

Aus dem Lehrstuhl für Physiologie des Veterinärwissenschaftlichen Departments
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Angefertigt an der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Pannen

**Effekte der intrathekal applizierten Glycin-Transporter-Inhibitoren
ALX-5407 und ALX-1393 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im
Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Ruth Antoniette Williams, geb. Wevers

aus Oberhausen

München, 2010

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Braun
Berichterstatter:	Univ.-Prof. Dr. Stangassinger
Korreferent:	Univ.-Prof. Dr. Schmahl

Tag der Promotion: 13. Februar 2010

Für Mark

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Neuropathischer Schmerz	1
1.2	Die glycinerge Neurotransmission	6
1.2.1	Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter	6
1.2.2	Glycin als exzitatorischer Neurotransmitter	9
1.2.3	Die Glycin-Transporter und ihre Inhibitoren.....	11
1.3	Die Beeinflussung der glycinergen Neurotransmission durch Glycin- Transporter-Inhibitoren	16
1.3.1	Die Beeinflussung der glycinergen Neurotransmission durch Inhibitoren des Glycin-Transporter-1	16
1.3.2	Die Beeinflussung der glycinergen Neurotransmission durch Inhibitoren des Glycin-Transporter-2	17
1.4	Zielvorstellung	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Glycin-Transporter-Inhibitoren	19
2.1.1	Der Glycin-Transporter-1-Inhibitor ALX-5407	20
2.1.2	Der Glycin-Transporter-2-Inhibitor ALX-1393	20
2.2	Kontrollsubstanzen bzw. Lösungsmittel	20
2.2.1	DMSO.....	21
2.2.2	NaCl.....	21
2.3	Versuchstiere	21
2.4	Schmerztestungen.....	21
2.4.1	Testung des Pfotenrückzugs-Schwellenwertes (PWT) und der mechanischen Allodynie mit dem Aesthesiometer [®]	22
2.4.2	Testung der Pfotenrückzugs-Latenz (PWL) und der thermalen Hyperalgesie mit dem Plantar Test [®]	24

2.5 Operationen	26
2.5.1 Operationsvorbereitung	26
2.5.2 Operation der linken Hintergliedmaße nach dem Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz von Bennett und Xie.....	26
2.5.3 Implantation eines intrathekalen PE10 Katheters.....	27
2.6 Versuchsprotokoll	29
2.7 Statistische Auswertung.....	31
3 ERGEBNISSE	32
3.1 Ergebnisse zur Methodik.....	32
3.1.1 Erfolgsrate der Operationen.....	32
3.1.2 Kontrolle der Ausprägung einer Allodynie und Hyperalgesie	32
3.1.3 Ergebnisse der Kontrollsubstanzen DMSO und NaCl.....	34
3.1.4 Post OP Monitoring	37
3.2 Die Wirkung von ALX-5407 auf die Nozizeption von Ratten im Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz.....	38
3.2.1 Die Wirkung von ALX-5407 auf die linke, neuropathische Pfote	38
3.2.2 Die Wirkung von ALX-5407 auf die rechte, unverletzte Pfote.....	40
3.3 Die Wirkung von ALX-1393 auf die Nozizeption von Ratten im Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz.....	43
3.3.1 Die Wirkung von ALX-1393 auf die linke, neuropathische Pfote	43
3.3.2 Die Wirkung von ALX-1393 auf die rechte, unverletzte Pfote.....	45
3.3.3 Neuromotorische Auswirkungen nach der Applikation von ALX-1393.....	48
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	50
3.4.1 Zusammenfassung der Wirkungen von ALX-5407.....	50
3.4.2 Zusammenfassung der Wirkungen von ALX-1393.....	50
4 DISKUSSION	51
4.1 Diskussion der Methodik.....	51
4.1.1 Die Glycin-Transporter-Inhibitoren ALX-5407 und ALX-1393.....	51
4.1.2 Die Kontrollsubstanzen bzw. Lösungsmittel DMSO und NaCl.....	54

4.1.3 Die Schmerztestungen	55
4.1.4 Das Chronic Constriction Injury Modell	57
4.1.5 Die intrathekale Katheterisierung	58
4.1.6 Das post OP Monitoring	60
4.2 Die Wirkung des Glycin-Transporter-1-Inhibitors ALX-5407	62
4.2.1 Die antinozizeptive Wirkung von ALX-5407	63
4.2.2 Die pronozizeptive Wirkung von ALX-5407	67
4.3 Die Wirkung des Glycin-Transporter-2-Inhibitors ALX-1393	71
4.3.1 Die antinozizeptive Wirkung von ALX-1393	71
4.3.2 Die neuromotorischen Wirkungen von ALX-1393	73
4.4 Schlussfolgerung und Ausblick	77
5 ZUSAMMENFASSUNG	79
6 SUMMARY	81
7 LITERATURVERZEICHNIS	83
8 ANHANG	104
8.1 Abkürzungsverzeichnis	104
8.2 Pain Score für Ratten im Chronic Constriction Injury Modell	106
8.3 Danksagung	107

1 Einleitung

1.1 Neuropathischer Schmerz

Die Wahrnehmung von Schmerzen (Nozizeption) ermöglicht es dem Organismus, adäquat auf potenziell schädliche Reize zu reagieren. Der akute nozizeptive Schmerz erfüllt somit eine biologisch sinnvolle Warnfunktion. Neuropathischer Schmerz hingegen tritt meist chronisch und oft ohne äußere Reizeinwirkung auf und dient somit keiner physiologischen Funktion. Die International Association for the Study of Pain (IASP) definiert neuropathischen Schmerz als einen „Schmerz, der durch eine primäre Läsion oder Dysfunktion des Nervensystems ausgelöst oder hervorgerufen wird“ (Merskey and Bogduk 1994). In **Tabelle 1.1** sind verschiedene Schmerzbegriffe und ihre Definitionen laut IASP, sowie weitere, in dieser Arbeit häufig vorkommende Begriffe aufgelistet und erklärt.

Tabelle 1.1: Schmerzbezeichnungen der IASP (Merskey and Bogduk 1994) und andere wichtige Begriffe

Schmerzbezeichnung	Definition
Schmerz	Schmerz ist eine unangenehme Empfindung und ein emotionales Erlebnis, das mit einem aktuellen oder potenziellen Gewebeschaden einhergeht
Neuropathischer Schmerz	Schmerz, der durch eine primäre Läsion oder Dysfunktion des Nervensystems ausgelöst oder hervorgerufen wird
Neuropathie	Eine Funktionsstörung oder eine pathologische Veränderung in einem Nerv. In einem Nerv: Mononeuropathie In mehreren Nerven: Mononeuropathie multiplex Wenn diffus und bilateral: Polyneuropathie
Allodynie	Schmerz, der durch einen Reiz hervorgerufen wird, der normalerweise nicht schmerzhaft ist. Veränderung der Qualität der Reizwahrnehmung
Hyperalgesie	Gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber normalerweise schmerzhaften Reizen Veränderung der Quantität der Reizwahrnehmung
Hypoalgesie	Verminderter Schmerz als Reaktion auf einen normalerweise schmerzvollen Reiz
Parästhesie	Kribbeln, Ameisenlaufen
Dysästhesie	Unangenehme Parästhesie
Pronozizeptive Wirkung	Verstärkte Schmerzwahrnehmung; Schmerz-fördernde Wirkung
Antinozizeptive Wirkung	Verminderte Schmerzwahrnehmung; Schmerz-lindernde Wirkung

Auf Anregung von Woolf und Bennett wird seit 1998 an einer ergänzenden mechanismenbasierten Definition für neuropathischen Schmerz gearbeitet (Woolf et al. 1998). Diese Definition soll statt der anatomischen Lokalisation der Nervenschädigung die jeweils zugrundeliegenden Pathomechanismen in den Vordergrund stellen (Baron 2000a). Da neuropathische Schmerzen als Begleiterscheinung bzw. Komplikation einer Vielzahl

von unterschiedlichen Erkrankungen auftreten können (siehe **Tabelle 1.2**), sind die Pathomechanismen äußerst vielseitig und für eine endgültige mechanismenbasierte Definition noch nicht ausreichend aufgeklärt (Backonja 2003; Hansson and Dickenson 2005).

Tabelle 1.2: Einige neuropathische Schmerzsyndrome bzw. Erkrankungen und Ätiologien, die mit neuropathischen Schmerzen einhergehen können und ihre Einteilung nach der anatomischen Lokalisation

Peripheres Nervensystem: Mononeuropathie
Chronische Radikulopathien (Bandscheibenvorfall, Tumoren, Knochenmetastasen, Lyme Radikulitis)
Posttraumatische/postchirurgische Neuropathie (Mastektomie, Herniorrhaphie, Thorakotomie)
Phantomschmerz *(O'Hagan 2006)
Postzoster Neuralgie
Trigeminusneuralgie/Tic douloureux
Diabetische Mononeuropathie
Engpasssyndrome (Karpaltunnel Syndrom, Schultergürtelkompressionssyndrom)
Polyarteritis nodosa
Neuralgische Schulteramyotrophie
Interkostale Neuralgie
Ischämische Neuropathie
Peripheres Nervensystem: Polyneuropathie
Diabetes mellitus
Hypothyreose
Alkoholismus
Vitamin B-Mangel
Multiples Myelom
Erbkrankheiten (Morbus Fabry, Amyloidose, Charcot-Marie-Tooth disease, Dominant-erbliche sensorische Neuropathie)
Bakterielle Infektionen (Bannwarth-Syndrom (Neuroborreliose), Lepra Neuropathie)
Virale Infektionen (Guillain-Barré-Syndrom (Eppstein-Barr-Virus), Aids-Neuropathie)
Medikamente (Chemotherapeutika, Antiretrovirale Substanzen, Cyclosporin, Chloramphenicol, Metronidazol)
Toxine (Thallium, Arsen, Quecksilber, Blei, Alkohol)
Laminitis beim Pferd (Hufrehe) *(Jones et al. 2007)
Zentrales Nervensystem
Multiple Sklerose
Querschnittsläsion
Parkinson-Syndrom
Hirnfarkt (v.a. Thalamus, Hirnstamm)
Syringomyelie *(Rusbridge and Jeffery 2008)
Komplexe neuropathische Erkrankungen
Komplexes regionales Schmerzsyndrom I (Sympathische Reflexdystrophie)
Komplexes regionales Schmerzsyndrom II (Kausalgie)

*vereinzelte Veröffentlichungen über neuropathische Schmerzsyndrome beim Tier.

Die Erforschung der Pathomechanismen chronischer neuropathischer Schmerzen, speziell peripherer Neuropathien, wird vor allem durch Tiermodelle ermöglicht (Wall and Gutnick 1974; Bennett and Xie 1988; Seltzer et al. 1990; Kim and Chung 1992; Decosterd and Woolf 2000). Alle diese Schmerzmodelle nutzen den N. ischiadicus, der sich als sehr großer, leicht zugänglicher gemischter Nerv für eine experimentelle periphere Nervenschädigung anbietet. Außerdem innerviert er die plantare Oberfläche des Fußes, die sich gut für sensorische Testungen eignet (Hogan 2002). Beim Chronic

Constriction Injury (CCI) Modell nach Bennett und Xie wird der linke N. ischiadicus locker mit vier chromierten Catgut Fäden umschlungen (Bennett and Xie 1988). Die Konstriktion der Blutgefäße, die den Nerven versorgen, führt zu einer Ödematisierung und im Bereich der Ligaturen zu einer Selbststrangulation des Nerven.

Table 1.3: Pathomechanismen neuropathischer Schmerzen im peripheren und zentralen Nervensystem

Pathomechanismen im peripheren Nervensystem (Aβ-, Aδ- und C-Fasern)	
<u>Sensibilisierung peripherer Nozizeptoren</u>	Durch eine Entzündungsreaktion und Ausschüttung von Entzündungsmediatoren kommt es zu einer Aktivierung von Proteinkinasen und einer verstärkten Phosphorylierung von intrazellulären Rezeptoren, Proteinen und Enzymen. Hierdurch wird die Erregungsschwelle der Nozizeptoren herabgesetzt (Clatworthy et al. 1995; Tracey and Walker 1995).
<u>Ektopische (spontane) Entladungen</u>	Durch eine Phosphorylierung, Neubildung und veränderte Expression von Na ⁺ -Ionen Kanälen wird die Erregbarkeit primärer Afferenzen erhöht (Wall and Gutnick 1974; Dib-Hajj et al. 1999; Costigan and Woolf 2000; Schaible 2007).
<u>Ephaptische Entladungen</u>	Durch Verlust der Myelinscheide kann es zu einer Weiterleitung von Aktionspotenzialen von A β - auf C-Fasern kommen (Blumberg and Janig 1982; Amir and Devor 2000).
<u>Sympathisch-afferente Kopplung</u>	Eine Expression von α Adrenozeptoren auf nozizeptiven Fasern führt zur Kopplung des sympathischen und des nozizeptiven Systems (Wasner and Baron 1998; Baron et al. 1999).
Pathomechanismen im zentralen Nervensystem (Dorsalhorn des Rückenmarks)	
<u>Sensibilisierung sekundärer Neurone</u>	Durch den verstärkten afferenten Input aus der Peripherie kommt es zu einer Verstärkung der exzitatorischen glutamatergen synaptischen Übertragung und zur Rekrutierung von NMDAR (Wind-up) (Mendell and Wall 1965; Dickenson 1990).
<u>Spinale Reorganisation</u>	A β -Fasern sprießen in Lamina I und II ein und nehmen Kontakt zu nozizeptiv spezifischen sekundären Neuronen auf (Woolf et al. 1992; Nakamura and Myers 1999).
<u>Verlust der endogenen Inhibition (Disinhibition)</u>	<ul style="list-style-type: none"> • Verschiebung des Anionengradienten durch aktivierte Gliazellen und exzitatorische Wirkung von Glycin über den GlyR (Coull et al. 2003; Coull et al. 2005) • Apoptotischer Zelltod von inhibitorischen Interneuronen (Moore et al. 2002) • Fehlender Input von mechanosensitiven Aβ-Fasern führt im Sinne der Gate-Control Theorie (Melzack and Wall 1965) zu einer verminderten Inhibition (Narikawa et al. 2000) • Verminderte Inhibition über GlyR nach Entzündungsreaktion (Ahmadi et al. 2002; Muller et al. 2003; Harvey et al. 2004)

Elektronenmikroskopische (Basbaum et al. 1991) und histologische (Nuytten et al. 1992) Untersuchungen des geschädigten Nerven offenbaren einen massiven Verlust von A β -Fasern sowie eine große Anzahl an unterbrochenen A δ -Fasern und pathologischen Veränderungen in vielen C-Fasern. Durch eine Entzündungsreaktion kommt es außer-

dem zu einer peripheren Sensibilisierung der primären Afferenzen. Im Dorsalhorn des Rückenmarks kommt es durch die periphere Sensibilisierung und den erhöhten afferenten Input zur zentralen Sensibilisierung der sekundären Neurone. Als adaptive Immunantwort kommt es nach der CCI-Operation zu einer Aktivierung von Gliazellen und T-Lymphozyten im Dorsalhorn des Rückenmarks (Hu et al. 2007). Zur Veranschaulichung der vielfältigen peripheren und zentralen Pathomechanismen, die im Verlauf einer Neuropathie auftreten können und die in ihrer Gesamtheit zur Ausprägung neuropathischer Schmerzen und einer Hyperalgesie und Allodynie führen, siehe **Tabelle 1.3**.

In der Klinik präsentieren sich neuropathische Schmerzen häufig als eine Kombination sowohl negativer als auch positiver sensorischer Phänomene (Suzuki and Dickenson 2000; Backonja 2003; Sommer 2003). Die negativen sensorischen Phänomene äußern sich als vermindertes oder fehlendes Schmerzempfinden oder Taubheit (Hypalgesie und Hypästhesie). Sie sind Ausdruck eines teilweisen oder kompletten Verlustes von afferenten Fasern (Suzuki and Dickenson 2000).

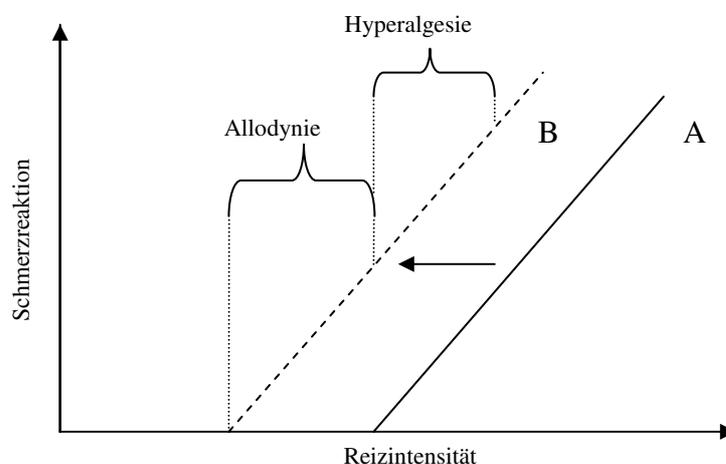


Bild 1.1: Vereinfachte Darstellung der Beziehung zwischen der physiologischen Schmerz Wahrnehmung eines gesunden Individuums (A) und der veränderten Schmerz Wahrnehmung eines Individuums mit neuropathischen Schmerzen (B) adaptiert aus (Hogan 2002). Reize geringer Intensität, die bei gesunden Individuen keine Schmerzreaktion auslösen, rufen bei Individuen mit neuropathischen Schmerzen eine Schmerzreaktion hervor (Allodynie). Reize, die auch physiologischerweise als schmerzhaft empfunden werden, werden jetzt als stärker schmerzhaft empfunden (Hyperalgesie).

