitestgehend irreversiblen Reduktion der C-Faser Summenaktionspotentialamplitude (C-Faser SAP). Auch nach längerer Auswaschphase des Agonisten trat keine Erholung des C-Faser SAP auf. Solche offensichtlich neurotoxischen Effekte von Capsaicin sind hinreichend bekannt und könnten sowohl osmotisch als auch durch Ca^{2+} abhängige Aktivierung von Ca^{2+} sensiblen Proteasen bedingt sein (Wood 1989), (Winter 1995).

Diese neurotoxischen Effekte scheinen, neben der Desensibilisierung von TRPV1 Rezeptoren, einen wichtigen Teil der analgetischen Wirkung von Capsaicin auszumachen (Sawynok 2003). In Abhängigkeit von der Capsaicinkonzentration, der Applikationsart sowie des Alters des Patienten erweist sich die Neurotoxizität von Capsaicin bei Anwendung in vivo, binnen einiger Wochen als reversibel. Die erstmalige intradermale Injektion von Capsaicin erzeugt zunächst Schmerz und eine Rötung der umgebenden Haut. An der Einstichstelle tritt im Verlauf eine Analgesie auf, während die angrenzenden geröteten Areale eine Hyperalgesie aufweisen (Sawynok 2003). Erst nach wiederholten Applikationen zeigt sich binnen ca. einer Woche die analgetische Wirkung von Capsaicin im gesamten Applikationsgebiet. Einige niedrig konzentrierte Capsaicin Cremes mit einem Wirkstoffanteil von 0,025% bzw. 0,075% haben sich in Doppelblindstudien gegenüber Placebo als wirksam erwiesen und befinden sich bereits in der klinischen Anwendung z.B. zur begleitenden Therapie von diabetischen Neuropathien, postherpetischen Neuropathien oder Cluster Kopfschmerzen (Watson 1994), (Katz 2003). Problematisch in der topischen Anwendung von Capsaicin ist jedoch die für Patienten unangenehme Schmerz erzeugende Eigenschaft während der ersten Woche. Dies führt zu einem Anteil an Therapieabbrüchen von 33% bis 67%. Auch die Kombination von Capsaicincreme mit einer vorangehenden Anwendung eines topischen Lokalanästhetikums konnte bei gesunden Probanden keine ausreichende Reduktion des Capsaicin induzierten Schmerzes erzeugen (Fuchs 1999). Ferner ist der Grad der durch Capsaicin erzielbaren Analgesie relativ gering. Die topische Applikation von Capsaicincremes kann somit derzeit lediglich unterstützend erfolgen. Um diese beiden Punkte zu optimieren, befinden sich höher konzentrierte Cremes mit einem Wirkstoffanteil von bis zu 10% in der klinischen Testung (Katz 2003), (Sawynok 2003). Auf diesem Wege könnte eine raschere Rezeptordesensibilisierung und damit eine

kürzere Schmerzphase in der ersten Woche sowie eine stärkere Analgesie erzielt werden.

Um sicherzustellen, daß die in dieser Arbeit an C-Faseraxonen beobachteten Effekte von Capsaicin, TRPV1 vermittelt sind, wurden zusätzliche Experimente mit dem TRPV1 spezifischen Antagonisten Capsazepin (CPZ) durchgeführt. Da CPZ sowohl die elektrophysiologischen Effekte der Capsaicinapplikation als auch deren Einfluß auf die intrazelluläre Calciumkonzentration antagonisierte, kann in diesem Punkt von einer wesentlichen Beteiligung von TRPV1 Rezeptoren ausgegangen werden. Das in Kapitel 4.1 Abb.12B gezeigte pharmakologisch ungewöhnliche Vorgehen der Applikation des Antagonisten nach Gabe des Agonisten beruht darauf, daß eine mehrmalige Capsaicingabe meist unmöglich war. Ursachen hierfür scheinen, Capsaicin bedingte, zum Teil irreversible Veränderungen der Eigenschaften (v.a. der SAP Amplitude) von C-Faseraxonen des Messpräparates zu sein. Das Einwaschen von CPZ und eine anschließende Badapplikation von Capsaicin, mit einer ausbleibenden Wirkung des Agonisten auf die intrazelluläre Calciumkonzentration und die SAP Amplitude, ohne vorherigen Wirksamkeitsnachweis von Capsaicin am Präparat, hätte somit keine Aussagekraft. Das in Kapitel 4.1 Abb. 12B gewählte Vorgehen stellt somit einen Kompromiss dar, der sowohl die Wirksamkeit von Capsaicin am jeweiligen Nervenpräparat, aber auch die antagonisierenden Effekte von CPZ verdeutlicht.

Welchen Stellenwert der TRPV1 Rezeptor in zukünftigen Strategien zur Schmerzbekämpfung einnehmen wird sowie die Rolle der topischen Anwendung von Capsaicin in der analgetischen Therapie, läßt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur schwer vorhersagen. Sicher ist jedoch, daß durch ein besseres Verständnis aller an der Vermittlung nozizeptiver Informationen beteiligten Mechanismen eine bessere Schmerztherapie ermöglicht werden kann. Die in dieser Arbeit durchgeführte Charakterisierung der Capsaicinsensibilität an isolierten menschlichen C-Faseraxonen des N. suralis und N. vagus liefert hierfür einen weiteren Baustein.

5.2 Nukleotid und Nukleosid Rezeptoren an isolierten, menschlichen C-Faseraxonen

Daß die lokale, periphere Applikation von Adenosin und ATP, sei es auf dem Boden experimentell erzeugter Hautblasen oder mittels Iontophorese von ATP auf unversehrter menschlicher Haut, Schmerz erzeugt, ist seit längerer Zeit bekannt (Bleehen 1977), (Sawynok 2003), (Hamilton 2000). Ferner konnte in tierexperimentellen Verhaltensstudien gezeigt werden, daß die lokale Applikation von ATP oder analogen Substanzen ein Schmerzverhalten bewirkt (Sawynok 2003). Für die erregenden Effekte von ATP an sensiblen Rattennervenzellen werden P2X₃ Rezeptoren und dessen heteromultimere Form P2X₂/P2X₃ verantwortlich gemacht (Chen 1995). In tierexperimentellen Modellen des neuropathischen Schmerzes konnte gezeigt werden, daß die Expression von P2X₃ Rezeptoren an Hinterwurzelganglienzellen gesteigert war (Novakovic 1999). Weitgehend unbekannt ist jedoch, welche Rezeptoren und Mechanismen ATP Antworten an menschlichen C-Faseraxonen vermitteln. Insbesondere die im Rahmen dieser Arbeit an isolierten humanen Nn. vagi durchgeführten Versuche stellen, soweit aus Literaturstudien ersichtlich, ein absolutes Novum dar (Lang 2003). Exaktere Kenntnisse über Rezeptoren für Adenosin und ATP auf peripheren menschlichen Nerven könnten somit dazu beitragen, die Rolle von Purinen in der Entstehung und Aufrechterhaltung von Schmerz besser zu verstehen.

Wie bereits in Kapitel 2.2.2 gezeigt, könnte in den Extrazellularraum freigesetztes ATP via P2X, P2Y Rezeptoren aber auch nach enzymatischem Abbau durch Ektonukleotidasen über P1 Rezeptoren wirksam sein. ZM 241385, ein P1 Rezeptor Antagonist mit hoher inhibitorischer Potenz an A₂ Rezeptoren (A_{2A}>A_{2B}), blockierte die axonale Erregbarkeitssteigerung, die üblicherweise nach Badapplikation von ATP bzw. Adenosin an C-Faseraxonen des N. suralis zu beobachten war. Diese Beobachtung läßt P1 Adenosin Rezeptoren (A₁, A_{2A}, A_{2B}, A₃) als Schlüsselstrukturen in der Vermittlung ATP induzierter Erregbarkeitssteigerungen an humanen C-Faseraxonen des N. suralis erscheinen. Diese Annahme steht dabei in Einklang mit den Ergebnissen aus den oben geschilderten Experimenten, in denen menschliche Probanden sowohl nach lokaler Applikation von Adenosin als auch von ATP über Schmerzen berichteten. Die zugrunde liegenden Mechanismen der metabotropen Adenosin induzierten Erregbarkeitssteigerung sind jedoch ungeklärt. In Frage kommen hierfür z.B. die Hemmung Ca²⁺

abhängiger K^+ Kanäle, die Modulation spannungsabhängiger Na^+ Kanäle oder die Aktivierung von cAMP regulierten I_h Strömen (Lang 2002). Eine Erklärung für die Wirkung von ATP an P1 Rezeptoren könnte die extrazelluläre Hydrolyse von ATP zu Adenosin via Ektonukleotidasen liefern. So konnte gezeigt werden, daß Schwannzellen, die nicht an der Myelinisierung von Axonen beteiligt sind, das zur Familie der Ektonukleotidasen zählende membrangebundene Enzym Ekto-Nukleosid-Triphosphat-Diphosphohydrolase 2 (NTPDase 2) exprimieren (Braun 2001).

