

Thomas Winfried Blüm
Dr. med.

Der Fibroblasten Wachstumsfaktor-2 moduliert die Impulsaktivität spinaler Neurone

Geboren am 01.04.1972 in Heidelberg
Reifeprüfung am 17.06.1991 in Walldorf
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1992/93 bis SS 1999
Physikum am 30.08.1994 an der Universität Heidelberg
Klinisches Studium in Heidelberg
Praktische Jahr in Ludwigsburg
Staatsexamen am 18.05.1999 am Klinikum Ludwigsburg, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie
Doktorvater: Prof. Dr. med. S. Mense

Vielfach untersucht sind die mittel- und langfristigen Wirkungen des vor allem von Astrozyten gebildeten Fibroblasten-Wachstumsfaktors-2 (FGF-2) zum Beispiel auf Wundheilung, Zellwachstum und -Differenzierung. Fast unbeforscht sind hingegen seine kurzfristigen Auswirkungen, insbesondere sein Einfluß auf das neuronale Entladungsverhalten. Exemplarisch haben wir uns daher mit Zeitverlauf und Reversibilität der FGF-2-Wirkung auf Hintergrundaktivität und Erregbarkeit von Rückenmarkhinterhornneuronen beschäftigt. Mittels juxtazellulärer Mikroiontophorese (an Sprague Dawley-Ratten, *in vivo*) war es möglich, einzelne Neurone sowohl vor als auch während und nach FGF-2-Applikation zu untersuchen und zudem systemische Effekte weitestgehend auszuschließen.

Überprüft werden sollte auch, ob Neurone in Abhängigkeit von ihrer Antwortcharakteristik (niederschwellig, hochschwellig oder multirezeptiv) und der Lokalisation ihres rezeptiven Feldes (in oberflächlichen oder tiefen Geweben) unterschiedlich auf die zellnahe FGF-2-Applikation reagieren.

Siebenunddreißig männliche Sprague-Dawley-Ratten mit einem Körpergewicht von 250 bis 450 g wurden durch einmalige Intraperitoneal-Injektion von 120mg/kg Körpergewicht Thiobutabarnatrium narkotisiert. Über einen ventromedianen Hautschnitt im Cervicalbereich wurden Trachea, A. carotis communis und V. jugularis externa dargesellt, um Kunststoffkanülen einzulegen zur kontinuierlichen Beatmung, invasiven Blutdruckmessung und Pharmaka-Applikation. Die Narkose wurde aufrechterhalten durch kontinuierliche Applikation von 10mg/h/kg Körpergewicht Thiobutabarnatrium. Die Körperkerntemperatur wurde über Heizkissen und Wärmelampen konstant gehalten. Der Kontrolle der Narkosetiefe dienten unter anderem ein EKG nach Einhoven I sowie die invasive Blutdruckmessung. Zur nichtdepolarisierenden Muskelrelaxation wurden stündlich 0,6mg/kg Körpergewicht Pancuroniumbromid i.v. appliziert. Nach Fixierung in einem Spinal Frame wurde das Rückenmark über eine thorakolumbale Laminektomie freigelegt und mit körpertemperiertem Siliconöl überschichtet.

In allen Experimenten wurde FGF-2 in einer Konzentrationen von 10 nmol/l (in physiologischer Kochsalzlösung) mittels Mikroiontophorese über eine Dreifach-Glaselektrode mit Spitzendurchmessern von 1 µm juxtazellulär im Rückenmarkhinterhorn appliziert (wobei über Änderungen des Applikationsstrom von 5-20nA unterschiedliche Dosierungen erreicht werden konnten). Während einer der weiteren Elektroden-Barrel zur automatischen Stromkompensation diente, erfolgte über den dritten Barrel kontinuierlich die elektrische Ableitung der Aktionspotentiale des untersuchten Neurons. Um die Erregbarkeit der zentralen Neurone durch peri-

phere mechanische Stimuli untersuchen zu können, wurden standardisierte mechanische Reizungen der Hinterpfote vorgenommen.

FGF-2 unterdrückt dosisabhängig, reversibel und unabhängig von der Tiefenlokalisierung im Rückenmark mit einer Latenz von wenigen Minuten zunächst die Reizantwort spinaler Neurone auf schwache mechanische Reizung ihres rezeptiven Feldes, bei höheren Konzentrationen auch die auf starke Reizung. Außerdem unterdrückt iontophoretisch appliziertes FGF-2 dosisabhängig und reversibel mit Latenzen von unter einer Minute Hintergrundaktivität spinaler Neurone.

In die Auswertung sind die Daten von insgesamt 55 Hinterhornneuronen eingegangen. Zehn davon waren hintergrundaktiv; die übrigen 45 Neurone wurden mechanisch stimuliert. Während die Applikation des reinen Vehikels keinerlei Einfluß zeigte, reagierten sieben der zehn hintergrundaktiven Zellen auf die Applikation von FGF-2 innerhalb einiger Sekunden mit einer Abnahme der Entladungsrates um mehr als 2 Standardabweichungen (bezogen auf die mittlere Entladungsrate unter Kontrollbedingungen). Eine Erhöhung der FGF-2-Dosis durch Erhöhung des Applikationsstroms führte zu einer stärkeren Abnahme der Entladungsrates. Der Effekt war binnen weniger Minuten komplett reversibel.

Durch periphere mechanische Stimuli treibbare Hinterhornneurone reagierten erst nach einer FGF-2-Applikation über einige Minuten mit einer Abnahme der Reizantwort. Siebenunddreißig der 39 untersuchten Zellen zeigten eine (im zweiseitigen Wilcoxon-Test für gepaarte Daten) signifikante, reversible Reduktion ihrer Reizantworten. Eine Steigerung der FGF-2-Dosis bewirkte auch hier eine stärkere Ausprägung des gleichen Effektes.

