

**AUS DEM UNIVERSITÄTSKLINIKUM MÜNSTER**

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hugo von Aken, FRCA, FANZA-

**Hemmung humaner NMDA-Rezeptoren durch  
Metamizol und dessen Metabolit 4-  
Aminoantipyrin**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Larissa Khodai

Teheran/Iran

2008

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. Klaus Hahnenkamp
2. Berichterstatter: Priv.- Doz. Dr. med. B. Kahl

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin  
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Hugo von Aken, FRCA, FANZCA-

Referent: Priv.- Doz. Dr. med. Klaus Hahnenkamp  
Koreferent: Priv.- Doz. Dr. med. B. Kahl

## Zusammenfassung

### Hemmung humaner NMDA-Rezeptoren durch Metamizol und dessen Metabolit 4-Aminoantipyrin

Khodai, Larissa

**Einleitung:** Obwohl die Peripherie und das zentrale Nervensystem als Wirkorte des Metamizols gesichert sind, ist der molekulare Wirkmechanismus bis heute nicht eindeutig geklärt. Basierend auf dem Wissen, dass NMDA-Rezeptoren in pathologischen Schmerzprozessen wie zentraler Sensibilisierung und Hyperalgesie entscheidend sind, wird hier die Hypothese untersucht, ob Metamizol über eine Hemmung des NMDA Rezeptorkanals wirkt und welchen Einfluss dessen Metabolite haben.

**Methode:** Nach Genehmigung der Experimente durch die Bezirksregierung Münster am 06.06.2000 mit dem Aktenzeichen tierexp. 23.0835.2.0 (A 40/2000) wurden humane NMDA-Rezeptoren des Subtyps NR1/NR2A in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Dazu wird in-vitro die Messenger-RNA, kodierend für NMDA-Rezeptoren, präpariert und vermehrt. Anschließend erfolgt die Injektion in Oozyten. Nach 48stündiger Inkubationszeit werden die an der Zelloberfläche exprimierten NMDA-Rezeptoren mittels Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik untersucht. Hierbei wird der durch Metamizol und seine Metaboliten veränderte Ionenstrom über die gesamte Zellmembran gemessen.

**Ergebnisse:** Native, defollikulierte Zellen zeigen keine Reaktion auf die physiologischen Agonisten Glutamat und Glyzin. Messenger-RNA injizierte Zellen reagieren auf Glutamat/Glyzin-Zugabe mit einer NMDA-Rezeptor-Aktivierung, wodurch ein Ioneneinwärtsstrom entsteht. Eine 10 minütige Inkubation in Metamizol führt zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung durch Metamizol. Der Metabolit 4-Aminoantipyrin inhibiert die Antwort auf die Glutamat/Glyzin. 4-Methylaminoantipyrin zeigt keine inhibierende Wirkung.

**Diskussion:** Metamizol hemmt die Glutamat/Glyzin induzierten Ionenströme von in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten humanen NR1/2A NMDA-Rezeptorkanälen. Der Metabolit 4-Aminoantipyrin hemmt diese Rezeptoren ebenso. Dies bietet eine weitere Erklärung für die stark analgetische Wirkung des Metamizols und leistet einen Beitrag zur Identifikation der molekularen Wirkmechanismen des Metamizols. Es könnten sich weitere Ansatzpunkte für die Behandlung und Vorbeugung von pathologischen Schmerzprozessen wie zentraler Sensibilisierung und Hyperalgesie ergeben.

Tag der mündlichen Prüfung: 29.05.2008



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2. METHODIK.....</b>	<b>3</b>
2.1 XENOPUS LAEVIS .....	3
2.1.1 HALTUNG.....	4
2.1.2 OOZYTEN-GEWINNUNG .....	4
2.1.3 GESTALT UND AUFBAU DES OOZYTEN.....	5
2.1.4 DEFOLLIKULIERUNG .....	6
2.2 NMDA-REZEPTOR-EXPRESSION.....	7
2.2.1 RNA-HERSTELLUNG.....	7
2.2.2 MIKROINJEKTION .....	8
2.3 ZWEI-ELEKTRODEN-VOLTAGE-CLAMP-TECHNIK.....	10
2.3.1 VORBEREITUNG DER GLASKAPILLAREN .....	10
2.3.2 APPARATUR-AUFBAU.....	10
2.3.3 ZWEI-ELEKTRODEN-VOLTAGE-CLAMP-TECHNIK.....	11
2.3.4 MESSPROTOKOLLE .....	12
2.4 STATISTIK.....	12
2.4.1 T-TEST.....	13
2.4.2 KRUSTAL-WALLIS-TEST .....	13
2.4.3 DESKRIPTIVE STATISTIK.....	13
2.5 HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN.....	14
2.5.1 CALCIUMFREIE-TYRODES-LÖSUNG .....	14
2.5.2 MODIFIED BARTH SOLUTION, ND 96 .....	15
2.5.3 OOCYTES-RINGER-SOLUTION, OR-2 .....	16
2.5.4 GLUTAMAT UND GLYZIN .....	16
2.5.5 METAMIZOL UND DESSEN MATABOLITEN 4- AMINOANTIPYRIN UND 4-METHYLAMINOANTIPYRIN .....	17

<b>3. ERGEBNISSE.....</b>	<b>17</b>
3.1 NATIVE OOZYTEN .....	18
3.2 DIE MIT NMDA-REZEPTOR-RNA INJIZIERTE ZELLEN: KONTROLLZELLEN.....	18
3.3 METAMIZOL HEMMT DIE NMDA-REZEPTORFUNKTION KONZENTRATIONSABHÄNGIG.....	20
3.4 DER METABOLIT 4-AMINOANTIPYRIN HEMMT DIE NMDA- REZEPTORFUNKTION .....	21
3.5 DER METABOLIT 4-METHYLAMINOANTIPYRIN HEMMT DIE NMDA- REZEPTORFUNKTION NICHT .....	21
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>23</b>
4.1 MODELLEVALUATION .....	23
4.1.1 VORTEILE DES XENOPUS LAEVIS MODELLS .....	23
4.1.2 NACHTEILE DES XENOPUS LAEVIS MODELLS.....	24
4.1.3 FEHLERQUELLEN DES XENOPUS LAEVIS MODELLS .....	25
4.1.4 KLINISCHE RELEVANZ DER KONZENTRATIONEN.....	29
4.2 METAMIZOL UND DESSEN METABOLITE.....	29
4.2.1 PHARMAKOKINETIK .....	29
4.2.2 PHARMAKODYNAMIK.....	31
4.2.3 NEBENWIRKUNGEN .....	32
4.3 NMDA-REZEPTOR IM MENSCHLICHEN KÖRPER .....	33
4.3.1 AUFBAU UND KINETIK.....	33
4.3.2 ROLLE IN NOZIZEPTION UND ANDEREN VORGÄNGEN.....	36
4.3.3 VORKOMMEN UND ZUSAMMENSTELLUNG .....	38

4.4	METAMIZOL IN DER SCHMERZTHERAPIE.....	38
4.4.1	INTERAKTION ZWISCHEN OPIATEN UND METAMIZOL.....	38
4.4.2	EINFLUSS AUF DIE ZENTRALE SENSIBILISIERUNG.....	39
4.4.3	ZUKÜNFTIGE STUDIEN.....	40
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>40</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>42</b>
<b>7.</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>50</b>
<b>8.</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>51</b>

## **ANHANG**

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	i
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	iii
GENEHMIGUNG DER BEZIRKSREGIERUNG MÜNSTER.....	v



# 1. EINLEITUNG

Metamizol wurde 1922 von der Firma Höchst unter dem Handelsnamen Novalgin® auf den deutschen Arzneimittelmarkt eingeführt. Es wird synthetisch hergestellt und gehört zu der Gruppe der Pyrazolinone. Seit 1987 ist Metamizol verschreibungspflichtig und in Kombinationspräparaten in Deutschland verboten [85]. Unter den Nicht-Opioid Analgetika hat Metamizol die höchste analgetische Potenz. Eine intravenöse Dosis von 2,5g Metamizol ist vergleichbar mit einer analogen Dosis von 50mg Pethidin. Die gleiche Dosis Metamizol hat eine höhere analgetische Wirksamkeit als 1000mg Paracetamol oral [12].

Das Wirkungsprofil von Metamizol ist einzigartig. Neben der analgetischen, antipyretischen und geringfügig antiphlogistischen Wirkung ist die spasmolytische Eigenschaft der Substanz besonders hervorzuheben [13]. Diese Effekte erweitern den Indikationsbereich. Zu den Anwendungsgebieten gehören akute Schmerzen, chronische Schmerzen und Tumorschmerzen [61]. Die kombinierte spasmolytische und analgetische Wirkung ist bei Koliken der Gallen- und ableitenden Harnwegen sehr effektiv [12]. Seit 85 Jahren wird die Wirksamkeit des Metamizols im klinischen Alltag geschätzt, ohne die genauen für sie verantwortlichen Wirkmechanismen zu kennen. Es ist bekannt, dass Metamizol sowohl auf peripherer Ebene als auch auf zentral-nervöser Ebene wirkt [12;6]. Viele Erkenntnisse über die molekularen Wirkmechanismen des Metamizols sind in den letzten Jahren gewonnen worden, aber eine endgültige Klärung konnte bisher nicht erzielt werden. Die Einzigartigkeit des Metamizols beschränkt sich nicht nur auf das Wirkungsprofil: das Auftreten einer Agranulozytose als Nebenwirkung ist der Grund für eine vorsichtige Indikationsstellung bei Verwendung dieser Substanz.

Metamizol ist eine pro-drug, dessen aktive Metaboliten das 4-Aminoantipyrin und 4-Methylaminoantipyrin sind [61]. Diese Untersuchung leistet einen weiteren Beitrag zur Klärung molekularer Wirkmechanismen des Metamizols. Vor dem Hintergrund, dass der NMDA-Rezeptor eine gewichtige Rolle in Schmerzprozessen wie Hyperalgesie und zentraler Sensibilisierung hat, werden folgende Fragen gestellt:

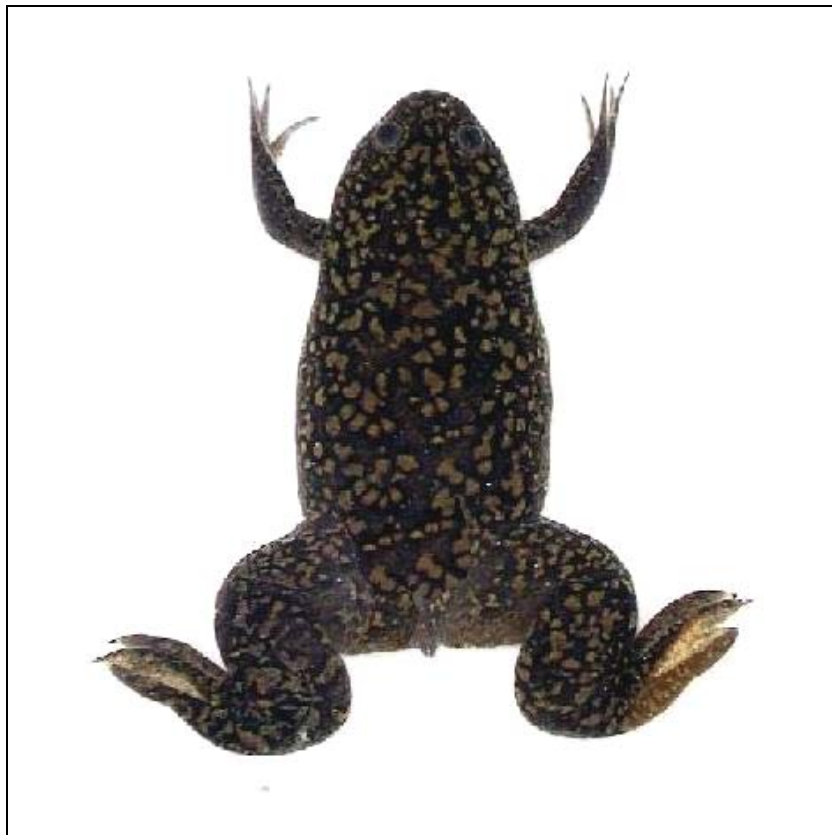
1. Wie wirkt Metamizol auf den aus NR1- und NR2A-Untereinheiten bestehenden NMDA-Rezeptor?
2. Wie wirken die aktiven Metaboliten 4-Aminoantipyrin und 4-Methylantipyrin auf den aus NR1- und NR2A-Untereinheiten bestehenden NMDA-Rezeptor?

## 2. METHODIK

Für die wissenschaftliche Arbeit und die Experimente liegt die Genehmigung der Bezirksregierung Münster mit der Referenznummer A 40/2000 vor.

### 2.1 *XENOPUS LAEVIS*

*Xenopus laevis*, aus der Gattung der Krallenfrösche, gehört zur Familie der Pipidae. Das *Xenopus-laevis*-Expressions-Modell ist ein bewährtes Verfahren in der medizinischen Forschung. Verwendung finden die Weibchen und deren Oozyten. Nach Mikroinjektion von DNA oder mRNA exprimieren die Oozyten auf der Zellmembran Proteine [4], deren Funktion mit der elektrophysiologischen Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Messtechnik quantifiziert werden kann. Auf diese Weise können unter anderem Neurotransmitter, Rezeptoren und Ionenkanäle erforscht werden.



**Abbildung 1:** *Xenopus laevis*, Weibchen

### **2.1.1 HALTUNG**

Die für diese Arbeit benötigten Oozyten stammen von weiblichen Krallenfröschen, die über die Firma Kähler (22453 Hamburg, Deutschland) bezogen werden. Die Krallenfrösche leben in einer Kolonie von 6-8 Exemplaren in einem Hartkunststoff-Becken mit einem Volumen von 250l in einem ruhigen Raum. Ein durchsichtiger Deckel bedeckt das Becken. Um ein Tag- und Nacht-Rhythmus von 12 Stunden zu gewährleisten, wird eine Leuchtröhre (Typ Multilux, Juwel Aquarium GmbH; 27356 Rotenburg/Wümme, Deutschland) angebracht, die an eine Zeitschaltuhr (Typ 46402, Unitec; 63450 Hanau, Deutschland) angekoppelt ist.

Bei der Wasseraufbereitung wird in einem Tank Wasser aus der öffentlichen Wasserversorgung für 48 Stunden stehen gelassen. Durch das Stehen lassen flüchtet das Chlor in Form von Gas. Dieser Schritt ist besonders wichtig, da die Frösche gegenüber Chlor sehr empfindlich sind. Als nächstes erfolgt die chemische Aufbereitung durch das Hinzufügen eines chemischen Zusatzes (Aqua-Safe, Tetra GmbH; 43904 Melle, Deutschland). Um einen wöchentlichen Wasserwechsel zu vermeiden, ist ein Ionenaustauscher (Klarafilter 77SN, Cillit; 69191 S73779 Schriesheim, Deutschland) angebracht. Ein zusätzlicher Außenfilter (Typ 2224, Eheim GmbH; Deizisau, Deutschland) sorgt für eine ständige Zirkulation und zusätzliche Reinigung des Beckenwassers.

Die Fütterung der Tiere erfolgt 2 Mal wöchentlich mit Spezialfutter für *Xenopus laevis* (Firma Kähler; 22453 Hamburg, Deutschland). Die Fütterung richtet sich nach der Zahl und Sättigung der Frösche. Nach vier Stunden wird das übrig gebliebene Futter eingesammelt, um eine zusätzliche Verunreinigung des Beckenwassers zu vermeiden.

### **2.1.2 Oozyten-Gewinnung**

Um die Follikelreifung der Frösche zu beschleunigen und den Ertrag zu erhöhen, wird zwei Wochen vor der ersten Operation den Fröschen das Hormon Gonadotropin (Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH; 30926 Seelze, Deutschland) injiziert.

Zur Narkotisierung und anschließender Oozytengewinnung wird ein Frosch in einen kleinen Tank mit 0,2% 3-Aminobenzoat-Methyl-Ester gesetzt. Das Narkotikum wirkt über die Schleimhäute. Nach 20 Minuten testet man die Schmerzempfindlichkeit mittels

Zehkneifen. Sobald der Frosch schmerzunempfindlich und bewegungslos ist, wird er auf eine Platte mit zerstoßenem Eis gelegt. Die Kälte fördert die Narkose. Der Schnitt erfolgt im unteren Abdomen rechts- oder linksseitig. Dabei werden die Haut und die oberflächlichen Muskeln durchtrennt. Erst nach der Präparation des Peritoneums wird dieses ebenfalls eröffnet. Ein Teil des Ovarialgewebes wird vorsichtig herausgezogen und ein Lappen bestehend aus 200-300 Oozyten entnommen. Nach der Entnahme wird das Ovarialgewebe zurückgelagert. Nun erfolgt die Naht des Peritoneums und der Haut; jeweils einzeln mit resorbierbarem Faden (Vicryl 4-0, Ehticon GmbH; 22851 Nordstedt, Deutschland) in Einzelknopfnah. Der operierte Frosch wird in einem separaten Tank mit frisch zubereitetem Beckenwasser für 2-3 Stunden zum Aufwachen gesetzt. Sobald der Frosch seine volle Beweglichkeit zurück erlangt hat, wird es in das große Becken zu seinen Artgenossen gesetzt.

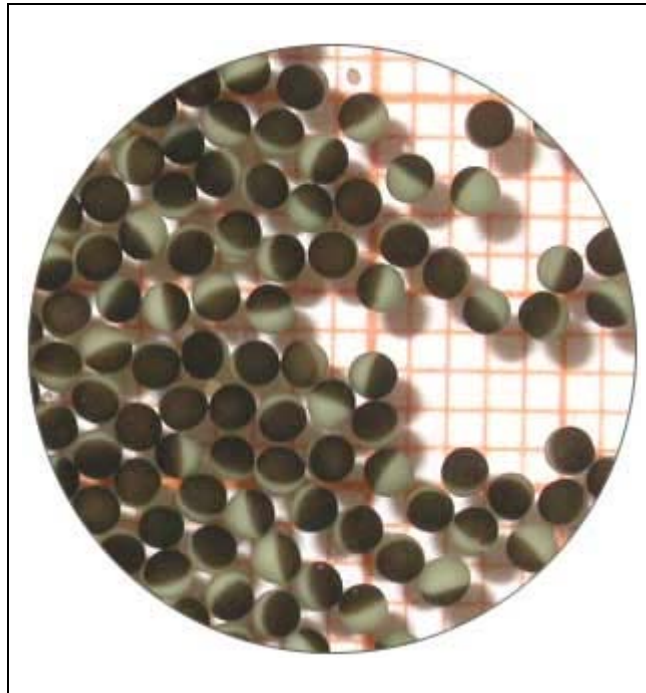
### ***2.1.3 GESTALT UND AUFBAU DES OOZYTEN***

Die Stadieneinteilung der Oozyten erfolgt nach Dumont [31], wobei zwischen Stadium I bis VI unterschieden wird. Die für diese Arbeit verwendeten Oozyten befinden sich in Stadium V und VI nach Dumont. In diesem Stadium sind die Zellen in ihren Durchmesser 1mm bis 1,3mm groß. Ein unipigmentiertes Äquatorialband teilt die Zelle in einen dunklen (animalischen) und in einen hellen (vegetativen) Pol. Diese Polarisierung spielt eine wichtige Rolle für die Entwicklung des Frosches nach der Befruchtung [23]. Die dunkle Farbe des animalischen Pols ergibt sich durch das Vorkommen von Melanin gefüllten Granula in diesem Bereich.

