

**5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und Analgetika:  
Effekte von Antimigränemitteln und Opioiden  
auf humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Vorgelegt von: Mina N. Lyutenska, geb. Popova  
aus: Sofia / BG

2006

Angefertigt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter PD. Dr. rer. nat. Martin Barann
2. Gutachter Prof. Dr. Heinz Bönisch

Tag der mündlichen Prüfung: 29.09.2006

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
und Operative Intensivmedizin der Universität Bonn  
Direktor Prof. Dr. med. A. Hoeft

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

*Meinen Eltern*



<b>Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>Hintergrund</b> .....	<b>7</b>
Serotonin .....	7
Serotonin Rezeptoren .....	7
Emesis und Analgetika.....	12
<b>Problemstellung</b> .....	<b>15</b>
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
<b>Stabile Transfektion</b> .....	<b>17</b>
<b>Zellkultur</b> .....	<b>17</b>
<b>Elektrophysiologie</b> .....	<b>18</b>
Technik (Patch-Clamp) .....	18
Lösungen .....	19
Schnelles Lösungsapplikationssystem .....	20
Substanzapplikation .....	21
<b>Datenerfassung und Datenauswertung</b> .....	<b>22</b>
Software .....	22
Analyse der Stromspuren .....	22
Statistik.....	24
<b>Materialien</b> .....	<b>24</b>
Strukturformeln verwendeter Substanzen .....	26
<b>Liste der verwendeten Abkürzungen</b> .....	<b>29</b>
<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
<b>Charakterisierung des 5HT-induzierten Stromes</b> .....	<b>30</b>
<b>Antimigränemittel</b> .....	<b>34</b>

Dihydroergotamin (DHE) .....	34
Sumatriptan .....	37
<b>Starke Analgetika.....</b>	<b>43</b>
Morphin.....	43
Hydromorphon .....	51
Synthetische Opioide .....	59
<b>Emetogene Mittel .....</b>	<b>64</b>
Apomorphin .....	64
<b>Endogene Opioide .....</b>	<b>71</b>
Endomorphin 2.....	71
Met-Enkephalin.....	75
<b>Diskussion .....</b>	<b>78</b>
Charakterisierung des 5HT <sub>3A</sub> -Rezeptors / Methodologische Fragen.....	78
Hintergrund .....	79
Einfluss von Migränemitteln auf die 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme durch den 5HT <sub>3A</sub> -Rezeptor. ....	80
Einfluss von Opioiden auf die 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme durch den 5HT <sub>3A</sub> -Rezeptor. ....	82
Einfluss von Apomorphin auf die 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme durch den 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor .....	86
Einfluss von Endopeptiden auf die 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme durch den 5-HT <sub>3A</sub> -Rezeptor .....	88
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>91</b>
<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>93</b>
<b>Publikationen.....</b>	<b>103</b>

# Einleitung

## Hintergrund

### Serotonin

5-Hydroxytryptamin (5-HT) oder Serotonin ist ein Neurotransmitter und Entzündungsmediator, der im Körper durch die Hydroxylierung und Decarboxylierung der essentiellen Aminosäure Tryptophan gebildet wird. Es findet sich in den Nervenendigungen, Thrombozyten, Mastzellen und den enterochromaffinen Zellen der intestinalen Schleimhaut. Im Gehirn ist es besonders in den Raphekernen zu finden. Von dort gibt es viele Projektionen ins limbische System, zum Thalamus und Hypothalamus, ins Vorderhirn, ins Kleinhirn und ins Rückenmark. Über diese Bahnen werden viele neuronale Funktionen kontrolliert.

5-HT hat eine Vielzahl von Wirkungen auf das kardiovaskuläre, respiratorische, und gastrointestinale System sowie auf das zentrale Nervensystem. Es hat eine sehr komplexe Wirkung und kann im gleichen Organ einen gegensätzlichen Effekt auslösen. So kann 5-HT je nach vorhandenen Bedingungen (vegetativem Tonus, Konzentration) sowohl eine Vasokonstriktion als auch Vasodilatation verursachen. Serotonin hat großen Einfluss auf das Wohlbefinden und wird auch als „Glückshormon“ bezeichnet. Es beeinflusst das Verhalten, und sein Mangel kann zu Aggressionen, Angst und Depressionen führen. Serotonin ist vermutlich das verursachende Agens der Migräne und spielt erwiesenermaßen eine wesentliche Rolle bei Übelkeit und Erbrechen, die durch zytotoxische Medikamente und Bestrahlung ausgelöst werden (Andrews und Davis, 1993; Minami et al., 2003).

### Serotonin Rezeptoren

Die vielfältigen und unterschiedlichen Wirkungen von 5-HT im Körper werden durch die Bindung an spezifische Rezeptoren vermittelt, die auf der Plasmamembran der Zielzellen lokalisiert sind. Die Vielzahl an Serotoninrezeptoren bzw. an Serotoninrezeptorsubtypen und ihre weite Verbreitung im Organismus bedingen das äußerst komplexe Wirkungsgeschehen dieses Neurotransmitters. Die ersten Hinweise auf eine pharmakologische Heterogenität der Serotoninrezeptoren wurden vor ca. 60 Jahren von Gaddum und Picarelli beschrieben (Gaddum et al., 1957). Sie

zeigten, dass an den Kontraktionen, die von 5-HT im isolierten Ileum hervorgerufen werden, zwei unterschiedliche Mechanismen beteiligt sind. Die auf glatten Muskelzellen lokalisierten 5-HT-Rezeptoren konnten durch Dibenzylin blockiert werden und wurden als D-Rezeptoren bezeichnet. Im Gegensatz dazu waren die Rezeptoren an den parasymphatischen Nervenendigungen gegenüber einer Inhibition durch Morphin empfindlich. Die neuronal lokalisierten 5-HT-Rezeptoren wurden daher als M-Rezeptoren bezeichnet.

Gegenwärtig sind sieben Klassen und insgesamt 15 Subtypen von 5-HT-Rezeptoren bekannt, die mittels Radioligandenbindungsexperimenten charakterisiert wurden. Da sich die vorliegende Arbeit mit dem 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor befasst, wird näher auf seine Charakteristika eingegangen werden.

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor gehört wie die Glycin-, nACh- und GABA<sub>A</sub>- Rezeptoren zu den ligand-gesteuerten Ionenkanälen, welche strukturelle und funktionelle Ähnlichkeiten aufweisen. Er vereinigt Signalerkennung und -Übersetzung in einem Makromolekül: er ist Rezeptor und Effektor – nämlich ein Ionenkanal – zugleich.

Ähnlich wie der nACh-Rezeptor besteht der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor aus fünf Untereinheiten, die eine ringförmige Kanalpore bilden (Maricq und Peterson, 1991). Dieser Ring ist innen am Zytoskelett verankert und durchbricht die Zellmembran. Jede Peptidkette einer Untereinheit durchquert die Membran viermal, wobei die transmembranären Teile zu  $\alpha$ - Helices spiralisiert sind und sowohl das N- als auch das C- terminale Ende extrazellulär liegen. Außen sind die Peptidketten glykolyisiert und innen können sie phosphoryliert sein. Die Phosphorylierung soll zur Desensibilisierung des Rezeptors beitragen.

Der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor ist der einfachste und am längsten bekannte 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor. Er besteht aus fünf identischen A-Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten ist in der Lage im Bereich des N-Terminus Liganden zu binden (z.B. den Agonisten Serotonin oder den Antagonisten Ondansetron). Sobald Serotonin an zwei Untereinheiten gebunden hat, kommt es zu einer Konformationsänderung und zur Öffnung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Kationkanals (Peters und Malone, 1992), was – in Abhängigkeit vom anliegenden Potential der Zelle - einen Natrium / Calcium Einwärtsstrom oder einen Kaliumauswärtstrom zur Folge hat. Bei physiologischen Bedingungen (Ruhepotential  $\sim -60$  mV) resultiert ein Natrium / Calcium Einwärtsstrom, der zu einer Depolarisation der Zelle führt. Somit ist der 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor ein exzitatorischer Ionenkanalrezeptor.

Die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten lösen eine konzentrationsabhängige Depolarisation aus, die durch selektive 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten gehemmt wird. Zu den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten



gehören neben dem unspezifischen Agonisten Serotonin (5-HT) seine Derivate 2-Methyl-5-HT, 1-Phenylbiguanid und 1-(m-Chlorophenyl)-biguanid, das als potentester 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoragonist beschrieben wird (Kilpatrick und Butler, 1990). 2-Methyl-5-HT ist zweifach schwächer wirksam als Serotonin (Richardson und Engel, 1985). Seine schnelle Metabolisierung, die Unfähigkeit die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und die schwache Aktivierung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptors beschränken seinen Einsatz auf *in vitro* Experimente. Die agonistische Potenz von 1-Phenylbiguanid am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor entspricht der von Serotonin. Zu den potentesten selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Agonisten gehört 1-(6-Chloro-2-pyridinyl)-4-Piperidinamin Hydrochlorid, welches eine sehr hohe Affinität sowohl für die zentralen als auch für die peripheren Rezeptoren *in vivo* und *in vitro* aufweist (Bachy, 1993).

Zunächst waren nur wenig spezifische 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten bekannt. Ein lang bekannter Vertreter ist das allerdings nicht selektiv wirksame und wenig potente Cocain (Fozard, 1983). Dazu gehören auch Metoclopramid (Fozard und Ali, 1978) und Quipazin (Lansdown und Nash, 1980), die eine Unterdrückung des 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelten Effektes zeigen, allerdings auch mit anderen Rezeptoren und/oder Neurotransmitter-uptake-Systemen interagieren. Metoclopramid ist längst als Antiemetikum und Prokinetikum bekannt und wird klinisch verwendet. Sowohl funktionale als auch Bindungs-Experimente beweisen seine antagonistische Wirkung am 5-HT<sub>3</sub> Rezeptor (Walkembach et al., 2005). Allerdings ist Metoclopramid wenig selektiv, da es auch Dopamin-Rezeptor-Antagonist ist.

Teilweise in Anlehnung an die Strukturen von Serotonin und Cocain wurde eine Reihe höchst selektiver und potenter 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten entwickelt, die bereits im nanomolaren Bereich wirksam sind. Ihr klinischer Einsatz bei Zytostatika- und Bestrahlung-induzierter Emesis (Ondansetron, Tropisetron) hat sich bewährt. Der Hauptangriffspunkt emetogener Chemo- und Strahlentherapie liegt in der Schleimhaut des oberen Magen-Darm-Traktes, wo enterochromaffine Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Vagusafferenzen nachweisbar sind. Die emetische Wirkung von Zytostatika wird durch zwei Mechanismen ausgelöst – eine direkte zytotoxische Wirkung sowie die Freisetzung von Serotonin durch Exozytose aus den enterochromaffinen Zellen mit anschließender Erregung von 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren auf vagalen Afferenzen. Durch eine selektive Blockade der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren mit Ondansetron wird das Erbrechen wirksam gehemmt.

Es liegen Arbeiten vor, die die Existenz mehrerer Subtypen des 5-HT<sub>3</sub> Rezeptors zeigen (**5-HT<sub>3A</sub>**-Nervus vagus, sensorische Neuronen, Ganglion nodosum und Ganglion cervicalis supe-

rior; **5-HT<sub>3B</sub>**-Sympaticus und Parasympathikus; **5-HT<sub>3C</sub>**- gastrointestinale Neuronen). Bradley (1986) geht davon aus, dass die unterschiedliche Affinität bestimmter Antagonisten (z.B. MLD-72222) für 5-HT<sub>3</sub> Rezeptoren in verschiedenen neuronalen Strukturen das Vorhandensein mehrerer 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorsubtypen vermuten lässt. Diese Ergebnisse lassen sich allerdings auch auf Spezies-Unterschiede zurückführen (Butler und Elswood, 1990).

Der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor kommt *funktionell* als Homopentamer oder in Verbindung mit dem 5-HT<sub>3B</sub>-Rezeptor als Heteromer vor (Davies et al., 1999). 1991 wurde bei Mäusen die aus 487 Aminosäuren (56 kDa) bestehende erste Rezeptoruntereinheit 5-HT<sub>3A</sub> kloniert (Maricq und Peterson, 1991). Hiervon sind alternative Splice-Varianten bekannt: eine Langform (5-HT<sub>3AI</sub>) sowie eine Kurzform (5-HT<sub>3AS</sub>). Die Splice-Varianten können keine funktionellen homomeren Rezeptoren bilden, beeinflussen aber die Kanalfunktion (Brüss et al., 2000)

Neben dem ZNS sind 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren in der Peripherie verbreitet. Allerdings finden sie sich im Unterschied zu den übrigen 5-HT-Rezeptoren hauptsächlich in neuronalen Strukturen. Sie konnten an Axonen und Endungen präganglionärer sympathischer Neurone nachgewiesen werden (Wallis, 1989). Weitere Studien ließen darauf schließen, dass der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor die Freisetzung von Neurotransmittern aus postganglionären parasympathischen Neuronen vermittelt, welche z.B. im Kaninchenherz und der Harnblase des Meerschweinchens lokalisiert sind (Fozard et al., 1983). Er wird mit der Aktivierung nicht-myelinisierter afferenter Bahnen des N. Vagus und mit der Freisetzung von Noradrenalin in Zusammenhang gebracht, was den Bezold Jarisch Reflex (reflektorische Hypotension und Bradykardie) auslösen kann (Fastier und McDowal, 1959; Göthert, 1992).

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor tritt auch an Neuronen des myenterischen und submucosen Plexus des Ileums auf (Mawe et al., 1986) und beeinflusst die Wasser- und Elektrolytsekretion des Darmes (Baird und Cuthbert, 1987). Es wird angenommen, dass dies durch die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorvermittelte schnelle Depolarisation cholinerg sekretomotorischer Neurone geschieht.

5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren werden seit langem mit der Schmerzvermittlung assoziiert. Sie treten an vielen somatosensorischen primären afferenten Neuronen und an Hautnervenendigungen auf. Es ist nachgewiesen, dass 5-HT oder 2-Methyl-5-HT-induzierte Schmerzempfindung von selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten gehemmt wird (Richardson und Engel, 1985)

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor konnte in verschiedenen Hirnregionen nachgewiesen werden. Unabhängig von der Spezies ist er in sehr hoher Dichte im Tractus solitarius, in der Area postrema, am hintere-

ren motorischen N. vagus Nukleus und im Nukleus des Tractus spinalis N. trigeminus zu finden (Pratt et al., 1990). Dies sind Nervenstrukturen, die an der Vermittlung von Emesis beteiligt sind, und somit mit der antiemetischen Wirkung von 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten in Zusammenhang gebracht werden. Viele Verhaltensstudien ließen auch auf eine potentielle antipsychotische Wirkung dieser Substanzen schließen. Es wird angenommen, dass die Erhöhung der mesolimbischen Dopamin-Aktivität Psychosen auslösen kann. Die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten, wie Ondansetron, können diese Aktivität inhibieren. Diese Antagonisten können auch psychische Abhängigkeit bei Benzodiazepin-, Alkohol-, Nikotin-, Cocain- und Amphetaminsucht mildern (Costall und Naylor, 2004). Analgetische Effekte der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten (Richardson, 1990) bei akuten und chronischen entzündlichen Schmerzen lassen vermuten, dass sie auch bei Migränetherapie eine große Rolle spielen könnten.

Die Vielfalt der von den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren vermittelten Effekten weist auf ein vernetztes und kompliziertes Zusammenspiel zwischen 5-HT<sub>3</sub>- und anderen Rezeptoren sowie Effektoren sowohl in der Peripherie als auch im ZNS hin. Dies weckt immer wieder das Interesse an diesem Rezeptor und an dem potentiellen klinischen Einsatz von Substanzen mit Affinität zu 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren.

## Emesis und Analgetika

Die Mechanismen des Brechreflexes und die Ursachen für die Emesis (gr. *emetikos* s. erbrechen) sind von großer klinischer Bedeutung hinsichtlich der Entwicklung und Anwendung antiemetischer Substanzen. Der Brechreflex umfasst Detektoren, die die Notwendigkeit zum Erbrechen feststellen, Effektoren, die das Erbrechen verursachen, und ein Koordinationszentrum, welches den gesamten Prozeß steuert. Die Hauptdetektoren des Brechbedürfnisses sind zum einen der Gastrointestinaltrakt, das Labyrinth des Innenohres, sowie die sog. Chemorezeptoretriggerzone (CTZ), die sich in der Area postrema (AP) auf dem Boden des IV. Hirnventrikels befindet. Die Chemo- und Mechanorezeptoren im Gastrointestinaltrakt übermitteln den Reiz an den Kern des Solitärbündels über den N.vagus, dessen einzelne Äste bis in die Area postrema reichen. Zum anderen ist die CTZ für die im Blut zirkulierenden Substanzen empfänglich, da sie durch ihre Lage Kontakt zu der zerebrospinalen Flüssigkeit hat. So handelt es sich um eine komplexe Schaltung - eine Substanz (Toxin oder Medikament) kann an mehreren Stellen aktiv werden und Übelkeit sowie Erbrechen auslösen (Leslie und Gwyn, 1984).

Am emetischen Reflex sind mehrere Neurotransmitter beteiligt. Acetylcholin und Histamin scheinen in den vestibulären Bahnen bei der Reisekrankheit eine Rolle zu spielen. Zahlreiche Antiemetika sind Dopamin-Rezeptorantagonisten, sie weisen auf die Rolle von Dopamin in Verbindung mit der emetischen Bahn hin. Interessant ist, dass Metoclopramid, ein D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist, auch am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor antagonistisch wirkt, wenn es in hoher Dosis verabreicht wird (Fozard und Ali, 1978). Dies hat auf die Rolle der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren bei dem emetischen Geschehen hingewiesen und die Entwicklung von Antiemetika, die speziell an dem 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor wirken sollten, vorangetrieben.

Man geht davon aus, dass die Freisetzung von Serotonin aus den enterochromaffinen Zellen der Darmschleimhaut durch Chemotherapie oder Bestrahlung im Rahmen der Krebsbehandlung Übelkeit und Erbrechen auslöst (Andrews und Davis, 1993). Als Folge aktiviert 5-HT vagale afferente Nervenenden und führt zum Erbrechen. Dieser Mechanismus wird durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten wie Ondansetron und Tropisetron effektiv unterbunden. Ein anderer möglicher Mechanismus geht von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren aus, die in der Area postrema lokalisiert sind. Somit kann man davon ausgehen, das Erbrechen durch Zytostatika wie Cisplatin über mehrere 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelte Bahnen ausgelöst bzw. antagonisiert werden kann. So stellen die 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten eine effektive therapeutische und experimentelle Substanzklasse

dar, um die Rolle von 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren bei der Emesis zu untersuchen. Außer Zytostatika lösen viele andere Medikamente Übelkeit und Erbrechen aus. Dazu zählen verschiedene Analgetika wie z.B. manche Migränemittel, potente Opioidanalgetika und Anästhetika.

Es ist bekannt, dass 5-HT an der Migräne-Pathophysiologie (Jensen, 2000) beteiligt ist und dass es sowohl für den Schmerz als auch für die Nebenerscheinungen wie Übelkeit und Erbrechen mitverantwortlich ist. Einige Studien lassen vermuten, dass der Serotoninspiegel während der Migräneattacke im Blut ansteigt, andere kommen zum gegenteiligen Ergebnis (Markus, 1993). Viele Migränemedikamente aktivieren die Serotoninrezeptoren, andere sind Rezeptorantagonisten. Trotzdem funktionieren beide Arten von Medikamenten gegen den Migräneschmerz. Vorbeugende Medikamente, Biofeedback und Muskelrelaxation wirken als Serotonin-Antagonisten am Zentral-Nervensystem-Serotoninrezeptor. Der Freisetzung von vasoaktiven Peptiden wie Substanz P oder Neurokinin A wird ebenfalls eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Migränekopfschmerzes zugeschrieben (Fidan et al., 2005, Bizzi und Moskowitz, 2005).

Ergotalkaloide und insbesondere Dihydroergotamin wurden traditionell zur Migräneprophylaxe und Therapie eingesetzt (Silberstein et al., 2003). Dihydroergotamin ist ein Dopaminrezeptoragonist und ein partieller Agonist an  $\alpha_1$ -Adrenorezeptoren. Darüber hinaus hat es eine mäßige bis starke Affinität zu verschiedenen Serotoninrezeptoren. Es zeigt eine agonistische Wirkung am 5HT<sub>1D</sub>-Rezeptor, der wahrscheinlich die Antimigränewirkung zugrunde liegt. Die Freisetzung der Neuropeptide (s. o.) aus terminalen Axonen des N. trigeminus (unmyelinisierte C-Fasern) soll über eine Erregung von 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptoren blockiert werden können (Buzzi und Moskowitz, 1991).

Zu Beginn der Behandlung mit Ergotalkaloiden treten Übelkeit und Erbrechen, Schwindelgefühl und Kopfschmerzen auf. Aufgrund der schlechteren Wirksamkeit und Verträglichkeit werden die Ergotalkaloide heute zunehmend durch die Triptane, d. h. selektive 5-HT<sub>1B/1D</sub>-Rezeptoragonisten, verdrängt (Boureau et al., 2000).

Die spezifisch agonistische Wirkung der Triptane ermöglicht eine schnellere Linderung der Kopfschmerzen und der Begleitsymptome (Übelkeit, Erbrechen, Photophobie), als dies von Ergotalkaloiden bekannt ist und verfügt zudem über ein wesentlich günstigeres Nebenwirkungsprofil (Bertin et al., 1999). Sumatriptan ist das erste zugelassene Triptan. Es wird angenommen, dass die 5-HT<sub>1B/1D</sub>-Rezeptor-Aktivierung durch Sumatriptan zur Konstriktion der Zerebralarterien und zur Unterdrückung der neurogenen Entzündung der afferenten trigeminovaskulären Bahnen führt

und daher seine Antimigränewirkung entfaltet. (Hoyer et al., 1994; Schoeffler et al., 1989). Im Vergleich zu den neueren Triptanen wirkt Sumatriptan am wenigsten selektiv. Deshalb kann es von Interesse sein, ob Sumatriptan auch am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor wirkt und auf diese Weise die Übelkeit und das Erbrechen bei Migräne beeinflussen könnte.

Ähnlich wie die Migränemedikamente können andere Schmerzmittel wie Opiate und Opioidanalgetika neben ihrer stark schmerzlindernden Wirkung Emesis verursachen. Diese Substanzen wirken mehr oder weniger selektiv an den Opiatrezeptoren, vorwiegend am  $\mu$ -Opiatrezeptor, aber die Beteiligung von Serotoninrezeptoren an ihren (Neben) Wirkungen ist nicht ausgeschlossen. Broekkamp und Phillips (1979) zeigten, dass Morphin über die  $\mu$ -Opiatrezeptoren Ausschüttung von Dopamin und daher Übelkeit und Erbrechen auslösen kann. Andererseits gibt es Hinweise, dass Opiate wie Morphin die Aufnahme von Serotonin in die serotonerge Neurone unterdrücken könnte (Carlsson, 1969), was eine Beteiligung von Serotoninrezeptoren bei der Opiat-induzierten Emesis erklären könnte.

Das früher bei Vergiftungen eingesetzte zentrale Emetikum Apomorphin ist ein Morphin-Abkömmling, der voller Agonist an zentralen D<sub>2</sub>-Rezeptoren und ein schwacher, partieller Agonist an zentralen D<sub>1</sub>-Rezeptoren ist. Die vermutlich über Dopamin-Rezeptoren und 5-HT-Freisetzung vermittelte Stimulation der Chemorezeptoren-Triggerzone in der Medulla bewirkt einen starken Brechreiz (Goldmann und Keabian, 1984). Trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zu Morphin, hat es keine Affinität zu  $\mu$ -Rezeptoren und weist keine analgetische Wirkung auf (Elster, 1990).

Von besonderem Interesse sind körpereigene Opioide, so genannte Endorphine, die in Stress- oder Schmerzsituationen vermehrt ausgeschüttet werden, spezifisch an den Opiatrezeptoren binden, diese aktivieren und schmerzlindernd sowie euphorisierend wirken. Zu diesen Poly- und Oligopeptiden gehören  $\beta$ -Endorphin (mit 31 Aminosäuren), Dynorphine (mit 17 bzw. 8 Aminosäuren) und die Pentapeptide Methionin- und Leucin-Enkephalin, die aus fünf endständigen Aminosäuren der Endorphine (Met-Enkephalin) bzw. der Dynorphine (Leu-Enkephalin) bestehen (Kosterlitz und Hughes, 1975). Im Körper konnte außerdem auch Endomorphin 1 und Endomorphin 2 – Tetrapeptide – nachgewiesen werden, die unter den Endopeptiden die höchste Selektivität für die  $\mu$ -Opiatrezeptoren aufweisen (Zadina et al, 1997). All diese Substanzen weisen ähnliche pharmakodynamische Eigenschaften auf wie die synthetischen Opioide. Sie unterscheiden sich von ihnen nur in der Pharmakokinetik. Deshalb ist es besonders wichtig, die pharmakologi-

schen Effekte beider Substanzklassen eingehend zu untersuchen, um die opioid-induzierte Emesis optimal charakterisieren zu können.

## **Problemstellung**

Kinetiken und Mechanismen von Antiemetika und weiteren Substanzen mit (anti)emetogenen Eigenschaften, wie Migränemittel und Opioid-Analgetika sind bereits auf der molekularen Ebene an humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren untersucht worden (Wittmann et al., 2006; Barann et al., 2002).

Die Wirkung von Ergotamin, einem traditionellen Antimigränemedikament, das für seine Emetogenität bekannt ist (Silberstein und Douglas, 2005), ist am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor von Walkembach et al. (2005) untersucht worden. Obwohl das Ergotalkaloid selbst keinen Effekt zeigte, hat das Antiemetikum und Prokinetikum Metoclopramid (MCP), das häufig mit den Ergotalkaloiden kombiniert wird (Schwarzberg, 1994) in Ab- und Anwesenheit von Ergotamin den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor bei klinischen Konzentrationen konzentrationsabhängig und reversibel gehemmt. MCP ist ein D<sub>2</sub>- und 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor Antagonist (Imafuku, 1987, Barann et al., 1993), somit war seine Potenz am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor mit seiner antiemetischen Wirkung bei Ergotalkaloide-Migränetherapie kompatibel. Obwohl sich der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor durch Ergotamin nicht direkt zu beeinflussen schien, waren diese Experimente ein Hinweis auf die Rolle des Rezeptors bei der Ergotalkaloide-Emetogenität während Migränetherapie. Daher sollten andere Migränemittel wie Dihydroergotamin und Sumatriptan am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor untersucht werden und mit den Effekten von Ergotamin verglichen werden.

Wittmann et al., (2006) zeigten, dass Morphin-Derivate bei klinischen Konzentrationen in HEK293-Zellen bei „Whole-cell Patch-Clamp“ den 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor beeinflussen. Morphin und Hydromorphon unterdrückten den 5-HT (30 µM)-induzierten Peakstrom und verlangsamten gleichzeitig die Rezeptorkinetiken, insbesondere die Rezeptor-Inaktivierung, was auf eine Rezeptor-Inhibierung und Verstärkung des 5-HT-induzierten Gesamtsignals (Rezeptor-Potenzierung) hindeutet. Die Ergebnisse belegten zu einem Teil eine Co-Inzidenz von direkten in-vitro Effekten von Pharmaka an humanen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren und Emesis bzw. deren Unterdrückung. Die Inhibierung des 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptors würde auf eine antiemetogene und seine Potenzierung auf eine eher emetogene Wirkung dieser Medikamente hinweisen. Des Weiteren gibt es auch Befunde, die auf eine indirekte Modulation des Rezeptors im Netzwerk hindeuten. Auf die Ergebnisse sollte nun im Einzelnen eingegangen werden.

Es sollte überprüft werden, welche Wirkungen die Morphin-Derivate am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor im „Outside-out“-Modus zeigen und ob sich diese mit den Effekten von anderen  $\mu$ -Rezeptor-affinen Analgetika wie z.B. synthetischen und endogenen Opioiden vergleichen lassen. Obwohl all diese Substanzen ihre analgetische Wirkung vorwiegend über  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren entfalten, weisen sie wesentliche strukturelle Unterschiede auf. Die Untersuchung von Morphin-Derivaten, synthetischen und endogenen Opioiden am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor hatte zum Zweck die Struktur-Wirkungsbeziehung dieser Substanzen besser zu charakterisieren. Experimente mit dem potenten Emetikum Apomorphin, der gewisse strukturelle Ähnlichkeiten zu Morphin aufweist, ohne an den Opioid-Rezeptoren wirksam zu sein, sollten klären, ob die Verstärkung des 5-HT-induzierten Gesamtsignals durch die Morphin-Derivate mit seiner emetischen Wirkung zusammenhängen könnten.

Folgende Fragen sollten in dieser Arbeit untersucht werden:

1. Welche Effekte haben Migränemittel und starke Analgetika am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor? Treten diese bei therapeutischen Plasmakonzentrationen der untersuchten Substanzen auf?
2. Verstärken klinische Konzentrationen emetogener Substanzen die Funktion des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors?

Der Einfluss von Migränemitteln und starken Analgetika auf den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor sollte bewertet werden. Es war zu klären, ob die durch die untersuchten Substanzen bewirkte Unterdrückung bzw. Potenzierung der 5-HT-induzierten Ioneneinströme die Nebenwirkungen von Analgetika erklären können. Die Relation zwischen Konzentrationen für *in vitro* Effekte und freien Plasmakonzentrationen, die während Therapie erreicht werden, könnte eine Beurteilung erlauben, inwieweit molekulare Effekte von Analgetika an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren mit postoperativen Übelkeit und Erbrechen korrelieren.