Der unterschiedliche Zeitverlauf der FGF-2-Wirkung auf Erregbarkeit und Hintergrundaktivität legt die Vermutung nahe, daß der Regulation jeweils unterschiedliche Mechanismen zugrundeliegen: Ausgehend von einer Di- und Tetramerisierung von FGF-2 über Heparansulfatproteoglykane und Interaktion mit hochaffinen Membranrezeptoren (Moy *et al.*, 1997) wird die Senkung der mechanischen Erregbarkeit wahrscheinlich über eine Inositoltrisphosphat-Kaskade vermittelt, die in intrazellulären Ca^{2+} -Verschiebungen mündet (Mignery und Sudhof, 1990). Bei der Unterdrückung der Hintergrundaktivität könnte hingegen eine rezeptorvermittelte Stimulation der Stickstoffmonoxid-Synthase mit konsekutiver NO-Freisetzung maßgeblich beteiligt sein (Marletta, 1993; Schenda und Vollrath, 1997).

Im Hinblick auf seine molare Potenz, ist der Fibroblasten-Wachstumsfaktor 2 eine höchst effektive Substanz. Die gezeigten Effekte waren alle bereits bei einer FGF-2-Konzentration von 10 nmol/l in der Iontophorese-Pipette zu beobachten. Bei einem ähnlichen experimentellen Aufbau konnten Hoheisel *et al.* (1994) z. B. in der Superfusion des Rückenmarks mit Substanz P erst bei der 10000fachen Konzentration Auswirkungen auf das neuronale Entladungsverhalten feststellen. Bei Superfusion des Rückenmarks mit FGF-2 kommt es bereits bei Konzentrationen von wenigen $\mu\text{mol/l}$ zu einer vollständigen Auslöschung der spinalen Hintergrundaktivität und der Treibbarkeit durch periphere mechanische Stimuli (Hoheisel *et al.*, 1995). Diese Beobachtungen legen die Vermutung nahe, daß die hier beschriebene differenzielle Wirkung von FGF-2 auf das Antwortverhalten bei nicht-noxischer bzw. noxischer Stimulation lediglich bei sehr niedrigen Konzentrationen und bei einem Applikationszeitraum von wenigen Minuten auftritt, während mikromolare Konzentrationen scheinbar anästhetische Wirkung zeigen.

Die höchsten FGF-2-Gewebekonzentrationen im Zentralnervensystem treten wahrscheinlich im Gefolge mechanischer und ischämischer Traumen auf. Da jedoch bisher keine gesicherten Daten über die dabei tatsächlich vorkommenden Konzentrationen verfügbar sind, läßt sich kaum eine Aussage darüber machen, ob FGF-2 *in vivo* nun perifokal modulierend oder blockierend auf zentralnervöse Neurone wirkt.

Die bei den hier verwendeten FGF-2-Konzentrationen beobachtete Hemmung der Verarbeitung nicht-noxischer Reize ist möglicherweise ein weiterer Aspekt der neuroprotektiven Wir-

kung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors 2: Über eine Unterdrückung vor allem der Impulsantwort auf schwache Reize kommt es auch zur Verminderung der Glutamat-Freisetzung im Zentralnervensystem (Humpel *et al.*, 1993; Koshinaga *et al.*, 1993). Die bei höheren Dosen eintretende anästhetische Wirkung könnte von entscheidender Bedeutung für die Entstehung der schlaffen Parese im Rahmen eines Spinalen Schocks bei Rückenmarksquerschnitt-Verletzungen oder des klinischen Bildes vom Koma bei zentralnervös traumatisierten Patienten sein. Die außergewöhnliche Potenz von FGF-2 als Modulator neuronalen Entladungsverhaltens legt nahe, daß dieser Substanz – besonders unter patho(physio)logischen Bedingungen mit vermehrter Freisetzung von Wachstumsfaktoren aus Astrozyten – eine wichtige Rolle bei der Glia-Neuron-Interaktion zukommt.

Insgesamt zeichnen sich somit je nach Beobachtungszeitraum FGF-2-Effekte in unterschiedlichen Bereichen ab: Langfristig, innerhalb von Tagen, bewirkt FGF-2 eine Astrogliose (Speliotas *et al.*, 1996), Angiogenese (Gospodarowicz *et al.*, 1979) und übt trophische Effekte auf zahlreiche Zellen neuroektodermalen Ursprungs aus (Reviews: Eckenstein, 1994; Grothe und Wewetzer, 1996; Sensenbrenner, 1993).

Innerhalb von Stunden nach FGF-2-Applikation kommt es (in Hippocampus-Zellkultur) zur vermehrten Calbindin-Expression (Callazo *et al.*, 1992), zur verminderten Expression eines 71 kD-NMDA-Rezeptorproteins (Mattson *et al.*, 1993) und zur vermehrten Expression der antioxidativen Enzyme Superoxid-Dismutase und Glutathion-Reduktase (Mattson *et al.*, 1995). Mittelfristig kommt FGF-2 also eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Ca²⁺-Homöostase und dem Schutz gegen freie Radikale zu.

Innerhalb weniger Minuten bewirkt FGF-2, wie in dieser Arbeit dargelegt, eine Abnahme der Hintergrundaktivität und der mechanischen Treibbarkeit spinaler Neurone, wirkt damit kurzfristig modulierend auf die synaptische Transmission.