Die Organellenverteilung unterscheidet sich in den Polen. So befinden sich der Nucleus und das endoplasmatische Retikulum im dunklen Pol und die Ribosomen im hellen Pol [100]. Die Injektion von mRNA erfolgt in den hellen Pol.

Mehrere Hüllen umgeben den Oozyten. Von innen nach außen aufgelistet: Plasmamembran, Vitellinmembran, Follikelzellschicht, Theka und schließlich einschichtiges Plattenepithel [32]. Die Theka ist durch das in ihr vorkommenden Kollagenfasern, Blutgefäße, Nerven und glatten Muskulatur gekennzeichnet. Die Follikelzellen und der Oozyt sind durch Gap-Junctions miteinander verbunden und enthalten Kalium-Kanäle [71;72]. Diese Kanäle können die elektrophysiologischen

Messungen beeinflussen. Die Vitellinmembran ist azellulär und fibrös. Um möglichst genau Ergebnisse mit der Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik liefern zu können, werden alle Schichten bis auf die Vitellinmembran mittels Defollikulierung vollständig entfernt.



**Abbildung 2:** Defollikulierte Oozyten

#### **2.1.4 DEFOLLIKULIERUNG**

Die Defollikulierung der Oozyten kann mechanisch, enzymatisch oder kombiniert durchgeführt werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Oozyten werden zum Teil enzymatisch und zum Teil mechanisch defollikuliert. Dadurch wird eine besonders schonende Defollikulierung erzielt. Zuerst wird der Follikelstrang mit einer Pinzette in Zellhaufen von 20-30 Zellen getrennt. Die Oozyten legt man in eine Petrischale, gefüllt mit 20ml OR-2-Lösung und dem Enzym Collagenase (Clostridiopeptidase A, EC 3.4.24.3 von Clostridium histolyticum, Boehringer Mannheim GmbH; 68289 Mannheim, Deutschland) in einer Konzentration von 1mg/ml. Diese Petrischale wird auf ein IKA-Schüttler (Modell MTS4; IKA-Werke, 79219 Staufen, Deutschland) für 1 bis 1,5

Stunden gelegt. Mittels einer Stereolupe (Stereo-Zoom 4, Leica Microsystem GmbH; 64625 Bernsheim, Deutschland) wird die enzymatische Defollikulierung mehrmals kontrolliert, bis die Zellhaufen in einzelnen Zellen gelöst sind und alle Zellhüllen bis auf Follikelhaut enzymatisch entfernt sind. Die Follikelhaut erkennt man an einem gräulich-weißlichen Schimmer und an den feinen Blutgefäßen, die in ihr verlaufen. Zu diesem Zeitpunkt werden die Zellen in ein Becherglas mit OR-2-Lösung hinein pipettiert und mit einer OR-2-Lösung mehrmals gespült. Nach jedem Spülvorgang wird der detritushaltige Anteil abgossen. Die Wiederholung des Spülvorganges stoppt die Kollagenasewirkung. Unter der Stereolupe erfolgt nun der mechanische Teil der Defollikulierung. Dabei wird die Follikelzellschicht mit zwei anatomischen Pinzetten entfernt. Die defollikulierten Zellen (siehe Abbildung 2, S.6) werden in eine Petrischale mit einer Modifizierten-Barth-Lösung gegeben. Diese Zellen sind nun für eine Mikroinjektion bereit.

## **2.2 NMDA-REZEPTOR-EXPRESSION**

In diesem Abschnitt werden die einzelnen Schritte vorgestellt, die für die Expression des NMDA-Rezeptors in der Oozyte notwendig sind. Dazu gehören die Herstellung der RNA aus DNA und die Mikroinjektion der RNA in die Oozyten.

### **2.2.1 RNA-HERSTELLUNG**

Der NMDA-Rezeptor, mit der sich diese Arbeit befasst, besteht aus den Untereinheiten NR1 und NR2A. Die NR1-Untereinheit besteht aus 3000 Basenpaaren und NR2A-Untereinheit aus 5500 Basenpaaren. Die humanen Untereinheiten NR1 und NR2A werden von Dr. P.J. Whiting (Neuroscience Research Center, Merck Sharp & Dohme Research Laboratories, Harlow, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Die Untereinheiten liegen als komplementäre DNA in einem pcDNA1/Amp Vektor vor. Während des Vorgangs werden Latexhandschuhe getragen. Vor dem Arbeitsbeginn werden die Geräte und der Arbeitsplatz mit 90%igem Methanol desinfiziert. Nach der Vermehrung der Plasmide in einem Nährmedium müssen sie linearisiert werden. Spezifische

Nucleasen durchtrennen die Plasmidringe an einer bestimmten Stelle. Die Nuclease für die NR1-Untereinheit ist XbaI und für die NR2A-Untereinheit EcoRV. Die RNA-Injektion erfolgt in den hellen Pol. Dieser Pol enthält wie bereits erwähnt Ribosomen, die für die Proteinsynthese notwendig sind. Zu diesem Zweck muss die vorliegende DNA in die komplementäre RNA transkribiert werden. Dazu wird ein RNA Präparationskit (mMessage mMachin<sup>TM</sup> T7 Kit; Ambion Inc., Austin Texas, USA) verwendet. Die Transkription erfolgt durch bakteriophage RNA Polymerase T7. 6ng NR1- zu NR2A-Untereinheiten werden in einem Verhältnis von 1 zu 5 in 30nl RNase-freiem Wasser verdünnt. Das Verhältnis von 1 zu 5 verhindert die homomere Expression des NMDA-Rezeptors. Nach Durchmischung und kurzer Zentrifugation wird die mRNA in sterile Reaktionsgefäße (Safe-Lock Reaktionsgefäße, Eppendorf AG; 22339 Hamburg, Deutschland) abgefüllt und bei -80°C aufbewahrt. Nach kurzer Auftauung kann die Mikroinjektion erfolgen.

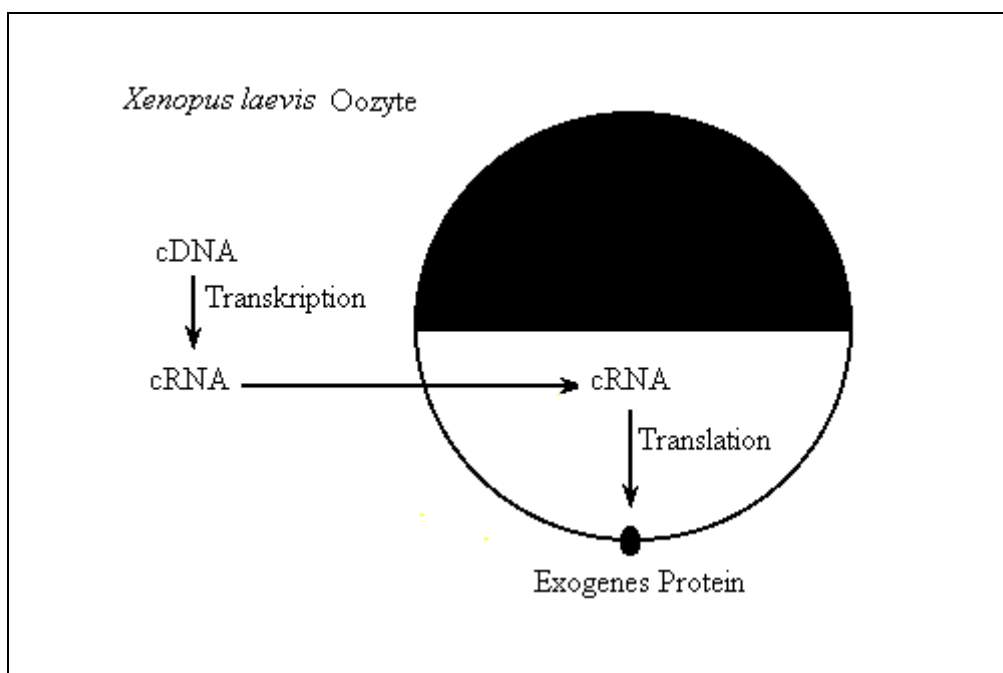
### **2.2.2 MIKROINJEKTION**

Um den NMDA-Rezeptor untersuchen zu können, muss der NMDA-Rezeptor an der Zelloberfläche exprimiert werden (siehe Abbildung 3, S.9). Für die Protein-Expression wird die zuvor durch Transkription gewonnene RNA in die Zelle injiziert. Nur optisch ungeschädigte Zellen mit einem Durchmesser von 1mm bis 1,3mm werden für die RNA-Mikroinjektionen verwendet. Der gesamte Arbeitsplatz und alle Geräte werden zuerst mit Methanol (Methanol, 90% in aqua dest) desinfiziert. Während der Mikroinjektion werden Einweghandschuhe getragen, um eine mögliche Kontamination der RNA mit RNase, die auf der Haut vorkommt, zu vermeiden. Eine Glaskapillare wird mit dem Elektrodenpuller (Modell 773, Campden Instruments Ltd.; Loughborough, Großbritannien) gezogen und unter der Stereolupe in einem Wassertropfen abgebrochen. Die Glaskapillare wird mit Mineralöl (M 5904, Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH; 30926 Deutschland) gefüllt und auf die Spitze des Mikroinjektors (Nanoject, Drummond Scientific Company; Broomall, PA, USA) gesetzt. Die RNA wird auf einen sterilen Laborfilm aufgetragen. Nun wird die Spitze der Glaskapillare mit einem Mikromanipulator (MN-333, Narishige International USA INC; East Meadow, NY, USA) unter der Stereolupe in den RNA-Tropfen eingetaucht.



Per Knopfdruck saugt der Mikroinjektor den RNA-Tropfen in die Glaskapillare hoch. Es entsteht ein optisch erkennbarer Öl-Wasser-Spiegel. Die Oozyten werden mit einer Pipette in eine Petrischale, gefüllt mit ND-96-Lösung, aufgereiht. Mit einer Mikropinzette werden sie mit dem hellen Pol nach oben positioniert. Per Knopfdruck injiziert der Mikroinjektor 30nl RNA in den hellen Pol einer Oozyte. Die Mikroinjektion ist erkennbar an dem Sinken des Öl-Wasser-Spiegels und an der leichten Anschwellung der Zelle nach der Injektion.

Die Zellen ruhen für 48 Stunden in der ND-96-Lösung in einem Laborkühlschrank (Laborkühlschrank; Modell Labo 100; Philipp Kirsch GmbH; 77608, Offenburg) mit einer Temperatur von 16°C. Jeden Tag wird die Lösung gewechselt und beschädigte Zellen werden mit einer Einwegpipette beseitigt. Nach 48 Stunden Inkubation können die Messungen an den Zellen stattfinden.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der Transkription und Translation. Nach in vitro Transkription der komplementären DNA (cDNA) erfolgt die Translation der komplementären RNA (cRNA) im hellen Pol der Oozyte. Das aus der Translation hervorgegangene Protein wird an der Zelloberfläche exprimiert und dient der physiologischen Untersuchung.

## **2.3 ZWEI-ELEKTRODEN-VOLTAGE-CLAMP-TECHNIK**

Diese Messmethode dient der Strommessung, die durch Ionenbewegung durch Kanäle über die gesamte Membran der *Xenopus* Oozyten entsteht. Die einzelnen Schritte werden in diesem Abschnitt erläutert.

### **2.3.1 VORBEREITUNG DER GLASKAPILLAREN**

Die Glaskapillaren bestehen aus Silikatglas (Hilgenberg GmbH; 34323 Malsfeld, Deutschland) und werden in einer Heizspirale mittels Zug durch den Elektrodenpuller hergestellt. Nach dem Ziehen ist die Spitze der Glaskapillare geschlossen und muss für die bevorstehende Messung geöffnet werden. Dafür taucht man die Glaskapillare in einen Wassertropfen unter der Stereolupe. Mit einer Mikropinzette wird die Spitze abgebrochen. Anschließend werden die Glaskapillaren mit dreimolarer Kaliumchlorid-Lösung gefüllt.

### **2.3.2 APPARATUR-AUFBAU**

Die für die Messung bestimmte Oozyte wird in die Vertiefung des Messbades hineinpipettiert. Das Messbad besteht aus Plexiglas und hat ein Fassungsvermögen von 0,5ml. In diesem Messbad befinden sich zwei aus Silberdraht bestehende Elektroden. Eine Elektrode fungiert als Erdungselektrode und die andere als Bezugselektrode für die Spannungselektrode. Über dem Messbad befinden sich zwei Mikromanipulatoren (MN-3333, Narishige International USA INC., East Meadow, NY, USA). Sie dienen der Halterung der Mikroelektroden, die ebenfalls aus Silberdrähten bestehen. Daneben ermöglichen sie eine präzise Bewegung im mm-Bereich. Eine Elektrode fungiert als Spannungselektrode mit einem Widerstand von 1 bis 2 Megaohm. Die andere Elektrode fungiert als Stromelektrode mit einem Widerstand von 0,5 bis 0,7 Megaohm. Diese Elektroden werden in die zuvor vorbereiteten Glaskapillaren eingetaucht und befestigt. Auf diese Weise entstehen Glasmikroelektroden. Durch das Eintauchen in die dreimolare Kaliumchlorid-Lösung entsteht eine elektrische Verbindung mit dem Messgerät. Um mögliche Störströme zu verhindern, die durch Oxidation und

Verunreinigung der Silberdrähte entstehen, werden diese in regelmäßigen Abständen mit DanKlorix R (Colgate Palmolive GmbH; 22113 Hamburg, Deutschland) gechlort.

Eine Zulaufeinrichtung beinhaltet zwei separate Lösungen: Calciumfreie-Barium-Tyodes-Lösung als Spüllösung und Glutamat/Glyzin-Lösung als Agonisten. Alle verwendeten Lösungen beinhalten weder Calcium noch Magnesium. Der Zulauf der Lösungen hat eine Geschwindigkeit von 5ml/min. Eine Ablaufeinrichtung bestehend aus Sammeltrichter und Pumpe sorgt für das Absaugen der Lösungen. Der Versuchsablauf wird unter der Stereolupe beobachtet und koordiniert.

### ***2.3.3 ZWEI-ELEKTRODEN-VOLTAGE-CLAMP-TECHNIK***

Das Membranpotential der Oocyte wird bei  $-70\text{mV}$  gehalten und es herrscht ein Äquilibrium zwischen Einstrom und Ausstrom von Ionen. Für die Messung werden beide Glasmikroelektroden in die Zelle gestochen. Die Glasmikroelektrode, die als Spannungselektrode fungiert, und die Bezugselektrode messen das Membranpotential der Zelle. Die andere Glasmikroelektrode, die als intrazelluläre Stromelektrode fungiert, appliziert den notwendigen Strom für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials bei  $-70\text{mV}$ . Eine Änderung des Membranpotentials entsteht, wenn sich Ionen durch Kanäle bewegen und dadurch Strom fließt. Unsere gesuchte Größe ist also die Strommenge, welche notwendig ist, um das Membranpotential bei  $-70\text{mV}$  zu halten. Die kontinuierliche Messung des Membranpotentials und des Stromes läuft über eine elektrische Rückkopplung (Oocyte Clamp, Typ OC-725C, Warner Instruments, LLC; 1125 Dixwell Avenue, Hamden, CT 06514, USA). Die Informationen werden von der elektrischen Rückkopplung an das Datenaufzeichnungsgerät (iWorx 118 Research Grade Recorder, iWorx/CD Sciences, Inc.; One Washington Street, #404, Dover, NH 03820, USA) weitergegeben. In diesem Gerät werden die eingehenden analogen Signale in digitale Signale transformiert. Die digitalen Signale werden so vom PC mit entsprechender Software registriert und optisch dargestellt. Die Aufzeichnung und Speicherung der Daten dient der Dokumentation.

### 2.3.4 MESSPROTOKOLLE

Für die Standardmessung wird die Oozyte mit dem dunklen Pol nach oben in das Messbad pipettiert. Die Glasmikroelektroden werden in die Zelle eingestochen. Nur Zellen, welche weniger als  $1\mu\text{A}$  Strom für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials benötigen, werden für die Messung verwendet. Über die Zulaufeinrichtung fließt für 5 Sekunden die Spüllösung. Für die weiteren 20 Sekunden fließt die Agonisten-Lösung. Anschließend fließt für 40 Sekunden nochmals die Spüllösung. Insgesamt dauert die Standardmessung eine Minute. Dabei wird der maximale Einwärtsstrom (peak-current) als Strecke zwischen dem Ausgangspotential und dem Wendepunkt des Graphen ausgewertet.

Nach Inkubation für 10 Minuten in Metamizol mit einer Konzentration von  $10^{-2}$  Molar bis  $10^{-9}$  Molar erfolgt die Bestimmung des Spitzenstromes. Hinzukommend wird der Spitzenstrom nach 10 minutiger Inkubation in 4-Aminoantipyrin oder 4-Methylaminoantipyrin mit einer Konzentration von  $10^{-4}$  Molar bestimmt.

## 2.4 STATISTIK

Um die Bedeutung von Wertdifferenzen nicht dem subjektiven Empfinden zu überlassen, müssen Signifikanztests durchgeführt werden. Diese bestimmen, ob Differenzen zufällig oder systematisch entstanden sind und erlauben es, von der Stichprobe auf die Grundgesamtheit zu schließen. Daher fallen sie unter die Rubrik der schließenden Statistik bzw. Inferenzstatistik. Allen Signifikanztests gehen Hypothesen voraus, wobei immer die Gültigkeit der Alternativhypothese ( $H_1$ ) überprüft wird. Dabei wird die  $\alpha$ -Fehlerwahrscheinlichkeit berechnet: Wie wahrscheinlich ist es, dass man einen Fehler begeht, wenn davon ausgegangen wird, dass die  $H_1$  gilt, wenn in der Grundgesamtheit die Nullhypothese ( $H_0$ ) gilt. Liegt die  $\alpha$ -Fehlerwahrscheinlichkeit unter 5% ( $p < 0,05$ ), spricht man von einem signifikanten Ergebnis und die  $H_1$  kann angenommen werden. Liegt sie sogar unter 1%, spricht man von einem sehr signifikanten Ergebnis. Überschreitet man die kritische Marke von 5%, muss die  $H_0$  angenommen und die  $H_1$  verworfen werden.

#### **2.4.1 T-TEST**

Da in dieser Arbeit Mittelwerte miteinander verglichen werden, möchte ich kurz auf das dafür notwendige Verfahren eingehen. Zum Vergleich von Mittelwerten stehen insgesamt drei t-Test Typen als statistische Verfahren zur Verfügung: im ersten t-Test werden die Mittelwerte aus einer Stichprobe mit denen der Grundgesamtheit verglichen, im zweiten werden Mittelwerte aus zwei unabhängigen Stichproben verglichen und im dritten t-Test Mittelwerte aus abhängigen Stichproben. In der vorliegenden Arbeit ist vor allem der zweite t-Test mit unabhängigen Stichproben von Bedeutung, denn die Oozyten stehen in keiner Beziehung zueinander. Zwei Voraussetzungen müssen für diesen Test erfüllt sein: als erstes muss das zu untersuchende Merkmal normalverteilt sein und als zweites müssen die Varianzen der Stichproben gleich sein.