## Material und Methoden

### Stabile Transfektion

Die Transfektion wurde im Institut für Pharmakologie (Abt. Bönisch / Brüß) der Universität Bonn durchgeführt. Für die Versuche wurden menschliche embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) verwendet. 20% konfluente HEK293-Zellen sind nach der modifizierten Calciumphosphat-Methode (Chen und Okayama, 1987) mit Hilfe des pCDNA3 (Invitrogen) Vektors unter Kontrolle des humanen Cytomegalovirus Promotors stabil mit der h5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-cDNA transfiziert worden. Stabil transfizierte Zellklone wurden durch Zugabe von Geneticin (800 µg/ml) selektioniert. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt. Nach Auftreten einzelner Zellkolonien wurden diese durch spezielle Klonzylinder (Sigma) getrennt und anschließend in 24-fachen Kulturplatten (Falcon) bis zur Konfluenz kultiviert. Aus jeder Transfektion wurden 20-40 Kolonien hinsichtlich erfolgreicher Expression der humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren mit [<sup>14</sup>C]guanidinium Influx und Bindung des selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Antagonisten [<sup>3</sup>H]GR 65630 [3-(5-methyl-1H-imidazol-4-yl)-1-(1-methyl-1H-indol-3-yl)-1-propanone] getestet. Die Kolonien mit der besten Expression wurden vermehrt und danach für weitere Experimente verwendet.

### Zellkultur

HEK293 -Zellen wurden in DMEM nutrient mix F12 (1:1; v/v) Medium bei 37°C mit 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank (Typ BB16, Fa Heraeus, Deutschland) kultiviert. Das Wachstumsmedium enthielt 10% fetales Kälberserum, Penicillin (100 I.U./ml), Streptomycin (100 µg/ml), Geneticin (0,75 mg/ml) und Glutamin (292 µg/ml). 6 Tage vor einem Patch-Clamp-Experiment wurden die Zellen in Petrischalen (Nunc, 35mm Durchmesser) aliquotiert.

Ein Teil der Zellen wurde für eine neue Zellkulturflasche verwendet. Nach drei Monaten wurde die laufende Zellcharge verworfen und eine neue herangezogen. Hierfür wurden neue, in 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) bei -80°C aufbewahrte HEK293 Zellen aufgetaut und nach Reinigung in eine neue Zellkulturflasche gebracht. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben beschriebenen.

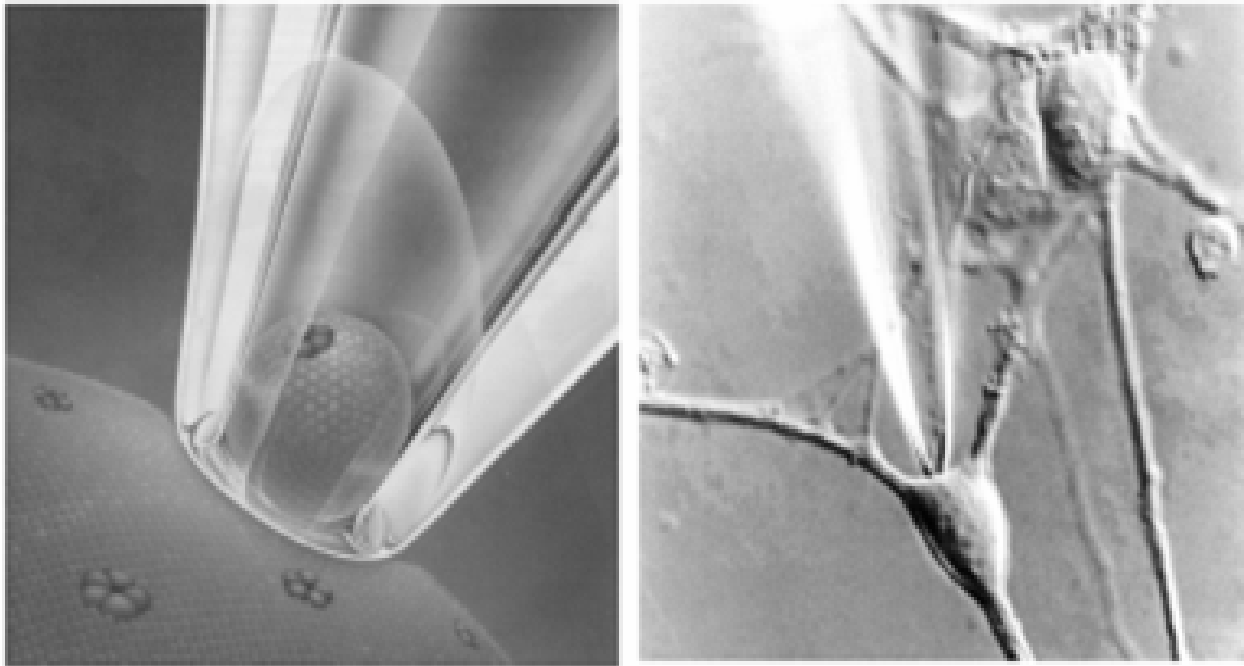
## Elektrophysiologie

### Technik (Patch-Clamp)

Die Patch-Clamp Methode dient zur Ableitung von transmembranären Strömen einzelner Zellen bzw. von Geweben. Die Patch-Clamp Technik an Liganden-gesteuerten Ionenkanälen wurde von Neher und Sakmann entwickelt (Hamill et al., 1981) und ermöglicht, diese selbst an Zellfragmenten zu untersuchen. Es werden verschiedene Konfigurationen dieser Methode unterschieden, für diese Arbeit wird die "excised" - Konfiguration im „outside-out“ Modus verwendet.

Aus einer Borosilikat-Glaskapillare (Kwik-Fil<sup>TM</sup>, World Precision Instruments, USA) wurden im Pipettenziehgerät (List L/M-3P-A) durch ein zweistufiges Ziehen zwei gleichlange Patchpipetten hergestellt. Die Pipettenspitzen wurden in der „Mikroforge“ (L/M-CPZ 101, List-Medical – Elektronik, Darmstadt) poliert. Die fertigen Pipetten wurden in einem verschließbaren Behälter aufbewahrt und innerhalb der nächsten Stunden benutzt. Kurz vor dem Versuch wurden sie mit einer dem intrazellulären Milieu angepassten Elektrolytlösung gefüllt.

Unter Mikroskopkontrolle wird die Messpipette mit einem mechanischen Manipulator von oben her in die Flüssigkeit mit den Zellen gebracht und langsam vorgeschoben. Dabei wird die Pipettenspitze zunächst unmittelbar oberhalb einer Zelle plaziert und dann mit einem manuell gesteuerten Mikromanipulator auf die Zelle aufgesetzt (Abbildung 1). Die untersuchte Zelle wird durch diese Pipette nur berührt. Durch leichtes Ansaugen der Membran Richtung Messpipette bildet sich eine so enge Verbindung zwischen Membran und Pipette, dass ein sehr hoher Widerstand in Giga-Ohm-Bereich (1-4 G $\Omega$ ) zwischen Pipettenlösung und Extrazellulär-(bzw. Bad-)lösung entsteht. Dadurch lassen sich das Hintergrundrauschen bzw. Leckströme Methode reduzieren. Die Pipette wird vorsichtig von der am Boden haftenden Zelle entfernt, so dass an die Pipette anhaftende Zellmembran von der restlichen Zellmembran abreißt und sich spontan wieder verschließt. Die ehemalige Innenseite der Zellmembran ist zum Pipettenlumen gerichtet, die Membranaußenseite zur Badlösung. Dadurch kann der Strom einer kleinen Anzahl von Ionenkanälen gemessen werden.



**Abbildung 1: Entstehen eines „patches“: Mit der Glaspipette wird ein Stück der Zellmembrann entnommen (Neher und Sackmann, Scientific American, März 1992).**

Für die Experimente wurde ein computergesteuerter Patch-Clamp Verstärker (EPC-7, List Electronic, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die analogen Daten wurden durch einen externen Low-pass-Filter bei 1 kHz gefiltert (entweder Frequency Devices, MA, USA oder LPBF-48DG, NPI Electronic, Tamm, Deutschland) und anschließend digitalisiert (Digidata 1200, Axon, Kalifornien, USA) Die Aufnahmefrequenz betrug 2 kHz. Das Membranpotential wurde 500 ms vor der Serotonin-Applikation von 0 mV auf -100 mV hyperpolarisiert. Dadurch wurde optimale Stabilität des Patches erreicht. Nach der Agonisten-Applikation (30  $\mu$ M 5-HT) wurde das Membranpotential von 0 mV wieder hergestellt.

### **Lösungen**

Die Elektrolytumgebung wurde so gewählt, dass Natriumionen durch die 5-HT<sub>3A</sub>-Kanäle permeieren können und die dadurch entstehenden Ströme messbar sind. Bei den Experimenten unterscheiden sich Intra- und Extrazellulärlösung.

Vor den Messungen wurde das Kulturmedium durch Extrazellulärlösung mit folgendem Inhalt ersetzt (mM):

NaCl 150; KCl 5,6; CaCl<sub>2</sub> 1,8; MgCl<sub>2</sub> 1; HEPES 10; pH 7,4.

Die Intrazellulärflüssigkeit, die in die Patch-Clamp-Pipette gefüllt wird, enthält (mM) KCl 140; EGTA 10; MgCl<sub>2</sub> 5; HEPES 10; pH 7,4. Die Einstellung des pH erfolgte mit NaOH / KOH bzw. HCl. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur (18-24° C) durchgeführt.

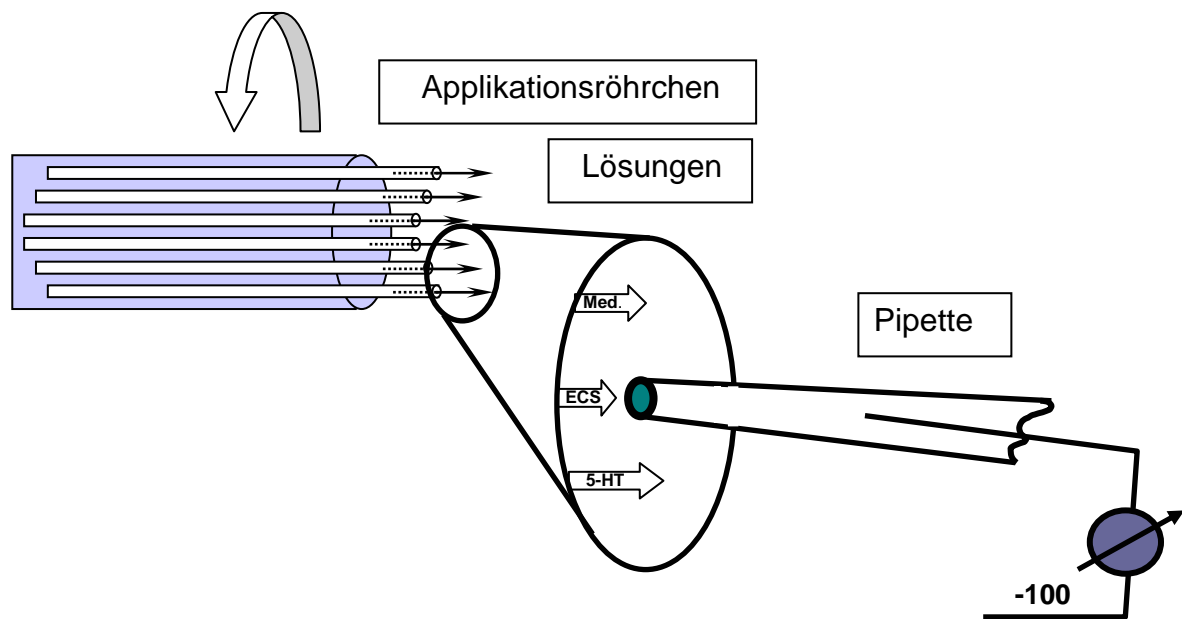
### **Schnelles Lösungsapplikationssystem**

Bislang besteht immer noch Unklarheit über den physiologischen Hergang an Synapsen mit 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren hinsichtlich der wirksamen Serotonin - Konzentration und ihrer Wirkungsdauer. Es wird vermutet, dass für die Rezeptoraktivierung nur eine kurze Exposition mit dem Liganden notwendig ist. Um dem gerecht zu werden, wurden bei der Durchführung der folgenden Experimente kurze Applikationszeiten verwendet.

Für die Versuche wurde ein schnelles Lösungsapplikationssystem (RSC 200, Biologic, Frankreich) verwendet, das den Austausch der Lösungen innerhalb von 2 ms ermöglicht (Abbildung 2). Hierfür wurde ein Zulaufsystem zur Petrischale konstruiert, das aus fünf Glasreservoirs und fünf Zulaufen, überwiegend aus Polytetrafluorethylen (Teflon, DuPont, USA) besteht. Polytetrafluorethylen zeichnet sich durch seine inerten Eigenschaften gegenüber den meisten chemischen Substanzen aus. Dadurch wird ein potentieller Verlust der untersuchten lipophilen Substanzen, der z.B. bei Anästhetika enorm sein kann, verringert (Barann et al., 2000a).

Zwischen den Glasreservoirs und den Teflonschläuchen war der obere Teil eines in der Klinik gebräuchlichen Infusionsbesteckes samt Tropfkammer angeschlossen. Der Schlauch des Infusionsbesteckes mündete in den Teflonschlauch, der auf einer kurzen Strecke (~ 3 cm) durch quetschbaren Silikonschlauch ersetzt war. Letzterer wurde in die Ventile des Perfusionssystems (RSC 200, Biologic, Frankreich) eingeklemmt. Jeder Zulauf mündete in einem eigenen Glasröhrchen, das unmittelbar vor den „patch“ positioniert werden kann.

Die „Patche“ wurden ~0,5 mm vor die Öffnung der Applikationsröhrchen positioniert. Mittels Messsystem-gesteuerten Quetschventilen konnte zwischen der Waschlösung (Extrazellulärlösung mit oder ohne Medikament) und der Testlösung (30 µM 5-HT in Extrazellulärlösung mit oder ohne Medikament) gewechselt werden. Jede Lösung wurde durch ein eigenes Applikationsröhrchen appliziert, was einen oszillationsfreien Austausch zwischen mehr als zwei Lösungen ermöglichte (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Schnelles Applikationssystem (Abbildung nach Walkembach). Der Drehkopf ermöglicht die schnelle und exakte Positionierung der Applikationsröhrchen vor den „patch“. Über die in der Pipette eingeführte Elektrode wurde die Membran hyperpolarisiert (-100 mV).**

### Substanzapplikation

Bis zu fünf Glasreservoirs wurden verwendet. In dem ersten war die Agonistlösung ohne Medikament ( $30\mu\text{M}$  Serotonin), in dem zweiten war die Waschlösung (Extrazellulärlösung), in dem dritten Glasreservoir war die Testlösung ohne, und in dem vierten mit Agonisten ( $30\mu\text{M}$  Serotonin). Es wurde eine 5-HT Konzentration von  $30\mu\text{M}$  gewählt, so dass ein nahezu maximaler und reproduzierbarer Ioneneneinstrom gemessen werden konnte.

Lösungsapplikationsprotokolle ( -- , +- , -+ )

Für die Patch-Clamp Experimente wurden drei verschiedene Applikationsarten gewählt (s.u.):

- (1) *Kontinuierliche Applikation* (++): 60 s vor und während der 5-HT-Gabe;
- (2) *Offenkanal-Applikation* (-+): Gabe der Testsubstanz ausschließlich während der 5-HT-Gabe;
- (3) *Geschlossenkanal-Applikation* (+-): Gabe der Testsubstanz ausschließlich 60 s vor der 5-HT-Gabe;

Nachdem ein stabiler Seal (1-4 G $\Omega$ ) erreicht worden war, wurde die Membran von 0 mV auf -100 mV hyperpolarisiert. Die Agonisten-Applikation (30  $\mu$ M 5-HT) löste Einwärtssröme aus, die am Bildschirm aufgezeichnet wurden (Abbildung 3), nachdem das Membranpotential von 0 mV wieder hergestellt wurde.

Jedes Experiment wurde nach dem jeweiligen Versuchsprotokoll drei Mal nach Auswaschintervallen von 60 s wiederholt, wenn eine neunzigprozentige Erholung der Kontrollstromspurenerreicht war. Dieses Zeitintervall wurde gewählt, da sich die 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren-Desensibilisierung nach 15-20 s zu 50 % erholt. Während des Versuches wurden die Maximalamplituden und die Kinetiken der Stromspuren beobachtet.

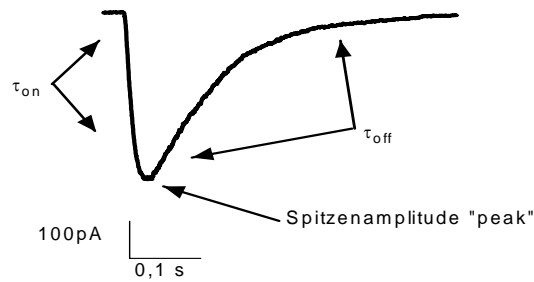
## **Datenerfassung und Datenauswertung**

### **Software**

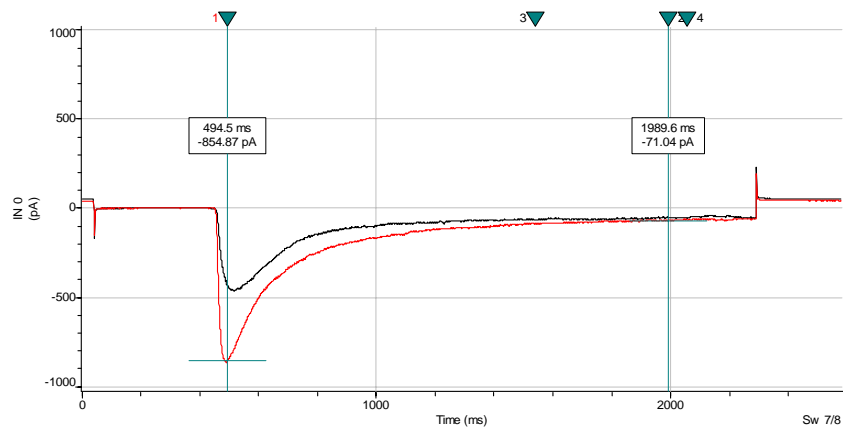
Alle Stromspuren wurden digitalisiert (Digidata 1200, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) und als Dateien auf der Computerfestplatte gespeichert. Für die Experimente wurde ein IBM-kompatibler Personal-Computer benutzt. Dieser steuerte den zur Messung der Stromspuren notwendigen Patch-Clamp Verstärker. Die Pulsprotokolle wurden mit dem Programm Pclamp 7 (Axon) erstellt. Die Auswertung der Stromspuren erfolgte mit dem Programm Clampfit 8 (Axon). Die Grafiken wurden mit Graph Pad Prism 3.2 Software (Graph Pad, CA, USA) erstellt.

### **Analyse der Stromspuren**

Die Auswertung der 5-HT (30 $\mu$ M)-induzierten Stromspuren erfolgte mit der Clampfit-Software. Die Maximalströme wurden mittels der Positionsanzeiger (Abbildung 4) in pA abgelesen. Die Aktivierungs- und Inaktivierungszeitkonstanten wurden ermittelt, indem (1) an dem jeweils aufsteigenden (Aktivierung) und an den abfallenden Teil (Inaktivierung) der Stromspur eine monoexponentielle Funktion angepasst wurde oder (2) eine biexponentielle Funktion an die gesamte Stromspur angepasst wurde. In der vorliegenden Arbeit sind die Stromspuren mit monoexponentiellen Funktionen ausgewertet worden, da kein Unterschied zwischen den beiden Methoden festgestellt wurde.



**Abbildung 3: 5-HT (30 $\mu$ M)-induzierter Einwärtsstrom (-100mV). Es wurden die Aktivierungszeitkonstante ( $\tau_{on}$ ), die Inaktivierungszeitkonstante ( $\tau_{off}$ ) der Stromspur durch exponentielle Kursoranpassung ermittelt. Der Maximalstrom (peak) wurde in pA abgelesen.**



**Abbildung 4: Zwei exemplarische 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierte Stromspuren. Einer der Positionsanzeiger ist an die Stromspurspitze angelegt, so dass eine Stromamplitude von 854 pA abgelesen werden kann. Durch Positionierung von beiden „cursorn“ am Anfang und am Ende der jeweils aufsteigenden und abfallenden Teile der Stromkurve konnte eine monoexponentielle Funktion an den jeweiligen Teil der Stromspur angelegt werden. Dadurch wurden die Zeitkonstanten der Strom-Aktivierung ( $\tau_{on}$ ) und Desensibilisierung ( $\tau_{off}$ ) ermittelt.**

Die so erhaltene Erstausswertung wurde zur weiteren Analyse in Graph Pad Prism 3.0 Software (Graph Pad, CA, USA) importiert. Die Einwärtsströme (pA) und Zeitkonstanten (ms) in Gegenwart einer Testsubstanz (z.B. Morphin) wurden in Prozent der Mittelwerte aus den jeweiligen Kontroll- und Auswaschströmen (in Abwesenheit der Testsubstanz) ausgedrückt.

Die Konzentrationswirkungskurven von 5-HT und den untersuchten Substanzen wurde durch Anpassen der Hill-Gleichung vorgenommen:

$$i = c^n / (c^n + EC^n_{50})$$

( $i$  ist der Spitzenstrom in Gegenwart des Medikamentes als Fraktion des Kontrollstromspitzenstroms,  $c$  ist die 5-HT Konzentration,  $n$  ist der Hill-Koeffizient, und  $EC_{50}$  ist die Konzentration des halb-maximalen Effekts). 3-6 erfolgreiche Experimente ergaben einen Datenpunkt.

### **Statistik**

Berechnet wurden Mittelwerte ( $\pm$  SEM). Für die Prüfung der Signifikanz wurde der gepaarte Student t-Test benutzt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgesetzt.

### **Materialien**

Die Materialien für die Zellkultur wurden von Gibco oder von Sigma bezogen. Alle untersuchten Substanzen wurden direkt in der Extrazellulärlösung gelöst.

Es wurden Experimente mit folgenden Substanzen durchgeführt:

Sumatriptan (GlaxoSmithKline)

Dihydroergotamin (DHE) (Sigma)

Morphin (Mundipharma)

Fentanyl (Janssen)

Hydromorphon (Abbott GmbH)



Remifentanyl (GlaxoSmithKline)

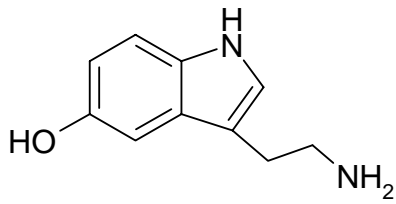
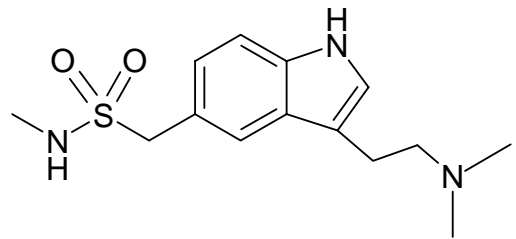
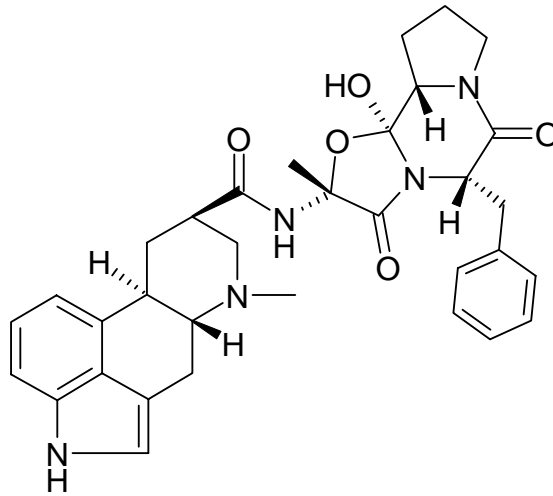
Alfentanyl (Janssen)

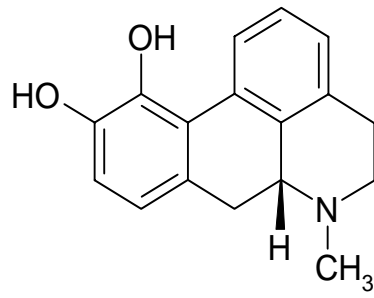
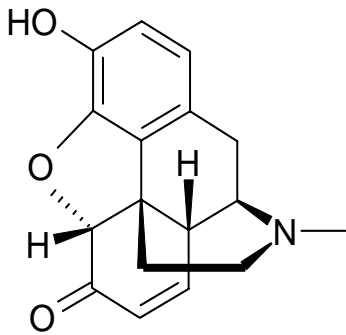
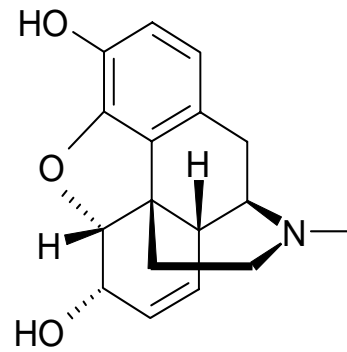
Sufentanyl (Janssen)

Apomorphin (Sigma)

Endomorphin 2 (Tocris)

Met-Enkephalin (Sigma)

**Strukturformeln verwendeter Substanzen****5-HT****Sumatriptan****Dihydroergotamin**

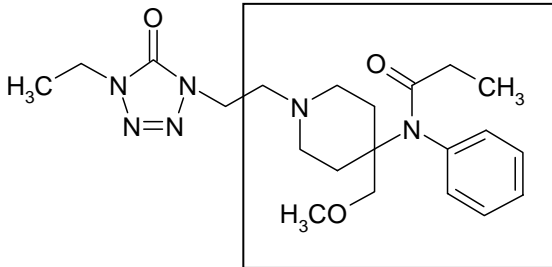
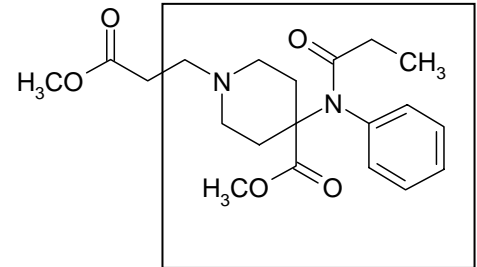
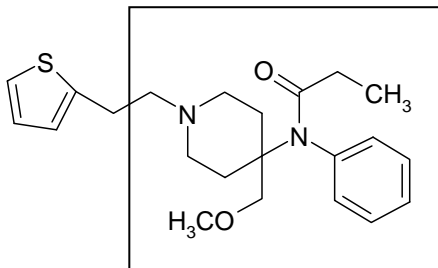
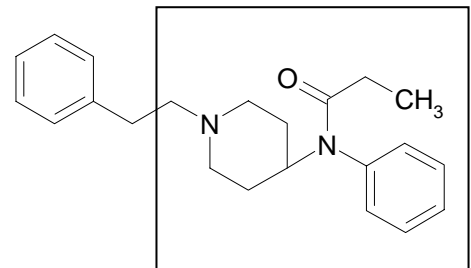
**Apomorphin****Morphin****Hydromorphon**

Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>

**Endomorphin 2**

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met

**Methionin Enkephalin**

**Alfentanil****Remifentanil****Sufentanil****Fentanyl**

**Liste der verwendeten Abkürzungen**

5-HT = 5-Hydroxytryptamin

h5-HT<sub>3A</sub> = Humaner 5-Hydroxytryptamin<sub>3A</sub> Rezeptor

HEK = Human embryonic kidney

ECS = Extracellular solution

ICS = Intracellular solution

nACh-Rezeptor = nikotinischer Acetylcholinrezeptor

DHE = Dihydroergotamin

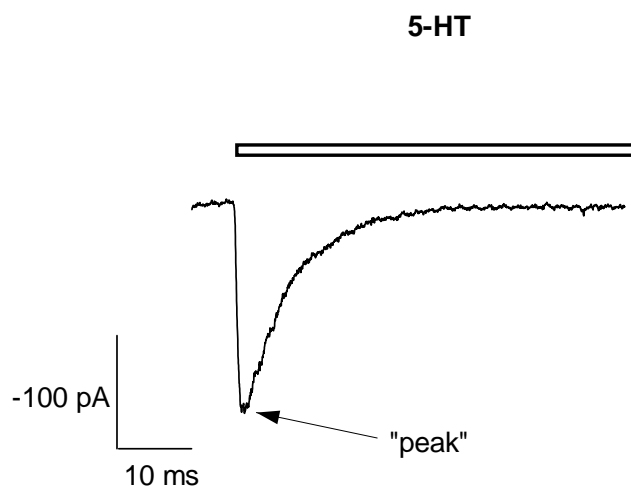
MCP = Metoclopramid

n.s. = nicht signifikant

## Ergebnisse

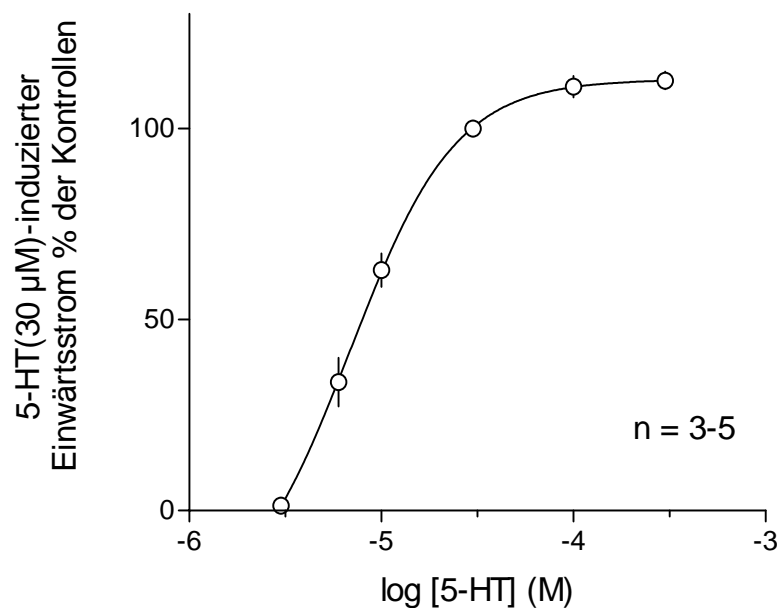
### Charakterisierung des 5HT-induzierten Stromes

Die Applikation von 5-HT auf „excised patches“ löste Einwärtsströme aus (Abbildung 5). Zur Charakterisierung des humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors wurde eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung zwischen der applizierten 5-HT-Konzentration und der Rezeptor-Antwort aufgestellt. Dazu wurde der Agonist in stufenweise ansteigender Konzentration (3-300  $\mu$ M) bei einem konstanten Haltepotential von -100 mV appliziert. Die Applikationszeit betrug 2 s. Zwischen den Applikationen lag ein Zeitintervall von 60 s zur vollständigen Erholung der Rezeptorkanäle. Um eine Konzentrations-Wirkungskurve zu erhalten, wurden die Maximalströme („peaks“) bestimmt und als Prozent der jeweiligen Kontrollstromspur (30  $\mu$ M) dargestellt. Es konnte der Einfluss des Agonisten auf Stromamplitude, Anstiegszeit, Desensibilisierungszeit erfasst werden. Die mittlere Stromamplitude der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme beträgt  $355 \pm 18,6$  pA (n = 313; Mittelwert  $\pm$  S.E.M.), die Aktivierungszeitkonstante  $\tau_{on}$   $7,1 \pm 0,1$  ms (n = 283; Mittelwert  $\pm$  S.E.M.) und die Inaktivierungszeitkonstante  $\tau_{off}$   $116,2 \pm 4,04$  ms (n = 284; Mittelwert  $\pm$  S.E.M.)



