

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

**Ex-vivo Untersuchungen zum
Wirkungsmechanismus von Amitriptylin auf die
Erregbarkeit unmyelinisierter Nervenfasern**

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

vorgelegt von Anja Freysoldt
aus Friedrichshafen

München
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Grafe

Mitberichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. T. C. Baghai
Prof. Dr. med. S. Kääh

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. R. Carr

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,
FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2012

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis.....	3
2. Tabellenverzeichnis.....	5
3. Abkürzungsverzeichnis.....	6
4. Einführung in die Grundlagen.....	7
4.1 Neuropathische Schmerzen.....	7
4.1.1 Epidemiologie.....	7
4.1.2 Pathogenese.....	7
4.1.2.1 Nozizeptiver, inflammatorischer und neuropathischer Schmerz.....	7
4.1.2.1 Axotomie.....	9
4.1.2.2 Demyelinisierung.....	10
4.1.2.3 Immunologische und entzündliche Mechanismen.....	12
4.1.2.4 Zentrale Chronifizierung.....	13
4.1.3 Klinik	16
4.1.4 Therapie.....	18
4.2 Amitriptylin.....	20
4.2.1 Wirkungsmechanismen.....	20
4.2.2 Klinische Aspekte.....	21
4.3 Nikotinischer Acetylcholinrezeptor.....	26
5. Die Konzeption dieser Arbeit.....	29
6. Material und Methodik.....	31
6.1 Nervenpräparate.....	31
6.2 Messanordnung.....	31
6.3 Threshold Tracking.....	34

6.4	Verwendete Chemikalien.....	36
7.	Ergebnisse.....	37
7.1	Ableitung von Summenaktionspotenzialen.....	37
7.2	Die Wirkung von Nikotin auf die Erregbarkeit unmyelinisierter Nervenfasern.....	39
7.3	Die Wirkung von Amitriptylin auf die durch Nikotin ausgelöste Erregbarkeitssteigerung unmyelinisierter Nervenfasern.....	41
7.4	Die Wirkung von Amitriptylin in Abhängigkeit von seiner Konzentration	42
7.5	Die Wirkung von Amitriptylin und Tetrodotoxin im Vergleich	44
8.	Diskussion.....	48
8.1	Die Interpretation der Ergebnisse.....	48
8.2	Die klinische Relevanz der verwendeten Konzentrationen.....	50
8.3	Nikotinische Acetylcholinrezeptoren und neuropathische Schmerzen.....	50
8.4	Nichtneuronale Acetylcholinquellen	51
8.5	Ausblick.....	52
9.	Zusammenfassung.....	53
10.	Literaturverzeichnis.....	55
11.	Danksagung.....	62

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die Folgen einer Nervendemyelinisierung.....	11
Abbildung 2: Aufsteigende und absteigende nozizeptive Bahnen.....	14
Abbildung 3: Numbers needed to treat für Amitriptylin.....	23
Abbildung 4: Der molekulare Aufbau des nikotinischen Acetylcholinrezeptors an der motorischen Endplatte.....	27
Abbildung 5: Die Acetylcholinbindungsstelle des nikotinischen Acetylcholinrezeptors an der motorischen Endplatte.....	28
Abbildung 6: Vereinfachte schematische Darstellung der Messanordnung mit Blick von oben.....	32
Abbildung 7: Vergrößerte schematische Abbildung der elektrophysiologischen Vorgänge an der Ableitsauglektrode und dem eingelegten Faszikel.....	33
Abbildung 8: Direkter Vergleich zwischen Messungen unter konstantem und variablem Stimulusstrom an einem isolierten Faszikel eines menschlichen N. suralis.....	35
Abbildung 9: Die verschiedenen Komponenten der Summenaktionspotenziale eines Faszikels des menschlichen N. suralis in Abhängigkeit von der Stimulusintensität.....	38
Abbildung 10: Die Wirkung von Nikotin auf die Erregbarkeit unmyelinisierter Nervenfasern.....	40
Abbildung 11: Die Wirkung von Amitriptylin auf die durch Nikotin ausgelöste Erregbarkeitssteigerung unmyelinisierter Nervenfasern.....	42
Abbildung 12: Die Wirkung von Amitriptylin in Abhängigkeit von seiner Konzentration.....	43
Abbildung 13: Statistik der konzentrationsabhängigen Wirkung von Amitriptylin auf die durch Nikotin verursachte Erregbarkeitssteigerung von unmyelinisierten Nervenfasern.....	44

Abbildung 14: Die Wirkung von Amitriptylin und Tetrodotoxin im Vergleich.....	46
Abbildung 15: Statistik des Vergleichs zwischen der Wirkung von Amitriptylin und Tetrodotoxin.....	47

2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Nervenfasertypen.....	8
Tabelle 2: Die häufigsten neuropathischen Schmerzen.....	16
Tabelle 3: Negative und positive sensorische Symptome bei peripheren neuropathischen Schmerzen.....	17
Tabelle 4: Pharmakologisches Profil von Amitriptylin.....	21
Tabelle 5: Periphere und zentrale Nebenwirkungen von Amitriptylin.....	25

3. Abkürzungsverzeichnis

ACh	Acetylcholin
AMPA	2-amino-3-(5-methyl-3-oxo-1,2-oxazol-4-yl)propanoic acid
ATP	Adenosintriphosphat
CGRP	Calcitonin Gene-related Peptide
GABA	γ -Aminobuttersäure
H ₁ -Rezeptor	Histamin-Rezeptor
mACh-Rezeptor	Muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor
nACh-Rezeptor	Nikotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NA	Noradrenalin
Na _v -Kanal	Spannungsabhängiger Natriumkanal
NMDA	N-methyl-D-aspartic acid
NNH	Number needed to treat
NNT	Number needed to harm
PNS	Peripheres Nervensystem
SAP	Summenaktionspotenzial
TNF	Tumornekrosefaktor
TRPV	Transient receptor potential vanilloid
TTX	Tetrodotoxin
WDR	Wide dynamic range
ZNS	Zentrales Nervensystem

4. Einführung in die Grundlagen

4.1 Neuropathische Schmerzen

4.1.1 Epidemiologie

Neuropathische Schmerzen stellen ein großes, gesundheitsökonomisches Problem dar. Schätzungsweise bis zu 5 Prozent der Allgemeinbevölkerung in Deutschland leiden derzeit an neuropathischen Schmerzen (BARON 2006a). Prognosen zufolge wird die Prävalenz in Zukunft noch weiter zunehmen, was auf verschiedene Gründe zurückzuführen ist: Die allgemein höhere Lebenserwartung, die steigenden Inzidenzen für Erkrankungen, die Neuropathien verursachen, und das aufgrund des medizinischen Fortschritts längere Überleben derjenigen Patienten, die an mit neuropathischen Schmerzen assoziierten Erkrankungen leiden (DWORKIN 2002). Darüber hinaus können Patienten mit neuropathischen Schmerzen erheblich in ihrer Lebensqualität eingeschränkt sein. So müssen 93 Prozent der Erkrankten Medikamente gegen die Schmerzen einnehmen, 76 Prozent suchen mindestens einmal im Monat anlässlich der Schmerzen einen Arzt auf, 43 Prozent leiden an Folgeerkrankungen und 52 Prozent haben bereits Einbußen in ihrer Erwerbsfähigkeit erfahren müssen (McDERMOTT ET AL. 2006; MEYER-ROSBERG ET AL. 2001).

4.1.2 Pathogenese

4.1.2.1 Nozizeptiver, inflammatorischer und neuropathischer Schmerz

Die physiologische Funktion des Nervensystems hängt von den Nervenzellen selbst, ihren Gliazellen sowie dem umgebenden Gewebe und Milieu ab. Kommt es im Rahmen einer Entzündung zu Zellschäden im benachbarten Gewebe, so werden Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, Zytokine, ATP, Kaliumionen als auch Serotonin freigesetzt und erregen über rezeptive periphere Nervenendigungen, die sogenannten Nozizeptoren, afferente unmyelinisierte C- oder myelinisierte A δ -Fasern (siehe Tabelle 1). Gleichmaßen können Noxen

wie Hitze, Kälte oder starke mechanische Reize zu einer Erregung der Nozizeptoren führen. Bei einer überschwelliger Depolarisation der Nozizeptoren entsteht eine Serie von Aktionspotenzialen, die entlang des Axons ins zentrale Nervensystem geleitet und dort zu einer Schmerzempfindung mit wichtiger Warnfunktion für den Organismus bezüglich der drohenden oder bereits eingetretenen Schädigung des Gewebes verarbeitet wird. (DEETJEN *ET AL.* 2006; SILBERNAGL & DESPOPOULOS 2003)

Fasertypen nach		afferent von	efferent zu	Durchmesser in μm	Leitungsgeschwindigkeit in m/s
Erlanger u. Gasser	Lloyd u. Hunt				
A α	I	Muskelspindel	Skelettmuskel	11-16	60-80
A β	II	Mechanorezeptoren der Haut		6-11	30-60
A γ			Muskelspindel	1-6	2-30
A δ	II	Hautafferenzen (Temperatur u. „schneller“ Schmerz)		1-6	2-30
B			Sympathisch präganglionäre Neurone	3	3-15
C	IV	Hautafferenzen („langsamer“ Schmerz)	Sympathisch postganglionäre Neurone	0,5-1,5	0,25-1,5
				marklos	

abgeändert aus SILBERNAGL & DESPOPOULOS 2003

Tabelle 1: Nervenfasertypen

Der neuropathische Schmerz ist von diesem inflammatorischen und nozizeptiven Schmerz abzugrenzen, da er nicht Ausdruck einer Schädigung des Umgebungsgewebes ist, sondern vielmehr aufgrund einer direkten Läsion oder Krankheit somatosensorischer Nervenstrukturen im peripheren oder zentralen Nervensystem entsteht (BARON 2006a; CRUCCU *ET AL.* 2004). Verschiedene mechanische, entzündliche, metabolische und toxische Ereignisse können für die Verletzung oder Erkrankung der nozizeptiven Afferenzen verantwortlich sein (BÖCKER *ET AL.* 2004) und ohne das Bestehen eines adäquaten Schmerzreizes zur Bildung von Aktionspotenzialen führen, die wie physiologische Erregungen in die nozizeptiven Areale des Gehirns weitergeleitet werden und sich in einer

Schmerzempfindung auswirken. Bestehen neuropathische Schmerzen über einen längeren Zeitraum finden plastische Veränderungen sowohl im Rückenmark als auch im Gehirn statt und die Schmerzen chronifizieren.

Die komplexen, multifaktoriellen Mechanismen, die zur Entstehung und Chronifizierung der krankhaften Hyperexzitabilität führen, sind noch nicht im Detail bekannt. Im Folgenden werden die bisherigen Erkenntnisse zur Pathogenese neuropathischer Schmerzen zusammengefasst. Dabei soll der Fokus auf den für diese Arbeit wichtigen peripheren Pathomechanismen von neuropathischen Schmerzen liegen.

4.1.2.1 Axotomie

Bei einer partiellen oder vollständigen Durchtrennung eines peripheren Nervs mit Beschädigung der Myelinscheide und des Perineuriums entsteht am proximalen Nervenstumpf durch Axonaussprossung ein Neurom, eine gutartige, knotenförmige Gewebsneubildung bestehend aus axonalen Regeneraten, überschießenden Bindegewebs- sowie Schwannzell-Proliferaten (BÖCKER *ET AL.* 2004). In den Zellmembranen oberhalb der Axotomie einschließlich des Neuroms und in benachbarten, intakten Nervenzellen verändert sich die Rezeptor- und Ionenkanalausstattung, unter anderem aufgrund von freigesetztem Nervenwachstumsfaktor (BARON 2006b) und weil die für die nicht mehr vorhandene Nervenendigungen bestimmten Ionenkanäle nun in die Neurommembran eingebaut werden (PFEIFFER & WEILLER 2001). So akkumulieren zum Beispiel spannungsabhängige, Tetrodotoxin-sensible und -resistente Natriumkanäle, α -Adrenozeptoren sowie TRPV1-Rezeptoren, die die Nervenfasern übererregbar machen und die Entstehung von Aktionspotenzialen an atypischer Stelle, also ektop, verursachen (BARON 2006b; WOOLF & MANNION 1999).

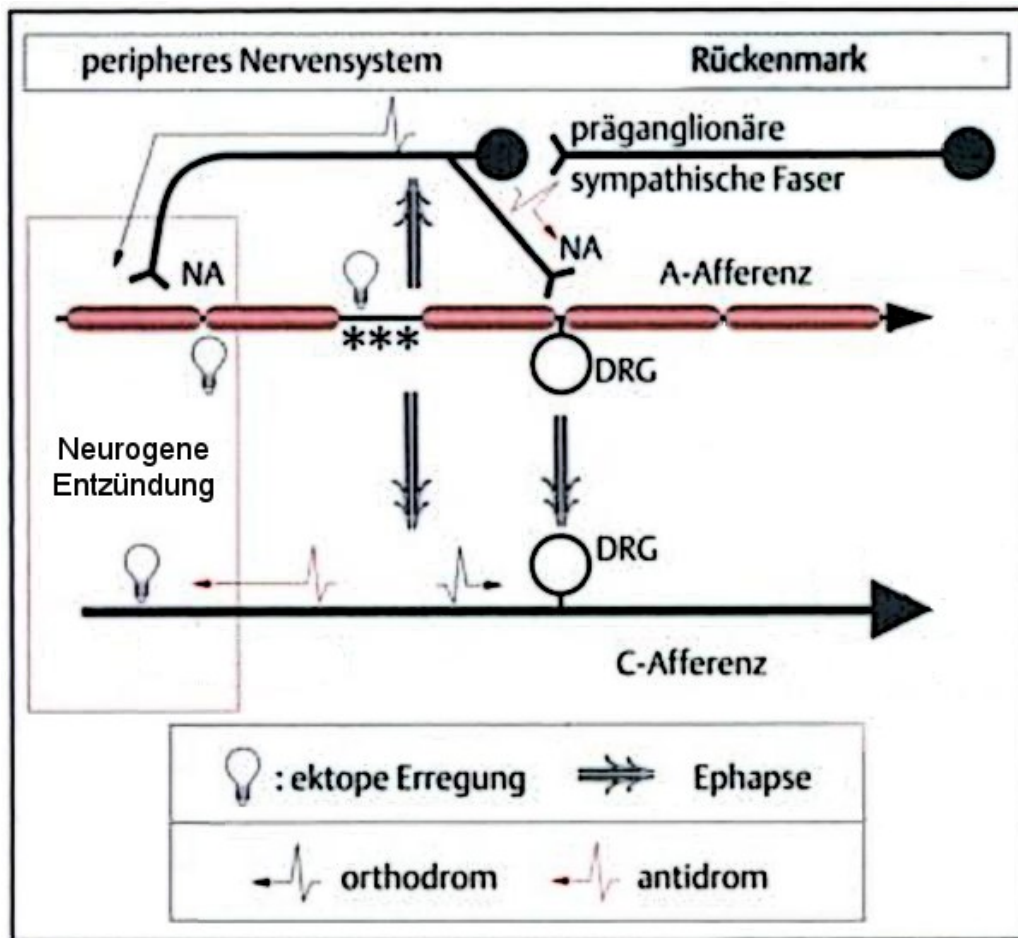
Die Nervenfaserteile distal der Axotomie sind von der Versorgung durch den Zellkern abgeschnitten. Außerdem fehlt durch die Beschädigung der Myelinscheide und des Perineuriums eine Leitstruktur für die Regeneration des proximalen Nervenabschnitts. Die betroffenen distalen Nervenfaserteile werden im Zuge der Waller-Degeneration vollständig abgebaut (BÖCKER *ET AL.* 2004). Dabei kommt es unter anderem zur Aktivierung von Makrophagen (SOMMER *ET AL.* 1995)

und zur Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren, die die Erregbarkeit der Nervenfasern weiter steigern (MOALEM *ET AL.* 2006; PFEIFFER & WEILLER 2001).

4.1.2.2 Demyelinisierung

Eine mechanisch, entzündlich oder metabolisch bedingte segmentale Demyelinisierung fördert an der entmarkten Stelle ebenfalls ektopische Erregungen. Aufgrund der Demyelinisierung entsteht ein Leitungsblock, sodass die Erregung an den betroffenen Nervensegmenten nicht weitergeleitet werden kann. Die Membran depolarisiert immer weiter bis die Spannung ausreicht, um benachbarte, unmyelinisierte Nervenfasern zu erregen und einen Nebenschluss, eine sogenannte Ephase, auszulösen. Ephasen auf C-Fasern verursachen ektopische Erregungen mit orthodromer Ausbreitung in Richtung Rückenmark sowie antidromer Ausbreitung in die Peripherie mit Initiierung einer neurogenen Entzündung (HERBERT & HOLZER 2002). Nebenschlüsse auf postganglionäre sympathische Fasern haben zur Folge, dass das von ihnen ausgeschüttete Noradrenalin orthodrom mittels seiner vasodilatatorischen Wirkung ebenfalls zur neurogenen Entzündung beiträgt und antidrom ephatische Erregungen zwischen Spinalganglienzellen begünstigt. (PFEIFFER & WEILLER 2001)

Eine neurogene Entzündung wird durch die Freisetzung von Neuropeptiden aus den Nervenendigungen von A δ - und C-Fasern aufgrund antidromer Leitung von Erregungen verursacht. Zu den wichtigsten Neuropeptiden zählen Substanz P, Neurokinin A und Calcitonin Gene-related Peptide (CGRP). Sie verursachen eine Vasodilatation, eine gesteigerte Gefäßpermeabilität mit daraus folgendem Ödem und die sekundäre Ausschüttung von Entzündungsmediatoren wie Histamin, Serotonin, Prostaglandinen, Leukotrienen und Interleukinen (HERBERT & HOLZER 2002). Diese Mediatoren erhöhen zusammen mit den Neuropeptiden die Erregbarkeit der C-Fasern (PFEIFFER & WEILLER 2001).



abgeändert aus PFEIFFER & WEILLER 2001

Abbildung 1: Die Folgen einer Nervendemyelinisierung

Diese Abbildung zeigt eine Zusammenfassung der im Text genannten Vorgänge nach mechanischer oder entzündlicher Demyelinisierung von Nervenfasern. An der Stelle der Demyelinisierung bilden sich ektope Erregungen, die im Falle eines Leitungsblocks abnorme Nebenschlüsse, sogenannte Ephasen, zu unmyelinisierten C-Fasern und postganglionären sympathischen Fasern verursachen. Das aus letzteren ausgeschüttete Noradrenalin begünstigt antidrom Ephasen zwischen Spinalganglionzellen, während es orthodrom zusammen mit den antidromen Aktionspotentialen der C-Fasern eine neurogene Entzündung auslöst.

DRG = dorsal root ganglion, NA = Noradrenalin

4.1.2.3 Immunologische und entzündliche Mechanismen

Neben der neurogenen Entzündung tragen noch weitere immunologische und entzündliche Mechanismen zur Pathogenese neuropathischer Schmerzen bei. Ihre Bedeutung wird angesichts der Beobachtung klar, dass alleine die Anwesenheit von Chromgut-Nahtmaterial in unmittelbarer Nähe des Nervus suralis ohne das Vorhandensein einer Nervenläsion neuropathische Hyperalgesie auslöst (MAVES, PECHMAN, GEBHART & MELLER 1993). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die Schmerzwahrnehmung bei einer peripheren Nervenverletzung positiv mit der Stärke der Immunantwort korreliert. Eine Hemmung des Immunsystems durch Dexamethason reduziert die Schmerzen, während eine lokale Stimulierung mit Hilfe von Freund-Adjuvant diese intensiviert (CLATWORTHY, ILLICH, CASTRO & WALTERS 1995). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Freund-Adjuvant Hyperalgesie sogar bei intaktem Nervus ischiadicus verursacht (ELIAV *ET AL.* 1999). Neuropathische Schmerzen können folglich durch immunologische und entzündliche Mechanismen moduliert als auch unabhängig von einer Nervenverletzung ausgelöst werden.