Positive sensorische Phänomene äußern sich als Missempfindungen (Dysästhesien und Parästhesien), spontane Schmerzen, die entweder kontinuierlich oder intermittierend auftreten können und evozierte Schmerzen (Hyperalgesie und Allodynie) (**Bild 1.1**).

Die evozierten Schmerzen können mithilfe einer Reihe von Instrumenten sowohl zur klinischen Diagnostik (Hansson 2002), als auch zur Quantifizierung neuropathischer Schmerzen im Tierversuch herangezogen werden. Die häufigsten klinischen Symptome bei allen neuropathischen Schmerzen sind spontane Schmerzen und eine mechanische Allodynie (Backonja and Stacey 2004; Maag et al. 2006).

In der Gesamtbevölkerung treten neuropathische Schmerzen zurzeit mit einer Prävalenz von 6,9 (Bouhassira et al. 2007) bis 8 Prozent (Torrance et al. 2006) auf. 20-24 Prozent aller Diabetiker, 25-50 Prozent der Patienten, die eine Herpes Zoster Infektion erleiden (Schmader 2002) und 23-28 Prozent der Patienten mit multipler Sklerose (Boivie et al. 1994; Baron 2000b; Rog et al. 2007) entwickeln neuropathische Schmerzen. Häufig ist die Lebensqualität dieser Patienten durch Depressionen, Angstzustände und Schlafstörungen vermindert (Schmader 2002; Breivik et al. 2006; Davies et al. 2006; Jensen et al. 2007). Da viele neuropathische Schmerzsyndrome bei älteren Patienten häufiger auftreten und die Bevölkerung in den Industrieländern dank besserer medizinischer Versorgung immer älter wird, ist davon auszugehen, dass die Prävalenz neuropathischer Schmerzen in Zukunft zunehmen wird (Dworkin 2002).

Die Therapie neuropathischer Schmerzen stellt bis heute eine Herausforderung dar und die Therapieerfolge sind häufig unbefriedigend. Nur zwischen 40-60 Prozent der Patienten erleben eine teilweise Linderung ihrer Schmerzen (Dworkin et al. 2007).

Bedenkt man, dass die World Health Organisation (WHO) und die European Federation of IASP Chapters (EFIC) die Schmerzbehandlung bzw. die Schmerzlinderung zum universellen Menschenrecht erklärt haben (Cousins et al. 2004), dann entsteht ein akuter Bedarf, das Wissen um die grundlegenden Pathomechanismen neuropathischer Schmerzen zu erweitern und neue Therapieansätze zu entwickeln.

1.2 Die glycinerge Neurotransmission

1.2.1 Glycin als inhibitorischer Neurotransmitter

Ein wichtiger Pathomechanismus, der unter anderem für die Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen verantwortlich ist, ist der Verlust der endogenen glycinergen Inhibition (Disinhibition) im Rückenmark (Sivilotti and Woolf 1994; Zeilhofer 2005).

Die sekundären Neurone im Dorsalhorn des Rückenmarks, die von afferenten mechano-sensitiven A β -Fasern und nozizeptiven A δ - und C-Fasern kontaktiert werden und die für die Weiterleitung schmerzhafter Reize verantwortlich sind, stehen normalerweise unter ständiger inhibitorischer Kontrolle. Hierbei übernimmt Glycin neben GABA im Rückenmark die Aufgabe des inhibitorischen Neurotransmitters (Curtis and Watkins 1960; Aprison and Werman 1965). Glycin bindet hier an den strychnin-sensitiven Glycin-Rezeptor (GlyR) (Graham et al. 1983), der zur Familie der pentameren Liganden-gesteuerten Ionenkanäle gehört (Betz 1990). Durch die Bindung von Glycin öffnet sich der für Chlorid-Ionen permeable Kanal und Chlorid-Ionen strömen entlang des elektrochemischen Gradienten in die Zelle ein. Der Einstrom von Chlorid-Ionen durch den Ionenkanal bewirkt eine Hyperpolarisation der postsynaptischen Membran, was auch als Inhibitorisches Postsynaptisches Potenzial (IPSP) bezeichnet wird. Durch die Summation mehrerer IPSP wird die Wahrscheinlichkeit, dass das sekundäre Neuron ein Aktionspotenzial aufbauen kann, verringert. Die Reizweiterleitung wird somit gedämpft. Glycin wird zum einen von spinalen inhibitorischen Interneuronen und zum anderen auch direkt von absteigenden Bahnen aus dem Hirnstamm ausgeschüttet (Kato et al. 2006). Die inhibitorischen Interneurone können einerseits von primären mechano-rezeptiven (Narikawa et al. 2000) und nozizeptiven Afferenzen (Lu and Perl 2003; Zhou et al. 2008), andererseits von absteigenden, antinozizeptiven Fasern aus dem Hirnstamm aktiviert werden (Zeilhofer 2005). Auch die Motoneurone im Rückenmark stehen unter glycinerger inhibitorischer Kontrolle (Kandel et al. 2000). Es gibt mehrere Pathomechanismen, die zu einem Verlust bzw. einer verminderten glycinergen Inhibition führen können:

- Im Verlauf einer Neuropathie kann es in der Peripherie zu einem Untergang von Aβ-Fasern kommen. Da diese normalerweise inhibitorische Interneurone im Sinne der Gate-Control-Theorie (Melzack and Wall 1965) aktivieren (Narikawa et al. 2000), führt ihr Verlust zu einer verminderten Aktivierung der inhibitorischen Interneurone und dadurch zu einer verminderten Inhibition.
- Durch den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat kann es zu einem apoptotischen Untergang inhibitorischer Interneurone kommen. Glutamat, das von nozizeptiven Afferenzen nach einer peripheren Sensibilisierung im Verlauf einer Neuropathie verstärkt ausgeschüttet wird, kann über eine Öffnung des NMDA-Rezeptors und einem übermäßigen Einstrom von Kalzium exzitotoxisch wirken (Olney 1969; Kemp and McKernan 2002). Hinweise auf einen apoptotischen Untergang inhibitorischer Interneurone gibt es in einer Studie von Moore et al. (Moore et al. 2002). Untersuchungen von Polgar et al. können den selektiven Untergang inhibitorischer Interneurone nicht bestätigen (Polgar et al. 2003; Polgar et al. 2004).
- Gliazellen, die durch eine periphere Nervenschädigung aktiviert werden (Watkins et al. 2001; Marchand et al. 2005; Tsuda et al. 2005; Hu et al. 2007), können ebenfalls zu der zentralen Disinhibition beitragen (Coull et al. 2003; Keller et al. 2007). Der Grad der Gliazell-Proliferation korreliert mit der Ausprägung der neuropathischen Schmerzen (Jergova and Cizkova 2007; Echeverry et al. 2008). Der von Gliazellen ausgeschüttete Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) bindet an seinen neuronalen TrkB-Rezeptor und vermittelt dadurch eine Herunterregulierung des K^+/Cl^- -Kotransporters KCC2 (Rivera et al. 2004). Der KCC2-Transporter ist beim adulten Lebewesen normalerweise dafür zuständig, die intrazelluläre Chloridkonzentration gering zu halten (Payne et al. 2003). Ist die intrazelluläre Chloridkonzentration durch eine verminderte Expression des KCC2-Transporters erhöht, dann führt eine Bindung von Glycin an den Glycin-Rezeptor und eine Öffnung des Ionenkanals zu einem Ausstrom von Chlorid aus der Zelle entlang seines elektrochemischen Gradienten. Dadurch kommt es an der postsynaptischen Zellmembran zu einer verminderten Hyperpolarisation oder sogar zu einer Depolarisation (Prescott et al. 2006). Die Depolarisation der Zellmembran oder auch das Exzitatorische Post-synaptische Potenzial (EPSP) macht es wahrscheinlicher, dass das sekundäre Neuron ein Aktionspotenzial aufbauen kann. Somit übt Glycin unter diesen Um-

ständen eine exzitatorische Funktion über den normalerweise inhibitorischen Glycin-Rezeptor aus.

- Auch lang andauernde periphere Entzündungen können zu einer Reduzierung der glycinergen inhibitorischen Kontrolle in Neuronen der Lamina I des Rückenmarks beitragen (Müller et al. 2003). Bei entzündlichen Schmerzen und neuropathischen Schmerzen mit entzündlicher Komponente kann es, über die Bildung von Prostaglandin-E2 und einer Aktivierung des PGE-Rezeptors, zu einer Proteinkinase-A-abhängigen Phosphorylierung eines speziell in den oberflächlichen Schichten (Lamina I und II) des Dorsalhorns des Rückenmarks exprimierten Glycin-Rezeptors mit einer $\alpha 3$ -Untereinheit (GlyR $\alpha 3$) kommen, wodurch dieser gehemmt wird (Ahmadi et al. 2002; Harvey et al. 2004). Dieser Mechanismus der Disinhibition scheint jedoch nicht hauptverantwortlich für die Entstehung neuropathischer Schmerzen zu sein, da auch Mäuse, denen sowohl der GlyR $\alpha 3$ (GlyR $\alpha 3^{-/-}$) als auch der Prostaglandin-E2 Rezeptor (EP2 $^{-/-}$) fehlen, im CCI-Modell genauso wie Wild-Typ Mäuse neuropathische Schmerzen entwickeln (Hosl et al. 2006).

Eine Verstärkung der glycinergen Neurotransmission über eine verstärkte GlyR-Aktivierung kann der Disinhibition entgegenwirken. So kann eine kontinuierliche intrathekale Applikation von Glycin die Ausprägung neuropathischer Schmerzen im CCI-Modell über eine verstärkte GlyR-Aktivierung verhindern (Huang and Simpson 2000) bzw. abschwächen (Simpson et al. 1996; 1997). Auch die nach einer CCI-Operation endogen erhöhte Glycinkonzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks auf der operierten Seite wirkt über den GlyR antinozizeptiv (Sato and Omote 1996). Neben der antinozizeptiven Wirkung von Glycin ist auch die Immobilität, die durch Inhalationsnarkotika ausgelöst wird, teilweise GlyR-vermittelt (Zhang et al. 2003). In einem Modell für spinalen Schock, bei dem es zu einem Verlust der spinalen Reflexe und einer schlaffen Lähmung kommt, ist die endogene Glycinkonzentration gemessen durch Mikrodialyse 2- bis 3-mal höher als in der Kontrollgruppe (Simpson et al. 1993).

Zwei seltene Erkrankungen, denen eine fehlerhafte glycinerge Neurotransmission zugrunde liegt, sind die glycinerge Enzephalopathie und die Hyperekplexie (Eulenburg et al. 2006).

Bei der glycinergen Enzephalopathie wird Glycin nicht ordnungsgemäß durch das Glycin-Abbau-Enzym, welches sich in der Mitochondrienmembran von Astrozyten befindet (Sato et al. 1991), abgebaut und reichert sich im Liquor cerebrospinalis an. Die klinischen Symptome dieses Überangebotes an Glycin beinhalten unter anderem eine muskuläre Hypotonie und generelle Lethargie (Applegarth and Toone 2004; 2006).

Die Hyperekplexie (auch: startle syndrome, stiff baby syndrome) äußert sich bei neugeborenen Babys durch Krampfanfälle, die zu einer Muskelrigidität führen. Grundlegende Mechanismen der Hyperekplexie sind zum einen eine Fehlfunktion des Glycin-Rezeptors im Sinne einer Kanalopathie und zum anderen eine Mutation des Glycin-Transporter-2, der nicht mehr in der Lage ist, Glycin in das präsynaptische Neuron zu transportieren (Rees et al. 2006; Harvey et al. 2008). Das inhibitorische Neuron verarmt an Glycin und die klinischen Symptome der Hyperekplexie sind demnach die einer Unterversorgung mit Glycin.

1.2.2 Glycin als exzitatorischer Neurotransmitter

Neben seiner inhibitorischen Wirkung über den GlyR hat Glycin auch eine exzitatorische Wirkung. Als obligater Koagonist von Glutamat bindet Glycin an den NMDA-Rezeptor (NMDAR) (Johnson and Ascher 1987; Kleckner and Dingledine 1988; Budai et al. 1992). Das Glycin, das am NMDAR bindet, stammt zum großen Teil aus den Astrozyten, die Glycin mithilfe des Glycin-Transporter-1 sowohl aus dem synaptischen Spalt aufnehmen, als auch in den synaptischen Spalt entlassen können. Außerdem diffundiert Glycin im Sinne eines Spill-overs aus glycinergen Synapsen heraus (Titmus et al. 1996) und kann so glutamaterge Synapsen erreichen (Ahmadi et al. 2003).

Der NMDAR gehört zusammen mit dem AMPA- und dem Kainat-Rezeptor (die zusammen als non-NMDAR bezeichnet werden) zur Familie der ionotropen Glutamat-Rezeptoren (Danysz and Parsons 1998) und ist, neben Na^+ - und K^+ -Ionen auch für Ca^{2+} -Ionen permeabel. Im Gegensatz zu den GlyR, die sich hauptsächlich im Rückenmark befinden, kommt der NMDAR auch in supraspinalen Bereichen vor (Danysz and Parsons 1998).

Der NMDAR ist bei normalen, negativen Membranpotenzialen durch ein Mg^{2+} -Ion, das sich innerhalb des Ionenkanals befindet, blockiert (Mayer et al. 1984; Nowak et al. 1984). Er nimmt daher an der physiologischen Schmerzverarbeitung nicht teil. Erst

durch eine Sensibilisierung peripherer Nerven im Verlauf einer Neuropathie, wird die postsynaptische Membran durch die Ausschüttung von Glutamat und die Aktivierung der non-NMDA Rezeptoren stark genug depolarisiert, sodass das Mg^{2+} -Ion aus dem NMDAR entlassen wird (Mayer et al. 1984). Wenn es nun gleichzeitig zur Bindung von Glutamat und Glycin kommt, dann kann sich der NMDAR öffnen (Johnson and Ascher 1987; Larson and Beitz 1988). Der Einstrom von Na^+ - und K^+ -Ionen bewirkt eine Depolarisation der Zellmembran und wirkt somit exzitatorisch. Außerdem ist der NMDAR auch für Kalzium-Ionen permeabel. Nach einer CCI-Operation ist die intrazelluläre Kalziumkonzentration in spinalen Neuronen ipsilateral der Läsion erhöht (Kawamata and Omote 1996). Kalzium hat als sekundärer Botenstoff vielfältige Auswirkungen auf das postsynaptische Neuron. Durch das einströmende Kalzium kommt es zu einer direkten Phosphorylierung des NMDAR in Neuronen des Dorsalhorns (Zou et al. 2000; Guo et al. 2002), wodurch die Aufhebung des Mg^{2+} -Blocks auch schon bei negativeren Membranpotenzialen erleichtert wird. Auch die Offenzeiten des Kanals werden länger (Millan 1999). Die Aktivierung intrazellulärer Proteinkinasen (CaMKII, PKC) führt unter anderem zu einem verstärkten Einbau von AMPA-Rezeptoren in die Zellmembran, wodurch es zu einer weiteren Potenzierung der exzitatorischen glutamatergen Neurotransmission kommt (Li et al. 1999; Boehm et al. 2006).

Da für eine Aktivierung des NMDAR drei Bedingungen gleichzeitig erfüllt sein müssen (1. Depolarisation der Zellmembran und Entfernung des Mg^{2+} -Ions, 2. Bindung von Glutamat, 3. Bindung von Glycin), wird der NMDAR auch als Koinzidenzdetektor bezeichnet (Collingridge and Singer 1990). Er spielt eine entscheidende Rolle bei der synaptischen Plastizität und bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen. Das Phänomen, dass eine wiederholte Applikation von schmerzhaften Reizen die Reizantwort kurzfristig erhöht, wird als Wind-up bezeichnet (Mendell and Wall 1965) und durch den NMDAR vermittelt (Costigan and Woolf 2000). Im Hippokampus wird das gleiche Phänomen als Long Term Potentiation (LTP) bezeichnet und stellt die molekulare Grundlage für Lernprozesse und Gedächtnisbildung dar (Bliss and Lomo 1973).

1.2.3 Die Glycin-Transporter und ihre Inhibitoren

Die Glycinkonzentration im synaptischen Spalt und damit auch die Neurotransmitterwirkung von Glycin sowohl am inhibitorischen GlyR als auch am exzitatorischen NMDAR, wird durch Glycin-spezifische Glycin-Transporter (GlyT) reguliert (Lechner 2006). Eine Hemmung der GlyT durch spezifische Inhibitoren führt zu einer Erhöhung der extrazellulären Glycinkonzentration (Atkinson et al. 2001; Whitehead et al. 2004) und stellt somit eine Möglichkeit dar, die glycinerge und glutamaterge Neurotransmission zu beeinflussen.