Neben der Tatsache, daß sich mittels ZM 241385 die Adenosin bzw. ATP vermittelte Erregbarkeitssteigerung an menschlichen C-Faseraxonen des N. suralis blockieren ließ, konnte noch eine weitere Beobachtung gemacht werden. Der erregende Effekt der Purine wurde unter Anwesenheit von ZM 241385 durch einen erregbarkeitshemmenden Effekt ersetzt. Diese zusätzliche Hemmung ließ sich durch den A_1 Rezeptor Antagonisten DPCPX aufheben. Ausgehend von diesem pharmakologischen Profil peripherer menschlicher C-Faseraxone besitzt Adenosin somit zweierlei Modalitäten. Zum einen die erregbarkeitssteigernde Wirkung via A_2 Rezeptoren zum anderen eine erregbarkeitshemmende Komponente, die durch A_1 Rezeptoren vermittelt wird. Dies ist vereinbar mit früheren Verhaltensexperimenten an transgenen Mäusen. Die Abwesenheit von A_{2A} Rezeptoren führte zu einem verzögerten Antwortverhalten der Tiere auf periphere thermisch induzierte Schmerzreize (Ledent 1997). Umgekehrt wiesen Tiere mit Fehlen von A_1 Rezeptoren eine Hyperalgesie auf schädigende, thermische Reize auf (Johansson 2001). Wie jedoch das Nebeneinander dieser zwei Adenosin Modalitäten auf funktioneller Ebene organisiert ist, bleibt letztendlich spekulativ. Eine interessante Entdeckung ist, daß unter physiologischen Bedingungen an afferenten Nervenendigungen im Bereich der Substantia gelatinosa des Rückenmarks hemmende A_1 Effekte dominieren (Lao 2001). Denkbar wäre daher z.B. ein Gradient des Verhältnisses A_1/A_2 , mit einem Überwiegen von erregenden A_2 Effekten an der peripheren Nervenendigung und einem Dominieren von inhibitorischen A_1 Effekten an der zentralen Nervenendigung.

Die Möglichkeit, daß die erregende Wirkung von ATP an menschlichen C-Faseraxonen des N. suralis zumindest zum Teil durch P2X Rezeptoren vermittelt sein könnte, erscheint aus den folgenden Gründen unwahrscheinlich. Der erregende Effekt von ATP läßt sich nicht durch PPADS, ein unspezifischer P2X Rezeptor Antagonist, reduzieren oder gar blockieren. Zum anderen zeigte die Badapplikation von α,β -me-ATP, ein ektonukleotidasestabiler P2X Rezeptor Agonist, keinerlei Effekt an den isolierten

menschlichen C-Faseraxonen des N. suralis (Lang 2002). Unter der Annahme, daß eine Aktivierung von ionotropen P2X Rezeptoren zu Veränderungen der extrazellulären Ionenkonzentration führen müsste, wurden in früheren Arbeiten Messungen der extrazellulären K^+ Konzentration durchgeführt. Nach Badapplikation von ATP und α,β -me-ATP an isolierte, menschliche Nervenfaszikel des N. suralis waren jedoch keine signifikanten Konzentrationsänderungen feststellbar (Lang 2002).

Ein gänzlich anderes Antwortverhalten ließ sich dagegen an isolierten C-Faseraxonen menschlicher Nn. vagi ermitteln. Die ektonukleotidasestabilen P2X Agonisten α,β -me-ATP, ATP γ S sowie der P2X₃ spezifische Agonist Ap5A zeigten hier deutliche erregbarkeitssteigernde Effekte, während, wie zuvor beschrieben, deren Applikation an Präparaten menschlicher Nn. surales keinerlei Einfluß auf die axonale Erregbarkeit zu haben scheint. Diese Beobachtung steht in Einklang mit früheren Messungen an isolierten N. vagus Präparaten der Ratte (Irnich 2001). In dieser Arbeit konnte auch die erwartete Veränderung der extrazellulären K^+ Konzentration nach Badapplikation von P2X Rezeptor Agonisten gemessen werden (Burgstahler 2001). Das in dieser Dissertation an humanen Vagusfaszikeln ermittelte pharmakologische Profil deutet auf die Präsenz von P2X₃ Rezeptoren bzw. der heteromeren P2X₂/P2X₃ Form hin. Dies ergibt sich aus der Tatsache, daß nach Badapplikation von P2X Rezeptor Agonisten, wie α,β -me-ATP, ATP γ S oder Ap5A eindeutige Effekte messbar waren, die durch TNP-ATP, eine antagonistische Substanz an P2X₁, P2X₃ und P2X₂/P2X₃ Rezeptoren, blockierbar waren. Die unter 4.2.2 gezeigte Reduktion der Amplitude des C-Fasersummenaktionspotentials (C-Faser SAP), nach Gabe von α,β -me-ATP, ist vermutlich auf die Inaktivierung von spannungsabhängigen Na^+ Kanälen, infolge lokaler Depolarisation der axonalen Membran nach P2X Rezeptor Aktivierung, zurückzuführen. Die somit kurzzeitig inaktiven Axone können daher nicht zur Amplitudenbildung des C-Faser SAP beitragen. Der Effekt ist aber dennoch als erregende Wirkung des P2X Rezeptor Agonisten aufzufassen. Aus den Ergebnissen kann jedoch nicht automatisch gefolgert werden, daß C-Faseraxone humaner Nn. surales, im Gegensatz zu Axonen des N. vagus, keine P2X Rezeptoren besitzen. Die Ursache, daß α,β -me-ATP an N. suralis Präparaten keinen Effekt zu haben scheint, liegt möglicherweise darin, daß hier lediglich der schnell desensibilisierende P2X₃ Rezeptor exprimiert wird, an Axonen des N. vagus dagegen eventuell die langsam desensibilisierende heteromultimere P2X₂/P2X₃ Rezeptorform. Im Fall des N. suralis

könnte somit die Badapplikation des Agonisten zu langsam sein, um eine ausreichende Menge an schnell desensibilisierenden P2X Rezeptoren zu aktivieren.

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß auch Schwannzellen durch die Applikation von ATP erregt werden (Fields 2000). Mit den in dieser Dissertation durchgeführten photometrischen Meßmethoden ließen sich nach Badapplikation von ATP rasche Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration beobachten. Die Gabe von Adenosin blieb dagegen ohne meßbaren Effekt. Derartige Wirkungen von ATP und ADP sind für Präparate des *N. suralis* bereits vorbeschrieben (Wächtler 1996). Ebenfalls bekannt ist, daß diese Calciumsignale von Schwannzellen ausgehen und mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Aktivierung membrangebundener P2Y Rezeptoren bedingt sind (Mayer 1998) (Lang 2002). Neu ist dagegen die Beobachtung, daß sich diese Calciumsignale mittels MRS 2179, einem potenten P2Y₁ Rezeptor Antagonisten, fast komplett blockieren lassen. Eine Beteiligung weiterer P2Y Rezeptoren, wie z.B. P2Y₂ ist jedoch möglich, da in früheren Messungen auch UTP, ein P2Y₂ Agonist, kleine Calciumsignale in manchen Faszikeln auszulösen vermochte (Wächtler 1996). Daß die Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration durch Ca²⁺ Influx via aktivierter P2X Rezeptoren bedingt sind, erscheint dabei anhand der Tatsache, daß sich mit MRS 2179 keinerlei Effekte auf die axonale Erregbarkeit erzielen lassen, unwahrscheinlich. Im Gegensatz zu den elektrophysiologischen Messungen konnten bezüglich der Calciumkonzentrationsänderungen keine Unterschiede zwischen *N. suralis* und *N. vagus* beobachtet werden. Ob und in welchem Maße jedoch diese ATP Effekte an Schwannzellen zur Erregung sensibler peripherer Axone beitragen, bleibt weiterhin ungeklärt. Denkbar wäre z.B. die Freisetzung von Neuropeptiden, wie z.B. Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP), die bereits von einigen Autoren nach Aktivierung von P2Y Rezeptoren an Hinterwurzelganglienzellen bzw. in der Dura mater der Ratte beobachtet wurde (Sanada 2002) (Zimmermann 2002).

5.3 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren in der Membran unmyelinisierter menschlicher C-Faseraxone

Schmerzen, die im Rahmen von Neuropathien kleiner Nervenfasern auftreten, sind ein häufiges Krankheitsbild. Sowohl unmyelinisierte Afferenzen als auch Efferenzen sind betroffen. Ursächlich bedeutsam sind dabei vor allem Diabetes mellitus, Amyloidose,

Toxine sowie hereditäre Neuropathien. Ferner werden autoimmune Pathomechanismen für einen Teil der Neuropathien verantwortlich gemacht. Die Schmerzen sind meist diffus bzw. multifokal lokalisiert und mit mehr oder weniger stark ausgeprägten autonomen Störungen assoziiert (Lacomis 2002). Elektrophysiologische Untersuchungen an C-Faseraxonen haben gezeigt, daß eine Sensibilität für Acetylcholin (ACh) sowohl an unmyelinisierten sensorischen Afferenzen als auch an unmyelinisierten sympathischen Efferenzen besteht (Bernardini 2001), (Schmidt 1999). Die Frage, ob ACh-Rezeptoren im Verlauf eines peripheren Nervenstammes funktionell aktiv sind, wird kontrovers diskutiert. Antworten diesbezüglich bleiben weiterhin spekulativ. So führte Diamond im Jahr 1959 einen in vivo Versuch an Hasen durch. Nach intraarterieller Injektion von ACh in Gefäße des N.suralis konnte er jedoch keine Änderung der Erregung von Axonen feststellen. Im Widerspruch hierzu stehen die Beobachtungen dieser Arbeit sowie z.B. der im Jahr 1963 beschriebene direkt depolarisierende Effekt von ACh an unmyelinisierten Axonen isolierter Nn. vagi von Hasen (Armstrong 1963). Eine mögliche Erklärung für diesen scheinbaren Widerspruch in den Beobachtungen könnte sein, daß die Aktivierung von axonalen ACh-Rezeptoren lediglich eine leichte Membrandepolarisation im Sinne einer Erregbarkeitssteigerung bewirkt, diese jedoch nicht stark genug ist, um eigenständig Aktionspotentiale zu generieren. Ferner existiert die Meinung, daß eine Schädigung von Axonen, z.B. im Rahmen der Präparation der Nn. surales bzw. der Nervenfaszikel, zu einer abnormen Chemosensibilität via Integration ungebundener Rezeptoren in die axonale Membran führen könnte (Michaelis 1997). Somit sollte, gemäß dem mit der Zeit fortschreitenden Einbau von Rezeptoren aus dem Zytosol in die axonale Membran, eine zeitabhängige Zunahme der Chemosensibilität zu erwarten sein. In dieser Arbeit konnten jedoch bereits eine Stunde nach Nervenpräparation deutliche Effekte von ACh gemessen werden. Ferner konnte auch 48 Stunden nach Präparation keine Steigerung der ACh Sensibilität nachgewiesen werden, die nach Michaelis et al. zu erwarten gewesen wäre.