**Abbildung 5: Exemplarische Stromspur eines 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Einwärtsstroms (-100 mV). Der Maximalstrom ist als „peak“ bezeichnet.**

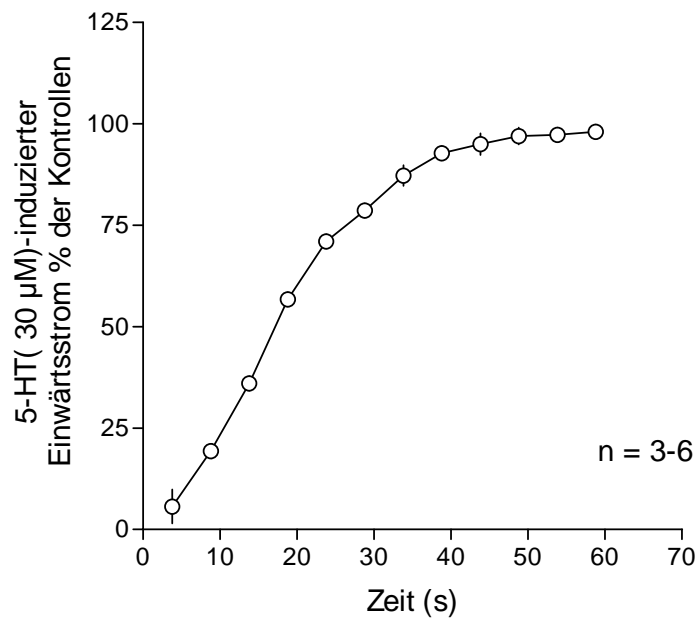
Die Konzentrations-Wirkungskurve von 5-HT (Abbildung 6) wurde nach der Hill-Gleichung gefittet ( $IC_{50} = 6,9 \mu\text{M}$ ; Hill-Koeffizient = 1,6). Diese Ergebnisse waren konsistent mit den von anderen Autoren unter denselben Bedingungen erhobenen Daten (Barann et al., 2000). Eine Konzentration von  $30 \mu\text{M}$  5-HT, die einen nahezu maximale ( $\sim 90\%$ ) und reproduzierbaren Ioneneinstrom hervorrief, wurde für die weiteren Experimente als Referenz gewählt.



**Abbildung 6:** Serotonin- Konzentrations-Wirkungskurve (-100 mV). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis der durch Serotonin auslösbaren Maximalströme zu den Kontrollströmen ( $30 \mu\text{M}$  5-HT) aufgetragen. Die Kurve konnte nach der Hill-Gleichung gefittet werden ( $IC_{50} = 6,9 \mu\text{M}$ ; Hill Koeffizient = 1,6).

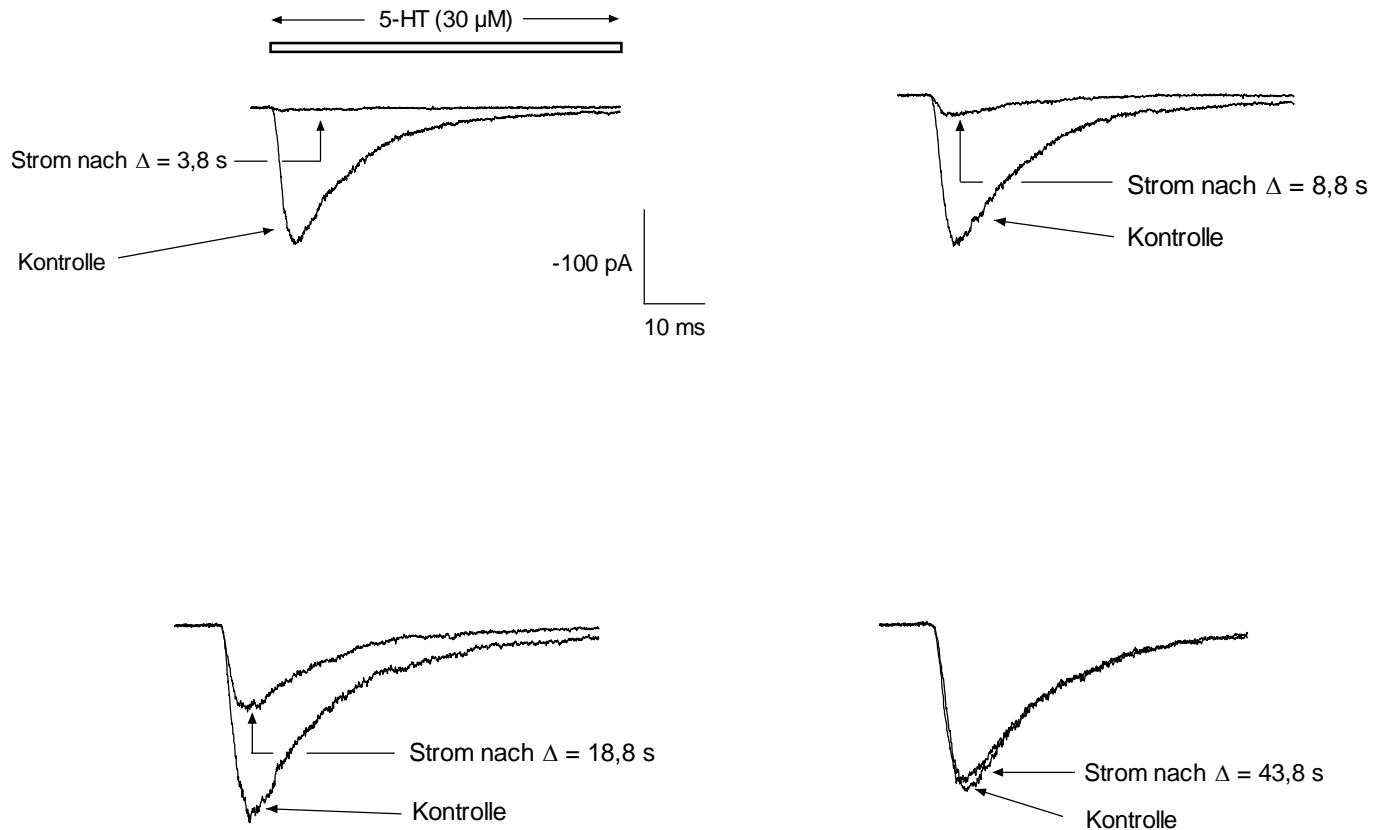
Zur weiteren Charakterisierung des  $5\text{-HT}_{3A}$ -Rezeptors wurden Doppelpulsexperimente durchgeführt. Hierbei sollte die Rezeptor-Desensibilisierung bzw. die Erholung davon untersucht werden. 5-HT ( $30 \mu\text{M}$ ) wurde in Zeitintervallen von 3,8 bis 58,8 s in 5 s Schritten auf die Kanäle appliziert. Bei Zeitintervallen zwischen den Pulsen von  $\leq 45$  s resultierte eine Reduzierung des Maxi-

malstroms, die auf die Rezeptor-Desensibilisierung zurückzuführen ist. Interpuls-Zeitintervalle von  $\leq 5$  s führten zu einer vollständigen Desensibilisierung der Rezeptoren (Abbildung 7 und Abbildung 8).



**Abbildung 7: Doppelpulsexperimente (-100 mV): 5-HT (30 µM)-induzierter Strom. Das Zeitintervall zwischen den beiden 5-HT Pulsen wurde von 3,8 s bis 58,8 s in 5 s Schritten verlängert, somit konnte die Rückkehr der Rezeptoren aus dem desensibilisierten Zustand gemessen werden.**





**Abbildung 8:** Originalspuren 5-HT (30 μM)-induzierter Einwärtsströme von einem „patch“: 5-HT (30 μM) wurde in Zeitintervallen von 3,8 bis 58,8 s in 5 s Schritten auf die Kanäle appliziert. Eine nahezu vollständige Desensibilisierung wurde bei Zeitintervallen von < 5 s zwischen den 5-HT Pulsen und eine komplette Erholung daraus bei Zeitintervallen von  $\geq 45$  s beobachtet.

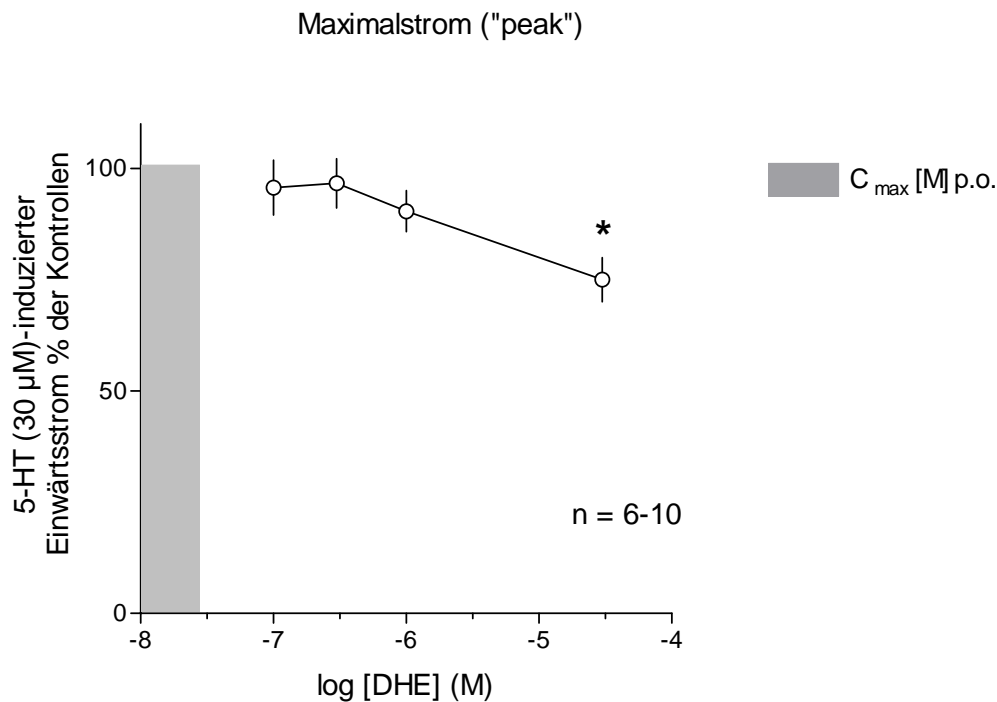
## Antimigränemittel

### Dihydroergotamin (DHE)

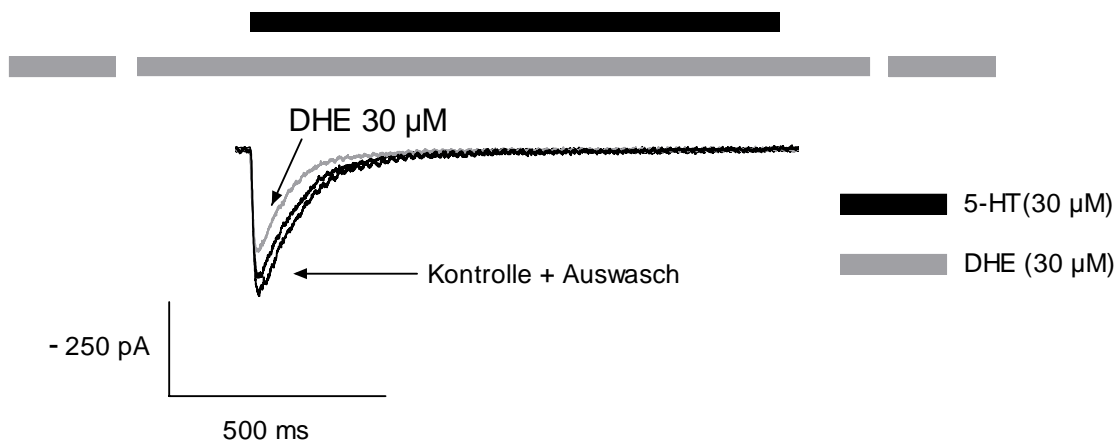
In „patchen“, die zuvor bei 5-HT (30  $\mu$ M)-Gabe einen Einwärtsstrom zeigten, löste DHE in Abwesenheit des Agonisten keine Ströme aus.

#### *Einfluss von DHE auf die Stromamplitude*

Die Konzentrations-Wirkungskurve in Abbildung 9 zeigt, dass DHE die Amplitude der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme erst bei höchsten Konzentrationen unterdrückt ( $\geq 3 \mu$ M; die Substanz wurde im Äquilibrium appliziert, ++, s. Methoden). Dieser Effekt wird durch die Originalspuren in Abbildung 10 verdeutlicht. Diese Unterdrückung war reversibel, da mindestens 90 % der Kontrollamplitude nach einem Auswasch für 60 s (Abbildung 10) wieder erreicht wurde. Der graue Balken (Abbildung 9) bezeichnet den Bereich der Plasmakonzentrationen des Medikamentes: ( $C_{\max}$ ) bei oraler Gabe von 1mg beträgt 2,88 ng/ml (entspricht 0,01  $\mu$ M), bei i.v. Gabe von 1 mg:  $C_{\max} > 10$  ng/ml, entspricht  $\geq 0,02 \mu$ M (Silberstein et al., 2003).



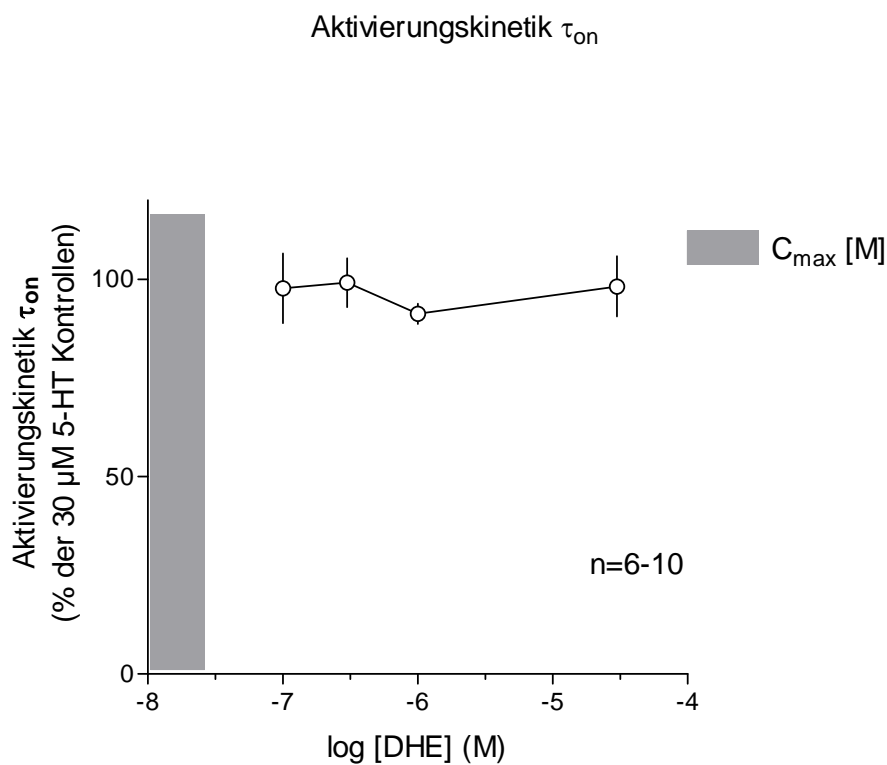
**Abbildung 9:** Konzentrations-Wirkungskurve der Wirkung von DHE auf 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-vermittelte Einwärtsströme bei Äquilibrium Applikationsart (++; Maximalstrom = „peak“). Eine signifikante Hemmung des durch 5-HT (30 µM)-induzierten Stromes tritt erst bei hohen Konzentrationen auf (\* = p < 0,05, gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in pA). DHE wurde 60 s vor und während des 5-HT-Pulses appliziert. Der graue Balken zeigt den Bereich der Plasmakonzentrationen (C<sub>max</sub>) von DHE.



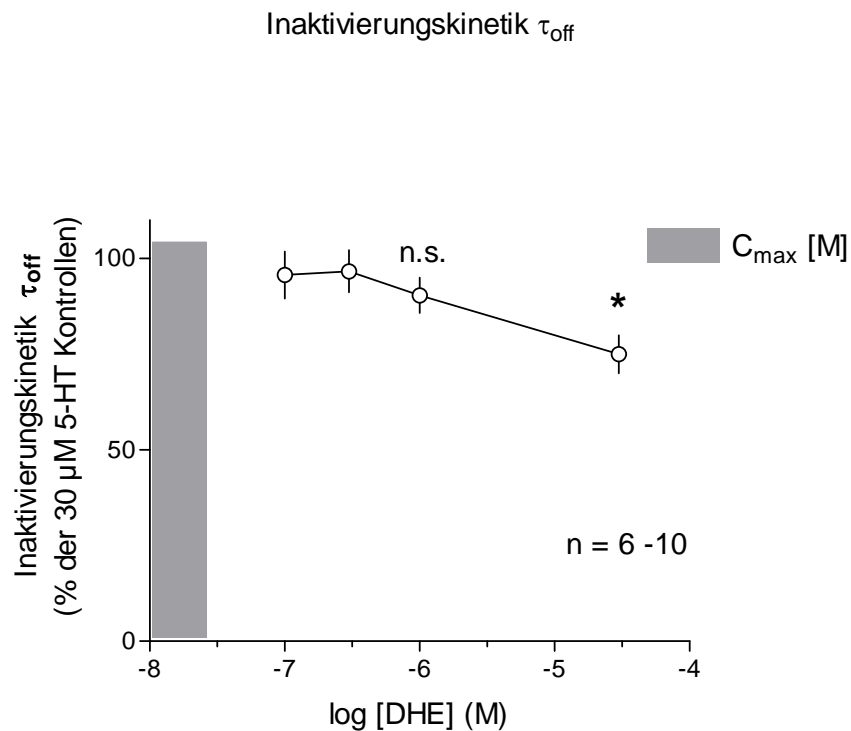
**Abbildung 10:** Originalstromspuren eines „Patches“ (-100 mV). Unterdrückung des 5-HT(30 µM)-induzierten Stromes durch 30 µM DHE bei Äquilibrium Applikationsart (++).

### Einfluss von DHE auf die Kinetiken

DHE ( $\leq 30 \mu\text{M}$ ) hat die Aktivierungskinetik des 5-HT-induzierten Stromes nicht beeinflusst (Abbildung 11), führte aber bei  $30 \mu\text{M}$  zu einer signifikanten Beschleunigung ( $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms) der Inaktivierungskinetik (Abbildung 12) [Kontrollwert:  $\tau_{\text{off}} = 105,1 \pm 21,6 \text{ ms}$ ; DHE  $30 \mu\text{M}$ :  $\tau_{\text{off}} = 84,8 \pm 6,4 \text{ ms}$ ;  $n = 6$  (Mittelwert  $\pm$  S.E.M.)]



**Abbildung 11:** Einfluss von DHE auf die Aktivierungskinetik des 5-HT ( $30 \mu\text{M}$ )-induzierten Stromes bei Äquilibrium-Applikationsart (++). Die Aktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{on}}$ ) sind als Prozent des jeweiligen Kontrollstromes berechnet. Der graue Balken zeigt die Plasmakonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) des Medikamentes. DHE führte zu keiner signifikanten Veränderung ( $p > 0,05$ ).



**Abbildung 12:** Einfluss von DHE auf die Inaktivierungskinetik des 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Stromes bei Äquilibrium Applikationsart (++). Die Inaktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{off}}$ ) sind als Prozent des jeweiligen Kontrollstromes berechnet. Der graue Balken zeigt die Plasmakonzentration ( $C_{\text{max}}$ ) des Medikamentes. DHE ab einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  führte zu einer signifikanten Beschleunigung der Inaktivierung des 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Stromes (\* =  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms).

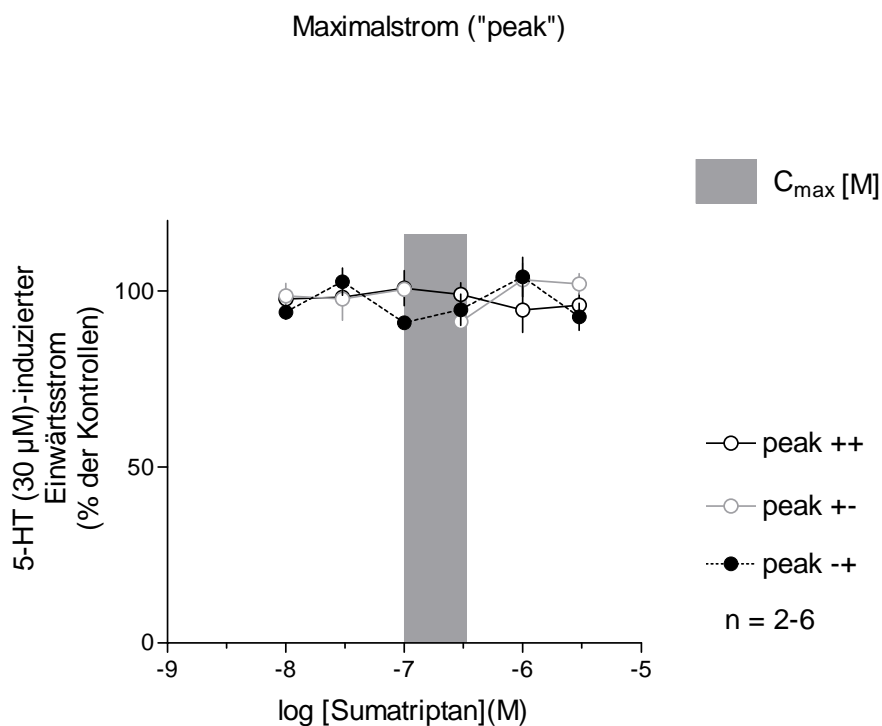
### Sumatriptan

Für die Versuche mit Sumatriptan (0,01 – 3  $\mu\text{M}$ ) am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor wurden alle drei verschiedenen Substanzapplikationsarten unter Standardbedingungen (Membranpotential -100mV) verwendet (s. Methoden). Es wurden die Effekte von Sumatriptan auf Zeitkonstanten (monoexponentieller Fit), Maximalströme und integrierte Signale analysiert.

In „patchen“, die zuvor bei 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-Gabe einen Einwärtsstrom zeigten, löste Sumatriptan in Abwesenheit des Agonisten keine Ströme aus.

### Einfluss von Sumatriptan auf die Stromamplitude

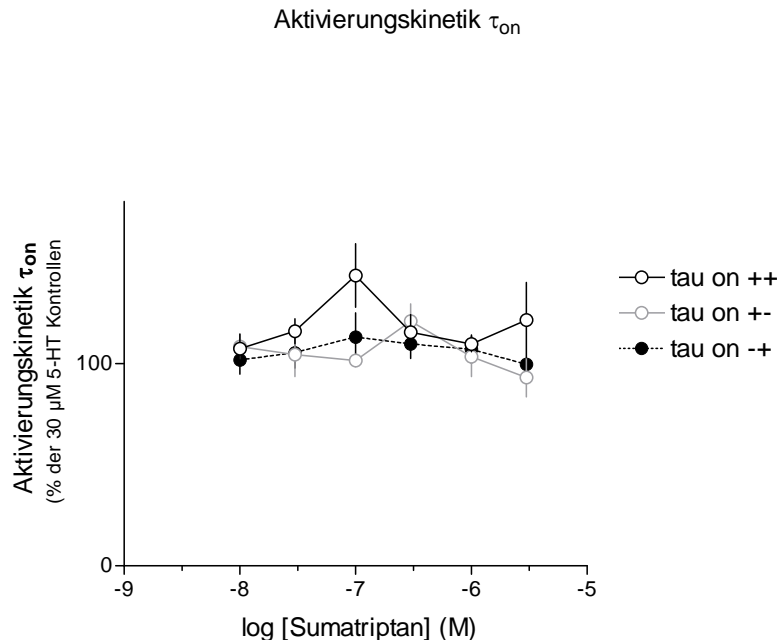
Wie aus Abbildung 13 ersichtlich ist, führt Sumatriptan bei allen drei Applikationsarten zu keiner Veränderung des 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Stroms. Der graue Balken bezeichnet den Bereich der Plasmakonzentrationen ( $C_{\max}$ ) des Medikaments. Sumatriptan wird in verschiedenen Darreichungsformen eingesetzt. Die Plasmakonzentration ( $C_{\max}$ ) bei i.v. Gabe von 3 mg beträgt 76,8 ng/ml (44-124 ng/ml; entspricht 0,1-0,4  $\mu$ M); bei s.c. Gabe von 6 mg: 72,4 ng/ml (54,9-108 ng/ml, entspricht 0,1-0,5  $\mu$ M) und bei oraler Verabreichung von 100 mg: 53,8 ng/ml (26-137 ng/ml, entspricht 0,1-0,5  $\mu$ M, Fowler et al., 1991). Deshalb wurde mit Sumatriptan-Konzentrationen experimentiert, die in dem *in vivo*-gemessenen Plasmakonzentrationsbereich des Medikamentes liegen



**Abbildung 13: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Sumatriptan auf 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-vermittelte Einwärtsströme (Maximalstrom = „peak“).** Auf der Y-Achse ist das Verhältnis der in Gegenwart von Sumatriptan auslösbaren Maximalströme zu den Kontrollströmen aufgetragen. Das Medikament wurde in Äquilibrium (++) , Geschlossenkanal (+-) und Offenkanaal-Applikationsmodus (-+) auf die Zellen appliziert. Der graue Balken bezeichnet den Bereich der Plasmakonzentrationen ( $C_{\max}$ ) des Medikaments. Sumatriptan führte zu keiner signifikanten Veränderung des Maximalstroms ( $p > 0,05$ ).

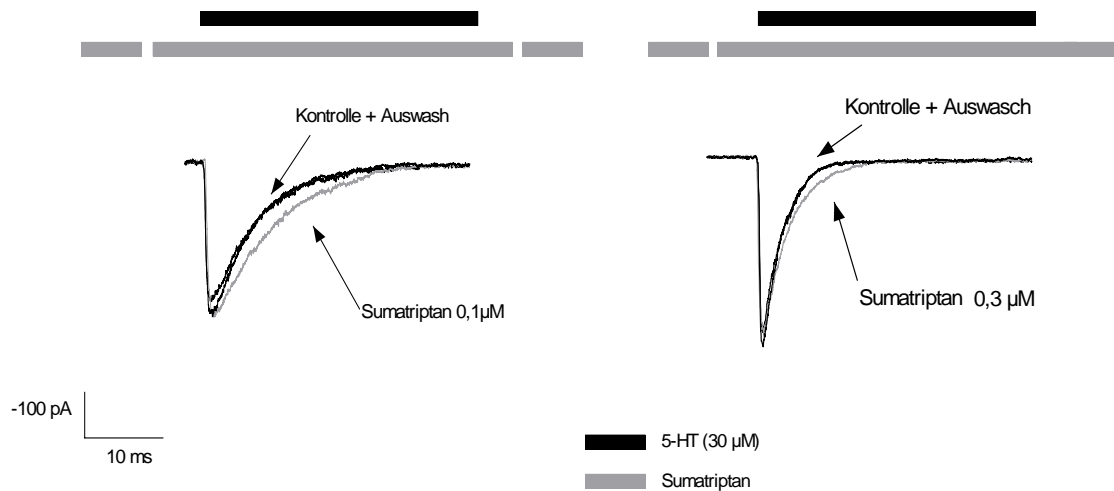
### Einfluss von Sumatriptan auf die Kinetiken

Sumatriptan hat die Aktivierungskinetik ( $\tau_{on}$ ) der 5-HT ( $30 \mu\text{M}$ )-induzierten Ströme nicht beeinflusst (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Sumatriptan auf die Aktivierungskinetik ( $\tau_{on}$ ) des 5-HT ( $30 \mu\text{M}$ )-induzierten Einwärtsstromes ( $-100\text{mV}$ ) bei Äquilibrium (++) , Geschlossenkanal (+-) und Offenkanal-Applikationsmodus (-+). Die Aktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{on}$ ) sind als Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben. Sumatriptan führt zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivierungskinetiken unabhängig von der Substanz-Applikationsart.

Bei Geschlossen- und Offenkanal-Applikation führte Sumatriptan ebenfalls zu keiner Veränderung der Inaktivierungskinetik (Abbildung 16-A). Es führte aber bei Sumatriptan Konzentration von  $0,3 \mu\text{M}$  zu einer signifikanten Verlangsamung der Inaktivierungszeitkonstante  $\tau_{off}$  wenn  $60 \text{ s}$  vor und während des Agonisten-Pulses appliziert (z.B. Kontrollwert:  $\tau_{off} = 69,4 \pm 10,6 \text{ ms}$ ; Sumatriptan  $0,3 \mu\text{M}$ :  $\tau_{off} = 92 \pm 14 \text{ ms}$ ,  $n = 4$ , Mittelwert  $\pm$  S.E.M.,  $p < 0,05$ ). Dieser Effekt wird durch die Originalstromspuren in Abbildung 15 verdeutlicht: Es wird die Wirkung von  $0,1$  und  $0,3 \mu\text{M}$  Sumatriptan auf 5-HT ( $30 \mu\text{M}$ )-induzierte Ströme gezeigt bei kontinuierlicher Applikationsart (Äquilibrium „++“) der Substanz. Man beachte die reversible Verlangsamung des Kontrollstroms durch Sumatriptan (graue Stromspuren).