Die Glycin-Transporter (GlyT) gehören zur Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Transporter, zu denen auch die Transporter für Monoamine (Serotonin, Norepinephrin und Dopamin) und die Transporter für den inhibitorischen Neurotransmitter GABA gehören (Nelson 1998; Chen et al. 2004). Die Aufnahme von Glycin in die Zelle durch GlyT ist energetisch an den transmembranösen Natrium-Gradienten gekoppelt, der durch die Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten wird (Eulenburg et al. 2005). Die GlyT nehmen Glycin aus dem synaptischen Spalt auf und beenden somit die Neurotransmitterwirkung von Glycin sowohl am GlyR als auch am NMDAR (Johnston and Iversen 1971; Lopez-Corcuera et al. 2001). Es gibt zwei verschiedene Glycin-spezifische GlyT (GlyT1 und GlyT2), die sich sowohl in ihrem Verbreitungsmuster als auch in ihrer physiologischen Funktion unterscheiden (siehe **Bild 1.2**).

1.2.3.1 Der Glycin-Transporter-1

Der Glycin-Transporter-1 (GlyT1) ist in den meisten Regionen des ZNS weit verbreitet und wird hauptsächlich von Astrozyten exprimiert (Adams et al. 1995; Zafra et al. 1995a; Jursky and Nelson 1996). Er ist mit dem NMDAR kolokalisiert (Smith et al. 1992), was auf eine wichtige Rolle des GlyT1 speziell bei der Kontrolle der glutamatergen Neurotransmission hinweist (Bergeron et al. 1998; Cubelos et al. 2005; Gabernet et al. 2005). Außerdem kommt der GlyT1 auch in prä- und postsynaptischen Neuronen von glutamatergen (Cubelos et al. 2005; Raiteri et al. 2005) und GABA/glycinergen Synapsen vor (Raiteri et al. 2001; Raiteri et al. 2008) (siehe auch **Bild 1.2**). Im Rückenmark und Hirnstamm werden GlyT1 zusammen mit dem GlyT2 in der Nähe von GlyR exprimiert und nehmen hier Einfluss auf die inhibitorische glycinerge Neurotransmission (Aragon and Lopez-Corcuera 2003; Eulenburg et al. 2005).

Der GlyT1 transportiert ein Glycin-Molekül zusammen mit einem Chlorid-Ion und zwei Natrium-Ionen in die Zelle (Roux and Supplisson 2000). Ist die intrazelluläre Natriumkonzentration erhöht oder ist die Zellmembran depolarisiert, kann der GlyT1 Glycin auch wieder aus der Zelle heraustransportieren (Aragon and Gimenez 1986; Sakata et al. 1997; Supplisson and Roux 2002; Aubrey et al. 2005), wo es dann für die Bindung an den NMDAR zur Verfügung steht. In glutamatergen Synapsen reduziert der GlyT1 die Glycinkonzentration unter die Sättigungsgrenze der Glycin-Bindungsstelle am NMDAR und limitiert somit dessen Aktivierung (Supplisson and Bergman 1997; Berger et al. 1998; Bergeron et al. 1998). Die Hauptaufgabe des GlyT1 ist es, Glycin aus dem synaptischen Spalt zu entfernen und somit die Neurotransmitterwirkung von Glycin zu beenden („Glycine Clearance“).

Homozygote Knockout-Mäuse (GlyT1^{-/-}), denen das Gen für den GlyT1 fehlt (Gomez et al. 2003a), sterben 6-14 Stunden nach der Geburt, höchstwahrscheinlich als Folge einer hochgradigen Ateminsuffizienz. Sie zeigen kaum spontane motorische Aktivität, reagieren nur schwach auf starke mechanische Stimuli und sind hochgradig ateminsuffizient. Elektrophysiologische Messungen mithilfe der Whole-Cell-Patch-Clamp Technik und die Verabreichung von Strychnin zeigen, dass die beobachteten Symptome durch eine Überaktivierung des GlyR durch eine erhöhte Glycinkonzentration im synaptischen Spalt vermittelt werden (Gomez et al. 2003a). Die Symptome dieser übermäßigen Glycinwirkung bei GlyT1-Knockout-Mäusen ähneln den klinischen Symptomen der humanen glycinergen Enzephalopathie.

Bei heterozygoten Mäusen (GlyT1^{+/-}), die halb so viele GlyT1 exprimieren wie Wild-Typ Mäuse, ist die Glycinaufnahme um 50 Prozent reduziert. Diese Mäuse entwickeln sich normal und zeigen in einem Verhaltensexperiment verbesserte Gedächtnisleistungen, welche über eine verstärkte NMDAR-Aktivierung vermittelt sind (Tsai et al. 2004). Elektrophysiologische Messungen zeigen, dass exogen zugeführtes Glycin die NMDAR-vermittelte Neurotransmission bei diesen Mäusen nicht weiter verstärken kann. Dies deutet darauf hin, dass die Glycin-Bindungsstelle bei heterozygoten (GlyT1^{+/-}) Knockout-Mäusen mit Glycin gesättigt ist (Tsai et al. 2004).

Ein natürlich vorkommender selektiver GlyT1-Inhibitor ist Sarkosin (N-methyl-Glycin) (Liu et al. 1993; Supplisson and Bergman 1997). Sarkosin ist ein Substrat des GlyT1

und hemmt die Aufnahme von Glycin kompetitiv. Der EC_{50} Wert von Sarkosin beträgt $150 \mu\text{M}$ (Lopez-Corcuera et al. 1998). Als Struktur analogon von Sarkosin wurde NFPS ((N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl])Sarkosin) entwickelt, das auch als ALX-5407 bekannt ist (Atkinson et al. 2001; Aubrey and Vandenberg 2001; Herdon et al. 2001) (**Bild 2.1**). ALX-5407 bindet irreversibel an eine extrazelluläre Bindungsstelle des GlyT1, die nicht identisch mit der Ionen-Bindungsstelle und Glycin-Bindungsstelle ist (Mallorga et al. 2003), und hemmt dadurch die Aufnahme von Glycin. Durch Mikrodialyse am lebenden Tier konnte nachgewiesen werden, dass die Glycinkonzentration im präfrontalen Kortex nach der oralen Verabreichung von ALX-5407 ansteigt (Atkinson et al. 2001).

1.2.3.2 Der Glycin-Transporter-2

Der Glycin-Transporter-2 (GlyT2) ist weniger weit verbreitet als der GlyT1 und wird hauptsächlich in der präsynaptischen Zellmembran von glycinergen Nervenendigungen im Rückenmark, im Hirnstamm und im Cerebellum exprimiert (Jursky and Nelson 1995; 1996). Er ist somit hauptsächlich auf das inhibitorische System beschränkt (Jursky and Nelson 1995; Poyatos et al. 1997). Er befindet sich in einiger Entfernung von den aktiven Zonen der Glycin-Ausschüttung, die auf den synaptischen Spalt beschränkt ist (Zafra et al. 1995a; Poyatos et al. 1997; Spike et al. 1997; Mahendrasingam et al. 2000). Zusätzlich kommt er auch auf Astrozyten vor (Raiteri et al. 2008) (siehe auch **Bild 1.2**). Im Rückenmark und im Hirnstamm überlappen sich die Verbreitungsmuster des GlyT2 und des GlyT1 (Eulenburg et al. 2005).

Der GlyT2 transportiert ein Glycin-Molekül zusammen mit einem Chlorid-Ion und drei Natrium-Ionen in die Zelle (Roux and Supplisson 2000). Da die extrazelluläre Natriumkonzentration unter physiologischen Bedingungen höher ist als die intrazelluläre Natriumkonzentration, entsteht ein starkes elektrochemisches Gefälle, welches es dem GlyT2 ermöglicht, 100-mal so schnell zu arbeiten wie der GlyT1 (Supplisson and Roux 2002). Der GlyT2 eignet sich, aufgrund seiner Stöchiometrie, besser als der GlyT1, Glycin in die Zelle aufzunehmen. Aus demselben Grund kann der GlyT2 jedoch nicht wie der GlyT1 in entgegen gesetzter Richtung arbeiten und Glycin in den synaptischen Spalt zurück entlassen (Roux and Supplisson 2000). Bedingt durch seine Lokalisation und seine Stöchiometrie wird dem GlyT2 die Aufgabe zugeschrieben, Glycin wieder in

die präsynaptische glycinerge Zelle aufzunehmen (Roux and Supplisson 2000; Legendre 2001; Supplisson and Roux 2002; Gomeza et al. 2003b), damit es dann von dem unspezifisch arbeitenden Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter (VIAAT) in die präsynaptischen Vesikel aufgenommen werden kann (Dumoulin et al. 1999) und dadurch wieder für eine inhibitorische Neurotransmission zur Verfügung steht („Glycine Recycling“).

Homozygote Knockout-Mäuse, denen der GlyT2 (GlyT2^{-/-}) fehlt, sterben in der zweiten Woche post partum, wahrscheinlich aufgrund der Unfähigkeit, Nahrung aufzunehmen (Gomeza et al. 2003b). Sie weisen komplexe neuromotorische Auffälligkeiten auf. Zu diesen gehören Spastizität, ein erhöhter Muskeltonus, starker Tremor und die Unfähigkeit sich aus der Rückenlage wieder aufzurichten. Elektrophysiologische Messungen von Rückenmarkskulturen und hypoglossalen Motoneuronen in situ zeigen eine verminderte Amplitude der GlyR-vermittelten IPSP. Durch die fehlenden GlyT2 verarmen die präsynaptischen Neurone also an Glycin, wodurch Glycin dann für eine inhibitorische Neurotransmission nicht mehr zur Verfügung steht. Die Symptome der GlyT2-Knockout-Mäuse ähneln denen der humanen Hyperekplexie (Zhou et al. 2002).

Der GlyT2 kann durch ALX-1393 (O-[(2-Benzyloxyphenyl-3-fluorophenyl)methyl]-L-Serin) selektiv gehemmt werden (Lechner 2000; Xu et al. 2005; Luccini and Raiteri 2007) (**Bild 2.1**).

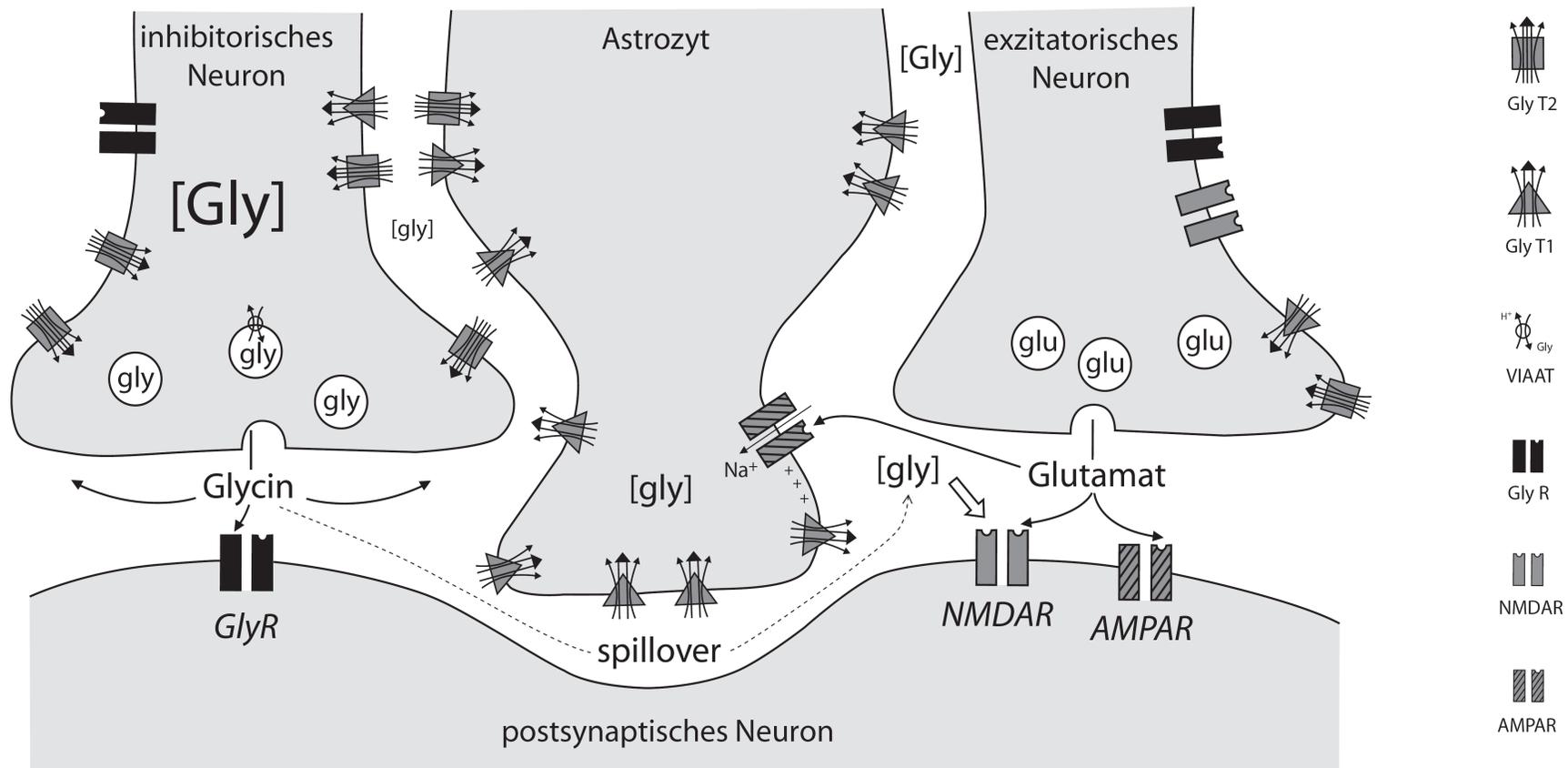


Bild 1.2: Vereinfachte Darstellung der Lokalisierung und Funktion der Glycin-Transporter-1 und -2. Adaptiert aus (Supplisson and Roux 2002). Beide Transporter spielen eine Rolle bei der Kontrolle der extrazellulären Glycinkonzentration in der glycinergen Synapse und limitieren den Spill-over zu benachbarten glutamatergen Synapsen. Der GlyT2 befindet sich hauptsächlich in der präsynaptischen Membran des inhibitorischen Neurons und ist dafür verantwortlich, Glycin wieder in die Zelle aufzunehmen, wo es dann durch VIAAT in präsynaptische Vesikel gefüllt werden kann und somit wieder für die inhibitorische Neurotransmission am GlyR zur Verfügung steht („Glycine Recycling“). Der GlyT1 befindet sich hauptsächlich in Astrozyten und kann Glycin sowohl aufnehmen („Glycine Clearance“), als auch wieder ausschütten. Der GlyT1 hält die Glycinkonzentration in der glutamatergen Synapse unter der Sättigungsgrenze für die Glycin-Bindungsstelle am NMDAR und nimmt so Einfluss auf die exzitatorische glutamaterge Neurotransmission. Weitere Informationen zum besseren Verständnis der Grafik sind dem Kapitel 1.2 und speziell dem Abschnitt 1.2.3 zu entnehmen.

1.3 Die Beeinflussung der glycinergen Neurotransmission durch Glycin-Transporter-Inhibitoren

Die Hemmung der GlyT durch Glycin-Transporter-Inhibitoren stellt eine interessante neue Möglichkeit dar, über eine Modulation der Glycinkonzentration im synaptischen Spalt, die glycinerge und die glutamaterge Neurotransmission zu beeinflussen. Speziell bei der Behandlung neuropathischer Schmerzen könnte die Verstärkung der glycinergen Inhibition der pathologischen Disinhibition entgegenwirken.

Andere Inhibitoren von Neurotransmittertransportern, zum Beispiel für Serotonin und Noradrenalin, werden seit Langem erfolgreich als Antidepressiva eingesetzt (Iversen 2006).

1.3.1 Die Beeinflussung der glycinergen Neurotransmission durch Inhibitoren des Glycin-Transporter-1

Der GlyT1-Inhibitor ALX-5407 war zu Beginn der vorliegenden Arbeit noch nicht auf seine Wirkung auf die Nozizeption bei neuropathischen Schmerzen getestet worden.

ALX-5407 und andere spezifische Inhibitoren des GlyT1 demonstrieren in vielen *in vitro* (Berger et al. 1998; Bergeron et al. 1998; Chen et al. 2003; Bradaia et al. 2004; Lim et al. 2004; Martina et al. 2004; Xu et al. 2005) und *in vivo* Studien (Chen et al. 2003; Kinney et al. 2003; Whitehead et al. 2004; Lipina et al. 2005; Perry et al. 2008) die Fähigkeit, durch eine Erhöhung der Glycinkonzentration in der Nähe des NMDAR, die exzitatorische NMDAR-vermittelte Neurotransmission zu verstärken. Eine Verstärkung der NMDAR-vermittelten exzitatorischen Neurotransmission durch die Hemmung des GlyT1 ist speziell bei der Behandlung der Schizophrenie von Interesse, da diese unter anderem eine Unterfunktion der NMDAR-vermittelten Neurotransmission zur Ursache hat (Millan 2002; Coyle et al. 2003; Stahl 2007). Da der NMDAR in supraspinalen Bereichen des ZNS für die LTP verantwortlich ist und daher bei Lern- und Gedächtnisprozessen involviert ist, könnte eine Potenzierung der NMDAR-vermittelten Neurotransmission durch eine Hemmung des GlyT1 auch bei kognitiven Störungen wie z. B. Morbus Alzheimer von Vorteil sein (Singer et al. 2008).