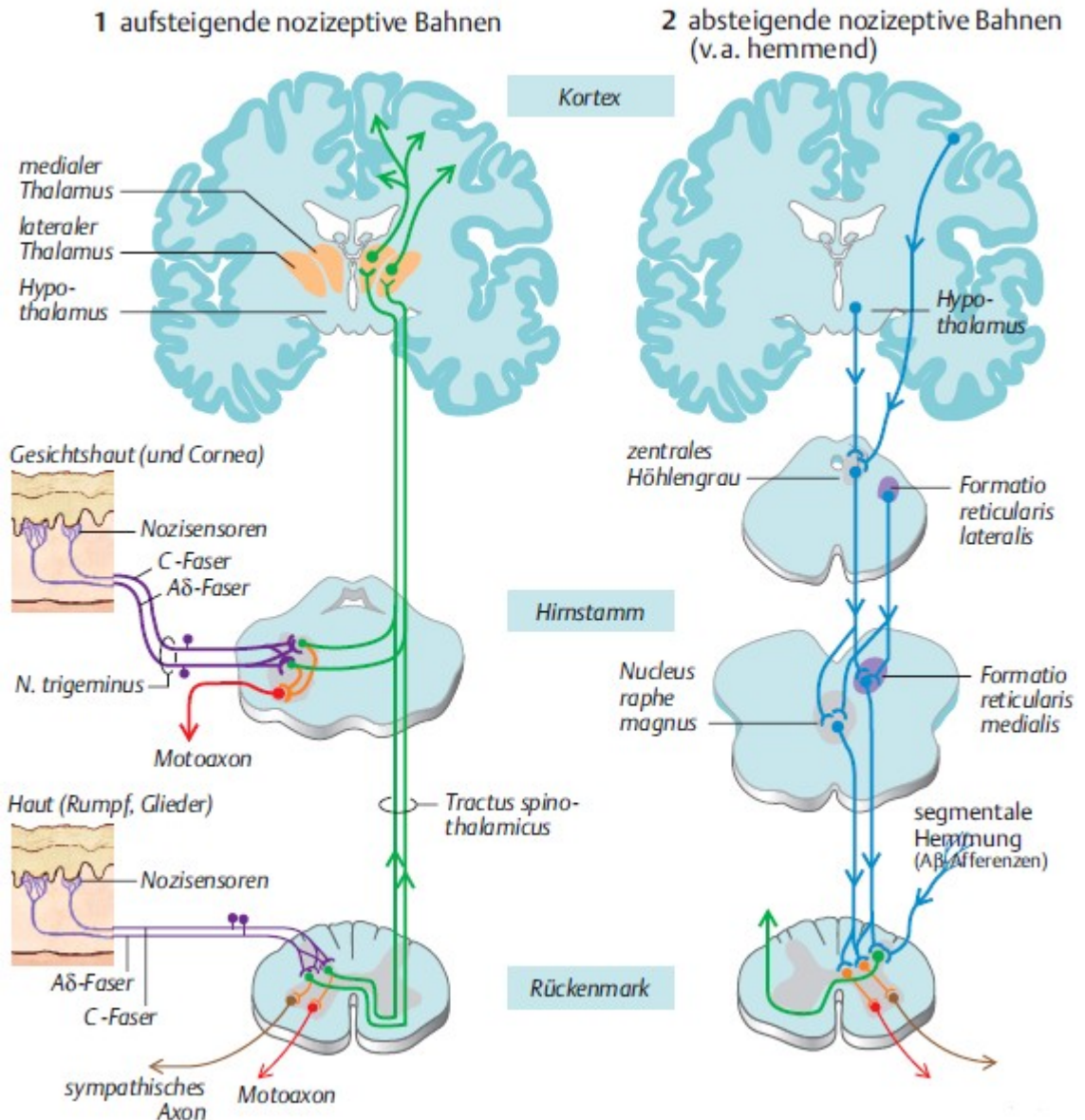
Infolge einer Nervenläsion oder -entzündung werden Mastzellen aktiviert (OLSSON 1967) und Neutrophile, Makrophagen sowie T-Lymphozyten infiltrieren den Nerv aus endoneuralen Blutgefäßen (BARON 2006b; ELIAV *ET AL.* 1999; MOALEM *ET AL.* 2005; MOALEM *ET AL.* 2006; PERRY, BROWN & GORDON 1987). Die Immunzellen und Schwannzellen setzen unter anderem Nervenwachstumsfaktor, proinflammatorische Zytokine (TNF- α , Interleukin 1 β und 6), Histamin, Prostaglandine, Serotonin und ATP frei (MOALEM *ET AL.* 2006). Ein Teil dieser Mediatoren fördert die weitere Rekrutierung von Immunzellen (MOALEM *ET AL.* 2006), andere steigern die Erregbarkeit verletzter sowie unverletzter afferenter C-Fasern bis hin zur Auslösung ektooper Erregungen (BARON 2006b; MARCHAND, PERRETTI & McMAHON 2005; MOALEM *ET AL.* 2006). Für Serotonin und ATP beispielsweise konnten axonale Rezeptoren mit einer direkten Erregbarkeits-steigernden Wirkung auf unmyelinisierte C-Fasern nachgewiesen werden (CARLTON & COGGESHALL 1997; IRNICH *ET AL.* 2002; LANG *ET AL.* 2002; MOALEM *ET AL.* 2005; ZEITZ *ET AL.* 2002)

4.1.2.4 Zentrale Chronifizierung

Schmerzleitende A- und C-Afferenzen enden in den Laminae I (marginalis) und II (gelatinosa) im Hinterhorn des Rückenmarks und werden auf konvergente Projektionsneurone in Lamina V, sogenannte wide dynamic range (WDR) Neurone, umgeschaltet (DEETJEN *ET AL.* 2006). Namensgebend ist die Tatsache, dass sie multimodale Informationen aus der Peripherie erhalten, sowohl was die Qualität (A β -, A δ - und C-Fasern) als auch was die Intensität der Reize betrifft. C-Fasern haben eine erregende Wirkung auf die WDR-Neurone, wohingegen A-Fasern einen direkten sowie über GABAerge Interneurone einen indirekten hemmenden Einfluss auf sie ausüben. Auch auf die präsynaptische Nervenendigung der C-Fasern wirken A-Afferenzen über GABAerge Interneurone inhibitorisch (PFEIFFER & WEILLER 2001). Die Axone der WDR-Neurone kreuzen segmental das Rückenmark, steigen mit Zuflüssen vom Nervus trigeminus in den Vorderseitenstrangbahnen, vor allem im Tractus spinothalamicus, zum Thalamus auf und erreichen von dort wichtige schmerzverarbeitende Areale des Kortex (siehe Abbildung 2, 1). Deszendierende Nervenzellen des noradrenergen Locus coeruleus und der serotoninerger Raphekernen hemmen die afferente Schmerzleitung durch synaptische Kontakte zu den WDR-Neuronen, Interneuronen und den Nervenendigungen von C-Fasern (siehe Abbildung 2, 2). (AUMÜLLER & ET AL 2007; SILBERNAGL & DESPOPOULOS 2003)

Einerseits können neuropathische Schmerzen chronifizieren, indem die erregenden Einflüsse gebahnt werden, andererseits indem hemmende Einflüsse wegfallen.

Die C-Faser-Terminalen setzen Glutamat und Neuropeptide, wie beispielsweise Substanz P, frei. Glutamat aktiviert AMPA-Rezeptoren der WDR-Neurone und Substanz P Neurokinin-1-Rezeptoren, was im ersten Fall durch unspezifischen Kationeneinstrom und im zweiten Fall durch Abnahme des Kaliumausstroms eine Depolarisation der postsynaptischen Membran auslöst. Eine langandauernde Aktivität der afferenten C-Fasern führt zur Sensibilisierung der WDR-Neurone, was auch Langzeitpotenzierung genannt wird. Diese Sensibilisierung kommt zustande, da Glutamat durch Depolarisation der WDR-Neurone einen



aus SILBERNAGL & DESPOPOULOS 2003

Abbildung 2: Aufsteigende und absteigende nozizeptive Bahnen

1 Aufsteigende nozizeptive Bahnen: Aδ- und C-Faserafferenzen werden im Hinterhorn des Rückenmarks auf sekundäre Neurone umgeschaltet. Diese kreuzen segmental das Rückenmark, steigen mit Zuflüssen vom Nervus trigeminus in den Vorderseitenstrangbahnen, vor allem im Tractus spinothalamicus, zum Thalamus auf und gelangen von dort zu wichtigen schmerzverarbeitenden Arealen des Kortex.

2 Absteigende nozizeptive Bahnen: Deszendierende Bahnen mit Ursprung in Kerngebieten des Mittelhirns hemmen die afferente Schmerzleitung durch synaptische Kontakte zu Projektionsneuronen, Interneuronen und den Nervenendigungen von C-Fasern.

Magnesiumionenblock von NMDA-Rezeptor-Kanalporen beseitigt und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle einströmen können. Diese haben eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und Veränderung der Genexpression sowie eine Phosphorylierung des AMPA-Rezeptors mit erhöhter Öffnungswahrscheinlichkeit zur Folge. Ab jetzt führt freigesetztes Glutamat zu einer noch stärkeren Depolarisation der postsynaptischen Membran. (DEETJEN *ET AL.* 2006) Hinzu kommt, dass eine periphere Nervenläsion Gliazellen des Rückenmarks aktiviert, die daraufhin vermehrt Glutamat und Zytokine ausschütten (WIESELER-FRANK, MAIER & WATKINS 2005). Die genannten Mechanismen steigern die Erregbarkeit der WDR-Neurone, sodass fortan leichte Reize ausreichen, um eine starke Antwort auszulösen.

Auch der Wegfall inhibitorischer Einflüsse kann zu einer zentralen Schmerzchronifizierung beitragen. Das deszendierende hemmende System und die hemmenden Interneurone verlieren mit der Zeit ihre Wirkung, die Menge des inhibitorisch wirksamen Transmitters GABA sinkt und sowohl die GABA- als auch die Opioid-Rezeptoren werden herunterreguliert (WOOLF & MANNION 1999). Des Weiteren induziert eine periphere Nervenläsion die Apoptose GABAerger Interneurone (MOORE *ET AL.* 2002). Ein Ausfall der A-Afferenzen, beispielsweise durch eine demyelinisierende Neuropathie, enthemmt die C-Fasern und WDR-Neurone. All diese Mechanismen führen zu einer ungeminderten Leitung nozizeptiver Impulse ins Gehirn.

Mit der Positronenemissionstomographie, der funktionellen Magnetresonanztomographie, der Magnetenzephalographie und weiteren bildgebenden Verfahren können auch im Gehirn Zeichen einer zentralen Chronifizierung der Schmerzen nachgewiesen werden, wie zum Beispiel eine erhöhte neuronale Aktivität in den klassischen schmerzverarbeitenden Arealen, eine Rekrutierung von zusätzlichen Hirnarealen, vielfältige strukturelle Umbauprozesse und eine metabolische Umstellung (SEIFERT & MAIHÖFNER 2009).

All diese, zum Teil irreversiblen, Veränderungen bewirken eine Verstärkung der Positivsymptomatik (siehe Tabelle 3) und eine Chronifizierung der Schmerzen, die sehr schwierig zu therapieren ist und die es in jedem Fall zu verhindern gilt.

4.1.3 Klinik

Als klassische Beispiele für periphere neuropathische Schmerzsyndrome sind die diabetische Polyneuropathie, die postzosterische Neuralgie, die Trigemius-Neuralgie und der Phantomschmerz nach Amputation eines Körperteils oder Organs zu nennen (siehe Tabelle 2).

Die häufigsten neuropathischen Schmerzen		
	Fokale Neuropathien, Mononeuropathien	Generalisierte Neuropathien, Polyneuropathien
Periphere Neuropathien	Postzosterische Neuralgie Post-Mastektomie-Schmerz Phantom-, Stumpfschmerz Trigemius-Neuralgie Chronische Radikulopathien Posttraumatische Neuropathie Engpasssyndrome	Diabetische Polyneuropathie Alkoholinduzierte Neuropathie Neuropathie bei Hypothyreose Neuropathie bei Vitaminmangel durch Chemotherapeutika verursachte Neuropathie chron. inflammatorische Polyradikuloneuropathie Bannwarth-Syndrom (Borrelien-Inf.) HIV-Neuropathie
Zentrale Neuropathien	Rückenmarksverletzungen	Hirnfarkt (v.a. Thalamus, Hirnstamm) Multiple Sklerose

abgeändert aus BARON 2006a

Tabelle 2: Die häufigsten neuropathischen Schmerzen

Die aufgeführten Erkrankungen machen über 80% der neuropathischen Schmerzen aus.

Typisch sind eine vielfältige, individuelle Kombination negativer und positiver sensorischer Symptome (siehe Tabelle 3). Zu den negativen sensorischen Symptomen zählen Hypästhesie, Pallhypästhesie, Hypalgesie, Thermhypästhesie und Anästhesie. Die belastungsunabhängigen, positiven sensorischen Symptome untergliedern sich zum einen in spontane Missempfindungen wie Parästhesie, einschließende Schmerzattacken und anhaltender oberflächlicher Schmerz, zum anderen in evozierte Schmerzen wie Allodynie und Hyperalgesie. (BARON 2006a; HANSSON 2002)

Negative und positive sensorische Symptome bei peripheren neuropathischen Schmerzen			
Negativsymptome (Ausfallerscheinungen)		Hypästhesie	Reduzierte Empfindung nicht schmerzhafter Reize
		Pallhypästhesie	Reduzierte Empfindung eines Vibrationsreizes
		Hypalgesie	Reduzierte Empfindung schmerzhafter Reize
		Thermhypästhesie	Reduzierte Empfindung eines Warm- oder Kältereizes
		Anästhesie	Empfindungslosigkeit
Positivsymptome	Spontane Missempfindungen	Parästhesie	Nicht schmerzhaft, anhaltende kribbelnde Empfindung
		Einschießende Schmerzattacken	Elektrisierende Schocks von Sekundendauer
		Oberflächlicher Schmerz	Schmerzhaft anhaltende Empfindung, oft brennend
	Evozierte Schmerzen	Allodynie (mechanisch und thermisch)	Normalerweise nicht schmerzhafter Reiz löst Schmerz aus
		Hyperalgesie	Normalerweise leicht schmerzhafter Reiz löst stärkeren Schmerz aus

abgeändert aus BARON 2006a

Tabelle 3: Negative und positive sensorische Symptome bei peripheren neuropathischen Schmerzen

Von den meisten Symptomen ist das morphologische Korrelat bekannt. So sind die Erregbarkeitssteigerung der C-Fasern und die ektopen Erregungen Erklärung für den plötzlich einschießenden Spontanschmerz und die Hyperalgesie der Patienten, während Ephasen zwischen A- und C-Fasern eine Ursache für die Allodynie darstellen könnten, bei der durch A-Fasern vermittelte nicht-noxische, sensorische Qualitäten als schmerzhaft empfunden werden (PFEIFFER & WEILLER 2001). Die Veränderung der Kanalausstattung nach Axotomie mit zum Beispiel vermehrt exprimierten TRPV1-Rezeptoren in verletzen sowie intakten Nervenfasern erklärt speziell die Allodynie auf Wärme- beziehungsweise Hitzereize (BARON 2006b). Die Waller-Degeneration des peripheren Axonstumpfes verursacht negative Symptome wie Hypästhesie und Hypalgesie (PFEIFFER & WEILLER 2001).

Zu den zentralen neuropathischen Schmerzen zählen Neuropathien, die beispielsweise aus einem Hirninfarkt, einer Rückenmarksverletzung oder Multipler Sklerose resultieren (siehe Tabelle 2). Sie treten in der Regel erst Monate nach Entstehung der Läsion oder Krankheit auf und sind insbesondere durch einen permanenten, brennenden Dauerschmerz charakterisiert. (BARON 2006a; HANSSON 2002)

Neben den somatischen Beschwerden weisen neuropathische Schmerzen oftmals auch eine starke affektive Komponente auf, die sich in Folgeerkrankungen wie Angststörungen, Depressionen sowie Schlafstörungen manifestiert und den Leidensdruck der Patienten zusätzlich verstärkt. (McDERMOTT *ET AL.* 2006; MEYER-ROSBURG *ET AL.* 2001)

4.1.4 Therapie

Um eine Chronifizierung der Schmerzen zu vermeiden und die Lebensqualität der Patienten zu verbessern, sollte so früh und intensiv wie möglich mit einer individuellen, effektiven Schmerztherapie begonnen werden.

Ist eine Ursache der Neuropathie kausal oder im besten Fall sogar kurativ behandelbar, wie zum Beispiel eine gute Diabeteseinstellung bei schmerzhafter Polyneuropathie oder eine Neurolyse bei Engpasssyndromen, so steht diese Therapieoption an erster Stelle.

Die symptomatisch pharmakologische Behandlung wird bei Neuropathien angewendet, deren Ursache nicht oder nur inadäquat kausal therapiert werden kann, was bei 93 Prozent der Patienten der Fall ist (McDERMOTT *ET AL.* 2006). Nichtopioid-Analgetika wie Ibuprofen, Aspirin und Paracetamol nehmen keinen hohen Stellenwert ein, da sie sich bei neuropathischen Schmerzen wenig wirksam zeigen und zudem ein breites Nebenwirkungsspektrum bei Langzeitanwendung aufweisen. Demgegenüber haben sich fünf verschiedene Substanzgruppen als evidenzbasierte Medikation zur potenten Schmerzreduktion etabliert: Kalzium-Kanal-modulierende Antikonvulsiva (Pregabalin, Gabapentin), Natrium-Kanal-Blocker (Carbamazepin, Lamotrigin), trizyklische Antidepressiva (Amitriptylin) oder selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (Duloxetin, Venlafaxin),

schwache Opioide (Tramadol, Tilidin) (BARON 2006a) und die intravenöse Gabe von Lokalanästhetika (Lidocain) (MAO & CHEN 2000; TREMONT-LUKATS *ET AL.* 2005). Sie werden gegenwärtig einzeln oder in Kombinationen, unter Berücksichtigung der Kontraindikationen und Nebenwirkungen sowie des individuellen Beschwerdebildes als pharmakologische Basistherapie eingesetzt. Diese systemisch wirkenden Substanzgruppen können insbesondere bei gut lokalisierbaren neuropathischen Schmerzen durch topische Behandlungsmöglichkeiten, zum Beispiel Lidocain-Pflaster oder Capsaicinsalbe, ergänzt werden. Außerdem stehen nichtmedikamentöse adjuvante Therapiemaßnahmen wie die transkutane elektrische Nervenstimulation, interventionelle Verfahren, Physio- und Ergotherapie als auch Physikalische Therapie zur Verfügung. Psycho- und Verhaltenstherapie sind ebenfalls ein wichtiger Bestandteil des multimodalen Therapiekonzepts. (BARON 2006a; DWORKIN *ET AL.* 2007; FINNERUP *ET AL.* 2005)

Als realistisches Behandlungsziel bei neuropathischen Schmerzen ist eine Schmerzreduktion um über 50 Prozent anzustreben. Eine vollständige Schmerzfreiheit kann in der Regel nicht erreicht werden. Die Gruppe der Non-Responder ist mit 20 bis 40 Prozent der medikamentös therapierten Patienten sehr groß. Bei diesen Patienten spricht die Behandlung nicht wie erwartet an, die Schmerzreduktion liegt unter 50 Prozent oder sie leiden an nicht tolerierbaren Nebenwirkungen. Bei Therapieresistenz und äußerst starken Schmerzen können unter strenger Verlaufsüberwachung oft erfolgreich hochpotente Opioide eingesetzt werden. Die Ultimo ratio bei Patienten mit deutlich eingeschränkter Lebenserwartung stellen zudem neurochirurgische Verfahren dar, die einen Teil des nozizeptiven System zerstören, beispielsweise die Durchtrennung des Tractus spinothalamicus. (BARON 2006a)

4.2 Amitriptylin

4.2.1 Wirkungsmechanismen

Amitriptylin ist eine Substanz aus der Gruppe der Nicht-selektiven Monoamin-Rückaufnahme-Hemmer, oder nach der chemischen Grundstruktur auch Trizyklische Antidepressiva genannt. Seit Jahrzehnten ist Amitriptylin einer der wichtigsten Wirkstoffe und oft die erste Wahl in der Therapie von neuropathischen Schmerzen (AKTORIES *ET AL.* 2005; DWORKIN *ET AL.* 2007; FINNERUP *ET AL.* 2005; SAARTO & WIFFEN 2007; VADALOUCA *ET AL.* 2006). Es sind verschiedene Wirkungsmechanismen im zentralen und peripheren Nervensystem bekannt, wie es jedoch zur Schmerzreduktion kommt ist noch weitestgehend ungeklärt.