In dieser Untersuchung werden 20 bis 30 Oozyten aus mindestens drei verschiedenen *Xenopus laevis* Exemplaren verwendet. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung werden die Softwareprogramme Sigmaplot 5.0 und Sigmastat (Statistical Solutions; Saugus, MA USA) verwendet.

#### **2.4.2 KRUSKAL-WALLIS-TEST**

Ein weiterer statistischer Test, der hier angewandt wird, ist der Kruskal-Wallis-Test. Dieses Testverfahren gehört zu den nichtparametrischen Varianzanalysen und wird für den Vergleich von mehr als zwei Stichproben angewandt. Es überprüft, ob signifikante Unterschiede zwischen mehreren Stichproben hinsichtlich der Ausprägungen ordinalskalierteter Variablen bestehen. Dazu bekommt jeder Einzelwert gemäß seiner Position in der Reihenfolge einen Rang zugewiesen. Die Rangsummen werden für jede Stichprobe berechnet und miteinander verglichen.

#### **2.4.3 DESKRIPTIVE STATISTIK**

Die deskriptive Statistik dient der Beschreibung von Daten aus einem Datensatz. In der Regel stellt man diskrete Variablen numerisch oder graphisch dar. Oftmals werden mit der deskriptiven Statistik absolute oder relative Häufigkeiten veranschaulicht. Möglich

ist aber auch die Visualisierung von Messzahlen metrischer Variablen, wie z.B. Mittelwerte oder Standardabweichungen.

## **2.5 HERSTELLUNG DER LÖSUNGEN**

Für die Herstellung der Lösungen wird destilliertes und deionisiertes Wasser verwendet. Der pH-Wert wird durch das Hinzugeben von einmolarer NaOH bzw. HCl mit einem pH-Meter (Knick, Typ 507, 48249 Dülmen, Deutschland. pH-Elektrode von Schott, Blueline 12pH; 55122 Mainz, Deutschland) auf den gewünschten Wert titriert. Die Substanzen werden mit einer Analysewaage (Modell Kern ABS 220-4; Kern & Sohn GmbH, 72336 Balingen) abgewogen. Unter ständiger Durchmischung mit einem Magnetrührer (RH basic 2 IKAMAG R, IKA R Werke GmbH & Co. KG; 79219 Staufen, Deutschland) werden die aufgelisteten Substanzen hinzugefügt. Die für die Lösungen benötigten Substanzen werden von den folgenden Firmen bezogen: Tris-HEPES von Carl Roth GmbH & Co. KG; 76185 Karlsruhe, Deutschland, Natriumchlorid von Riedel-de-Haen Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH; 30926 Deutschland, Kaliumchlorid von Merck KGaA; 64271 Darmstadt, Deutschland. Alle anderen Substanzen werden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH; 89552 Steinheim, Deutschland bezogen.

### **2.5.1 CALCIUMFREIE-TYRODES-LÖSUNG**

Die Oozytenmembran besitzt calciumabhängige Chloridkanäle [71]. Durch die Verwendung calciumfreier Lösungen, wird die Aktivierung der calciumabhängigen Chloridkanäle verhindert. Barium hat die gleiche Wertigkeit wie Calcium und keinen Effekt auf die Kanäle. Aus diesem Grund wird Calcium durch Barium ersetzt [59]. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Tris-hydroxy-methyl-aminomethan-N-hydroxyethyl-piperazin-N-2-ethan-sulfonat (Tris-HEPES) dient als Puffer.

<b>Substanz</b>	<b>Menge in g/l</b>
Bariumchlorid (BaCl <sub>2</sub> )	0,439
Kaliumchlorid (KCl)	0,37
Natriumchlorid (NaCl)	8,77
Dextrose	1,8
Tris-HEPES	2,38

**Abbildung 4:** Calciumfreie-Tyrodes-Lösung

### 2.5.2 *MODIFIED BARTH SOLUTION, ND 96*

Als Ausgangssubstanz dient 1 Liter destilliertes und deionisiertes Wasser. Nach Hinzufügen der Substanzen wird der pH-Wert dieser Lösung auf 7,5 eingestellt. Danach wird die Lösung autoklaviert. Nach Abkühlen der Lösung werden die Antibiotika Penicillin und Gentamycin zugegeben, welche einen bakteriellen Befall der Oozyten verhindern sollen. Diese Lösung dient der Aufbewahrung der Oozyten nach der mRNA-Injektion.

<b>Substanz</b>	<b>Menge</b>
Caliumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	0,264g/l
Gentaycin	0,1 mg/ml
Kaliumchlorid (KCl)	0,149 g/l
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	0,203 g/l
Natriumchlorid (NaCl)	5, 610 g/l
Penicillin	0,1 mg/ml
Tris-HEPES	1,191 g/l

**Abbildung 5:** Mengenangaben für Modified Bath Solution, ND 96

### 2.5.3 OOCYTES-RINGER-SOLUTION, OR-2

Der pH-Wert dieser Lösung wird auf 7,5 eingestellt. Diese Lösung dient der Spülung der Oozyten im Defollikulierungsprozess. Die für die Defollikulierung notwendige Kollagenase wird in OR-2 gelöst.

Substanz	Menge in g/l
Kaliumchlorid (KCl)	0,148
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	0,203
Natriumchlorid (NaCl)	4,82
Tris-HEPES	1,19

Abbildung 6: Mengenangaben für Oocytes-Ringer-Solution, OR-2

### 2.5.4 GLUTAMAT UND GLYZIN

Als Basis für Glutamat und Glyzin (Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH; 30926 Seelze, Deutschland) dient Calcimfreie-Tyrodes-Lösung. Die einzelnen Substanzen werden in halbmaximaler Effektkonzentration ( $EC_{50}$ ) appliziert (Glutamat  $10^{-5}M$ , Glyzin  $10^{-5}M$ ). Glutamat und Glyzin sind physiologische Agonisten des NMDA-Rezeptors.

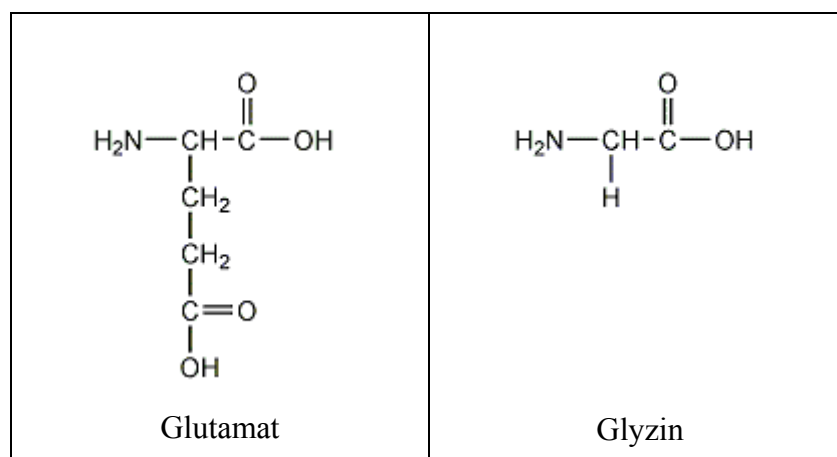
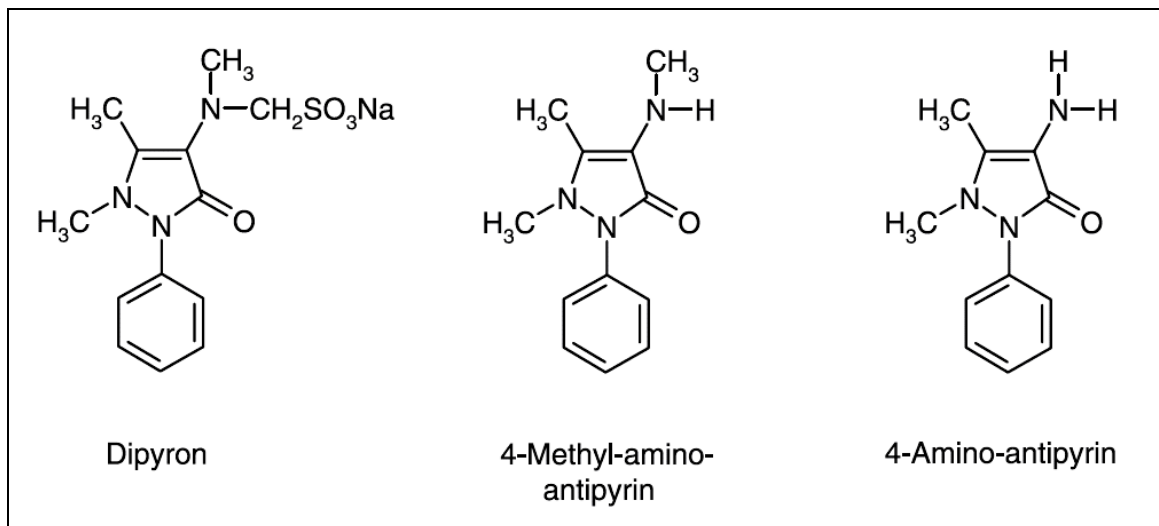


Abbildung 7: Molekularer Aufbau des Glutamats und Glyzins; beide sind physiologische Agonisten des NMDA-Rezeptors.



### 2.5.5 METAMIZOL UND DESSEN MATABOLITEN 4-AMINOANTIPYRIN UND 4-METHYLAMINOANTIPYRIN

Eine Verdünnungsreihe für Metamizol von  $10^{-2}$  M bis  $10^{-9}$  M wird hergestellt. Des Weiteren werden  $10^{-4}$  M 4-Aminoantipyrin- und 4-Methylaminoantipyrin-Lösungen hergestellt. Sowohl Metamizol als auch 4-AA und 4-MAA stammen von der Firma Sanofi-Aventis (Sanofi-Aventis; Industriepark Höchst, 65926 Frankfurt, Deutschland). Für die Herstellung der Lösungen wird destilliertes und deionisiertes Wasser verwendet. Die Bezeichnungen Metamizol und Dipyrone sind Synonyme.



**Abbildung 8:** Molekulare Struktur von Metamizol, 4-Methylaminoantipyrin und 4-Aminoantipyrin. 4-Methylaminoantipyrin entsteht aus der nicht-enzymatischen Hydrolyse des Dipyrone im Gastrointestinaltrakt. 4-Aminoantipyrin entsteht aus der enzymatischen Demethylierung des 4-Methylaminoantipyrins in der Leber.

## 3. ERGEBNISSE

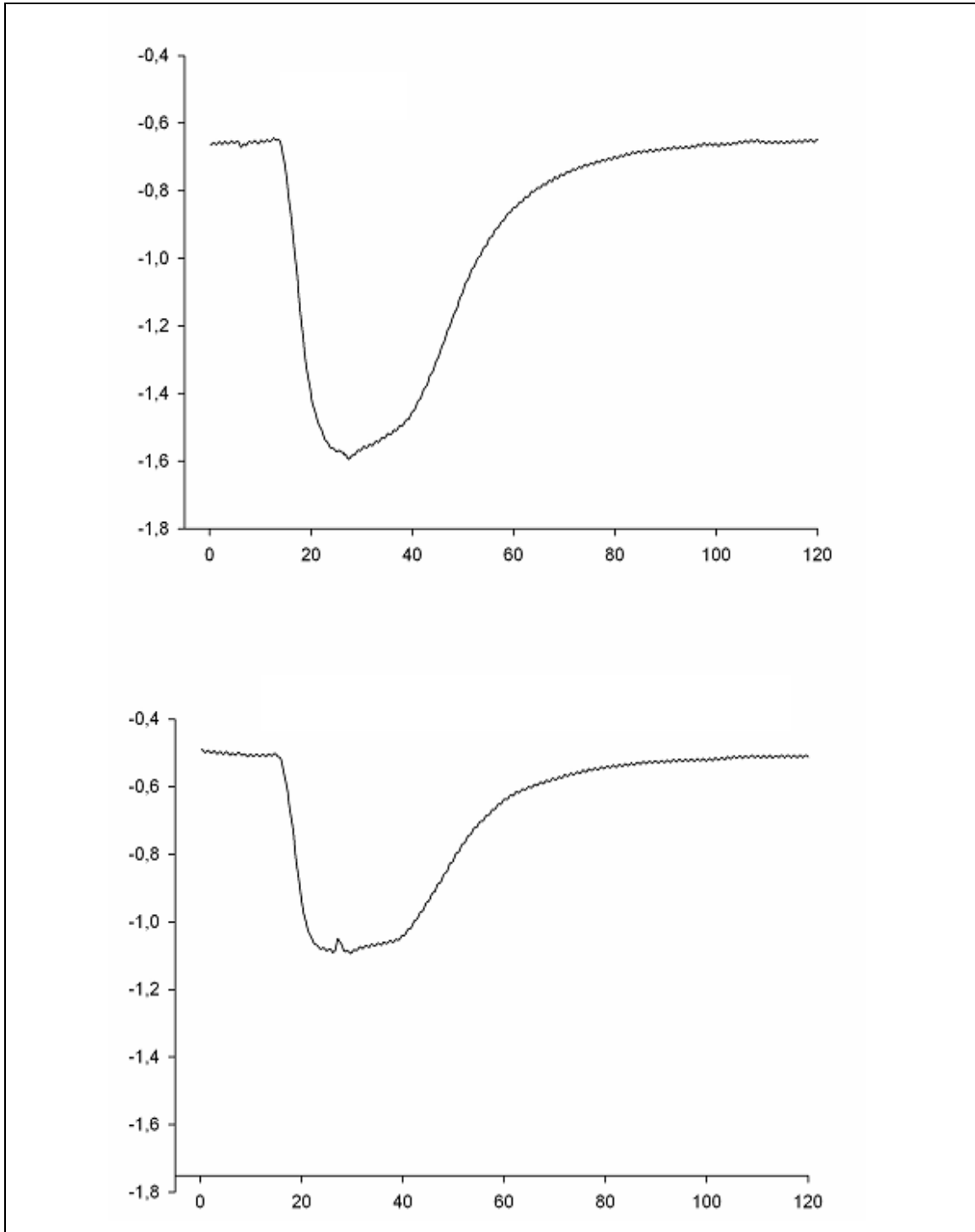
In diesem Kapitel werden die aus dieser wissenschaftlichen Arbeit hervorgegangenen Ergebnisse vorgestellt.

### **3.1 NATIVE OOZYTEN**

Die Zugabe von Glutamat und Glyzin führen zu keinem Ionen-Einwärtsstrom über die Zellmembran defollikulierter, nativer Oozyten. Folglich exprimieren Oozyten keinen endogenen NMDA-Rezeptor.

### **3.2 DIE MIT NMDA-REZEPTOR-RNA INJIZIERTE ZELLEN: KONTROLLZELLEN**

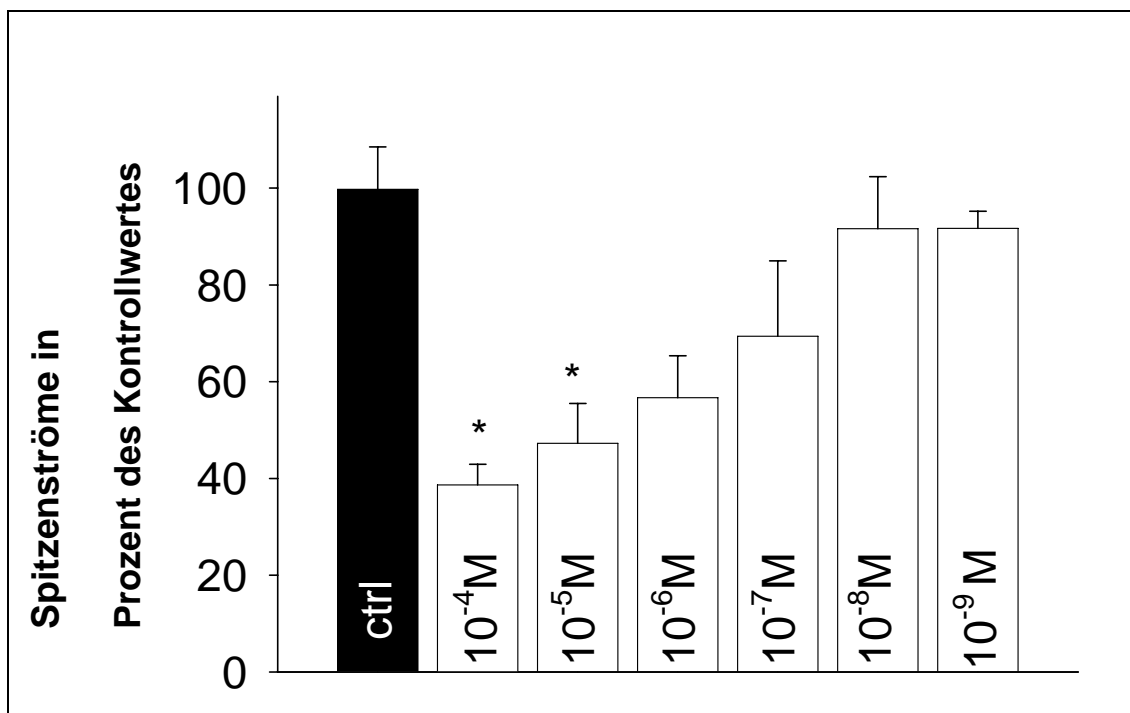
Zellen, in die NMDA-Rezeptor kodierende RNA injiziert wurden, zeigen eine typische Reaktion auf die Zugabe der Agonisten Glutamat und Glyzin, wie in Abbildung 9 auf der folgenden Seite zu sehen ist. Diese Reaktion besteht aus einem schnellen Einwärtsstrom über die Zellmembran der Oozyte, ausgelöst durch NMDA-Rezeptor-kanalöffnung. Nach Zugabe der Spülflüssigkeit (Barium-Tyrodes) erfolgt die Rückkehr zum Ausgangsniveau. Diese Zellen werden als Kontrollzellen bezeichnet und liefern Bezugswerte, die für Vergleiche mit Zellen, die in Metamizol oder Metabolite inkubiert werden, notwendig sind.



**Abbildung 9:** Zwei repräsentative Antworten von mit mRNA injizierten Zellen auf Glutamat/Glyzin-Zugabe. Auf den Abszissen ist die Zeit in Sekunden dargestellt. Auf den Ordinaten ist Strom in  $\mu\text{A}$  angegeben. Die obere Grafik zeigt die Antwort der Zelle auf Glutamat/Glyzin-Zugabe ohne vorherige Inkubation in Metamizol. Die untere Grafik zeigt die Antwort der Zelle nach 10 minutiger Inkubation in Metamizol-Lösung mit einer Konzentration von  $10^{-4}$  M.

### 3.3 METAMIZOL HEMMT DIE NMDA-REZEPTORFUNKTION KONZENTRATIONSABHÄNGIG

Nach 10 minutiger Inkubation der NMDA-Rezeptor-RNA injizierten Zellen in Metamizol, erfolgt die Zugabe der Agonisten Glutamat und Glyzin. Diese injizierten Zellen zeigen einen deutlich geringeren Einwärtsstrom über die Zellmembran als Kontrollzellen. Die Abnahme des maximalen Einwärtsstromes (peak-current) erklärt sich durch die Hemmung des NMDA-Rezeptors durch Metamizol. Wie in Abbildung 10 auf Seite 20 zu sehen ist, hemmt Metamizol den NMDA-Rezeptor konzentrationsabhängig. Eine signifikante Hemmung des NMDA-Rezeptors erfolgt bei Konzentrationen von  $10^{-4}$  und  $10^{-5}$  M.