Hinweise darauf, dass eine Inhibition des GlyT1 neben der Potenzierung der exzitatorischen Neurotransmission über den NMDAR auch die inhibitorische Neurotransmis-

sion über den GlyR verstärkt, gibt es in der Studie von Gomeza et al. (Gomeza et al. 2003a). Die inhibitorische glycinerge Neurotransmission ist bei Knockout-Mäusen, die keine GlyT exprimieren und bei denen sich Glycin daher im synaptischen Spalt anreichert, verstärkt. Auch Menschen, die an der glycinergen Enzephalopathie leiden und bei denen sich Glycin aufgrund einer verringerten Enzymaktivität anreichert, zeigen Symptome einer übermäßigen Inhibition (Lethargie, Muskelschwäche).

Ebenso wird auch eine Hemmung der GlyT1 durch spezifische Inhibitoren über eine Erhöhung der Glycinkonzentration in der Nähe von GlyR zu einer Verstärkung der GlyR-vermittelten Neurotransmission führen können. Diese Potenzierung der inhibitorischen Neurotransmission im Dorsalhorn des Rückenmarks könnte der in Abschnitt 1.2.1 beschriebenen Disinhibition entgegenwirken und so die Ausprägung neuropathischer Schmerzen vermindern.

1.3.2 Die Beeinflussung der glycinergen Neurotransmission durch Inhibitoren des Glycin-Transporter-2

Der GlyT2-Inhibitor ALX-1393 wurde von Lechner et al. intrathekal verabreicht und demonstrierte in einem Modell für entzündlichen Schmerz antinozizeptive Eigenschaften (Lechner 2000). Die Wirkung von ALX1393 auf neuropathische Schmerzen ist noch nicht untersucht worden.

Eine Hemmung des GlyT2 führt im Rückenmark in der Nähe des inhibitorischen GlyR zu einer erhöhten Glycinkonzentration. Die Potenzierung der GlyR-vermittelten Neurotransmission ist speziell bei der Behandlung neuropathischer Schmerzen von Interesse, da diesen unter anderem ein Verlust bzw. eine verminderte glycinerge Inhibition zugrunde liegt. Da die glycinerge Neurotransmission auch bei Erkrankungen, die mit einer Spastizität einhergehen, vermindert sein kann (Simpson et al. 1995; Harvey et al. 2008), wäre eine Verstärkung der GlyR-vermittelten Inhibition durch eine Hemmung des GlyT2 auch für diese Indikationen vorteilhaft (Caulfield et al. 2001).

Neben einer inhibitorischen Wirkung über eine Erhöhung der Glycinkonzentration in der Nähe von GlyR könnte eine Hemmung des GlyT2 jedoch auch dazu führen, dass die präsynaptischen glycinergen Vesikel an Glycin verarmen und somit kein Glycin für die inhibitorische Neurotransmission zur Verfügung steht (Gomeza et al. 2003b; Rousseau et al. 2008).

1.4 Zielvorstellung

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss des Glycin-Transporter-1-Inhibitors ALX-5407 und des Glycin-Transporter-2-Inhibitors ALX-1393 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz zu untersuchen.

Hierbei sollten folgende Fragen geklärt werden:

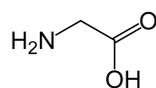
- Kommt es durch die einmalige intrathekale Applikation der Glycin-Transporter-Inhibitoren zu einer signifikanten Beeinflussung neuropathischer Schmerzen?
- Falls es zu einer Beeinflussung der Nozizeption kommt, treten dann sowohl antinozizeptive Effekte als auch pronozizeptive Effekte auf?
- Kommt es zu einer Beeinflussung der Nozizeption der unverletzten, gesunden Pfote?
- Treten nach der Applikation von Glycin-Transporter-Inhibitoren zusätzliche neurologische und/oder motorische Wirkungen auf?

Erste Ergebnisse zu diesem Vorhaben wurden bereits publiziert (Hermanns et al. 2008a) bzw. auf dem Deutschen Anästhesie Congress im Jahr 2008 vorgestellt (Hermanns et al. 2008b).

2 Material und Methoden

2.1 Glycin-Transporter-Inhibitoren

Die beiden Glycin-Transporter-Inhibitoren stammten von der Firma Sigma (Deisenhofen, Deutschland). Die Substanzen wurden vor Versuchsbeginn in 100%igem Dimethylsulfoxid (DMSO) nach Herstellerangaben gelöst. Die jeweiligen Konzentrationen (10 µg, 50 µg und 100 µg gelöst in 10 µl 100%igem DMSO) wurden in kleine Reaktionsgefäße gefüllt und bei -20 °C eingefroren. Am Versuchstag wurden die Substanzen bei Zimmertemperatur nach Bedarf aufgetaut und randomisiert intrathekal appliziert. Die Untersucher waren den jeweils verabreichten Dosierungen und Substanzen gegenüber verblindet.



Glycin

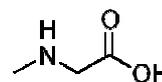
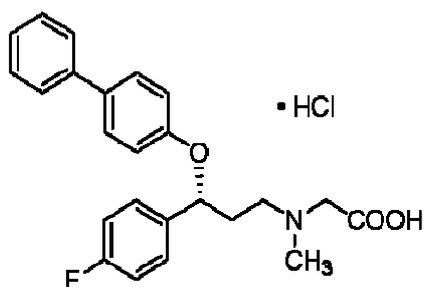
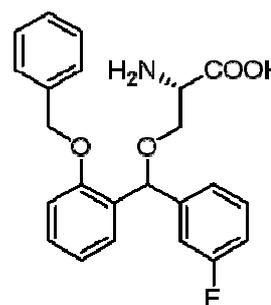
Sarkosin
(N-methyl-Glycin)ALX-5407
N-[3-(4-fluorophenyl)-3-(4-phenylphenoxy)propyl]-
SarkosinALX-1393
O-[(2-Benzyloxyphenyl)-3-fluorophenyl]methyl]L-
Serin

Bild 2.1: Die Strukturformeln von Glycin (Agonist am GlyR und obligater Koagonist von Glutamat am NMDAR), Sarkosin (natürlich vorkommender selektiver GlyT1-Inhibitor), ALX-5407 (selektiver GlyT1-Inhibitor) und ALX-1393 (selektiver GlyT2-Inhibitor).

2.1.1 Der Glycin-Transporter-1-Inhibitor ALX-5407

ALX-5407 ist ein potenter, selektiver Glycin-Transporter-1-Inhibitor (Atkinson et al. 2001; Aubrey and Vandenberg 2001; Mallorga et al. 2003). Eine synonyme Bezeichnung für ALX-5407 ist NFPS (N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)-propyl]Sarkosin). ALX-5407 besteht aus einem Sarkosin-Grundgerüst mit einem großen, sperrigen, hydrophoben Rest (siehe **Bild 2.1**). ALX-5407 hat eine EC_{50} von 2,8 nM und bindet damit irreversibel an den GlyT1. Anders als Sarkosin, ein natürliches Substrat und Hemmer des GlyT1, ist ALX-5407 kein Substrat des GlyT1. Die Summenformel von ALX-5407 ist $C_{24}H_{24}NO_3 \cdot HCl$. ALX-5407 hat eine molare Masse von 429,91 g/mol. Es hat eine Löslichkeit in DMSO von ~16 mg/ml. ALX-5407 wurde in Dosen von 10 µg, 50 µg und 100 µg gelöst in 10 µl 100%igem DMSO jeweils acht Tieren pro Gruppe intrathekal verabreicht.

2.1.2 Der Glycin-Transporter-2-Inhibitor ALX-1393

ALX-1393 ist ein Inhibitor des Glycin-Transporter-2 (Lechner 2000; Xu et al. 2005; Luccini and Raiteri 2007). ALX-1393 ist ein Serin-Derivat und sein synonymer Name ist O-[(2-Benzyloxyphenyl-3-fluorophenyl)methyl]-L-Serin (**Bild 2.1**). Die Summenformel von ALX-1393 ist $C_{23}H_{22}NO_4F$ und die molare Masse beträgt 395,42 g/mol. Die Löslichkeit von ALX-1393 in DMSO ist ~20 mg/ml. ALX-1393 wurde in Dosen von 10 µg, 50 µg und 100 µg gelöst in 10 µl 100%igem DMSO jeweils acht Tieren pro Gruppe intrathekal verabreicht.

2.2 Kontrollsubstanzen bzw. Lösungsmittel

Laut Herstellerangaben sind die beiden Glycin-Transporter-Inhibitoren ALX-5407 und ALX-1393 ausschließlich in DMSO löslich. Als Kontrolle wurde daher einer Versuchsgruppe (n = 8) 10 µl 100%iges DMSO intrathekal verabreicht. Um mögliche Wirkungen des DMSO auf die Nozizeption auszuschließen, wurde einer weiteren Gruppe (n = 8) 10 µl 0,9%iges NaCl intrathekal appliziert.

2.2.1 DMSO

Dimethylsulfoxid (DMSO) hat eine geringe Toxizität und wird häufig als potentes Lösungsmittel für wasserunlösliche Substanzen eingesetzt (Vignes 2000). Das DMSO stammte von der Firma Sigma.

2.2.2 NaCl

Das NaCl (Isotone Kochsalzlösung 0.9 %) stammte von der Firma Braun/Melsungen.

2.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar Ratten eingesetzt ($n = 122$). Die Ratten stammten aus der eigenen Zucht der Tierversuchsanlage Düsseldorf, sodass eine Quarantäne und eine Adaptationszeit entfielen. Der mikrobielle Status der Tiere war konventionell, die Haltung war offen. Bei Versuchsbeginn wogen die Tiere zwischen 300-400 g. Während des Versuchs wurden die Tiere einzeln in Makrolon[®]-Käfigen vom Typ 3 (800 cm², Höhe 15 cm) gehalten. Die Einstreu bestand aus entstaubtem Weichholzgranulat (Lignocell, Fa. J. Rettemaier und Söhne) und wurde wöchentlich gewechselt. Die Raumtemperatur betrug 22 ± 2 °C. Die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 50 ± 5 %. Pro Stunde wurde die Raumluft 16- bis 20-mal gewechselt. Die Beleuchtung fand mit weißem Kunstlicht statt. Die Lichtintensität lag bei 300-320 Lux. Der Tag-Nacht Rhythmus dauerte 12 Stunden, wobei die Tagphase von 06:00 bis 18:00 Uhr und die Nachtphase von 18:00 bis 06:00 Uhr dauerte. Das Futter (Alleinfutter für Ratten und Mäuse, Haltung, 10 mm, Fa. Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest) wurde ad libitum angeboten. Das entkeimte Wasser (ozonisiert und mit HCl angesäuert) hatte einen pH-Wert von 2,6-3 und wurde ebenfalls ad libitum in Glasflaschen angeboten.

2.4 Schmerztestungen

Die Schmerztestungen wurden entsprechend den ethischen Richtlinien der IASP zu Untersuchungen von experimentellem Schmerz am wachen Tier (Zimmermann 1983) und mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (AZ 50.05-230-43/06) durchgeführt. Die Schmerztestungen fanden im Zeitraum zwischen 8:00 bis 16:00 Uhr in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf statt.

2.4.1 Testung des Pfotenrückzugs-Schwellenwertes (PWT) und der mechanischen Allodynie mit dem Aesthesiometer®

Der physiologische Pfotenrückzugs-Schwellenwert (Paw Withdrawal Threshold, PWT) und die Ausprägung einer mechanischen Allodynie als Anzeichen eines neuropathischen Schmerzes wurden mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer® (Ugo Basile, Cat.No. 37400) quantifiziert. Dieses Gerät basiert auf den in der Neurologie und Schmerzforschung seit Langem eingesetzten von Frey-Filamenten (Frey 1896). Mit ähnlichen Methoden wird auch in der Klinik eine Allodynie beim Menschen diagnostiziert (Boivie et al. 1994).

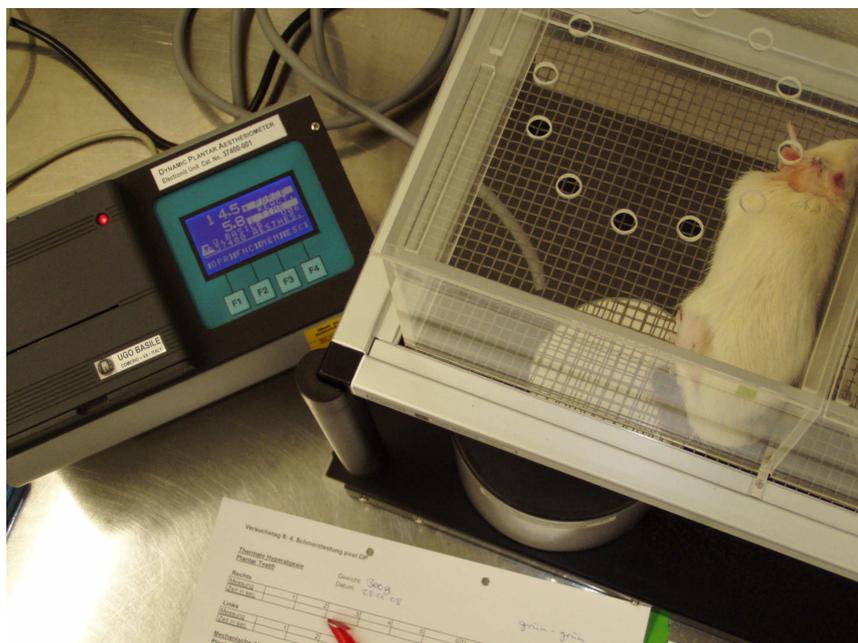


Bild 2.2: Versuchsaufbau zur Messung der mechanischen Allodynie und des PWT mit dem Aesthesiometer®. Links im Bild sieht man die digitale Anzeige und rechts im Bild das Versuchstier in der Plexiglasbox auf dem Drahtgeflecht. Unter der Ratte sieht man den runden Spiegel, der eine genaue Positionierung des Metallfilaments unter der Pfote ermöglicht.

Die Versuchstiere wurden hierzu in zwei aneinander geschweißte Plexiglasboxen (39 x 21 x 14 cm) gesetzt, die sich auf einem erhöht stehenden, engmaschigen Drahtgeflecht befanden (siehe **Bild 2.2**). Unter diesem Drahtgeflecht konnte das Aesthesiometer frei bewegt werden. Die exakte Positionierung des von Frey-Filaments unter der Hinterpfote der Ratte wurde durch einen Spiegel erleichtert (siehe **Bild 2.3**). Nach Druck auf den sich seitlich am Gerät befindlichen Auslöser bewegte sich das gerade, stumpfe Metallfilament (Durchmesser 0,5 mm) durch einen Elektroantrieb innerhalb von 20 Sekunden 12 mm nach oben. Hierdurch wird ein nicht schmerzhafter mechanischer Reiz auf die plantare Oberfläche der Hinterpfote der Ratte ausgeübt. Zog

die Ratte ihren Fuß weg, wurde die Messung beendet und der Messwert konnte an einer digitalen Anzeige abgelesen werden. Pro Pfote wurden 6 bis 7 Messungen durchgeführt. Der Messwert wird an der digitalen Anzeige in Gramm angegeben und wird als Pfotenrückzugs-Schwellenwert oder als Paw withdrawal threshold (PWT) bezeichnet.



Bild 2.3: Aesthesiometer[®] zur Messung der statischen, mechanischen Allodynie und des physiologischen PWT. Zu Erkennen ist das stumpfe, nicht schmerzhaft von Frey-Filament und der Spiegel zur einfachen Positionierung unter der Pfote der Ratte. In der zylindrischen Apparatur befindet sich ein Elektromotor, der das von Frey-Filament nach dem Druck auf den Auslöser kontinuierlich nach oben bewegt und so das Filament gegen die Pfote drückt.

Ist der PWT im Vergleich zur Kontrolle größer, dann spricht man von einem antinozizeptiven Effekt, da das Versuchstier den Reiz erst in einer größeren Intensität als schmerzhaft empfindet. Dementsprechend spricht man von einem pronozizeptiven Effekt, wenn der PWT kleiner ist, die Ratte ihren Fuß also schon bei Reizen geringerer Intensität wegzieht.

2.4.2 Testung der Pfotenrückzugs-Latenz (PWL) und der thermalen Hyperalgesie mit dem Plantar Test[®]

Die physiologische Pfotenrückzugs-Latenz (Paw Withdrawal Latency, PWL) und die Ausbildung einer thermalen Hyperalgesie als Anzeichen eines neuropathischen Schmerzes wurden mit dem Plantar Test 7370[®] (Ugo Basile Inc., Comerio, Italien) untersucht. Dieser Test basiert auf einer Methode, die 1988 von Hargreaves zuerst beschrieben wurde (Hargreaves et al. 1988).