Möglicherweise ist die Monoamin-Wiederaufnahmehemmung im zentralen Nervensystem für die Schmerzreduktion unter Amitriptylineinnahme von Bedeutung. Sie führt zu einer Erhöhung der Serotonin- und Noradrenalin-Konzentration im synaptischen Spalt und unterstützt so das deszendierende hemmende System (ONGHENA & VAN HOUDENHOVE 1993; SACERDOTE, BRINI, MANTEGAZZA & PANERAI 1987). Eine deutlich geringere Relevanz nehmen wahrscheinlich die agonistische Bindung von Amitriptylin an Opioidrezeptoren (HALL & OGREN 1981) und der antagonistische Effekt auf die NMDA-Rezeptoren im Rückenmark (CAI & McCASLIN 1992; EISENACH & GEBHART 1995; McCASLIN, YU, HO & SMITH 1992; REYNOLDS & MILLER 1988; WATANABE, SAITO & ABE 1993) ein, da die Bindungsaffinitäten für therapeutische Amitriptylinkonzentrationen beim Menschen zu gering sind.

Darüber hinaus sind periphere Wirkungsmechanismen von Amitriptylin als Grundlage der Schmerzreduktion denkbar. Die Hemmung von spannungsabhängigen Natrium- (BRÄU *ET AL.* 2001; DICK *ET AL.* 2007; LEFFLER, REIPRICH, MOHAPATRA & NAU 2007; NAU, SEEVER, WANG & WANG 2000; WANG, RUSSELL & WANG 2004), Kalium- (GALEOTTI *ET AL.* 1997; PUNKE & FRIEDERICH 2007) oder Kalziumkanälen (LAVOIE, BEAUCHAMP & ELIE 1990; SHIMIZU, NISHIDA & YAMAWAKI 1992), ebenso wie der antagonistische Effekt auf nikotinische Acetylcholinrezeptoren (CONNOLLY, BOULTER & HEINEMANN 1992; GUMILAR *ET AL.* 2003) spielen an peripheren

Nervenfasern im Bereich der therapeutischen Amitriptylinkonzentrationen möglicherweise eine Rolle.

Eine Zusammenfassung über die vielen verschiedenen Angriffspunkte von Amitriptylin, unabhängig von ihrer Bedeutung für die Schmerzreduktion, gibt Tabelle 4.

Pharmakologisches Profil von Amitriptylin in der Zusammenfassung	
Wiederaufnahmehemmung	Serotonin-Transporter
	NA-Transporter
Rezeptorblockade	α_1 -Adrenozeptor
	H ₁ -Rezeptor
	mACh-Rezeptor
	nACh-Rezeptor
	NMDA-Rezeptor
Ionenkanalblockade	Na ⁺ -Kanal
	K ⁺ -Kanal
	Ca ²⁺ -Kanal
Agonistischer Effekt	Opioidrezeptor

abgeändert aus SINDRUP ET AL. 2005

Tabelle 4: Pharmakologisches Profil von Amitriptylin

4.2.2 Klinische Aspekte

In zahlreichen Studien und im klinischen Alltag hat sich herausgestellt, dass neuropathische Schmerzen im Schnitt mit einer geringeren Amitriptylindosierung erfolgreich gelindert werden können als Depressionen. Für die Therapie von neuropathischen Schmerzen werden üblicherweise zwischen 20 und 100 mg Amitriptylin pro Tag verabreicht, während bei Depressionen 50 bis 150 mg pro Tag notwendig sind (AKTORIES ET AL. 2005). Zudem lassen sich erste Therapieerfolge bei neuropathischen Schmerzen bereits wenige Tage nach Beginn der Medikamenteneinnahme verzeichnen, wohingegen eine Besserung bei Depressionen nicht selten bis zu sechs Wochen auf sich warten lässt. (SAARTO & WIFFEN 2007)

Die Wirkung von Amitriptylin auf neuropathische Schmerzen ist dabei völlig unabhängig von der psychischen Stimmungslage. Studien haben gezeigt, dass sowohl depressive als auch psychisch stabile Patienten von einer Therapie mit Amitriptylin profitieren können. (LEIJON & BOIVIE 1989; MAX ET AL. 1987; SAARTO & WIFFEN 2007)

Die Wirksamkeit eines Medikaments drückt sich in der „Number needed to treat“ (NNT) aus. Sie gibt die Anzahl der Patienten an, die pro Zeitintervall mit dem Medikament behandelt werden müssen, um das gewünschte Therapieziel bei einem dieser Patienten zu erreichen. Die Behandlung von neuropathischen Schmerzen gilt als erfolgreich, sobald eine dauerhafte Linderung der Schmerzen um mindestens 50 Prozent verwirklicht wird. Amitriptylin weist dabei im Durchschnitt eine NNT von 3,1 auf, was ein vergleichsweise gutes Ergebnis ist, wenn man sich beispielsweise den mittleren NNT-Wert von 6,8 der selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer vor Augen führt. (SAARTO & WIFFEN 2007; SINDRUP ET AL. 2005)

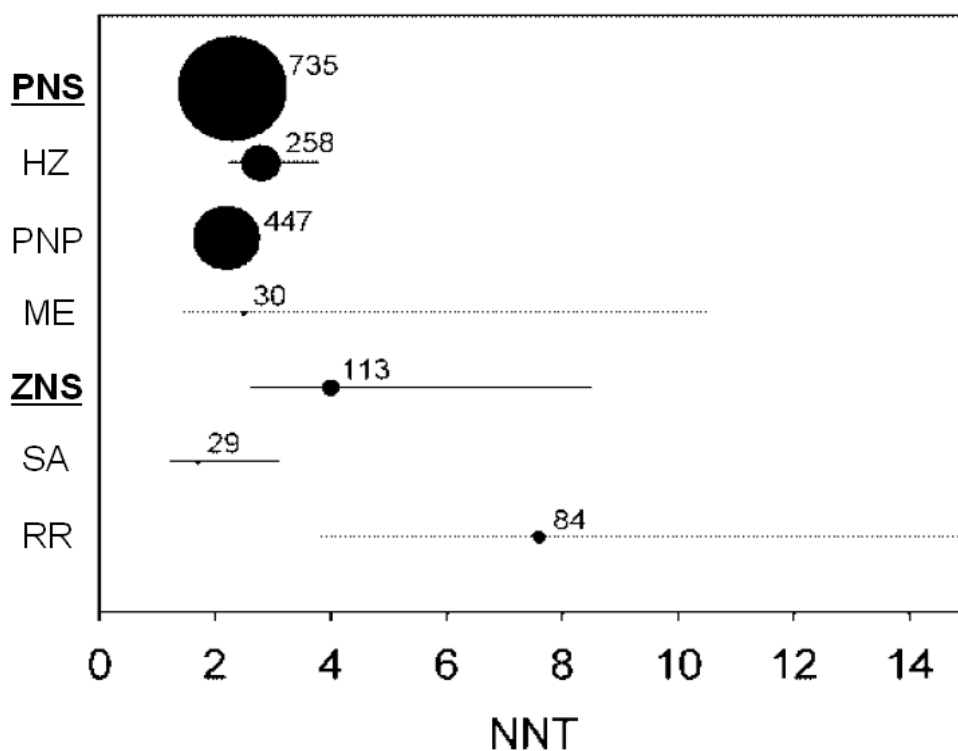
Es wurden bereits zahlreiche Studien zur Wirksamkeit von Amitriptylin bei verschiedenen Grunderkrankungen mit neuropathischen Schmerzen durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass Amitriptylin bei vielen Krankheiten sehr effektiv gegen die Schmerzen ist, bei anderen wiederum keinen signifikanten Unterschied zum Placebo erzielt. Eine grobe Übersicht der NNT-Werte für Amitriptylin bei verschiedenen Arten von Neuropathien zeigt Abbildung 3.

Allgemein gelten schmerzhafte Polyneuropathie (MAX ET AL. 1987; VRETHEM ET AL. 1997), Schmerzen nach Herpes Zoster (MAX ET AL. 1988; WATSON ET AL. 1982), Schlaganfall (LEIJON & BOIVIE 1989) und Mastektomie (KALSO ET AL. 1996) sowie atypische Gesichtsschmerzen als gut mit Amitriptylin therapierbar. (DWORKIN ET AL. 2007; FINNERUP ET AL. 2005)

Nicht signifikant besser als ein Placebo schneidet Amitriptylin bislang bei Phantomschmerzen (ROBINSON ET AL. 2004), durch HIV verursachte Neuropathien (KIEBURTZ ET AL. 1998; SHLAY ET AL. 1998), Rückenmarksverletzungen (CARDENAS ET AL. 2002), Tumorschmerzen bei fortgeschrittenem Tumorstadium und durch

Cisplatin hervorgerufene Schmerzen ab. (DWORKIN *ET AL.* 2007; FINNERUP *ET AL.* 2005)

Neben der symptomatischen Therapie wurde Amitriptylin in wenigen Studien auch auf seine Wirkung bezüglich der Schmerzprävention untersucht. Erfolgsversprechend ließen sich Schmerzen nach Herpes Zoster (BOWSHER 1997) und Mastektomie (KALSO *ET AL.* 1996) im Vergleich zu den Plazebogruppen deutlich abschwächen oder die Patienten blieben zu einem höheren Anteil sogar komplett schmerzfrei.



abgeändert aus SINDRUP *ET AL.* 2005

Abbildung 3: Numbers needed to treat für Amitriptylin

PNS = Periphere neuropathische Schmerzen, HZ = Schmerzen nach Herpes Zoster, PNP = schmerzhafte Polyneuropathie, ME = Schmerzen nach Mastektomie

ZNS = Zentrale neuropathische Schmerzen, SA = Schmerzen nach Schlaganfall, RR = Schmerzen nach Rückenmarksverletzung

Die Balken stellen das 95 Prozent Konfidenzintervall dar. Die Größe der Punkte korreliert positiv mit der Anzahl der an den Studien teilgenommenen Patienten.

Da Amitriptylin unter anderem durch das genetisch polymorphe Cytochrom-P₄₅₀-2D6-Enzym metabolisiert wird, muss die Dosis individuell eingestellt werden (SINDRUP *ET AL.* 2005). 2-3 Prozent der europäischen Bevölkerung sind extrem schnelle Metabolisierer, bei denen Amitriptylin in der Regel keine oder nur in ungewöhnlich hohen Dosen eine Wirkung erzielt. Demgegenüber wird das Enzym bei 5-10 Prozent der Bevölkerung nicht exprimiert, sodass es bei diesen Patienten zu starken, unerwünschten Nebenwirkungen kommen kann. (AKTORIES *ET AL.* 2005)

Anticholinerge Reaktionen und Sedierung dominieren in der Häufigkeitsverteilung deutlich (VADALOUCA *ET AL.* 2006). Diese Nebenwirkungen sind zwar in der Regel harmlos, können die Lebensqualität der Patienten jedoch stark einschränken und zu Complianceproblemen führen. Die Zahl der Patienten, unter denen statistisch einer die Therapie aufgrund von unerwünschten Wirkungen abbricht, wird analog zur NNT „Number needed to harm“ (NNH) genannt. Für schwache Nebenwirkungen infolge von Amitriptylineinnahme beträgt sie 6, demzufolge geben circa 17 Prozent der Patienten die Therapie auf (SAARTO & WIFFEN 2007).

Für starke Nebenwirkungen weist Amitriptylin eine NNH von 28 auf (SAARTO & WIFFEN 2007). Am gravierendsten ist der Einfluss auf die Herzfunktion, denn Amitriptylin kann ebenso wie andere Trizyklische Antidepressiva schwere Herzrhythmusstörungen hervorrufen. Bei einer Tagesdosis über 100 mg, die in der Schmerztherapie zwar nicht üblich ist, bei Non-Respondern oder extrem schnellen Metabolisierern jedoch durchaus eingesetzt werden, besteht ein 2,2-fach erhöhtes Risiko für einen Myokardinfarkt (RAY *ET AL.* 2004; SINDRUP *ET AL.* 2005; VADALOUCA *ET AL.* 2006).

Eine Zusammenfassung über die unerwünschten peripheren und zentralen Nebenwirkungen von Amitriptylin gibt Tabelle 5.

Periphere Nebenwirkungen	
mACh-Rezeptor	Mundtrockenheit, Akkommodationsstörungen, Mydriasis mit Gefahr eines Glaukomanfalls, Obstipation, Miktionsbeschwerden, Sinustachykardie
α_1 -Adrenozeptor	Orthostatische Hypotonie mit reflektorischer Tachykardie
Na ⁺ -Kanal	Erregungsleitungsstörungen am Herzen bis hin zum AV-Block
Zentrale Nebenwirkungen	
H ₁ -Rezeptor	Sedation, Schläfrigkeit, Gewichtszunahme
mACh-Rezeptor	Delirien, Verwirrtheit, Gedächtnisstörungen
NA-Transporter	Orthostatische Störungen, Tremor, Unruhe, sexuelle Dysfunktion
Serotonin-Transporter	Übelkeit, Kopfschmerzen, epileptische Anfälle, sexuelle Dysfunktion

aus AKTORIES ET AL. 2005

Tabelle 5: Periphere und zentrale Nebenwirkungen von Amitriptylin

Die Kontraindikationen für eine Therapie mit Amitriptylin ergeben sich aus den unerwünschten Wirkungen. Beispielsweise ist bei einer bekannten Epilepsie, bei bestehenden Herzrhythmusstörungen, einem Glaukomanfall in der Vorgeschichte oder Harnverhalt auf Trizyklische Antidepressiva zu verzichten und in einer anderen Substanzgruppe nach einer Alternative zu suchen (VADALOUCA ET AL. 2006). Medikamenteninteraktionen können bei Wirkstoffen auftreten, die ebenfalls durch das Cytochrom-P₄₅₀-2D6-Enzym metabolisiert werden und müssen insbesondere mit Blick auf die zum Teil starken Nebenwirkungen beachtet werden.

4.3 Nikotinischer Acetylcholinrezeptor

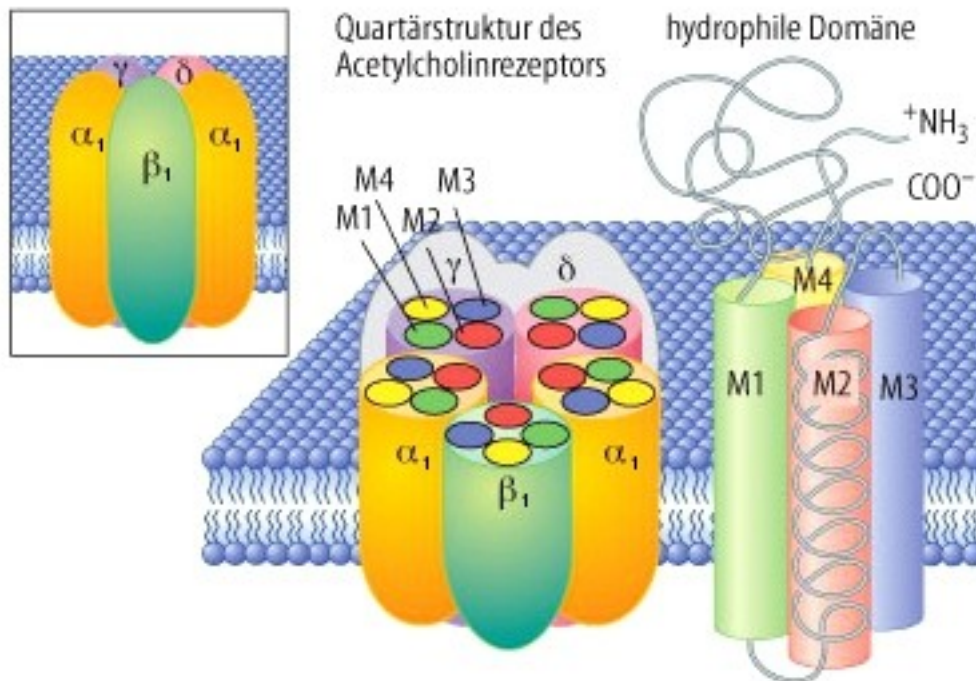
Nikotinische Acetylcholinrezeptoren (nACh-Rezeptoren) stellen einen der im letzten Kapitel aufgezählten möglichen Angriffspunkte für die Schmerz-reduzierende Wirkung von Amitriptylin dar.

Nikotinische ACh-Rezeptoren sind in Teilen des peripheren, zentralen und vegetativen Nervensystem sowie in der Skelettmuskulatur zu finden. Schon lange ist bekannt, dass sie sowohl präsynaptisch, postsynaptisch als auch an der motorischen Endplatte dank ihrer Membran-depolarisierenden Eigenschaft eine maßgeblich Rolle in der Signalübertragung und -modulation einnehmen (ROLE & BERG 1996). Darüber hinaus konnten nACh-Rezeptoren in der Axonmembran peripherer Nerven nachgewiesen werden, (MOALEM *ET AL.* 2005; SCHMELZ *ET AL.* 2003; STEEN & REEH 1993; TANELIAN 1991; VIZI & LENDVAI 1999; ZHANG *ET AL.* 2004), wo sie nach Aktivierung ebenfalls Membran-depolarisierend wirken (ARMETT & RITCHIE 1963; LANG *ET AL.* 2003), jedoch anscheinend nicht in der Lage sind Aktionspotenziale auszulösen (DIAMOND 1959; LANG *ET AL.* 2003). Die physiologische Funktion dieser axonalen Rezeptoren ist bislang noch ungeklärt. Diskutiert wird, ob sie für die Pathogenese neuropathischer Schmerzen von Bedeutung sind.

Nikotinische Acetylcholinrezeptoren sind aus fünf Peptidketten aufgebaut, die auch Untereinheiten genannt werden und deren Zusammensetzung abhängig von ihrer Lokalität stark variiert. Es sind insgesamt zehn α -Ketten (α 1- α 10), vier β -Ketten (β 1- β 4) und jeweils eine γ - δ - und ϵ - Kette bekannt. nACh-Rezeptoren an der motorischen Endplatte eines Erwachsenen bestehen zum Beispiel aus der Kombination (α 1)₂ β 1 ϵ δ (LUKAS *ET AL.* 1999), wohingegen Rezeptoren in der Axonmembran unmyelinisierter C-Fasern wahrscheinlich α 3-, α 5- und β 4-Untereinheiten aufweisen (LANG *ET AL.* 2003).