Wie bereits im Kapitel 4.3 erwähnt, konnte in dieser Arbeit ein pharmakologisches Profil der, an isolierten menschlichen Nervenfaszikeln vorkommenden nikotinischen ACh-Rezeptoren (nAChR), erstellt werden. Die mögliche pentamere Zusammensetzung der Untereinheiten, der an peripheren menschlichen Nervenfaszikeln vorkommenden nAChR, kann anhand des gewonnenen Konzentrationswirkungsprofils ermittelt werden. An HEK293 Zellen, die mit humanen $\alpha 2\beta 4$ oder $\alpha 4\beta 4$ nAChR Kombinationen

transfiziert wurden, erzeugte Cytisin deutlich stärkere Effekte als DMPP (Stauderman 1998). Ein genau umgekehrtes Verhalten konnte dagegen an humanen C-Faseraxonen festgestellt werden. Hier zeigte DMPP eine höhere Wirkungspotenz als Cytisin. Eine solch hohe DMPP Sensibilität ist für Zellen, die vornehmlich humane $\alpha 3$ und $\beta 2$ bzw. $\beta 4$ Untereinheiten exprimieren, in der Literatur beschrieben (Stauderman 1998), (Chavez-Noriega 2000). Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, daß 5-Iodo-A-85380, ein an $\alpha 4\beta 2$ Untereinheiten gegenüber Epibatidin annähernd gleichpotenter Agonist, etwa 10^2 fach schwächer wirksam war als Epibatidin, spricht ebenfalls gegen eine wesentliche Beteiligung von $\alpha 2$ bzw. $\alpha 4$ Untereinheiten an nAChRs humaner C-Faseraxone. Weitere Erkenntnisse wurden durch den Einsatz von Antagonisten gewonnen. In den Versuchen dieser Arbeit erwies sich Mecamylamin in der Antagonisierung Epibatidin induzierter Erregbarkeitssteigerungen deutlich potenter als DH β E. Diese für $\alpha 3$ und gegen das Vorhandensein von $\alpha 4$ Untereinheiten sprechende Beobachtung ist vereinbar mit früheren Arbeiten (Chavez-Noriega 2000). Ferner sei an dieser Stelle angemerkt, daß DH β E an $\alpha 3\beta 4$ Kombinationen schwächer antagonistisch wirksam ist als an $\alpha 3\beta 2$ Kombinationen (Harvey 1996).

Begleitend zu den elektrophysiologisch gewonnenen Erkenntnissen dieser Arbeit konnte von einer weiteren Arbeitsgruppe des Instituts der immunhistochemische Nachweis von $\alpha 3$ und $\alpha 5$ Untereinheiten an menschlichen C-Faseraxonen geführt werden. In Kryoschnitten eines humanen N. suralis konnte eine Kollokalisierung von $\alpha 3$ und $\alpha 5$ Untereinheiten mit Peripherin aufgezeigt werden. Peripherin gilt dabei als immunhistochemischer Marker für unmyelinisierte Axone. Ein Teil der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -positiven Axone wies zudem eine Immunreaktivität für Thyrosinhydroxylase auf, ein Markerenzym für sympathische Axone (Lang 2003), (Sippel 2005). Der pharmakologische Einfluß von $\alpha 5$ Untereinheiten läßt sich allerdings, aufgrund fehlender Spezifität verfügbarer Agonisten, nicht weiter differenzieren. Ferner findet man in der Literatur, daß die Transfektion von $\alpha 3\beta 4$ bzw. $\alpha 3\beta 2$ Zelllinien mit der $\alpha 5$ Untereinheit keinen signifikanten Einfluß auf das Agonistenwirkungsprofil zur Folge hat (Nelson 2001). Ein Nachweis von $\alpha 5$ Untereinheiten mit pharmakologischen Methoden war daher nicht möglich.

Des weiteren existiert eine Arbeit aus dem Jahr 2001, die an kultivierten Hinterwurzelganglienzellen postnataler Ratten durchgeführt wurde. Diese Arbeit kommt zu dem Ergebnis, daß $\alpha 7$ Untereinheiten, in 77% der Fälle mit Nikotinbedingten-Effekten an großen Hinterwurzelganglienneuronen sowie in 32% der Fälle

mit Nikotin-bedingten-Effekten an kleinen Hinterwurzelganglienzellen, beteiligt sind (Genzen 2001). Ferner konnte gezeigt werden, daß $\alpha 7$ Untereinheiten Bestandteile von nAChRs auf Capsaicin sensiblen unmyelinisierten Hinterwurzelganglienzellen der Ratte sind (Rau 2004). Eine Beteiligung von $\alpha 7$ Untereinheiten an nAChRs menschlicher C-Faseraxone konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht ermittelt werden. Zum einen fehlt hierfür eine deutliche Aktivierung nach Applikation von Cholin. Zum anderen bleibt die gemäß des K_D Wertes (vgl. Tab. 5 Kapitel 2.2.3) zu erwartende antagonistische Wirkung bereits geringer MLA Konzentrationen aus. Dennoch kann aus den nachfolgenden zwei Gründen eine mögliche Beteiligung von $\alpha 7$ Untereinheiten an nAChRs menschlicher C-Faseraxone nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Erstens ist bekannt, daß nAChRs mit $\alpha 7$ Untereinheiten sehr rasch nach ACh Kontakt desensibilisieren. Die verwendete Badapplikation des Agonisten könnte somit zu langsam sein, um eine ausreichende Agonistenkonzentrationen herzustellen. Zweitens sind Veränderungen des Expressionsmusters von nAChR Untereinheiten im Verlauf der Entwicklung eines Lebewesens beschrieben (Zoli 1995). Dies könnte ebenfalls die Unterschiede zwischen Hinterwurzelganglienzellen postnataler Ratten und den Axonen erwachsener Menschen erklären. Eine Beteiligung von $\alpha 9$ und $\alpha 10$ Untereinheiten an nAChRs menschlicher C-Faseraxone erscheint anhand des in dieser Arbeit gewonnenen pharmakologischen Profils unwahrscheinlich, wenn auch in der Literatur die Expression von $\alpha 9$ und $\alpha 10$ Untereinheiten an Hinterwurzelganglienzellen der Ratte beschrieben wurde (Lips 2002).

Durch den in dieser Arbeit geführten Nachweis von nAChRs im Verlauf peripherer unmyelinisierter menschlicher Nervenstämmen stellen sich jedoch einige Fragen. So z.B. die nach der weiterhin unklaren Funktion axonal lokalisierter nikotischer ACh Chemorezeptoren (Lang 2003). Ein Grund, warum derzeit eine Beantwortung dieser Frage nicht erfolgen kann, ist, daß mögliche Quellen für die Freisetzung von ACh im Bereich peripherer Nervenstämmen bisher noch nicht identifiziert wurden. Denkbar wären hier z.B. den Nervenstamm umgebende Schwannzellen (Dennis 1974), Fibroblasten, Keratinozyten (Sharma 2002) (Sawynok 2003) oder Endothelzellen (Macklin 1998). Des Weiteren ist auch die Rolle von ACh bei der Aktivierung unmyelinisierter Axone unter normalen oder pathologischen Bedingungen ungeklärt (Carr 1996). Vorstellbar wäre jedoch, daß von den zuvor genannten Zellen in der Umgebung des peripheren Nervenstammes freigesetztes ACh zur ektopen axonalen

Erregungsbildung im Rahmen entzündlicher oder neuropathischer schmerzhafter Zustände beiträgt (Scholz 2002). Dieser ektopen Bildung von Aktionspotentialen, via Fehlsteuerung spannungsabhängiger oder ligandenaktivierbarer Ionenkanäle, wird derzeit eine Schlüsselrolle in der Entstehung neuropathischen Schmerzes zugeschrieben. Anhand solcher Theorien, verbunden mit einer Reihe von Beobachtungen, erscheinen nAChRs sowie muskarinerge ACh Rezeptoren derzeit als mögliche, neuartige Ziele analgetischer Therapien (Sawynok 2003). So z.B. die Beobachtung, daß die Applikation nikotinischer Agonisten auf orale Schleimhäute initial als schmerzhaft empfunden wird, sich nach wiederholter Gabe jedoch, vermutlich infolge Rezeptordesensibilisierung, eine Analgesie einstellt (Dessirier 1997). Die intraartikuläre Injektion des Acetylcholinesteraseinhibitors Neostigmin in entzündlich veränderte Kniegelenke von Ratten erzeugte bei diesen eine geringere mechanische Hyperalgesie. Ferner konnte bei Patienten nach Knieoperationen mittels intraartikulärer Injektion von Neostigmin eine zumindest partielle Analgesie erzielt werden (Sawynok 2003). Neben der Verwendung von Acetylcholinesteraseinhibitoren könnten in Zukunft jedoch auch ACh Rezeptor Antagonisten eine mögliche analgetische Therapieoption darstellen.

