



SENSORISCHE NERVENZELLEN IN KULTUR

Ein zellbiologisches Modell zum Studium des Schmerzes

U. Otten und H. Vedder

Biozentrum der Universität Basel, Inst. f. Pharmakologie,
Klingelbergstr. 70, 4056 Basel

ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen über Schmerz und die Wirksamkeit von Schmerzmitteln werden bisher fast ausschliesslich am lebenden Tier durchgeführt.

Ein Kultursystem für sensorische Nervenzellen von Trigeminus- und Spinalganglien der Ratte ist entwickelt worden. Mit dieser *in vitro*-Technik ist es möglich, sensorische Neurone von neugeborenen Ratten für einen Zeitraum von 4 - 8 Wochen zu züchten. Nervenzellen in Kultur zeigen typische Eigenschaften der sensorischen Neurone, die an der Leitung von Schmerzreizen beteiligt sind: Synthese von Peptidtransmittersubstanzen wie Substanz P und Substanz K, Ansprechbarkeit auf depolarisierende Reize und die Erregbarkeit durch Schmerzmediatoren wie Bradykinin, Serotonin und Histamin. Mit Hilfe dieses Zellkultursystems wird es möglich, Untersuchungen zum Schmerz und zur Schmerzentstehung auf zellulärer und molekularer Ebene in einem schmerzfreien System vorzunehmen.

EINLEITUNG

Schmerz ist eines der eindrücklichsten Krankheitssymptome. Seine Bekämpfung ist eine wichtige pharmakotherapeutische Aufgabe. Durch die Entwicklung von wirksamen schmerzdämpfenden Medikamenten (Analgetika) und anderen Therapiemethoden ist es möglich geworden, neben akuten oft auch chronische Schmerzzustände erfolgreich zu behandeln. Im wesentlichen lassen sich die analgetisch wirksamen Arzneimittel heute in 2 Hauptgruppen unterteilen:



peripher angreifende (z. B. Aspirin) und zentral wirkende (z. B. Morphin) Analgetika (7).

Leider ist es trotz der guten Wirkung verschiedener Analgetika in den meisten Fällen noch nicht gelungen, genaue Aussagen über die molekularen Wirkungsmechanismen und zellulären Angriffspunkte zu machen.

Die im Tierreich routinemässig vorgenommene Untersuchung von Stoffen auf ihre analgetische Wirksamkeit wird mit sogenannten "Schmerztests" durchgeführt (7). Diese Tests basieren auf nozizeptiven Reflexen, motorischen Reaktionen, die durch experimentell erzeugte Schmerzreize ausgelöst werden.

Einer der klassischen Schmerztests, der für Standard- und Serienversuche eingesetzt wird, ist der Heizplatten- (Hot-plate) Test. Bei diesem wird die Reaktion von Versuchstieren, die auf eine heisse Metallplatte (56° C) gesetzt werden, untersucht. Die Reaktionszeit zwischen dem Aufsetzen der Tiere auf die Platte und der Reizantwort (Lecken der Pfote, Hochspringen) wird gemessen. Diese Reaktionszeit wird durch Analgetika erheblich verlängert. Andere auf dem gleichen Prinzip beruhende Schmerztests sind der Rattenschwanz- (Tail flick), der Krampf- (Writhing), der Elektroschmerz- und der Oedemtest (8).

NOZIZEPTIVES SYSTEM

Schmerzen werden im allgemeinen durch eine Gewebeschädigung ausgelöst. Die durch lokale Schmerzreize (mechanisch, thermisch oder chemisch) ausgelöste Erregung von Schmerzrezeptoren (Nozizeptoren) wird über markhaltige A-Delta Fasern und über marklose C-Fasern in das Rückenmark geleitet. Bei diesen Fasern handelt es sich um Fortsätze sensorischer Neurone, deren Zellkörper in den Spinal- und Trigeminus-Ganglien liegen. Im Rückenmark wird der Schmerzimpuls umgeschaltet und zum Gehirn weitergeleitet (6). Nozizeptoren werden durch körpereigene Schmerzstoffe, Mediatorsubstanzen, die im geschädigten Gewebe freigesetzt werden,



aktiviert und sensibilisiert (4). Substanzen, wie Histamin, Serotonin, Acetylcholin, das Peptid Bradykinin und Capsaicin (das wirksame Prinzip von scharfem Paprika) (2) lösen bei lokaler Verabreichung in der Haut beim Menschen und beim Tier durch die Erregung von Nozizeptoren starke Schmerzen aus. Ueber die Mechanismen, die der Schmerzentstehung, bzw. der Aktivierung der Nozizeptoren zugrunde liegen, ist bisher noch wenig bekannt. Ein wichtiger Grund dafür ist, dass die in der Schmerzforschung verwendeten tierexperimentellen Modelle zu komplex sind, um derartige Fragen beantworten zu können.