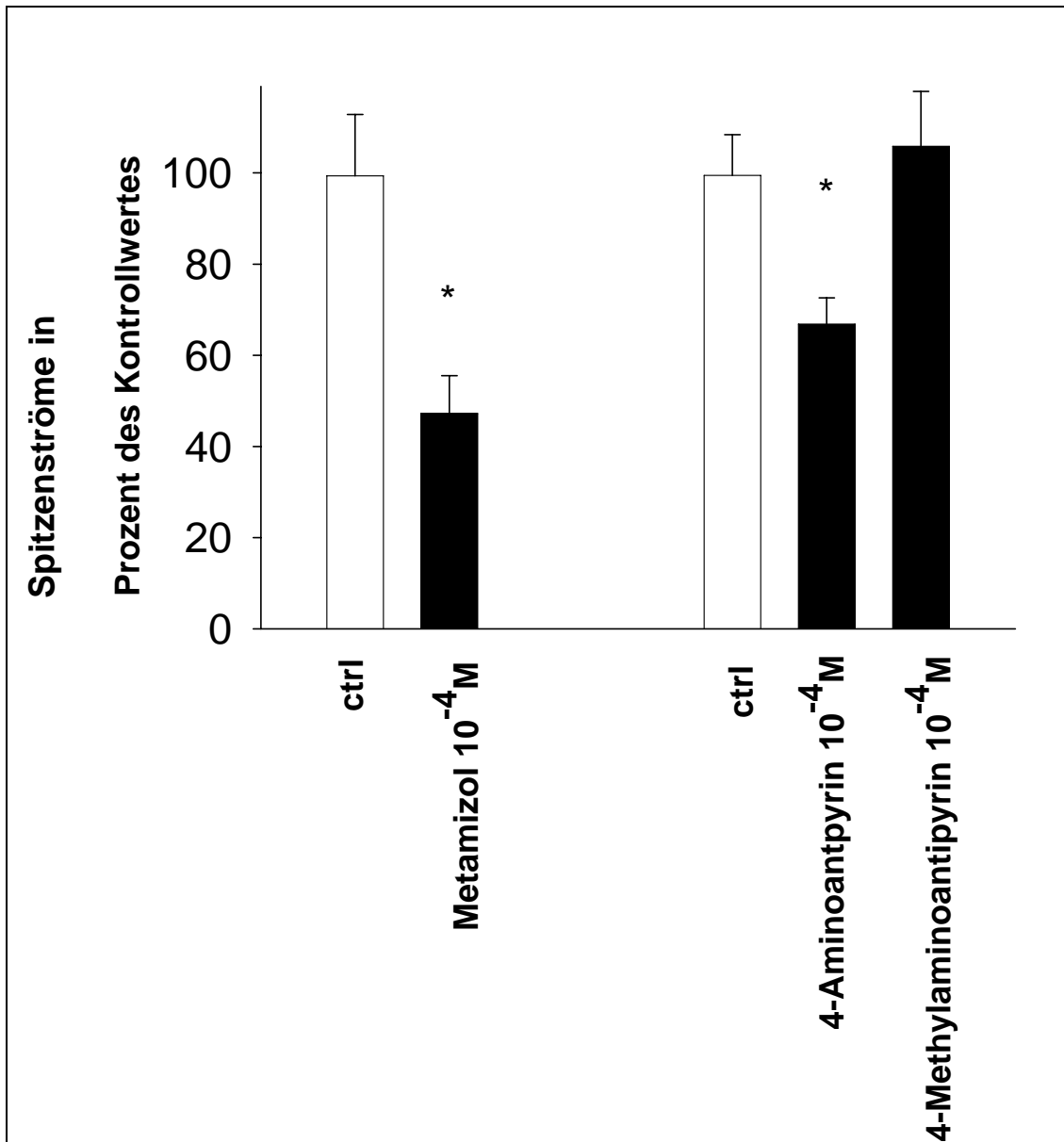
**Abbildung 10:** Auf der Abszisse sind die Konzentrationen des Metamizols dargestellt. Auf der Ordinate ist der Einwärtsstrom in Prozenten des Kontrollwertes (ctrl) dargestellt. Eine Hemmung des NMDA-Rezeptors durch Metamizol führt zu einer Abnahme des Einwärtsstromes. Diese Hemmung ist konzentrationsabhängig. Eine signifikante Hemmung (\*) erfolgt bei den Konzentrationen von  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M.

### **3.4 DER METABOLIT 4-AMINOANTIPYRIN HEMMT DIE NMDA-REZEPTORFUNKTION**

Nach 10 minutiger Inkubation der injizierten Zellen in 4-Aminoantipyrin erfolgt – wie oben bereits beschrieben – die Zugabe der Agonisten. Die Antwort der injizierten Zellen in Form eines Einwärtsstroms über die Zellmembran ist deutlich geringer im Vergleich zu den Kontrollzellen. Wie in Abbildung 11 auf Seite 22 dargestellt, erfolgt eine signifikante Hemmung des NMDA-Rezeptorkanals bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M.

### **3.5 DER METABOLIT 4-METHYLAMINOANTIPYRIN HEMMT DIE NMDA-REZEPTORFUNKTION NICHT**

Wie aus der Abbildung 11 auf Seite 22 hervorgeht, zeigen die Zellen keine Abnahme des Einwärtsstromes nach 10 minutiger Inkubation in 4-Methylaminoantipyrin. Die Schlussfolgerung daraus ist, dass 4-Methylaminoantipyrin keine hemmende Wirkung auf den NMDA-Rezeptorkanal hat.



**Abbildung 11:** Auf der Abszisse sind Kontrollwerte, Metamizol, 4-Aminoantipyrin (4-AA) und 4-Methylaminoantipyrin (4-MAA) in einer Konzentration von  $10^{-4}$  Molar dargestellt. Auf der Ordinate ist der Einwärtsstrom in Prozent des Kontrollwertes dargestellt. 4-Aminonaptyrin hemmt den NMDA-Rezeptorkanal bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  Molar. 4-Aminoantipyrin zeigt im Vergleich zu Metamizol eine etwas geringere Hemmung des NMDA-Rezeptorkanals. 4-Methylaminoantipyrin hat keine hemmende Wirkung auf den NMDA-Rezeptorkanal. Der Asterisk (\*) weist auf signifikante Unterschiede zu Kontrollwerten ( $p < 0.05$ ).

## 4. DISKUSSION

Was nun folgt, ist die Evaluation des Modells und die Beschreibung des Metamizols sowie dessen Metabolite auf pharmakologischer Ebene. Zudem werden der Aufbau, die Funktion des NMDA-Rezeptorkanals und die Verwendung des Metamizols und seiner Metaboliten in der Schmerztherapie dargestellt.

### 4.1 MODELLEVALUATION

In diesem Abschnitt sollen zunächst die Vor- und Nachteile des *Xenopus laevis* Modells dargestellt werden. Anschließend werden mögliche Fehlerquellen kritisch diskutiert.

#### 4.1.1 VORTEILE DES *XENOPUS LAEVIS* MODELLS

Die *Xenopus laevis* Oozyten eignen sich besonders gut für die Forschung von Proteinen, da sie über ein sehr effizientes Translationssystem verfügen. Gurdon und Mitarbeiter zeigen, dass die *Xenopus laevis* Oozyte eine hohe Translationskapazität für fremde mRNA besitzt [39]. Dieses Translationssystem ermöglicht das Expremieren von heterologen Proteinen nach mRNA- oder cDNA-Injektion [100;23;108;39]. Die Haltung und Vermehrung der Frösche in der Gefangenschaft gestaltet sich leicht und kostengünstig. Die Vorbereitung und Handhabung der Oozyten für die Messung kann man in kurzer Zeit erlernen [108]. Die Oozyte verfügt über alle Substrate, welche sie für das Wachstum und für die Translation von Proteinen braucht. Aus diesem Grund gibt es eine kleine Anzahl von endogenen Membran-Transportsystemen, die mit den heterolog exprimierten Proteinen interagieren könnten. Die posttranslationalen Modifikationen der Oozyte an heterologen Proteinen, wie Phosphorylierung und Glykosilierung, sind denen der menschlichen Zelle ähnlich [99]. Zudem sind die Nähr- und Aufbewahrungslösungen für die Oozyten leicht herzustellen. Ein weiterer Vorteil ist die Anwendung verschiedener Messmethoden an den Oozyten, um Ionenkanäle und Transportsysteme zu untersuchen [110]. Zu diesen Messmethoden gehören unter

anderem Patch-Clamp-Technik, intrazelluläre Ionenmessungen und die hier angewandte Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik.

#### **4.1.2 NACHTEILE DES *XENOPUS LAEVIS* MODELLS**

Die Oozytenqualität variiert saisonal. Besonders bei hohen Außentemperaturen sind die Oozyten empfindlich und liefern schwankende Ergebnisse.

Die Vorbereitung und Injektion der Zellen stellt eine starke Beanspruchung der Zelle dar. Hierbei können zelluläre Strukturen beschädigt werden, wodurch Schwankungen in der Expressionsdichte des NMDA-Rezeptorkanals entstehen. Eine Schädigung der Organellen und somit des Translationsapparates während der mRNA-Injektion und des Messverfahrens kann eintreten. In beiden Fällen wird die Zelle perforiert und Glasmikroelektroden werden in das Zytoplasma der Zelle hineingeführt.

Eine mögliche Schwankung der RNA-Menge ergibt sich erstens aus dem Durchmesser der Glaskapillarspitze während der RNA-Injektion. Zweitens wird ein Teil der RNA-Menge beim Herausziehen der Glaskapillare herausgeschwemmt. Nach der Injektion folgt die Inkubationszeit von zwei Tagen. In dieser Zeit erfolgt die Translation und Regenerationsmechanismen setzen ein, die über das Überleben der Oozyte oder deren Zelltod entscheiden.

Die mRNA Expression und damit die Proteinbiosynthese unterscheidet sich in einzelnen Stadien der Oogenese nach Dumont [50;110]. Die in den elektro-physiologischen Messungen verwendeten Oozyten befinden sich in Stadium V und VI nach Dumont. Die stadienabhängige Proteinbiosynthese verdeutlicht die Notwendigkeit der Verwendung von Oozyten im gleichen Reifungsstadium. Die Unterscheidung nach Größe und Morphologie ist nicht leicht und schließt nicht aus, dass bei den Messungen auch Zellen anderen Reifungsgrades verwendet werden.

Nicht nur die gewonnenen Ergebnisse von verschiedenen Fröschen können sich unterscheiden, sondern auch die Ergebnisse von Oozyten ein und desselben Frosches. Gründe für diese Schwankungen sind vielfältig und noch nicht eindeutig geklärt. Angenommen werden unter anderem Reste der Follikelzellschicht, die über Rezeptoren verfügen und damit die Messergebnisse verfälschen [65]. Eine andere Ursache für diese Schwankungen sind Abweichungen in der Expression von Proteinen [110].



Wie oben geschildert gibt es eine Reihe von Faktoren, die die Messungen und die anschließende Auswertung der Ergebnisse beeinflussen können. Durch Standardisierung aller Schritte des Experiments und durch die hohe Anzahl der Messwiederholungen, wird der Einfluss dieser Faktoren minimiert. Messwerte beruhen auf mindestens 20 Einzelmessungen. Die dafür notwendigen Oozyten stammen von drei bis vier Fröschen.

#### **4.1.3 FEHLERQUELLEN DES *XENOPUS LAEVIS* MODELLS**

Das homologe Milieu des exprimierten NMDA-Rezeptorkanals ist die menschliche Nervenzelle. Um diesen Rezeptor zu untersuchen, wurde die humane mRNA in das heterologe Milieu der Oozyte injiziert und der Translationsapparat der Oozyte für diesen Zweck genutzt. Durch das Verwenden der Oozyte als Expressionssystem fremder Proteine können mögliche Fehlerquellen entstehen, welche in diesem Abschnitt beschrieben und diskutiert werden.

Untersuchungen der endogenen Proteine ergeben, dass im zentralen Nervensystem des *Xenopus laevis* die Glutamaterezeptor-Untereinheit Xen U1 und die NR1-Untereinheit Xen NR-1 vorkommen [96;97]. Die Coexpression von Xen U1 und Xen NR-1 führen zum Aufbau eines funktionalen Rezeptors mit ähnlichen Eigenschaften wie die des NMDA-Rezeptorkanals. Um die Möglichkeit der Beteiligung endogener Untereinheiten beim Aufbau des NMDA-Rezeptorkanals auszuschließen, wird eine bestimmte Menge fremder mRNA in die Zelle injiziert. Dieser Überschuss an exogener RNA konkurriert mit der endogenen RNA um das Translationssystem. Das Okkupieren des Translationssystems bewirkt eine Abnahme der Syntheserate der endogenen Proteine [23].

Über die Frage, ob die post-translationalen Modifikationen der Oozyte mit der menschlichen Zelle zu vergleichen sind, existiert noch kein Konsens. Es besteht Ähnlichkeit in den einzelnen Schritten der post-translationalen Modifikation wie Phosphorylierung und Glykosylierung [23;99]. Jedoch gibt es Abweichungen in der Korrektheit und Vollständigkeit der Schritte [99].

Das Temperaturoptimum für menschliche Proteine liegt bei einer Körpertemperatur von 37°C. Allerdings finden die Experimente dieser Untersuchung unter

Raumtemperatur statt. Das kann die Kinetik des humanen NMDA-Rezeptorkanals und das temperaturempfindliche Protein-Trafficking verändern [108]. Die niedrige Temperatur stellt gleichzeitig die Plasmafluidität und das Funktionieren des Translationssystems der Oozyte sicher. Die zuletzt genannten Fakten haben beim Aufbau und der Durchführung des Versuchs höhere Priorität. Regulationsmechanismen von exprimierten Proteinen wie Endozytose und Exozytose sind gewebspezifisch [108]. Interaktionen zwischen exogenen und endogenen Proteinen können das Expressionsausmaß des fremden Proteins in der Zellmembran beeinträchtigen.

Das bei der Injektion der mRNA verwendete Verhältnis von NR1- zu NR2A-Untereinheiten ist 1 zu 5. Das ungleiche Verhältnis sichert den Aufbau eines heteromeren Rezeptors. Ein homomerer Aufbau des Rezeptors ist durchaus denkbar. Schwankungen in der Menge der injizierten Untereinheitsverhältnisse können nicht ausgeschlossen werden.

Die Plasmamembran der Oozyte besitzt zahlreiche endogene Kanäle. Die für die Experimente wichtigen Kanäle werden hier vorgestellt und als mögliche Fehlerquellen diskutiert. Die vorherrschenden Kanäle sind die Chlorid-Kanäle, die durch intrazellulären Anstieg der Calcium-Konzentration aktiviert werden [111]. Aus diesem Grund nennt man sie calciumabhängige Chlorid-Kanäle. Diese Kanäle befinden sich in zehnfach höherer Dichte im animalischen Pol der Oozyte. Um eine mögliche Aktivierung dieser Kanäle und der daraus resultierenden Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden, wird in dieser Untersuchung anstelle von Calcium Barium verwendet [59]. Barium fließt von extrazellulärem Raum in den intrazellulären Raum durch den NMDA-Rezeptorkanal. Ein weiterer Vorteil durch den Austausch von Calcium durch Barium ist, dass Barium eine hemmende Wirkung auch auf andere endogene Ionenkanäle aufweist, wie z.B. Kalium-Kanäle [110].

Magnesium blockiert die Kanalpore des NMDA-Rezeptorkanals spannungsabhängig (siehe Kapitel 4.3.1). Um den Durchfluss von Barium als Ladungsträger durch den NMDA-Rezeptorkanal sicherzustellen, beinhaltet die OR-2-Lösung kein Magnesium. Die Plasmamembran der Oozyte verfügt über Mechano-rezeptoren, die durch Zug- und Volumenänderung aktiviert werden. Diese Rezeptoren sind permeabel für monovalente Ionen und Calcium. Eine Aktivierung durch mRNA-Injektion, wodurch eine Volumenzunahme in der Zelle entsteht, ist denkbar. Jedoch ist

die Permeabilität des Rezeptors für Barium-Ionen nicht gesichert. Wie Weber 1999 bereits schildert, bewirkt eine Aktivierung des Rezeptors keine signifikante Änderung in der Stromamplitude und in der Kanal-Leitfähigkeit [111].

Die Defollikulierung ist definiert als die Entfernung der Follikelschichten bis auf die Vitellinmembran auf enzymatischem und mechanischem Weg. Dieses Verfahren wurde in der Methodik ausführlich dargestellt (siehe Kapitel 2.1.4). Die Follikelschichten, die die Oozyten umhüllen, haben eine stabilisierende und nährnde Funktion [95]. Die Follikelschicht kann die elektrophysiologische Messungen verfälschen und zu einer falschen Interpretation der Ergebnisse führen [65]. Bei der Defollikulierung stehen sich zwei Prinzipien gegenüber: Schonung der Zelle versus gründliche Defollikulierung. Eine gründliche Defollikulierung minimiert die Gefahr einer Verfälschung der Ergebnisse, kann sie aber nicht völlig ausschließen. Ein Rest von Follikelzellschicht kann daher erhalten bleiben. Die in dieser Schicht vorhandenen Zellen verfügen über Rezeptoren, die über Gap-Junctions eine elektrische und chemische Verbindung zu der Zelle herstellen [100]. Die bei der Defollikulierung belassene Vitellinmembran ist azellulär und fibrös. Sie stellt keine Diffusionsbarriere für Pharmaka dar und führt nicht zu einer Verfälschung von Ergebnissen [65].

Eine weitere Quelle für Artefakte ist die Kollagenase, die bei der Defollikulierung eingesetzt wird. Die kommerziell bezogene Kollagenase kann mit Trypsin verunreinigt sein [111]. In der Plasmamembran der Oozyte existieren Trypsin-Rezeptoren. Eine Rezeptor-Substrat-Bindung verändert den Modus eines Natrium/Calcium-Transporters, so dass Natrium aus der Zelle und Calcium in die Zelle transportiert wird. Dies bewirkt eine Zunahme der intrazellulären Konzentration von Calcium und dadurch eine Aktivierung calciumabhängiger Chlorid-Kanäle. Im Allgemeinen werden Kollagenasen mit geringer Trypsin-Aktivität bevorzugt. Bei hoher Trypsin-Aktivität können Trypsin-Inhibitoren eingesetzt werden, wobei die enzymatische Defollikulierungszeit ansteigt. Die erforderliche Menge ergibt sich aus der von der jeweiligen Produktionsfirma aufgestellten Tabelle mit Kollagenase- und entsprechender Trypsin-Inhibitor-Menge [108].