Aktuell sind hierbei Conotoxine von besonderem Interesse. Diese aus 12 bis 30 Aminosäuren aufgebauten und somit ungewöhnlich kleinen Peptide lassen sich aus dem Gift von Kegelschnecken (Genus: conus) isolieren (Alonso 2003). Circa 500 verschiedene Spezies dieser Schnecken sind derzeit bekannt. Ihr Hauptverbreitungsgebiet liegt in den warmen Gewässern des pazifischen Ozeans. Jede Schneckenspezies besitzt dabei ihr eigenes artspezifisches Conotoxin, woraus sich ein großes Repertoire an chemisch unterschiedlichen Substanzen ergibt. Anhand ihrer molekularen Struktur lassen sich Conotoxine in die zwei Hauptgruppen, Disulfidbrücken-reich und Disulfidbrücken-arm, unterteilen. Einen Überblick hierfür liefert Abb. 27. Das therapeutische Potential dieser Peptide wird derzeit in einer Vielzahl an klinischen und präklinischen Studien untersucht. Am weitesten fortgeschritten sind dabei Untersuchungen mit ω -Conotoxinen, die mit hoher Spezifität N-Typ Calciumkanäle blockieren. So konnte in den USA für das ω -Conotoxin MVIIA (Ziconotide, Handelsname: Prialt) die von der „United States Food and Drug Administration“ zu erteilende Zulassung als Analgetikum erreicht werden (Terlau 2004). Weitere Substanzen, wie das ω -Conotoxin CVID aus dem Gift von *Conus catus*, sollen diesem Beispiel folgen. Anhand von in vivo Experimenten mit Ratten konnte für das neue aus 16 Aminosäuren aufgebaute α -Conotoxin Vc1.1 (andere Bezeichnung

ACV1) gezeigt werden, daß sich die Erregung sensorischer Nervenfasern selektiv unterdrücken ließ (Sandall 2003). ACV1 wurde daher bereits als mögliche analgetische Substanz in der Therapie neuropathischer Schmerzen vorgeschlagen (Alonso 2003). Die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführte Überprüfung, ob ACV1 an nAChRs in der Membran unmyelinisierter menschlicher peripherer Nerven antagonistisch wirksam ist, stellt somit einen weiteren Baustein auf dem Weg zu einer eventuellen neuartigen Analgetikagruppe dar.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, daß ACV1 ein Antagonist an nAChRs mit Lokalisation in der Membran unmyelinisierter menschlicher Axone ist. Die effektivste ACV1 Konzentration betrug dabei 10 μM . Im Vergleich mit anderen Arbeiten ist diese Konzentration deutlich höher. So konnte z.B. mit einer ACV1 Konzentration von 1 μM eine blockierende Wirkung an chromaffinen Zellen von Rindern und Ratten mit einer nAChR Untereinheitenkombination aus $\alpha 3$, $\alpha 5$ und β beobachtet werden (Sandall 2003). Im Rahmen von in vivo Untersuchungen der peripheren Nervenfunktion an Ratten konnte bereits eine ACV1 Konzentration von 0,1 μM die im Sinne eines Axonreflexes zu erwartende Gefäßreaktion nach selektiver Stimulierung unmyelinisierter sensorischer Nervenaxone unterdrücken (Sandall 2003). Da nur unmyelinisierte Axone vasoaktive Substanzen wie CGRP oder Substanz P enthalten, kann man anhand der vaskulären Reaktion, wie z.B. Hautrötung, auf die C-Faserfunktion Rückschlüsse stellen. Die in dieser Arbeit eingesetzten, mit 10 μM relativ hohen, ACV1 Konzentrationen könnten durch den experimentellen Aufbau bedingt sein. Möglicherweise ist die Diffusion von Substanzen in den intakten Nervenfaszikel begrenzt, so daß die erreichten Gewebekonzentrationen deutlich unter den Konzentrationen der Badlösung liegen dürften.

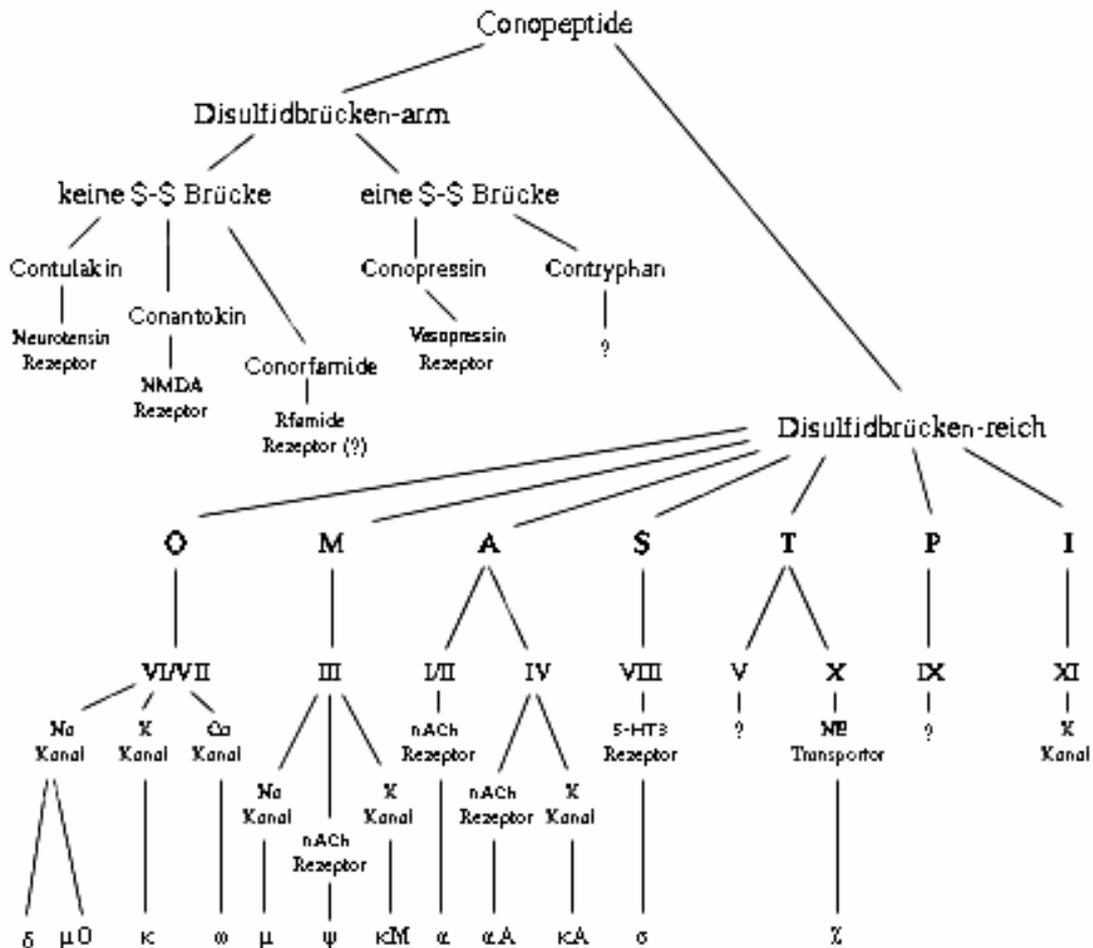


Abbildung 27

Einteilung der Conotoxine. Hervorgehoben sind die beiden Hauptfamilien der Conopeptide: Disulfidbrücken-arm und Disulfidbrücken-reich. Ferner sind Unterfamilien sowie die jeweiligen Zielstrukturen angegeben über die die Toxinwirkung vermittelt wird. Die griechischen Buchstaben kennzeichnen die einzelnen Conotoxinfamilien der Disulfidbrücken-reichen Conopeptide (Abb. modifiziert aus Terlau 2004).

Wie bereits zuvor erwähnt, besteht eine Sensibilität für Acetylcholin (ACh) sowohl an unmyelinisierten sensorischen Afferenzen als auch an unmyelinisierten sympathischen Efferenzen. Beiden Systemen wird derzeit eine mögliche Rolle in der Pathogenese neuropathischen Schmerzes zugesprochen. So konnte z.B. eine erhöhte Dichte sympathischer Axone in N. suralis Biopsien von Patienten mit neuropathischen Schmerzen nachgewiesen werden. Diese Dichte zeigte zudem eine positive Korrelation zu den von den Patienten angegebenen Schmerzen (Bickel 2000). Sympathische Efferenzen scheinen auch für einen Teil der Patienten mit Komplexem Regionalem Schmerzsyndrom (CRPS) von Bedeutung zu sein. In diesem Fall wird auch von CRPS

mit sympathikusabhängigem Schmerz (SMP) gesprochen (Treede 1998). Pathophysiologisch könnte dem CRPS mit SMP eine Überempfindlichkeit sensorischer Afferenzen gegenüber adrenergen sympathischen Transmittersubstanzen zugrunde liegen. Die Erregung sympathischer Efferenzen könnte somit zu einer abnormen Erregung sensorischer Afferenzen via axonaler membrangebundener adrenerger Rezeptoren führen. Hinweise für die Anwesenheit von nAChRs auf sensorischen Afferenzen stammen z.B. aus der Beobachtung, daß menschliche Probanden nach intradermaler Applikation von ACh über Schmerzen klagen (Schmelz 2003). Zudem erzeugt ACh über den oben beschriebenen Axonreflex eine deutliche Hautrötung, die auf der Freisetzung vasoaktiver Substanzen aus sensorischen Afferenzen beruht (Parkhouse 1988). Ferner könnte eine gesteigerte Expression von $\alpha 3$ und $\alpha 5$ nAChR Untereinheiten zur mechanischen Hypersensibilität mit verantwortlich sein, die sich typischerweise nach experimenteller Nervenligatur als Model für Neuropathien einstellt (Vincler 2004).