Alle Peptidketten enthalten vier Transmembransegmente M1 bis M4 (siehe Abbildung 4), von denen jeweils das negativ geladenen M2-Segment zur Bildung eines zentralen Kationenkanals beiträgt (CORRINGER, LE NOVÈRE & CHANGEUX 2000). Bei Bindung von Acetylcholinmolekülen an den Rezeptor öffnet sich der Kanal durch allosterische Effekte, es kommt zum Einstrom von Kationen in die

Zelle und die Membran depolarisiert. Findet eine Dauerstimulation statt, so desensibilisiert der Rezeptor, der Kanal schließt sich und kann für die Dauer der Refraktärzeit nicht geöffnet werden.

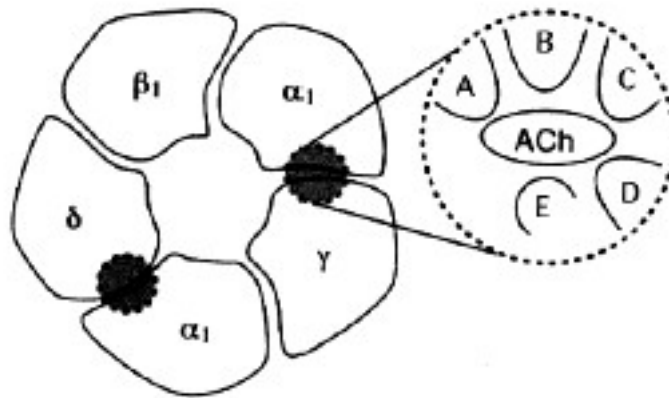


abgeändert aus LÖFFLER & PETRIDES 2003

Abbildung 4: Der molekulare Aufbau des nikotinischen Acetylcholinrezeptors an der motorischen Endplatte

Dargestellt ist das Rezeptorisomer des fetalen Skelettmuskels bestehend aus fünf Peptidketten der Kombination $(\alpha_1)_2\beta_1\gamma\delta$. Jede Peptidkette weist vier Transmembransegmente auf, von denen das jeweils zentral gelegene M2-Segment den Kationenkanal bildet.

Die Acetylcholinbindungsstellen sind in den extrazellulären N-terminalen Domänen zu finden (CLEMENTI ET AL. 2000). Sie werden je durch eine α -Kette zusammen mit einer beliebigen anderen Kette gebildet (GRUTTER & CHANGEUX 2001). Bei adulten nACh-Rezeptoren an der motorischen Endplatte beispielsweise fügen sich drei Domänen der α -Untereinheiten mit entweder zwei Domänen der γ - oder δ -Untereinheit zu zwei Acetylcholinbindungsstellen pro Rezeptormolekül zusammen (siehe Abbildung 5) (CLEMENTI ET AL. 2000).



aus CLEMENTI ET AL. 2000

Abbildung 5: Die Acetylcholinbindungsstelle des nikotinischen Acetylcholinrezeptors an der motorischen Endplatte

Es ist der Rezeptor eines Erwachsenen mit der Peptidkettenkombination $(\alpha_1)_2\beta_1\epsilon\delta$ gezeigt. Die drei Domänen A, B und C der beiden α -Untereinheiten bilden entweder mit zwei Domänen D und E der γ - oder δ -Untereinheit zwei Acetylcholinbindungsstelle pro Rezeptormolekül.

Neben Acetylcholin gibt es weitere Moleküle, die den nACh-Rezeptor aktivieren können. Am bekanntesten ist das namensgebende, natürliche Alkaloid Nikotin. Außerdem besitzt der nACh-Rezeptor extrazelluläre Bindungsstellen für kompetitive und nicht-kompetitive Antagonisten sowie für allosterische Modulatoren. So ist beispielsweise Amitriptylin ein nichtkompetitiver Antagonist für den Rezeptor (SCHOFIELD ET AL. 1981).

5. Die Konzeption dieser Arbeit

Die Pathogenese neuropathischer Schmerzen ist sehr komplex und nach wie vor nicht im Detail verstanden. Des Weiteren hat die klinische Erfahrung gezeigt, dass es derzeit leider nur wenige potente Wirkstoffe gegen neuropathische Schmerzen gibt. Eines der First Line Medikamente ist Amitriptylin, wobei noch unklar ist, über welchen Mechanismus die Schmerzreduktion erzielt wird. In dieser Arbeit wurde daher der Effekt von Amitriptylin auf die Erregbarkeit unmyelinisierter C-Fasern des Menschen untersucht, mit dem Ziel, anhand des beobachteten Wirkungsmechanismus neue Erkenntnisse über die Pathogenese neuropathischer Schmerzen zu erhalten.

Amitriptylin hemmt bekanntermaßen spannungsabhängige Ionenkanäle und agiert bereits in submikromolarer Konzentration als nichtkompetitiver Antagonist an nACh-Rezeptoren (PARK *ET AL.* 1998; SCHOFIELD *ET AL.* 1981), die in den letzten Jahren in der Axonmembran unmyelinisierter C-Fasern nachgewiesen werden konnten (MOALEM *ET AL.* 2005; SCHMELZ *ET AL.* 2003; STEEN & REEH 1993; TANELIAN 1991; VIZI & LENDVAI 1999; ZHANG *ET AL.* 2004). Daher standen diese Proteine im Fokus des Interesses und es ergab sich folgender Ablauf der Experimente:

Summenaktionspotenziale isolierter menschlicher Nervenfaszikel wurden extrazellulär abgeleitet, aufgezeichnet sowie die Amplitude und Latenz der Potenziale bestimmt. Zusätzlich konnten mittels Threshold Technik wichtige Parameter der Nervenfasererregbarkeit gemessen werden. Zu Anfang wurde die Erregbarkeitssteigerung der Nervenfasern durch Nikotin in Kontrollversuchen charakterisiert, um danach die Wirkung von Amitriptylin in verschiedenen Konzentrationen auf diese Erregbarkeitssteigerung zu untersuchen. Die durch Nikotin ausgelöste Erregbarkeitssteigerung wurde konzentrationsabhängig und bereits bei sehr geringen Konzentrationen von Amitriptylin reduziert, weshalb schon zu diesem Zeitpunkt der Schluss nahe lag, dass Amitriptylin nACh-Rezeptoren hemmt. Doch zusätzlich veränderten hohe Amitriptylinkonzentrationen auch die Amplitude und Latenz der Summenaktionspotenziale geringfügig, was ein Zeichen für die Hemmung spannungsabhängiger Natriumkanäle hätte sein können. Daher

wurden die durch Amitriptylin vermittelten Effekte von denen des etablierten Natriumkanalblockers Tetrodotoxin abgegrenzt, um spannungsabhängige Natriumkanäle mit größtmöglicher Wahrscheinlichkeit als Wirkort von Amitriptylin auszuschließen.

6. Material und Methodik

6.1 Nervenpräparate

Für die Experimente dieser Arbeit wurden menschliche Nervi surali verwendet, die aus Biopsien im Rahmen der Diagnosestellung von Polyneuropathien unklarer Genese an der Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität entstammten. Für dieses Vorgehen gaben die Patienten vor dem Eingriff ihr schriftliches Einverständnis und die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität München erteilte eine Genehmigung (Projekt Nr. 348/00).

Die 15 bis 25 mm langen Nervenstücke wurden unter dem Mikroskop vom umliegenden Bindegewebe freipräpariert und in die einzelnen Faszikel getrennt, sodass pro Nervenpräparat je nach Anzahl der enthaltenen Faszikel mehrere Untersuchungen durchgeführt werden konnten. In der Zeit zwischen der Entnahme und den Messungen wurden die Nervensegmente bei 8°C in einer mit der Puffersubstanz HEPES pH-kontrollierten Elektrolytlösung aufbewahrt. Unmittelbar vor den Versuchen wurde das Perineurium sorgfältig von den Faszikeln entfernt. Im Allgemeinen mussten bei allen Tätigkeiten am Nervenmaterial insbesondere Quetschungen und Einklemmungen der Faszikel sowie Zugkräfte entlang der Faszikellängsachse vermieden werden, um eine Verletzung des intakten Versuchsmaterials zu verhindern.

Die Messungen wurden an insgesamt 18 isolierten Faszikeln von 7 Nervi surali durchgeführt. Zum Entnahmezeitpunkt waren die ausschließlich männlichen Patienten zwischen 44 und 84 Jahre alt, das mittlere Alter betrug 66 Jahre.

6.2 Messanordnung

Der isolierte Nervenfaszikel wurde an seinen beiden Enden behutsam in zwei sich gegenüberliegende Saugelektroden einer runden Kammer eingebracht, sodass der Faszikel die mit Lösung gefüllte Kammer auf einer Länge von circa 5 mm frei durchzog. Die Kammer fasste ein Flüssigkeitsvolumen von 1 ml und wurde während der Messung über einen Zulauf- und einen Absaugschlauch

kontinuierlich mit 6 bis 8 ml der Versuchslösungen pro Minute perfundiert. Die Lösungen wurden durch ein Wasserbad auf 32°C erwärmt und der pH-Wert durch Begasung mit einem Gemisch aus 95% O₂ und 5% CO₂ konstant auf 7,4 gehalten. Die künstliche Organlösung enthielt 118,0 mM NaCl, 3,0 mM KCl, 1,5 mM CaCl₂, 1,0 mM MgCl₂, 5,0 mM D-Glucose, 25 mM NaHCO₃ und 1,2 mM NaH₂PO₄. Während der Messung wurde mit mehreren Gefäßen gearbeitet, so enthielt ein Kolben nur die Organlösung und weitere jeweils die Organlösung plus die auf ihre Wirkung zu untersuchende Substanz. Die Applikation erfolgte über den Zulaufschlauch, der die Lösung aus einem beliebigen Kolben im Wasserbad zur Kammer mit dem eingelegten Nerv leitete. (siehe Abbildung 6)

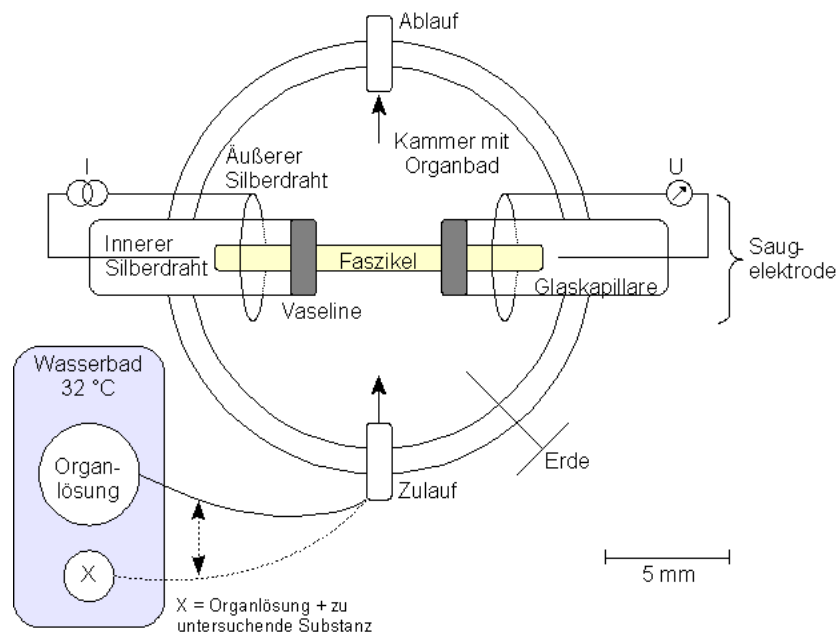


Abbildung 6: Vereinfachte schematische Darstellung der Messanordnung mit Blick von oben

Das Wasserbad entspricht in seiner Größe nicht dem angegebenen Maßstab, sondern ist verkleinert dargestellt.

Um Aktionspotenziale zu generieren und aufzuzeichnen, wurden die bereits erwähnten zwei Saugelektroden verwendet. Eine Saugelektrode bestand jeweils aus einer Glaskapillare, die das eine Ende des Nervenfaszikels hielt, und zwei Silberdrähten. Ein Silberdraht wurde außen an der Glaskapillare im Organbad und der andere in der Glaskapillare jenseits der Vaselineisolierung befestigt. Diese Anordnung der Elektroden erlaubte Untersuchungen mit einer extrazellulären Ableittechnik.

Die eine Saugelektrode stimuliert den Faszikel mittels einer Stromquelle konstant mit 0,5 Hz und löste Summenaktionspotenziale aus, die andere Saugelektrode leitete das entstehende Spannungssignal ab.

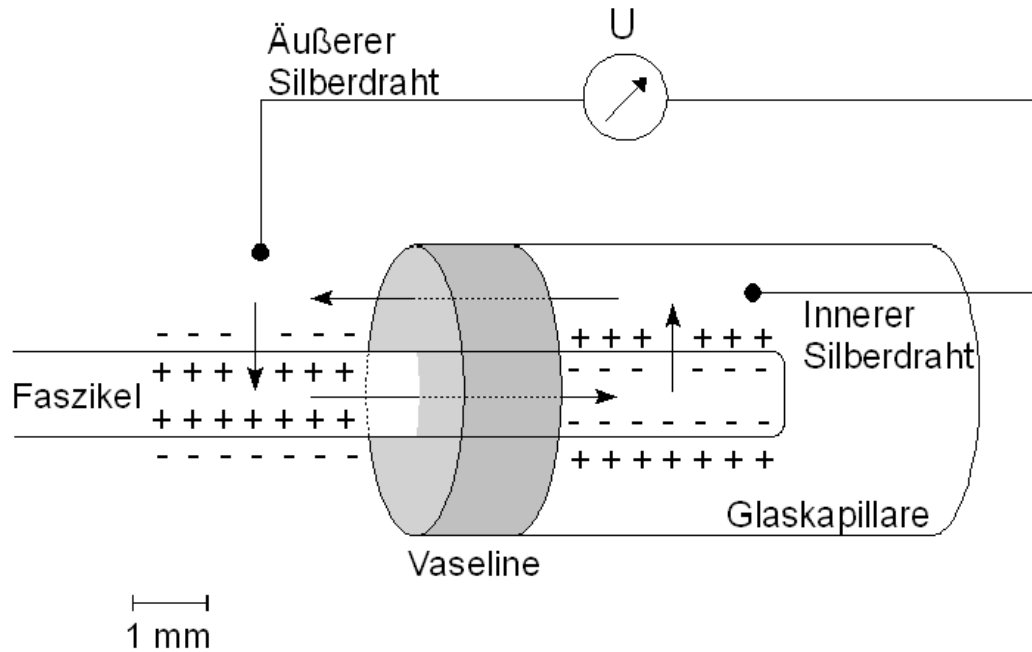


Abbildung 7: Vergrößerte schematische Abbildung der elektrophysiologischen Vorgänge an der Ableitsauglektrode und dem eingelegten Faszikel

Die Silberdrahtspitzen befinden sich beide extrazellulär in unmittelbarer Umgebung des Faszikels. Wird ein Summenaktionspotenzial aus der Richtung der Stimulusquelle den Faszikel entlang geleitet, so wird eine Potenzialdifferenz aufgrund der unterschiedlichen extrazellulären Ladungen zwischen den Silberdrähten registriert. Das Signal wird durch die Vaselineisolation, die einen höheren Widerstand zwischen den Silberdrähten schafft, verstärkt.

6.3 Threshold Tracking

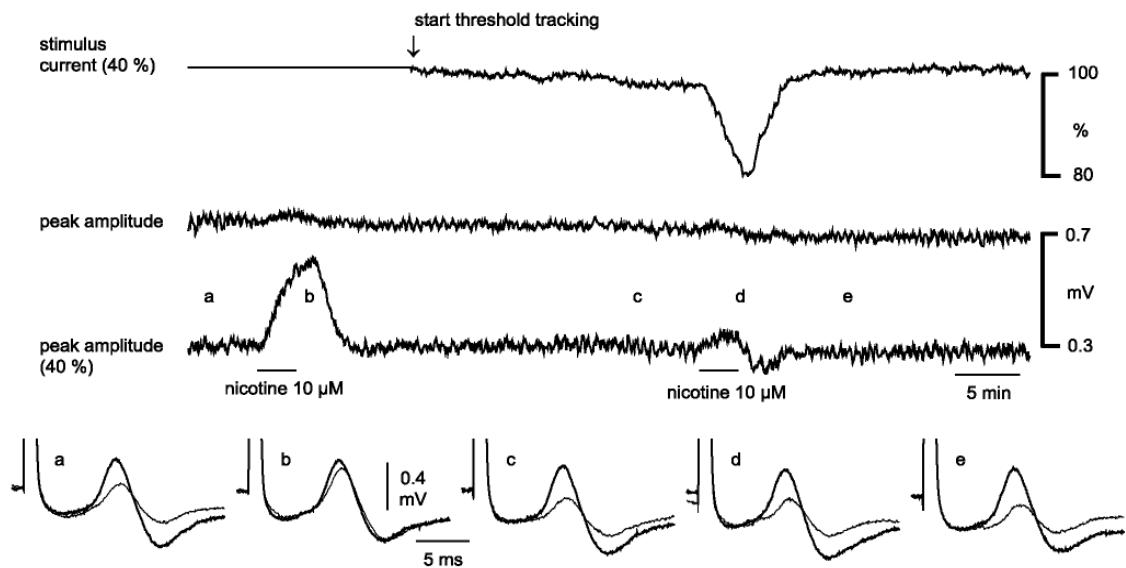
Die axonale Erregbarkeit peripherer C-Faser-Faszikel wurde mittels Threshold Tracking gemessen, einer Technik, bei der der Stimulusstrom zur Auslösung eines C-Faser-Summenaktionspotenzials mit festgelegter Antwortstärke bestimmt wird.

Das Threshold Tracking wurde mit dem Computerprogramm QTRAC (Institute of Neurology, London) durchgeführt, welches ursprünglich für In-Vivo-Experimente an menschlichen Nerven geschrieben wurde (BOSTOCK, CIKUREL & BURKE 1998), für elektrophysiologische Ex-vivo-Experimente an isolierten Nerven jedoch ebenfalls sehr gut geeignet ist (GRAFE, QUASTHOFF, GROSSKREUTZ & ALZHEIMER 1997; IRNICH, BURGSTHALER, BOSTOCK & GRAFE 2001; LANG *ET AL.* 2002). QTRAC steuerte über eine Datenerfassungsschnittstelle (DATA Translation DT2812, Marlboro, MA, USA) den Stimulusgenerator (A395, WPI, Sarasota, F1, USA), der den Faszikel mit einer Frequenz von 0,5 Hz und einer maximalen Stromstärke von 1 μ A für jeweils 100 ms reizte.