Um sicher zu gehen, dass die erfolgten Messungen tatsächlich auf das Expressieren von NMDA-Rezeptorkanälen beruhen, muss eine Unterscheidung zwischen endogenen und exogenen Proteinen vorgenommen werden. Dies erfolgt an Hand der

pharmakologischen und kinetischen Eigenschaften des exprimierten Proteins. Der NMDA-Rezeptorkanal wird durch die Applikation des synthetisch hergestellten Agonisten N-Methyl-D-Aspartat mit einer Konzentration von 1mM aktiviert, wodurch Einwärtsstrom über die Zellmembran der Oozyte entsteht. Glyzin ist der obligatorische Co-Agonist von Glutamat. Nur durch die gleichzeitige Applikation des physiologischen Agonisten Glutamat und Glyzin entsteht Einwärtsstrom über die Zellmembran der Oozyte. Darüber hinaus muss eine mögliche Blockade des Rezeptors durch Magnesium verhindert werden. Der NMDA-Rezeptor ist sowohl für Calcium als auch für Barium permeabel. All diese Bedingungen sind in diesem *Xenopus laevis* Modell gegeben. Daraus folgt, dass es sich dabei um den in der Oozyte exprimierten NMDA-Rezeptorkanal handelt.

Um die Frage beantworten zu können, ob Metamizol oder seine aktiven Metabolite hemmend auf den NMDA-Rezeptorkanal wirken, werden diese Substanzen separat auf ihre hemmende Wirkung getestet. Sowohl Metamizol als auch 4-Aminoantipyrin hemmen den NMDA-Rezeptorkanal. Metamizol ist ein instabiles pro-drug und wird im Magen durch die Magensäure nicht-enzymatisch zu 4-Methylaminoantipyrin hydrolysiert. In der Leber erfolgt dann die enzymatische Demethylierung zu 4-Aminoantipyrin [61]. Ergün und Mitarbeiter zeigen, dass die nicht-enzymatische Hydrolyse von drei Faktoren beeinflusst wird: Konzentration, Temperatur und pH-Wert der Metamizollösung [34]. Je kleiner die Konzentration, umso schneller erfolgt die Hydrolyse. Die optimale Temperatur entspricht der Körpertemperatur und beträgt 37°C. Der optimale pH-Wert ist 2,5. Die Verdünnungsreihen des Metamizols werden mit destilliertem Wasser hergestellt, welches einen pH-Wert von 7 hat. Die Versuche finden unter Zimmertemperatur statt und die Verdünnungsreihe reicht von  $10^{-4}$  bis  $10^{-9}$  Molar. Unter diesen Bedingungen ist die nicht-enzymatische Hydrolyse zwar unwahrscheinlich, aber nicht ausgeschlossen. Ergün und Mitarbeiter erwähnen die Möglichkeit, dass 4-MAA durch Autokatalyse entstehen könnte. Weiterhin kann ein spontaner Zerfall des 4-MAA in 4-AA ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Ein Beitrag zu der hemmenden Wirkung des Metamizols durch 4-AA ist sehr unwahrscheinlich, jedoch nicht auszuschließen. Die separate Untersuchung der Substanzen ergibt, dass 4-MAA keine hemmende Wirkung auf den NMDA-Rezeptorkanal hat.

#### **4.1.4 KLINISCHE RELEVANZ DER KONZENTRATIONEN**

In dieser wissenschaftlichen Arbeit konnte eine signifikante Inhibition des NMDA-Rezeptorkanals bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M für 4-AA und bei Konzentrationen von  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M für Metamizol ermittelt werden. Nach einer oralen Dosis von 1g Metamizol beträgt die maximale Plasmakonzentration ( $C_{max}$ ) des 4-AA im menschlichen Körper  $1,5\mu\text{g/ml}$  [61]. Die Zeit bis zum Erreichen dieser Konzentration ( $t_{max}$ ) beträgt 4,4 Stunden. Bei einer Molmasse von  $203,5\text{g/mol}$  und einer Plasmaproteinbindung von 47,9% entspricht dies einer Konzentration von  $38,4 \times 10^{-5}$  M. Erhöht man die orale Dosis auf 3g Metamizol, so beträgt  $C_{max}$  nach 6,87 Stunden ( $t_{max}$ )  $4,67\mu\text{g/ml}$  [107]. Dies entspricht einer Konzentration von  $11,9 \times 10^{-4}$  M. Diese im klinischen Einsatz verwendeten Konzentrationen liegen in einer Größenordnung, die ausreicht, um den NMDA-Rezeptorkanal in diesem Modell zu inhibieren. Anders als 4-AA ist Metamizol nach intravenöser Applikation im Plasma nur für 16 Minuten vorhanden. Nach oraler Einnahme ist Metamizol weder im Urin noch im Plasma aufspürbar [61]. Aus diesem Grund können die in diesem tierexperimentellen Modell verwendeten Konzentrationen von  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M für Metamizol nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden. Abschließend soll darauf hingewiesen werden, dass bei der Übertragung des Modells auf den Menschen die gemessenen Ergebnisse vom Expressionslevel des NMDA-Rezeptorkanals abhängig sind.

## **4.2 METAMIZOL UND DESSEN METABOLITE**

In diesem Abschnitt werden die Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und das Nebenwirkungsprofil des Metamizols dargestellt.

### **4.2.1 PHARMAKOKINETIK**

Metamizol gehört zu der Gruppe der Pyrazolon-Derivate und wird synthetisch hergestellt. Synonyme Wirkstoffbezeichnungen für Metamizol lauten Novaminsulfon-

Natrium und Sylpirine. Die korrekte pharmakologische Bezeichnung ist: N-Methyl-N-2,3-dimethyl-5-oxo-1-phenyl-3-pyrazolin-4-aminomethansulfonsäure oder kurz das Natriumsalz des Metamizols [85]. Zu den bekanntesten Handelsnamen gehört Novalgin von der Firma Höchst.

Nach der Demethylierung wird 4-AA anschließend in der Leber enzymatisch zu 4-Acetylaminoantipyrin acetyliert. Dieser Schritt ist abhängig von Acetylierungsphänotyp des Patienten. Die Metabolite 4-Methylaminoantipyrin und 4-Aminoantipyrin sind die biologisch aktiven Metaboliten [12]. Bereits nach 48 Stunden werden 90% der Metaboliten renal eliminiert [85]. Die Plasmahalbwertszeit von 4-MAA beträgt 2,5 Stunden und für 4-AA beträgt es 3,7 bis 8,1 Stunden, was ihrer analgetischen Wirkdauer entspricht. Nach oraler Einnahme hat 4-MAA eine Bioverfügbarkeit von 85% [63]. Das Ausmaß der Proteinbindung ist für 4-MAA 57,6% und für 4-AA 47,9% [122]. Metamizol und seine Metaboliten zeigen keine klinisch relevante Interaktion mit anderen Medikamenten wie Antikoagulantien oder Furosemid [61]. Metamizol ist weder hepatotoxisch noch nierentoxisch. Die Letaldosis 50 liegt bei 1g/kg und mehr. Die therapeutische Breite ist sehr hoch. Es existieren keine Berichte über Todesfälle durch eine Überdosis mit Metamizol. Die empfohlene maximale Tagesdosis beträgt 4 bis 5g. Bei Patienten mit Leberzirrhose ist die Metabolisierungs- und Biotransformationsrate verlangsamt und eine entsprechende Dosisanpassung muss erfolgen. Eine Nierenerkrankung verändert die Clearance der Metaboliten. Alle Metaboliten sind in der Muttermilch nachweisbar [61]. Metamizol und seine Metaboliten passieren die Blut-Hirn-Schranke und sind in der cerebrospinalen Flüssigkeit nachweisbar [60]. Es existiert eine signifikante Korrelation zwischen den im Plasma und den in der cerebrospinalen Flüssigkeit gemessenen Konzentrationen von 4-MAA und 4-AA [20].

Für Metamizol existieren mehrere Darreichungsformen: Tropfen, Filmtabletten, Injektionslösungen und Suppositorien. Diese unterscheiden sich in ihrer Bioverfügbarkeit. Eine hohe Bioverfügbarkeit und ein dadurch schneller Wirkungseintritt erfolgt nach parenteraler Gabe. Nach oraler Gabe ist der Wirkungseintritt abhängig von Magenaktivität und Magenfüllungszustand [85].

#### 4.2.2 PHARMAKODYNAMIK

Das Wirkungsprofil von Metamizol ist facettenreich, denn es wirkt analgetisch, antiphlogistisch, antipyretisch und spasmolytisch. Diese Effekte lassen sich nicht durch einen einzigen Wirkmechanismus erklären, sondern bedürfen zur Erklärung eines Spektrums an Wirkmechanismen.

Die bis heute entdeckten Mechanismen basieren sowohl auf einem peripheren als auch auf einem zentralen Angriffspunkt des Metamizols und seiner Metaboliten. Metamizol hemmt die Prostaglandin-Synthese in der Peripherie und im zentralen Nervensystem [1]. Die Prostaglandin-Ausschüttung durch Astrozyten und Makrophagen wird ebenfalls durch Metamizol gehemmt [45]. Hinz und Mitarbeiter zeigen, dass 4-MAA nicht selektiv die Cyclooxygenasen 1 und 2 hemmt [45]. Cyclooxygenasen kommen sowohl im peripheren Gewebe als auch im zentralen Nervensystem vor. Dieser Wirkmechanismus kann die Hemmung der zentralen und peripheren inflammatorischen Hyperalgesie durch Metamizol erklären. Pierre und Mitarbeiter zeigen, dass 4-MAA die Cyclooxygenase reversibel und indirekt hemmt [82]. Häm dient als prosthetische Gruppe in der Prostaglandin-Synthese der Cyclooxygenase. 4-MAA konkurriert nicht mit Arachidonsäure um die katalytische Stelle der Cyclooxygenase, wie lange vermutet, sondern bildet mit Häm einen Komplex, wodurch Radikalfänger entstehen. Diese Radikalfänger binden Radikale, die für die katalytische Aktivität der Cyclooxygenase notwendig sind. Für den peripheren anti-nozizeptiven Effekt des Metamizols wird die Aktivierung der ATP-abhängigen Kalium-Kanäle verantwortlich gemacht. In diesem Sinne wird eine mögliche Beteiligung in der L-Arginin/NO/cGMP- Strecke durch Metamizol angenommen [3].

Carlsson und Mitarbeiter zeigen in tierexperimentellen Modellen, dass eine Mikroinjektion von Metamizol im periaquäduktalen Grau (PAG) einen antinozizeptiven Effekt hat [13]. Metamizol aktiviert die im periaquäduktalem Grau absteigenden Bahnen, die auf Nozizeption hemmend wirken. Eine intrathekale Injektion von Metamizol reduziert die Aktivität der nozizeptiven Neuronen in der Substantia nigra. Beide Effekte – in PAG und Substantia nigra – werden auch nach einer intravenösen Metamizol-Injektion beobachtet, wodurch das Überwinden der Bluthirnschranke durch die Metaboliten gesichert ist. Chandrasekharan und Mitarbeiter beschreiben eine Hemmung der Cyclooxygenase-3 [17]. Diese Isoform (COX-3) kommt im Kortex,

Rückenmark und Herz vor. Die COX-3-Hemmung könnte ebenfalls die analgetische und antipyretische Wirkung des Metamizols erklären.

Der spasmolytische Effekt bezieht sich sowohl auf die glatte Muskulatur in den Gefäßen als auch auf den Gastrointestinaltrakt. Im vaskulären Bereich wird eine direkte Wirkung der Metabolite angenommen, wodurch die Erregbarkeit der glatten Muskulatur herabgesetzt wird [85;21].

In experimentellen Epilepsie-Modellen zeigen Doretto und Mitarbeiter, dass Metamizol einen antikonvulsiven Effekt hat [29]. Welche Wirkmechanismen dafür verantwortlich sind, bleiben vorerst unbekannt. Jedoch nehmen diese Forscher analog zum analgetischem Wirkmechanismus einen multifokalen Wirkmechanismus an.

#### **4.2.3 NEBENWIRKUNGEN**

Zu den häufigsten Nebenwirkungen des Metamizols gehören Hautreaktionen wie Juckreiz und Urtikaria [12]. Eine Überempfindlichkeitsreaktion bis hin zu anaphylaktischem Schock treten selten auf. Bei einer zu schnellen intravenösen Injektion kann die spasmolytische Wirkung zum Widerstandverlustschock führen, welches sich als Kreislaufversagen zeigt [85]. Im Vergleich zur Acetylsalicylsäure zeigt Metamizol ein deutlich schwächer ausgeprägtes gastrointestinales Nebenwirkungsprofil wie z.B. die Entstehung von Magenulzera und Ulcusblutungen [85;12]. Die schwerwiegendste Nebenwirkung, die mit Metamizol in Verbindung gebracht wird, ist die Auslösung einer Agranulozytose. In einer internationalen Agranulozytose- und Aplastischen Anämie Studie wurden zwischen den Jahren 1981 und 1984 22,3 Millionen Menschen untersucht. Diese Studie ermittelte eine Agranulozytose-Inzidenz von 1,1 pro eine Million exponierte Patienten pro Behandlungswoche [85;61]. Metamizol löst eine allergische Agranulozytose vom Typ I aus; d.h. sie ist zeit- und dosisunabhängig. Eine schwedische Forschung wertete ausgestellte Rezepte für Metamizol in einem Zeitraum von 1995 bis 1998 aus und stellte die Zahl der Agranulozytose-Erkrankungen fest. Diese Studie ergab eine Agranulozytose-Inzidenz von 1 zu 1439 [85]. In dieser Studie beschränkte sich das Auftreten der Agranulozytose nicht auf einen bestimmten Zeitpunkt nach Einnahme von Metamizol, womit sich die hohe Inzidenz teilweise erklären lässt.



### **4.3 NMDA-REZEPTOR IM MENSCHLICHEN KÖRPER**

In diesem Abschnitt werden der Aufbau, die Kinetik und die Aktivierungsbedingungen des NMDA-Rezeptorkanals dargestellt. Darüber hinaus werden die Funktion und das Vorkommen des NMDA-Rezeptorkanals beschrieben.

#### **4.3.1 AUFBAU UND KINETIK**

Glutamat-Rezeptoren werden in zwei große Gruppen unterteilt: Als erstes sind Metotrope Rezeptoren zu benennen, die an G-Proteine gekoppelt sind und als Kanäle fungieren. Zu ihnen gehören der L-AP4 Kanal und der ACPD Kanal [35]. Als zweites sind die ionotropen Rezeptoren aufzuzählen, die als ligandengesteuerte Kanäle fungieren. Zu ihnen gehören der AMPA- sowie der NMDA-Rezeptorkanal. Die Bezeichnung der Rezeptoren erfolgt an Hand der synthetischen Substanz, die als Agonisten auf den Rezeptor einwirken. So erhält der NMDA-Rezeptorkanal seinen Namen von dem Agonisten N-Methyl-D-Aspartat [35].

Das Vorkommen dieses Rezeptors im zentralen Nervensystem (ZNS) und seine Beteiligung an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen reflektiert seine herausragende Bedeutung. So spielt dieser Rezeptor eine wichtige Rolle in Schmerzwahrnehmungsprozessen, Epilepsie und Lernprozessen [120]. Auf die Bedeutung des Rezeptors wird im Abschnitt 4.3.2 näher eingegangen.

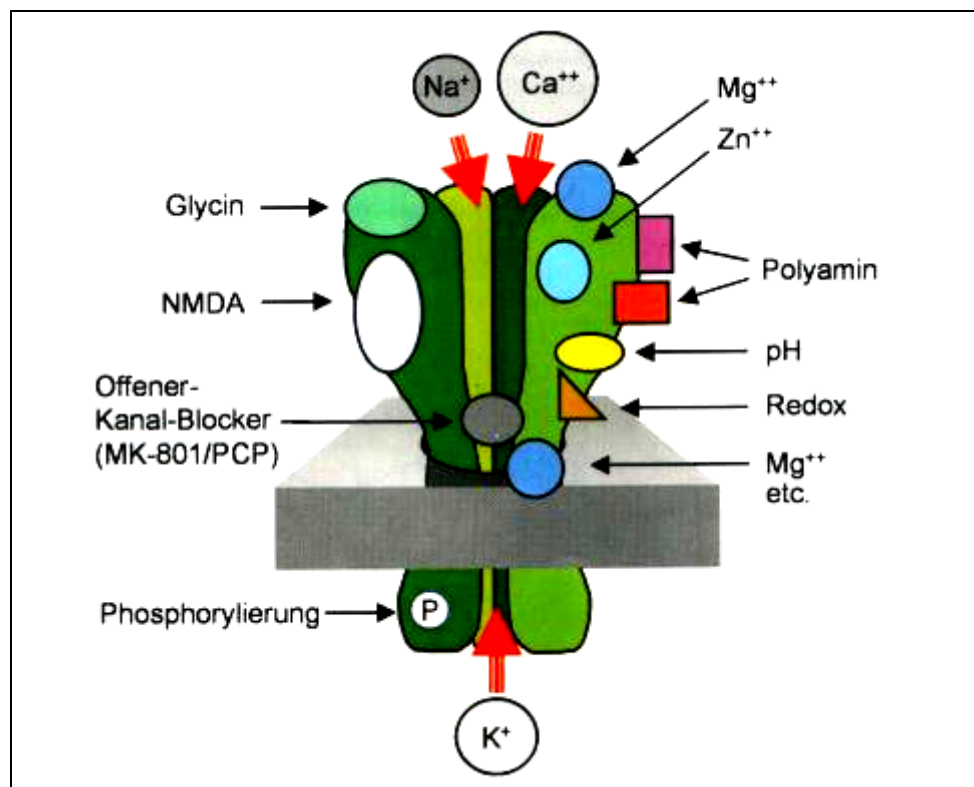
Für den NMDA-Rezeptorkanal existieren 3 Genfamilien, die die Rezeptor-Untereinheiten codieren [68]. Für die Vielfalt des Rezeptors sind nicht nur die verschiedenen Genfamilien verantwortlich, sondern auch Splicing und RNA-Editierung [68;49]. Der NMDA-Rezeptorkanal besteht aus einer heteromeren Zusammenstellung der Untereinheiten NR1 und NR2 oder NR3. Für die NR1-Untereinheit existieren mehrere Splice-Varianten [120] und für die NR2-Untereinheiten existieren vier Subtypen A bis D [105]. Für die NR3-Untereinheit existieren zwei Subtypen A und B [81].

Erst die Coexpression einer NR1-Untereinheit und einer NR2- oder NR3- Untereinheit führt zu einer funktionalen Formation des Rezeptors [120]. Die NR1-Untereinheit ist ausschlaggebend für den Aufbau und Funktion des Kanals [81]. Die NR2-Untereinheit ist für die biophysikalischen und kinetischen Eigenschaften verantwortlich.

Über die Untereinheit-Stöchiometrie wird kontrovers diskutiert. So wird von einigen Forschern ein tetramerer Aufbau angenommen [35;120]. Hierbei unterscheiden sich 3 Segmente (M1, M3 und M4), die als Transmembransegmente die Zellmembran durchspannen. Das Segment (M2), welches durch die Membran schleifenartig verläuft, wird als re-entrant loop bezeichnet [120]. Dieses re-entrant loop bildet die Pore des als Ionenkanal fungierenden NMDA-Rezeptorkanals. Das M2 Segment ist verantwortlich für die Ionenselektivität des Kanals und ist Ort der Magnesium-Blockade. Der in dieser Untersuchung exprimierte Rezeptor besteht aus NR1- und NR2A- Untereinheiten.