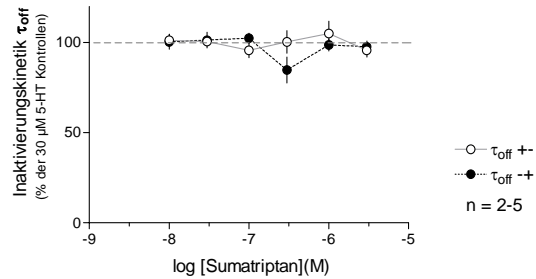
**Abbildung 15: Originalspuren 5-HT (30 µM)-induzierter Ströme (-100mV). Der Effekt zweier verschiedener Sumatriptan-Konzentrationen [0,1 und 0,3 µM; Äquilibrium Applikationsart (++)] wird dargestellt. Die Inaktivierung der 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme ist unter Gabe von Sumatriptan deutlich verlangsamt. Die Kontroll- und Auswasch-Stromspuren liegen übereinander, was die Reversibilität dieses Effektes belegt.**

Aus der entstandenen Konzentrations-Wirkungskurve (Abbildung 16-B) ist ersichtlich, dass die Inaktivierungsverlangsamung konzentrationsabhängig ist. Interessant ist, dass bei höheren Sumatriptan-Konzentrationen (1 bis 10µM) ein Bruch in der Kurve auftritt und dieser Effekt nicht mehr stattfindet. Um Messfehler auszuschließen, wurden Nachmessungen durchgeführt, die dieses bestätigten (n = 3-5 „patche“). Bedingt durch die Form der Konzentrations-Wirkungskurve konnte an die Datenpunkte keine Funktion angepasst werden.

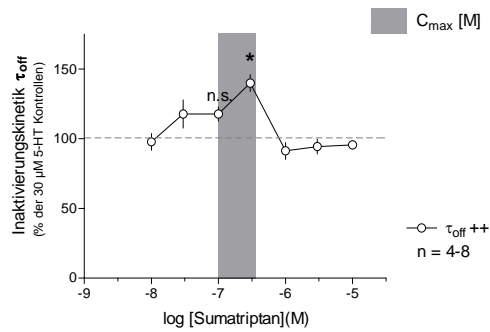
Um die Wirkung von Sumatriptan auf 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren weiter zu charakterisieren, wurde sein Effekt auf den 5-HT-induzierten Strom als Fläche über der Stromkurve (= Integral) ausgewertet (Abbildung 16-C), so dass die gesamte Ladungsaustausch durch die Membran quantitativ erfasst werden konnte. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Vergrößerung dieser Fläche bei Konzentrationen von 0,01 bis 0,3µM Sumatriptan. Ähnlich wie bei der  $\tau_{off}$  - Konzentrations-Wirkungskurve ließ sich dieser Effekt bei höheren Konzentrationen (1 bis 10µM) nicht mehr nachweisen.



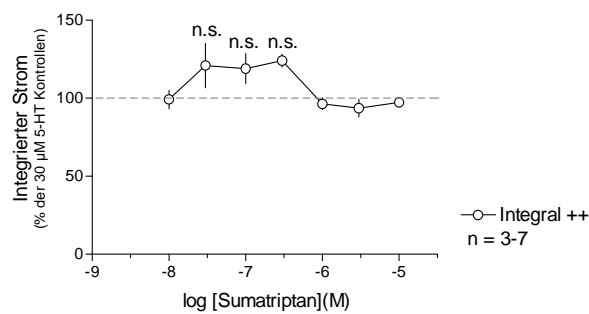
A:  $\tau_{\text{off}}$  (Geschlossen- und Offenkanal-Applikation, +-, -+)



B:  $\tau_{\text{off}}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)

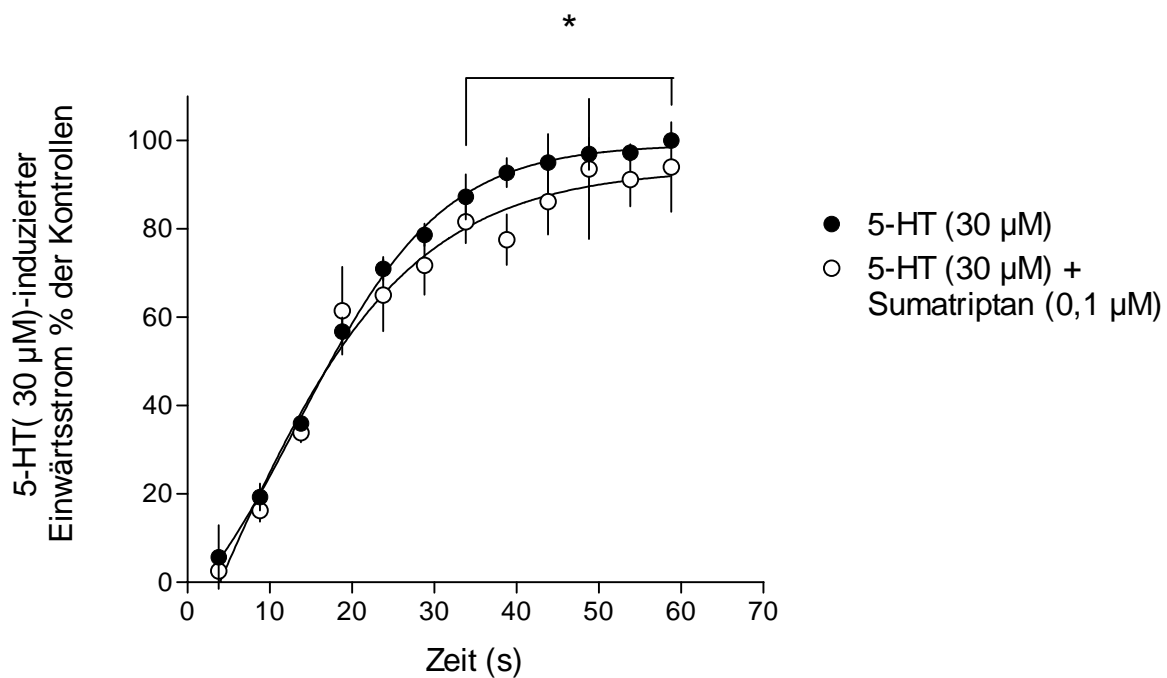


C: Integral (Äquilibrium-Applikation, ++)



**Abbildung 16: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Sumatriptan -A, B- auf die Inaktivierungskinetik ( $\tau_{\text{off}}$ ) und -C- auf die Integrale der 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Einwärtsströme (-100mV). Die Geschlossen-(+-) und Offenkanal-Applikation (-+) der Substanz (A) führt zu keiner signifikanten Veränderung der Inaktivierungskinetik ( $p > 0,05$ ). Bei Äquilibrium-Applikation (++) zeigt sich eine signifikante Verlangsamung der Inaktivierungszeitkonstante bei Sumatriptan-Konzentrationen von  $\leq 1 \mu\text{M}$  (B, \* =  $p < 0,05$ ).**

Auf Grund der Beobachtung, dass Sumatriptan offensichtlich die Inaktivierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorkanals verlangsamt, sollte geprüft werden, ob dieser Effekt in einem Zusammenhang mit der Desensibilisierung bzw. der Erholung daraus steht. Hierfür wurden 5-HT (30 µM)-Doppelpulsexperimente in Abwesenheit und in Anwesenheit von 0,1 µM Sumatriptan durchgeführt. Das Zeitintervall zwischen den beiden 5-HT Pulsen wurde von 3,8 s bis 58,8 s in 5 s Schritten verlängert, und somit die Rückkehr der Rezeptoren aus dem desensibilisierten Zustand gemessen. Abbildung 17 zeigt eine signifikante Verzögerung dieses Prozesses durch 0,1 µM Sumatriptan.



**Abbildung 17: Doppelpuls-Experimente (-100 mV) in An- und Abwesenheit von 0,1 µM Sumatriptan. Sumatriptan führt zu einer signifikanten verzögerten Erholung der Rezeptor-Desensibilisierung (\* =  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in pA ).**

## **Starke Analgetika**

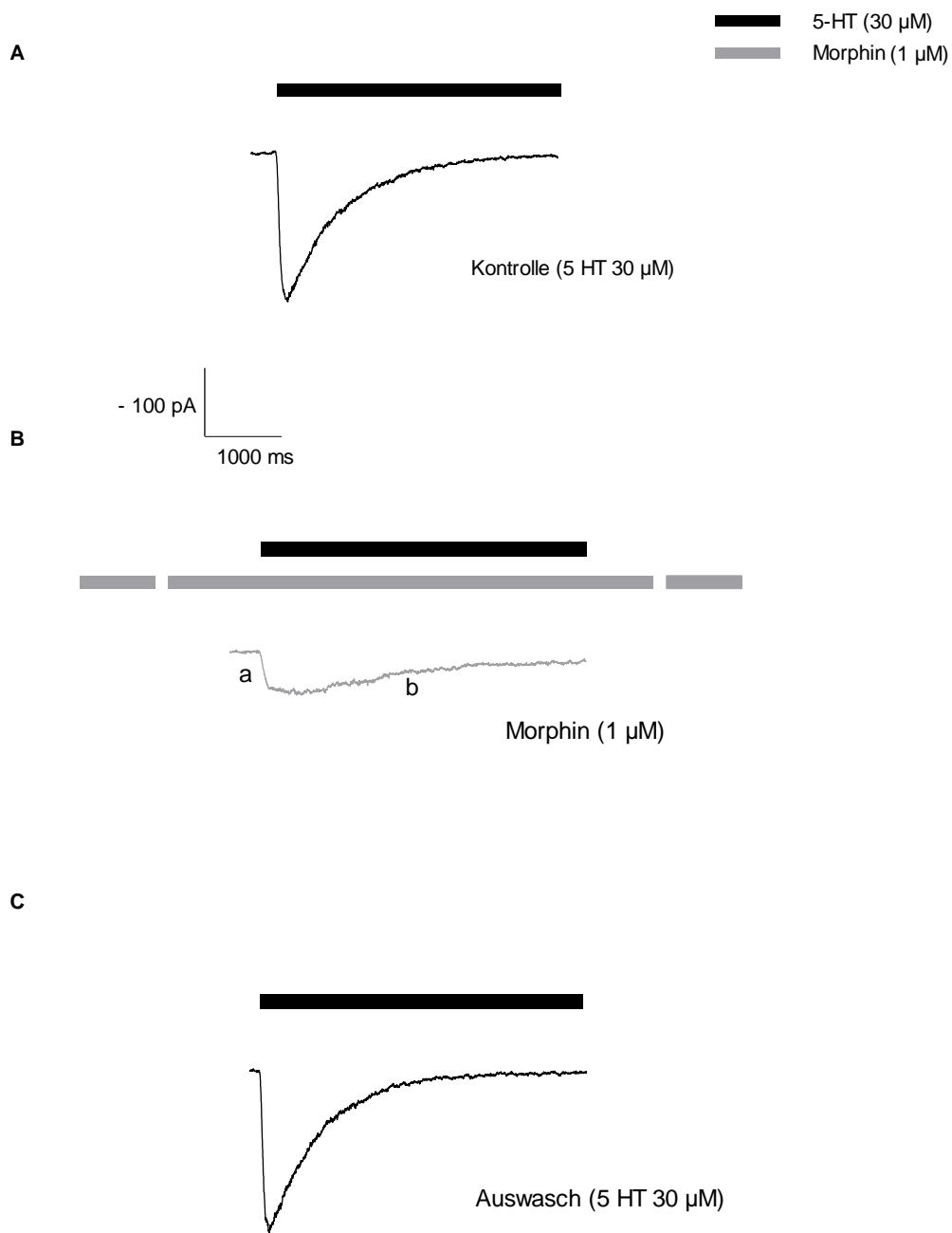
Da starke Opioidanalgetika ähnlich wie manche Migränemittel Emesis verursachen, war es von Interesse, deren Wirkungen am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zu charakterisieren. Es wurden insgesamt sechs gebräuchliche Opioid-Analgetika (Morphin, Hydromorphon, Fentanyl, Alfentanil, Sufentanil und Remifentanil) untersucht.

### **Morphin**

In „patches“, die zuvor bei 5-HT (30 µM)-Gabe einen Einwärtsstrom zeigten, löste Morphin (0,03-3,0 µM) in Abwesenheit des Agonisten keine Ströme aus.

#### *Einfluss von Morphin auf die Stromamplituden*

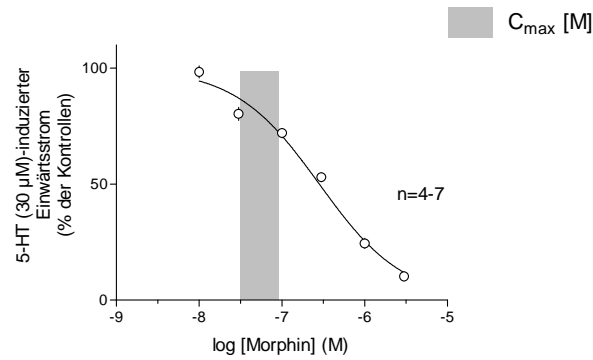
Morphin inhibierte den 5-HT (30 µM)-induzierten Maximalstrom konzentrationsabhängig bei Äquilibrium (++) und Geschlossenkanal (+-) Applikationsmodus. Die Originalstromspuren in Abbildung 18 zeigen den Hemmeffekt von Morphin am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor: Neben der schon erwähnten Hemmung des Maximalstroms verlangsamte 1 µM Morphin reversibel die Aktivierungs- (a)- und Inaktivierungsphase (b) des 5-HT (30 µM)- induzierten Stroms. Die Effekte waren nach 60 s Auswasch des „patches“ mit Puffer (ECS) vollständig aufhebbar.



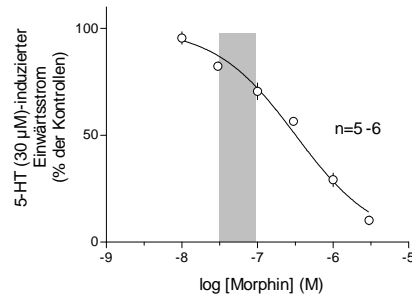
**Abbildung 18: Originalspuren 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierter Ströme (-100mV) in einen „patch“. Gezeigt ist der Effekt von 1  $\mu\text{M}$  Morphin bei Äquilibrium-Applikationsart (++). Die Aktivierung (a) und die Inaktivierung (b) der 5-HT-induzierte Ströme sind unter Gabe von Morphin deutlich verlangsamt und der Maximalstrom ist reversibel um 75 % durch 1  $\mu\text{M}$  Morphin gehemmt (B). Die Kontroll- und Auswasch-Stromspuren belegen die Reversibilität dieses Effektes (A, C).**

Abbildung 6 zeigt den Effekt von Morphin auf den 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Einwärtsstrom: Das Medikament hemmt den Maximalstrom konzentrationsabhängig sowohl bei „++“ (A) als auch bei „+-“ (B) Applikationsart (s. Methoden). Die Kurven konnten nach der Hill-Gleichung gefittet werden: **A**:  $\text{IC}_{50} = 0,3 \mu\text{M}$ ; Hill-Koeffizient = -0,8; **B**:  $\text{IC}_{50} = 0,3 \mu\text{M}$ ; Hill-Koeffizient = -0,8. Der Hill Koeffizient von  $< 1$  spiegelt eine flache Steilheit der Kurven wider und legt die Beteiligung mehrerer Bindungsmechanismen der untersuchten Substanz nahe. Morphin führte zu keiner signifikanten Veränderung des Maximalstroms, wenn es ausschließlich während des Agonistenpulses (++) appliziert wurde (Abbildung 19–C).

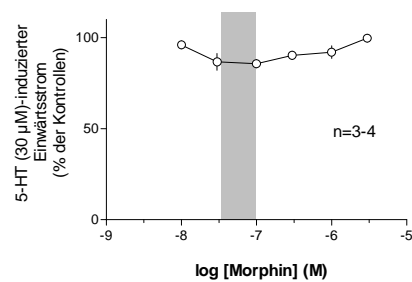
A: "peak" (Äquilibrium-Applikation, ++)



B: "peak" (Geschlossenkanal-Applikation, +-)



C: "peak" (Offenkanal-Applikation, --)



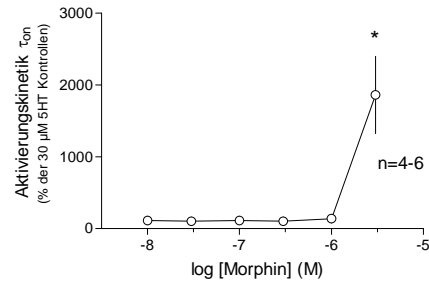
**Abbildung 19: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Morphin auf 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-vermittelte Einwärtsströme (Maximalstrom = „peak“).** Auf der Y-Achse ist das Verhältnis der in Gegenwart von Morphin auslösbaren Maximalströme zu den Kontrollströmen aufgetragen. Das Medikament wurde in (A) Äquilibrium (++) , (B) Geschlossenkanal (+-) und (C) Offenkanal-Applikationsmodus (-+) auf die Zellen appliziert. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Hemmung des 5-HT (30 µM)- induzierten Einwärtsstromes durch Morphin (A, B). In grau wird der Bereich der Plasmakonzentrationen (C<sub>max</sub>) des Medikamentes dargestellt.

### *Einfluss von Morphin auf die Kinetiken*

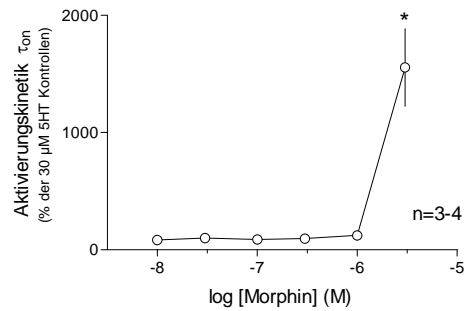
Morphin wirkte nicht nur auf die Stromamplitude, sondern beeinflusste auch die Stromkinetik. In Abbildung 20 sind die Konzentrations-Wirkungskurven der Wirkung von Morphin auf die Aktivierungskinetik des 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Stromes gezeigt (A: „+++“; B: „+-“ und C: „-+“ Applikationsart). Eine interessante Beobachtung war die Steilheit der ersten beiden Konzentrationswirkungskurven bei Morphinkonzentrationen von  $\geq 1 \mu\text{M}$  (z.B. bei „+++“-Applikation: 0,3  $\mu\text{M}$  Morphin verlangsamte die Aktivierungszeitkonstante  $\tau_{\text{on}}$  um 9 %; 1  $\mu\text{M}$ - um 34 % und 3  $\mu\text{M}$ - um 1600 % in Vergleich zu dem 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Kontrollstrom. Die „Offenkanal-Applikation“ von Morphin (Abbildung 20-C) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivierungskinetik ( $p > 0,05$ ).

Im Unterschied dazu, trat der Effekt von Morphin auf die Inaktivierungskinetik der 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Ströme bei noch niedrigeren Konzentrationen auf (z.B. 0,3  $\mu\text{M}$  Morphin verlangsamten bei „+++“ Applikationsart die Inaktivierungszeitkonstante  $\tau_{\text{off}}$  um 34 %, 1  $\mu\text{M}$  - um 98 %, 3  $\mu\text{M}$  – um 226 % in Vergleich zu dem Kontrollstrom, \* =  $p < 0,05$ , gepaarter t-test basierend auf den Absolutwerten in ms). Abbildung 21 zeigt die Konzentrations-Wirkungsbeziehungen dieses Effektes A: bei Äquilibrium (++), B: bei Geschlossenkanal – und C bei Offenkanal-Applikationsmodus (+-) der Testsubstanz. Bei Offenkanal-Applikationsart (-+) zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Inaktivierungskinetik durch Morphin (Abbildung 21-C)

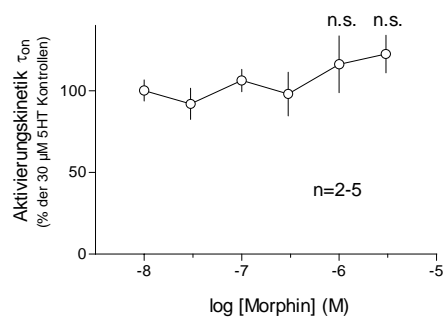
A:  $\tau_{on}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)



B:  $\tau_{on}$  (Geschlossenkanal-Applikation, +-)



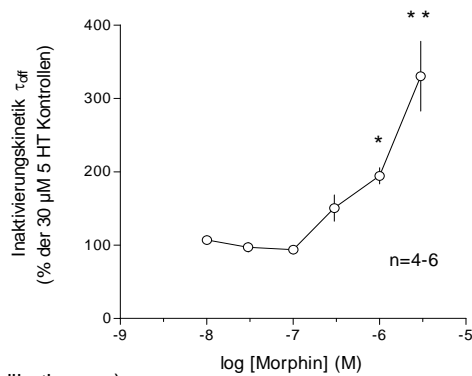
C:  $\tau_{on}$  (Offenkanal-Applikation, -+)



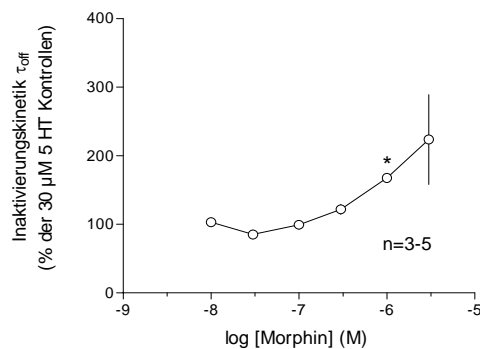
**Abbildung 20: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Morphin auf die Aktivierungskinetik ( $\tau_{on}$ ) des 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Einwärtsstromes (-100mV) bei A: Äquilibrium- (++) , B: Geschlossenkanal- (-+) und C: Offenkanal-Applikationsmodus (-+). Die Aktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{on}$ ) sind als Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben. Man beachte die rapide Verlangsamung der Aktivierungskinetik bei Morphinkonzentrationen  $> 1\mu$ M (A, B, \* =  $p < 0,05$ ). Morphin führte bei Offenkanal-Applikation (C) zu keiner signifikanten Veränderung der Stromkinetiken ( $p > 0,05$ )**



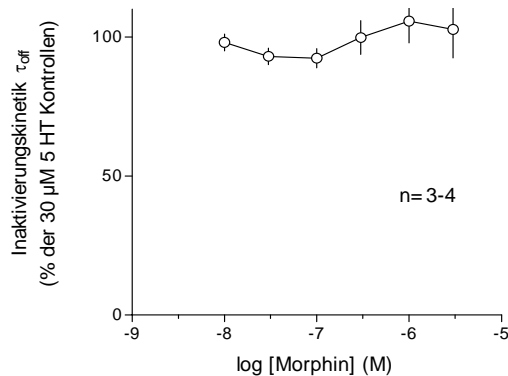
A:  $\tau_{\text{off}}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)



B:  $\tau_{\text{off}}$  (Geschlossenkanal-Applikation, +-)



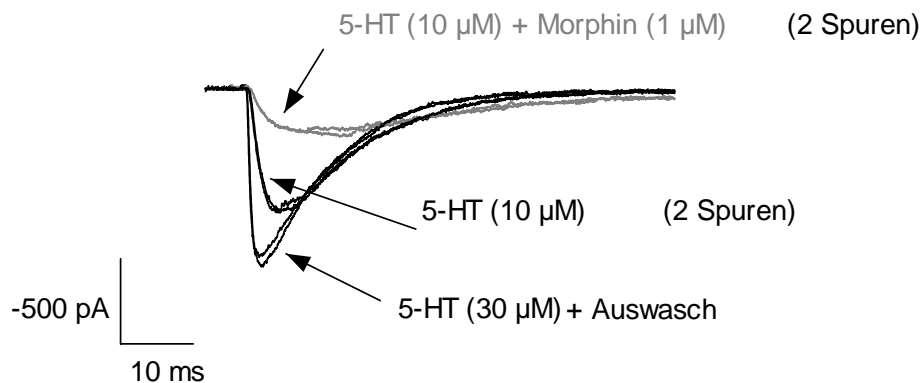
C:  $\tau_{\text{off}}$  (Offenkanal-Applikation, -+)



**Abbildung 21: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Morphin auf die Inaktivierungskinetik ( $\tau_{\text{off}}$ ) des 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Einwärtsstromes (-100mV) bei A: Äquilibrium- (++) , B: Geschlossenkanal- (-+) und C: Offenkanal-Applikationsmodus (-+). Die Inaktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{off}}$ ) sind als Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben. Man beachte die Verlangsamung der Inaktivierungskinetik bei Morphinkonzentrationen  $\geq 1 \mu\text{M}$  (\* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ). Morphin führte bei Offenkanal-Applikation (C) zu keiner signifikanten Veränderung der Stromkinetiken ( $p > 0,05$ )**

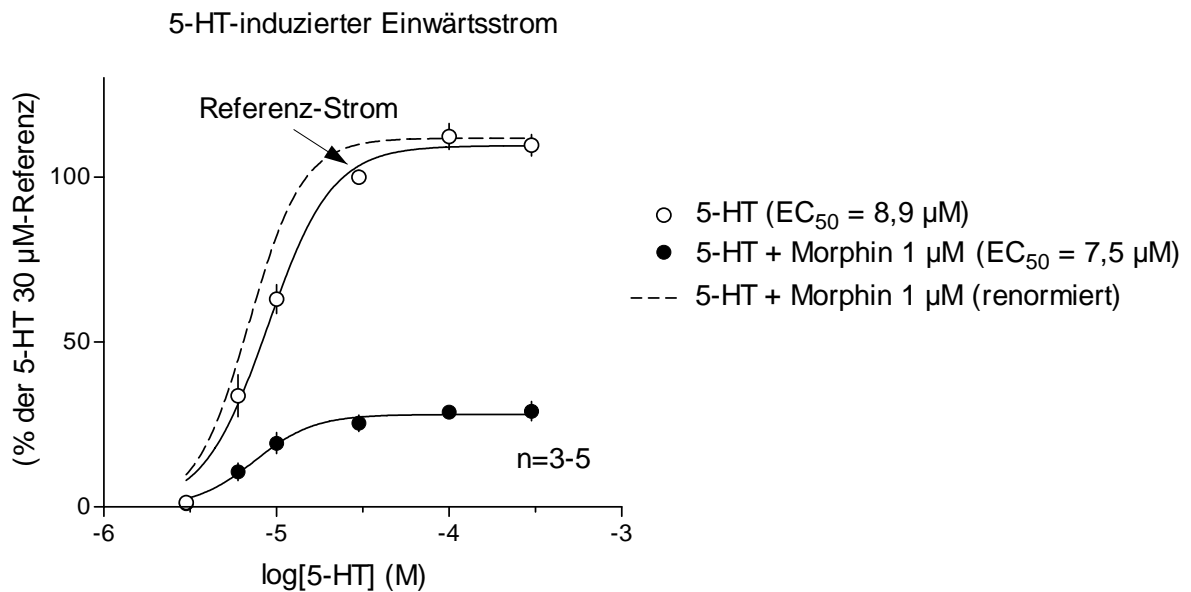
### Kompetitionsexperimente

Morphin wurde auf mögliche Wechselwirkungen mit den Agonistenbindungsstellen des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors getestet (*kompetitiver Antagonismus*). Hierfür wurde die Konzentrations-Wirkungskurve von Serotonin in Abwesenheit und in Anwesenheit von 1 μM Morphin erstellt. Das Medikament wurde im Äquilibrium-Applikationsmodus (++) 60 s vor und während des Serotoninpulses auf den „patch“ appliziert. Abbildung 22 zeigt exemplarisch Originalspuren 5-HT (30 μM)-induzierter Ströme durch einen „patch“.



**Abbildung 22: Originalspuren 5-HT-induzierter Ströme durch 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren (-100mV): 5-HT (10 μM) wurde in Abwesenheit und in Anwesenheit von 1 μM Morphin (60 s vor und während dem Agonistenpuls) auf den „patch“ appliziert. Zu Beginn und am Ende des Experimentes wurden 30 μM 5-HT-Kontrollpulse in Abwesenheit von Morphin gemessen, um die Reversibilität des Effektes zu prüfen.**

1 μM Morphin veränderte die 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve in einer für einen *nicht-kompetitiven Antagonisten* typischen Weise. (Abbildung 23; Erniedrigung des Maximums und keine Parallel-Verschiebung nach rechts).

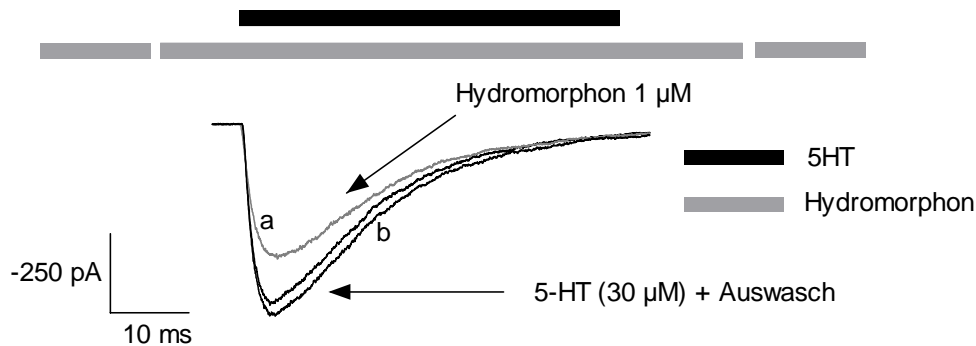


**Abbildung 23:** Konzentrations-Wirkungskurven des durch 5-HT verursachten Einwärtsstroms in Abwesenheit (offene Symbole) und in Anwesenheit (gefüllte Symbole) von Morphin ( $1 \mu\text{M}$ ; 60 s vor und während des Serotoninpulses = ++ Modus). Morphin führte zu einer Erniedrigung des Maximums und zu keiner signifikanten Parallel-Verschiebung der 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve. Die gestrichelte, renormierte Konzentrations-Wirkungskurve verdeutlicht, dass  $1 \mu\text{M}$  Morphin die  $EC_{50}$  des Agonisten nicht verändert hat.