In QTRAC wurden drei verschiedene Reiz-Antwort-Kanäle parallel genutzt, die sich stetig wiederholend in zwei Sekunden Intervallen der Reihe nach durchliefen. In Kanal 1 wurde der Faszikel konstant supramaximal stimuliert, sodass folglich größtmögliche Amplituden der Summenaktionspotenziale (SAP) erzeugt wurden. QTRAC ermittelte von den maximalen Antworten aus Kanal 1 in jedem Durchlauf jeweils 40% der Amplitude und stimulierte den Faszikel in Kanal 2 mit der dafür benötigten Stromstärke. Es wurden 40% für das Threshold Tracking gewählt, da die Änderungen der Stimulusstromstärke in Abhängigkeit von der axonalen Erregbarkeit in diesem Bereich am deutlichsten sind. Bei gleichbleibender SAP-Amplitude besagt eine Verringerung der benötigten Stromstärke eine Zunahme der axonalen Erregbarkeit, umgekehrt zeigt eine Vergrößerung der Stimulusstromstärke eine Abnahme der Erregbarkeit an. In Kanal 3 wurde der Faszikel, ebenso wie in Kanal 2, mit einem automatisch regulierten Stimulus auf den 40% Wert der maximalen SAP-Antwort gereizt. Zudem wurde 30 ms vor dem Hauptstimulus ein supramaximaler Präpuls gesetzt, um die Änderungen der axonalen Erregbarkeit nach dem Aktionspotenzial zu messen (MOALEM-

TAYLOR ET AL. 2007).

Neben der Regulierung des Stimulusgenerators erfasste QTRAC die abgeleiteten Messwerte und stellte sie unmittelbar auf dem Computerbildschirm dar. Üblicherweise wurde die zum Stimulieren verwendete Stromstärke gleichermaßen wie die Latenz zwischen Reiz und Antwort sowie die Amplitude der SAPs jeweils als Funktion über die Zeit graphisch aufgetragen.



aus LANG ET AL. 2005

Abbildung 8: Direkter Vergleich zwischen Messungen unter konstantem und variablem Stimulusstrom an einem isolierten Faszikel eines menschlichen *N. suralis*

Es wurden die C-Faser SAP-Amplituden unter supramaximaler Stimulierung (peak amplitude) und die Antworten unter Stimulierung auf 40% des maximalen Wertes (peak amplitude (40%)) sowie die benötigte Reizstromstärke (stimulus current) zur Stimulierung auf 40% des Antwortmaximums kontinuierlich aufgezeichnet. Die Messung beginnt mit einem konstanten Stimulusstrom (a). Die Applikation von Nikotin ändert kaum etwas an der maximalen Antwort, während die Amplitude der submaximalen Antwort als Zeichen der Zunahme der axonalen Erregbarkeit kurzzeitig stark ansteigt (b). Bei der Messung unter Threshold Tracking und dementsprechend einem variablen Stimulusstrom (c) führt die gleiche Verabreichung von Nikotin infolge der erhöhten Erregbarkeit des Faszikels zu einer signifikanten Abnahme der benötigten Stromstärke. Die supramaximale Antwort weist erneut lediglich minimale Veränderung auf und die submaximale Antwort zeigt leichte Schwankungen (d), die durch die geringe zeitliche Verzögerung aufgrund der computerbasierten Steuerung des Stimulusgenerators bedingt sind. Am unteren Rand der Abbildung sind jeweils typische Summenaktionspotenziale bei supramaximaler Stimulierung und Stimulierung auf 40% des Maximums zu den Zeitpunkten a-e dargestellt.

6.4 Verwendete Chemikalien

Es wurden Nikotin (nicotine hydrogen tartrat salt), Amitriptylin (amitriptyline hydrochloride) und Tetrodotoxin verwendet, die alle von der Firma Sigma aus Taufkirchen stammten. Die Lösungen wurden jeweils unmittelbar vor den Versuchen hergestellt.

7. Ergebnisse

7.1 Ableitung von Summenaktionspotenzialen

Bei der elektrischen Stimulation eines Faszikels des Nervus suralis wurden Summenaktionspotenziale ausgelöst, die abhängig von der verwendeten Stromstärke verschiedene Komponenten aufwiesen (siehe Abbildung 9).

Bei geringer Stromstärke konnten zunächst nur Aktionspotenziale der dicksten und myelinisierten Nervenfasern ausgelöst werden. So war bei einer Stromstärke von $12,5 \mu\text{A}$ und einer Stimulusdauer von $0,1 \text{ ms}$, das heißt bei $1,25 \text{ nC}$, lediglich ein Peak für die $\text{A}\alpha$ - und β -Fasern zu registrieren (siehe Tabelle 1 auf Seite 8). Wurde die Stromstärke bei gleicher Stimulusdauer auf $62,5 \mu\text{A}$ erhöht, ließ sich der durch die etwas dünneren und weniger myelinisierten $\text{A}\delta$ -Fasern verursachte Peak erkennen. Da die Leitungsgeschwindigkeit mit abnehmendem Axondurchmesser aufgrund des daraus folgenden höheren inneren Längswiderstands geringer wird, wies der $\text{A}\delta$ -Peak eine größere Latenz zum Stimulus auf als der Peak der dickeren und damit schneller leitenden $\text{A}\alpha$ - und β -Fasern. Erhöhte man die Stimulusintensität weiter, indem beispielsweise die Stimulusdauer bei $37,5 \mu\text{A}$ auf 1 ms verlängert wurde, so konnte mit noch größerer Latenz ein erster kleiner Peak für die unmyelinisierten C-Fasern registriert werden. Bei erneuter Steigerung des Stimulus entwickelten sich im Falle einiger Faszikel zwei Spitzen in diesem Peak, die unterschiedlich schnell leitende C-Faser-Populationen repräsentieren.

Für die im Folgenden dargestellten Messungen wurde in QTRAC (siehe Kapitel 5.3) ein Zeitfenster gewählt, das nur den durch die langsam leitenden C-Fasern verursachten Peak beinhaltete. Auf diese Weise konnten die Messgrößen für die Nervenfasererregbarkeit ausschließlich für unmyelinisierte C-Fasern bestimmt werden und andere Fasertypen sowie Stimulusartefakte blieben ohne Einfluss auf die Ergebnisse.

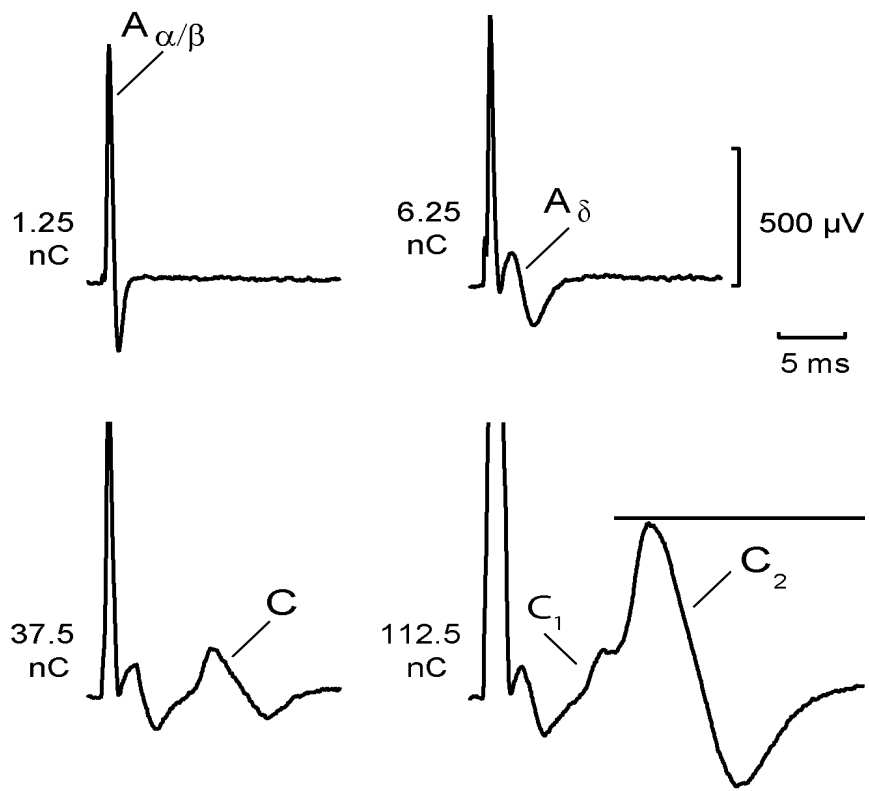


Abbildung 9: Die verschiedenen Komponenten der Summenaktionspotenziale eines Faszikels des menschlichen N. suralis in Abhängigkeit von der Stimulusintensität

Der Balken im Summenaktionspotenzial unten rechts stellt das Zeitfenster der Messungen dar.

7.2 Die Wirkung von Nikotin auf die Erregbarkeit unmyelinisierter Nervenfasern

Zunächst wurde die Wirkung von Nikotin auf die Erregbarkeit unmyelinisierter Nervenfasern dargestellt.

Nervenfaszikel wurden mit einer konstanten Frequenz von 0,5 Hz sowie einer Stimulusdauer von 1 ms gereizt, Nikotin wurde in einer Konzentration von 10 μM für eine Dauer von 1,5 Minuten in das Organbad appliziert und die Summenaktionspotenziale wurden mit Hilfe von QTRAC abgeleitet. Dabei lag der Fokus auf der Amplitude und der Latenz des Summenaktionspotenzials bei supramaximaler Stimulation sowie der benötigten Reizstärke, um 40% der maximalen Amplitude ohne und mit supramaximalem Präpuls zu erzielen. Die Amplitude wurde mittels der Differenz zwischen den maximalen Ausschlägen in beide Richtungen innerhalb des Zeitfensters errechnet. Die Latenz stellt die Zeit zwischen Stimulus und der zur Hälfte erreichten maximalen Amplitude dar. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 10.

Nach der Zugabe von Nikotin zum Organbad ließ sich eine geringe Zunahme der maximalen Amplitude feststellen. Außerdem erhöhte sich auch die Amplitude, die 40% des maximalen Wertes umfasste, und überschritt somit ihren Sollwert. Folglich musste QTRAC im Sinne des Threshold Trackings die Stromstärke reduzieren, um die Amplitude auf ihrem Sollwert zu halten. Die Tatsache, dass eine geringere Stromstärke nötig war, um die Sollamplitude zu erzeugen, bedeutet, dass die Nervenfasererregbarkeit zugenommen hatte. Des Weiteren änderte sich die nach einem Präpuls auftretende Übererregbarkeit der Nervenfasern von circa 10% auf eine Untererregbarkeit von 2-3% während und kurzzeitig nach der Nikotingabe. Dieser, durch Nikotin ausgelöste, Wechsel von Über- zu Untererregbarkeit lässt sich mit einer Membrandepolarisation erklären (MOALEM-TAYLOR *ET AL.* 2007).

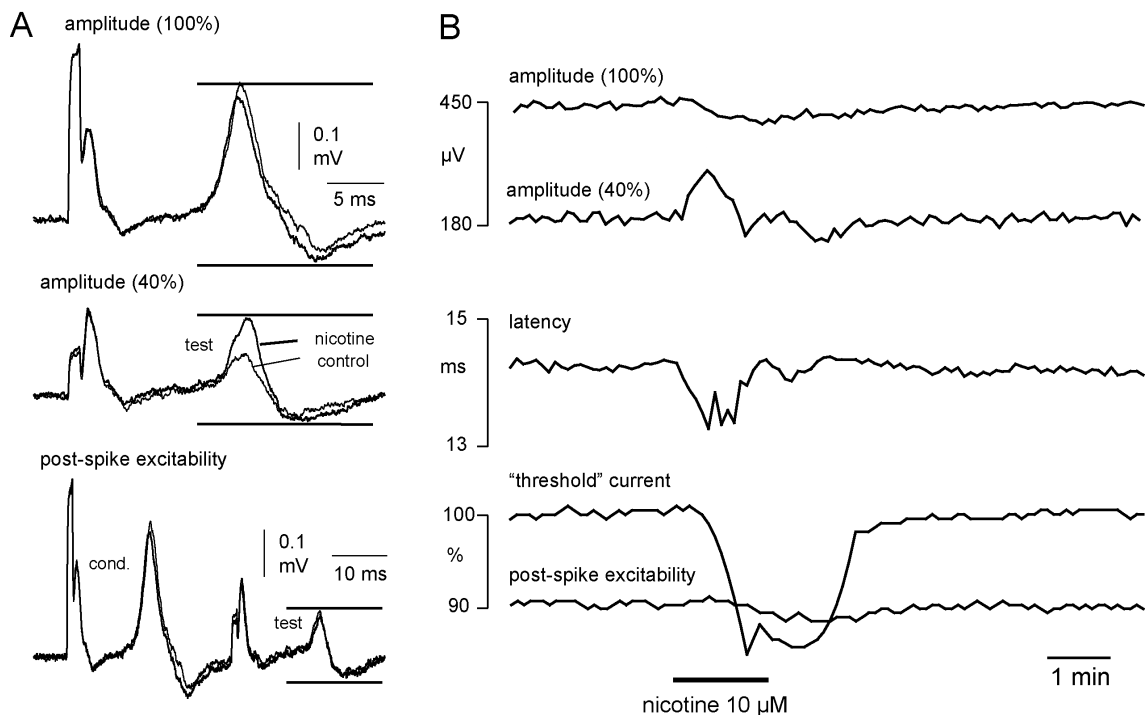


Abbildung 10: Die Wirkung von Nikotin auf die Erregbarkeit unmyelinisierter Nervenfasern

Kanal 1 in QTRAC zeigt die Summenaktionspotenziale (SAP) nach supramaximaler Stimulation. Die Amplitude errechnete sich durch die Differenz zwischen den maximalen Ausschlägen in beide Richtungen innerhalb des Zeitfensters, veranschaulicht durch die Höhe der Balken. Kanal 2 und 3 stellen die SAP-Antworten unter Stimulation auf 40% des maximalen Wertes dar, wobei Kanal 3 zusätzlich noch 30 ms zuvor einen supramaximalen Präpuls setzte. Die Stromstärke, die zur Auslösung dieser auf 40% des Maximums reduzierten SAP-Antworten benötigt wurde, ist ein Maß für die Erregbarkeit der Nervenfasern ohne („threshold“ current) oder mit Präpuls (post-spike excitability).

Nach der Applikation von 10 μM Nikotin für 1,5 Minuten (die Applikationsdauer ist an dem beschrifteten Balken ablesbar) erhöhte sich die Amplitude der Summenaktionspotenziale in Kanal 2, sie lag bei über 40% der maximalen Amplitude. Im Zuge des Threshold Trackings musste QTRAC daher die Stromstärke („threshold“ current) reduzieren um die Amplitude auf ihrem Sollwert zu halten. Die Kurve des „threshold“ current schneidet die darunter liegende Kurve der Nervenfasererregbarkeit nach einem Präpuls und verläuft während sowie kurzzeitig nach der Nikotinapplikation auf niedrigerem Niveau. Dieser Kurvenverlauf bedeutet, dass die nach einem Präpuls normalerweise auftretende Übererregbarkeit der Nervenfasern durch Nikotin in eine Untererregbarkeit verändert wurde. Der Wechsel von Über- zu Untererregbarkeit spricht für eine Membrandepolarisation (MOALEM-TAYLOR ET AL. 2007).

7.3 Die Wirkung von Amitriptylin auf die durch Nikotin ausgelöste Erregbarkeitssteigerung unmyelinisierter Nervenfasern

Im nächsten Schritt wurde die Wirkung von Amitriptylin auf die zuvor nachgewiesene Erregbarkeitssteigerung unmyelinisierter Nervenfasern durch Nikotin untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 zu sehen.

In Kontrollversuchen (n=11) wurden 10 μM Nikotin mehrmals 1,5 Minuten lang in Abständen von 20 Minuten appliziert. Die Steigerung der Nervenfasernerregbarkeit war nach jeder Applikation in gleichem Maß vorhanden, was eine Toleranzentwicklung ausschließt.

In den nachfolgenden Versuchen wurde das Schema der Nikotinapplikation beibehalten, zusätzlich jedoch nach der ersten Applikation 3 μM Amitriptylin verabreicht. Die erste Gabe von Nikotin führte wie gewohnt zu einer starken Erhöhung der Nervenfasernerregbarkeit. Nach der Verabreichung von Amitriptylin zeigte sich, dass alle weiteren Nikotinapplikationen eine deutlich reduzierte Wirkung hatten. Die Erregbarkeit der Nervenfasern war bei der zweiten Nikotinapplikation im Mittel um fast 60% gegenüber der ersten reduziert. Die Statistik der Messungen ist in Abbildung 13 gezeigt. Anhand dieser Daten ließ sich ein EC_{50} -Wert für Amitriptylin von $2,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) bestimmen.

Der Erregbarkeits-hemmende Effekt von Amitriptylin war selbst 40 Minuten nach dem Ende der Verabreichung noch deutlich zu sehen und ist somit als sehr langanhaltend einzuschätzen.

Entgegen der starken Wirkung auf die Nervenfasernerregbarkeit ließen sich bei einer Amitriptylinkonzentration von 3 μM nur minimale Veränderungen der Amplitude und der Latenz der Summenaktionspotenziale nach supramaximaler Reizung feststellen. Nachfolgend wurde diese Beobachtung näher untersucht.

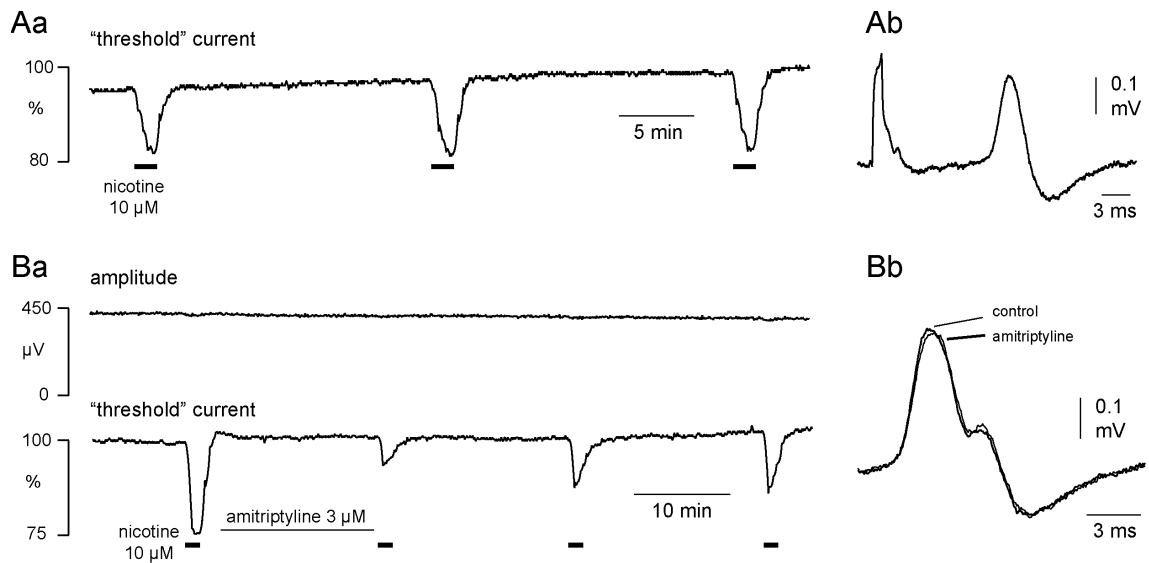


Abbildung 11: Die Wirkung von Amitriptylin auf die durch Nikotin ausgelöste Erregbarkeitssteigerung unmyelinisierter Nervenfasern

Aa Ein typischer Kontrollversuch zeigt, dass Nikotin die Nervenfasernerregbarkeit bei mehrmaliger Applikation immer um das gleiche Maß steigerte. Es gab daher keine Anzeichen für eine Tachyphylaxie.

Ab Beispielhaftes Summenaktionspotenzial nach supramaximaler Stimulation.

Ba Nach der Verabreichung von Amitriptylin war die durch Nikotin verursachte Erregbarkeitssteigerung der Nervenfasern deutlich und langanhaltend reduziert.