Über welche Wege die analgetische Wirkung von ACV1 zustande kommt, sei es die Blockade von nAChRs auf sensorischen Afferenzen und/oder sympathischen Efferenzen, bleibt derzeit jedoch unklar. Festzuhalten bleibt, daß eine nAChR vermittelte axonale Erregbarkeitssteigerung zur ektopten Aktionspotentialbildung im Rahmen neuropathischen Schmerzes beitragen könnte. nAChR Antagonisten wie ACV1 könnten diese pathologische Erregungsbildung reduzieren. Zugleich wäre eine Reduktion inflammatorischer Begleitzustände durch eine ACV1 bedingte Unterdrückung der Freisetzung vasoaktiver Substanzen, im Rahmen des Axonreflexes, denkbar. Ferner ließe sich durch Blockierung von nAChRs der ACh induzierte Ca^{2+} Influx reduzieren. Dies könnte einer möglichen Rezeptorsensibilisierung vorbeugen (Lang 2005).

5.4 Axonale Chemosensibilität und neuropathischer Schmerz

Als grundlegendes Substrat neuropathischen Schmerzes wird eine gesteigerte elektrische Erregbarkeit sensorischer Neurone sowie das Auftreten ektopter repetitiver Erregungen vermutet (vgl. Kapitel 2.1.2). Die Tatsache, daß periphere Axone auch in ihrem Verlauf, unter Umständen fern von sensiblen Hautarealen, eine Chemosensibilität besitzen, läßt dabei die axonale Membran von Interesse erscheinen.

Neben Nervenläsionen, Dysmyelinisierung und Veränderungen im Expressionsmuster spannungsabhängiger axonaler Ionenkanäle (vgl. Kapitel 2.1.2) wäre auch eine abnorme Chemosensibilität unmyelinisierter Axone als ein Faktor denkbar, der zu neuropathischen Schmerzen führt. Untermuert wird diese letztgenannte Vermutung z.B. durch die derzeitige Vorstellung der Pathologie, die dem CRPS mit SMP zugrunde liegt (vgl. Kapitel 2.1.2.2). Hier wird z.B. eine gesteigerte Katecholaminsensibilität auf Seiten sensorischer Afferenzen vermutet.

In anderen Krankheitsbildern des neuropathischen Formenkreises könnten geschädigte Nervenfasern zu einer Anreicherung des extrazellulären Milieus mit Inhaltsstoffen des Zytosols wie z.B. ATP führen. In diesem Zusammenhang könnte auch die Freisetzung von Acetylcholin von Bedeutung sein (vgl. Kapitel 5.3). Diese Substanzen könnten Nervenfasern durch axonale Chemorezeptoren erregen und eine gesteigerte Aktivität bewirken. Denkbar wäre daher aber auch, daß ektope Aktivität nicht ausschließlich in den primär geschädigten Axonen auftritt, sondern auch zu einer erhöhten Aktivität in benachbarten intakten Axonen führt (Moalem 2005).

Abschließend bleibt festzustellen, daß die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu einem neuen Verständnis der Funktion der axonalen Membran beitragen. Diese weist keinesfalls, wie lange Zeit angenommen, lediglich konduktorische Eigenschaften auf. Eine bessere Kenntnis der axonalen Chemosensibilität und somit von Rezeptoren der Membran von C-Faseraxonen könnte in Zukunft neue Wege in der Therapie neuropathischer Schmerzen eröffnen.

6. Zusammenfassung

Die Pathophysiologie von neuropathischen Schmerzen ist noch weitgehend unverstanden. Es ist jedoch anzunehmen, daß Verletzung und Entzündung im Stamm eines peripheren Nervens zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren oder Inhaltsstoffen des Zytosols führt und auf diese Weise ektope Erregungen entstehen könnten. In der vorliegenden Arbeit wurde mit funktionellen Tests untersucht, ob die axonale Membran dünner unmyelinisierter Nervenfasern in isolierten Segmenten menschlicher Nervenpräparate Rezeptoren für derartige Substanzen besitzt.

Dünne Nervenfasern sind für intrazelluläre elektrophysiologische Ableittechniken nicht zugänglich. In den Untersuchungen wurde deshalb eine Kombination von extrazellulärer elektrophysiologischer Erregbarkeitsanalyse und einer photometrischen Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration eingesetzt.

Die Daten zeigen, daß Capsaicin axonale Anstiege der intrazellulären Calciumkonzentration vermittelt. Dies war mit einem zumeist irreversiblen Abfall der Amplitude des C-Faser Summenaktionspotentials verbunden. Die durch Capsaicin bedingten Effekte konnten mit dem TRPV1 Rezeptor Antagonisten Capsazepin antagonisiert werden.

ATP erhöht die axonale Erregbarkeit von C-Faseraxonen. An Nervenfasern des N. suralis dürfte die erregbarkeitssteigernde Wirkung am ehesten über Adenosin Rezeptoren (A_2) nach vorangegangener Hydrolyse von ATP erfolgen. Die ATP Effekte an N. vagus Präparaten sind dagegen mit hoher Wahrscheinlichkeit durch die Aktivierung von $P2X_3$ bzw. $P2X_2/P2X_3$ Rezeptoren bedingt. ATP vermittelte intrazelluläre Calciumkonzentrationsanstiege erfolgen der Datenlage nach via $P2Y_1$ Rezeptoren und finden mit hoher Wahrscheinlichkeit in Schwannzellen statt. Hierbei ließen sich keinerlei Unterschiede zwischen N. suralis und N. vagus feststellen.

Die Charakterisierung des neuronalen nikotinischen Acetylcholinrezeptors (nAChR) in der Membran unmyelinisierter menschlicher C-Faseraxone wurde durch die Erstellung von pharmakologischen Profilen für spezifische Rezeptoragonisten bzw. – antagonist durchgeföhrt. Ein Vergleich mit beschriebenen Befunden an exprimierten Rezeptorstrukturen ergab, daß für periphere unmyelinisierte Axone des Menschen überwiegend die Rezeptoruntereinheiten α_3 , α_5 , β_2 sowie β_4 an der Komposition des pentamer aufgebauten neuronalen nAChR beteiligt sind. Ferner konnte gezeigt werden, daß das

neuartige α -Conotoxin Vc1.1 an humanen nAChR in der axonalen Membran unmyelinisierter peripherer Axone antagonistisch wirksam ist.

Der Nachweis von Chemosensibilität der axonalen Membran von dünnen nozizeptiven Nervenfasern erweitert das Verständnis der Pathophysiologie von neuropathischen Schmerzen. Bisher wurde angenommen, daß die pathologische ektopische Erregung nur an verletzten Nervenfasern auftritt. Die vorgestellten Befunde zeigen, daß auch intakte nozizeptive Axone in der Nachbarschaft von geschädigten Fasern durch das extrazelluläre Entzündungsmilieu in ihrer Erregbarkeit verändert werden könnten.

Der Befund, daß das neuartige α -Conotoxin Vc1.1 an isolierten menschlichen C-Faseraxonen antagonistisch wirksam ist, könnte neuartige Strategien in der Therapie neuropathischer Schmerzen ermöglichen.

7. Quellenverzeichnis

- Ali Z, Meyer RA, Campbell JN 1996 Secondary hyperalgesia to mechanical but not to heat stimuli following a capsaicin injection in hairy skin. *Pain* 68: 401-411
- Alonso D, Khalil Z, Satkunanathan N, Livett BG 2003 Drugs from the sea: conotoxins as drug leads for neuropathic pain and other neurological conditions. *Mini Review of Medical Chemistry* 3(7): 785-787
- Arnett CJ, Ritchie JM 1963 The ionic requirements for the action of acetylcholine on mammalian non-myelinated fibres. *Journal of Physiology* 165: 141-159
- Babes A, Reid G 2003 Ion channels involved in cold transduction and cold nociception. *Pain in Europe IV book of abstracts*: 19
- Baker M, Bostock H 1992 Ectopic activity in demyelinated spinal root axons of the rat. *Journal of Physiology (London)* 451: 539-552
- Bean BP 1992 Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels. *Trends in Pharmacological Sciences* 13: 87-90
- Benarroch EE, Low PA 1991 The acetylcholine-induced flare response in evaluation of small fiber dysfunction. *Annals of Neurology* 29: 590-595
- Benham CD, Davis JB, Randall AD 2002 Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* 42: 873-888
- Bernardini N, Sauer SK, Haberberger R, Fischer MJ, Reeh PW 2001 Excitatory nicotinic and desensitizing muscarinic (M2) effects on C-nociceptors in isolated rat skin. *Journal of Neuroscience* 21: 3295-3302
- Bickel A, Butz M, Schmelz M, Handwerker HO, Neundörfer B 2000 Density of sympathetic axons in sural nerve biopsies of neuropathy patients is related to painfulness. *Pain* 84: 413-419
- Birklein F 2003 Neurogenic inflammation in complex regional pain syndrome (CRPS). *Pain in Europe IV book of abstracts*: 58
- Black JA, Felts P, Smith KJ, Kocsis JD, Waxman SG 1991 Distribution of sodium channels in chronically demyelinated spinal cord axons: immuno-ultrastructural localization and electro-physiological observations. *Brain Research* 544: 59-70
- Bleehen T, Keele CA 1977 Observations on the algogenic actions of adenosine compounds on the human blister base preparation. *Pain* 3: 367-377
- Bley KR 2003 *Advances in Localized Management of Neuropathic Pain*. NeurogesX
- Böcker W, Denk H, Heitz PU 2001 *Pathologie 2. Auflage* Urban & Fischer Verlag