## Hydromorphon

Weiterhin wurde der Effekt von Hydromorphon am  $5\text{-HT}_{3A}$ -Rezeptor untersucht. In „patchen“, die zuvor bei 5-HT ( $30 \mu\text{M}$ )-Gabe einen Einwärtsstrom zeigten, löste Hydromorphon ( $0,1\text{-}100 \mu\text{M}$ ) in Abwesenheit des Agonisten keine Ströme aus.

Aus den Originalstromspuren in Abbildung 24 ist ersichtlich, dass  $1 \mu\text{M}$  Hydromorphon (graue Stromspur) die Maximalstromamplitude des 5-HT ( $30 \mu\text{M}$ )-induzierten Stromes inhibierte. Der Effekt war reversibel nach 60 s Auswasch mit Puffer (ECS).  $1 \mu\text{M}$  Hydromorphon unterdrückte den Maximalstrom („peak“) um 28 %.



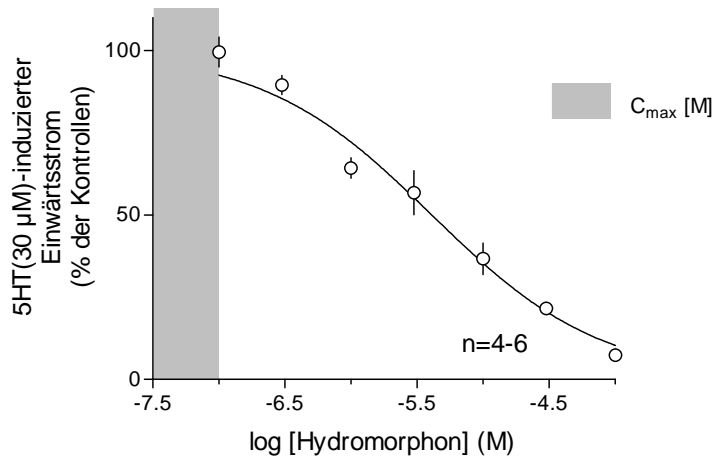
**Abbildung 24:** Originalspuren 5-HT (30 µM)-induzierter Ströme (-100 mV). Der Effekt von 1 µM Hydromorphon bei Äquilibrium Applikationsart (++) wird dargestellt. Die Aktivierung (a) und die Inaktivierung (b) der 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme sind unter Gabe von 1 µM Hydromorphon wenig beeinflusst. Der Maximalstrom („peak“) ist reversibel um 28 % durch 1 µM Hydromorphon gehemmt. Die Kontroll - und Auswasch-Stromspuren liegen beieinander, was die Reversibilität dieses Effektes belegt.

#### *Einfluss von Hydromorphon auf die Stromamplitude*

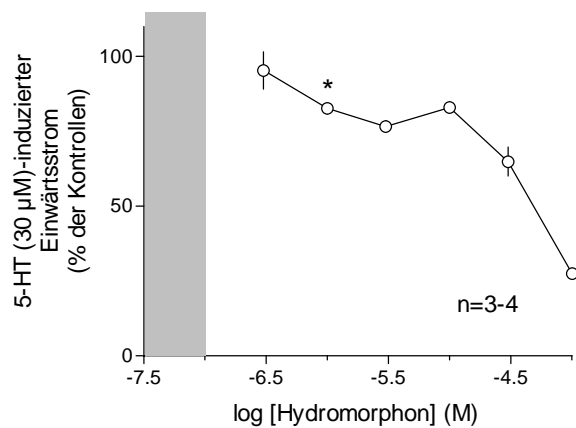
Es wurden zunächst die Konzentrations-Wirkungskurven für den Hemmeffekt von Hydromorphon (0,1-100 µM) am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor ermittelt (Abbildung 25). Das Medikament unterdrückte den 5-HT (30 µM)-induzierten Einwärtstrom konzentrationsabhängig und reversibel sowohl bei Äquilibrium- und wie bei Offenkanal-Applikationsart. An der „++“-Konzentrationswirkungskurve (Abbildung 25-A) konnte eine Hill-Funktion angepasst werden ( $IC_{50} = 4,1 \mu\text{M}$ ; Hill-Koeffizient = -0,7).

Der graue Balken in Abbildung 25 zeigt den Bereich der Plasmakonzentrationen von Hydromorphon ( $C_{\text{max}} = 19,1 \pm 8,7 \text{ ng/ml}$ , entspricht 0,03-0,1 µM; Lindena und Arnau, 1998). Die Hydromorphon-Konzentrationen, die den beobachteten Hemmeffekt am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor hervorriefen, lagen nahe über dem Plasmakonzentrationsbereich.

A: "peak" (Äquilibrium-Applikation, ++)



B: "peak" (Offenkanal-Applikation, -+)



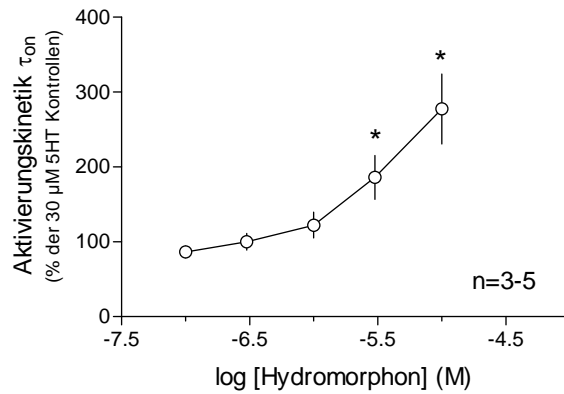
**Abbildung 25: Konzentrations-Wirkungskurve der Wirkung von Hydromorphon auf 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-vermittelte Einwärtsströme.** Das Medikament wurde (A) 60 s vor und während dem Agonistenpuls (++) und (B) ausschließlich während dem Agonistenpuls appliziert (-+). Auf den Y-Achsen ist das Verhältnis der in Gegenwart von Hydromorphon auslösbaren Maximalströme zu den Kontrollströmen aufgetragen. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Hemmung des 5-HT (30 µM)-induzierten Einwärtsstromes durch Hydromorphon ( A: IC<sub>50</sub> = 4,1 µM; Hill-Koeffizient = -0,7; B: \* = p < 0,05, gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in pA)

### *Einfluss von Hydromorphon auf die Kinetiken*

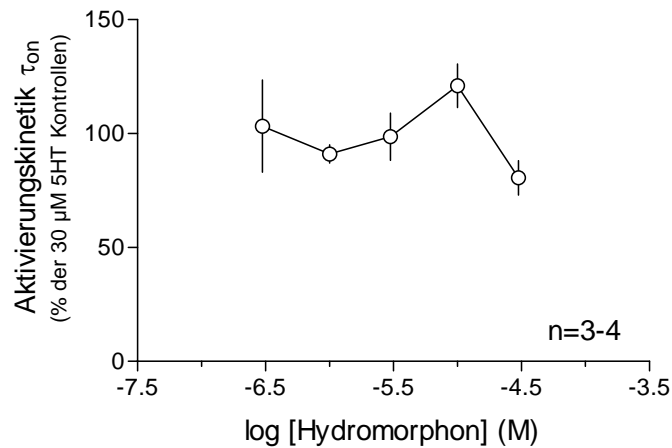
Weiterhin wurde die Wirkung von Hydromorphon auf die Aktivierung und die Deaktivierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors unter denselben Versuchsbedingungen untersucht. Die Konzentrations-Wirkungskurven in Abbildung 26 zeigen die Verlangsamung der Aktivierungszeitkonstante  $\tau_{on}$  durch Hydromorphon (z.B. Kontrollwert:  $\tau_{on} = 6,7 \pm 0,8$  ms; Hydromorphon 10  $\mu$ M:  $\tau_{on} = 23,4 \pm 5,0$  ms; Mittelwert  $\pm$  S.E.M.). Bei Hydromorphonkonzentrationen über 10  $\mu$ M konnte die Aktivierungszeitkonstante weder mit mono- noch mit biexponentiellem Fit (s. Methoden) bestimmt werden.

Interessant ist, dass im Unterschied zu Morphin, Hydromorphon die Inaktivierungskinetik der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme erst bei Konzentrationen von  $\geq 3$   $\mu$ M verlangsamte (Abbildung 27-A) [Kontrollwert:  $\tau_{off} = 60,8 \pm 11,5$  ms; Hydromorphon 10 $\mu$ M:  $\tau_{off} = 126,0 \pm 15,9$  ms; n = 6, Mittelwert  $\pm$  S.E.M.]. Bei Hydromorphonkonzentrationen über 30  $\mu$ M konnte die Inaktivierungszeitkonstante  $\tau_{off}$  weder mit mono- noch mit biexponentiellem fit (s. Methoden) bestimmt werden. Im Unterschied zu dem Äquilibrium-Applikationsmodus (++) , führte die Gabe von Hydromorphon ausschließlich während des Agonistenpulses (-+) zu keiner signifikanten Veränderung der Kinetik der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme (Abbildung 27-B).

A:  $\tau_{on}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)

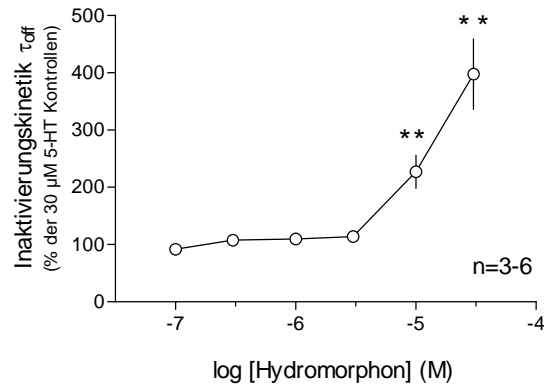


B:  $\tau_{on}$  (Offenkanal-Applikation, -+)

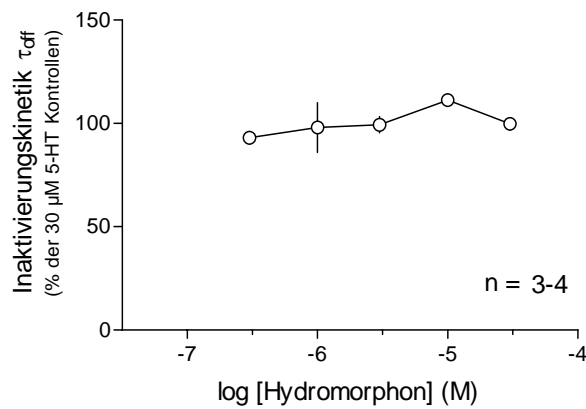


**Abbildung 26: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Hydromorphon auf die Aktivierungskinetik ( $\tau_{on}$ ) des 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Einwärtsstroms. Das Medikament wurde (A) 60 s vor und während dem Agonistenpuls (++) und (B) ausschließlich während dem Agonistenpuls appliziert (-+). Die Aktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{on}$ ) sind als Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben. Hydromorphon verlangsamt konzentrationsabhängig die Aktivierungskinetik der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme bei Äquilibrium-Applikation (\* =  $p < 0,05$ , gepaarter t-test basierend auf den Absolutwerten in ms).**

A:  $\tau_{\text{off}}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)



B:  $\tau_{\text{off}}$  (Offenkanal-Applikation, -+)

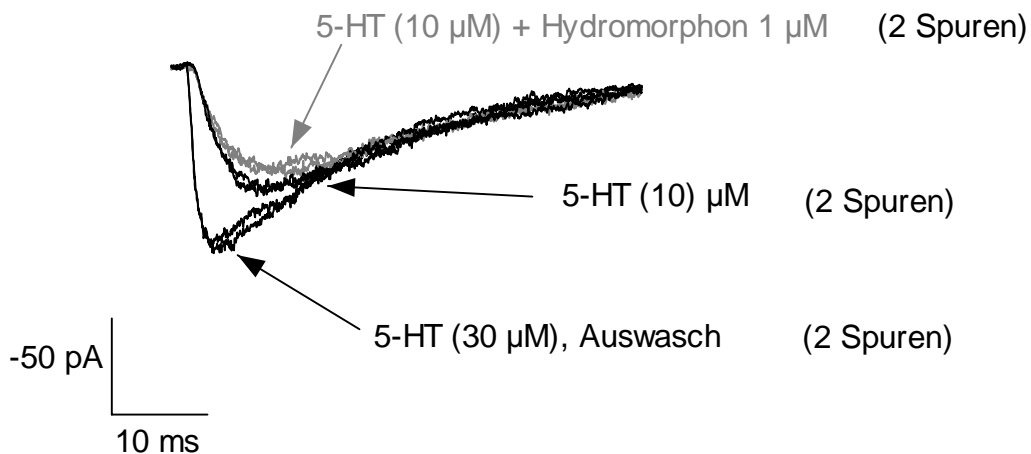


**Abbildung 27: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Hydromorphon auf die Inaktivierungskinetik ( $\tau_{\text{off}}$ ) des 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Einwärtsstromes bei A: Äquilibrium- (++) und B: Offenkanal- Applikationsmodus (-+). Die Inaktivierungszeitkonstante ( $\tau_{\text{off}}$ ) ist als Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben. Hydromorphon verlangsamt konzentrationsabhängig die Inaktivierungskinetik der 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Ströme bei Äquilibrium-Applikationsart (\*\* =  $p < 0,01$ , gepaarter t-test basierend auf den Absolutwerten in ms).**



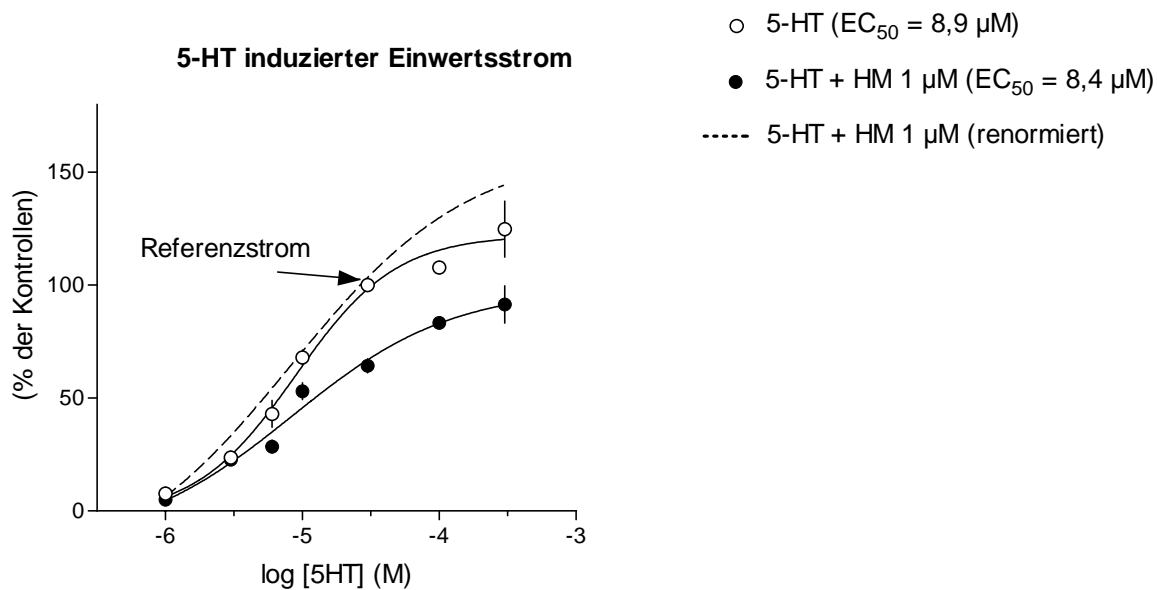
### Kompetitionsexperimente

Im Hinblick auf den möglichen Mechanismus der Hemmung des 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Ioneneinstroms durch Hydromorphon wurde auch hier sein Einfluss auf die 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve untersucht. Die Kompetitionsexperimente wurden unter denselben Versuchsbedingungen wie jene mit Morphin durchgeführt. Hierfür wurde die Konzentrations-Wirkungskurve von Serotonin in Abwesenheit und in Anwesenheit von 1  $\mu\text{M}$  Hydromorphon erstellt. Das Medikament wurde im Äquilibrium-Applikationsmodus (++) 60 s vor und während dem Serotoninpuls auf den „patch“ appliziert. Abbildung 28 zeigt exemplarisch Originalspuren 5-HT-induzierter Ströme bei 5-HT Konzentrationen von 10  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 28: Originalspuren 5-HT-induzierter Ströme durch 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (-100mV): 5-HT (10  $\mu\text{M}$ ) wurde in Abwesenheit und in Anwesenheit (60 s vor und während dem Agonistenpuls) von 1  $\mu\text{M}$  Hydromorphon auf den „patch“ appliziert. Zu Beginn und am Ende des Experimentes wurden 30  $\mu\text{M}$  5-HT-Kontrollpulse gemessen, um die Reversibilität des Effektes zu prüfen.**

Die Konzentrations-Wirkungskurve in Abbildung 29 zeigt, dass 1  $\mu\text{M}$  Hydromorphon zu Erniedrigung des Maximums und zu keiner Parallelverschiebung der 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve führt. Die 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve wurde durch Hydromorphon in einer für einen *nicht-kompetitiven Antagonisten* typischen Weise verändert.



**Abbildung 29:** Konzentrations-Wirkungskurven des durch 5-HT verursachten Einwärtsstroms in Abwesenheit (offene Symbole) und in Anwesenheit (gefüllte Symbole) von 1  $\mu\text{M}$  Hydromorphon 60 s vor und während dem Serotoninpuls. Hydromorphon führte zu einer Erniedrigung des Maximums und keiner Parallelverschiebung der 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurve in einer für den nicht-kompetitiven Antagonismus typischen Weise. Die gestrichelte, renormierte Konzentrations-Wirkungskurve verdeutlicht, dass 1  $\mu\text{M}$  Hydromorphon die  $EC_{50}$  des Agonisten nicht verändert hat.

## Synthetische Opioide

Ausgehend von Daten, die an ganzen Zellen erhoben wurden, (Wittmann et al., 2006), wurden die Substanzen in Äquilibrium-Applikationsart (++) getestet. Da an ganzen Zellen festgestellt wurde, dass die Analgetika in niedrigeren Konzentrationen keinen Effekt auf den 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Strom ausübten, wurden in den folgenden Experimenten nur zwei bis vier zusätzliche Medikamentenkonzentrationen im oberen mikromolaren Bereich untersucht.

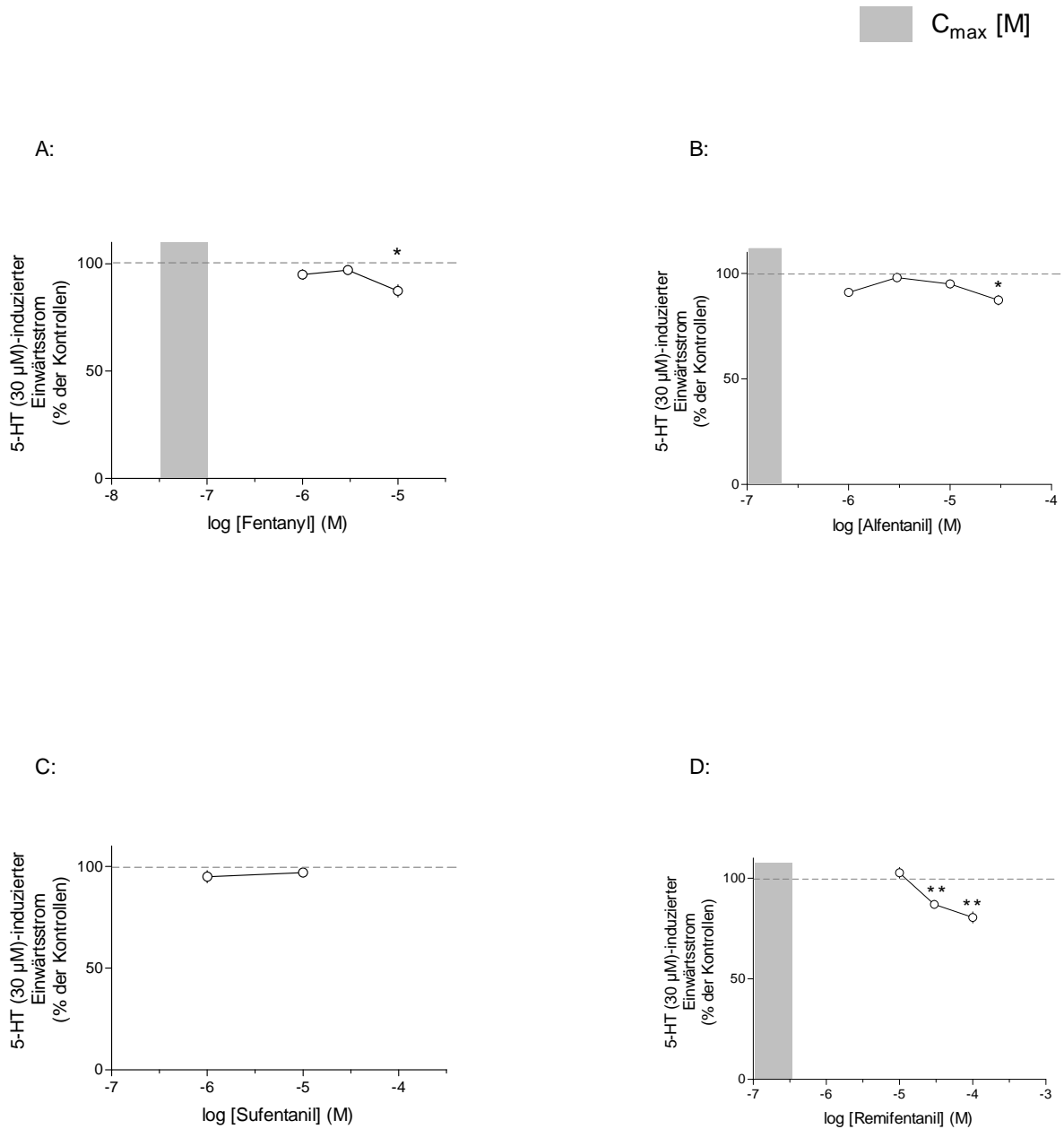
Wie bei all den bisher untersuchten Substanzen, wurden auch die synthetischen Opioide vor jedem Versuch in Abwesenheit des Agonisten auf „patche“ appliziert, die zuvor bei 5-HT (30  $\mu$ M) Gabe einen Einwärtsstrom zeigten. Auch hier lösten die Medikamente keine Ströme aus.

Die grauen Balken in Abbildung 30 zeigt den Bereich der Plasmakonzentrationen der untersuchten Opioiden: **Fentanyl**  $C_{\max}$  beträgt 0,6-5,1 ng/ml und entspricht 0,002-0,01  $\mu$ M; die  $C_{\max}$  von **Alfentanil** beträgt 40-80 ng/ml und entspricht 0,1-0,2  $\mu$ M (Barash et al., 2001); die Plasmakonzentration von **Remifentanil** befindet sich je nach Applikationsart in dem Bereich von 3 nM bis 0,3  $\mu$ M (jede Steigerung von 0,1  $\mu$ g/kg/min in der Infusionsrate führt zu einer Blutspiegel-Erhöhung von 2,5 ng/ml; Ultiva-Fachinformation, GlaxoSmithKline, 2004). Die Plasmakonzentration von **Sufentanil** beträgt 0,05-0,1 ng/ml (entspricht 0,1-0,2 nM, Barash et al., 2001)) und liegt somit deutlich unterhalb des von uns untersuchten Konzentrationsbereichs (in Abbildung 30 nicht gezeigt).

### *Einfluss synthetischer Opioide auf die Stromamplitude*

Abbildung 30 zeigt die Konzentrations-Wirkungskurven für den Effekt der synthetischen Opioide auf die Maximalamplituden der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme. Der graue Balken bezeichnet die jeweilige Plasmakonzentration der untersuchten Medikamente. Im Unterschied zu den übrigen Substanzen, die den Maximalstrom leicht gehemmt haben, hat **Sufentanil** keinen signifikanten Effekt auf die Stromamplitude gezeigt. (Abbildung 30-D). Leider konnte dieser Effekt bei höheren Konzentrationen nicht bestätigt werden, da die Substanzen in Puffer (ECS) nicht mehr gut lösbar waren.

"peak" (Äquilibrium-Applikation, ++)



**Abbildung 30: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses synthetischer Opiode auf 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorvermittelte Einwärtsströme.** Das Medikament wurde 60 s vor und während dem Agonistenpuls (++) auf den „patch“ appliziert. Auf den Y-Achsen ist das Verhältnis der in Gegenwart von den Medikamenten auslösbarer Maximalströme zu den Kontrollströmen aufgetragen. Die grauen Balken bezeichnen den Bereich der Plasmakonzentrationen der jeweiligen Substanz. Fentanyl, Alfentanil und Remifentanil hemmten den 5-HT(30  $\mu$ M)-induzierten Strom (\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms).

### *Einfluss synthetischer Opioide auf die Kinetiken*

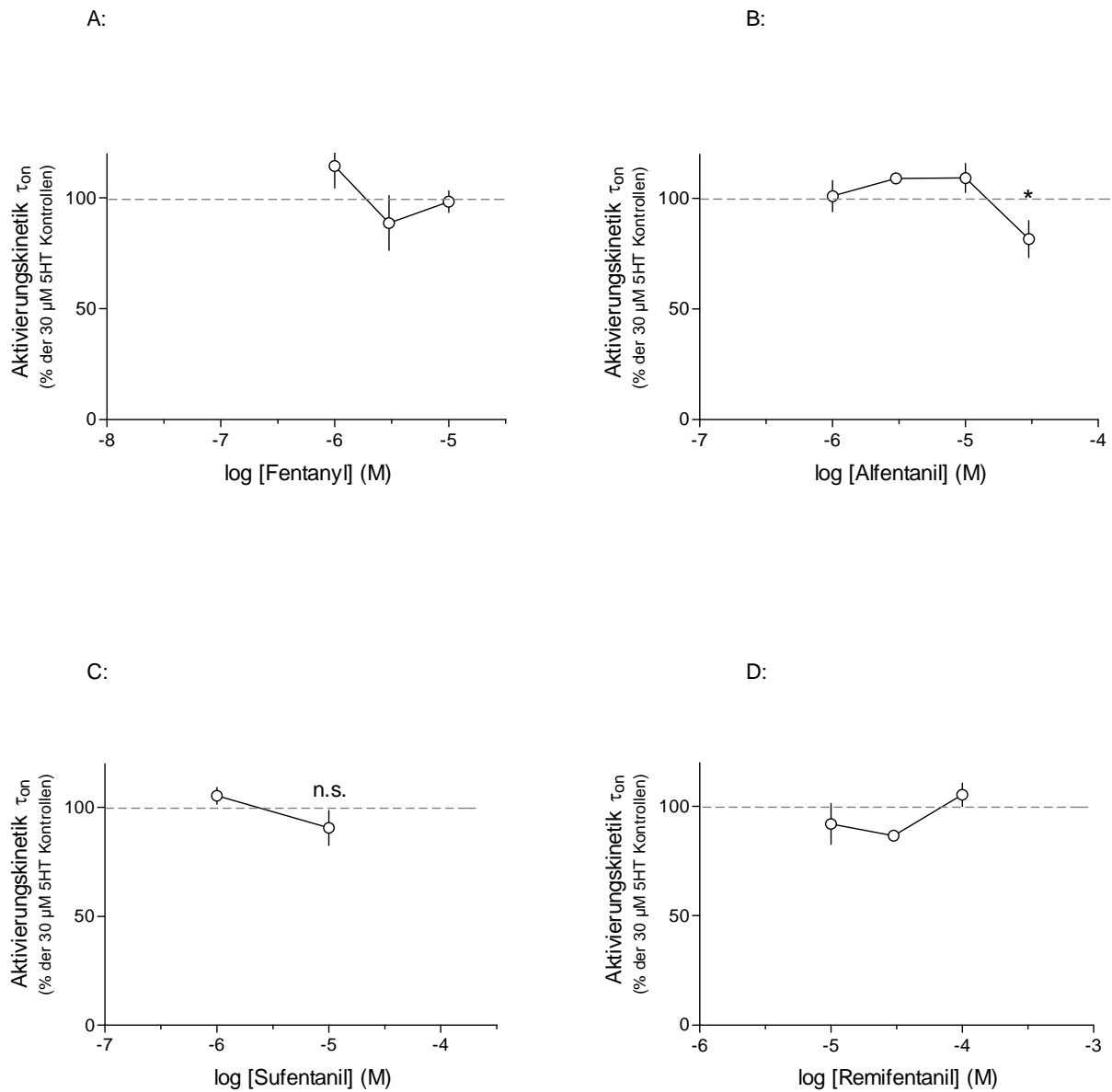
Abbildung 31 und Abbildung 32 fassen den Einfluss der untersuchten Opioide auf die Stromkinetik zusammen. **Fentanyl** zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Zeitkonstanten der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme (Abbildung 31-A und Abbildung 32-A).

**Alfentanil** hat sowohl die Aktivierungs- als auch die Inaktivierungskinetiken der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme bei Konzentrationen über 10  $\mu$ M beschleunigt (Abbildung 31-B und Abbildung 32-B). [z.B. Kontrollwert:  $\tau_{\text{off}} = 166,3 \pm 39,0$  ms, Alfentanil 30  $\mu$ M:  $\tau_{\text{off}} = 111,0 \pm 17,5$  ms, n = 3; Mittelwert  $\pm$  S.E.M,  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms]. Leider konnte dieser Effekt bei höheren Konzentrationen nicht weiter verfolgt werden, da sich das Medikament nicht mehr in Puffer (ECS) auflösen ließ.