Der NMDA-Rezeptorkanal ist ein ligandengesteuerter und spannungsabhängiger Ionenkanal (siehe Abbildung 12, S.35). Die Ligandensteuerung spiegelt sich in der Tatsache wider, dass erst die Bindung des Agonisten Glutamat und des obligatorischen Co-Agonisten Glyzin den NMDA-Rezeptor aktivieren [68]. Dabei bindet Glutamat an die NR2-Untereinheit und Glyzin an die NR1-Untereinheit. Die Spannungsabhängigkeit des Rezeptors spiegelt sich in der Tatsache wider, dass der Rezeptor unter Ruhemembranpotential (-70mV) von extrazellulärem Magnesium blockiert wird [35]. Das extrazelluläre Magnesium ist verantwortlich für die spannungsabhängige Blockade des Kanals. Erst eine Vordepolarisation hebt die spannungsabhängige Magnesium-Blockade auf. Ein Einwärtsstrom von Ionen kann nun stattfinden. AMPA-Rezeptoren sind oft mit NMDA-Rezeptorkanälen auf der gleichen Synapse co-lokalisiert [105]. Dieser Rezeptor wird durch Glutamat aktiviert und ist verantwortlich für die Vordepolarisation, welche die Magnesiumblockade aufhebt [115]. Der NMDA-Rezeptorkanal ist permeabel für monovalente Ionen und für bivalente Calcium-Ionen [81]. Der NMDA-Rezeptorkanal unterliegt der allosterischen Modulation durch zahlreiche Substanzen und Bedingungen [120]. Eine hemmende Wirkung auf den Rezeptor haben Zink und eine hohe intrazelluläre Calciumkonzentration. Letzteres stellt einen Schutzmechanismus gegenüber einem massiven Calcium-Einstrom in die Zelle während Ischämie dar [120]. Eine aktivierende bzw. potenzierende Wirkung auf den Rezeptor haben Histamin und Arachidonsäure. Der Redox-Status spielt ebenfalls eine Rolle, wobei eine Reduktion die Kanalöffnung fördert. Ein anderer Mechanismus der Modulation stellt die Phosphorylierung dar [2]. Proteinkinase C phosphoryliert den NMDA-Rezeptorkanal indirekt, indem sie eine intrazelluläre Kaskade in Gang setzt. Am Ende wird Src, ein Enzym aus der Familie der Proteinkinasen, aktiviert. Src ist für

die Phosphorylierung der Untereinheiten verantwortlich [2]. Dieser Prozess fördert nicht nur die Kanalöffnung an sich, sondern auch die Öffnungsdauer. Eine andere Substanz, die ebenfalls eine modulierende Wirkung auf den NMDA-Rezeptorkanal ausübt, ist Substanz-P [26]. 90% der C-Fasern, die Glutamat in ihren Speichervesikeln haben, verfügen auch über Substanz-P. Diese Coexistenz beider Neurotransmitter verstärkt den Ionen-Einwärtsstrom durch den NMDA-Rezeptorkanal in die Zelle.



**Abbildung 12:** Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptorkanals; Auszug eines Querschnitts. N-Methyl-D-Aspartatsäure (NMDA) ist der synthetisch hergestellte Agonist des Rezeptors. Die Kanalpore ist permeabel für monovalente Ionen wie Kalium ( $K^+$ ), Natrium ( $Na^+$ ) und bivalente Ionen wie Calcium ( $Ca^{++}$ ). Eine Depolarisation hebt die Magnesium- ( $Mg^{++}$ ) Blockade auf. Ionen können jetzt die Kanalpore passieren. Die Bindungsstelle für Glutamat liegt auf NR2-Untereinheit und die für Glyzin auf NR1-Untereinheit. Ähnlich wie Magnesium blockieren auch MK-801 und PCP die Kanalpore. Eine Phosphorylierung moduliert die Rezeptor-Kinetik. Modullierende Faktoren sind: Zink ( $Zn^{++}$ ), Polyamine, pH (Säuren und Basen) und Redox (reduzierende oder oxidierende Substanzen).

#### 4.3.2 *ROLLE IN NOZIZEPTION UND ANDEREN VORGÄNGEN*

Der Schmerz hat die biologisch sinnvolle Funktion, den Körper vor möglichen Gewebsschädigungen zu schützen oder sie zu minimieren. Eine Vielzahl von chemischen, thermischen oder mechanischen Reizen erreicht die Hinterhornzelle des Rückenmarks über C- und A $\delta$ -Fasern. Das Rückenmark ist eine der Schaltebenen der Nozizeption, in der das Vorkommen von NMDA-Rezeptoren gesichert ist. [24]. Wird ein Schmerzreiz an die Hinterhornzelle des Rückenmarks geleitet, werden AMPA-Rezeptoren ( $\alpha$ -amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäure-Rezeptoren) aktiviert. Bei starken Schmerzreizen werden auch andere Rezeptoren rekrutiert, unter anderem NMDA-Rezeptoren. Vom Rückenmark werden die Schmerzfasern in den Thalamus und von dort in den Kortex geleitet. Im Kortex entsteht der Sinneseindruck "Schmerz" [88].

Verliert der Schmerz seine Schutzfunktion, erlangt er einen Krankheitswert. Der NMDA-Rezeptorkanal spielt in pathologischen Schmerzprozessen wie der zentralen Sensibilisierung eine wichtige Rolle. Die zentrale Sensibilisierung ist definiert als eine gesteigerte Erregbarkeit und erhöhte Spontanaktivität von Hinterhornneuronen des Rückenmarks. Klinisch manifestiert sich die zentrale Sensibilisierung in Form von Allodynie und Hyperalgesie. Allodynie ist ein Zustand, in dem zuvor nicht schmerzhaft Reize als schmerzhaft wahrgenommen werden. Wird ein Schmerzreiz als noch intensiver wahrgenommen, wird dies als Hyperalgesie bezeichnet [53]. Im Bereich der Schädigung wird dies als primäre Hyperalgesie und in der Umgebung der Schädigung als sekundäre Hyperalgesie bezeichnet [89]. Um zentrale Sensibilisierung auf zellulärer Ebene zu erklären, bedient man sich eines Modells, welches als long-term-potential (LTP) bezeichnet wird. Bei starken Schmerzreizen wird erstens eine große Menge Glutamat in den synaptischen Spalt der Hinterhornneurone des Rückenmarks ausgeschüttet. Zweitens bewirkt ein starker Schmerzreiz die Aufhebung der spannungsabhängigen Mg<sup>2+</sup>-Blockade des NMDA-Rezeptorkanals. Die Bindung des Glutamats an den Mg<sup>2+</sup>-freien Rezeptorkanal führt zur Öffnung desselben und Calcium-Ionen fließen durch den Kanal. Calcium-Ionen fungieren als ein zweiter Botenstoff und setzen eine Kaskade in Gang, die zu einer Langzeitveränderung der Zelle führt. Unter anderen werden phosphorylierende Enzyme wie Calcium-Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II (CaMKII), Protein Kinase A und Protein

Kinase B aktiviert [89]. Die Phosphorylierung induziert die Transkription von Genen, die zur Expression neuer Proteinen führt. Außerdem erhöhen die Phosphorylierung des NMDA-Rezeptorkanals [22] und des AMPA-Rezeptors [88] die Öffnungswahrscheinlichkeit und Leitfähigkeit beider Rezeptoren. Die darauf folgende Ausschüttung und Bindung des Glutamats führt zu einer stärkeren Erregung der Hinterhornneurone. In diesem Sinne können bereits schwache Schmerzreize eine weitaus stärkere Erregung der Hinterhornneurone auslösen. Die synaptische Langzeitpotenzierung (LTP) hilft somit, die Entstehung der zentralen Sensibilisierung zu erklären [88].

"Wind-up" bezeichnet ursprünglich die Zunahme der Reizantwort der nozizeptiven Nervenzelle im Hinterhorn nach einer sukzessiven C-Faser Reizung. Somit ist "wind-up" ein normales Kodierungsverhalten von einigen Hinterhornzellen des Rückenmarks. Bleibt die C-Faser Reizung jedoch über eine längere Zeit bestehen, können auch niedrige Schmerzreize zu einer Reizantwort führen [87]. Eine konstante C-Faser Stimulation führt zu einer Enthemmung der spannungsabhängigen Magnesium-Blockade des NMDA-Rezeptorkanals [22], wodurch auch niedrige Schmerzreize in der Lage sind, eine Reaktion auszulösen. Die Phänomene "wind-up" und LTP sind nicht gleichzusetzen. Vielmehr kann "wind-up" die Entstehung des LTPs an der C-Faser-Synapse fördern, in dem es durch progressive Depolarisationen den Calcium-Einwärtsstrom durch den NMDA-Rezeptorkanal ermöglicht [89]. Gleichzeitig kann ein bereits bestehendes LTP an der C-Faser Synapse die Entstehung von "wind-up" begünstigen und die Stärke des "wind-ups" erhöhen [87].

Die synaptische Veränderungen in Form von LTP werden auch bei kognitiven Funktionen wie Lernen und Gedächtnis beobachtet [83]. In CA1 Neuronen des Hippocampus initiieren hoch-frequente elektrische Impulse LTP, wodurch synaptische Übertragungen langfristig verändert und effektiver werden [115;73]. LTP erklärt auf zellulärer Ebene auch die räumliche Wahrnehmung und Orientierung. Die Bedeutung des NMDA-Rezeptorkanals liegt nicht ausschließlich in seiner Beteiligung in der Schmerzprozessierung. Dieser Rezeptor spielt eine wichtige Rolle in neurodegenerativen Prozessen des zentralen Nervensystems [81] wie Alzheimer Demenz und Amyotrophe Lateralsklerose [120]. Weiterhin ist dieser Rezeptor in neurotoxischen Prozessen des akuten ischämischen Insults und der Epilepsie beteiligt.

### **4.3.3 VORKOMMEN UND ZUSAMMENSTELLUNG**

Der NMDA-Rezeptorkanal kommt im zentralen Nervensystem des Menschen vor. Es ist weit verbreitet im Hippocampus, Kortex [57] und Hinterhorn des Rückenmarks [105]. Die Untereinheit-Zusammenstellung ist nicht in allen Phasen der Embryonalentwicklung gleich. In der pränatalen Phase besteht der Rezeptor vorwiegend aus der obligatorischen NR1-Untereinheit und NR2B- oder NR2D-Untereinheit [57;76]. Die heteromere Zusammenstellung unterliegt einem sehr komplexen System der Endo- und Exozytose. In der vorgeburtlichen Phase ist die Rate der Endo-, Exozytose und des Traffickings innerhalb der Zelle sehr hoch. Kurz vor der Geburt nimmt diese Rate ab. In dieser Phase besteht der Rezeptor vorwiegend aus NR1- und NR2A- oder NR2B-Untereinheiten. Diese NR1/NR2A-Konstellation spiegelt den Aufbau einer konstanten Synapse wider und ist im post-synaptischen Bereich lokalisiert.

## **4.4 METAMIZOL IN DER SCHMERZTHERAPIE**

Im kommenden Abschnitt wird die Rolle des Metamizol als NMDA-Rezeptorkanalblocker in der Schmerztherapie vorgestellt. Zudem wird auf die Frage eingegangen, welche Interaktionen zwischen Opiaten und Metamizol existieren. Abschließend werden die Einflussmöglichkeiten des Metamizols in zentraler Sensibilisierung und zukünftige Studien dargestellt.

### **4.4.1 INTERAKTION ZWISCHEN OPIATEN UND METAMIZOL**

Die zentrale Aussage dieser Untersuchung ist, dass Metamizol und sein Metabolit 4-Aminoanitpyrin den NMDA-Rezeptorkanal hemmen. Die Tragweite dieser Feststellung auf den Einsatz des Metamizols in der Schmerztherapie wird an dieser Stelle dargestellt.

Seit dem Jahre 1986 empfiehlt die World Health Organisation (WHO) den Einsatz einer Kombination bestehend aus einem Opioid und Nicht-Opioid in ihrer letzten Stufe der Schmerztherapie. Zu den Nicht-Opioiden gehört unter anderem Metamizol. Hernandez-Delgadillo und Mitarbeiter zeigen, dass die Kombination aus Morphin und Metamizol eine anti-nozizeptive Potenzierung bewirkt [43]. Die analgetische Wirkung

der Kombination ist größer als die Summe der Einzelwirkungen, da sich Morphin und Metamizol in ihrer Analgesie synergistisch verhalten [44]. Metamizol kann zwar die Entwicklung einer Morphin-Toleranz nicht verhindern, sie jedoch verzögern. Diese toleranzverzögernde Wirkung wird mit NMDA-Rezeptorkanal Antagonismus durch Metamizol in Verbindung gebracht. Im klinischen Alltag kann eine bestehende Morphin-Toleranz mit Dosiserhöhung überwunden werden. Der Einsatz von Metamizol bietet eine vorteilhafte Alternative, denn es kann die übermäßige Dosiserhöhung und damit einhergehenden Morphin-Nebenwirkungen verhindern.

#### ***4.4.2 EINFLUSS AUF DIE ZENTRALE SENSIBILISIERUNG***

Wie bereits beschrieben ist eine Aktivierung des NMDA-Rezeptorkanals für die zentrale Sensibilisierung und Hyperalgesie entscheidend. Unter Hyperalgesie versteht man eine verstärkte Antwort auf einen schmerzhaften Reiz. Zentrale Sensibilisierung bedeutet, dass ein Schmerzreiz bei gleicher Intensität als schmerzhafter empfunden wird [10]. Eine NMDA-Rezeptorkanal-Aktivierung wird nicht nur durch eine Gewebsverletzung und darauf folgende C-Faser Stimulation initiiert. Eine NMDA-Rezeptorkanal-Aktivierung wird auch durch Opiate wie Morphin und Fentanyl angenommen [15;41]. So stehen sich zwei entgegengesetzte Opiat-Effekte gegenüber: Antinozizeption versus Pronozizeption. In diesem Sinne führt eine durch Opiate ausgelöste NMDA-Rezeptorkanal-Aktivierung zu einem pronozizeptiven Effekt, der mit Hyperalgesie und zentraler Sensibilisierung assoziiert wird. Im tierexperimentellen Modell zeigt eine Vorbehandlung mit dem NMDA-Rezeptorkanal-Blocker MK-801, dass die durch Opioide induzierte Hyperalgesie verhindert werden kann [15]. Schmerzformen wie zentrale Sensibilisierung sprechen kaum auf Opiate an, da der Prozess des "wind-ups" bereits stattgefunden hat [26]. Unter diesen Bedingungen ist der nicht-kompetitive NMDA-Rezeptorkanal-Blocker Ketamin wirkungsvoll und kann die zentrale Sensibilisierung blockieren. Weiterhin konnten Woolf und Mitarbeiter in tierexperimentellen Versuchen zeigen, dass die NMDA-Rezeptorkanal-Blocker MK-801 und D-CCP (3-propyl-1-phosphonic-acid) die Auslösung und Aufrechterhaltung der zentralen Sensibilisierung blockieren [116].

#### **4.4.3 ZUKÜNFTIGE STUDIEN**

Zukünftige Studien sollten die NMDA-Rezeptorkanal blockierende Wirkung des Metamizols und des 4-Aminoantipyrins in Hinblick auf zentrale Sensibilisierung und Hyperalgesie prüfen. Nahe liegend sind die Annahmen, dass ein präventiver Einsatz von Metamizol das Entstehen der zentralen Sensibilisierung und der Hyperalgesie verhindern könnte. Außerdem könnten sich Metamizol und 4-AA im Zustand der zentralen Sensibilisierung als wirkungsvoll erweisen. Es gibt wenige Untersuchungen, die die Metamizol-Toleranzentwicklung thematisieren. Hernandez-Delgadillo und Mitarbeiter zeigen im tierexperimentellen Modell, dass es nach einer langen Anwendung des Metamizols zu einer Toleranz gegenüber thermischen Reizen kommt. Weitere Forschungen sind auch in diesem Bereich notwendig.

## **5. ZUSAMMENFASSUNG**

Obwohl die Peripherie und das zentrale Nervensystem als Wirkorte des Metamizols gesichert sind, ist der genaue molekulare Wirkmechanismus, der für die analgetische Wirkung verantwortlich ist, bis heute nicht eindeutig geklärt. Basierend auf dem Wissen, dass NMDA-Rezeptorkanäle in pathologischen Schmerzprozessen wie der zentralen Sensibilisierung und der Hyperalgesie beteiligt sind, wird in dieser Arbeit die Hypothese überprüft, ob Metamizol seine Wirkung durch eine Hemmung des humanen NMDA-Rezeptorkanals entfaltet. Zusätzlich wird untersucht, welche Einflüsse dessen Metabolite auf den NMDA-Rezeptorkanal haben.

Zu diesem Zweck werden humane NMDA-Rezeptorkanäle des Subtyps NR1/NR2A in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Dazu wird in-vitro die Messenger-RNA, kodierend für NMDA-Rezeptorkanäle, präpariert und vermehrt. Anschließend erfolgt die Injektion in Oozyten. Nach 48 stündiger Inkubationszeit werden die an der Zelloberfläche exprimierten NMDA-Rezeptorkanäle untersucht. Hierzu werden die mit mRNA injizierten Zellen für jeweils 10 Minuten in Metamizol, 4-Aminnoantipyrin oder 4-Methylantipyrin inkubiert. Die Messung des veränderten Ionenstroms durch



Metamizol und seine Metaboliten erfolgt mittels Zwei-Elektroden-Voltage-Clamp-Technik.

Die Untersuchungen führen zu folgenden Ergebnissen: Native, defollikulierte Zellen zeigen keine Reaktion auf die physiologischen Agonisten des NMDA-Rezeptorkanals Glutamat und Glyzin. Messenger-RNA injizierte Zellen reagieren auf Glutamat/Glyzin-Zugabe mit einer NMDA-Rezeptorkanal-Aktivierung, wodurch ein Ioneneinwärtsstrom entsteht. Eine 10 minutige Inkubation in Metamizol führt zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung. Eine signifikante Hemmung findet bei Metamizol in Konzentrationen von  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M statt. Der Metabolit 4-Aminoantipyrin inhibiert ebenfalls die Antwort auf die Glutamat/Glyzin-Zugabe. Hierbei findet eine signifikante Hemmung bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  M statt. 4-Methylaminoantipyrin zeigt keine inhibierende Wirkung.