Um so überraschender ist es, dass bisher relativ wenig Anstrengungen gemacht wurden, neue, verbesserte Testsysteme zu entwickeln, die Untersuchungen über den Schmerz und die Wirkungsweise von Analgetika an nicht schmerzfähigen Modellen ermöglichen.

Wir haben in unserem Labor ein Kultursystem für sensorische Nervenzellen entwickelt. Mit Hilfe dieses *in vitro* Systems können Untersuchungen zur Schmerzentstehung unter genau definierten Bedingungen durchgeführt werden. (Otten & Vedder, Manuskript in Vorbereitung)

Die Zellkörper sensorischer Neurone, die an der Schmerzentstehung und -leitung beteiligt sind, liegen in den Spinal- und Trigeminusganglien. Neue immunohistochemische und biochemische Untersuchungen haben ergeben, dass neben Aminosäuren (Glutamat, Aspartat) verschiedene Peptide wie Substanz P und Substanz K, Somatostatin und CGRP ("Calcitonin gene-related peptide") in sensorischen Neuronen angereichert sind (1,3,5,6). Es gibt überzeugende experimentelle Anhaltspunkte dafür, dass Peptide wie Substanz P an der Erregungsübertragung von Schmerzimpulsen beteiligt sind (9). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Erregung von peripheren Schmerzfasern Substanz P aus den sensorischen Neuronen im Rückenmark freigesetzt wird.

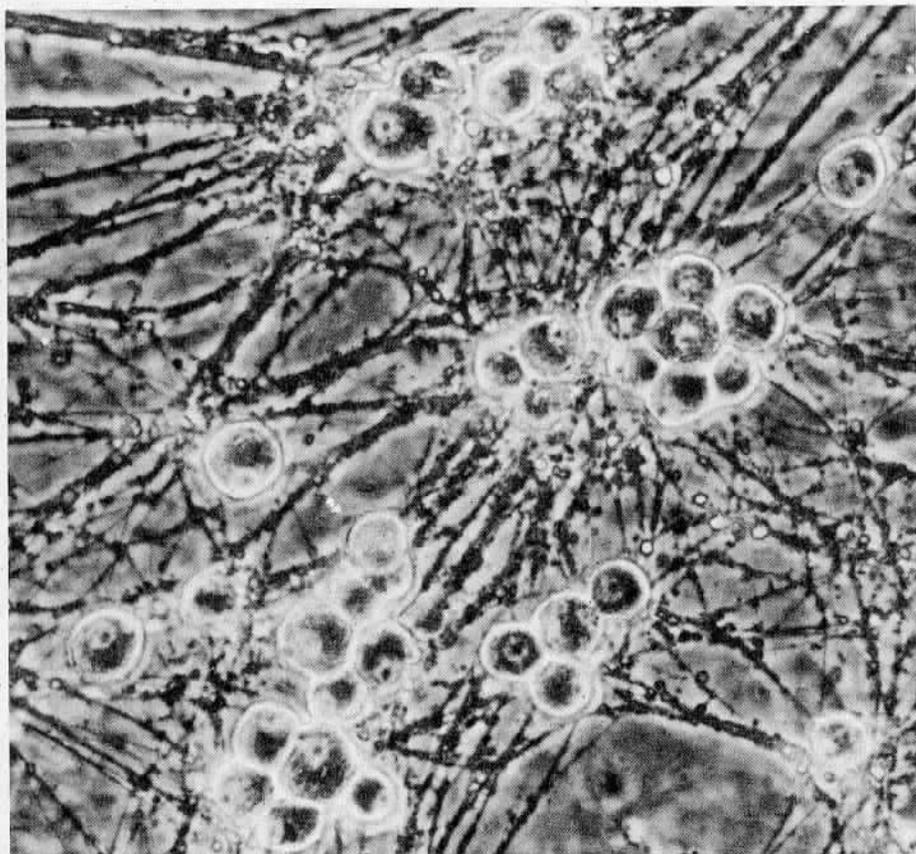


Abb. 1
 Wachsende sensorische Nervenzellen in Kultur (Trigeminus-
 ganglien der Ratte). Runde Zellkörper mit dichtem Nerven-
 fasernetzwerk. 43 Tage alte Kultur
 Vergrößerung 250 x