- Braun N, Sevigny J, Robson SC, Zimmermann H 2001 Expression of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2 (NTPDase 2) in non-myelinating Schwann cells. *Society of Neuroscience Abstracts* 27: 157.10
- Brismar T, Gilly WF 1987 Synthesis of sodium channels in the cell bodies of squid giant axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84: 1459-1463
- Burgstahler R, Grafe P 2001 Diadenosine pentaphosphate is more potent than ATP at P2X receptors in isolated rat vagus nerve. *Neuroreport* 12: 679-682
- Burnstock G 1996 A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *Lancet* 347: 1604-1605
- Calvin WH, Devor M, Howe J 1982 Can neuralgias arise from minor demyelination? Spontaneous firing, mechanosensitivity and afterdischarge from conducting axons. *Experimental Neurology* 75: 755-763
- Carr RW, Proske U 1996 Action of cholinesterases on sensory nerve endings in skin and muscle. *Clinical Experimental Pharmacology and Physiology* 23: 355-362
- Caselli A, Uccioli L, Khaodhjar L, Veves A 2003 Local anesthesia reduces the maximal skin vasodilation during iontophoresis of sodium nitroprusside and heating. *Microvascular Research* 66: 134-139
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D 1997 The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-824
- Chard PS, Bleakman D, Savidge JR, Miller RJ 1995 Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: Involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience* 65: 1099-1108
- Chavez-Noriega LE, Gillespie A, Stauderman KA, Crona JH, Claeps BO, Elliott KJ, Reid RT, Rao TS, Velicelebi G, Harpold MM, Johnson EC, Corey-Naeve J 2000 Characterization of the recombinant human neuronal nicotinic acetylcholine receptors $\alpha 3\beta 2$ and $\alpha 4\beta 2$ stably expressed in HEK293 cells. *Neuropharmacology* 39: 2543-2560
- Chen CC, Akoplan AN, Sivilotti L, Colquhoun D, Burnstock G, Wood JN 1995 A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377: 428-431
- Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D 2001 Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P₂-mediated inhibition. *Nature* 411: 957-962

- Connor JA, Stevens CF 1971 Prediction of repetitive firing behaviour from voltage clamp data on an isolated neurone soma. *Journal of Physiology* 213: 31-52
- Corringer PJ, Le Novère N, Changeux JP 2000 Nicotinic receptors at the amino acid level 40: 431-458
- Dasgupta P, Fowler CJ 1997 Chillies: From antiquity to urology. *British Journal of Urology* 80: 845-852
- Davis KD, Meyer RA, Campbell JN 1993 Chemosensitivity and sensitization of nociceptive afferents that innervate the hairy skin of monkey. *Journal of Neurophysiology* 69: 1071-1081
- Dennis MJ, Miledi R 1974 Electrically induced release of acetylcholine from denervated Schwann cells. *Journal of Physiology* 237: 431-452
- Dessirier JM, O'Mahony M, Carstens E 1997 Oral irritant effects of nicotine: psychophysical evidence for decreased sensation following repeated application and lack of cross-desensitization with capsaicin. *Chemical Senses* 22: 483-492
- Diener HCH, Maier CH 1997 *Das Schmerz Therapie Buch* Urban & Schwarzenberg
- Drummond PD, Skipworth S, Finch PM 1996 α_1 -Adrenoceptors in normal and hyperalgesic human skin. *Clinical Science* 91: 73-77
- England JD, Gamboni F, Levinson SR 1991 Increased numbers of sodium channels form along demyelinated axons. *Brain Research* 548: 334-337
- England JD, Happel LT, Kline DG 1996 Sodium channel accumulation in humans with painful neuromas. *Neurology* 47: 272-276
- Everill B, Kocsis JD 1998 Effect of nerve growth factor on potassium conductance after nerve injury in adult cutaneous afferent dorsal root ganglion neurons. *Society of Neuroscience Abstracts* 24: 1332
- Fields RD, Stevens B 2000 ATP: an extracellular signalling molecule between neurons and glia. *Trends in Neuroscience* 23: 625-633
- Fowler JC, Greene R, Weinreich D 1985 Two calcium-sensitive spike after-hyperpolarization in visceral sensory neurones of the rabbit. *Journal of Physiology* 365: 59-75
- Fredholm BB, Burnstock G, Harden KT, Spedding M 1996 Receptor nomenclature. *Drug Development Research* 39: 461-466
- Fried K, Govrin-Lippmann R, Devor M 1993 Close apposition among neighbouring axonal endings in a neuroma. *Journal of Neurocytology* 22: 663-681

- Fuchs PN, Pappagallo M, Meyer RA 1999 Topical EMLA pre-treatment fails to decrease the pain induced by 1% topical capsaicin. *Pain* 80: 637-642
- Gamse R, Petsche U, Lembeck F, Jancsó G 1982 Capsaicin applied to the peripheral nerve inhibits axoplasmatic transport of substance P and somatostatin. *Brain Research* 238: 447-462
- Gehling M, Tryba M, Niebergall H, Hufschmidt A, Schild M, Geiger K 2003 Komplexe regionale Schmerzsyndrome CRPS I und II. *Schmerz* 17: 309-316
- Genzen JR, Van Cleve W, Mc Gehee DS 2001 Dorsal root ganglion neurons express multiple nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Journal of Neurophysiology* 86: 1773-1782
- Grafe P, Quasthoff S, Grosskreutz J, Alzheimer C 1997 Function of the hyperpolarization-activated inward rectification in non-myelinated peripheral rat and human axons. *Journal of Neurophysiology* 77: 421-426
- Grutter T, Changeux JP 2001 Nicotinic receptors in wonderland. *Trends in Biochemical Sciences* 26: 459-463
- Gunthorpe MJ, Benham CD, Randall A, Davis JB 2002 The diversity in the vanilloid (TRPV) receptor family of ion channels. *Trends in Pharmacological Sciences* 23: 183-191
- Hamilton SG, Warburton J, Bhattacharjee A, Ward J, McMahon SB 2000 ATP in human skin elicits a dose-related pain response which is potentiated under conditions of hyperalgesia. *Brain Research* 123: 1238-1246
- Harvey SC, Luetje CW 1996 Determinants of competitive antagonist sensitivity on neuronal nicotinic receptor β subunits. *Journal of Neuroscience* 16: 3798-3806
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB 2000 Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88: 205-215
- Holton FA, Holton P 1953 The possibility that ATP is a transmitter at sensory nerve endings. *Journal of Physiology (London)* 119: 50-51
- Holton P 1959 The liberation of ATP on antidromic stimulation of sensory nerves. *Journal of Physiology (London)* 145: 494-504

- Holzer P 1988 Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: Involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 24: 739-768
- Holzer P 1991 Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacology reviews* 43: 143-201
- Honore P, Mikusa J, Bianchi B, McDonald H, Cartmell J, Faltynek C, Jarvis M-F 2002 TNP-ATP, a potent P2X₃ receptor antagonist, blocks acetic acid-induced abdominal constriction in mice: comparison with reference analgesics. *Pain* 96: 99-105
- Hwang SW, Cho H, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Jung J, Cho S, Min KH, Suh YG, Kim D, Oh U 2000. Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substances. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 6155-6160
- Irnich D, Burgstahler R, Bostock H, Grafe P 2001 ATP affects both axons and Schwann cells of unmyelinated C fibres. *Pain* 92: 343-350
- Irnich D, Tracey DJ, Polten J, Burgstahler R, Grafe P 2002 ATP stimulates peripheral axons in human, rat and mouse – differential involvement of A_{2B} adenosine and P2X purinergic receptors. *Neuroscience* 110: 123-129
- Jänig W, Levine JD, Michaelis M 1996 Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. In Kumazawa T, Kruger L, Mizumura K (eds.) *The polymodal receptors Gateway to Pathological pain*. Elsevier Science, Amsterdam S. 161-184
- Jänig W, Stanton-Hicks M 1996 Reflex sympathetic dystrophy – a reappraisal. IASP, Seattle
- Jahr CE, Jessell TM 1983 ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature* 304: 730-733
- Jahr CE, Jessell TM 1983 ATP excites a subpopulation of rat dorsal horn neurones. *Nature* 304: 730-733
- Johansson B, Halldner L, Dunwiddie TV, Masino SA, Poelchen W, Gimenez-Llort L, Escorihuela RM, Fernandez-Teruel A, Wiesenfeld-Hallin Z, Xu XJ, Hardemark A, Betsholtz C, Herlenius E, Fredholm BB 2001 Hyperalgesia, anxiety, and decreased hypoxic neuroprotection in mice lacking the adenosine A₁ receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98: 9407-9412