Die Befunde, dass sowohl Metamizol als auch 4-Aminoantipyrin den humanen NR1/2A NMDA-Rezeptorkanal hemmen, bieten eine weitere Erklärung für die stark analgetische Wirkung des Metamizols und leistet einen Beitrag zur Identifikation der molekularen Wirkmechanismen des Metamizols. Daraus könnten sich weitere Ansatzpunkte für die Behandlung und Vorbeugung von pathologischen Schmerzprozessen wie zentraler Sensibilisierung und Hyperalgesie ergeben.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Aguirre-Banuelos P, Granados-Soto V. Evidence for a peripheral mechanism of action for the potentiation of the antinociceptive effect of morphine by dipyron. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1999; 42(2):79-85.
2. Ali DW, Salter MW. NMDA receptor regulation by src kinase signalling in excitatory synaptic transmission and plasticity. *Curr Opin Neurobiol*. 2001; 11(3):336-342.
3. Alves D, Duarte I. Involvement of ATP-sensitive K(+) channels in the peripheral antinociceptive effect induced by dipyron. *Eur J Pharmacol*. 2002; 444(1-2):47-52.
4. Amaya E. Xenomics. *Genome Res*. 2005; 15(12):1683-1691.
5. Arellano F, Sacristan JA. Metamizole: Reassessment of its therapeutic role. *Eur J Clin Pharmacol*. 1990; 38(6):617-619.
6. Beirith A, Santos AR, Rodrigues AL, Creczynski-Pasa TB, Calixto JB. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. study of the mechanism of action. *Eur J Pharmacol*. 1998; 345(3):233-245.
7. Bensenor IM. To use or not to use dipyron? or maybe, central station versus ER? that is the question. *Sao Paulo Med J*. 2001; 119(6):190-191.
8. Benveniste M, Mayer ML. Kinetic analysis of antagonist action at N-methyl-D-aspartic acid receptors. two binding sites each for glutamate and Glyzine. *Biophys J*. 1991; 59(3):560-573.
9. Berardi S, Hagenbuch B, Carafoli E, Krahenbuhl S. Characterization of the endogenous carnitine transport and expression of a rat renal na(+)-dependent carnitine transport system in xenopus laevis oocytes. *Biochem J*. 1995; 309 ( Pt 2)(Pt 2):389-393.
10. Brack A, Rittner HL, Schafer M. Non-opioid analgesics for perioperative pain therapy. risks and rational basis for use. *Anaesthesist*. 2004; 53(3):263-280.
11. Brandstatter G, Schinzel S, Wurzer H. Influence of spasmolytic analgesics on motility of sphincter of oddi. *Dig Dis Sci*. 1996; 41(9):1814-1818.
12. Brogden RN. Pyrazolone derivatives. *Drugs*. 1986; 32 Suppl 4:60-70.
13. Carlsson KH, Helmreich J, Jurna I. Activation of inhibition from the periaqueductal grey matter mediates central analgesic effect of metamizol (dipyron). *Pain*. 1986; 27(3):373-390.
14. Carpenter KJ, Dickenson AH. Molecular aspects of pain research. *Pharmacogenomics J*. 2002; 2(2):87-95.
15. Celerier E, Laulin J, Larcher A, Le Moal M, Simonnet G. Evidence for opiate-activated NMDA processes masking opiate analgesia in rats. *Brain Res*. 1999; 847(1):18-25.

16. Celerier E, Laulin JP, Corcuff JB, Le Moal M, Simonnet G. Progressive enhancement of delayed hyperalgesia induced by repeated heroin administration: A sensitization process. *J Neurosci*. 2001; 21(11):4074-4080.
17. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(21):13926-13931.
18. Chaplan SR, Malmberg AB, Yaksh TL. Efficacy of spinal NMDA receptor antagonism in formalin hyperalgesia and nerve injury evoked allodynia in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997; 280(2):829-838.
19. Chen L, Huang LY. Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation. *Nature*. 1992; 356(6369):521-523.
20. Cohen O, Zylber-Katz E, Caraco Y, Granit L, Levy M. Cerebrospinal fluid and plasma concentrations of dipyron metabolites after a single oral dose of dipyron. *Eur J Clin Pharmacol*. 1998; 54(7):549-553.
21. Collares EF, Vinagre AM. Evidence of the effect of dipyron on the central nervous system as a determinant of delayed gastric emptying observed in rats after its administration. *Braz J Med Biol Res*. 2003; 36(10):1375-1382.
22. Costigan M, Woolf CJ. Pain: Molecular mechanisms. *J Pain*. 2000; 1(3 Suppl):35-44.
23. Dascal N. The use of xenopus oocytes for the study of ion channels. *CRC Crit Rev Biochem*. 1987; 22(4):317-387.
24. Dickenson AH. NMDA receptor antagonists: Interactions with opioids. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1997; 41(1 Pt 2):112-115.
25. Dickenson AH. Spinal cord pharmacology of pain. *Br J Anaesth*. 1995; 75(2):193-200.
26. Dickenson AH. Central acute pain mechanisms. *Ann Med*. 1995; 27(2):223-227.
27. Dickenson AH. Neurophysiology of opioid poorly responsive pain. *Cancer Surv*. 1994; 21:5-16.
28. Dickenson AH. A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends Pharmacol Sci*. 1990; 11(8):307-309.
29. Doretto MC, Garcia-Cairasco N, Pimenta NJ, Souza DA, Tatsuo MA. Dipyron, a novel anticonvulsant agent? insights from three experimental epilepsy models. *Neuroreport*. 1998; 9(10):2415-2421.
30. Dray A, Urban L, Dickenson A. Pharmacology of chronic pain. *Trends Pharmacol Sci*. 1994; 15(6):190-197.
31. Dumont JN. Oogenesis in xenopus laevis (daudin). I. stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J Morphol*. 1972; 136(2):153-179.

32. Dumont JN, Brummett AR. Oogenesis in *xenopus laevis* (daudin). V. relationships between developing oocytes and their investing follicular tissues. *J Morphol.* 1978; 155(1):73-97.
33. Dunbar SA, Pulai IJ. Repetitive opioid abstinence causes progressive hyperalgesia sensitive to N-methyl-D-aspartate receptor blockade in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284(2):678-686.
34. Ergun H, Frattarelli DA, Aranda JV. Characterization of the role of physicochemical factors on the hydrolysis of dipyrone. *J Pharm Biomed Anal.* 2004; 35(3):479-487.
35. Gasic GP, Hollmann M. Molecular neurobiology of glutamate receptors. *Annu Rev Physiol.* 1992; 54:507-536.
36. Gordh T, Karlsten R, Kristensen J. Intervention with spinal NMDA, adenosine, and NO systems for pain modulation. *Ann Med.* 1995; 27(2):229-234.
37. Guo H, Huang LY. Alteration in the voltage dependence of NMDA receptor channels in rat dorsal horn neurones following peripheral inflammation. *J Physiol.* 2001; 537(Pt 1):115-123.
38. Guo W, Zou S, Guan Y, et al. Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci.* 2002; 22(14):6208-6217.
39. Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G. Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature.* 1971; 233(5316):177-182.
40. Hahnenkamp K, Durieux ME, Hahnenkamp A, et al. Local anaesthetics inhibit signalling of human NMDA receptors recombinantly expressed in *xenopus laevis* oocytes: Role of protein kinase C. *Br J Anaesth.* 2006; 96(1):77-87.
41. Hahnenkamp K, Nollet J, Van Aken HK, et al. Remifentanyl directly activates human N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *xenopus laevis* oocytes. *Anesthesiology.* 2004; 100(6):1531-1537.
42. Hernandez N, Vanegas H. Antinociception induced by PAG-microinjected dipyrone (metamizol) in rats: Involvement of spinal endogenous opioids. *Brain Res.* 2001; 896(1-2):175-178.
43. Hernandez-Delgadillo GP, Cruz SL. Dipyrone potentiates morphine-induced antinociception in dipyrone-treated and morphine-tolerant rats. *Eur J Pharmacol.* 2004; 502(1-2):67-73.
44. Hernandez-Delgadillo GP, Lopez-Munoz FJ, Salazar LA, Cruz SL. Morphine and dipyrone co-administration delays tolerance development and potentiates antinociception. *Eur J Pharmacol.* 2003; 469(1-3):71-79.
45. Hinz B, Cheremina O, Bachmakov J, et al. Dipyrone elicits substantial inhibition of peripheral cyclooxygenases in humans: New insights into the pharmacology of an old analgesic. *FASEB J.* 2007; 21;000-000 (noch keine Printausgabe verfügbar)
46. Hollmann M, Heinemann S. Cloned glutamate receptors. *Annu Rev Neurosci.* 1994; 17:31-108.

47. Hollmann M, O'Shea-Greenfield A, Rogers SW, Heinemann S. Cloning by functional expression of a member of the glutamate receptor family. *Nature*. 1989; 342(6250):643-648.
48. Hollmann MW, Liu HT, Hoenemann CW, Liu WH, Durieux ME. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium. part II: Interactions with volatile anesthetics. *Anesth Analg*. 2001; 92(5):1182-1191.
49. Hucho F, Weise C. Ligandengesteuerte Ionenkanäle. *Angewandte Chemie*. 2001; 113:3194-3211.
50. Ibanez CF, Hallbook F, Godeau F, Persson H. Expression of neurotrophin-4 mRNA during oogenesis in *xenopus laevis*. *Int J Dev Biol*. 1992; 36(2):239-245.
51. Izquierdo I. Pharmacological evidence for a role of long-term potentiation in memory. *FASEB J*. 1994; 8(14):1139-1145.
52. Kopec CD, Li B, Wei W, Boehm J, Malinow R. Glutamate receptor exocytosis and spine enlargement during chemically induced long-term potentiation. *J Neurosci*. 2006; 26(7):2000-2009.
53. Koppert W. Opioid-induced analgesia and hyperalgesia. *Schmerz*. 2005; 19(5):386-90, 392-4.
54. Kyrozis A, Albuquerque C, Gu J, MacDermott AB. Ca<sup>2+</sup>-dependent inactivation of NMDA receptors: Fast kinetics and high Ca<sup>2+</sup> sensitivity in rat dorsal horn neurons. *J Physiol*. 1996; 495 (2):449-463.
55. Laird JM, de la Rubia PG, Cervero F. Excitability changes of somatic and viscerosomatic nociceptive reflexes in the decerebrate-spinal rabbit: Role of NMDA receptors. *J Physiol*. 1995; 489 (2):545-555.
56. Lang C, Barco A, Zablow L, Kandel ER, Siegelbaum SA, Zakharenko SS. Transient expansion of synaptically connected dendritic spines upon induction of hippocampal long-term potentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(47):16665-16670.
57. Lavezzari G, McCallum J, Dewey CM, Roche KW. Subunit-specific regulation of NMDA receptor endocytosis. *J Neurosci*. 2004; 24(28):6383-6391.
58. Le Bourdelles B, Wafford KA, Kemp JA, et al. Cloning, functional coexpression, and pharmacological characterisation of human cDNAs encoding NMDA receptor NR1 and NR2A subunits. *J Neurochem*. 1994; 62(6):2091-2098.
59. Leonard JP, Kelso SR. Apparent desensitization of NMDA responses in *xenopus* oocytes involves calcium-dependent chloride current. *Neuron*. 1990; 4(1):53-60.
60. Levy M, Brune K, Zylber-Katz E, Cohen O, Caraco Y, Geisslinger G. Cerebrospinal fluid prostaglandins after systemic dipyron intake. *Clin Pharmacol Ther*. 1998; 64(1):117-122.
61. Levy M, Zylber-Katz E, Rosenkranz B. Clinical pharmacokinetics of dipyron and its metabolites. *Clin Pharmacokinet*. 1995; 28(3):216-234.

62. Liao GY, Wagner DA, Hsu MH, Leonard JP. Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. *Mol Pharmacol.* 2001; 59(5):960-964.
63. Lisman J. Long-term potentiation: Outstanding questions and attempted synthesis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2003; 358(1432):829-842.
64. Liu HT, Hollmann MW, Liu WH, Hoenemann CW, Durieux ME. Modulation of NMDA receptor function by ketamine and magnesium: Part I. *Anesth Analg.* 2001; 92(5):1173-1181.
65. Madeja M, Musshoff U, Speckmann EJ. Follicular tissues reduce drug effects on ion channels in oocytes of *xenopus laevis*. *Eur J Neurosci.* 1997; 9(3):599-604.
66. Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD. Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(14):7731-7736.
67. Mayer M. Molecular neurobiology. NMDA receptors cloned at last. *Nature.* 1991; 354(6348):16-17.
68. Mayer ML, Armstrong N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol.* 2004; 66:161-181.
69. Mazario J, Herrero JF. Antinociceptive effects of metamizol (dipyrone) in rat single motor units. *Neurosci Lett.* 1999; 274(3):179-182.
70. Methfessel C, Witzemann V, Takahashi T, Mishina M, Numa S, Sakmann B. Patch clamp measurements on *xenopus laevis* oocytes: Currents through endogenous channels and implanted acetylcholine receptor and sodium channels. *Pflugers Arch.* 1986; 407(6):577-588.
71. Miledi R, Parker I, Woodward RM. Membrane currents elicited by divalent cations in *xenopus* oocytes. *J Physiol.* 1989; 417:173-195.
72. Miledi R, Woodward RM. Effects of defolliculation on membrane current responses of *xenopus* oocytes. *J Physiol.* 1989; 416:601-621.
73. Miyamoto E. Molecular mechanism of neuronal plasticity: Induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100(5):433-442.
74. Moar VA, Gurdon JB, Lane CD, Marbaix G. Translational capacity of living frog eggs and oocytes, as judged by messenger RNA injection. *J Mol Biol.* 1971; 61(1):93-103.
75. Montes A, Warner W, Puig MM. Use of intravenous patient-controlled analgesia for the documentation of synergy between tramadol and metamizol. *Br J Anaesth.* 2000; 85(2):217-223.
76. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH. Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron.* 1994; 12(3):529-540.
77. Mori H, Masaki H, Yamakura T, Mishina M. Identification by mutagenesis of a  $mg(2+)$ -block site of the NMDA receptor channel. *Nature.* 1992; 358(6388):673-675.

78. Moriyoshi K, Masu M, Ishii T, Shigemoto R, Mizuno N, Nakanishi S. Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature*. 1991; 354(6348):31-37.
79. Morris RG. Long-term potentiation and memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003; 358(1432):643-647.
80. Parada CA, Vivancos GG, Tambeli CH, de Queiroz Cunha F, Ferreira SH. Activation of presynaptic NMDA receptors coupled to NaV1.8-resistant sodium channel C-fibers causes retrograde mechanical nociceptor sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(5):2923-2928.
81. Petrenko AB, Yamakura T, Baba H, Shimoji K. The role of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in pain: A review. *Anesth Analg*. 2003; 97(4):1108-1116.
82. Pierre SC, Schmidt R, Brenneis C, Michaelis M, Geisslinger G, Scholich K. Inhibition of cyclooxygenases by dipyrone. *Br J Pharmacol*. 2007 June;151(4):494-503.
83. Prybylowski K, Wenthold RJ. N-methyl-D-aspartate receptors: Subunit assembly and trafficking to the synapse. *J Biol Chem*. 2004; 279(11):9673-9676.
84. Quartaroli M, Carignani C, Dal Forno G, et al. Potent antihyperalgesic activity without tolerance produced by Glyzine site antagonist of N-methyl-D-aspartate receptor GV196771A. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 290(1):158-169.
85. Reinhardt N, Jantos R, Sinning C, Imming P. Renaissance eines Analgetikums. *Pharmazeutische Zeitung Online* 2006; 32.
86. Sachs D, Cunha FQ, Ferreira SH. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: Activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase G/ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(10):3680-3685.
87. Sandkuhler J. Neurobiologische Grundlagen des Scherzgedächtnisses. *Psychoneuro*. 2005;31(2): 77-80
88. Sandkuhler J. Schmerzgedächtnis. *Deutsches Ärzteblatt*. 2001; 98(42):2725-2730.
89. Sandkuhler J. Learning and memory in pain pathways. *Pain*. 2000; 88(2):113-118.
90. Sandkuhler J, Liu X. Induction of long-term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury. *Eur J Neurosci*. 1998; 10(7):2476-2480.
91. Schito AM, Pizzuti A, Di Maria E, et al. mRNA distribution in adult human brain of GRIN2B, a N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunit. *Neurosci Lett*. 1997; 239(1):49-53.
92. Schreibmayer W, Lester HA, Dascal N. Voltage clamping of xenopus laevis oocytes utilizing agarose-cushion electrodes. *Pflugers Arch*. 1994; 426(5):453-458.
93. Sheng M, Hyoung Lee S. AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity: Major unanswered questions. *Neurosci Res*. 2003; 46(2):127-134.

94. Siebel JS, Beirith A, Calixto JB. Evidence for the involvement of metabotropic glutamatergic, neurokinin 1 receptor pathways and protein kinase C in the antinociceptive effect of dipyrone in mice. *Brain Res.* 2004; 1003(1-2):61-67.
95. Sigel E. Use of xenopus oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. *J Membr Biol.* 1990; 117(3):201-221.
96. Sluka KA, Audette KM. Activation of protein kinase C in the spinal cord produces mechanical hyperalgesia by activating glutamate receptors, but does not mediate chronic muscle-induced hyperalgesia. *Mol Pain.* 2006; 2:13.
97. Soloviev MM, Barnard EA. Xenopus oocytes express a unitary glutamate receptor endogenously. *J Mol Biol.* 1997; 273(1):14-18.
98. Soloviev MM, Brierley MJ, Shao ZY, et al. Functional expression of a recombinant unitary glutamate receptor from xenopus, which contains N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor subunits. *J Biol Chem.* 1996; 271(51):32572-32579.
99. Soreq H. The biosynthesis of biologically active proteins in mRNA-microinjected xenopus oocytes. *CRC Crit Rev Biochem.* 1985; 18(3):199-238.
100. Soreq H, Seidman S. Xenopus oocyte microinjection: From gene to protein. *Methods Enzymol.* 1992; 207:225-265.
101. South SM, Kohno T, Kaspar BK, et al. A conditional deletion of the NR1 subunit of the NMDA receptor in adult spinal cord dorsal horn reduces NMDA currents and injury-induced pain. *J Neurosci.* 2003; 23(12):5031-5040.
102. Stanfa LC, Misra C, Dickenson AH. Amplification of spinal nociceptive transmission depends on the generation of nitric oxide in normal and carrageenan rats. *Brain Res.* 1996; 737(1-2):92-98.
103. Stein C, Schafer M, Hassan AH. Peripheral opioid receptors. *Ann Med.* 1995; 27(2):219-221.
104. Sullivan LM, Honemann CW, Arledge JA, Durieux ME. Synergistic inhibition of lysophosphatidic acid signaling by charged and uncharged local anesthetics. *Anesth Analg.* 1999; 88(5):1117-1124.
105. Tolle TR, Berthele A, Zieglansberger W, Seeburg PH, Wisden W. The differential expression of 16 NMDA and non-NMDA receptor subunits in the rat spinal cord and in periaqueductal gray. *J Neurosci.* 1993; 13(12):5009-5028.
106. Tovar KR, Westbrook GL. The incorporation of NMDA receptors with a distinct subunit composition at nascent hippocampal synapses in vitro. *J Neurosci.* 1999; 19(10):4180-4188.
107. Vlahov V, Badian M, Verho M, Bacracheva N. Pharmacokinetics of metamizol metabolites in healthy subjects after a single oral dose of metamizol sodium. *Eur J Clin Pharmacol.* 1990; 38(1):61-65.