ZELLKULTUR SENSORISCHER NEURONE AUS SPINAL-
 UND TRIGEMINUSGANGLIEN NEUGEBORENER RATTEN

Um die zellulären Eigenschaften der an der Schmerzleitung beteiligten sensorischen Neurone näher charakterisieren zu können, wurde ein in vitro-System für diese Nervenzellen etabliert. Die Trigemini- und Spinalganglien neugeborener Ratten werden unter sterilen Bedingungen aus dem Tier entnommen. Die sensorischen Nervenzellen werden durch enzymatische und mechanische Dissoziations-Techniken aus dem Gangliengewebe, das zu

gleichen Teilen aus neuronalen und nichtneuronalen Zellen besteht, herausgelöst. Die so gewonnene Zellsuspension wird in speziell beschichtete Kulturschalen verteilt. Auf dem Boden dieser Schalen haften die Zellen innerhalb weniger (1 - 3) Stunden fest an. In einem Nährmedium, das mit Aminosäuren und Vitaminen angereichert ist, können die adhärrierenden Zellen für 4 - 8 Wochen bei 37° C gezüchtet werden. Die Proliferation nichtneuronaler Zellen wird unter diesen Kulturbedingungen nahezu vollständig unterdrückt. Ein optimales Überleben und Wachstum der Neurone *in vitro* ist nur dann möglich, wenn das Kulturmedium Nervenwachstumsfaktor (NGF), eine hormonähnliche Substanz, enthält. In Gegenwart von NGF bildet sich ein dichtes Nervenfasernetzwerk, das die einzelnen Zellen und Zellgruppen miteinander verbindet (Abb. 1).

Mit Hilfe unserer Technik ist es möglich, aus den Spinalganglien einer neugeborenen Ratte ca. 200.000, aus einem Paar Trigeminalganglien ca. 30.000 (entsprechend einer Kulturschale) neuronale Zellen zu gewinnen. Untersuchungen mit spezifischen, hochempfindlichen Nachweismethoden (Radioimmunoassays und Hochdruckflüssigkeitschromatographie, HPLC) für verschiedene Peptide ergaben, dass die sensorischen Neurone in Kultur die für diese Zellen *in vivo* charakteristischen Peptide Substanz P, Substanz K und CGRP enthalten. In zusätzlichen Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass der Zeitverlauf der Peptidproduktion *in vitro* fast identisch mit der *in vivo* Entwicklung ist.

Weitere Experimente zeigten, dass die Stimulation sensorischer Neurone (Depolarisation mit Kalium-Ionen) zu einer raschen Freisetzung der Peptide in das Kulturmedium führt. Dabei korreliert die freigesetzte Peptidmenge gut mit der Stärke des auslösenden Reizes. Auch Bradykinin, eine der stärksten schmerz-erzeugenden Substanzen, löst eine dosisabhängige Peptidsekretion aus. Andere Mediatoren, die unter *in vivo* Bedingungen Schmerz-

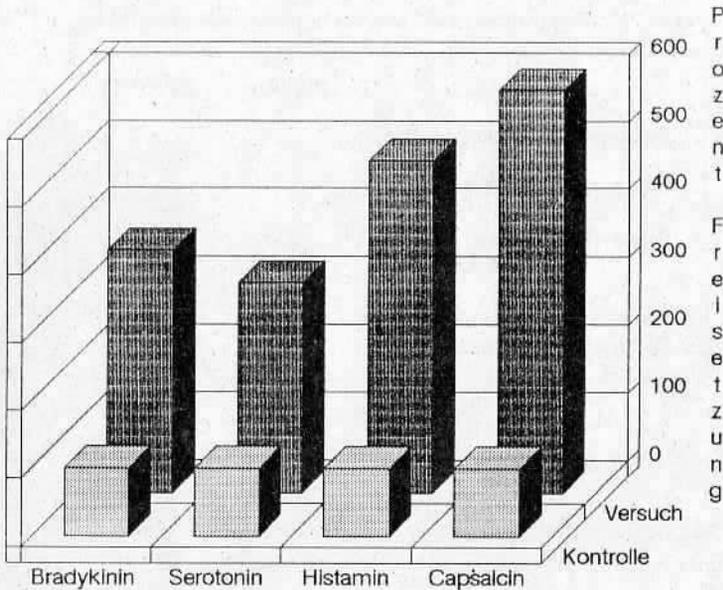


Abb. 2

Einfluss von Schmerzstoffen (Mediatoren) auf die Peptid-Transmitter-Freisetzung (Substanz P) aus sensorischen Neuronen in Kultur (Stimulationszeit: 15 min)

rezeptoren erregen, wie Histamin, Serotonin und Capsaicin sind wirksame Stimulatoren der Peptidfreisetzung. Diese Ergebnisse sind in Abbildung 2 dargestellt.