Ähnlich wie Alfentanil zeigt **Sufentanil** Tendenz zur Beschleunigung der Inaktivierungszeitkonstante  $\tau_{\text{off}}$  unter Gabe von 10  $\mu$ M Sufentanil (Abbildung 32-C). Dieser Effekt war signifikant (z. B. Kontrollwert:  $\tau_{\text{off}} = 160,6 \pm 34,0$  ms; Sufentanil 10  $\mu$ M:  $\tau_{\text{off}} = 129,3 \pm 26,4$  ms; n = 3; (Mittelwert  $\pm$  S.E.M,  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms). Die Aktivierungszeitkonstante  $\tau_{\text{on}}$  blieb durch das Opioid unverändert (Abbildung 31-C; z. B. Kontrollwert  $\tau_{\text{on}} = 9,0 \pm 3,0$  ms; 10  $\mu$ M Sufentanil  $\tau_{\text{on}} = 8,6 \pm 3,6$  ms; n = 3; Mittelwert  $\pm$  S.E.M,  $p > 0,05$ ).

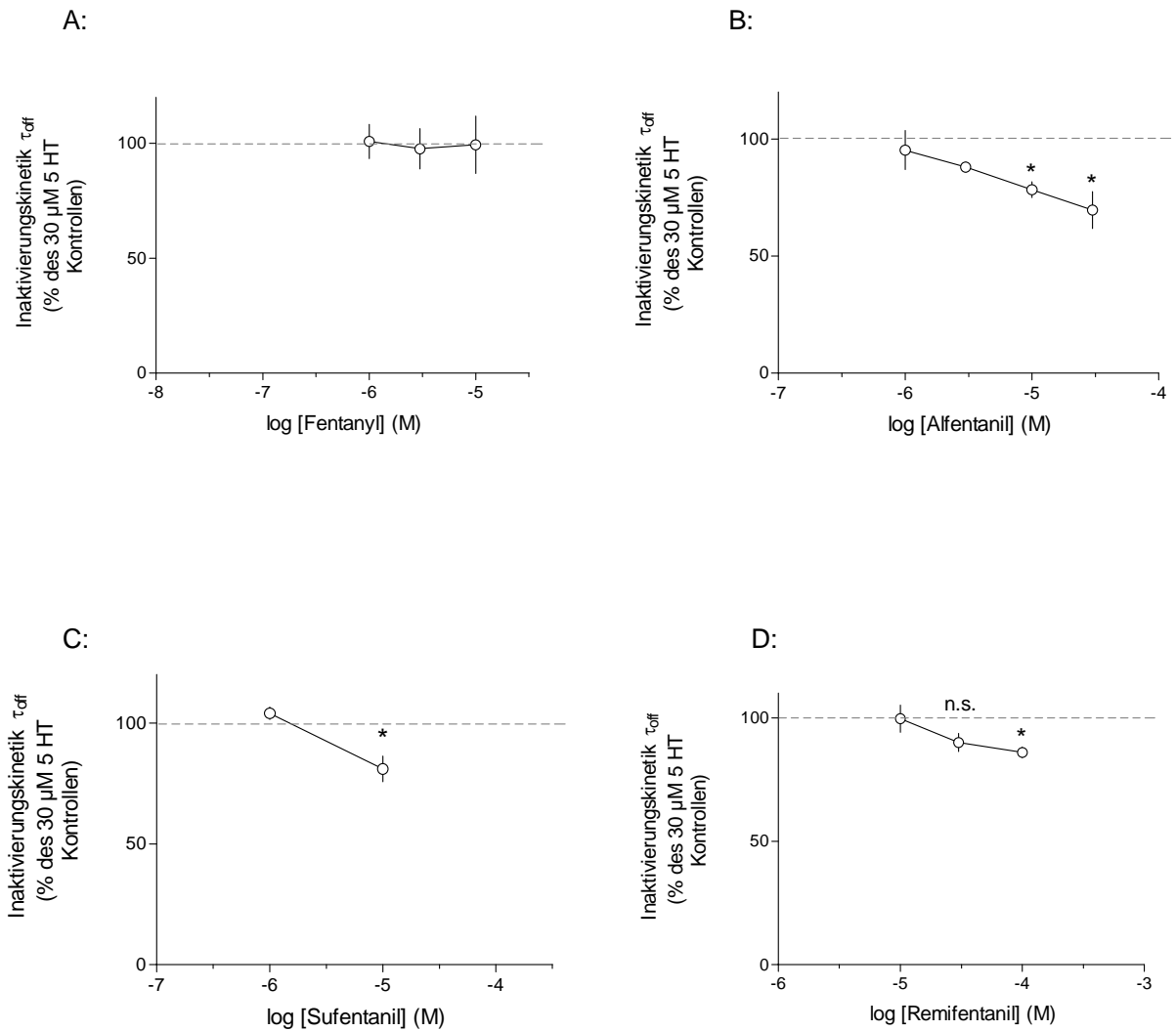
**Remifentanil** führte zu keiner signifikanten Veränderung der Aktivierungskinetiken der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme (Abbildung 31-D), hat aber ähnlich wie die anderen synthetischen Opioide die Inaktivierungskinetiken beschleunigt (z.B. Kontrollwert  $\tau_{\text{off}} = 113,2 \pm 31$  ms; 100  $\mu$ M Remifentanil  $\tau_{\text{off}} = 100,7 \pm 28$  ms,  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms, Abbildung 32-D).

$\tau_{on}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)



**Abbildung 31: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses synthetischer Opiode auf die Aktivierungskinetik ( $\tau_{on}$ ) des 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Einwärtsstroms. Die Medikamente wurden 60 s vor und während dem Agonistenpuls (++) auf den „patch“ appliziert. Die Aktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{on}$ ) sind als Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben. Alfentanil führte zu einer signifikanten Beschleunigung der Aktivierungskinetiken (\* =  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms)**

$\tau_{\text{off}}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)

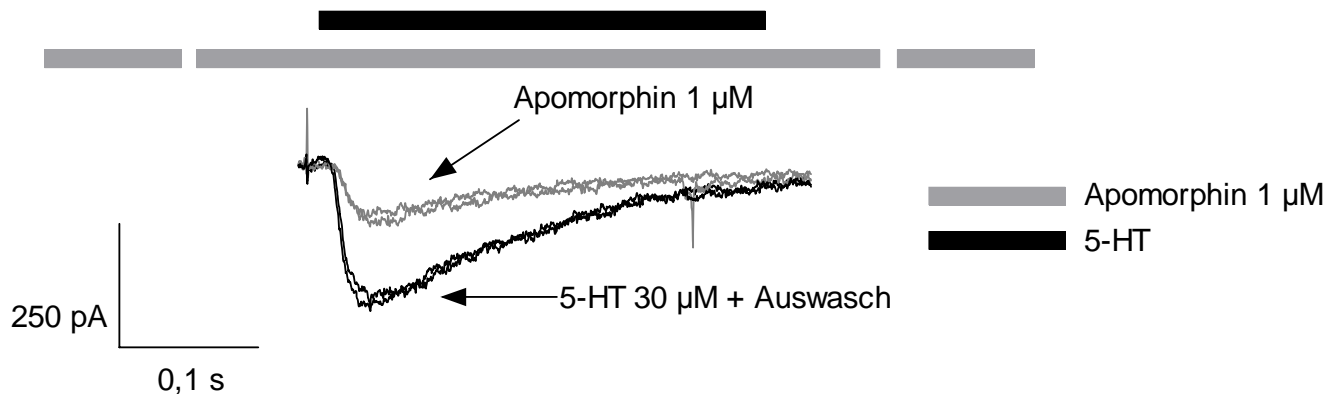


**Abbildung 32: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses synthetischer Opiode auf die Inaktivierungskinetik ( $\tau_{\text{off}}$ ) des 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Einwärtsstroms. Die Medikamente wurden 60 s vor und während dem Agonistenpuls (++) auf den „patch“ appliziert. Die Inaktivierungszeitkonstanten ( $\tau_{\text{off}}$ ) sind als Prozent des jeweiligen Kontrollwertes angegeben. Alfentanil, Sufentanil und Remifentanil führten zu einer signifikanten Beschleunigung der Inaktivierungskinetiken (\* =  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms).**

## Emetogene Mittel

### Apomorphin

Abbildung 33 zeigt Originalspuren 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierter Ströme durch 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren, unter dem Einfluss von 1  $\mu\text{M}$  Apomorphin bei kontinuierlicher Substanzapplikation und nach Auswasch des Emetikums. Es zeigt sich eine reversible Hemmung der Kontrollstromamplitude um 72 % durch 1  $\mu\text{M}$  Apomorphin, die nach 60 s Auswasch mit Puffer (ECS) vollständig aufhebbar war.



**Abbildung 33: Originalspuren 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierter Ströme (-100mV). Der Effekt von 1  $\mu\text{M}$  Apomorphin bei Äquilibrium Applikationsart (++) wird dargestellt. Der Maximalstrom („peak“) ist reversibel um 72 % durch 1  $\mu\text{M}$  Apomorphin gehemmt. Die Kontroll- und Auswasch-Stromspuren liegen übereinander, was die Reversibilität dieses Effektes belegt.**

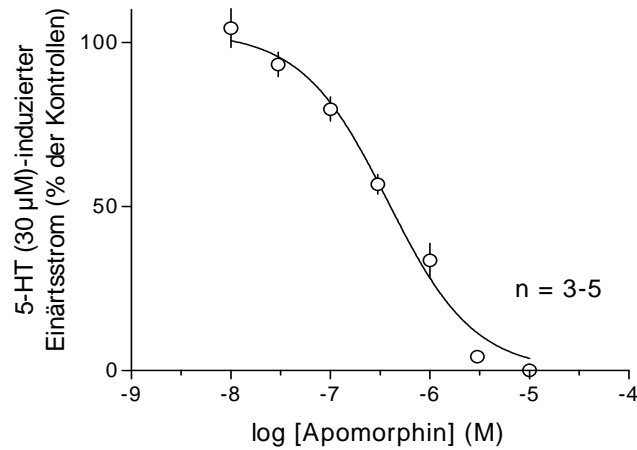


In den weiteren Experimenten wurde versucht, den Hemmtyp dieses Effektes zu charakterisieren. Dazu wurden komplette 5-HT-Konzentrations-Wirkungskurven unter steigenden Apomorphin-Konzentrationen bei Äquilibrium- und Offenkanal-Applikationsmoden (s. Methoden) aufgenommen.

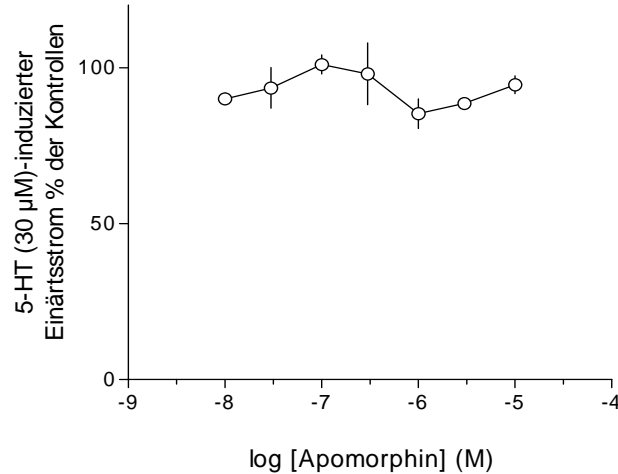
#### *Einfluss von Apomorphin auf die Stromamplituden*

Apomorphin inhibierte den 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Maximalstrom konzentrationsabhängig bei Äquilibrium (++) Applikationsmodus. Die Kurve konnte nach der Hill-Gleichung gefittet werden: (Abbildung 34-A:  $\text{IC}_{50} = 0,4 \mu\text{M}$ ; Hill-Koeffizient = -1.0). Im Unterschied dazu, führte die Offenkanal-Applikation von Apomorphin zu keiner signifikanten Veränderung der Stromamplitude (Abbildung 34-B).

A: "peak" (Äquilibriumapplikation, ++)



B: "peak" (Offenkanal-Applikation, -+)



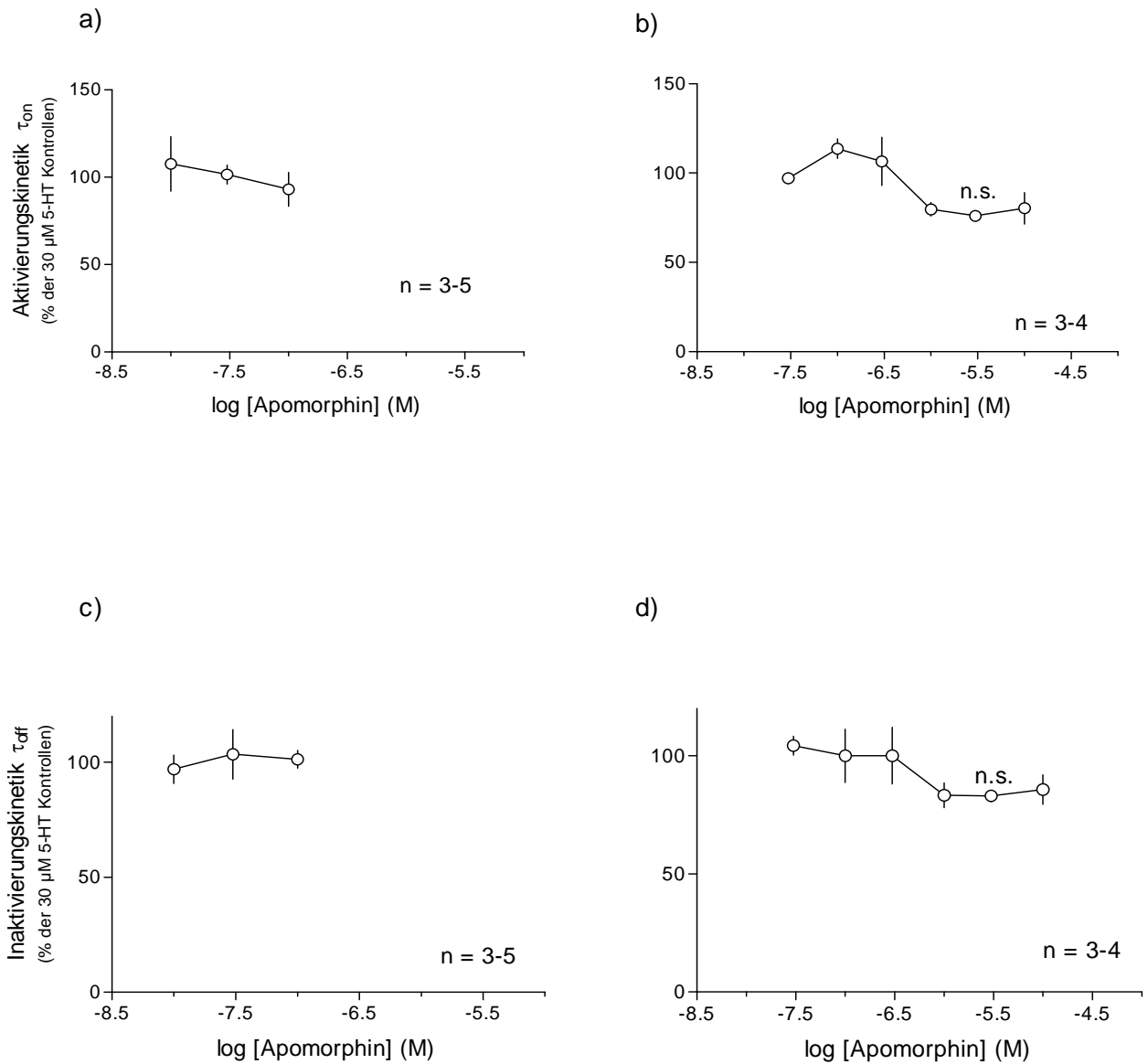
**Abbildung 34: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Apomorphin auf 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptorvermittelte Einwärtsströme (Maximalstrom = „peak“). Auf der Y-Achse ist das Verhältnis des in Gegenwart von Apomorphin auslösbaren Maximalstromes zu dem Kontrollstrom aufgetragen. Das Medikament wurde vor und während des 5-HT (30 µM) – Agonistenpulses appliziert (++) . An den Datenpunkten konnte eine Hill-Funktion angepasst werden (Hill-Koeffizient = -1,0; IC<sub>50</sub> = 0,4 µM). Apomorphin führte zu keiner signifikanten Veränderung des Maximalstromes bei Offenkanal-Applikation (B).**

*Einfluss von Apomorphin auf die Kinetiken*

Es fällt auf, dass sich im Unterschied zu den morphinartigen Opioiden, hier keine signifikante-Wirkung auf die Stromkinetiken zeigte (Abbildung 35). In Äquilibrium-Applikationsart liessen sich die Stromspuren bei Konzentrationen über 1  $\mu\text{M}$  weder bi- noch monoexponentiell fitten (Abbildung 35 a und c)

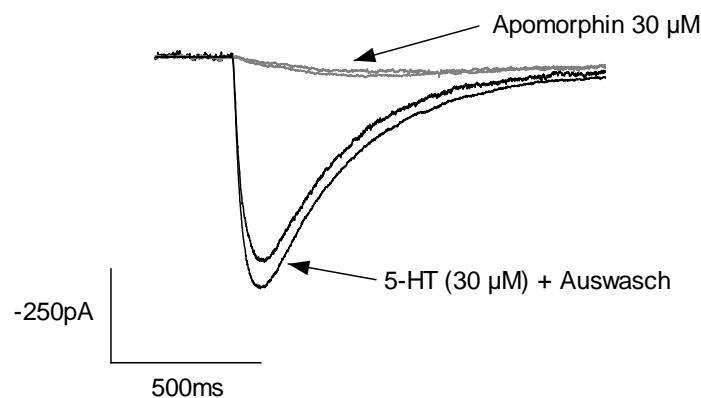
A: (Äquilibriumapplikation, ++)

B: (Offenkanal-Applikation, -+)



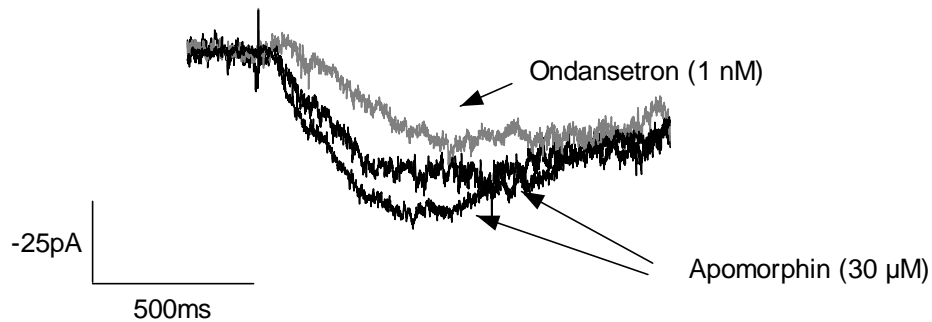
**Abbildung 35: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Apomorphin auf die Aktivierungs-(a, b) und Inaktivierungskinetiken (c, d) der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Einwärtsströme bei Äquilibrium- (A) und Offenkanal-Applikationsart (B) der Testsubstanz. Die Zeitkonstanten sind als Prozent des jeweiligen Kontrollstromes berechnet. Es zeigte sich kein signifikanter Effekt auf die Stromkinetiken durch Apomorphin.**

Wie bei all den bisher untersuchten Substanzen wurde jede Apomorphin-Konzentration auf eigene Wirkung am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor untersucht, in dem es in Abwesenheit des Agonisten auf „patch“ appliziert wurde, die bei vorherigen Serotoningabe einen Einwärtsstrom gezeigt haben. Apomorphin löste in Konzentrationen von 10 und 30 µM reproduzierbare Einwärtsströme aus. Abbildung 36 zeigt Originalspuren Apomorphin-induzierter Ströme am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor (graue Spuren). Um den Effekt zu verdeutlichen, wurden im gleichen „patch“ auch Kontrollströme durch 30 µM Serotonin erzeugt. Nach 60 s Auswasch der Substanzen zeigte sich dieser Effekt erneut, was seine Reversibilität belegte.



**Abbildung 36: Originalspuren Apomorphin (30 µM)-induzierter Ströme durch 5HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren (-100 mV). Die Kontroll- und Auswasch-Stromspuren liegen übereinander, was die Reversibilität dieses Effektes belegt.**

Um sicherzustellen, dass dieser Effekt spezifisch für Apomorphin war, wurden zusätzliche Experimente mit dem selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Ondansetron durchgeführt. Auf einen „patch“, an dem 30 µM Apomorphin 5-HT<sub>3A</sub>-Kanäle aktivierte, wurde anschließend 1 nM Ondansetron appliziert (graue Stromspur). Abbildung 37 zeigt Originalaufzeichnungen Apomorphin-induzierter Einwärtsströme am 5HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, die durch 1 nM Ondansetron reversibel gehemmt werden konnten.



**Abbildung 37: Originalspuren Apomorphin (30 µM)-induzierter Einwärtsströme durch 5HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren an einem exemplarischen „patch“ (-100 mV). Gezeigt ist die reversible Hemmung durch 1 nM Ondansetron (graue Stromspur).**

Als Zwischenergebnis konnte festgehalten werden, dass Apomorphin gleichzeitig den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor hemmte und aktivierte. Die Aktivierung wurde lediglich bei Konzentrationen von  $\geq 10$  µM beobachtet. Messungen mit Konzentrationen über 30 µM wurden aufgrund der dann auftretenden Verfärbung der Lösung bei Lichtexposition nicht durchgeführt.

Die beobachteten Effekte wurden von Apomorphin-Konzentrationen ausgelöst, die deutlich über den Plasmakonzentrationen des Medikaments liegen ( $C_{\max} = 0,06$  nM; Teclapharm, GmbH, Lüneburg, Deutschland, 2003).

## Endogene Opiode

### Endomorphin 2

In „patches“, die zuvor bei 5-HT (30  $\mu$ M) Gabe einen Einwärtsstrom zeigten, löste Endomorphin 2 in Abwesenheit des Agonisten keine Ströme aus. Das Peptid wurde im Äquilibrium, Geschlossen- und Offenkanaal-Applikationsmodus untersucht.

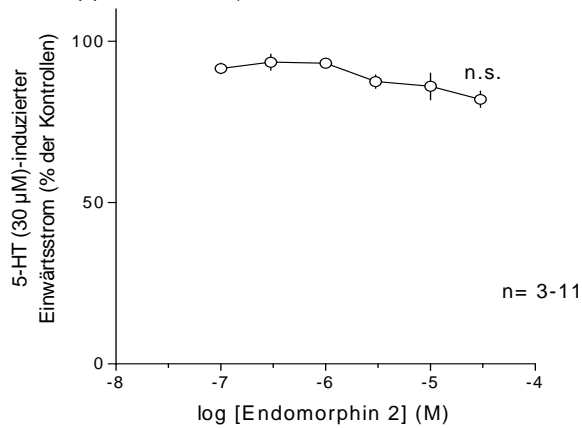
#### *Einfluss von Endomorphin 2 auf die Stromamplituden*

In Abbildung 38 ist der Effekt von Endomorphin 2 auf die Amplitude 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierter Ströme dargestellt. Aus den Konzentrations-Wirkungskurven ist ersichtlich, dass Endomorphin 2 keinen Einfluss auf den Maximalstrom ausübte.

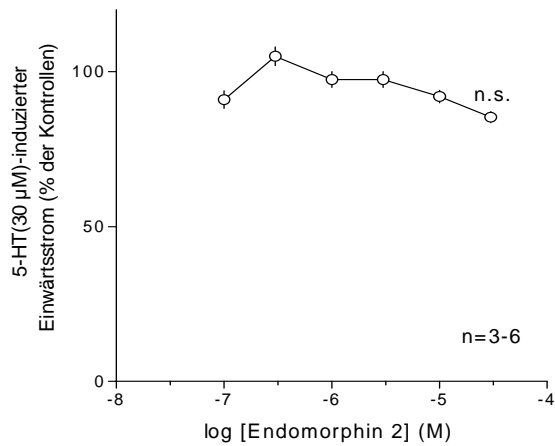
#### *Einfluss von Endomorphin 2 auf die Kinetiken*

Endomorphin 2 hatte keine signifikante Wirkung auf die Aktivierungskinetik (Abbildung 39), hat aber die Inaktivierungszeitkonstanten der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme konzentrationsabhängig beschleunigt (Abbildung 40) [z.B. Kontrollwert  $\tau_{\text{off}} = 112,7 \pm 8,1$  (n = 8); Endomorphin 2 (10  $\mu$ M):  $\tau_{\text{off}} = 77,0 \pm 12,6$  (n = 3); Mittelwerte  $\pm$  S.E.M.  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms].

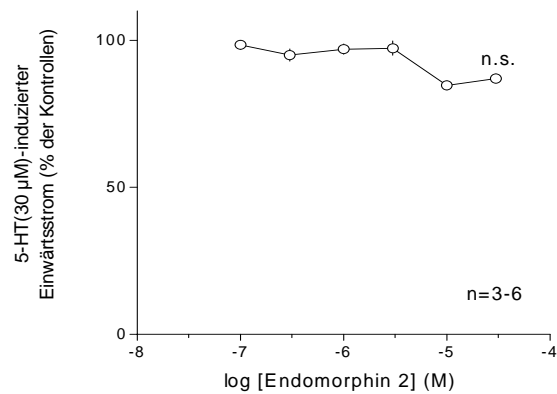
A: "peak" (Äquilibrium-Applikation, ++)



B: "peak" (Geschlossenkanal-Applikation, +-)



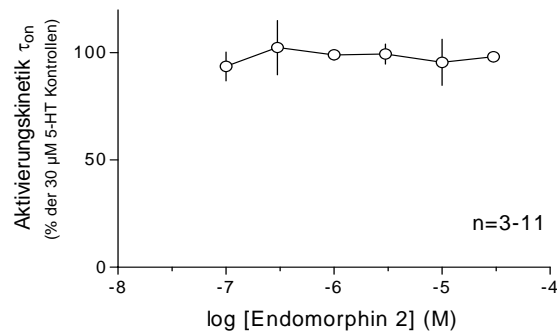
C: "peak" (Offenkanal-Applikation, -+)



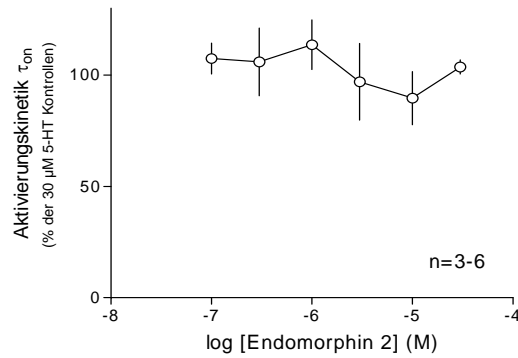
**Abbildung 38: Konzentrations-Wirkungskurven des Einflusses von Endomorphin 2 auf 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-vermittelte Einwärtsströme.** Auf der Y-Achse ist das Verhältnis der in Gegenwart von Endomorphin 2 auslösbaren Maximalströme zu den Kontrollströmen aufgetragen. Das Peptid wurde in (A) Äquilibrium- (++) , (B) Geschlossenkanal- (+-) und (C) Offenkanal-Applikationsmodus (-+) auf den „patch“ appliziert. Es zeigt sich kein signifikanter Effekt von Endomorphin 2 auf den Maximalstrom.



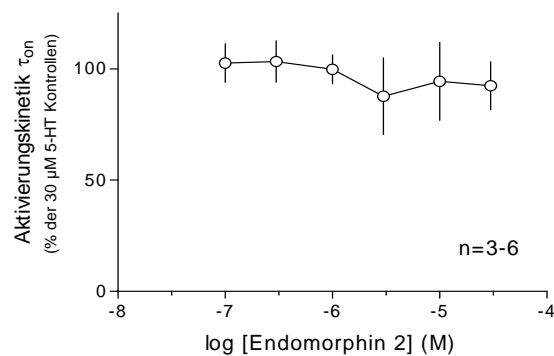
A:  $\tau_{on}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)



B:  $\tau_{on}$  (Geschlossenkanal-Applikation, +-)

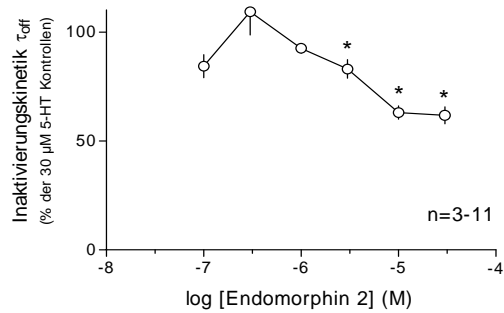


C:  $\tau_{on}$  (Offenkanal-Applikation, -+)

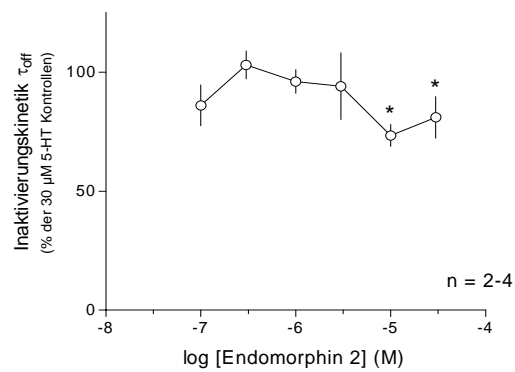


**Abbildung 39: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Endomorphin 2 auf die Aktivierungskinetik ( $\tau_{on}$ ) des 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Einwärtsstroms. Das Peptid wurde in (A) Äquilibrium- (++) , (B) Geschlossenkanal- (+-) und (C) Offenkanal-Applikationsmodus (-+) auf den „patch“ appliziert. Es zeigt sich keine signifikante Veränderung der Aktivierungskinetik.**

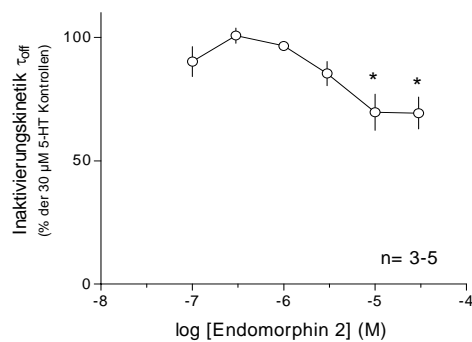
A:  $\tau_{\text{off}}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)



B:  $\tau_{\text{off}}$  (Geschlossenkanal-Applikation, +-)



C:  $\tau_{\text{off}}$  (Offenkanal-Applikation, -+)



**Abbildung 40: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Endomorphin 2 auf die Inaktivierungskinetik ( $\tau_{\text{off}}$ ) des 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Einwärtsstroms. Das Peptid wurde in (A) Äquilibrium (++), (B) Geschlossenkanal (+-) und (C) Offenkanal-Applikationsmodus (-+) auf den „patch“ appliziert. Man beachte die konzentrationsabhängige Beschleunigung der Inaktivierungskinetik (\* =  $p < 0,05$ , gepaarter t-test, basierend auf den Absolutwerten in ms).**

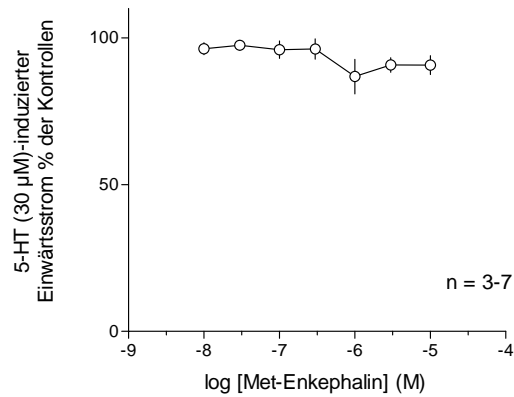
**Met-Enkephalin**

In „patchen“, die zuvor bei 5-HT (30  $\mu$ M)-Gabe einen Einwärtsstrom zeigten, löste Met-Enkephalin in Abwesenheit des Agonisten keine Ströme aus.