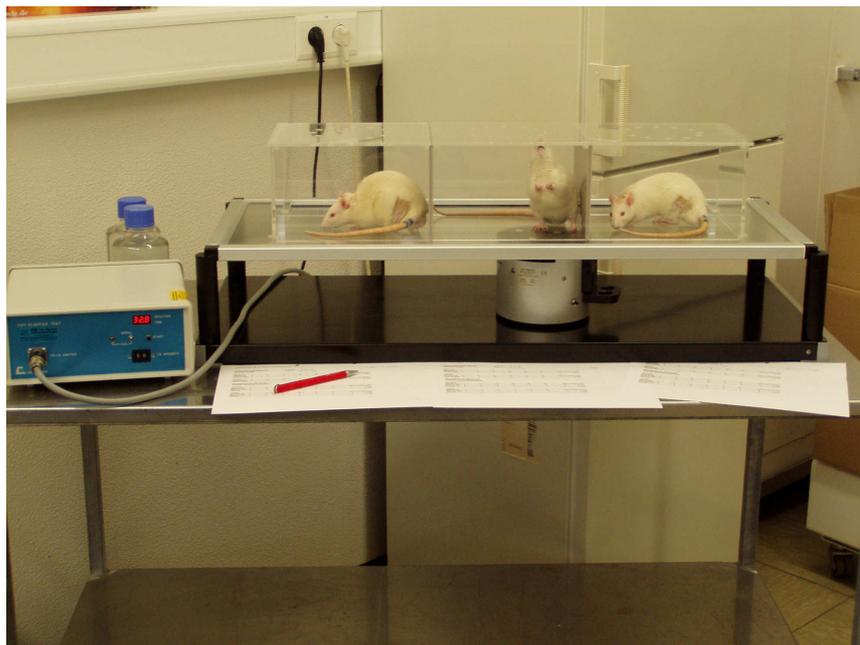


Bild 2.4: Messung der thermalen Hyperalgesie und der PWL mit dem Plantar Test[®]. Links im Bild sieht man die digitale Anzeige, an dem die PWL abgelesen werden kann. Die Ratten befinden sich in drei Plexiglasboxen. Der mobile Infrarotstrahler (silberner Zylinder in der Mitte des Bildes) lässt sich frei unter den Ratten bewegen.

Die Versuchstiere befanden sich während des Versuchs in drei zusammengeschweißten Plexiglasboxen (24 x 15 x 19 cm), in denen sie sich frei bewegen konnten (**Bild 2.4**). Nach einer Eingewöhnungsphase, in der die Tiere exploratives Verhalten zeigten, kamen die Tiere zur Ruhe und die Schmerztestung konnte begonnen werden. Hierzu wurde der mobile Infrarotstrahler mithilfe eines Fadenkreuzes unter der Hinterpfote der Ratte positioniert (siehe **Bild 2.5**). Nach Druck auf den Auslöser erzeugt der Infrarotgenerator fokussierte Hitzestrahlen mit einer Intensität von 50 Watt/Sekunde. Dieser thermale Reiz ist ein schmerzhafter Reiz. Wenn die Ratte den Hitzereiz als schmerzhaft wahrgenommen hatte und ihre Pfote wegzog, schalteten sich der Infrarotgenerator und der Sekundenzähler automatisch ab. Ein häufig zu beobachtendes Verhalten nach der

Schmerzwahrnehmung war das Wegziehen und ausgiebige Belecken der betroffenen Pfote. Die PWL konnte dann an dem 3-stelligen LED-Display in 0,1 Sekunden Schritten abgelesen werden. Um eine Überhitzung der einzelnen Pfoten zu vermeiden, wurde dieselbe Pfote nicht direkt anschließend wieder getestet. Außerdem schaltete sich der Hitzereiz automatisch nach 32,8 Sekunden ab. Die Schmerztestung wurde an beiden Hinterpfoten jeweils 6- bis 7-mal durchgeführt.



Bild 2.5: Der mobile Infrarotgenerator wird mithilfe des Fadenkreuzes unter der plantaren Oberfläche des Fußes der Hintergliedmaße positioniert. Nach Druck auf den Auslöser tritt in der Mitte des Fadenkreuzes ein fokussierter, schmerzhafter Hitzestrahler aus.

Der Messwert (PWL) gibt die Zeit in Sekunden an, bei der die Ratte ihren Fuß wegzieht. Ist die PWL im Vergleich zur Kontrolle verlängert, dann spricht man von einem antinozizeptiven Effekt, da das Versuchstier den Reiz jetzt erst in einer größeren Intensität als schmerzhaft empfindet. Dementsprechend spricht man von einem pronozizeptiven Effekt, wenn die PWL im Vergleich zur Kontrolle verkürzt ist.

2.5 Operationen

2.5.1 Operationsvorbereitung

Vor der Operation wurden die Tiere (n = 122) tierärztlich untersucht. Das Körpergewicht wurde ermittelt, um die Narkose genau dosieren zu können. Die Versuchstiere wurden mit 60 mg/kg Pentobarbital (Narcoren[®], Merial) i.p. narkotisiert. Nach Erlöschen der Flucht-, Stell- und Lidreflexe wurden der Nackenbereich und der linke Oberschenkel rasiert und desinfiziert (Dibromol Tinktur farblos, Trommsdorff Arzneimittel). Um die Augen vor dem Austrocknen zu schützen, wurde ein Augengel appliziert (Visdic Augengel, Dr. Mann Pharma). Intraoperativ wurden die Tiere durch eine Wärmematte im OP-Bereich und eine Wärmeflasche und/oder Wärmelampe in der Aufwachphase vor Auskühlung geschützt. Um dem Flüssigkeitsverlust entgegenzuwirken, wurden 5 ml 0,9%iges NaCl s.c. verabreicht. Nach den Operationen standen die Tiere unter tierärztlicher Beobachtung, bis sie vollständig aus der Narkose erwacht waren. Zeigten die Tiere Lähmungserscheinungen, wurden sie umgehend euthanasiert.

2.5.2 Operation der linken Hintergliedmaße nach dem Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz von Bennett und Xie

Bennett und Xie haben 1988 das Chronic Constriction Injury Modell (CCI-Modell) als Tiermodell einer peripheren Mononeuropathie etabliert (Bennett and Xie 1988). Hierbei wird der linke N. ischiadicus durch vier lockere Catgut Ligaturen geschädigt. Zehn bis zwölf Tage nach der Operation bildet sich dann an der linken Pfote eine Allodynie und Hyperalgesie aus.

Die Tiere wurden für die Operation in rechter Seitenlage mit einem sterilen Tuch abgedeckt. Das Operationsfeld blieb frei. Der Hautschnitt wurde caudal des linken Oberschenkelknochens in einer Verbindungslinie des Sitzbeinhöckers und des Knies angelegt. Dann wurden die Muskelbäuche des M. biceps femoris mit einer Schere stumpf voneinander getrennt. Mithilfe eines Wundspreizers wurde das Operationsfeld übersichtlich freigehalten. Der linke N. ischiadicus wurde vorsichtig, ohne ihn direkt zu berühren, von seiner bindegewebigen Hülle befreit. Proximal der Trifurkation wurden dann vier lockere Ligaturen mit 3-0 Catgut um den Nerv gelegt (**Bild 2.6**). Die Muskelfaszie wurde mit 5-0 Vicryl Fäden genäht. Die Hautnaht erfolgte mit 5-0 Prolene Fäden.



Bild 2.6: Das Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz. Zu erkennen sind die vier lockeren Catgut Ligaturen um den freigelegten N. ischiadicus.

2.5.3 Implantation eines intrathekalen PE10 Katheters

Die Methode der intrathekalen Katheterisierung von Ratten wurde 1976 zuerst von Yaksh und Rudy beschrieben (Yaksh and Rudy 1976). Mithilfe des Katheters ist es möglich, Medikamente direkt subarachnoidal zu verabreichen und so deren Wirkung auf das Rückenmark zu untersuchen.

Die Katheter (PE10 Katheter, Polyethylenschlauch, Sinux Portex Ltd. U.K.) wurden am OP-Tag auf 12 cm Länge zurechtgeschnitten. Der Innendurchmesser der Katheter betrug 0,28 mm, der Außendurchmesser 0,61 mm. Bis zur OP wurden die Katheter in einer mit Alkohol gefüllten Petrischale aufbewahrt. Vor der Implantation wurden die Katheter gründlich mit NaCl ab gespült, sowie auf ihre Durchlässigkeit überprüft.

Die Ratten wurden in Bauchlage auf ca. 5 cm hoch gestapelten Kompressen gelagert. Mithilfe eines Stereotakts (Trent Wells. Inc., So.Gate, Calif.) wurde der Kopf so fixiert, dass er sich einfach nach oben und unten, jedoch nicht nach lateral bewegen ließ. Es wurde darauf geachtet, dass der Kopf gerade fixiert war, kein Exophthalmus vorlag und die Ohren sich in entspannter, normaler Haltung befanden (Malkmus and Yaksh 2004). Der Hautschnitt mit einem 13er Skalpell (Braun Aesculab AG) erfolgte medial in der Genickgegend. Als Orientierungspunkte diente die Protuberantia occipitalis und das

Tuberculum dorsale des Atlas, bzw. der etwas besser zu tastende Processus spinalis des Axis. Dann wurde die Faszie des M. rectus capitis dorsalis major und die des M. rectus capitis minor durchtrennt. Ein mikrochirurgischer Wundspreizer half die Muskeln auseinanderzuhalten. Mit einem scharfen Löffel wurde dann die Membrana atlantooccipitalis anterior und posterior freigelegt. Diese spannt sich vom vorderen bzw. hinteren Atlasbogen zur vorderen bzw. hinteren Grenze des Foramen magnum (**Bild 2.7**).

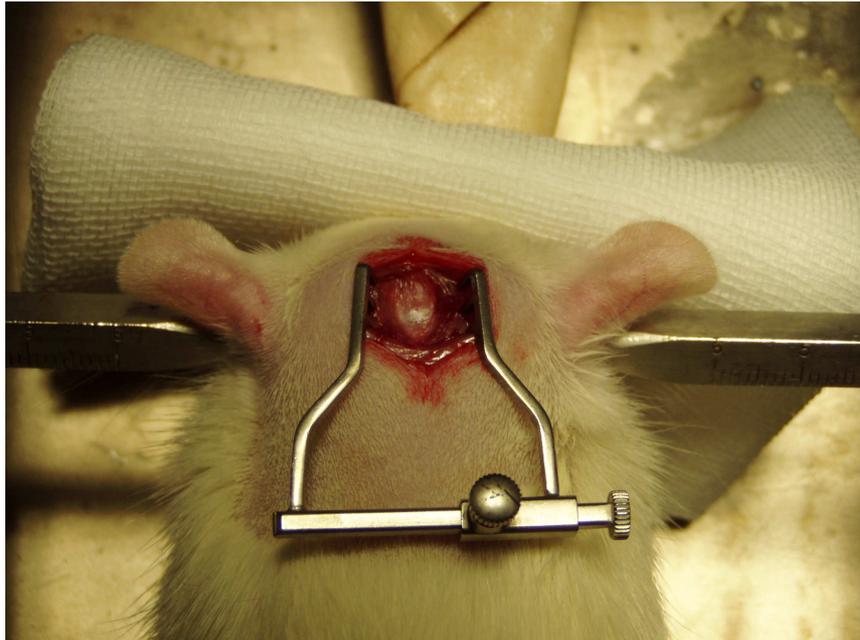


Bild 2.7: Operationssitus nach Freilegung der hier leicht schimmernden Membrana atlantooccipitalis. Das Operationsfeld wird durch einen mikrochirurgischen Wundspreizer übersichtlich freigehalten. Die Fixierung des Kopfes geschieht mithilfe eines Stereotakts.

Dann wurde sehr vorsichtig die Membrana atlantooccipitalis mit einem 11er Skalpell in sagittaler Richtung angeritzt. Da die Membrana atlantooccipitalis fest mit der Dura mater verwachsen ist und die Arachnoidea durch den intrathekalen Druck eng an die Dura gepresst wird, wurde so der subarachnoidale Raum eröffnet. Durch die ca. 1 mm lange Öffnung floss bis zum Druckausgleich Liquor cerebrospinalis ab. Nun wurde der Kopf des Tieres maximal gebeugt. Der vorbereitete Katheter wurde durch die Öffnung in den Wirbelkanal eingeführt und langsam und vorsichtig 8 cm in dorsocaudale Richtung vorgeschoben. Mittels eines Kunststoffklebers (Stabiloplast Kunststoff 488, Renfert GmbH) wurde der Katheter am Hinterhauptsbein fixiert. Außerdem verschloss der Kleber die Öffnung in der Membrana atlantooccipitalis und verhinderte so einen weiteren Verlust von Liquor cerebrospinalis. Zur zusätzlichen Fixation des Katheters wurde er zusammen mit der Muskelnah vernäht. Die Muskelnah erfolgte mit resorbier-

barem Nahtmaterial (5-0 Vicryl, Ethicon). Die Hautnaht erfolgte mit nicht-resorbierbarem Nahtmaterial (5-0 Prolene, Ethicon). Abschließend wurde der Katheter mithilfe einer Mikroliter Spritze (Hamilton Bonaduz AG) mit 10 µl NaCl gespült. Das Ende des Katheters wurde mithilfe eines Feuerzeugs angeschmolzen und durch Druck eines Nadelhalters verschlossen.

2.6 Versuchsprotokoll

Der Tierversuch fand mit Genehmigung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen statt (AZ 50.05-230-43/06). Die Schmerztestungen und Operationen fanden zwischen 8:00 bis 16:00 Uhr in der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf statt. Zur Veranschaulichung des zeitlichen Ablaufs des Versuchs siehe **Tabelle 2.1**.

Tabelle 2.1: Zeitlicher Versuchsablauf

Tag 1	Schmerztestungen (Aesthesiometer und Plantar Test) Operationen (CCI und intrathekale Katheterisierung)
Tag 2 bis 12	Tägliche Kontrolle der Versuchstiere (post OP Monitoring)
Tag 12	Schmerztestungen Applikation der Test- bzw. Kontrollsubstanzen i.t. Schmerztestungen 5 min post Applikation Schmerztestungen 10 min post Applikation Schmerztestungen 30 min post Applikation Schmerztestungen 60 min post Applikation Schmerztestungen 120 min post Applikation Schmerztestungen 240 min post Applikation Euthanasie der Versuchstiere

CCI = Chronic Constriction Injury; i.t. = intrathekal.

Am ersten Versuchstag wurde eine erste Schmerztestung (Plantar Test und Aesthesiometer) durchgeführt. Diese Messwerte stellen die physiologischen Schwellenwerte der PWL und des PWT dar. Anschließend fanden am selben Tag die beiden Operationen (CCI und intrathekale Katheterisierung) statt. Nach den Operationen wurden die Tiere einzeln gehalten, um ein gegenseitiges Belecken der OP-Wunde und eine Beschädigung des Katheters zu verhindern.

In den nächsten 10 bis 12 Tagen wurden die Ratten täglich tierärztlich untersucht (post OP Monitoring). Hierbei wurden neben dem Gewicht auch andere Befunde, die Rückschlüsse auf postoperative Schmerzen und das Allgemeinbefinden der Tiere zulassen

(z. B. Brillenbildung, Körperhaltung, Pflegezustand) notiert. Gab es Anzeichen für starke Schmerzen und Leiden, oder traten Lähmungserscheinungen auf, wurden die Tiere umgehend euthanasiert.

Am 10. bis 12. Tag nach den Operationen wurden erneut die Schwellenwerte der PWL und des PWT bestimmt. Eine signifikante Reduzierung der PWL und des PWT an der operierten Gliedmaße zeigt die erfolgreiche Ausprägung neuropathischer Schmerzen an. Ratten, bei denen sich an der linken, operierten Gliedmaße ein neuropathischer Schmerz entwickelt hatte, wurden in die Studie aufgenommen.

Die Testsubstanzen (ALX-5407 und ALX-1393) und die Kontrollsubstanzen (NaCl und DMSO) wurden am Versuchstag bei Zimmertemperatur aufgetaut. Dann wurden sie intrathekal appliziert. Hierzu wurden die Ratten mit einem Tuch fixiert, der Katheter wurde mit einer Schere eröffnet und die Substanzen mit einer Mikroliter Spritze (Hamilton Bonaduz AG) verabreicht. Um sicher zu gehen, dass die Substanzen nicht im Katheter verblieben, wurde der Katheter anschließend mit 10 µl 100%igem DMSO gespült. Dann wurde der Katheter mithilfe eines Feuerzeugs angeschmolzen und durch Druck mit einem Nadelhalter verschlossen. Da die Studie verblindet war, wussten die Untersucher zu keinem Zeitpunkt, welche Substanz in welcher Konzentration verabreicht worden war. In **Tabelle 2.2** sind die Versuchsgruppen anschaulich dargestellt.

Tabelle 2.2: Versuchsgruppen-Übersicht

	µg/10 µl DMSO	n
CCI + GLYT 1-Inhibitor ALX-5407 i.t.	10	8
CCI + GLYT 1-Inhibitor ALX-5407 i.t.	50	8
CCI + GLYT 1-Inhibitor ALX-5407 i.t.	100	8
CCI + GLYT2-Inhibitor ALX-1393 i.t.	10	8
CCI + GLYT2-Inhibitor ALX-1393 i.t.	50	8
CCI + GLYT2-Inhibitor ALX-1393 i.t.	100	8
CCI + NaCl i.t. (Kontrolle)		8
CCI + DMSO i.t. (Kontrolle)		8

CCI = Chronic Constriction Injury; i.t. = intrathekal; n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

Nachdem die Substanzen appliziert waren, fanden nun nach 5, 10, 30, 60, 120 und 240 Minuten jeweils beide Schmerztestungen (Plantar Test und Aesthesiometer) statt.