Unsere Ergebnisse machen somit deutlich, dass die Neurone in vitro spezifische Eigenschaften sensorischer Neurone in vivo besitzen (Abb. 3). Alle bisherigen biochemischen und pharmakologischen Untersuchungen sprechen dafür, dass es sich bei den Nervenzellen in Kultur um die Neurone handelt, die an der Schmerzentstehung und -leitung in vivo beteiligt sind.

Mit Hilfe dieses in vitro-Modells wird es möglich, gezielte Studien unter exakt definierten Bedingungen über die Wirkungsmechanismen verschiedener Mediatorsubstanzen, wie Bradykinin, Serotonin und Histamin, auf zellulärer Ebene durchzuführen.



Abb. 3 Eigenschaften sensorischer Nervenzellen

	IN VIVO	INVITRO
Synthese von Neuropeptiden	+	+
Ca-Aktionspotentiale	+	+
Peptid-Freisetzung auf Reiz	+	+
Ansprechbarkeit auf Schmerzmediatorsubstanzen	+	+

VOR- UND NACHTEILE DES IN VITRO-SYSTEMS

Die entscheidenden Vorteile des hier vorgestellten Kultursystems lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- genau definierte Kulturbedingungen
- Verminderung von unkontrollierbaren Faktoren, die Schmerz-Tests am lebenden Tier beeinflussen
- die Möglichkeit, Experimente in einem schmerzfreien System durchzuführen
- die direkte Wirkung schmerzauslösender und schmerzdämpfender Substanzen auf sensorische Neurone kann analysiert werden
- mehrere Untersuchungen können an einer Kultur durchgeführt werden
- Eignung als Auswahlverfahren für peripher angreifende analgetisch wirksame Substanzen

Einer der Hauptnachteile des Kultursystems für Nervenzellen ist, dass durch dieses in vitro-Modell nur Teilaspekte des komplexen biologischen Phänomens Schmerz untersucht werden können. Andererseits eröffnen sich mit der Anwendung dieser Methode neue Möglichkeiten, Studien zum Schmerz auf zellulärer und molekularer Ebene durchzuführen.



Wir sind allerdings der Ueberzeugung, dass in der Schmerz-
forschung auf Versuche am Ganztier nicht verzichtet werden
kann. Zellkultursysteme können jedoch bei der Erforschung von
spezifischen Teilbereichen des Schmerzes eine wertvolle
Ergänzung zum Tierversuch darstellen.

(Unterstützt vom Fonds für versuchstierfreie Forschung (FFVFF),
Zürich und der H. Doerenkamp-G.Zbinden Stiftung, Zürich)

LITERATUR

- (1) DALSGAARD, C. J., HAEGERSTRAND, A., THEODORSSON-NORHEIM, E.,
BRODIN, E. and HOEKFELT, T. (1985): Neurokinin A-like
immunoreactivity in rat primary sensory neurons; coexistence
with Substance P. *Histochemistry*, **83**, 37 - 39.
- (2) FITZGERALD, M. (1983): Capsaicin and sensory neurones -
a review. *Pain* **15**, 109 - 130.
- (3) GIBSON, S. J., POLAK, J. M., BLOOM, S. R., SABATE, I. M.,
MULDERRY, P. M., GHATEI, M. A., MCGREGOR, G. P., MORRISON,
J. F. B., KELLY, J. S., EVANS, R. M. and ROSENFELD, M. G.
(1984): Calcitonin gene-related peptide immunoreactivity
in the spinal cord of man and of eight other species.
Neuroscience **4**, 3101 - 3111.
- (4) GIERTZ, H. und FLOHE, L. (1987): Mediatoren der Entzündung
und Allergie, pp 176 - 215. In: FORTH, W., HENSCHLER, D.,
RUMMEL, W.: *Lehrbuch der allg. und spez. Pharmakologie*.
BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich.
- (5) HOEKFELT, T., JOHANSSON, O., LJUNGDAHL, A., LUNDBERG, J. M.,
SCHULTZBERG, M. (1980): Peptidergic neurons. *Nature*
(London), **284**, 515 - 521.
- (6) JESSELL, T. M. (1982): Pain. *The Lancet* **8307**, 1084 - 1088.
- (7) JURNA, I. (1987): Analgetika - Schmerzbekämpfung,
pp 522 - 546. In: FORTH, W., HENSCHLER, D., RUMMEL, W.:
Lehrbuch der allg. und spez. Pharmakologie.
BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Wien, Zürich.
- (8) KISTLER, P. (1987): Schmerzbekämpfung im Tierversuch.
Alternativen zu Tierexperimenten **7**, 34 - 44.
- (9) OTSUKA, M. and KONISHI, S. (1983): Substance P - the first
peptide neurotransmitter? *Trends Neuro. Sci.* **6**, 317 - 320.