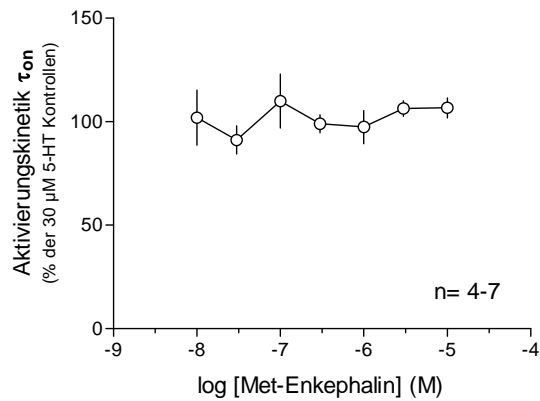
Das Endopeptid wurde 60 s vor und während dem Serotoninpuls (30  $\mu$ M) auf den „patch“ appliziert (Äquilibrium-Applikationsart, ++). Es wurden die Effekte von Met-Enkephalin auf Maximalströme und Kinetiken (monoexponentieller Fit) der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme untersucht.

Met-Enkephalin zeigte keinen Effekt auf die Stromamplitude. Im Unterschied zu Endomorphin 2 fand sich hier keinerlei Effekt auf die Zeitkonstanten der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme (Abbildung 41).

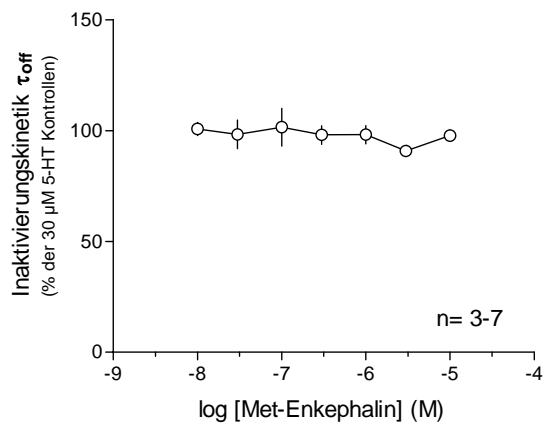
A: "peak" (Äquilibrium-Applikation, ++)



B:  $\tau_{on}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)



C:  $\tau_{off}$  (Äquilibrium-Applikation, ++)



**Abbildung 41: Konzentrations-Wirkungskurve des Einflusses von Met-Enkephalin auf die Maximalamplitude (A), die Aktivierungs- (B) und die Inaktivierungskinetik (C) des 5-HT (30 μM)-induzierten Einwärtsstroms. Das Peptid wurde 60 s vor und während dem 5-HT (30 μM)-Agonistenpuls appliziert (++) . Met-Enkephalin zeigte weder einen Effekt auf den Maximalstrom, noch auf die Kinetiken.**

Auf Tabelle 1 sind die unterschiedlichen Effekte der untersuchten Substanzen auf die Stromamplitude, Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik der 5-HT (30  $\mu\text{M}$ )-induzierten Ströme, sowie die Plasmakonzentrationen zusammenfassend aufgeführt.

**Tabelle 1: Vergleich der Effekte von unterschiedlichen Substanzen auf die Stromamplitude und Kinetiken bei Äquilibrium-Applikationsart.**

Medikament	Stromamplitude	Aktivierungs- Kinetik ( $\tau_{\text{on}}$ )	Inaktivierungs- Kinetik ( $\tau_{\text{off}}$ )	Plasma- Konzentration ( $C_{\text{max}}$ )
<b>DHE</b>	↓ > 0,3 $\mu\text{M}$	- 0,1-30 $\mu\text{M}$	↓ > 0,3 $\mu\text{M}$	0,01-0,02 $\mu\text{M}$
<b>Sumatriptan</b>	- 0,01-3 $\mu\text{M}$	- 0,01-3 $\mu\text{M}$	↑ 0,03-0,3 $\mu\text{M}$	0,1-0,5 $\mu\text{M}$
<b>Morphin</b>	↓ $\text{IC}_{50} = 0,3 \mu\text{M}$	↑ > 1 $\mu\text{M}$	↑ > 1 $\mu\text{M}$	0,03-0,1 $\mu\text{M}$
<b>Hydromorphon</b>	↓ $\text{IC}_{50} = 4,1 \mu\text{M}$	↑ > 0,1 $\mu\text{M}$	↑ > 3 $\mu\text{M}$	0,03-0,1 $\mu\text{M}$
<b>Fentanyl</b>	↓ >3 $\mu\text{M}$	- 1-10 $\mu\text{M}$	- 1-10 $\mu\text{M}$	4-10 nM
<b>Alfentanil</b>	↓ >1 $\mu\text{M}$	↓ >10 $\mu\text{M}$	↓ > 3 $\mu\text{M}$	0,1-0,2 $\mu\text{M}$
<b>Sufentanil</b>	- 1-10 $\mu\text{M}$	- 1-10 $\mu\text{M}$	↓ > 1 $\mu\text{M}$	0,1-0,2 nM
<b>Remifentanil</b>	↓ >10 $\mu\text{M}$	- 10-100 $\mu\text{M}$	↓ >10 $\mu\text{M}$	3-300 nM
<b>Apomorphin</b> (zus. Aktivierung)	↓ $\text{IC}_{50} = 0,4 \mu\text{M}$	- 0,01-10 $\mu\text{M}$	- 0,01-10 $\mu\text{M}$	0,06 nM
<b>Endomorphin 2</b>	- 0,1-30 $\mu\text{M}$	- 0,1-30 $\mu\text{M}$	↓ > 1 $\mu\text{M}$	ca. 1 $\mu\text{M}$ ?
<b>Met-Enkephalin</b>	- 0,01-30 $\mu\text{M}$	- 0,01-30 $\mu\text{M}$	- 0,01-30 $\mu\text{M}$	ca.0,26 pM

## Diskussion

### Charakterisierung des 5HT<sub>3A</sub>-Rezeptors / Methodologische Fragen

In dieser Arbeit werden die Effekte verschiedener Analgetika auf humane 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren, exprimiert in HEK293-Zellen, mit Hilfe einer elektrophysiologischen Methode (Patch-Clamp) charakterisiert.

Bei HEK293-Zellen handelt sich um menschliche embryonale Nierenzellen, die durch Exposition mit Fragmenten von Adenovirus Typ 5-DNA transfiziert worden sind (Graham und Smiley, 1977). Diese Zelllinie wurde anfänglich in der virologischen Forschung eingesetzt (Brown und Petric, 1986). An stabil transfizierten Zellen können Membranproteine in hoher Dichte untersucht werden, die *in-vivo* schlecht zugänglich sind.

Im Unterschied zu anderen Zelllinien, an denen 5HT<sub>3</sub>-Rezeptoren exprimiert werden (z.B. N1E115 Maus-Neuroblastom Zellen, Barann et al., 1997), zeigte sich hier eine größere Amplitude der 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme (HEK293-Zellen:  $355 \pm 18,6$  pA; N1E115 Zellen:  $20 \pm 1,9$  pA). Dies optimierte die Versuchsbedingungen und ermöglichte eine bessere Evaluierung der beobachteten Effekte. Bei der von uns verwendeten „patch-clamp“-Methode an „outside-out patchen“ wurden Ionenkanäle isoliert in ihrer Umgebung (frei von Zytosol) untersucht. Auf diese Weise konnten Ionenkanäle einer Zelle gemessen werden (Hamil et al., 1981) welche sich in einer kleinen Membranfläche befinden. Kombiniert mit einem Applikationssystem, das es gestattete, Lösungen innerhalb von weniger als 2 ms auszutauschen, konnte man somit schnell auftretende Effekte der eingesetzten Substanzen von langsamen unterscheiden. Die untersuchten 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-Ionenkanäle in HEK293-Zellen zeigten bei Serotonin-Applikation typische Stromformen von Ligand-gesteuerten Ionenkanälen, was im Einklang mit früheren Beobachtungen war (Barann et al, 2000b, 2002; Malone und Peters, 1991). Die experimentellen Standardbedingungen (Membranhaltpotential -100 mV = konstant) wirkten einer Depolarisierung der Zelle entgegen und verhinderten somit die Beteiligung spannungsabhängiger Kanäle.

## Hintergrund

Übelkeit und Erbrechen (Emesis) sind belastende Nebenwirkungen sowohl bei Zytostatika- als auch Migräne-Therapie. Darüber hinaus verursachen Anästhetika und Opioid-Analgetika Emesis. Die genauen Mechanismen der emetogenen Wirkung dieser Substanzen sind noch nicht vollständig geklärt worden: An dem emetischen Reflex sind zahlreiche Neurotransmitter wie z.B. Acetylcholin, Histamin, Dopamin und Serotonin beteiligt, was auf ein kompliziertes Rezeptoren-Netzwerk hindeutet. Die Einführung der Antiemetika aus der Klasse der 5-HT<sub>3</sub>-Antagonisten hat dennoch eine dramatische Reduktion der Inzidenz von Chemotherapie- und Strahlentherapieinduzierter, sowie von postoperativer Nausea und Emesis ermöglicht. Dies weist auf die wichtige Rolle der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren bei der Vermittlung von Pharmaka-induzierter Übelkeit und Erbrechen hin und weckt immer wieder das Interesse an diesem Rezeptor.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Effekte von klinisch gebräuchlichen Analgetika an humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren *in vitro* zu untersuchen und auf Parallelen mit *in vivo* Beobachtungen zu überprüfen. Es wurde auf die Effekte von Anti-Migränemitteln sowie synthetischen und körpereigenen Opioiden am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor eingegangen, um zu klären, ob molekulare Effekte dieser Substanzen mit postoperativer Nausea und Emesis korrelieren.

Es sollte zunächst geklärt werden, welche Wirkungen die untersuchten Substanzen am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor aufweisen. Eine *in vitro* Verstärkung des 5-HT-induzierten Gesamtsignals (Fläche über der Stromkurve) durch die Testsubstanzen könnte für ihre potentielle emetische Wirkung sprechen und umgekehrt - eine Hemmung des Rezeptors bzw. der durch die Kanalpore fließenden Ströme würde eine antiemetische Wirkung dieser Substanzen vermuten lassen – vorausgesetzt, diese *in-vitro* Effekte fänden bei (freien) klinischen Plasmakonzentrationen statt. Diese Hypothese ist jedoch etwas vereinfacht, da es durchaus möglich wäre, dass Substanzen, die keinen direkten Effekt am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor zeigen, ihn dennoch indirekt aktivieren könnten (z.B. Hemmung des Serotonintransporters durch Tramadol bei Plasmakonzentrationen, ohne direkten Effekt am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor, Barann et al., 2006).

### **Einfluss von Migränemitteln auf die 5-HT (30 $\mu$ M)-induzierten Ströme durch den 5HT<sub>3A</sub> Rezeptor.**

Die Ergotalkaloide (z.B. Ergotamin, DHE), sind potente Agonisten an den 5-HT<sub>1B</sub>-und 5-HT<sub>1D</sub>-Rezeptoren, über die sie ihre vasokonstriktorische und entzündungshemmende Wirkung bei der Migräneerkrankung entfalten (Silberstein und Douglas, 2003). Es wird angenommen, dass die Nebenwirkungen der Ergotalkaloide, wie Übelkeit und Erbrechen, z.T. über zentrale 5-HT<sub>2A</sub>-und D<sub>2</sub>-Rezeptoren erfolgen. Walkembach et al., (2005) zeigten, dass Ergotamin keinen signifikanten Effekt am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor verursacht. Dagegen hemmte das Antiemetikum Metoclopramid, das häufig mit Ergotamin bei Migränetherapie kombiniert wird, den Rezeptor bei klinischen Konzentrationen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren (a) an der antiemetischen Wirkung von Metoclopramid direkt, und (b) an den Ergot-Nebenwirkungen indirekt beteiligt sein können.

DHE (Dihydroergotamin) hat den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor erst bei sehr hohen, weit oberhalb der Plasmakonzentrationen beeinflusst: Es zeigte sich eine Hemmung des 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Stromes bei Konzentrationen von über 0,3  $\mu$ M (Abbildung 9), was für eine eher antiemetische Wirkung des Ergotalkaloids sprechen würde. Obwohl dieser Effekt weit oberhalb klinischer Plasmakonzentrationen zu beobachten war, korreliert er mit der klinischen Beobachtung, dass DHE weniger Nebenwirkungen im Sinne von Übelkeit und Erbrechen im Vergleich zu Ergotamin zeigt (Silberstein und Douglas, 2003). Ergotalkaloide werden in die Gewebe aufgenommen, so dass ihre pharmakologischen Effekte länger anhalten, als sie oder ihre Metabolite im Plasma nachweisbar sind (Moller-Schweinitzer und Rosenthaler, 1987). Daher wäre es durchaus möglich, dass der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor ein potentielles Ziel für Effekte der Dihydroergotamin-Metabolite *in vivo* ist.

Ein anderes Antimigränemittel, das heutzutage viel häufiger klinisch eingesetzt wird, ist Sumatriptan. Es gehört zu der Gruppe der Triptane, die nach ihrer Einführung in der Migränetherapie und Prophylaxe eine effektive und besser verträgliche Alternative zu den Ergotalkaloiden darstellen. Die Triptane führen über eine selektive Erregung von 5-HT<sub>1B/1D</sub>-Rezeptoren zu einer direkten Vasokonstriktion meningealer Gefäße und hemmen die Freisetzung neuronaler Peptide, was zum Abklingen der neuronalen Entzündung und zur Linderung der Migräneattacke führt. Die Triptane weisen wesentlich weniger Nebenwirkungen, darunter aber auch Übelkeit und Erbre-



chen auf. Deshalb war es auch hier von Interesse zu überprüfen, ob der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor möglicherweise von Sumatriptan bei klinischen Plasmakonzentrationen beeinflusst wird. Sumatriptan wurde für die Experimente vorgezogen, da es von den Triptanen am wenigsten selektiv an 5-HT<sub>1B/1D</sub>-Rezeptoren wirkt (Fowler et al., 1991).

Sumatriptan wird in verschiedenen Darreichungsformen eingesetzt. Die Plasmakonzentration ( $C_{max}$ ) bei i.v. Gabe von 3 mg beträgt 76,8 ng/ml (44-124 ng/ml; entspricht 0,1-0,4  $\mu$ M); bei s.c. Gabe von 6 mg: 72,4 ng/ml (54,9-108 ng/ml, entspricht 0,1-0,5  $\mu$ M) und bei oraler Verabreichung von 100 mg: 53,8 ng/ml (26-137 ng/ml, entspricht 0,1-0,5  $\mu$ M, Fowler et al., 1991). Es wurde mit Sumatriptan-Konzentrationen experimentiert, die in dem *in vivo*-gemessenen Plasmakonzentrationsbereich des Medikamentes liegen.

Unabhängig von der Applikationsart, zeigte Sumatriptan keinen signifikanten Effekt auf die Amplituden der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme (Abbildung 13). Dagegen führte Sumatriptan interessanterweise zu einer signifikanten Verlangsamung der Rezeptorinaktivierung, die bei klinischen Konzentrationen ( $\sim$  0,3  $\mu$ M) konzentrationsabhängig und reversibel auftrat (Abbildung 16). Diese Eigenschaft entspricht einer Potenzierung des Effektes am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor (z.B. indem eine verlängerte Öffnungszeit zu einer Vergrößerung der Fläche der Stromspuren führt) und kann auf einen durch ihn vermittelten indirekten emetogenen Effekt von Sumatriptan hindeuten. Der Effekt war von der Applikationsart der Substanz abhängig und zeigte sich lediglich, wenn sie für 60 s vorappliziert wurde. Dies weist darauf hin, dass dieser Effekt langsam ist. Es zeigte sich jedoch ein Bruch in der Konzentrations-Wirkungskurve dieses Effektes: Sumatriptan in Konzentrationen von 1-10  $\mu$ M hatte die Inaktivierungskinetik nicht beeinflusst (Abbildung 16). Um die Validität der Rezeptor-Inaktivierungsverlangsamung bei Konzentrationen unter 1  $\mu$ M zu validieren, wurden die Experimente wiederholt, wobei sich dieser signifikante Effekt bestätigen ließ. Doppelpuls-Experimente (zwei aufeinander folgende 5-HT Pulse) sollten den Effekt von Sumatriptan auf die 5HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-Desensibilisierung näher charakterisieren (Abbildung 17). Die Anwesenheit des Medikamentes führte zu einer geringfügigen - dennoch signifikanten - Verzögerung der Erholung aus der Rezeptor Desensibilisierung, was dieselbe Ursache wie die Verlangsamung der Inaktivierungskinetiken haben könnte (s. Tabelle 1).

Die relativ geringe Verstärkung des 5-HT-Effektes am humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor durch Sumatriptan weist auf eine mögliche emetogene Potenz hin, widerspricht aber der klinisch weniger im Vergleich zu anderen Antimigränemitteln ausgeprägten Übelkeit und Erbrechen. Die Ergeb-

nisse zeigen, dass Sumatriptan außer an 5-HT<sub>1B/1D</sub>- auch an 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren wirksam sein könnte.

### **Einfluss von Opioiden auf die 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme durch den 5HT<sub>3A</sub>-Rezeptor.**

Ein ähnlicher Effekt wie der des Sumatriptan auf die Rezeptorkinetiken wurde auch bei anderen Substanzen, wie Morphin und Hydromorphon beobachtet. Beide Substanzen sind Analgetika und entfalten ihre Wirkung vorwiegend über den µ-Rezeptor (Kretz et al., 2000). Hydromorphon ist ein Dihydromorphinderivat, das sich strukturell wenig von Morphin unterscheidet (Substitution der 6-Hydroxylgruppe durch Sauerstoff und Hydrogenierung der 7-8-Doppelbindung, Strukturformel s. Methoden). Sowohl die pharmakologischen Effekte, als auch die Nebenwirkungen von Hydromorphon und Morphin wie z.B. Übelkeit und Erbrechen unterscheiden sich nicht wesentlich und beide Substanzen weisen eine strukturelle Ähnlichkeit auf.

Morphin und Hydromorphon haben konzentrationsabhängig und reversibel sowohl die Aktivierungs- als auch die Inaktivierungskinetiken des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors verlangsamt, vorausgesetzt die Substanzen wurden für 60 s vorappliziert (Äquilibrium-Applikation, „++“). Dies deutet auf einen eher langsamen Prozess hin (Zeit vom Start der Serotonin-Applikation bis zum Erreichen der Maximalstromamplitude = 20 ms). Gleichartige Befunde am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor wurden bei Ganzzellmessungen mit Morphin (Wittmann et al., 2006) und Hydromorphon erhoben (nicht publizierte Daten). Diese Effekte wurden bei Konzentrationen beobachtet, die über den Plasmakonzentrationen lagen ( $C_{\max} = 20-50$  ng/ml, entspricht 0,03-0,1 µM, Barash et al., 2001).

Anscheinend spielt die Desensibilisierung des Rezeptors eine wesentliche Rolle für die Wirkmechanismen dieser Substanzen am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. Sie ist ein für Ligand-gesteuerte Ionenkanäle typisches Phänomen (Bond, 1987). Durch den bestehenden inaktiven Zustand des Rezeptors ist es möglich die Synapse vor weiteren Impulsen zu schützen und somit ihre Antwortmöglichkeit deutlich zu beeinflussen (Huganir et al., 1986; Jones und Westbrook, 1996). Somit könnte die Desensibilisierung ein wichtiger Mechanismus der Kurzzeit-Regulation synaptischer Effizienz sein. Eine Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren bewirkt z.B. eine erhöhte Aktivität viszero-affektiver Neurone, die klinisch zu Nausea und Emesis führt (Hoyer et al., 1994). Dies lässt vermuten, dass die beobachteten Effekte von Sumatriptan, Morphin und Hydromorphon auf die 5-HT (30µM)-

induzierte Stromkinetik (Verlangsamung) eine Beteiligung der 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptoren an Emesis - verursacht durch diese Substanzen – erklären kann. Weiter ist bekannt, dass es nach Aktivierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren über direkte wie auch indirekte Prozesse zu vermehrter Freisetzung von 5-HT, GABA und Dopamin kommt, hingegen zu einer Hemmung der Ausschüttung von ACh (Barnes und Sharp, 1999). Daher kann man davon ausgehen, dass im Netzwerk durch Veränderungen an der Funktion von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren auch andere Neurotransmittersysteme beeinflusst werden.

Morphin und Hydromorphon haben neben den Rezeptorkinetiken auch die Amplitude der 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme im Sinne einer konzentrationsabhängigen und reversiblen Hemmung beeinflusst (Morphin: IC<sub>50</sub> = 0,3 µM, Hydromorphon: IC<sub>50</sub> = 4,1 µM). Diese Effekte sind ebenfalls an Ganzzellmessungen beobachtet worden, jedoch Morphin zeigte sich um Faktor 3 weniger potent im Vergleich zu „Excised-Patch“ (IC<sub>50</sub> = 1 µM, Wittmann et al., 2006), während Hydromorphon im Whole-Cell-Modus eher potenter am 5-HT<sub>3A</sub> Rezeptor war (IC<sub>50</sub> = 2,2 µM, nicht publizierte Daten).

Die Hemmpotenz von Morphin am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor ist schon 1957 von Gaddum und Picarelli beschrieben worden, weswegen diese neuronal lokalisierten Rezeptoren als M-Rezeptoren bezeichnet wurden (s. Einleitung). Obwohl die analgetische Wirkung von Morphin von den µ-Opioid-Rezeptoren vermittelt wird, wird von mehreren Autoren zusätzlich von einer Morphin-induzierten Serotonin-Ausschüttung berichtet (Suzuki und Taguchi, 1986, Yaksh und Tyce, 1979), die bei seinem analgetischen Effekt auf spinalem Niveau eine wichtige Rolle spielt. Kawamata et al. (2002) berichten von einer indirekten analgetischen Wirkung von Morphin durch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-Aktivierung und anschließende GABA-Ausschüttung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Opioide sowohl ihre Wirkungen wie ihre Nebenwirkungen, wie Übelkeit und Erbrechen, teilweise – zumindest indirekt - über den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor entfalten könnten. Dies wird noch von der Beobachtung unterstützt, dass die Effekte von Morphin an diesem Rezeptor innerhalb von Plasmakonzentrationen auftraten (s. Tabelle 1, C<sub>max</sub> = 20-50 ng/ml, entspricht 0,03-0,1 µM, Barash et al., 2001).

Die Ergebnisse von Morphin und Hydromorphon sind auf den ersten Blick widersprüchlich: Die Potenzierung des Effektes am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor durch Morphin und sein Derivat Hydromorphon lässt eine Verstärkung der Rezeptorfunktion und daher seine Beteiligung an Opioid-induzierter Emesis vermuten (Abbildung 21 und Abbildung 27). Andererseits würde eine Hemmung des Re-

zeptors eher für eine antiemetische Wirkung der Opioide sprechen (Abbildung 19 und Abbildung 25). Diese Beobachtungen werden von Untersuchungen unterstützt, die zeigen, dass eine Prämedikation mit niedrigen Morphindosen antiemetisch bei Morphin- (Costello and Borison, 1977), Nikotin- (Beleslin et al., 1981) und Apomorphin- induzierter Emesis wirken kann (Blancquart et al., 1986). Dies macht die Komplexität dieses Prozesses deutlich. Barnes und Bunce (1991) berichten von einer ähnlichen antiemetischen Wirkung von Fentanyl beim Frettchen und gehen von einer  $\mu$ -Rezeptor vermittelten Antagonisierung der Cisplatin-, Apomorphin und Kupfersulfat-induzierter Emesis aus. Foss et al (1998) zeigen, dass Methylnaltrexon, ein peripherer  $\mu$ -Rezeptorantagonist, den emetogenen Effekt von Morphin bei Hunden hemmen und dadurch seine antiemetische Wirkung demaskieren kann. Dies lässt vermuten, dass die periphere emetogene Wirkung von Morphin durch Opioid-Rezeptoren vermittelt wird, während die Inhibierung der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren im ZNS zu seiner antiemetischen Wirkung beitragen könnte. Die klinisch letztendlich beobachtete Emetogenität der Opioide könnte somit mit ihrer höheren Potenz am  $\mu$ -Opioid-Rezeptor (im Vergleich zum 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor) zusammenhängen.

Trotz der strukturellen Ähnlichkeit zu Morphin und seiner klinisch 7,5-fach stärkeren analgetischen Wirksamkeit (Lindena und Arnau, 1998), zeigte sich Hydromorphon weniger potent am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor. Darüber hinaus fällt auf, dass der Hemmeffekt von Morphin lediglich bei 60 s Vorapplikation („++“; „+-“) -, während der von Hydromorphon auch bei Offenkanal-Applikation („-+“) auftritt (Abbildung 25). Dies weist auf unterschiedliche Kinetiken der Hemmeffekte hin: Der Effekt von Hydromorphon ist schnell und spielt sich innerhalb von ca. 20 ms ab – während der von Morphin langsamer ist und sich am geschlossenen Kanal abspielen könnte. Interessanterweise führt Hydromorphon zur Verlangsamung der Stromkinetik – im Unterschied zu seinem Hemmeffekt – lediglich wenn es für 60 s vorappliziert wurde, was darauf hindeutet, dass die Verstärkung des 5-HT-induzierten Signals und die Hemmung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors durch unterschiedliche Mechanismen mit verschiedenen Kinetiken vermittelt wird.

Die Hemmeffekte von Morphin und Hydromorphon wurden durch Konkurrenzexperimente näher charakterisiert. Beide Opioide schienen den 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Strom nicht kompetitiv zu hemmen (Abbildung 23 und Abbildung 29), was in Diskrepanz zu den Ergebnissen von Ganzzell- und Ionenflussmessungen (Wittmann et al. 2006, Fan, 1995) steht. Dieser Unterschied mag jedoch an dem unterschiedlichen Versuchsmodell liegen, z.B. am Verlust der intrazellulären Komponenten, da die Membran im „excised patch“ Modus (s. Methoden) von dem Zytosol und

den intrazellulären Komponenten getrennt wird. Es ist auch durchaus möglich, dass die Kinetik des Morphin- und Hydromorphoneffektes langsamer als die 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierte Stromkinetik in „excised patchen“ ist: Dies könnte bedeuten, dass die Hemmung durch 5-HT in den 20 ms bis zum „peak“-Strom nicht mehr antagonisierbar ist – somit wäre eine Kompetitivität mit dem Versuchsmodell am „excised patch“ nicht darstellbar. Anders als Morphin, zeigte Hydromorphon seine Hemmwirkung am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor innerhalb von 20 ms (Offenkanal-Applikation „-+“, Abbildung 25), somit sollte die Charakterisierung als nicht-kompetitive Wirkung in diesem Fall valide sein (Abbildung 29). Um die Effekte von Morphin und Hydromorphon am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor weiter zu charakterisieren, sollten Kinetikmessungen folgen, die den zeitlichen Verlauf der Inhibierung zeigen.

Es war von Interesse zu überprüfen, ob andere Opioid-Analgetika am humanen 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor wirken. Die synthetischen Opioide von der Fentanyl-Gruppe sind im Vergleich zu Morphin noch stärkere Analgetika und weisen ein ähnliches Nebenwirkungsprofil auf (Barash et al., 2001). Fentanyl, Alfentanil, Sufentanil und Remifentanil sind selektive  $\mu$ -Opioid-Rezeptor-Agonisten und haben eine im Vergleich zu Morphin und seinen Derivaten unterschiedliche molekulare Grundstruktur (s. Methoden), die vermutlich für ihre ausgeprägte  $\mu$ -Rezeptor Selektivität und Affinität verantwortlich sind (Kretz et al., 2000).