108. Wagner CA, Friedrich B, Setiawan I, Lang F, Broer S. The use of xenopus laevis oocytes for the functional characterization of heterologously expressed membrane proteins. *Cell Physiol Biochem*. 2000; 10(1-2):1-12.
109. Washbourne P, Liu XB, Jones EG, McAllister AK. Cycling of NMDA receptors during trafficking in neurons before synapse formation. *J Neurosci*. 2004; 24(38):8253-8264.
110. Weber W. Ion currents of xenopus laevis oocytes: State of the art. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1421(2):213-233.
111. Weber WM. Endogenous ion channels in oocytes of xenopus laevis: Recent developments. *J Membr Biol*. 1999; 170(1):1-12.
112. Wenthold RJ, Prybylowski K, Standley S, Sans N, Petralia RS. Trafficking of NMDA receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2003; 43:335-358.
113. Wilson JA, Garry EM, Anderson HA, et al. NMDA receptor antagonist treatment at the time of nerve injury prevents injury-induced changes in spinal NR1 and NR2B subunit expression and increases the sensitivity of residual pain behaviours to subsequently administered NMDA receptor antagonists. *Pain*. 2005; 117(3):421-432.
114. Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(14):7723-7730.
115. Woolf CJ, Salter MW. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science*. 2000; 288(5472):1765-1769.
116. Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*. 1991; 44(3):293-299.
117. Wu LJ, Toyoda H, Zhao MG, et al. Upregulation of forebrain NMDA NR2B receptors contributes to behavioral sensitization after inflammation. *J Neurosci*. 2005; 25(48):11107-11116.
118. Yaksh TL, Hua XY, Kalcheva I, Nozaki-Taguchi N, Marsala M. The spinal biology in humans and animals of pain states generated by persistent small afferent input. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(14):7680-7686.
119. Yamakura T, Harris RA. Effects of gaseous anesthetics nitrous oxide and xenon on ligand-gated ion channels. comparison with isoflurane and ethanol. *Anesthesiology*. 2000; 93(4):1095-1101.
120. Yamakura T, Shimoji K. Subunit- and site-specific pharmacology of the NMDA receptor channel. *Prog Neurobiol*. 1999; 59(3):279-298.
121. Zhang HM, Zhou LJ, Hu XD, Hu NW, Zhang T, Liu XG. Acute nerve injury induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn of intact rat. *Sheng Li Xue Bao*. 2004; 56(5):591-596.
122. Zylber-Katz E, Granit L, Levy M. Plasma protein binding of dipyrone metabolites in man. *Eur J Clin Pharmacol*. 1985; 29(1):67-71.

## **7. DANKSAGUNG**

Herr Privatdozent Dr. med. Klaus Hahnenkamp hat mir die Möglichkeit gegeben, einen Einblick in die medizinische Forschung zu gewinnen, weshalb ich ihm sehr verbunden bin. Für seine gute Betreuung und Unterstützung möchte ich mich an dieser Stelle herzlich bedanken. Weiterhin bin ich Frau Kathrin Schulnies für ihre Geduld und ihre guten Ratschläge zu Dank verpflichtet.

Ein großer Dank gilt meiner Familie und hier insbesondere meiner Schwester Ludmilla.

Ich möchte die Gelegenheit ergreifen und mich ganz herzlich bei Dr. med. Assemi-Kabir bedanken, der mich auf meinem beruflichen Weg maßgeblich geprägt hat.



# ANHANG

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1, S. 3** *Xenopus laevis*, Weibchen.
- Abbildung 2, S. 6** Defolikulierte Oozyten.
- Abbildung 3, S. 9** Schematische Darstellung der Transkription und Translation. Nach in vitro Transkription der komplementären DNA (cDNA) erfolgt die Translation der komplementären RNA (cRNA) im hellen Pol der Oozyte. Das aus der Translation hervorgegangene Protein wird an der Zelloberfläche exprimiert und dient der physiologischen Untersuchung.
- Abbildung 4, S. 15** Calciumfreie-Tyrodes-Lösung.
- Abbildung 5, S. 15** Mengenangaben für Modified Bath Solution, ND 96.
- Abbildung 6, S. 16** Mengenangaben für Oocytes-Ringer-Solution, OR-2.
- Abbildung 7, S. 16** Molekularer Aufbau des Glutamats und Glyzins; beide sind physiologische Agonisten des NMDA-Rezeptors.
- Abbildung 8, S. 17** Molekulare Struktur von Metamizol, 4-Methylaminoantipyrin und 4-Aminoantipyrin. 4-Methylaminoantipyrin entsteht aus der nicht-enzymatischen Hydrolyse des Dipyrone im Gastrointestinaltrakt. 4-Aminoantipyrin entsteht aus der enzymatischen Demethylierung des 4-Methylaminoantipyrins in der Leber.
- Abbildung 9, S. 19** Zwei repräsentative Antworten von mit mRNA injizierten Zellen auf Glutamat/Glyzin-Zugabe. Auf den Abszissen ist die Zeit in Sekunden dargestellt. Auf den Ordinaten ist Strom in  $\mu\text{A}$  angegeben. Die obere Grafik zeigt die Antwort der Zelle auf Glutamat/Glyzin-Zugabe ohne vorherige Inkubation in Metamizol. Die untere Grafik zeigt die Antwort der Zelle nach 10 minutiger Inkubation in Metamizol-Lösung mit einer Konzentration von  $10^{-4}$  M.
- Abbildung 10, S. 20** Auf der Abszisse sind die Konzentrationen des Metamizols

dargestellt. Auf der Ordinate ist der Einwärtsstrom in Prozenten des Kontrollwertes (ctrl) dargestellt. Eine Hemmung des NMDA-Rezeptors durch Metamizol führt zu einer Abnahme des Einwärtsstromes. Diese Hemmung ist konzentrationsabhängig. Eine signifikante Hemmung (\*) erfolgt bei den Konzentrationen von  $10^{-4}$  M und  $10^{-5}$  M.

**Abbildung 11, S. 22** Auf der Abszisse sind Kontrollwerte, Metamizol, 4-Aminoantipyridin (4-AA) und 4-Methylaminoantipyridin (4-MAA) in einer Konzentration von  $10^{-4}$  Molar dargestellt. Auf der Ordinate ist der Einwärtsstrom in Prozent des Kontrollwertes dargestellt. 4-Aminonaptyrin hemmt den NMDA-Rezeptorkanal bei einer Konzentration von  $10^{-4}$  Molar. 4-Aminoantipyridin zeigt im Vergleich zu Metamizol eine etwas geringere Hemmung des NMDA-Rezeptorkanals. 4-Methylaminoantipyridin hat keine hemmende Wirkung auf den NMDA-Rezeptorkanal. Der Asterisk (\*) weist auf signifikante Unterschiede zu Kontrollwerten.

**Abbildung 12, S. 35** Schematische Darstellung des NMDA-Rezeptorkanals; Auszug eines Querschnitts. N-Methyl-D-Aspartatsäure (NMDA) ist der synthetisch hergestellte Agonist des Rezeptors. Die Kanalpore ist permeabel für monovalente Ionen wie Kalium ( $K^+$ ), Natrium ( $Na^+$ ) und bivalente Ionen wie Calcium ( $Ca^{2+}$ ). Eine Depolarisation hebt die Magnesium- ( $Mg^{2+}$ ) Blockade auf. Ionen können jetzt die Kanalpore passieren. Die Bindungsstelle für Glutamat liegt auf NR2-Untereinheit und die für Glyzin auf NR1-Untereinheit. Ähnlich wie Magnesium blockieren auch MK-801 und PCP die Kanalpore. Eine Phosphorylierung moduliert die Rezeptor-Kinetik. Modulierende Faktoren sind: Zink ( $Zn^{2+}$ ), Polyamine, pH (Säuren und Basen) und Redox (reduzierende oder oxidierende Substanzen).

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA/4-AA	Aminoantipyrin/4-Aminoantipyrin
Abb.	Abbildung
ACPD	1-Amino-1,3-Dicarboxycyclopentane
AMPA	Alpha-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isioxazolepropionic-Acid
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Protein Kinase II
cDNA	complementary Desoxynucleinacid
Cmax	Maximale Plasmakonzentration
COX	Cyclooxygenase
ctrl	Kontrolle
D-CCP	3-propyl-1-phosphonic-acid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
DNS	Desoxyriboneukleinsäure
EC <sub>50</sub>	Halbmaximale Effektkonzentration
EcoRV	Nuclease
ED <sub>50</sub>	Effektivdosis 50
g	Gramm
Glu	Glutamat
Gly	Glyzin
HCl	Salzsäure
Kg	Kilogramm
l	Liter
L-AP4	L-2-amino-4-phosphonobutyric acid
L-Arginin/NO/cGMP	L-Arginin/Stickstoffmonoxid/cycling Guanosinmonophosphat
LTP	Long Term Potentiation
M	Molar
M1-M4	Untereinheit-Segmente
MAA/4-MAA	Methylaminoantipyrin/4-Methylaminoantipyrin
mg	Milligramm

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonucleic Acid
mV	Millivolt
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p	Probability;Wahrscheinlichkeit
PAG	Periaquäduktales Grau
pcDAI/Amp	Vektor
PKC	Proteinkinase C
RNA	Ribonucleic Acid
S.	Seite
Tis-HEPES	Tris-hydroxy-methyl-aminomethan-N- hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonat
tmax	Zeit bis zur maximalen Plasmakonzentration
WHO	World Health Organisation
Xen NR1	Xenopus laevis NR1-Untereinheit
Xen U1	Xenopus laevis Glutamatrezeptor-Untereinheit
ZNS	Zentrales Nervensystem

# **GENEHMIGUNG DER BEZIRKSREGIERUNG MÜNSTER**





## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Frau  
PD Dr. med. B. Link  
Institut für Pharmakologie und  
Toxikologie  
Universitätsklinikum Münster  
Domagkstr. 12

48149 Münster

Dienstgebäude:  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2104  
Telefax:  
Raum: 423  
Auskunft erteilt:  
Kerstin Stichling  
E-Mail:  
kerstin.stichling@bezreg-muenster.nrw.de  
Aktenzeichen:  
50.0835.2.0 (A 40/2000)

21. Mai 2003

### Änderungsanzeige zu Versuchsvorhaben gem. § 8a Abs. 4 Tierschutzgesetz (TierSchG)

Ihre Anzeige vom 29.04.2003, hier eingegangen am 21.05.2003  
A 40/2000

Sehr geehrte Frau Dr. Linck,

Ihre o.a. Anzeige wird hiermit bestätigt.  
Für den laufenden Tierversuch A 40/2000 sind Sie als Stellvertreterin und Herr Dr.  
Hahnenkamp als Leiter benannt.

Mit freundlichen Grüßen  
Im Auftrag

*Stichling*  
Stichling

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300  
E-Mail: [poststelle@bezreg-muenster.nrw.de](mailto:poststelle@bezreg-muenster.nrw.de) • Internet: [www.bezreg-muenster.nrw.de](http://www.bezreg-muenster.nrw.de)  
zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525  
Konten der Landeskasse Münster:  
Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520  
Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820  
ÖPNV ab Hbf: Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis  
Haltestelle Widothorststraße (Haus K), Linie 7, bis Haltestelle Wiener Str. (Haus W).





H. Aken

## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster · 48128 Münster

Herrn Prof. Dr. med. W. Schmitz  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Westf. Wilhelms-Universität Münster  
Domagkstr. 12  
48129 Münster

Dienstgebäude  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Zimmer: 431  
Frau Möllers

Aktenzeichen  
23.0835.2.0 (A 40/2000)

6. Juni 2000

Herrn Prof. Dr. med. H. Van Aken  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
und operative Intensivmedizin  
Albert-Schweitzer-Str. 33  
48129 Münster

Betr.: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren;  
hier: Anzeige von Versuchsvorhaben gemäß § 10a Tier-  
schutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Be-  
kanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105)  
Versuchsvorhaben:  
"Untersuchungen von Membranproteinen (G-Protein  
gekoppelte Rezeptoren - GPR, Liganden - und  
Spannungs - kontrollierte Ionenkanäle) und deren  
Beeinflussung durch Anästhetika"

Bezug: Ihr Antrag auf Genehmigung von Versuchsvorhaben gemäß  
§ 8 Abs. 1 TierSchG vom 12.03. 2000, hier eingegangen  
am 03.04.2000

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Schmitz,  
sehr geehrter Herr Prof. Dr. Van Aken,

ich habe Ihren o.a. Antrag geprüft und festgestellt, dass das  
von Ihnen geplante Versuchsvorhaben nicht genehmigungspflichtig  
nach § 8 TierSchG ist, sondern unter die Bestimmung des § 10a  
TierSchG fällt und somit lediglich anzeigepflichtig ist.

Die geplanten Eingriffe und Behandlungen dürfen jedoch nur  
vorgenommen werden, wenn die Voraussetzungen des § 7 Abs. 2 und  
3 (zulässiger Verwendungszweck, Unerlässlichkeit, ethische  
Vertretbarkeit) vorliegen.

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300  
e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525  
Konten der Regierungshauptkasse Münster:  
Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520  
Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820  
Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

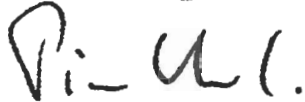
Da nach Ihren Antragsangaben auf das Vorliegen der genannten Voraussetzungen geschlossen werden kann, bestätige ich gemäß § 10a TierSchG das o.a. Versuchsvorhaben.

Das Versuchsvorhaben läuft jetzt unter der Nummer A 40/2000.

Herr Dr. Lücke als zuständiger Tierschutzbeauftragter und die Stadt Münster - Veterinär- und Lebensmittelüberwachungsamt - (Erlaubnisbehörde gemäß § 11 TierSchG) erhalten jeweils eine Durchschrift dieser Bestätigung.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Piontkowski'.

Dr. Piontkowski

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
z.H. Frau Dr. Bettina Linck  
Domagkstr. 12

**48149 Münster**

VETERINÄR- UND  
LEBENSMITTEL-  
ÜBERWACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1  
Auskunft erteilt:  
Frau Heumann  
Zimmer: 106  
Telefon: 02534/971 - 301  
Telefax: 02534/971 - 399  
E-Mail: Amt\_39@stadt-  
muenster.de  
Sprechzeiten:  
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:  
12.03.2000 an die Bezirksregierung  
hier eingegangen am 05.04.2000

Mein Zeichen (Bitte angeben):  
39/401 a)

Münster,  
12.04.2000

**Tierschutzgesetz;**

**Tierversuch G 34/2000 Antragsteller: Prof. Dr. W. Schmitz und Prof. Dr. H. Van Aken**

Versuchsleiterin: Dr. Bettina Linck, Pharmakologie u. Toxikologie 2. Versuchsleiter: Dr. Ch. Hönemann, Anästhesiologie und op. Inten- sivmedizin	Stellvertreter: Prof. Dr. J. Neumann Prof. Dr. T. Möllhoff, Anästhesiologie und op. Intensivmedizin
--	---

Sehr geehrte Frau Dr. Linck,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung von

**78 afrikanischen Krallenfröschen.**


**Folgende Auflagen sind einzuhalten:**

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Pfleger des Tierstalls Ihres Institutes zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Herrn Prof. Dr. Richter zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen.
5. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart und -zahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.

*Diese Erlaubnis gilt für die Laufzeit des genehmigten Versuches. Bitte beachten Sie, dass der Versuch erst begonnen werden kann, wenn Ihnen die Genehmigung der Bezirksregierung Münster vorliegt.*

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Otto  
Städt. Veterinärdirektor

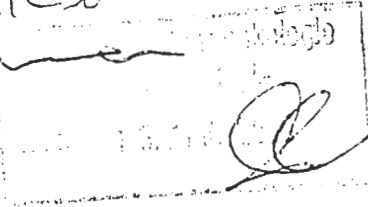
**Konten der Stadtkasse**

Sparkasse Münster	Kto.-Nr. 752	(BLZ 400 501 50)	Commerzbank Münster	Kto.-Nr. 393 210 0/00	(BLZ 400 400 28)
Landeszentralbank Münster	Kto.-Nr. 40 001 700	(BLZ 400 000 00)	Deutsche Bank Münster	Kto.-Nr. 0470 005	(BLZ 400 700 80)
Postbank Dortmund	Kto.-Nr. 21 136-481	(BLZ 440 100 46)	Dresdner Bank Münster	Kto.-Nr. 606 465 800	(BLZ 400 800 40)
Bank für Gemeinwirtschaft	Kto.-Nr. 1 010 305 100	(BLZ 400 101 11)	Volksbank Münster eG	Kto.-Nr. 4 200 800	(BLZ 401 800 50)
Bankhaus Lampe Münster	Kto.-Nr. 306 002	(BLZ 480 201 51)	Westdeutsche Landesbank Münster	Kto.-Nr. 61 228	(BLZ 400 500 00)

**Zentrale Verbindungen**

→ Hauptvermittlung (0251) 492-0  
Telefax (0251) 492-7700  
Datex-J \*0251492#  
E-Mail  
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de

Kopie: Dr. W. Schmitz  
A. Linck  
Prof. Dr. H. Van Aken



DER  
OBERBÜRGERMEISTER

STADT  MÜNSTER

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Herrn  
Prof. Dr. W. Schmitz oder Vertreter  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
Domagkstr. 12

48149 Münster

VETERINÄR- UND  
LEBENSMITTEL-  
ÜBERWACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:  
Frau Heumann  
Zimmer: 106  
Telefon: 02534/971 - 301  
Telefax: 02534/971 - 399  
E-Mail:  
Amt\_39@stadt-muenster.de  
Sprechzeiten:  
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:  
12.03.2000 an die Bezirksregierung

Mein Zeichen (Bitte angeben):  
39.401 a)

Münster, 12.04.2000

Tierschutz;

hier: Versuchsvorhaben: Untersuchungen von Membranproteinen (G-Protein gekoppelte Rezeptoren - GPR, Liganden - und Spannungs-kontrollierte Ionenkanäle) und deren Beeinflussung durch Anästhetika  
- Antragsteller: Prof. Dr. med. W. Schmitz und Prof. Dr. med. H. Van Aken

Sehr geehrter Herr Professor Schmitz,

beigefügt erhalten Sie die Genehmigung zur Haltung von afrikanischen Krallenfröschen für obigen Versuch. Da für mich Ansprechpartner und Verantwortlicher eines Versuches grundsätzlich der Leiter eines Versuches bzw. sein Stellvertreter ist, habe ich die Genehmigung auf Frau Dr. Bettina Linck ausgestellt. Bitte leiten Sie das Schreiben an sie weiter.

Mit freundlichen Grüßen

i.A.



Dr. Otto  
Städt. Veterinärdirektor

#### Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster Kto.-Nr. 752  
Landeszentralbank Münster Kto.-Nr. 40 001 700  
Postbank Dortmund Kto.-Nr. 21 1 38-481  
Bank für Gemeinwirtschaft Kto.-Nr. 1 010 305 100  
Bankhaus Lampe Münster Kto.-Nr. 308 002

(BLZ 400 501 50)  
(BLZ 400 000 00)  
(BLZ 440 100 48)  
(BLZ 400 101 11)  
(BLZ 480 201 51)

Commerzbank Münster  
Deutsche Bank Münster  
Dresdner Bank Münster  
Volksbank Münster eG  
Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 0/00 (BLZ 400 400 28)  
Kto.-Nr. 0470 005 (BLZ 400 700 80)  
Kto.-Nr. 608 465 800 (BLZ 400 800 40)  
Kto.-Nr. 4 200 800 (BLZ 401 600 50)  
Kto.-Nr. 81 226 (BLZ 400 500 00)

#### Zentrale Verbindungen

Hauptvermittlung (0251) 492-0  
Telefax (0251) 492-7700  
E-Mail  
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de