- Jordt SE, Tominaga M, Julius D 2000 Acid potentiation of the capsaicin receptor determined by a key extracellular site. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 8134-8139
- Julius D, Basbaum AI 2001 Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413: 203-210
- Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, Kim D, Oh U 1999 Capsaicin Binds to the Intracellular Domain of the Capsaicin-Activated Ion Channel. *The Journal of Neuroscience* 19: 529-538
- Jung J, Hwang SW, Kwak J, Lee SY, Kang CJ, Kim WB, Kim D, Oh U 1999 Capsaicin Binds to the Intracellular Domain of the Capsaicin-Activated Ion Channel. *The Journal of Neuroscience* 19: 529-538
- Katz N, Simone D, Julius D 2003 Neuropathic Pain Emerging Role of VR1 Receptor Agonists. *Topical High-Concentration Capsaicin: Prospects for Treatment of Peripheral Neuropathic Pain. 4th Congress of the European Federation of IASP Chapters (EFIC)*
- King BF, Townsend N 2003 Nucleotide and Nucleoside Receptors. *Tocris Reviews* No. 23
- Lacomis D 2002 Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 26: 173-188
- Lang PM, Burgstahler R, Haberberger RV, Sippel W, Grafe P 2005 A Conus Peptide Blocks Nicotinic Receptors of Unmyelinated Axons in Human Nerve. *NeuroReport*
- Lang PM, Burgstahler R, Sippel W, Irnich D, Schlotter-Weigel B, Grafe P 2003 Characterization of Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors in the Membrane of Unmyelinated Human C-Fiber Axons by In Vitro Studies. *Journal of Neurophysiology* 90: 3295-3303
- Lang PM, Sippel W, Schmidbauer S, Irnich D, Grafe P 2003 Functional Evidence for P2X Receptors in Isolated Human Vagus Nerve. *Anaesthesiology* 99: 232-235
- Lang PM, Tracey DJ, Irnich D, Sippel W, Grafe P 2002 Activation of adenosine and P2Y receptors by ATP in human peripheral nerve. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 366: 449-457
- Lao LJ, Kumamoto E, Luo C, Furue H, Yoshimura M 2001 Adenosine inhibits excitatory transmission to substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord through the activation of presynaptic A1 adenosine receptor. *Pain* 94: 315-324

- Ledent C, Vaugeois JM, Schiffmann SN, Pedrazzini T, El Yacoubi M, Vanderhaeghen JJ, Costentin J, Heath JK, Vassart G, Parmentier M 1997 Aggressiveness, hypoalgesia and high blood pressure in mice lacking the adenosine A_{2A} receptor. *Nature* 388: 674-678
- Linden J, Thai T, Figler H, Jin X, Robeva AS 1999 Characterization of human A(2B) adenosine receptors: radioligand binding, western blotting, and coupling to G(q) in human embryonic kidney 293 cells and HMC-1 mast cells. *Molecular Pharmacology* 56: 705-713
- Lips KS, Pfeil U, Kummer W 2002 Coexpression of α 9 and α 10 nicotinic acetylcholine receptors in adult rat trigeminal ganglion neurons. *Neuroscience* 115: 1-5
- Lukas RJ, Changeux JP, Le Novère N, Albuquerque EX, Balfour DJK, Berg DK, Bertrand D, Chiappinelli VA, Clarke PBS, Collins AC, Dani JA, Grady SR, Kellar KJ, Lindstrom JM, Marks MJ, Quik M, Taylor PW, Wonnacott S 1999 International Union of Pharmacology. XX. Current Status of the Nomenclature for Nicotinic Acetylcholine Receptors and Their Subunits. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 51:397-401
- Macklin KD, Maus AD, Pereira EF, Albuquerque EX, Conti-Fine BM 1998 Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 287: 435-439
- Matzner O, Devor M 1987 Contrasting thermal sensitivity of spontaneously active A- and C-fibers in experimental nerv-end neuromas. *Pain* 30: 373-384
- Mayer C, Quasthoff S, Grafe P 1998 Differences in the sensitivity to purinergic stimulation of myelinating and non-myelinating Schwann cells in peripheral human and rat nerve. *Glia* 23: 374-382
- Mayer C, Quasthoff S, Grafe P 1999 Confocal imaging reveals activity-dependent Ca²⁺ transients in nociceptive human C-fibres. *Pain* 81(3): 317-322
- Mayer ML, Westbrook GL 1983 A voltage-clamp analysis of inward (anomalous) rectification in mouse spinal sensory ganglion neurones. *Journal of Physiology* 340: 19-45
- Michaelis M, Vogel C, Blenk KH, Janig W 1997 Algesics excite axotomised afferent nerve fibers within the first hours following nerve transection in rats. *Pain* 72: 347-354

- Moalem G, Grafe P, Tracey JD 2005 Chemical mediators enhance the excitability of unmyelinated sensory axons in normal and injured peripheral nerve of the rat. *Neuroscience* 134: 1399-1411
- Nelson ME, Wang F, Kuryatov A, Choi CH, Gerzanich V, Lindstrom J 2001 Functional properties of human nicotinic AChRs expressed by IMR-32 neuroblastoma cells resemble those of $\alpha 3\beta 4$ AChRs expressed in permanently transfected HEK cells. *Journal of General Physiology* 118: 563-582
- Nordin M, Nystrom B, Wallin U, Hagbarth KE 1984 Ectopic sensory discharges and paresthesia in patients with disorders of peripheral nerves, dorsal roots and dorsal columns. *Pain* 20: 231-245
- Novakovic SD, Kassotakis LC, Oglesby IB, Smith JAM, Eglen RM, Ford APDW, Hunter JC 1999 Immunocytochemical localization of P2X3 purinoceptors in sensory neurons in naive rats and following neuropathic injury. *Pain* 80: 273-282
- Novakovic SD, Tzoumaka E, McGivern JC et al 1998 Distribution of the Tetrodotoxin-resistant sodium channel PN3 in rat sensory neurons in normal and neuropathic conditions. *Journal of Neuroscience* 18: 2174-2187
- Omana-Zapata I, Khabbaz MA, Hunter JC, Clarke DE, Bley KR 1997 Tetrodotoxin inhibits neuropathic ectopic activity in neuromas, dorsal root ganglia and dorsal horn neurons. *Pain* 72: 41-49
- Parkhouse N, Le Quesne PM 1988 Quantitative objective assessment of peripheral nociceptive C fibre function. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 51: 28-34
- Paterson D, Nordberg A 2000 Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progress in Neurobiology* 61: 75-111
- Prescott ED, Julius D 2003 A Modular PIP₂ Binding Site as a Determinant of Capsaicin Receptor Sensitivity. *Science* 300: 1284-1288
- Ralevic V, Burnstock G 1998 Receptors for Purines and Pyrimidines. *Pharmacological Reviews* 50: 413-492
- Rasminsky M 1978 Ectopic generation of impulses and cross-talk in spinal nerve roots of 'dystrophic' mice. *Annals of Neurology* 3: 351-357
- Rau KK, Johnson RD, Cooper BY 2004 Nicotinic AChR in Subclassified Capsaicin Sensitive and Insensitive Nociceptors of the Rat DRG. *Journal of Neurophysiology*

- Safranov BV, Bischoff U, Vogel W 1996 Single voltage-gated K⁺ channels and their functions in small dorsal root ganglion neurones of the rat. *Journal of Physiology* 493: 393-408
- Sanada M, Yasuda H, Omatsu-Kanbe M, Sango K, Isono T, Matsuura H, Kikkawa R 2002 Increase in the intracellular Ca(2+) and calcitonin gene-related peptide release through metabotropic P2Y receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 10: 413-422
- Sandall DW, Satkunanathan N, Keays DA, Polidano MA, Liping X, Pham V 2003 A novel alpha-Conotoxin identified by gene sequencing is active in suppressing the vascular response to selective stimulation of sensory nerves in vivo. *Biochemistry* 42: 6904-6911
- Sauer S, Lang PM, Sippel W, Reeh PW, Grafe P 2003 An increase of the Ca²⁺ concentration in axons but not in Schwann cells induces iCGRP release from peripheral nerve trunk: Sensitisation by methanandamide. *Pflügers Archiv* 445: 94
- Sawynok J 2003 Topical and Peripherally Acting Analgesics. *Pharmacological Reviews* 55: 1-20
- Schmelz M, Schmidt R, Weidner C, Hilliges M, Torebjork ET, Handwerker HO 2003 Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens. *Journal of Neurophysiology* 89: 2441-2448
- Schmidt R, Schmelz M, Bickel A, Weidner C, Reinhardt F, Torebjörk E, Handwerker HO 1999 Time course of acetylcholine-induced sudomotor activation and sweat production in human skin. *Society of Neuroscience Abstract* 25: 189
- Schmidt R, Schmelz M, Ringkamp M, Handwerker HO, Torebjork HE 1997 Innervation territories of mechanically activated C nociceptor units in human skin. *Journal of Neurophysiology* 78: 2641-2648
- Scholz J, Woolf CJ 2002 Can we conquer pain? *Nature Neuroscience* 5 Suppl: 1062-1067
- Sedgwick SG, Smerdon SJ 1999 The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in Biochemical Sciences* 24: 311-316
- Sedgwick SG, Smerdon SJ 1999 The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends in Biochemical Sciences* 24: 311-316
- Sharma G, Vijayaraghavan S 2002 Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells. *Journal of Neurobiology* 53: 524-534

- Sharples CGV, Wonnacott S 2001 Neuronal Nicotinic Receptors. *Tocris Reviews* No.19: 1-11
- Shin J, Cho H, Hwang SW, Jung J, Shin CY, Lee SY, Kim SH, Lee MG, Choi YH, Kim J, Haber NA, Reichling DB, Khasar S, Levine JD, Oh U 2002 Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99: 10150-10155
- Sippel W, Lang PM, Burgstahler R, Haberberger RV, Grafe P 2005 A Conus peptide blocks neuronal nicotinic receptors of unmyelinated axons in human peripheral nerve. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology* 84th Annual Meeting Deutsche Physiologische Gesellschaft
- Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB 2000 The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *British Journal of Pharmacology* 129: 227-230
- Stauderman KA, Mahaffy LS, Akong M, Velicelebi G, Chavez-Noriega LE, Crona JH, Johnson EC, Elliott KJ, Gillespie A, Reid RT, Adams P, Harpold MM, Corey-Naeve J 1998 Characterization of human recombinant neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunit combinations $\alpha 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 4$, and $\alpha 4\beta 4$ stably expressed in HEK293 cells. *Journal of Pharmacological Experiments and Therapies* 284: 777-789
- Szallasi A, Blumberg PM 1996 Vanilloid receptors: New insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain* 68: 195-208
- Szallasi A, Blumberg PM 1999 Vanilloid (Capsaicin) Receptors and Mechanisms. *Pharmacological Reviews* 51: 159-211
- Szolcsányi J 1993 Actions of capsaicin on sensory receptors, in *Capsaicin in the Study of Pain* (Wood JN ed.) pp 1-26, Academic Press San Diego.
- Szolcsányi J, Jancsó-Gábor A, Joó F 1975 Functional and fine structural characteristics of the sensory neuron blocking effect of capsaicin. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 287: 157-163
- Taylor DCM, Pierau FrK, Szolcsányi J 1984 Long-lasting inhibition of horseradish peroxidase (HRP) transport in sensory nerves induced by capsaicin pre-treatment of the receptive field. *Brain Research* 298: 45-49
- Terlau H, Olivera BM 2004 Conus Venoms: a Rich Source of Novel Ion Channel-Targeted Peptides. *Physiology Review* 84: 41-68