Bei Konzentrationen weit oberhalb der klinischen (Barash et al., 2001) führten alle Substanzen bis auf Sufentanil zu einer geringfügigen, dennoch signifikanten Unterdrückung der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme (Abbildung 30). Des Weiteren führten Alfentanil, Sufentanil und Remifentanil zur Beschleunigung der Inaktivierungskinetiken, während lediglich Alfentanil die Aktivierungskinetiken beschleunigt hat (Abbildung 31 und Abbildung 32). Eine weitere Charakterisierung dieser Effekte bei noch höheren Konzentrationen war wegen der schlechten Löslichkeit der Substanzen nicht möglich. Gleichartige Befunde sind bei Ganzzellmessungen erhoben worden (nicht publizierte Daten). Somit zeigten die synthetischen Opioide – im Unterschied zu Morphin und Hydromorphon - keinen Effekt am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor bei klinischen Plasmakonzentrationen. Weiterhin haben die Fentanyl-Derivate die Rezeptor-Inaktivierungskinetik beschleunigt und nicht wie die Morphin-Derivate verlangsamt, was für eine Rezeptor-Hemmung spricht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die selektiveren und analgetisch potenteren Substanzen am  $\mu$ -Opioid-Rezeptor eine von den Morphin-Derivaten unterschiedliche Wirkung am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor haben, die wahrscheinlich durch ihre unterschiedliche chemische Struktur bedingt wird.

Da diese Effekte ausschließlich oberhalb klinischer Plasmakonzentrationen auftraten, lässt sich vermuten, dass direkte Effekte (z.B. Potenzierungen) am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor für die Emetogenität dieser Medikamente nicht verantwortlich sind. Damit wäre der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor aber immer noch auch ein empfindliches Ziel für indirekte Effekte (z.B. 5-HT-Ausschüttung), verursacht durch diese Substanzen.

### **Einfluss von Apomorphin auf die 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme durch den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor**

Um auf die Struktur-Wirkungsbeziehung von den emetogenen Substanzen weiterhin einzugehen, wurde die Wirkung von Apomorphin am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor untersucht. Apomorphin ist ein D<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist und wirkt stark emetogen, weswegen es früher klinisch bei Vergiftungen eingesetzt worden ist. Die Substanz weist gewisse strukturelle Ähnlichkeit zu Morphin auf (s. Methoden), hat aber keine Affinität am µ-Rezeptor, wirkt daher nicht analgetisch und Suchtpotenzierend (Estler, 1990).

Apomorphin unterdrückte konzentrationsabhängig und reversibel die 5-HT (30 µM)-induzierten Ströme bei 60 s Vorapplikation (IC<sub>50</sub> = 0,4 µM, Abbildung 34) und hatte keinen signifikanten Effekt auf die Stromkinetiken (Abbildung 35). Interessanterweise – im Unterschied zu all den anderen untersuchten Substanzen – aktivierte Apomorphin (10 und 30 µM) den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, indem es *in Abwesenheit des Rezeptoragonisten (5-HT)* reproduzierbare Ströme auslöste. Die Spezifität dieses Effektes wurde durch Experimente mit dem selektiven 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten Ondansetron sichergestellt, der den Apomorphin-induzierten Einwärtsstrom reversibel hemmte (Abbildung 37). Aktivierung (in Abwesenheit von Serotonin) und Inhibierung (in Anwesenheit von Serotonin) sind keineswegs widersprüchliche Befunde, wenn man annimmt, dass Apomorphin ein schwächerer und nur partieller Agonist im Vergleich zu Serotonin ist. Zusätzlich ist bekannt, dass Agonisten nach längerer Applikation häufig Rezeptoren desensibilisieren (auch ein längerer 5-HT-Puls würde dies verursachen).

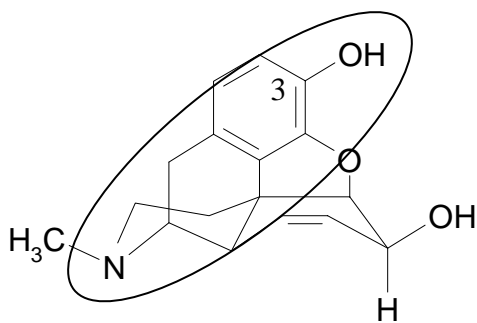
Matsumoto et al. (1996) berichten von einem durch Apomorphin (1-10 µM) ausgelösten konzentrationsabhängigen Serotoninanstieg im Ratten-Hippokampus (Microdialyse-Studie *in vivo*). Ähnliche Befunde werden auch von Balcioglu et al., (2003) berichtet. Apomorphin ist ein D<sub>2</sub>-Rezeptor-Agonist, was seine emetische Wirkung zumindest teilweise erklärt. Dennoch ist es somit zusätzlich möglich, dass direkte und indirekte Mechanismen an 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptoren beteiligt

sind. Das Prinzip, dass eine Substanz mehrere spezifische Angriffspunkte hat, ist nicht unbekannt und wurde vorher schon für Metoclopramid diskutiert, welches neben einem D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonismus auch 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren bei klinischen Konzentrationen hemmt (Walkembach et al., 2005). Allerdings muss betont werden, dass der Effekt von Apomorphin erst weit oberhalb klinischer Plasmakonzentrationen auftrat ( $C_{\max} = 0,06 \text{ nM}$ ; Teclapharm GmgH, Lüneburg, Deutschland, 2003) und somit die klinische Relevanz fraglich ist.

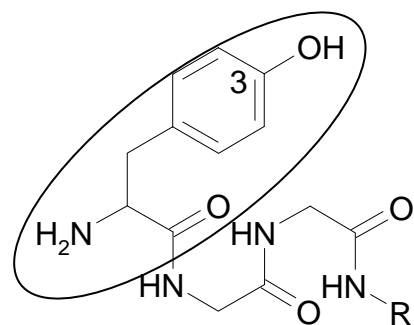
## Einfluss von Endopeptiden auf die 5-HT (30 $\mu$ M)-induzierten Ströme durch den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor

Schließlich wurden Experimente mit endogenen Opioiden - Peptid-artigen Substanzen mit hoher Affinität an Opiatrezeptoren - durchgeführt. Endorphine und Opioide greifen an denselben Rezeptoren an: Endomorphin 2 ist vorwiegend affin zum  $\mu$ -Rezeptor, während Met-Enkephalin aktiv am  $\delta$ -, aber auch am  $\mu$ - und  $\kappa$ -Opioid-Rezeptor ist (Zadina et al., 1997).

Die räumliche Struktur dieser Peptide zeigt Ähnlichkeiten mit Morphin: Die Hydroxylgruppen an dritter Stelle und die Amino-Gruppen im gleichen Abstand lassen eine ähnliche Wirkung vermuten. Es ist allerdings zu beachten, dass Enkephalin (hier nur Teilsequenz des Peptids) insgesamt ein größeres molekulares Volumen besitzt.



Morphin



Teilsequenz von Enkephalinen

**Abbildung 42: Struktureller Vergleich von Morphin mit den Enkephalinen. Man beachte, dass die Hydroxylgruppen in Position 3 und die Amino-Gruppen den gleichen Abstand aufweisen.**



Endomorphin 2 ist ein Tetrapeptid, dem die höchste Affinität und Selektivität für die  $\mu$ -Opiatrezeptoren zugeschrieben wird (Zadina et al., 1997). Es hat im Unterschied zu Morphin und Hydromorphon die Amplitude der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme und die Aktivierungskinetik des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors nicht beeinflusst (Abbildung 40 und Abbildung 41). Das Peptid hat unabhängig von der Applikationsart die Inaktivierungskinetiken – ähnlich zu den synthetischen Opioiden – beschleunigt (Abbildung 40). Somit hemmen die endogenen Opiode den 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor eher, und zeigen nicht wie erwartet – ausgehend von der Strukturähnlichkeit (Abbildung 42) - einen morphinartigen potenzierenden Effekt. Die Endopeptide werden im Plasma durch Endopeptidasen wie z.B. Enkephalinase abgebaut und sind von daher *in vivo* kaum zu bestimmen. Deshalb war es schwierig, Literaturdaten über die Menschenplasmakonzentrationen von Endomorphin 2 zu erheben, weswegen man kaum Aussagen treffen kann, ob der beobachtete Effekt innerhalb Plasmakonzentrationen aufgetreten ist. Es kann jedoch von Tierexperimenten ausgegangen werden, die zeigen, dass nach systemischer (i.v.) Applikation von Endomorphin 2 in Ratten eine analgetische Plasmakonzentration von ca. 900 ng/kg erreicht wird, was ungefähr 1  $\mu$ M entspricht (Czapla et al., 2000).

Met-Enkephalin ist ein Pentapeptid. Im Unterschied zu Endomorphin 2, bindet es nicht ausschließlich am  $\mu$ -sondern auch am  $\delta$ -Opioid-Rezeptor. Die Unterschiede in der Bindungsaffinität und Selektivität der endogenen Opiode könnten verschiedene Mechanismen in ihrer analgetischen Wirkung zur Folge haben. Im Unterschied zu Endomorphin 2 führte Met-Enkephalin zu keiner signifikanten Veränderung sowohl der Amplituden, als auch der Kinetiken der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ströme. Figuerola und Leston. (1996) haben Met-Enkephalin im Zusammenhang mit dem Kopfschmerztyp bei Migränepatienten untersucht und festgestellt, dass die physiologische Plasmakonzentration des Peptids im picomolaren Bereich ( $0,25 \pm 0,01$  pmol/l) liegt, was von anderen Autoren bestätigt wurde (1 pmol/l; Plotnikoff et al., 1997). Demnach kann man davon ausgehen, dass die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit Met-Enkephalin sogar oberhalb der Plasmakonzentrationen keine signifikante Wirkung am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor gezeigt haben.

Die emetische Wirkung der Opiode wird mit ihrer Wirkung am  $\delta$ -und /oder  $\kappa$ -Rezeptor in Verbindung gesetzt (Barnes und Bunce., 1991). Harris (1982) vermutet, dass Enzyme, wie z.B. die Enkephalinase, durch Chemotherapeutika abgebaut werden und dass die Inhibierung des Enkephalin-Abbaus in emetischen Zentren (Area postrema) Emesis und Übelkeit potenzieren

könnte. Darüber hinaus stimulieren die Chemotherapeutika 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren indirekt, indem sie eine Serotoninfreisetzung aus den enterochromaffinen Zellen in der visceralen Mukosa bewirken. Das ist ein Grund, warum diese Substanzen starke Übelkeit und Erbrechen auslösen, welches durch Antagonisierung von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren gehemmt wird (Gandara und Rolia, 1986). Dieses Beispiel zeigt, dass 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren als Vermittler der Emesis durchaus ein indirektes Ziel emetogener Substanzen sein können, selbst wenn diese keinerlei direkte Effekte auf diese Rezeptoren ausüben.

## Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der Charakterisierung modulatorischer Einflüsse von Antimigränemitteln, synthetischen und körpereigenen Opioiden auf 5-HT<sub>3A</sub>-Ionenkanalrezeptoren.

Der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor besitzt pharmakologische Bedeutung hinsichtlich der Therapie von zytostatika-induziertem und postoperativem Erbrechen sowie Schmerz. Da Messungen 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor-vermittelter synaptischer Antworten *in-vivo* schwer durchzuführen sind, ist es sinnvoll, mit Hilfe von *in-vitro* Methoden Erkenntnisse über das serotonerge Transmittersystem zu gewinnen. Eine Möglichkeit, um Liganden-gesteuerte Ionenkanäle *in vitro* elektrophysiologisch zu untersuchen, ist die Kultivierung neuronaler Zellen, die native 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren exprimieren. Vorteilhafter ist die isolierte Betrachtung der funktionellen Rezeptor-Aktivität anhand heterolog exprimierter Rezeptoren. Wir verwendeten als Modell für neuronale 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren den humanen homomeren 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor, welcher in HEK293-Zellen stabil exprimiert wurde. Die elektrophysiologischen Eigenschaften der in diesem Modell erhaltenen 5-HT<sub>3A</sub>-Ionenkanäle und die Wirkung der Pharmaka auf die Kanäle wurden mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik im „outside out“ Modus untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Gruppen von Analgetika untersucht, die auf unterschiedlichen Ebenen Emesis verursachen und möglicherweise mit dem serotoninergen System interagieren. Manche Substanzen haben den Rezeptor innerhalb oder nah dem Bereich der Plasmakonzentrationen beeinflusst, indem sie entweder eine Verstärkung des 5-HT-induzierten Gesamtsignals (Sumatriptan, Morphin, Hydromorphon) oder Rezeptorinhibierung (Morphin, Hydromorphon) gezeigt haben. Um die Struktur-Wirkungsbeziehung dieser Effekte besser zu charakterisieren wurden potentere (synthetische Opioiden) und strukturverwandte endogene Opioiden (Endomorphin und Met-Enkephalin) und Emetika (Apomorphin) an 5-HT<sub>3A</sub>-Kanälen untersucht. Es wurden im Einzelnen die folgenden Effekte beobachtet:

1. Konzentrationsabhängige und reversible Unterdrückung der 5-HT (30 µM)-induzierten Ionenströme (Morphin, Hydromorphon, Apomorphin).

2. Verlangsamung der Aktivierungs- (Morphin, Hydromorphon) und Deaktivierungskinetiken der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ionenströme (Morphin, Hydromorphon, Sumatriptan)
3. Beschleunigung der Aktivierungs- (Alfentanil ) und der Inaktivierungskinetiken der 5-HT (30  $\mu$ M)-induzierten Ionenströme (DHE, Alfentanil, Sufentanil, Remifentanil und Endomorphin 2)
4. Aktivierung des 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptors durch Apomorphin (10 und 30  $\mu$ M) in Abwesenheit des Agonisten (5-HT).

Der Vergleich der Ergebnisse mit den jeweiligen klinischen Wirkspiegeln zeigt, dass emetogene Substanzen entweder den Serotonin-Effekt am 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptor potenzieren (z.B. durch Inaktivierungsverlangsamung wie bei Morphin, Sumatriptan, Hydromorphon) oder aber diesen Rezeptor bei klinischen Konzentrationen eher unbeeinflusst lassen (synthetische Opioide). Letztere Möglichkeit ist erklärbar durch indirekte Mechanismen, die womöglich 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren einbeziehen oder durch Mechanismen über nicht-serotonerge Bahnen. Die hier beschriebenen Beobachtungen legen die Vermutung nahe, dass Effekte dieser Medikamente eine Rolle bei der 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor-vermittelten Schmerz- und Emesismodulation spielen können. Die vorgestellten Ergebnisse bestätigen nochmals, dass die Vielzahl an 5-HT-Rezeptoren bzw. Rezeptorsubtypen und ihre weite Verbreitung im Organismus ein äußerst komplexes Wirkungsgeschehen bedingt.

Da Unterschiede zwischen den Wirkungen der Medikamente *in vitro* und *in vivo* verschiedene Ausprägungen von (Neben-)Wirkungen erklären könnten, ist es schwierig, die Vielzahl der Effekte am 5-HT<sub>3A</sub>-Rezeptor an unterschiedlichen Rezeptor-Systemen mit einer Methode zu erfassen. Trotzdem deuten die beobachteten Effekte an, dass die analgetische und die emetogene Wirkung durch gezielte Synthese neuer Opioide pharmakologisch separierbar sein könnte.

## Literaturverzeichnis

Andrews PLR, Davis CJ. The mechanism of emesis induced by anti-cancer therapies. In Emesis in Anti-cancer Therapy. Mechanisms and Treatment. London:Chapman & Hall, 1993

Bachy M. SR 57227: a potent and selective agonist at central and peripheral 5-HT<sub>3</sub> receptors in vitro and in vivo. Eur J Pharmacol 1993; 237: 299-305

Baird AW, Cuthbert AW. Neuronal involvement in type 1 hypersensitivity reactions in gut epithelia. Br J Pharmacol 1987; 92:647-655

Balcioglu A., Zhang K., Tarazi FI. Dopamine depletion abolishes apomorphine- and amphetamine-induced increases in extracellular serotonin levels in the striatum of conscious rats: a microdialysis study. Neuroscience 2003; 119:1045-1053.

Barann M, Göthert M, Bönisch H, Dybek A, Urban BW. 5-HT<sub>3</sub> receptors in outside-out patches of N1E-115 neuroblastoma cells: basic properties and effects of pentobarbital. Neuropharmacology 1997;36:655-664

Barann M, Friederich P, Retzmann K, Dybek A, Urban BW. Loss of propofol during In-Vitro experiments. Anesthesiology 2000a; 93:310-311

Barann M, Meder W, Dorner Z, Bruss M, Bönisch H, Göthert M, Urban BW. Recombinant human 5-HT<sub>3A</sub> receptors in outside-out patches of HEK 293 cells: basic properties and barbiturate effects. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2000b;362:255-265

Barann M, Molderings G, Bruss M. Direct inhibition by cannabinoids of human 5-HT<sub>3A</sub> receptors: probable involvement of an allosteric modulatory site. *Br J Pharmacol* 2002; 137:589-596

Barann M, Urban B, Stamer U, Dorner Z, Bonisch H, Bruss M. Effects of tramadol and O-demethyl-tramadol on human 5-HT reuptake carriers and human 5-HT<sub>3A</sub> receptors: a possible mechanism for tramadol-induced early emesis. *Eur J Pharmacol.* 2006; 15:531:54-58

Barash P, Cullen B, Stoeling R, Handbook of clinical anethesia. Philadelphia-Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins, 2001

Barnes NM., Bunce KT. The actions of Fentanyl to inhibit drug induced emesis. *Neuropharmacol* 1991; 30:1073-1083

Barnes NM., Sharp T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacol* 1999; 38:1083-1152

Beleslin DB., Krstic K., Stcfnnovic-Denic K., Strbac M. Micic D. Inhibition of morphine and morphine-like drugs of nicotine induced emesis in cats. *Brain Res Bull* 1981; 6:451-453

Bertin L, Brion N, Farkkila M, Gobel H, Wessely P A dose-defining study of sumatriptan suppositories in the acute treatment of migraine. *Int J Clin Pract* 1999; 53:593–598

Blancquact J.-P., Lefebvre RA, Willems JL. Emetic and antiemetic effects of opioids in the dog. *Eur J Pharmacol* 1986; 128: 143-150

Boyd ND. Two distinct kinetic phases of desensitization of acetylcholine receptors of clonal rat PC 12 cells. *J Physiol* 1987; 389: 45-67

Boureau F, Kappos L, Schoenen J, Esperanca P, Ashford E (2000) A clinical comparison of sumatriptan nasal spray and dihydroergotamine nasal spray in the acute treatment of migraine. *Int J Clin Pract* 2000; 54:281–286

Bradley PB, Engel G, Feniuk W, Fozard JR, Humphrey PP, Middlemiss DN, Mylecharane EJ, Richardson BP, Saxena PR. Proposals for the classification and nomenclature of functional receptors for 5-hydroxytryptamine. *Neuropharmacology* 1986; 25:563-576

Broekkamp CLE, Phillips AG, Stimulant effects of enkephalin microinjection into the dopaminergic A10 area. *Nature* 1978; 278:560-562

Brown M, Petrik M. Evaluation of the cell line 293 for virus isolation in routine viral diagnosis. *Clin Microbiol* 1986; 23: 704-708

Bruss M, Barann M, Hayer-Zillgen M, Eucker T, Gothert M, Bonisch H. Modified 5-HT<sub>3A</sub> receptor function by co-expression of alternatively spliced human 5-HT<sub>3A</sub> receptor isoforms. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 362:392-401

Butler A, Elswood CJ. The pharmacological characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors in three isolated preparations derived from guinea-pig tissues. *Br J Pharmacol* 1990; 101: 591-598

Buzzi MG, Moskowitz MA. The pathophysiology of migraine: year 2005. *J Headache Pain* 2005; 3:105-111.

Carlsson A. Pharmacology of synaptic monoamine transmission. *Prog Brain Res* 1969; 31:53-59.

Chen C, Okayama H. High-efficacy transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol Cell Biol* 1987; 7:2745-2752

Costall B, Naylor RJ. 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2004; 3:27-37

Costello DJ, Borison HL. Naloxone antagonises narcotic self-blockade of emesis in the cat. *J Pharmacol Exp Ther* 1977; 203:222-230

Czapla MA, Gozal D, Alea OA, Beckerman RC, Zadina JE. Differential Cardiorespiratory Effects of Endomorphin 1, Endomorphin 2, DAMGO and Morphine. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 162: 994-999

Davies PA, Pistis M, Hanna MC, Peters JA, Lambert JJ, Hales TG, Kirkness EF. The 5-HT<sub>3B</sub> subunit is a major determinant of serotonin-receptor function. *Nature* 1999; 397:359–363

Estler CJ *Lehrbuch der allgemeinen und systematischen Pharmakologie und Toxikologie* Stuttgart - New York: 1990

Fan P. Nonopioid mechanism of morphine modulation of the activation of 5-hydroxytryptaminetype 3 receptors. *Mol Pharmacol* 1995;47:491-495

Fastier FN, McDowal MA. Pharmacological properties of phenylbiguanide and other amidine derivates in relation to those of 5-hydroxytryptamine. *Br J Pharmacol Chem* 1959; 14:527-535

Fidan I, Yuksel S, Ymir T, Irkec C, Aksakal FN The importance of cytokines, chemokines and nitric oxide in pathophysiology of migraine. *J Neuroimmunol* 2006; 171:184-188



Figuerola ML, Leston J. Plasma met-enkephalin levels: its relationship with age and type of headache. *Arch Ger* 1996; 22: 137-143

Foss JF, Yuan CS, Roizen MF, Goldberg LI. Prevention of apomorphine- or cisplatin-induced emesis in the dog by a combination of methylnaltrexone and morphine. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 42:287-291

Fowler PA, Lacey LF, Thomas M, Keene ON, Tanner RJ, Baber NS. The clinical pharmacology, pharmacokinetics and metabolism of sumatriptan. *Eur Neurol* 1991;31:291-294

Fozard JR, Ali AT. Receptors for 5-hydroxytryptamine on the sympathetic nerves of the rabbit heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1978; 301:223-235

Fozard JR, Mobarok-Ali AT. Blokade of neuronal tryptamine receptors by metoclopramide. *Eur J Pharmacol* 1978; 49:109-112

Fozard JR. Differences between receptors for 5-hydroxytryptamine on autonomic neurones revealed by Nor (-) cocaine. *J Auton Pharmacol* 1983; 3:21-26

Gaddum JH, Picarelli ZP. Two kinds of tryptamine receptor. *Br J Pharmacol Chemother* 1957; 12:323-328

Gandara DR, Rolia F. Consensus proposal for 5-HT<sub>3</sub>-antagonists in the prevention of acute emesis related to highly emetogenic chemotherapy. Dose, schedule and route of administration. *Supportive Care Cancer* 1986; 9:237-243

Goldman ME, Keabian JW. Aporphine enantiomers. Interactions with D-1 and D-2 dopamine receptors. *Mol. Pharmacol* 1984; 25: 18

Göthert M. 5-Hydroxytryptamine receptors. An example for the complexity of chemical transmission of information. *Arzneimittelforschung* 1992; 42:238-46

Graham FL, Smiley J. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36: 59-74

Hamill OP, Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.: Improved patch-clamp techniques for high resolution current recordings from cells and cell-free membrane patches. *Pflüger Arch* 1981; 391: 85-100

Harris AL. Cytotoxic-therapy-induced vomiting is mediated via enkephalin pathways. *Lancet*. 1982; 1:714-716

Hoyer D, Clarke DE, Fozard JR, Hartig PR, Martin GR, Mylecharane EJ, Saxena PR, Humphrey PP. International union of pharmacology classification of receptors for 5-Hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacol Rev* 1994; 46:157-203

Huganir RL, Delcour AH, Greengard P, Hess GP. Phosphorylation of the nicotinic acetylcholine receptor regulates its rate of desensitization. *Nature* 1986; 321: 774-776

Jensen R. Central and peripheral mechanisms in migraine: a neurophysiological approach. *Funct Neurol*. 2000; 15 Suppl 3:63-67

Jones MV, Westbrook GL. The impact of receptor desensitization on the fast synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 1996; 19:96-101

Kawamata T, Omote K, Toriyabe M. Intracerebroventricular morphine produces antinociception by evoking gamma-aminobutyric acid release through activation of 5-hydroxytryptamine 3 receptors in the spinal cord. *Anesthesiology* 2002; 96:1175-1182

Kilpatrick GJ, Butler A. 1-(m-Chlorophenyl)-biguanide, a potent high affinity 5-HT<sub>3</sub> receptor agonist. *Eur J Pharmacol* 1990; 182:193-197

Kosterlitz HW, Hughes J. Some thoughts on the significance of enkephalin, the endogenous ligand. *Life Sci* 1975; 17:91-96

Kretz FJ, Schäffer J, Stiebel H-W. *Anästhesie Intensiv Medizin Notfallmedizin Schmerztherapie* Berlin Heidelberg New York: Springer, 2000

Lansdown MJR, Nash, HL. Antagonism of 5-hydroxytryptamine receptors by quipazine. *Br J Pharmacol* 1980; 68:525-532

Langevin S, Lessard MR, Trepanier CA, Baribault JP. Alfentanil causes less postoperative nausea and vomiting than equipotent doses of fentanyl or sufentanil in outpatients. *Anesthesiology* 1999; 91:1666-1673

Leslie RA, Gwyn DG. Neuronal connections of the area postrema. *Fed Proc.* 1984; 43:2941-2943

Lindena G, Arnau H. Hydromorphon-pharmakologische Eigenschaften und therapeutische Wirksamkeit. *Schmerz* 1998; 12:195-204

Malone HM, Peters JA. Physiological and pharmacological properties of 5-HT<sub>3</sub> receptors-a patch clamp-study. *Neuropeptides* 1991; 19:25-30

Maricq AV, Peterson A. Primary structure and functional expression of the 5-HT<sub>3</sub> receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science* 1991; 254:432-437

Marcus DA. Serotonin and its role in headache pathogenesis and treatment. *Clin J Pain* 1993; 9:159-167

Matsumoto M, Yoschioka M, Togaschi H. Functional regulation by dopamine receptors of serotonin release from the rat hippocampus: in vivo microdialysis study. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1996; 353:621-629.

Mawe GM, Branchek TA, Gershon MD. Peripheral neural serotonin receptors: identification and characterization with specific agonists and antagonists. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83:9799-9803

Minami M, Endo T, Hirafuji M, Hamaue N, Liu Y, Hiroshige T, Nemoto M, Saito H, Yoshioka M. Pharmacological aspects of anticancer drug-induced emesis with emphasis on serotonin release and vagal nerve activity. *Pharmacol Ther* 2003; 99:149-165

Moller-Schweinitzer E, Rosenthaler J. Dihydroergotamine: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and mechanism of vasoconstrictor action in beagle dogs. *J Cardiovasc Pharmacol* 1987; 9:686-693

Peters JA, Malone HM. Recent advances in the electrophysiological characterization of 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Tr Pharmacol Sci* 1992; 13:391-397

Plotnikoff NP, Faith RE, Murgu AJ, Herberman RB, Good RA. Metionine Enkephalin: A new Cytokine- human studies. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997; 82:93-101

Pratt GD, Bowery NG, Kilpatrik GJ. Consensus meeting agrees distribution of 5-HT<sub>3</sub> receptors in mammalian Hidbrain. *Tr Pharmacol Sci* 1990; 11:135-137

Richardson BP Serotonin and nociception. *Ann N Y Acad Sci* 1990; 600:511-519

Richardson BP, Engel G. Identification of serotonin M-receptor subtypes and their specific blockade by a new class of drugs. *Nature* 1985; 316:126-131

Schwarzberg MN (1994) Application of metoclopramide specificity in migraine attacks therapy. *Headache* 1994; 34:439–441

Silberstein S, Douglas C. Ergotamine and Dihydroergotamine: history, pharmacology and Efficacy. *Headache* 2003; 43: 144-151

Suzuki Y, Taguchi K. In vivo voltammetric studies of the effect of morphine on the serotonergic system in the cat spinal cord. *Brain Res* 1986; 398:413-418

Yaksh TL, Tyce GM. Microinjection of morphine into the periaqueductal gray evokes the release of serotonin from spinal cord. *Brain Res* 1979; 171:176–181

Walkembach J, Bruss M, Urban BW, Barann M. Interactions of metoclopramide and ergotamine with human 5-HT<sub>3A</sub> receptors and human 5-HT reuptake carriers. *Br J Pharmacol* 2005; 146:1156

Wallis DI. Interaction of 5-Hydroxytryptamine with autonomic und sensory neurons. In: Wallis DI, Fozard, JR. The peripheral Actions of 5-Hydroxytryptamine, Oxford: Oxford University Press, 1989: 220-246

Wittmann M, Peters I, Schaaf T, Wartenberg HC, Wirz S, Nadstawek, Urban BW, Barann M. Effects of morphine on human 5-HT<sub>3A</sub> receptors. *Anesth Analg.* 2006;103:747-752

Wu HE, Sun HS, Darpolar M, Leitermann RJ, Kampine JP, Tseng LF. Dynorphinergic mechanism mediating Endomorphin 2-induced analgesia in the mouse spinal cord *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 307:1135-1141

Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ. A potent and selektive endogenous agonist fort he mu-opiate receptor. *Nature* 1997; 386, 499-502

**Publikationen**

Barann M, Bruess M, Brinkmann M, Linden I, Lyutenska M, Schneider M, Walkembach J, Wittmann M. 5-HT<sub>3</sub> receptors and emesis. *Pharmacological Reports* 2006; 58:253-255

## **Danksagung**

Herrn PD Dr. Barann danke ich für Überlassung der Arbeit, für die vorbildliche Betreuung, tatkräftige Unterstützung und wissenschaftliche Förderung.

Herrn Prof. Dr. Urban danke ich für seine offene Art, freundliche Beratung und exzellente wissenschaftliche Betreuung.

Frau Dorner gilt mein Dank für die stete Bereitschaft zur Hilfe, für ihre Geduld und Unterstützung.

Frau v.d. Busshe danke ich für die perfekte Handhabung der Zellkulturtechniken.

Frau Linden, Frau Brinkmann, Herrn Walkenbach und Herrn Schaaf danke ich für die konstruktiven Ratschläge während der Experimente.

Frau Dr. Tamara Werner und Frau Dorner danke ich für das Korrekturlesen.

Ein großer Dank gilt vor allem meiner Familie für Ihre stetige Unterstützung.