Tiere, bei denen nach Verabreichung der Substanzen Nebenwirkungen auftraten, wurden einer neurologischen Untersuchung unterzogen. Hierbei wurden das Allgemeinverhalten und der Bewusstseinszustand, sowie die Haltung und der Gang des Tieres notiert. Anschließend wurden der Flexor-Reflex (Zwischenzehen-Reflex) und der Pannikulus-Reflex (Kontraktion der Hautmuskulatur des Rumpfes) mithilfe einer Pinzette überprüft. Schmerzhaft Reize wurden durch Kneifen mit der Pinzette zugefügt. Kam es daraufhin zu Lautäußerungen, Abwehr- bzw. Fluchtreaktionen und zu einer Hinwendung des Tieres zum schmerzhaften Reiz, wurde dies als bewusste Schmerzwahrnehmung gedeutet. Nur Tiere, bei der diese neurologische Untersuchung keinen besonderen Befund ergab, wurden weiteren Schmerztestungen unterzogen. Tiere, die permanent gelähmt waren, oder deren Reflexe verzögert waren, wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Am Ende des Versuchs wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital (150 mg/kg i.p.) eingeschläfert.

2.7 Statistische Auswertung

Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Die Pfotenrückzugs-Latenzen (PWL), die Pfotenrückzugs-Schwellenwerte (PWT) und die Flächen unter den Kurven zwischen den Gruppen, wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) und LSD post Hoc Test verglichen (SPSS 16). $P \leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen. Die Berechnung der Flächen unter der Kurve wurde mithilfe der Trapezregel durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse zur Methodik

3.1.1 Erfolgsrate der Operationen

Insgesamt wurden für diese Studie 122 Tiere operiert. Von diesen 122 Tieren fielen 58 Tiere operationsbedingt aus. Gründe für das Ausscheiden aus der Studie waren postoperative Lähmungen, Tod während der Operation, Verlust des intrathekalen Katheters und eine Wundinfektion (siehe **Tabelle 3.1**). Alle 64 Tiere, die nach den Operationen nicht euthanasiert werden mussten, entwickelten neuropathische Schmerzen an der operierten Gliedmaße (siehe Abschnitt 3.1.2) und konnten in die Studie aufgenommen werden.

Tabelle 3.1: Erfolgsrate der beiden Operationen und Gründe für den Ausfall

	Anzahl n = 122	Prozent %
Insgesamt für die Studie operierte Tiere		
Erfolgreich operierte Tiere	64	52,46
Ausgefallene Tiere	58	47,54
Ausfall durch Katheterisierung		
Postoperative Lähmung	46	37,70
Tod während OP	7	5,74
Katheter verloren*	4	3,28
Wundinfektion	1	0,82
Ausfall durch CCI		
Autotomie*	1	0,82

* Das Tier mit der Autotomie hatte auch den Katheter verloren, und kommt daher in beiden Kategorien vor.

3.1.2 Kontrolle der Ausprägung einer Allodynie und Hyperalgesie

Um die Ausprägung einer Allodynie und Hyperalgesie und damit den Erfolg des CCI-Modells für neuropathische Schmerzen zu überprüfen, wurden der erste Messwert (vor der CCI-Operation) und der zweite Messwert (10 bis 12 Tage nach der CCI-Operation) miteinander verglichen und in einem Blockdiagramm dargestellt (PWT bzw. PWL \pm SEM; n = 64; $p \leq 0,05$). Der Messwert vor der CCI-Operation spiegelt die physiologischen Pfotenrückzugs-Latenzen (PWL) bzw. Schwellenwerte (PWT) der gesunden, nicht operierten Tiere wieder. Der zweite Messwert verdeutlicht, wenn er signifikant erniedrigt ist, die erfolgreiche Ausprägung einer Hyperalgesie und Allodynie nach der CCI-Operation an der linken Pfote.

3.1.2.1 Ausprägung der mechanischen Allodynie an der linken Pfote

10 bis 12 Tage nach der CCI-Operation an der linken Pfote hat sich bei allen untersuchten Tieren an der linken Pfote eine signifikante mechanische Allodynie ausgeprägt ($44,0 \pm 0,6$ g vor der CCI vs. $21,8 \pm 0,6$ g nach der CCI; Mittelwert \pm SEM; $n = 64$; $*p \leq 0,05$; **Bild 3.1**). Die Werte der rechten Pfote unterscheiden sich nicht signifikant von den physiologischen Ausgangswerten.

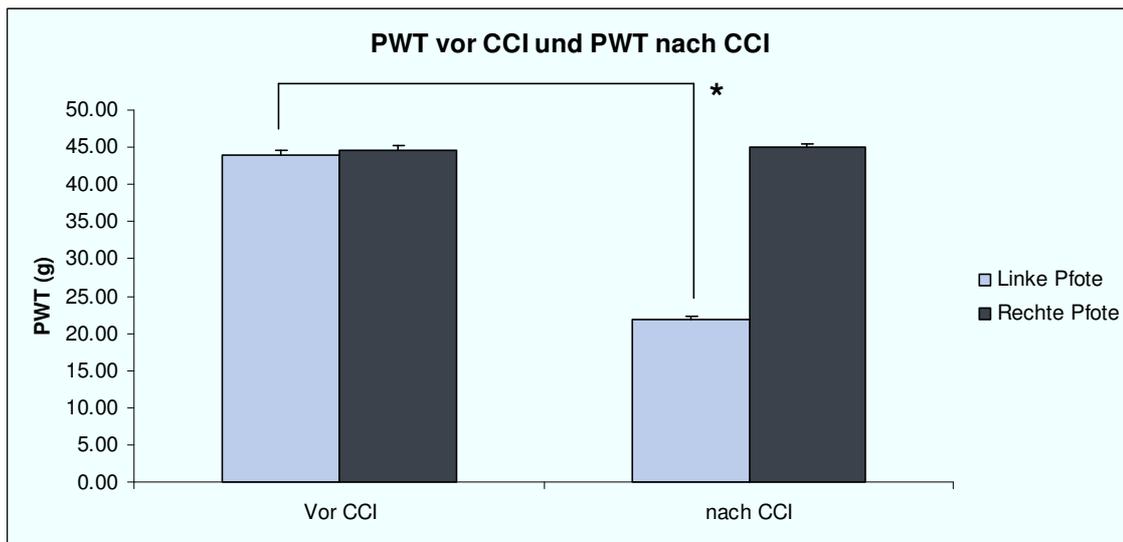


Bild 3.1: Darstellung der physiologischen Werte des PWT der rechten und linken Pfote vor der CCI und der Ausprägung einer mechanischen Allodynie an der linken operierten Pfote nach der CCI. (PWT = paw withdrawal threshold; Mittelwert \pm SEM; $*p \leq 0,05$; $n = 64$).

3.1.2.2 Ausprägung der thermalen Hyperalgesie an der linken Pfote

10 bis 12 Tage nach der CCI-Operation der linken Pfote hat sich bei allen untersuchten Tieren eine signifikante thermale Hyperalgesie an der operierten linken Gliedmaße entwickelt ($9,7 \pm 0,3$ s vor der CCI vs. $7,5 \pm 0,2$ s nach der CCI; Mittelwert \pm SEM; $n = 64$; $*p \leq 0,05$; **Bild 3.2**).

Die PWL der rechten, nicht operierten Pfote ist nach der CCI-Operation der linken Gliedmaße signifikant verlängert ($10,0 \pm 0,3$ vor der CCI vs. $11,7 \pm 0,2$ s nach der CCI; Mittelwert \pm SEM; $n = 64$; $*p \leq 0,05$; **Bild 3.2**).

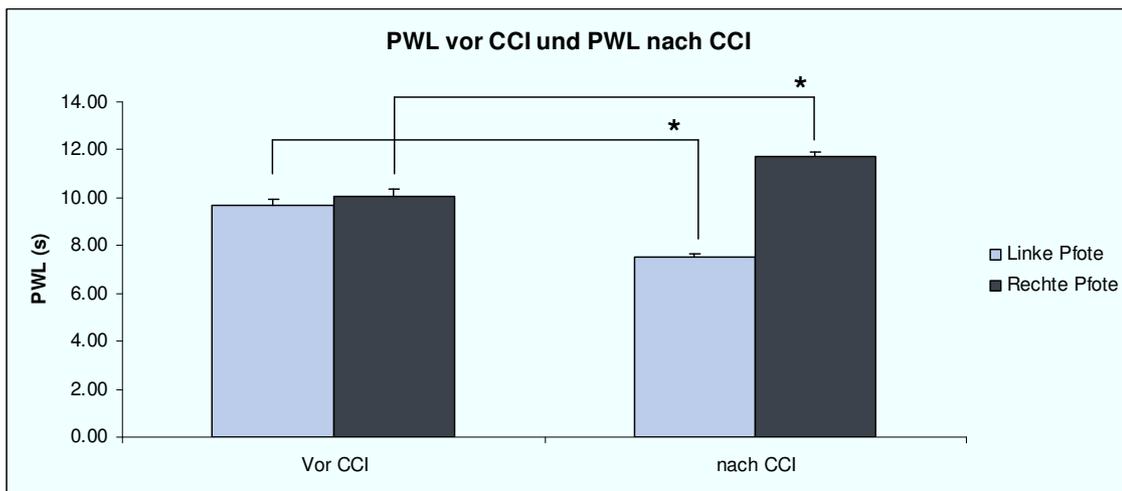


Bild 3.2: Darstellung der physiologischen Werte der PWL der rechten und linken Pfote vor der CCI und der Ausprägung einer thermalen Hyperalgesie der linken Pfote nach der CCI. Die PWL der rechten Pfote ist signifikant verlängert (PWL = paw withdrawal latency; Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 64$).

3.1.3 Ergebnisse der Kontrollsubstanzen DMSO und NaCl

3.1.3.1 Wirkung von DMSO und NaCl auf die mechanische Allodynie der linken Pfote

Die Verlaufskurve nach der Applikation von DMSO liegt zu allen Zeitpunkten knapp unterhalb der Kurve von NaCl. Dieser pronozizeptive Trend von DMSO auf die mechanische Allodynie der linken Pfote ist nicht signifikant (**Bild 3.3**).

Die Fläche unter der Kurve von DMSO ist kleiner als die von NaCl. Ein signifikanter Unterschied der Wirkungen von DMSO und NaCl auf die mechanische Allodynie der linken Pfote liegt nicht vor (**Bild 3.3**).

3.1.3.2 Wirkung von DMSO und NaCl auf die thermale Hyperalgesie der linken Pfote

Die Verlaufskurve von DMSO liegt während des gesamten Beobachtungszeitraums knapp unterhalb der Kurve von NaCl. Dieser pronozizeptive Trend auf die thermale Hyperalgesie der linken Pfote ist zu keinem Zeitpunkt signifikant im Vergleich zu NaCl (**Bild 3.4**).

Die Fläche unter der Kurve von DMSO ist kleiner als die von NaCl. Die Gesamtwirkungen von DMSO und NaCl auf die thermale Hyperalgesie der linken Pfote unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (**Bild 3.4**).

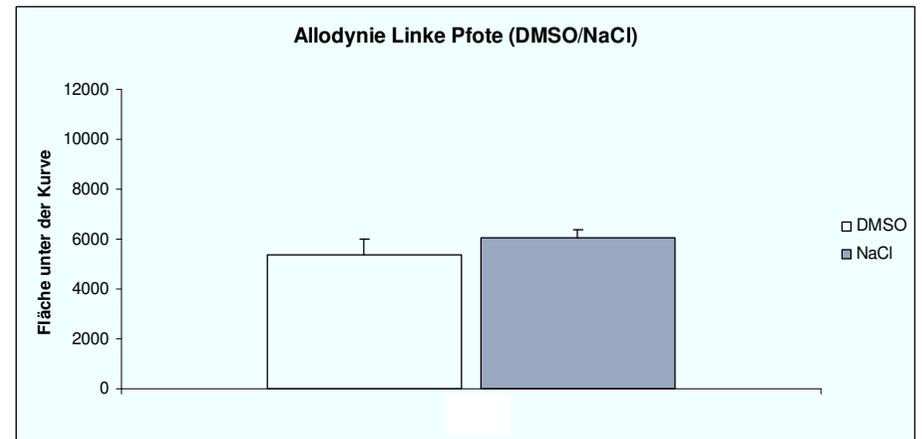
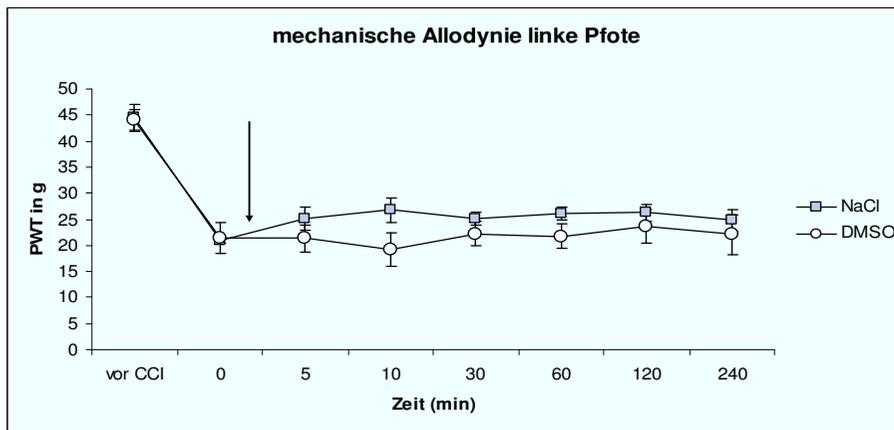


Bild 3.3: Effekte von NaCl und DMSO auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung der mechanischen Allodynie der linken Pfote mit dem Aesthesiometer. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der intrathekalen Applikation an. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$).

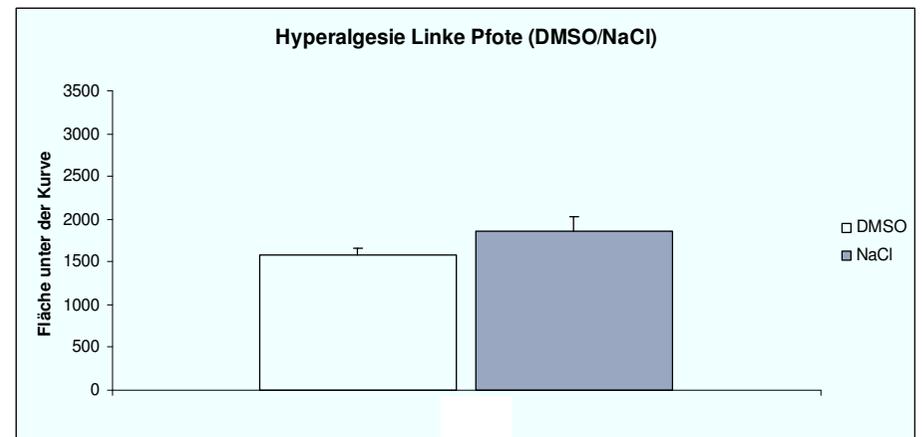
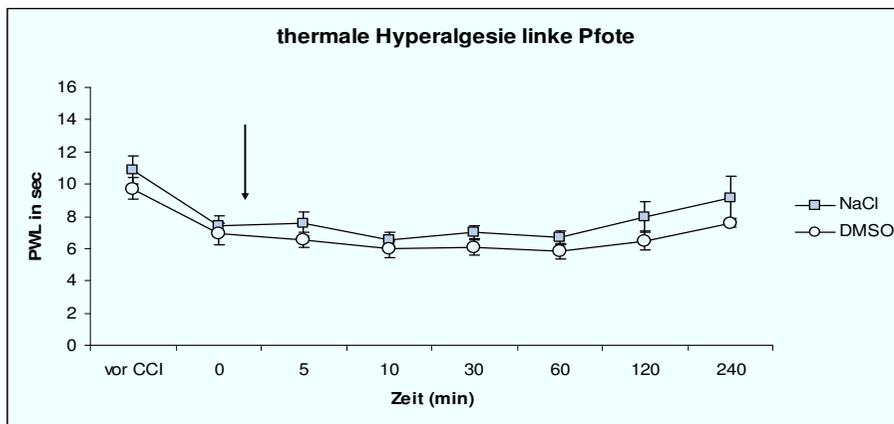


Bild 3.4: Effekte von NaCl und DMSO auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung der thermalen PWL der linken Pfote mit dem Plantar Test. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der intrathekalen Applikation an. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$).