Bb Die Wirkung von Amitriptylin auf die Amplitude und Latenz der mit supramaximaler Stimulation ausgelösten Summenaktionspotenziale war minimal.

7.4 Die Wirkung von Amitriptylin in Abhängigkeit von seiner Konzentration

Um den Einfluss der Konzentration von Amitriptylin auf die Wirkung zu prüfen, wurden Versuche mit 1 µM, 3 µM und 10 µM durchgeführt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 12 und 13 dargestellt.

Das Schema der Nikotinapplikation wurde wie in den Versuchen zuvor fortgeführt, das heißt es wurden 10 µM Nikotin für jeweils 1,5 Minuten in Intervallen von 20 Minuten verabreicht. Zusätzlich wurde Amitriptylin in aufsteigender Konzentration von 1 µM über 3 µM bis hin zu 10 µM gegeben.

Eine Konzentration von 1 μM Amitriptylin verursachte bereits eine deutliche Reduktion des Erregbarkeits-steigernden Effekts durch Nikotin (um $33,7 \pm 3\%$, $n=5$), wohingegen Veränderungen der Summenaktionspotenziale, eine Verringerung der Amplitude ($3,3 \pm 2,8\%$, $n=5$) sowie eine Verkürzung der Latenz ($1,2 \pm 1,7\%$, $n=5$) nicht signifikant waren. 3 μM Amitriptylin verringerten die Wirkung von Nikotin noch etwas stärker, zusätzlich ließen sich minimale Veränderungen der Amplitude und Latenz erkennen. 10 μM Amitriptylin verursachten schließlich eine ausgeprägte Reduktion der durch Nikotin ausgelösten Steigerung der Nervenfasererregbarkeit sowie eine leicht verringerte Amplitude und verlängerte Latenz der Summenaktionspotenziale.

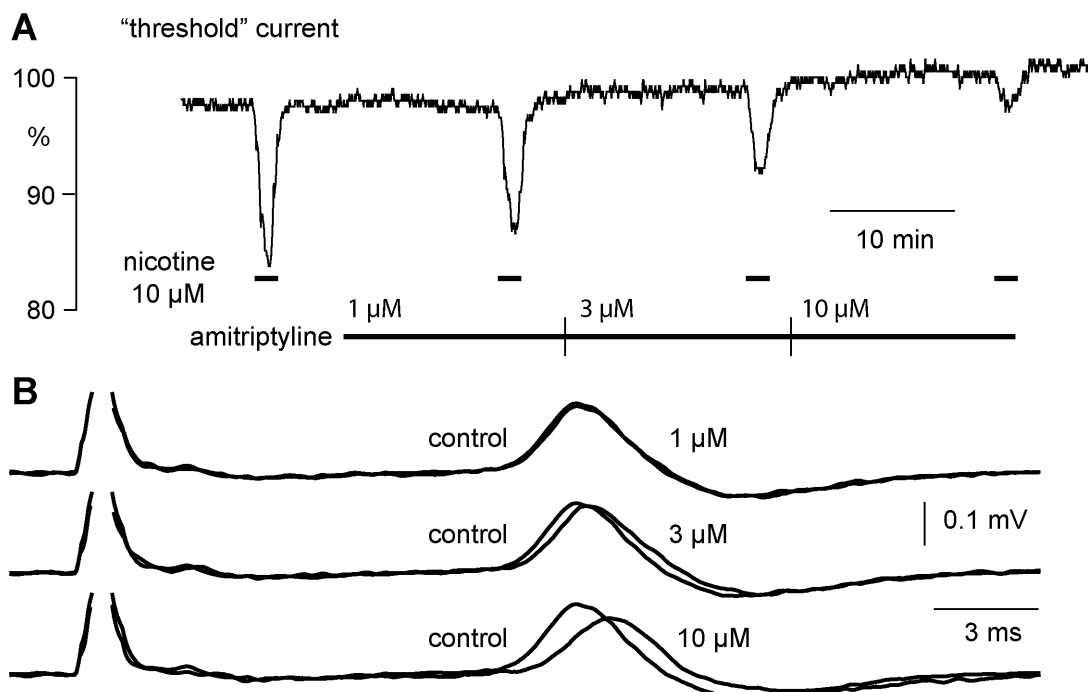


Abbildung 12: Die Wirkung von Amitriptylin in Abhängigkeit von seiner Konzentration

A Bereits bei 1 μM Amitriptylin war eine Reduktion der durch Nikotin verursachten Steigerung der Nervenfasererregbarkeit nachweisbar. Je höher die Amitriptylinkonzentration, desto stärker diese Wirkung.

B Bei 1 μM Amitriptylin war noch kein Effekt auf die Amplitude und Latenz der durch supramaximale Stimulation ausgelösten Summenaktionspotenziale vorhanden. Minimale Veränderungen waren bei 3 μM Amitriptylin zu erkennen. Doch erst 10 μM Amitriptylin verringerten die Amplitude und verlängerte die Latenz deutlich.

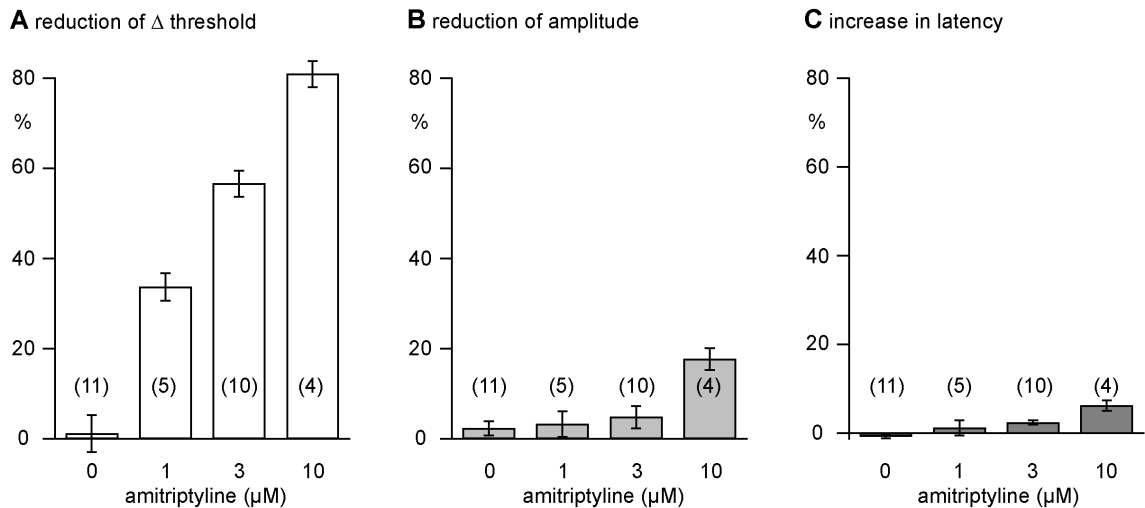


Abbildung 13: Statistik der konzentrationsabhängigen Wirkung von Amitriptylin auf die durch Nikotin verursachte Erregbarkeitssteigerung von unmyelinisierten Nervenfasern

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von (n) Messungen.

Für die Reduktion der Nervenfasererregbarkeit durch Nikotin gilt ein EC_{50} -Wert von $2,6 \pm 0,2 \mu\text{M}$. Er wurde mittels einer Ausgleichskurve unter Zuhilfenahme des Programms IgorPro errechnet, welches den Levenberg-Marquardt Algorithmus zur Bestimmung der kleinsten Quadrate benutzt.

7.5 Die Wirkung von Amitriptylin und Tetrodotoxin im Vergleich

Zum Schluss wurde die Wirkung von 10 μM Amitriptylin auf die durch Nikotin ausgelöste Steigerung der Erregbarkeit mit der Wirkung von 10 nM Tetrodotoxin verglichen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 und 15 dargestellt.

Nikotin wurde, wie bei den vorherigen Versuchen, in einer Konzentration von 10 μM für jeweils 1,5 Minuten in 20 Minuten Abständen zum Organbad hinzugefügt. Nach zwei Kontrollen mit Nikotin wurden 10 nM Tetrodotoxin verabreicht und bis einschließlich der dritten Nikotinapplikation dessen Wirkung erfasst. Danach wurde Tetrodotoxin ausgewaschen und im üblichen Intervall eine Kontrolle mit Nikotin angeschlossen, um sicher zu gehen, dass die Wirkung von Tetrodotoxin bereits abgeklungen war, bevor 10 μM Amitriptylin gegeben wurden. Bei weiteren Nikotinapplikationen konnte die Wirkung des Amitriptylins direkt mit

der des zuvor verabreichten Tetrodotoxins verglichen werden.

Tetrodotoxin führte zu einer eindeutigen Amplitudenverminderung und Latenzverlängerung der durch supramaximale Stimulation ausgelösten Summenaktionspotenziale. Darüber hinaus erhöhte es in den QTRAC Kanälen 2 und 3 die Stromstärke, die zur Aufrechterhaltung von Summenaktionspotenzialen mit einer Amplitude von 40% der maximalen Antwort aus Kanal 1 benötigt wurde. Es minderte demzufolge die Erregbarkeit der Nervenfasern. Die Erregbarkeitssteigerung durch Nikotin beeinflusste Tetrodotoxin jedoch nicht. Die Wirkung von Tetrodotoxin hielt nach dem Ende der Applikation nicht lange an und war in den Ableitungen schon bald nicht mehr zu sehen.

Demgegenüber führte die Applikation von Amitriptylin nur zu einer geringen Abnahme der Amplitude und zu einer kleinen Zunahme der Latenz der C-Faser-Summenaktionspotenziale. Außerdem beeinflusste es die Erregbarkeit der Nervenfasern im Allgemeinen nicht, die Erregbarkeitssteigerung durch Nikotin jedoch reduzierte es stark. Amitriptylin und Tetrodotoxin zeigten folglich sehr unterschiedliche Effekte. Dies war auch nach dem Auswaschen der Substanzen zu sehen. Die Wirkung von Amitriptylin war im Gegensatz zu der von Tetrodotoxin sehr lange nachweisbar.

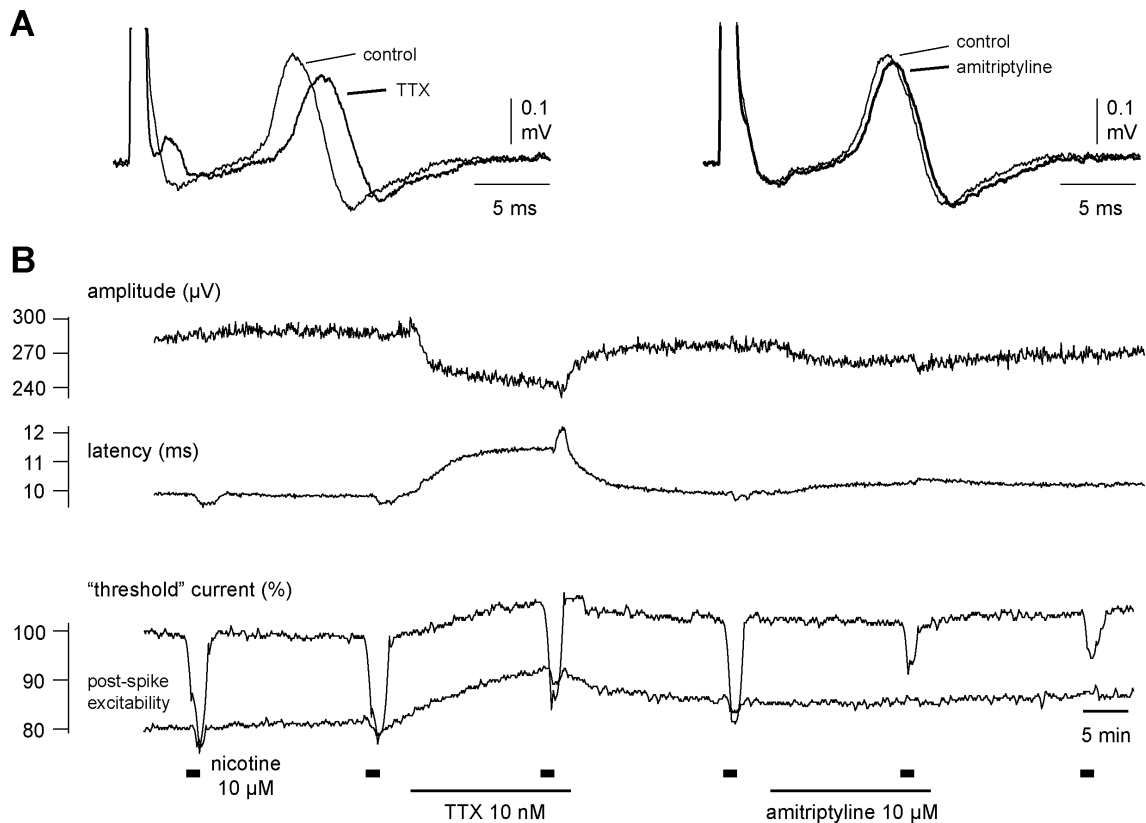


Abbildung 14: Die Wirkung von Amitriptylin und Tetrodotoxin im Vergleich

A Die durch supramaximale Stimulation erzeugten Summenaktionspotenziale veränderten sich unter Tetrodotoxin stark, die Amplitude verringerte sich und die Latenz nahm zu. Amitriptylin hingegen hatte im Vergleich dazu nur einen geringen Effekt.

B Die Gabe von Tetrodotoxin führte zu einem Anstieg des „threshold current“, was bedeutet, dass sich die allgemeine Erregbarkeit der Nervenfasern verringerte. Die Erregbarkeits-steigernde Wirkung von Nikotin beeinflusste Tetrodotoxin jedoch nicht, denn der „threshold current“ wurde im gleichen Maße reduziert wie bei den Kontrollen. Bereits ein Intervall nach dem Ende der Tetrodotoxineinwirkung herrschten wieder Kontrollbedingungen. Unter Amitriptylin blieb die allgemeine Erregbarkeit der Nervenfasern konstant und der Erregbarkeits-steigernde Effekt von Nikotin wurde erheblich und langanhaltend verringert.

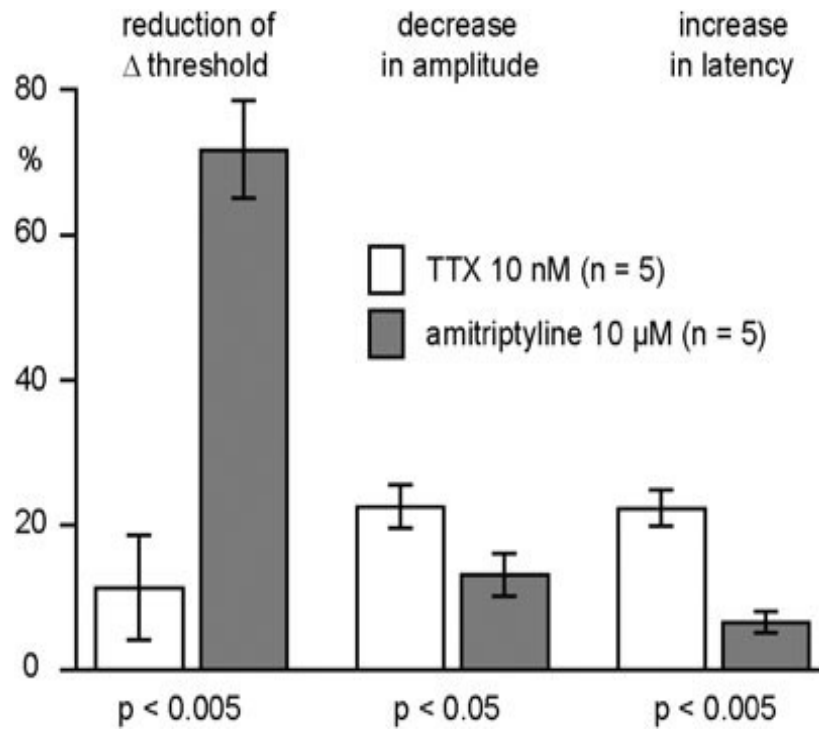


Abbildung 15: Statistik des Vergleichs zwischen der Wirkung von Amitriptylin und Tetrodotoxin

Die Signifikanz wurde mittels gepaartem Student-t-Test ermittelt.

8. Diskussion

8.1 Die Interpretation der Ergebnisse

Die wichtigste Schlussfolgerung aus den Versuchen ist, dass Amitriptylin in sehr geringen Konzentrationen nACh-Rezeptoren hemmt, die sich in der Axonmembran menschlicher, unmyelinisierter C-Fasern befinden.

Diese Schlussfolgerung ergibt sich aus folgenden Überlegungen:

Nikotin, ein natürlicher Agonist des nACh-Rezeptors, steigerte die Erregbarkeit der Nervenfasern. In Anwesenheit von bereits geringen Dosen Amitriptylin war diese Wirkung von Nikotin deutlich geringer. Es liegt daher nahe zu allererst an eine Hemmung der nACh-Rezeptoren durch Amitriptylin zu denken. Zumal bereits in der Vergangenheit nachgewiesen wurde, dass Amitriptylin aufgrund seiner Molekülstruktur ein passender Antagonist von nACh-Rezeptoren ist (ARIAS, BHUMIREDDYA & BOUZAT 2006; RITCHIE & ARMETT 1963).

Nichtsdestoweniger müssen bei der Frage nach der Ursache des beobachteten Effekts auch die anderen, potenziellen Wirkorte von Amitriptylin berücksichtigt werden. Denn wie bereits in der Einleitung erläutert ist bekannt, dass Amitriptylin neben den nACh-Rezeptoren auch an Ionenkanälen peripherer Nervenfasern wirkt. Die durch supramaximale Stimulation ausgelösten Summenaktionspotenziale waren nach Amitriptylingabe leicht verändert, die Amplitude nahm geringfügig ab und die Latenz verlängerte sich minimal. Veränderungen an den Summenaktionspotenzialen lassen auf die Beteiligung von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Na_v -Kanäle), schließen, da sie für die Depolarisation während eines Aktionspotenzials verantwortlich sind und ihre Hemmung eine solche Reaktion vermuten ließe. Um auszuschließen, dass Na_v -Kanäle für die beobachtete Amitriptylinwirkung verantwortlich sind, wurde ein Vergleich mit einem etablierten Blocker dieser Kanäle gezogen. Die Zugabe von Tetrodotoxin (TTX) zum Organbad führte zu gravierenden Veränderungen der Summenaktionspotenziale, die Amplitude nahm erwartungsgemäß deutlich ab und die Latenz verlängerte sich ebenfalls stark. Außerdem blieb die durch Nikotin ausge-

löste Steigerung der Nervenfasererregbarkeit von Tetrodotoxin unbeeinflusst. Im Vergleich fällt auf, dass die Wirkung von Amitriptylin und Tetrodotoxin auf die Summenaktionspotenziale sowie die gesteigerte Nervenfasererregbarkeit nach Nikotinapplikation sehr unterschiedlich ist. Während Tetrodotoxin große Veränderungen der Summenaktionspotenziale mit Konzentrationen im Nanomolarbereich erzielt, benötigt Amitriptylin für viel kleinere Veränderungen Konzentrationen im Mikromolarbereich. Darüber hinaus hemmte nur Amitriptylin die Nervenfasernerregende Wirkung von Nikotin, Tetrodotoxin beeinflusste diese kaum. Nach dem Vergleich der beiden Stoffe ist es daher als unwahrscheinlich zu werten, dass sie über den gleichen Mechanismus agieren. Dementsprechend lassen sich spannungsabhängige, TTX-sensible Natriumkanäle als Ursache für die beobachtete Wirkung von Amitriptylin ausschließen.

