



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Medizinische Fakultät Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

Untersuchung der Hitzetransduktion in primären nozizeptiven Neuronen der Ratte mit fokussierten Nahinfrarot-Laserpulsen

Autorin: Elisabeth Jubileum
Institut: Centrum für Biomedizin und Medizintechnik Mannheim (CBTM) - Neurophysiologie
Doktorvater: Prof. Dr. R.-D. Treede

In der vorliegenden Studie wurde das Antwortverhalten akut dissoziierter, kleiner Spinal- und Trigeminalganglienneurone auf fokussierte Infrarotlaserreize (< 1000 ms) untersucht. Die gewählte Wellenlänge des Lasers (1475 nm) lag im Bereich eines relativen Absorptionsmaximums wässriger Lösungen (1440 nm) und ermöglichte so die Hitzereizung der Neurone ohne größeren Energieverlust. Zudem traf der Laserstrahl ohne vorherige Passage der Badlösung direkt auf die an einem Deckglas von unten anhaftenden Neurone. Das Antwortverhalten der Neurone auf Infrarotlaserreize ansteigender Energie sollte für verschiedene Leistungen als Funktion der Reizdauer charakterisiert werden. Die Beteiligung von TRPV1 an der Hitzetransduktion wurde pharmakologisch geprüft. Durch die gezielte Positionierung des Infrarotlaserspots ($d = 55 \mu\text{m}$) über prozentual definierten Teilbereichen des neuronalen Somas wurde einerseits die Abhängigkeit laserinduzierter Kalziumtransienten von der Größe der erhitzten Zellfläche untersucht – und andererseits deren intrazelluläre Ausbreitung.

Die Temperaturabhängigkeit des für die intrazellulären Kalziummessungen verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes FURA 2 zeigte einen steilen, zunächst linearen Temperaturanstieg des Infrarotlaserreizes sowie einen rasanten Temperaturabfall (35 mW, 512 ms: linearer Anstieg bis ca. 80 ms: Zeitkonstante $\tau = 75 \pm 10$ ms; Abfall: Zeitkonstante $\tau = 47 \pm 14$ ms).

89 % der Neurone waren lasersensitiv ($n = 75/84$). Mit einer Reizdauer von lediglich 4 ms (70 mW) wurden laserinduzierte Kalziumtransienten hervorgerufen. Die Schwellenenergie, bei der 50 % der Neurone laserinduzierte Kalziumtransienten aufwiesen, war abhängig von der Leistung. Die Schwellenenergie lag bei 35 mW fünfmal höher als bei 70 mW (2,73 mJ vs. 0,58 mJ). Hierbei betrug die Reizdauer bei 35 mW das Zehnfache im Vergleich zu 70 mW (78 ms vs. 8 ms). Diese Beobachtungen erklären sich durch die zunehmende laterale Wärmediffusion bei höherer Reizdauer und die geringere Geschwindigkeit des Temperaturanstiegs des Infrarotlaserreizes bei niedrigerer Leistung. Bei Verdoppelung der Schwellenenergie zeigte sich eine signifikante Reizstärken-Kodierung.

Die Capsaicinsensitivität aller getesteten lasersensitiven Neurone, die signifikante Reduktion der Kalziumtransienten durch den kompetitiven TRPV1-Antagonisten Capsazepin um 60 % ($p < 0,01$) und der Ausprägungsgrad der Tachyphylaxie bei repetitiver Reizung (3. Hitzeantwort 30 - 40 % der 1. Hitzeantwort) sprachen für eine laserinduzierte Aktivierung des TRPV1-Kanals.

Bereits bei Infrarotlaserreizung von lediglich einem Drittel des Somas wurden laserinduzierte Kalziumtransienten hervorgerufen. Der Anstieg der Kalziumtransienten bei Zunahme der erhitzten Zellfläche sprach für eine räumliche Summation des Kalziumsignals über vermehrt aktivierte TRPV1-Kanäle. Der überwiegende Kalziumeinstrom erfolgte jedoch über spannungsabhängige Kalziumkanäle infolge einer Depolarisation bzw. Aktionspotenzial-Entladung (1/3 vs. 1/1 des Somas: 108 % vs. 153 %, $p < 0,001$). Die gesamte Erregung des Neurons erfolgte mit einer Ausbreitungsgeschwindigkeit oberhalb von $330 \mu\text{m/s}$. Bei ungleicher Bestrahlung beider Zellhälften war das Kalziumsignal der mit dem Laserspot anvisierten Zellhälfte durch eine mutmaßlich vermehrte Aktivierung von TRPV1-Kanälen signifikant größer ($p < 0,01$). Der Ausgleich des entstandenen Kalziumgradienten zwischen den beiden Zellhälften erfolgte innerhalb von 1,5 – 4 Sekunden und somit wahrscheinlich durch Diffusion.

Infrarotlaserreize eignen sich demnach sowohl zur sehr schnellen als auch zur räumlich begrenzten Untersuchung der Hitzetransduktionsmechanismen einzelner Neurone. Die Eigenschaften der laserinduzierten Kalziumtransienten sprechen hierbei für TRPV1 als wesentlichen Transduktionskanal für rasche Infrarotlaserreize.