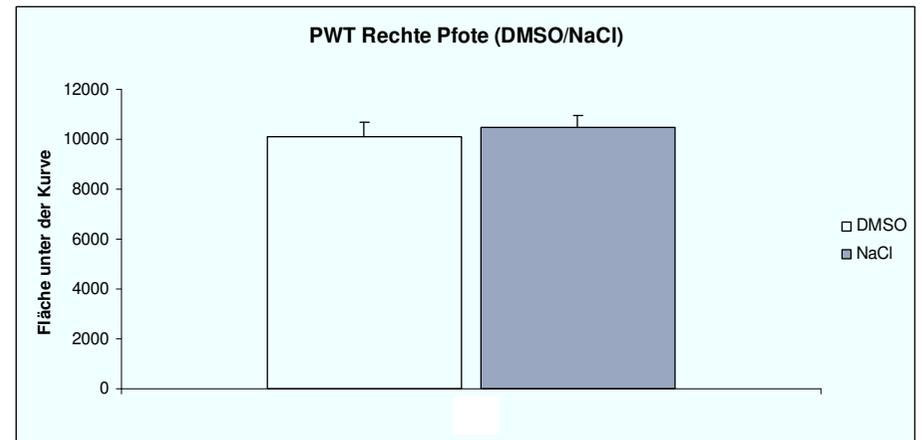
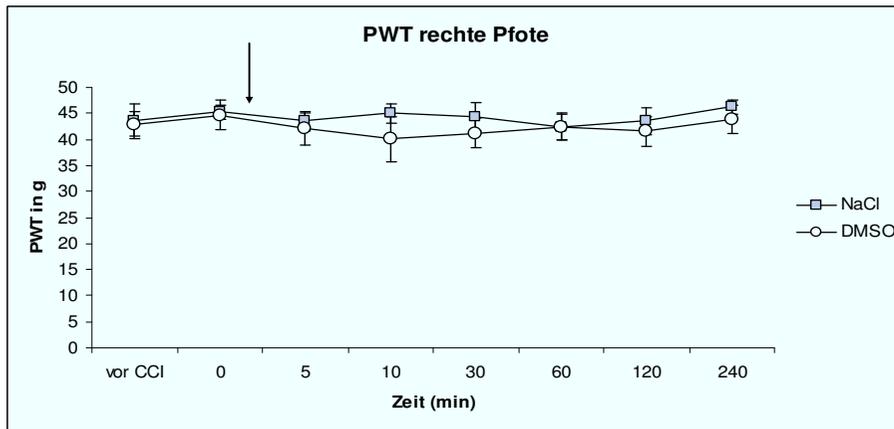


Bild 3.5: Effekte von NaCl und DMSO auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung des mechanischen PWT der rechten unverletzten Pfote mit dem Aesthesiometer. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der intrathekalen Applikation an. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$).

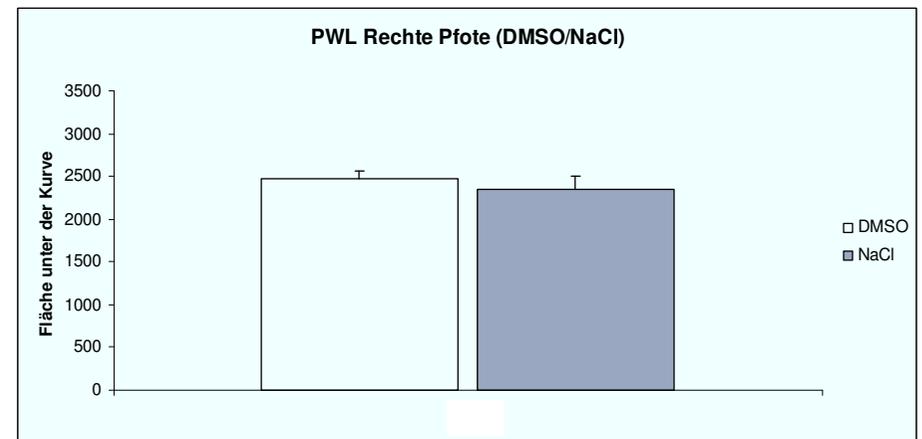
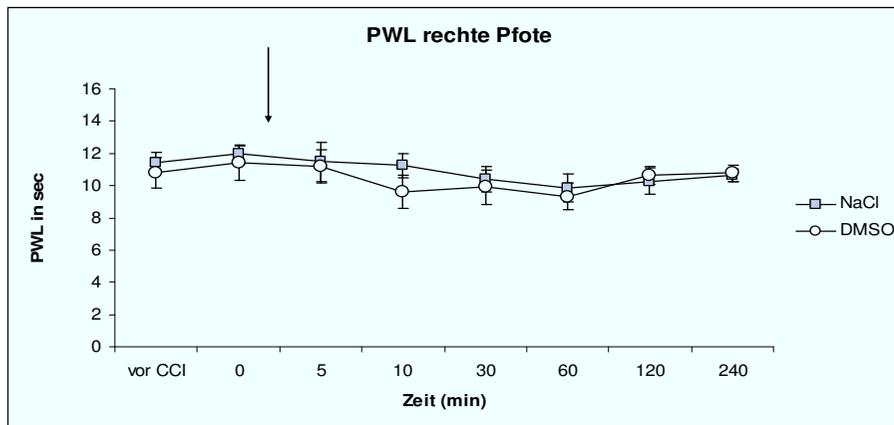


Bild 3.6: Effekte von NaCl und DMSO auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung der thermalen PWL der rechten unverletzten Pfote mit dem Plantar Test. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Der Pfeil zeigt den Zeitpunkt der intrathekalen Verabreichung an. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n=8$ Ratten pro Gruppe).

3.1.3.3 Wirkung von DMSO und NaCl auf den mechanischen PWT der rechten Pfote

Die Applikation von DMSO oder NaCl hat zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Effekt auf den mechanischen PWT der rechten unverletzten Pfote (**Bild 3.5**).

Die Flächen unter der Kurve von DMSO und NaCl, die die Gesamtwirkung der beiden Substanzen auf den mechanischen PWT der rechten Pfote darstellen, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (**Bild 3.5**).

3.1.3.4 Wirkung von DMSO und NaCl auf die thermale PWL der rechten Pfote

Die Kurven von DMSO und NaCl bei der Messung der thermalen PWL der rechten Pfote unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander (**Bild 3.6**).

Die Flächen unter der Kurve von DMSO und NaCl, die die Gesamtwirkung der beiden Substanzen auf die thermale PWL der rechten Pfote darstellen, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (**Bild 3.6**).

Die beiden Kontrollsubstanzen DMSO und NaCl haben keine signifikante Wirkung auf die Nozizeption der linken und rechten Pfote von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Die Wirkungen der beiden Kontrollsubstanzen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

Da die Testsubstanzen ALX-5407 und ALX-1393 in DMSO gelöst wurden, wird in den folgenden Abbildungen die DMSO-Gruppe als Kontrolle dargestellt.

3.1.4 Post OP Monitoring

Das Körpergewicht der Tiere wurde regelmäßig kontrolliert. Im Verlauf des Versuchs verloren die Versuchstiere durchschnittlich $31,8 \pm 1,8$ g bzw. $8,98 \pm 0,5$ Prozent ihres Körpergewichts. Andere Parameter wie z. B. der Pflegezustand und die Körperhaltung wurden notiert, aber nicht quantifiziert.

3.2 Die Wirkung von ALX-5407 auf die Nozizeption von Ratten im Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz

Die mithilfe des Aesthesiometers gemessenen Pfotenrückzugs-Schwellenwerte (PWT) und die mithilfe des Plantar Tests gemessenen Pfotenrückzugs-Latenzen (PWL) sind als Verlaufskurven dargestellt. Hierbei repräsentieren die einzelnen Punkte die Mittelwerte \pm SEM der Messwerte von jeweils 8 Tieren zu einem bestimmten Zeitpunkt. Auf der Y-Achse ist entweder der PWT in Gramm (beim Aesthesiometer) oder die PWL in Sekunden (beim Plantar Test) dargestellt, bei der die Tiere ihre Pfote wegziehen. Auf der X-Achse wird die Messung vor der CCI-Operation (vor CCI), die Messung 10-12 Tage nach der CCI-Operation (0) und die Messungen nach der Applikation von ALX-5407 (nach 5, 10, 30, 60, 120 und 240 Minuten) abgebildet. Der schwarze Pfeil markiert den Zeitpunkt der intrathekalen Applikation von ALX-5407. Ein signifikantes Ergebnis ($p \leq 0,05$) ist durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet.

Um die Gesamtwirkung der einzelnen Konzentrationen im gesamten zeitlichen Verlauf der Untersuchung besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Fläche unter der Kurve mithilfe der Trapezregel berechnet (vom Zeitpunkt 0 bis 240 min nach der Applikation) und in einem Blockdiagramm dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 8 Tieren; * $p \leq 0,05$.

3.2.1 Die Wirkung von ALX-5407 auf die linke, neuropathische Pfote

3.2.1.1 Wirkung auf die mechanische Allodynie der linken Pfote (Bild 3.7)

Fünf und zehn Minuten nach der Verabreichung von **10 μ g ALX-5407** ist ein statistisch signifikanter antinozizeptiver Effekt auf die mechanische Allodynie der verletzten Pfote im Vergleich zur Kontrolle aufgetreten ($31,5 \pm 3,2$ g vs. $21,4 \pm 2,6$ g nach 5 min und $31,2 \pm 2,9$ g vs. $19,2 \pm 3,2$ g nach 10 min; * $p \leq 0,05$; $n = 8$). Im weiteren zeitlichen Verlauf liegt die Kurve oberhalb der Kontrolle ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

30 Minuten nach der Verabreichung von **50 μ g ALX-5407** bis zum Ende der Untersuchung kann ein pronozizeptiver Trend auf die mechanische Allodynie der verletzten Pfote beobachtet werden, der nicht statistisch signifikant ist.

Fünf und zehn Minuten nach der Applikation von **100 µg ALX-5407** kann ein signifikanter antinozizeptiver Effekt auf die mechanische Allodynie der verletzten Pfote im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden ($30,0 \pm 4,0$ g vs. $21,4 \pm 2,6$ g nach 5 min; $28,4 \pm 3,7$ g vs. $19,2 \pm 3,2$ g nach 10 min; $*p \leq 0,05$; $n = 8$). Im weiteren Verlauf ist ein antinozizeptiver Trend zu beobachten, der nicht statistisch signifikant ist.

Die Flächen unter der Kurve nach Verabreichung von 10 µg, 50 µg und 100 µg ALX-5407 unterscheiden sich nicht signifikant von der der Kontrolle. Ein pronozizeptiver Trend der mittleren Konzentration auf die mechanische Allodynie der linken Pfote, sowie ein antinozizeptiver Trend auf die mechanische Allodynie bei der niedrigen und hohen Konzentration sind zu erkennen. Im Vergleich der verschiedenen Konzentrationen untereinander ist ein antinozizeptiver Effekt der niedrigen und der hohen Konzentration bzw. ein pronozizeptiver Effekt der mittleren Konzentration auf die mechanische Allodynie der linken Pfote zu erkennen (6647 ± 868 bei 10 µg und 6895 ± 754 bei 100 µg vs. 4152 ± 366 bei 50 µg; $*p \leq 0,05$; $n = 8$).

3.2.1.2 Wirkung auf die thermale Hyperalgesie der linken Pfote (Bild 3.8)

Nach Applikation von **10 µg ALX-5407** verläuft die Kurve während der gesamten Messung oberhalb der Kontrolle. Dieser antinozizeptive Trend auf die thermale Hyperalgesie der verletzten Pfote ist zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Die Applikation von **50 µg ALX-5407** hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die thermale Hyperalgesie der verletzten Pfote.

Die Applikation von **100 µg ALX-5407** hat nach 5, 10 und 30 Minuten einen statistisch signifikanten antinozizeptiven Effekt auf die thermale Hyperalgesie der verletzten Pfote im Vergleich zur Kontrolle ($9,2 \pm 1,0$ s vs. $6,5 \pm 0,5$ s nach 5 min; $9,2 \pm 0,6$ s vs. $5,6 \pm 0,5$ s nach 10 min; $8,0 \pm 0,6$ s vs. $6,1 \pm 0,5$ s nach 30 min; $*p \leq 0,05$; $n = 8$). Bis zum Ende der Messungen ist ein antinozizeptiver Trend ohne statistische Signifikanz zu beobachten.

Im Vergleich zur Kontrolle unterscheiden sich die Flächen unter der Kurve nicht signifikant voneinander. Ein antinozizeptiver Trend von ALX-5407 auf die thermale Hyperalgesie der verletzten linken Pfote ist sowohl in der niedrigen, als auch in der hohen Konzentration zu beobachten.

3.2.2 Die Wirkung von ALX-5407 auf die rechte, unverletzte Pfote

3.2.2.1 Wirkung auf den mechanischen PWT der rechten Pfote (Bild 3.9)

Die Verlaufskurve des mechanischen PWT der unverletzten Pfote nach Applikation von **10 µg ALX-5407** verläuft während der gesamten Versuchsdauer oberhalb der Kontrolle. Dieser antinozizeptive Trend ist zu keinem Zeitpunkt signifikant im Vergleich zur Kontrolle.

10 Minuten nach der Applikation von **50 µg ALX-5407** verläuft die Kurve bis zum Ende der Messungen unterhalb der Kontrolle. Dieser tendenziell pronozizeptive Effekt auf den mechanischen PWT der unverletzten Pfote ist zunächst nicht statistisch signifikant. 120 Minuten nach der Applikation ist dann ein statistisch signifikanter pronozizeptiver Effekt im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten ($35,0 \pm 3,2$ g vs. $41,5 \pm 2,8$ g nach 120 min; $*p \leq 0,05$; $n = 8$).

Die Verlaufskurve nach der Applikation von **100 µg ALX-5407** verläuft meist knapp oberhalb der Kontrolle. Ein statistisch signifikanter Effekt auf den mechanischen PWT der unverletzten Pfote ist nicht zu beobachten.

Die Fläche unter der Kurve ist bei einer Dosierung von **50 µg ALX-5407** signifikant kleiner als die der Kontrolle (8915 ± 609 vs. 10126 ± 546 ; $*p \leq 0,05$; $n = 8$). In einer Dosierung von 10 µg und 100 µg ALX-5407 sind die Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant, es ist jedoch ein antinozizeptiver Trend bei beiden Dosierungen im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen. Im Vergleich zur mittleren (50 µg) Konzentration sind diese Unterschiede signifikant (11003 ± 316 bei 10 µg und 10888 ± 278 bei 100 µg vs. 8915 ± 609 bei 50 µg; $*p \leq 0,05$; $n = 8$).

3.2.2.2 Wirkung auf die thermale PWL der rechten Pfote (Bild 3.10)

Die Verabreichung von ALX-5407 hat in allen drei Konzentrationen keinen statistisch signifikanten Effekt auf die thermale PWL der unverletzten Pfote. Ein pronozizeptiver Trend ohne statistische Signifikanz ist 30 min nach der Applikation von 50 µg ALX-5407 zu sehen.

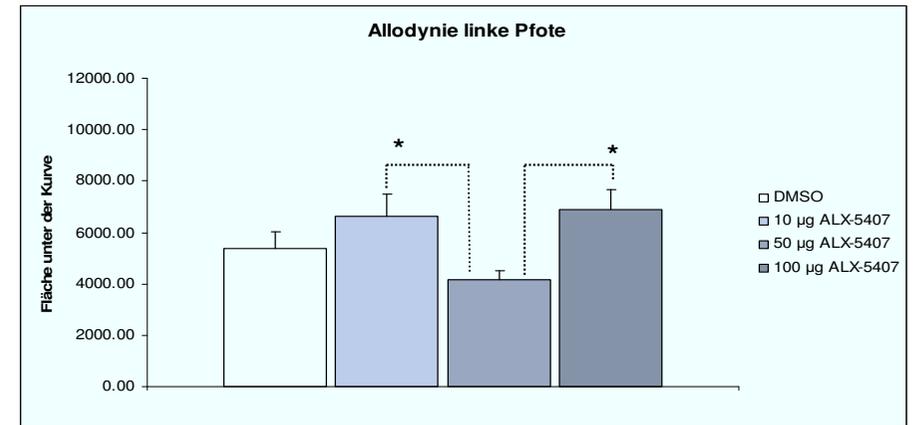
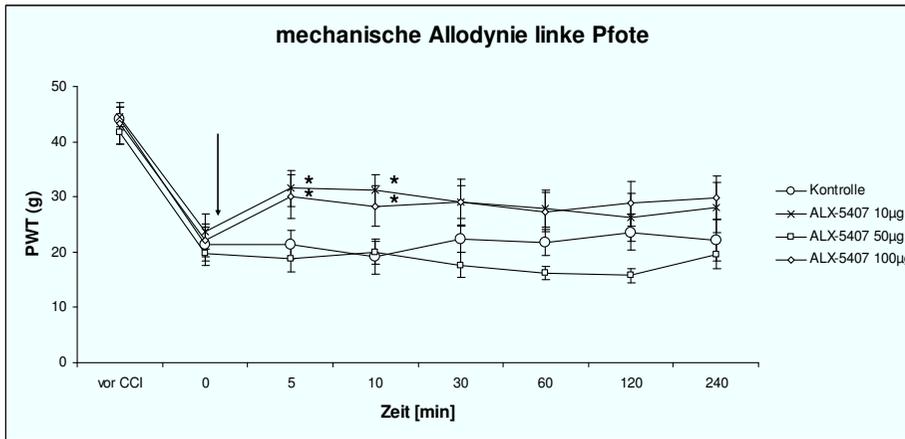


Bild 3.7: Effekte von ALX-5407 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung der mechanischen Allodynie der linken Pfote mit dem Aesthesiometer. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$).