Denkbar wäre weiterhin, dass der Erregungs-hemmende Effekt durch eine Wirkung von Amitriptylin auf TTX-resistente Na_v -Kanäle zustande kommt. In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Amitriptylin TTX-resistente Na_v -Kanäle in der Hinterwurzel und im Ganglion trigeminale von Ratten hemmt (BRÄU *ET AL.* 2001; HUR *ET AL.* 2008). Diese Hypothese lässt sich mit den durchgeführten Versuchen nicht ausschließen, erscheint aber dennoch äußerst unglaubhaft. Erstens ist bekannt, dass Nikotin TTX-resistenten Na_v -Kanäle hemmt (LIU *ET AL.* 2004), womit eine inhibitorische Wirkung von Amitriptylin auf die gleichen Kanäle keine Effekte wie die in dieser Arbeit präsentierten hervorrufen kann. Zweitens wurde nachgewiesen, dass Amitriptylin die durch Acetylcholin ausgelöste Erregbarkeitssteigerung im Skelettmuskel hemmt, einem Gewebe, das keine TTX-resistente Natriumkanäle exprimiert (GUMILAR *ET AL.* 2003).

Alles in allem lässt sich daher sagen, dass die wahrscheinlichste Erklärung für die geschilderten Beobachtungen die direkte Hemmung der nACh-Rezeptoren durch Amitriptylin ist.

8.2 Die klinische Relevanz der verwendeten Konzentrationen

Amitriptylin in der Konzentration von 1 μM reduzierten die gesteigerte Erregbarkeit der Nervenfasern nach Nikotinapplikation in den Versuchen deutlich. Damit befinden wir uns in einem Konzentrationsbereich, der für die Klinik absolut relevant ist. Die Plasmakonzentration von Amitriptylin nach einer Einzeldosis oder nach mehreren Anwendungen beträgt zwischen 70 und 540 nM (SCHULZ, DICK, BLASCHKE & HOLLISTER 1985). Da die Wirkung bereits bei 1 μM sehr stark ausfällt, ist durchaus denkbar, dass auch 0,5 μM oder weniger noch zu Effekten führen. Insofern ist es realistisch, dass Amitriptylin im Zuge der Therapie neuropathischer Schmerzen nACh-Rezeptoren hemmt.

8.3 Nikotinische Acetylcholinrezeptoren und neuropathische Schmerzen

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen den Schluss nahe, dass nACh-Rezeptoren an der Pathogenese neuropathischer Schmerzen beteiligt sein könnten.

Vorausgegangene Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen stützen diese Vermutung. An Ratten konnte beobachtet werden, dass nach einer Nervenverletzung der Hinterwurzel oder des Nervus ischiadicus sowohl am peripheren als auch am proximalen ligierten Nervenstumpf vermehrt nACh-Rezeptoren exprimiert wurden (GILLBERG & ASKMARK 1991). Darüber hinaus wurde immunzytochemisch nachgewiesen, dass nach einer Ligatur der Spinalnerven die Expression der $\alpha 3$ - und $\alpha 5$ -Untereinheiten im äußeren Hinterhorn des Rückenmarks heraufreguliert wurde (VINCLER & EISENACH 2004). In einer weiteren Arbeit wurde das Gen für die $\alpha 5$ -Untereinheit mittels Zugabe eines gegenläufigen Oligonukleotids ausgeschaltet und auf diese Weise eine durch Spinalnervenligatur ausgelöste, mechanische Allodynie gemildert (VINCLER & EISENACH 2005). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von nACh-Rezeptoren, beispielsweise durch Conotoxine, eine Schmerzreduktion bei neuropathischen Schmerzen bewirkt (LIVETT *ET AL.* 2006; VINCLER *ET AL.* 2006).

8.4 Nichtneuronale Acetylcholinquellen

Trotz der zahlreichen Beobachtungen des Zusammenhangs von nACh-Rezeptoren mit Nervenverletzungen und neuropathischen Schmerzen ist nach wie vor unklar, woher das Acetylcholin stammt, das die axonalen Rezeptoren aktiviert.

Acetylcholin ist bekanntermaßen als Neurotransmitter im synaptischen Spalt zwischen zwei Nervenzellen und an der neuromuskulären Endplatte zu finden. Für die Erregung der axonalen nACh-Rezeptoren spielt dieses, aus den Nervenendigungen ausgeschüttete, Acetylcholin jedoch keine Rolle. Die Diffusionsstrecke beträgt maximal 300 nm (LAND, SALPETER & SALPETER 1981) und ist somit viel zu kurz für eine Wirkung entlang der Nervenfasern, selbst für den Fall, dass sich die Läsion unmittelbar in der Nähe einer Nervenendigung befindet. Daher müssen andere Acetylcholinquellen in der Umgebung von Nervenfasern in Betracht gezogen werden. Die Ausschüttung von Acetylcholin ist für zahlreiche nichtneuronale Zellen beschrieben worden (SHARMA & VIJAYARAGHAVAN 2002), zum Beispiel für Keratinozyten (GRANDO, KIST, QI & DAHL 1993; NGUYEN *ET AL.* 2001), Endothelzellen (KAWASHIMA *ET AL.* 1990; MACKLIN *ET AL.* 1998) Schwannzellen (BIRKS, KATZ & MILEDI 1960; DENNIS & MILEDI 1974; EVANS, REALE, MERZON & VILLEGAS 1999) und Lymphozyten (RINNER *ET AL.* 1998). Vor allem die beiden letzteren gelten als vielversprechender Ansatzpunkt.

Schwannzellen haben eine bedeutende Funktion für das Milieu der Nervenfasern. Nach einer Nervenverletzung setzen sie zahlreiche Mediatoren frei, wie zum Beispiel proinflammatorische Zytokine, Nervenwachstumsfaktor, Prostaglandin E₂ sowie ATP und tragen auf diese Weise zur Erregbarkeitssteigerung der Nervenfasern bei (MOALEM *ET AL.* 2006). Es ist durchaus denkbar, dass im Zusammenhang mit einer Nervenverletzung auch Acetylcholin ausgeschüttet wird.

Die Acetylcholinproduktion und -freisetzung bei Lymphozyten hängt von ihrem Differenzierungs- und Aktivierungsgrad ab. So wirkt beispielsweise eine Stimulation der Lymphozytenproliferation steigend auf die Produktion und Ausschüttung von Acetylcholin (RINNER *ET AL.* 1998). Nach einer Nervenläsion wurde eine

Lymphozyteninfiltration des betroffenen Endoneuriums (KLEINSCHNITZ *ET AL.* 2006) sowie eine Lymphozyteninvasion in die entsprechenden Spinalganglien (HU & McLACHLAN 2002) und Rückenmarkssegmente (SWEITZER *ET AL.* 2002) nachgewiesen. Die Lymphozyten exprimieren ihrerseits nACh-Rezeptoren (KAWASHIMA & FUJII 2003), die ebenso wie neuronalen Rezeptoren durch Amitriptylin gehemmt werden könnten.

Alles in allem ist denkbar, dass die Freisetzung von Acetylcholin aus den genannten Zellen zur Aktivierung der axonalen nACh-Rezeptor unmyelinisierter C-Fasern führt und auf diese Weise zur erhöhten Nervenfasererregbarkeit mit der Bildung ektooper Erregungen bei neuropathischem Schmerz beiträgt

8.5 Ausblick

Die Arbeitshypothese, dass die Schmerz-reduzierende Wirkung von Amitriptylin bei manchen Formen von neuropathischen Schmerzen über die Blockade von axonalen nACh-Rezeptoren vermittelt wird, bietet vielversprechende, pharmakologische Möglichkeiten.

Die Schmerztherapie mit Amitriptylin wird von 17% der Patienten aufgrund unerwünschter Nebenwirkungen abgebrochen (SAARTO & WIFFEN 2007). Der Hauptteil dieser Nebenwirkungen entsteht, da Amitriptylin außer an nACh-Rezeptoren auch an vielen anderen Rezeptoren und Ionenkanälen angreift (siehe Tabellen 4 auf S. 21 und 5 auf S. 25). Folglich müssen spezifische Antagonisten für nACh-Rezeptoren gefunden werden. Nach Möglichkeit so spezifisch, dass die verschiedenen Isomere der nACh-Rezeptoren berücksichtigt (HOLLADAY *ET AL.* 1997) und nur axonale Rezeptoren mit den Untereinheiten $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\beta 4$ inhibiert werden. Dies würde beispielsweise die Wirkung im zentralen Nervensystem stark verringern, da hier das Isomer $\alpha 4\beta 2$ dominiert (HOLLADAY *ET AL.* 1997). Das Ziel müssen maximal spezifische nACh-Rezeptor-Antagonisten mit minimalen Nebenwirkungen sowie verbesserter Pharmakokinetik und Schmerzreduktion sein.

9. Zusammenfassung

Neuropathische Schmerzen stellen Patienten, Ärzte, das Gesundheitswesen und die Wissenschaft vor große Herausforderungen. Die Inzidenz neuropathischer Schmerzen in der Bevölkerung liegt im einstelligen Prozentbereich mit Tendenz nach oben. Ärzte stehen dem hohen Leidensdruck der Patienten aufgrund unzureichender Therapiemöglichkeiten oftmals machtlos gegenüber. Auch die gesundheitsökonomischen Auswirkungen durch Arztbesuche, Arbeitsausfall und Folgeerkrankungen sind immens. Die Pathogenese neuropathischer Schmerzen ist überaus komplex und noch nicht vollständig verstanden, weshalb die Forschung auf diesem Gebiet sehr aktiv betrieben wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde Amitriptylin, eines der First Line Medikamente bei schmerzhaften Neuropathien, verwendet, um weitere Erkenntnisse über seinen Schmerz-reduzierenden Wirkmechanismus und dadurch auch über die Pathogenese neuropathischer Schmerzen zu gewinnen. In Experimenten mit isolierten Faszikeln humaner Nervi surali wurden Summenaktionspotenziale abgeleitet und zusammen mit wichtigen Parametern wie der Amplitude und Latenz aufgezeichnet. Außerdem konnte mittels einer Threshold Tracking Technik die Erregbarkeit der Nervenfasern erfasst werden.

Amitriptylin reduzierte die durch Nikotin ausgelöste Erregbarkeitssteigerung peripherer, unmyelinisierter C-Fasern bereits in einer Konzentration von 1 μM signifikant. Bei Steigerung der Konzentration auf 3 und schließlich 10 μM wurde die Nikotin-induzierte Erregbarkeitssteigerung immer stärker bis hin zu circa 70% reduziert. 10 μM Amitriptylin verursachten zusätzlich minimale Veränderungen der Summenaktionspotenziale, die Amplitude verringerte sich und die Latenz verlängerte sich geringfügig. Im direkten Vergleich von Amitriptylin und Tetrodotoxin, einem etabliertem Blocker spannungsabhängiger Natriumkanäle, zeigten sich große Unterschiede in der Wirkung. Schon 10 nM Tetrodotoxin hatten einen sehr starken Effekt auf die Summenaktionspotenziale, die Amplitude verringerte sich und die Latenz verlängerte sich deutlich. Die Erregbarkeitssteigerung der Nervenfasern durch Nikotin wurde jedoch nur wenig reduziert.

Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Amitriptylin konzentrationsabhängig axonale nACh-Rezeptoren von unmyelinisierten C-Fasern des Menschen hemmt, so die Erregbarkeitssteigerung durch Nikotin beziehungsweise Acetylcholin verringert und dieser Mechanismus die Grundlage der Schmerzreduktion bei Nervenläsionen darstellen könnte. Eine Wirkung von Amitriptylin an spannungsabhängigen Natriumkanälen wurde über den experimentellen Vergleich mit Tetrodotoxin und den großen Unterschieden zwischen den Reaktionen auf beide Moleküle mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen.

Folglich könnten axonale nACh-Rezeptoren eine Funktion in der Pathogenese neuropathischer Schmerzen haben. Diese Erkenntnis deckt sich mit vorausgegangenen Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen, die nACh-Rezeptoren in Zusammenhang mit Nervenläsionen und neuropathischen Schmerzen bringen konnten. Unklar ist, woher das Acetylcholin stammt, dass die Rezeptoren entlang der Nervenaxone aktiviert. Diskutiert werden nicht-neuronale Quellen wie beispielsweise Schwannzellen und Lymphozyten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zum besseren Verständnis sowohl des Wirkungsmechanismus von Amitriptylin als auch der Pathogenese von neuropathischen Schmerzen bei und präsentieren ein Zielprotein für zukünftige, spezifische Medikamentenentwicklung mit der Chance auf potentere, pharmakokinetisch bessere sowie nebenwirkungsfreiere Schmerzmittel.

10. Literaturverzeichnis

- AKTORIES, K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F., STARKE, K. & ET AL (2005): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier.
- ARIAS, H., BHUMIREDDYA, P. & BOUZAT, C. (2006): *Molecular mechanisms and binding site locations for noncompetitive antagonists of nicotinic acetylcholine receptors*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38, 1254-76.
- ARMETT, C. & RITCHIE, J. (1963): *The ionic requirements for the action of acetylcholine on mammalian non-myelinated fibres*. *Journal of Physiology*, 165, 141-59.
- AUMÜLLER, G. & ET AL (2007): Anatomie. Thieme.
- BARON, R. (2006a): *Diagnostik und Therapie neuropathischer Schmerzen*. *Deutsches Ärzteblatt*, 41, 2720-2730.
- BARON, R. (2006b): *Mechanisms of disease: neuropathic pain - a clinical perspective*. *Nature clinical practice neurology*, 2, 95-106.
- BIRKS, R., KATZ, B. & MILEDI, R. (1960): *Physiological and structural changes at the amphibian myoneural junction, in the course of nerve degeneration*. *The Journal of Physiology*, 150, 145-68.
- BÖCKER, W., DENK, H., HEITZ, P. & ET AL (2004): Pathologie. Elsevier.
- BOSTOCK, H., ÇIKUREL, K. & BURKE, D. (1998): *Threshold tracking techniques in the study of human peripheral nerve*. *Muscle & Nerve*, 21, 137-58.
- BOWSHER, D. (1997): *The management of postherpetic neuralgia*. *Postgrad Medical Journal*, 73, 623-9.
- BRÄU, M., DREIMANN, M., OLSCHESKI, A., VOGEL, W. & HEMPELMANN, G. (2001): *Effect of drugs used for neuropathic pain management on tetrodotoxin-resistant Na(+) currents in rat sensory neurons*. *Anesthesiology*, 94, 137-44.
- CAI, Z. & McCASLIN, P. (1992): *Amitriptyline, desipramine, cyproheptadine and carbamazepine, in concentrations used therapeutically, reduce kainate- and N-methyl-D-aspartate-induced intracellular Ca²⁺ levels in neuronal culture*. *European Journal of Pharmacology*, 219, 53-7.
- CARDENAS, D., WARMS, C., TURNER, J., MARSHALL, H., BROOKE, M. & LOESER, J. (2002): *Efficacy of amitriptyline for relief of pain in spinal cord injury: results of a randomized controlled trial*. *Pain*, 96, 365-73.
- CARLTON, S. & COGGESHALL, R. (1997): *Immunohistochemical localization of 5-HT_{2A} receptors in peripheral sensory axons in rat glabrous skin*. *Brain Research*, 763, 271-5.
- CLATWORTHY, A., ILLICH, P., CASTRO, G. & WALTERS, E. (1995): *Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain*. *Neuroscience Letters*, 184, 5-8.
- CLEMENTI, F., FORNASARI, D. & GOTTI, C. (2000): *Neuronal nicotinic receptors, important new players in brain function*. *European Journal of Pharmacology*, 393, 3-10.
- CONNOLLY, J., BOULTER, J. & HEINEMANN, S. (1992): *Alpha 4-2 beta 2 and other nicotinic acetylcholine receptor subtypes as targets of psychoactive and addictive drugs*. *British Journal of Pharmacology*, 105, 657-66.
- CORRINGER, J., LE NOVÈRE, N. & CHANGEUX, J. (2000): *Nicotinic Receptors at the Amino Acid Level*. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 40, 431-

458.

- CRUCCU, G., ANAND, P., ATTAL, L., GARCIA-LARREA, L., HAANPÄÄ, M., JØRUM, E., SERRA, J. & JENSEN, T. (2004): *EFNS guidelines on neuropathic pain assessment. European Journal of Neurology*, 11, 153-162.
- DEETJEN, P., SPECKMANN, E., HESCHELER, J. & ET AL (2006): Physiologie. Elsevier.
- DENNIS, M. & MILED, I.R. (1974): *Electrically induced release of acetylcholine from denervated Schwann cells. The Journal of Physiology*, 237, 431-52.
- DIAMOND, J. (1959): *The effects of injecting acetylcholine into normal and regenerating nerves. Journal of Physiology*, 145, 611-29.
- DICK, I., BROCHU, R., PUROHIT, Y., KACZOROWSKI, G., MARTIN, W. & PRIEST, B. (2007): *Sodium channel blockade may contribute to the analgesic efficacy of antidepressants. Journal of Pain*, 8, 315-24.
- DWORKIN, R. (2002): *An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. The Clinical Journal of Pain*, 18, 343-9.
- DWORKIN, R., O'CONNOR, A., BACKONJA, M., FARRAR, J., FINNERUP, N., JENSEN, T., KALSO, E., LOESER, J., MIASKOWSKI, C., NURMIKKO, T., PORTENOY, R., RICE, A., STACEY, B., TREEDE, R., TURK, D. & WALLACE, M. (2007): *Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. Pain*, 132, 237-51.
- EISENACH, J. & GEBHART, G. (1995): *Intrathecal amitriptyline acts as an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in the presence of inflammatory hyperalgesia in rats. Anesthesiology*, 83, 1046-54.
- ELIAV, E., HERZBERG, U., RUDA, M. & BENNETT, G. (1999): *Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. Pain*, 83, 169-82.
- EVANS, P., REALE, V., MERZON, R. & VILLEGAS, J. (1999): *A comparison of the release of a vasoactive-intestinal-peptide-like peptide and acetylcholine in the giant axon-Schwann cell preparation of the tropical squid Sepioteuthis sepioidea. The Journal of Experimental Biology*, 202, 417-428.
- FINNERUP, N., OTTO, M., MCQUAY, H., JENSEN, T. & SINDRUP, S. (2005): *Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. Pain*, 118, 289-305.
- GALEOTTI, N., GHELARDINI, C., CAPACCIOLI, S., QUATTRONE, A., NICOLIN, A. & BARTOLINI, A. (1997): *Blockade of clomipramine and amitriptyline analgesia by an antisense oligonucleotide to mKv1.1, a mouse Shaker-like K⁺ channel. European Journal of Pharmacology*, 330, 15-25.
- GILLBERG, P. & ASKMARK, H. (1991): *Changes in cholinergic and opioid receptors in the rat spinal cord, dorsal root and sciatic nerve after ventral and dorsal root lesion. Journal of Neural Transmission. General Section*, 85, 31-9.
- GRAFE, P., QUASTHOFF, S., GROSSKREUTZ, J. & ALZHEIMER, C. (1997): *Function of the hyperpolarization-activated inward rectification in nonmyelinated peripheral rat and human axons. Journal of Neurophysiology*, 77, 421-6.
- GRANDO, S., KIST, D., QI, M. & DAHL, M. (1993): *Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. 101, J Invest Dermatol*, 32-6.
- GRUTTER, T. & CHANGEUX, J. (2001): *Nicotinic receptors in wonderland. Trends in Biochemical Sciences*, 26, 459-63.
- GUMILAR, F., ARIAS, H., SPITZMAUL, G. & BOUZAT, C. (2003): *Molecular mechanisms of inhibition of nicotinic acetylcholine receptors by tricyclic antidepressants. Neuropharmacology*, 45, 964-76.
- HALL, H. & OGREN, S. (1981): *Effects of antidepressant drugs on different receptors in the brain. European Journal of Pharmacology*, 70, 393-407.
- HANSSON, P. (2002): *Neuropathic pain: Clinical characteristics and diagnostic*

workup. *European Journal of Pain*, 6, 47-50.