- Thieme's Innere Medizin: TIM. 1999 Thieme Verlag
- Tillmann B, Töndury G, Zilles K 1987 Rauber/Kopsch Anatomie des Menschen
Lehrbuch und Atlas Band III Thieme Verlag
- Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann
BE, Basbaum AI, Julius D 1998 The cloned capsaicin receptor integrates
multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21: 531-543
- Treede RD 1998 Pathophysiologie und Diagnostik von sensiblen Störungen bei
sympathikusabhängigen Schmerzen. *Schmerz* 12: 250-260
- Verkhratsky A, Orkand RK, Kettenmann H 1998. Glial calcium: homeostasis and
signaling function. *Physiological Review* 78: 99-141
- Vincler M, Eisenach JC 2004 Plasticity of spinal nicotinic acetylcholine receptors
following spinal nerve ligation. *Neuroscience Research* 48: 139-145
- Wächtler J, Mayer C, Quasthoff S, Adelsberger H, Grafe P 1996 P2 purinoceptor-
mediated intracellular Ca²⁺ transients in human sural nerve. *Neuroreport* 7:
1289-1292
- Wall D, Melzack R 1999 Textbook of pain 4th edn. Churchill Livingstone, Edinburgh
- Watson CPN, Watt-Watson JH 1999 Treatment of neuropathic pain: focus on
antidepressants, opioids and gabapentin. *Pain Research and Management* 4:
168-178
- Waxman SG, Ritchie JM 1985 Organization of ion channels in the myelinated nerve
fiber. *Science* 228: 1502-1507
- Winter J, Bevan S, Campbell EA 1995 Capsaicin and pain mechanisms. *British Journal
of Anaesthesiology* 75: 157-168
- Winter J, Dray A, Wood JN, Yeats JC, Bevan S 1990 Cellular mechanism of action of
resiniferatoxin: A potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Research* 520: 131-
140
- Wood JN, Coote PR, Minhas A, Mullaney I, McNeil M, Burgess GM 1989 Capsaicin-
induced ion fluxes increase cyclic GMP but not cyclic AMP levels in rat sensory
neurons in culture. *Journal of Neurochemistry* 53: 1203-1211
- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-
Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE 2002 TRPV3 is a
calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418: 181-186

- Zimmermann K, Reeh PW, Averbeck B 2002 ATP can enhance the proton-induced CGRP release through P2Y receptors and secondary PGE2 release in isolated rat dura mater. *Pain* 97: 259-265
- Zoli M, Le Novere N, Hill JA Jr, Changeux JP 1995 Developmental regulation of nicotinic ACh receptor subunit mRNAs in the rat central and peripheral nervous systems. *Journal of Neuroscience* 15: 1912-1939
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang HH, Sörgård M, Di Marzo V, Julius D, Högestätt ED 1999 Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400: 452-457

8. Verzeichnis der Publikationen

Lang PM, Burgstahler R, Haberberger RV, Sippel W, Grafe P 2005

A conus peptide blocks nicotinic receptors of unmyelinated axons in human nerves. *Neuroreport*. 16(5): 479-83.

Lang PM, Burgstahler R, Sippel W, Irnich D, Schlotter-Weigel B, Grafe P 2003

Characterization of neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the membrane of unmyelinated human C-fiber axons by in vitro studies. *J Neurophysiol*. Nov; 90(5): 3295-303.

Lang PM, Sippel W, Schmidbauer S, Irnich D, Grafe P 2003

Functional evidence for P2X receptors in isolated human vagus nerve. *Anesthesiology*. Jul; 99(1): 232-5.

Lang PM, Tracey DJ, Irnich D, Sippel W, Grafe P 2002

Activation of adenosine and P2Y receptors by ATP in human peripheral nerve. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. Nov; 366(5): 449-57.

9. Lebenslauf

- geboren am 26.02.1979 in München als Sohn von Frau Edith und Herrn Dr. Karl Otto Sippel.
- 1981 Umzug nach Baierbrunn
- von 1985 bis 1989 Besuch der Grundschule in Baierbrunn
- ab 1989 Besuch des Gymnasiums Icking
- seit 11.06.1996 Mitglied des Bayerischen Roten Kreuz im Kreisverband Bad Tölz Wolfratshausen.
- Bestehen des Abiturs am 26.06.1998. Leistungskurse Chemie und Physik.
- Antritt des Wehrdienstes am 01.07.1998. Grundausbildung mit anschließender Sicherungs- und Wachausbildung in der 6./Gebirgsinstandsetzungsbataillon 8 in Hemau bis 18.09.1998. Danach Versetzung nach München in die 4./Gebirgsinstandsetzungsbataillon 8 und Beendigung des Wehrdienstes am 30.04.1999. Während der Wehrdienstzeit erfolgte, im Rahmen des Berufsförderungsdienstes für Grundwehrdienstleistende, die erfolgreiche Teilnahme an den Kursen „Internet HTML“ und „Objektorientiertes Programmieren mit C++“.
- vom 14.06.1999 bis 31.07.1999 absolvieren eines Praktikums bei der DaimlerChrysler Aerospace AG (jetzt EADS) mit der Zielsetzung „Softwareentwicklung zur Messwerterfassung in den Fachgebieten Mikrowellentechnik und Strahlungsmesstechnik“.
- Beginn des Medizinstudiums zum Wintersemester 1999/2000 an der Technischen Universität München.
- Pflegepraktikum vom 01.03.2000 bis 31.03.2000 sowie 01.09.2000 bis 30.09.2000 im Krankenhaus Martha-Maria München.
- Im Rahmen der Zusammenlegung der beiden Münchner Vorkliniken, Wechsel an die Ludwig Maximilians Universität München zum Wintersemester 2000/2001.
- Bestehen der Ärztlichen Vorprüfung am 06.09.2001. Mündliche Prüfung in den Fächern Biochemie/Physiologie.
- Beginn des klinischen Abschnitts des Medizin Studiums an der Technischen Universität München zum Wintersemester 2001/2002.

- Famulaturen in den Gebieten: Chirurgie (Krankenhaus Martha-Maria), Anästhesiologie (Klinikum der Universität München – Innenstadt), Orthopädie Sportmedizin (Dr. W.Lehner) und Innere Medizin (Krankenhaus Wolfratshausen).
- Beginn der medizinischen Doktorarbeit bei Prof. Dr. Grafe am Physiologischen Institut der Ludwig Maximilians Universität München im Sommersemester 2002.
- Bestehen des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 29.08.2002.
- im Rahmen der Doktorarbeit erfolgte die Teilnahme mit Posterpräsentation auf folgenden Kongressen: „82. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft Bochum 2003“, „4th Congress of EFIC - Pain in Europe IV Prag 2003“, „83. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft Leipzig 2004“, „84. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft Göttingen 2005“.
- Publikationen während der Promotion in: Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology (2002), Anaesthesiology (2003), Journal of Neurophysiology (2003) und in NeuroReport (2005).
- erfolgreiche Teilnahme an dem Zusatzkurs „internistischer Ultraschall“ angeboten durch die 2. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar.
- Bestehen des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 07.09.2004. Mündliche Prüfung in den Fächern Chirurgie/Orthopädie.
- Beginn des Praktischen Jahrs am 25.10.2005. 1. Tertial: Innere Medizin, 3. Medizinische Abteilung Krankenhaus München-Bogenhausen. 2. Tertial: Dermatologie, Klinikum rechts der Isar - am Biederstein. 3. Tertial: Chirurgie, Krankenhaus St. Elisabeth Straubing.
- Bestehen des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung am 21.10.2005.
- Erteilung der Approbation als Arzt am 26.10.2005.

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist durch die engagierte Mithilfe zahlreicher Personen entstanden, denen ich an dieser Stelle für die angenehme Zusammenarbeit und Hilfe danken möchte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. med. P. Grafe**, für die Themenstellung und exzellente fachliche Betreuung während meiner Arbeit.

Weiterhin danke ich **Herrn Dr. med. PM. Lang** für die großartige Betreuung und Hilfestellung bei der Durchführung der Experimente zur Fertigstellung dieser Dissertation.

Ganz herzlich danken möchte ich auch **Frau C. Müller** für die Aufbereitung einzelner Messpräparate, sowie das Anfertigen zahlreicher Badlösungen und pharmakologischer Testsubstanzen.

Mein Dank gilt auch **Herrn F. Rucker** für die Instandhaltung und das Lösen technischer Probleme der Messanordnung.

Schließlich danke ich auch meinen Eltern und meiner Freundin für die moralische Unterstützung während der Fertigstellung dieser Arbeit.