HERBERT, M. & HOLZER, P. (2002): *Die neurogene Entzündung. Anästhesiologie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie*, 37, 314-25.

HOLLADAY, M., DART, M. & LYNCH, J. (1997): *Neuronal nicotinic acetylcholine receptors as targets for drug discovery. Journal of Medicinal Chemistry*, 40, 4169-94.

HU, P. & McLACHLAN, E. (2002): *Macrophage and lymphocyte invasion of dorsal root ganglia after peripheral nerve lesions in the rat. Neuroscience*, 11, 23-38.

HUR, Y., CHOI, I., CHO, J., PARK, E., CHOI, J., CHOI, B. & JANG, I. (2008): *Effects of carbamazepine and amitriptyline on tetrodotoxin-resistant Na⁺ channels in immature rat trigeminal ganglion neurons. Archives of Pharmacal Research*, 31, 178-82.

IRNICH, D., BURGSTÄHLER, R., BOSTOCK, H. & GRAFE, P. (2001): *ATP affects both axons and Schwann cells of unmyelinated C fibres. Pain*, 92, 343-50.

IRNICH, D., TRACEY, D., POLTEN, J., BURGSTÄHLER, 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, 123-9.

KALSO, E., TASMUTH, T. & NEUVONEN, P. (1996): *Amitriptyline effectively relieves neuropathic pain following treatment of breast cancer. Pain*, 64, 293-302.

KAWASHIMA, K. & FUJII, T. (2003): *The lymphocytic cholinergic system and its contribution to the regulation of immune activity. Life Sciences*, 74, 675-96.

KAWASHIMA, K., WATANABE, N., OOHATA, H., FUJIMOTO, K., SUZUKI, T., ISHIZAKI, Y., MORITA, I. & MUROTA, S. (1990): *Synthesis and release of acetylcholine by cultured bovine arterial endothelial cells. Neuroscience Letters*, 119, 156-8.

KIEBURTZ, K., SIMPSON, D., YIANNOUTSOS, C., MAX, M., HALL, C., ELLIS, R., MARRA, C., MCKENDALL, R., SINGER, E., DAL PAN, G., CLIFFORD, D., TUCKER, T. & COHEN, B. (1998): *A randomized trial of amitriptyline and mexiletine for painful neuropathy in HIV infection. Neurology*, 51, 1682-8.

KLEINSCHNITZ, C., HOFSTETTE, R. H., MEUTH, S., BRAEUNINGER, S., SOMMER, C. & STOLL, G. (2006): *T cell infiltration after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve is associated with interleukin-17 expression. Experimental Neurology*, 200, 480-5.

LAND, B., SALPETER, E. & SALPETER, M. (1981): *Kinetic parameters for acetylcholine interaction in intact neuromuscular junction. Proc Natl Acad Sci USA*, 78, 7200-4.

LANG, P., BURGSTÄHLER, R., HABERBERGER, R., SIPPPEL, W. & GRAFE, P. (2005): *A conus peptide blocks nicotinic receptors of unmyelinated axons in human nerves. Neuroreport*, 16, 479-83.

LANG, P., BURGSTÄHLER, R., SIPPPEL, 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, 3295-303.

LANG, P., TRACEY, D., IRNICH, D., SIPPPEL, W. & GRAFE, P. (2002): *Activation of adenosine and P2Y receptors by ATP in human peripheral nerve. Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 366, 449-57.

LAVOIE, P., BEAUCHAMP, G. & ELIE, R. (1990): *Tricyclic antidepressants inhibit voltage-dependent calcium channels and Na(+)-Ca²⁺ exchange in rat brain cortex synaptosomes. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 68, 1414-8.

- LEFFLER, A., REIPRICH, A., DP, M. & C, N. (2007): *Use-dependent block by lidocaine but not amitriptyline is more pronounced in tetrodotoxin (TTX)-Resistant Nav1.8 than in TTX-sensitive Na⁺ channels. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 320, 354-64.*
- LEIJON, G. & BOIVIE, J. (1989): *Central post-stroke pain--a controlled trial of amitriptyline and carbamazepine. Pain, 36, 27-36.*
- LIU, L., ZHU, W., ZHANG, Z., YANG, T., GRANT, A., OXFORD, G. & SIMON, S. (2004): *Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. Journal of Neurophysiology, 91, 1482-91.*
- LIVETT, B., SANDALL, D., KEAYS, D., DOWN, J., GAYLER, K., SATKUNANATHAN, N. & KHALIL, Z. (2006): *Therapeutic applications of conotoxins that target the neuronal nicotinic acetylcholine receptor. Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology, 48, 810-29.*
- LÖFFLER, G. & PETRIDES, P. (2003): *Biochemie & Pathbiochemie. Springer-Verlag.*
- LUKAS, R., CHANGEUX, J., LE NOVÈRE, N., ALBUQUERQUE, E., BALFOUR, D., BERG, D., BERTRAND, D., CHIAPPINELLI, V., CLARKE, P., COLLINS, A., DANI, J., GRADY, S., KELLAR, K., LINDSTROM, J., MARKS, M., QUIK, M., TAYLOR, P. & WONNACOT, S. (1999): *International Union of Pharmacology. XX. Current Status of the Nomenclature for Nicotinic Acetylcholine Receptors and Their Subunits. Pharmacological Reviews, 51, 397-401.*
- MACKLIN, K., MAUS, A., PEREIRA, E., ALBUQUERQUE, E. & CONTI-FINE, B. (1998): *Human vascular endothelial cells express functional nicotinic acetylcholine receptors. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 287, 435-9.*
- MAO, J. & CHEN, L. (2000): *Systemic lidocaine for neuropathic pain relief. Pain, 87, 7-17.*
- MARCHAND, F., PERRETTI, M. & McMAHON, S. (2005): *Role of the immune system in chronic pain. Nature Reviews. Neuroscience, 6, 521-32.*
- MAVES, T., PECHMAN, P., GEBHART, G. & MELLER, S. (1993): *Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. 1993, 54, 57-69.*
- MAX, M., CULNANE, M., SCHAFER, S., GRACELY, R., WALTHER, D., SMOLLER, B. & DUBNER, R. (1987): *Amitriptyline relieves diabetic neuropathy pain in patients with normal or depressed mood. Neurology, 37, 589-96.*
- MAX, M., SCHAFER, S., CULNANE, M., SMOLLER, B., DUBNER, R. & GRACELY, R. (1988): *Amitriptyline, but not lorazepam, relieves postherpetic neuralgia. Neurology, 38, 1427-32.*
- McCASLIN, P., YU, X., HO, I. & SMITH, T. (1992): *Amitriptyline prevents N-methyl-D-aspartate (NMDA)-induced toxicity, does not prevent NMDA-induced elevations of extracellular glutamate, but augments kainate-induced elevations of glutamate. Journal of Biochemistry, 59, 401-5.*
- McDERMOTT, A., TOELLE, T., ROWBOTHAM, D., SCHAEFER, C. & DUKES, E. (2006): *The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. European Journal of Pain (London, England), 10, 127-35.*
- MEYER-ROSBERG, K., KVARNSTRÖM, A., KINNMAN, E., GORDH, T., NORDFORS, O. & KRISTOFFERSON, A. (2001): *Peripheral neuropathic pain--a multidimensional burden for patients. European Journal of Pain (London, England), 5, 379-89.*
- MOALEM-TAYLOR, G., LANG, P., TRACEY, D. & GRAFE, P. (2007): *Post-spike excitability indicates changes in membrane potential of isolated C-fibers.*

Muscle & Nerve, 36, 172–82.

MOALEM, G., GRAFE, P. & TRACEY, D. (2005): *Chemical mediators enhance the excitability of unmyelinated sensory axons in normal and injured peripheral nerve of the rat. Neuroscience*, 134, 1399-1411.

MOALEM, G., TRACEY, D. & TRACEY, D. (2006): *Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. Brain Res Rev*, 51, 240-64.

MOORE, K., KOHNO, T., KARCHEWSKI, L., SCHOLZ, J., BABA, H. & WOOLF, C. (2002): *Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22, 6724-31.

NAU, C., SEAVER, M., WANG, S. & WANG, G. (2000): *Block of human heart hH1 sodium channels by amitriptyline. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 292, 1015-23.

NGUYEN, V., NDOYE, A., HALL, L., ZIA, S., ARREDONDO, J., CHERNYAVSKY, A., KIST, D., ZELICKSON, B., LAWRY, M. & GRANDO, S. (2001): *Programmed cell death of keratinocytes culminates in apoptotic secretion of a humectant upon secretagogue action of acetylcholine. Journal of Cell Science*, 114, 1189-204.

OLSSON, Y. (1967): *Degranulation of mast cells in peripheral nerve injuries. Acta Neurologica Scandinavica*, 43, 365-74.

ONGHENA, P. & VAN HOUDENHOVE, B. (1993): *Antidepressant-induced analgesia in chronic non-malignant pain: a meta-analysis of 39 placebo-controlled studies. Pain*, 49, 205-19.

PARK, T., SHIN, S., SUH, B., SUH, E., LEE, I., KIM, Y. & KIM, K. (1998): *Differential inhibition of catecholamine secretion by amitriptyline through blockage of nicotinic receptors, sodium channels, and calcium channels in bovine adrenal chromaffin cells. Synapse (New York, N.Y.)*, 29, 248-56.

PERRY, V., BROWN, M. & GORDON, S. (1987): *The macrophage response to central and peripheral nerve injury. A possible role for macrophages in regeneration. The Journal of Experimental Medicine*, 165, 1218-23.

Pfeiffer, G. & Weiller, C. (2001). Neurologie. In G. Hempelmann (Ed.), *Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie. Band 4: Schmerztherapie* (168-74). Georg Thieme Verlag.

PUNKE, M. & FRIEDERICH, P. (2007): *Amitriptyline is a potent blocker of human Kv1.1 and Kv7.2/7.3 channels. Anesthesia & Analgesia*, 104, 1256-64.

RAY, W., MEREDITH, S., THAPA, P., HALL, K. & MURRAY, K. (2004): *Cyclic antidepressants and the risk of sudden cardiac death. Clinical Pharmacology Therapeutics*, 75, 234-41.

REYNOLDS, I. & MILLER, R. (1988): *Tricyclic antidepressants block N-methyl-D-aspartate receptors: similarities to the action of zinc. British Journal of Pharmacology*, 95, 95-102.

RINNER, I., KAWASHIMA, K. & SCHAUENSTEIN, K. (1998): *Rat lymphocytes produce and secrete acetylcholine in dependence of differentiation and activation. Journal of Neuroimmunology*, 81, 31-7.

RITCHIE, J. & ARMETT, C. (1963): *The role of acetylcholine in conduction in mammalian nonmyelinated nerve fibers. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 139, 201-7.

ROBINSON, L., CZERNIECKI, J., EHDE, D., EDWARDS, W., JUDISH, D., GOLDBERG, M., CAMPBELL, K., SMITH, D. & JENSEN, M. (2004): *Trial of amitriptyline for relief of pain in amputees: results of a randomized controlled study. Archives of Physical*

- Medicine and Rehabilitation*, 85, 1-6.
- ROLE, L. & BERG, D. (1996): *Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses*. *Neuron*, 16, 1077-85.
- SAARTO, T. & WIFFEN, P. (2007): *Antidepressants for neuropathic pain*. *Cochrane Database of Systematic Reviews (Online)*, (4), CD005454.
- SACERDOTE, P., BRINI, A., MANTEGAZZA, P. & PANERAI, A. (1987): *A role for serotonin and beta-endorphin in the analgesia induced by some tricyclic antidepressant drugs*. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 26, 153-8.
- SCHMELZ, M., SCHMIDT, R., WEIDNER, C., HILLIGES, M., TOREBJORK, H. & HANDWERKER, H. (2003): *Chemical response pattern of different classes of C-nociceptors to pruritogens and algogens*. *Journal of Neurophysiology*, 89, 2441-8.
- SCHOFIELD, G., WITKOP, B., WARNICK, J. & ALBUQUERQUE, E. (1981): *Differentiation of the open and closed states of the ionic channels of nicotinic acetylcholine receptors by tricyclic antidepressants*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 78, 5240-4.
- SCHULZ, P., DICK, P., BLASCHKE, T. & HOLLISTER, L. (1985): *Discrepancies between pharmacokinetic studies of amitriptyline*. *Clinical Pharmacokinetics*, 10, 257-68.
- SEIFERT, F. & MAIHÖFNER, C. (2009): *Central mechanisms of experimental and chronic neuropathic pain: Findings from functional imaging studies*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 375-90.
- SHARMA, G. & VIJAYARAGHAVAN, S. (2002): *Nicotinic receptor signaling in nonexcitable cells*. *Journal of Neurobiology*, 53, 524-34.
- SHIMIZU, M., NISHIDA, A. & YAMAWAKI, S. (1992): *Antidepressants inhibit spontaneous oscillations of intracellular Ca²⁺ concentration in rat cortical cultured neurons*. *Neuroscience Letters*, 146, 101-4.
- SHLAY, J., CHALONER, K., MAX, M., FLAWS, B., REICHELDERFER, P., WENTWORTH, D., HILLMAN, S., BRIZZ, B. & COHN, D. (1998): *Acupuncture and amitriptyline for pain due to HIV-related peripheral neuropathy: a randomized controlled trial*. *Journal of the American Medical Association*, 280, 1590-5.
- SILBERNAGL, S. & DESPOPOULOS, A. (2003): *Taschenatlas der Physiologie*. Thieme.
- SINDRUP, S., OTTO, M., FINNERUP, N. & JENSEN, T. (2005): *Antidepressants in the treatment of neuropathic pain*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 96, 399-409.
- SOMMER, C., LALONDE, A., HECKMAN, H., RODRIGUEZ, M. & MYERS, R. (1995): *Quantitative neuropathology of a focal nerve injury causing hyperalgesia*. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 54, 635-43.
- STEEN, K. & REEH, P. (1993): *Actions of cholinergic agonists and antagonists on sensory nerve endings in rat skin, in vitro*. *Journal of Neurophysiology*, 70, 397-405.
- SWEITZER, S., HICKEY, W., RUTKOWSKI, M., PAHL, J. & DELEO, J. (2002): *Focal peripheral nerve injury induces leukocyte trafficking into the central nervous system: potential relationship to neuropathic pain*. *Pain*, 100, 163-70.
- TANELIAN, D. (1991): *Cholinergic activation of a population of corneal afferent nerves*. *Experimental Brain Research*, 86, 414-20.
- TREMONT-LUKATS, I., CHALLAPALLI, V., MCNICOL, E., LAU, J. & CARR, D. (2005): *Systemic administration of local anesthetics to relieve neuropathic pain: a systematic review and meta-analysis*. *Anesthesia and Analgesia*, 101, 1738-49.
- VADALOUCA, A., SIAFAKA, I., ARGYRA, E., VRACHNOU, E. & MOKA, E. (2006): *Therapeutic management of chronic neuropathic pain: an examination of*

- pharmacologic treatment. Annals of the New York Academy of Sciences*, 1088, 164-86.
- VINCLER, M. & EISENACH, J. (2004): *Plasticity of spinal nicotinic acetylcholine receptors following spinal nerve ligation. Neuroscience Research*, 48, 139-45.
- VINCLER, M. & EISENACH, J. (2005): *Knock down of the alpha 5 nicotinic acetylcholine receptor in spinal nerve-ligated rats alleviates mechanical allodynia. Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 80, 135-43.
- VINCLER, M., WITTENAUER, S., PARKER, R., ELLISON, M., OLIVERA, B. & MCINTOSH, J. (2006): *Molecular mechanism for analgesia involving specific antagonism of alpha9alpha10 nicotinic acetylcholine receptors. Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 17880-4.
- VIZI, E. & LENDVAI, B. (1999): *Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. Brain Research Reviews*, 30, 219-235.
- VRETHEM, M., BOIVIE, J., ARNQVIST, H., HOLMGREN, H., LINDSTRÖM, T. & THORELL, L. (1997): *A comparison a amitriptyline and maprotiline in the treatment of painful polyneuropathy in diabetics and nondiabetics. Clinical Journal of Pain*, 13, 313-23.
- WANG, G., RUSSELL, C. & WANG, S. (2004): *State-dependent block of voltage-gated Na⁺ channels by amitriptyline via the local anesthetic receptor and its implication for neuropathic pain. Pain*, 110, 166-74.
- WATANABE, Y., SAITO, H. & ABE, K. (1993): *Tricyclic antidepressants block NMDA receptor-mediated synaptic responses and induction of long-term potentiation in rat hippocampal slices. Neuropharmacology*, 32, 479-86.
- WATSON, C., EVANS, R., REED, K., MERSKEY, H., GOLDSMITH, L. & WARSH, J. (1982): *Amitriptyline versus placebo in postherpetic neuralgia. Neurology*, 32, 671-3.
- WIESELER-FRANK, J., MAIER, S. & WATKINS, L. (2005): *Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. Neuro-Signals*, 14, 166-74.
- WOOLF, C. & MANNION, R. (1999): *Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. The Lancet*, 353, 1959-64.
- ZEITZ, K., GUY, N., MALMBERG, A., DIRAJLAL, S., MARTIN, W., SUN, L., BONHAUS, D., STUCKY, C., JULIUS, D. & BASBAUM, A. (2002): *The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. The Journal of Neuroscience: the Official Journal of the Society for Neuroscience*, 22, 1010-9.
- ZHANG, C., VERBANY, Y., MALEK, S., STYS, P. & CHIU, S. (2004): *Nicotinic acetylcholine receptors in mouse and rat optic nerves. Journal of Neurophysiology*, 91, 1025-35.

11. Danksagung

Zum Schluss möchte ich mich bei allen an der vorliegenden Dissertation beteiligten Personen recht herzlich für die breite Unterstützung, engagierte Mithilfe und äußerst angenehme Zusammenarbeit bedanken.

Meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Peter Grafe, sei an dieser Stelle ganz besonders gedankt, denn er hat mir diese Arbeit sowohl durch seine exzellente fachlichen Beratung und langjährigen Erfahrung, als auch durch seine endlose Geduld und Hilfsbereitschaft ermöglicht.

Ebenso gilt meine Erkenntlichkeit Herrn Dr. rer. nat. Richard Carr für seine unermüdliche Mitarbeit beim Vorbereiten der Messungen und Gestalten der Versuchsabläufe.

Bei Herrn Dr. med. Johannes Fleckenstein sowie den Handchirurgen und Plastischen Chirurgen der Poliklinik um Dr. med Stefan Deiler möchte ich mich für die zuverlässige Organisation, die sorgfältige Entnahme und den schnellen Transport der humanen Nerven bedanken.

Ein großer Dank gebührt außerdem Frau Christina Müller für die Herstellung zahlreicher Versuchslösungen, die Präparation der Nerven und ihr stets offenes Ohr.

Auch Herr Franz Rucker hat mit der fortwährenden technische Instandhaltung und Ausbesserung des Messplatzes einen bedeutenden Anteil zum reibungslosen Versuchsablauf beigesteuert.

Für die außerordentliche moralische Unterstützung und das große Interesse an meiner Arbeit möchte ich mich weiterhin sehr bei meiner Familie bedanken.