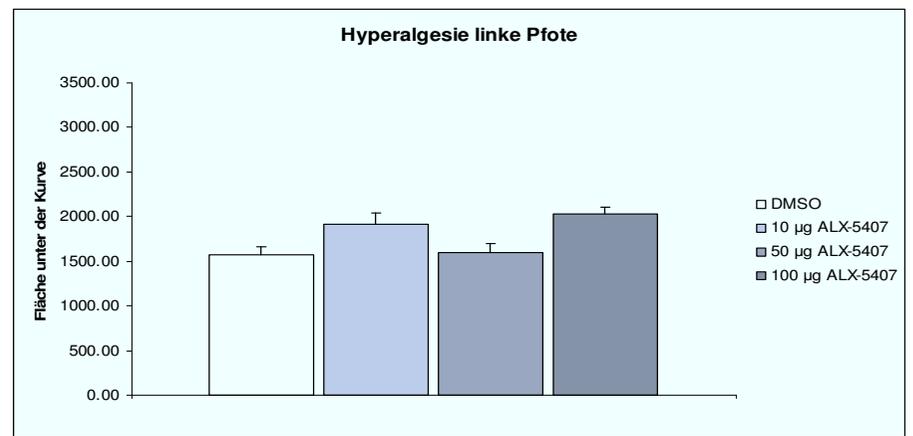
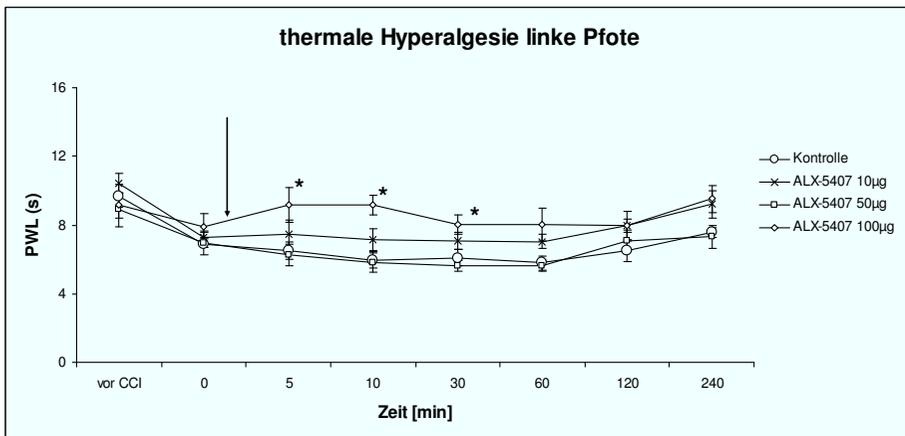


Bild 3.8: Effekte von ALX-5407 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung der thermalen Hyperalgesie der linken Pfote mit dem Plantar Test. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$).

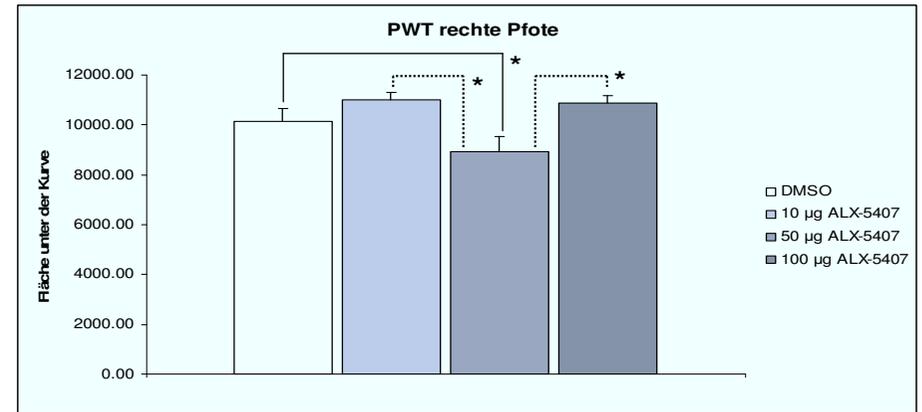
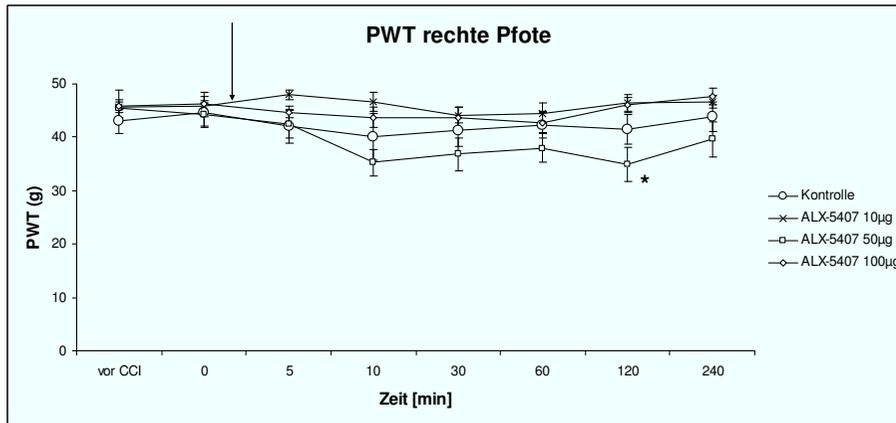


Bild 3.9: Effekte von ALX-5407 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung des mechanischen PWT der rechten unverletzten Pfote mit dem Aesthesiometer. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$).

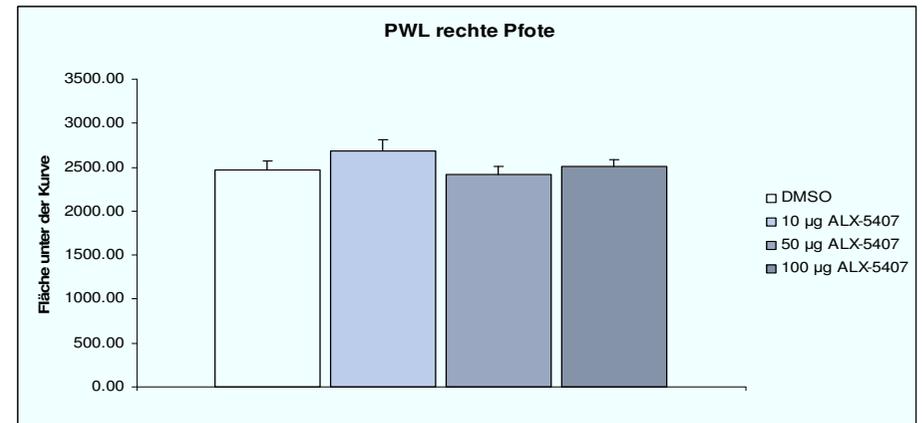
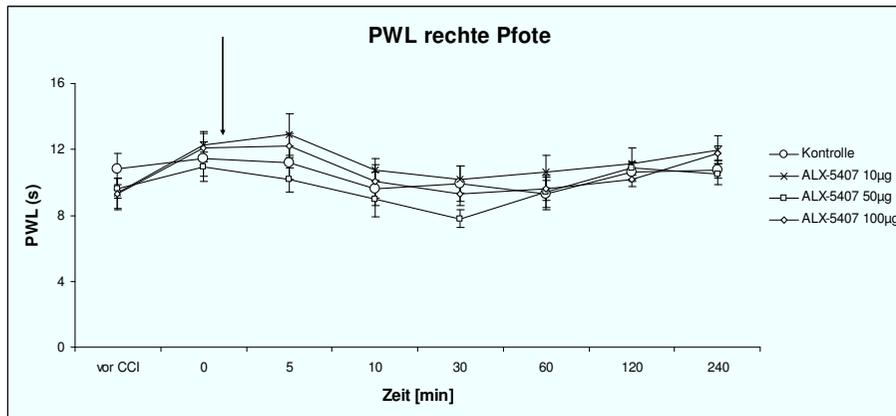


Bild 3.10: Effekte von ALX-5407 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung der thermalen PWL der rechten unverletzten Pfote mit dem Plantar Test. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$).

3.3 Die Wirkung von ALX-1393 auf die Nozizeption von Ratten im Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz

Die mithilfe des Aesthesiometers gemessenen Pfotenrückzugs-Schwellenwerte (PWT) und die mithilfe des Plantar Tests gemessenen Pfotenrückzugs-Latenzen (PWL) sind als Verlaufskurven dargestellt. Hierbei repräsentieren die einzelnen Punkte die Mittelwerte \pm SEM der Messwerte von jeweils 8 Tieren (bzw. von 6 Tieren in der Versuchsgruppe, die 100 μ g ALX-1393 erhielt). Auf der Y-Achse ist entweder der PWT in Gramm (beim Aesthesiometer) oder die PWL in Sekunden (beim Plantar Test), bei der die Tiere ihre Pfote wegziehen, dargestellt. Auf der X-Achse wird die Messung vor der CCI-Operation (vor CCI), die Messung 10-12 Tage nach der CCI-Operation (0) und die Messungen nach der Applikation von ALX-1393 (nach 5, 10, 30, 60, 120 und 240 Minuten) abgebildet. Der schwarze Pfeil markiert den Zeitpunkt der intrathekalen Applikation von ALX-1393. Ein signifikantes Ergebnis ($p \leq 0,05$) ist durch ein Sternchen (*) gekennzeichnet.

Um die Gesamtwirkung der einzelnen Konzentrationen im gesamten zeitlichen Verlauf der Untersuchung besser miteinander vergleichen zu können, wurde die Fläche unter der Kurve mithilfe der Trapezregel berechnet (vom Zeitpunkt 0 bis 240 Minuten nach der Applikation) und in einem Blockdiagramm dargestellt. Die Balken repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von jeweils 8 bzw. 6 Tieren. * $p \leq 0,05$.

3.3.1 Die Wirkung von ALX-1393 auf die linke, neuropathische Pfote

3.3.1.1 Wirkung auf die mechanische Allodynie der linken Pfote (Bild 3.11)

Die Kurve nach Verabreichung von **10 μ g ALX-1393** verläuft 5, 10 und 60 Minuten nach Applikation oberhalb der Kontrolle, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Nach der Applikation von **50 μ g ALX-1393** gibt es keinen statistisch signifikanten Effekt auf die mechanische Allodynie der verletzten Pfote.

Die Applikation von **100 μ g ALX-1393** hat zu allen Zeitpunkten der Untersuchung einen antinozizeptiven Effekt auf die mechanische Allodynie der verletzten Pfote, der nach 5, 10 und 240 Minuten statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle ist

(36,0 ± 3,3 g vs. 21,4 ± 2,6 g nach 5 min; 28,1 ± 3,4 g vs. 19,2 ± 3,2 g nach 10 min; 36,0 ± 5,4 g vs. 22,1 ± 3,8 g nach 240 min; *p ≤ 0,05; n = 6).

Der antinozizeptive Effekt von **100 µg ALX-1393** auf die mechanische Allodynie der linken Pfote ist im gesamten zeitlichen Verlauf statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle (7604 ± 711 vs. 5388 ± 626; *p ≤ 0,05; n = 6). Auch im Vergleich mit der niedrigen und der mittleren Konzentration ist der antinozizeptive Effekt von 100 µg ALX-1393 signifikant (7604 ± 711 bei 100 µg vs. 5655 ± 571 bei 10 µg und 5046 ± 383 bei 50 µg; *p ≤ 0,05; n = 6).

3.3.1.2 Wirkung auf die thermale Hyperalgesie der linken Pfote (Bild 3.12)

Die Kurve nach Verabreichung von **10 µg ALX-1393** verläuft nach 10 Minuten bis zum Ende der Untersuchung oberhalb der Kontrolle. Dieser antinozizeptive Effekt auf die thermale Hyperalgesie der verletzten Pfote ist zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

Die Kurve nach Applikation von **50 µg ALX-1393** verläuft nach 5 Minuten bis zum Ende der Untersuchung oberhalb der Kontrolle. Dieser antinozizeptive Effekt auf die thermale Hyperalgesie der verletzten Pfote ist zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant.

Direkt nach der Applikation von **100 µg ALX-1393** bis zum Ende der Untersuchung, verläuft die Kurve oberhalb der Kontrolle. Dieser antinozizeptive Effekt auf die thermale Hyperalgesie der verletzten Pfote ist zu jedem Zeitpunkt der Untersuchung statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle (10,5 ± 2,4 s vs. 6,5 ± 0,5 s nach 5 min; 9,1 ± 1,1 s vs. 6,0 ± 0,5 s nach 10 min; 9,1 ± 0,9 s vs. 6,1 ± 0,5 s nach 30 min; 10,6 ± 3,4 s vs. 5,8 ± 0,4 s nach 60 min; 12,0 ± 3,1 s vs. 6,5 ± 0,6 s nach 120 min; 12,3 ± 0,9 s vs. 7,6 ± 0,3 s nach 240 min; *p ≤ 0,05; n = 6). Außerdem liegen die Messwerte 5, 60, 120 und 240 Minuten nach der Applikation oberhalb des physiologischen Messwertes vor der CCI (10,5 ± 2,2 s nach 5 min; 10,64 ± 3,4 nach 60min; 12,0 ± 3,1 s nach 120 min; 12,2 ± 0,1 s nach 240 min vs. 9,95 ± 0,7 s vor der CCI-Operation; n = 6).

Im gesamten zeitlichen Verlauf hat die Applikation von **100 µg ALX-1393** im Vergleich zur Kontrolle einen signifikanten antinozizeptiven Effekt auf die thermale Hyperalgesie der linken Pfote (2747 ± 526 vs. 1577 ± 84; *p ≤ 0,05; n = 6). Auch im Ver-

gleich zu der niedrigen und mittleren Konzentration ist dieser antinozizeptive Effekt signifikant (2747 ± 526 vs. 1882 ± 124 bei $10 \mu\text{g}$ und 2080 ± 143 bei $50 \mu\text{g}$; $*p \leq 0,05$; $n = 6$).

3.3.2 Die Wirkung von ALX-1393 auf die rechte, unverletzte Pfote

3.3.2.1 Wirkung auf den mechanischen PWT der rechten Pfote (Bild 3.13)

Die Applikation von ALX-1393 hat in allen 3 Konzentrationen keinen statistisch signifikanten Effekt auf den mechanischen PWT der unverletzten Pfote. Die Kurve der niedrigen Konzentration verläuft knapp oberhalb, die der hohen Konzentration verläuft im gesamten Verlauf oberhalb der Kontrolle ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Die Flächen unter der Kurve nach Applikation von ALX-1393 sind größer als die der Kontrolle, unterscheiden sich jedoch in keiner Konzentration signifikant von der der Kontrolle.

3.3.2.2 Wirkung auf die thermale PWL der rechten Pfote (Bild 3.14)

Die Applikation von **$10 \mu\text{g}$ ALX-1393** hat keinen signifikanten Effekt auf die thermale PWL der unverletzten Pfote.

Nach Applikation von **$50 \mu\text{g}$ ALX-1393** liegt die Verlaufskurve ab 10 Minuten bis 120 Minuten nach der Applikation oberhalb der Kontrolle. Dieser antinozizeptive Trend auf die thermale PWL der unverletzten Pfote ist nicht statistisch signifikant.

Nach der Verabreichung von **$100 \mu\text{g}$ ALX-1393** liegt die Kurve nach 10 Minuten bis zum Ende der Untersuchung oberhalb der Kontrolle. Dieser antinozizeptiver Trend auf die thermale PWL der rechten Pfote erreicht 60 Minuten nach der Applikation statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle ($12,8 \pm 2,6$ s vs. $9,3 \pm 0,8$ s; $*p \leq 0,05$; $n = 6$).

Die Flächen unter der Kurve unterscheiden sich in keiner Konzentration signifikant von der Kontrolle. Es ist jedoch mit steigender Konzentration von ALX-1393 ein tendenziell antinozizeptiver Effekt auf die thermale PWL der rechten Pfote zu beobachten, der mit steigender Konzentration zunimmt.

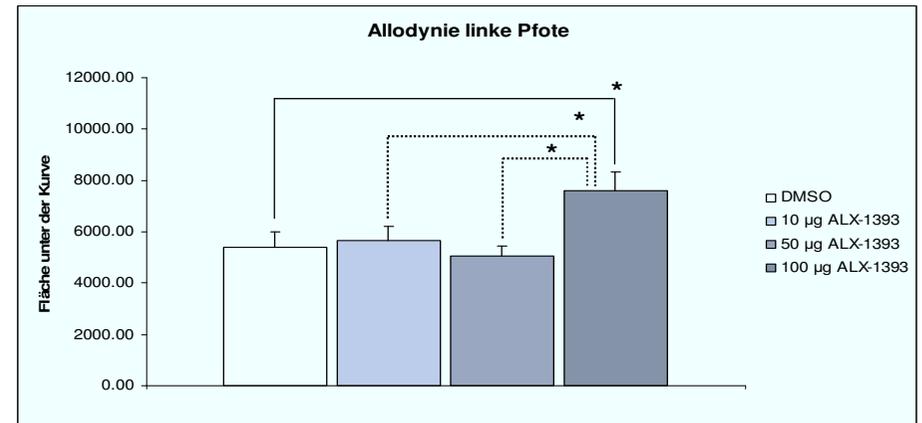
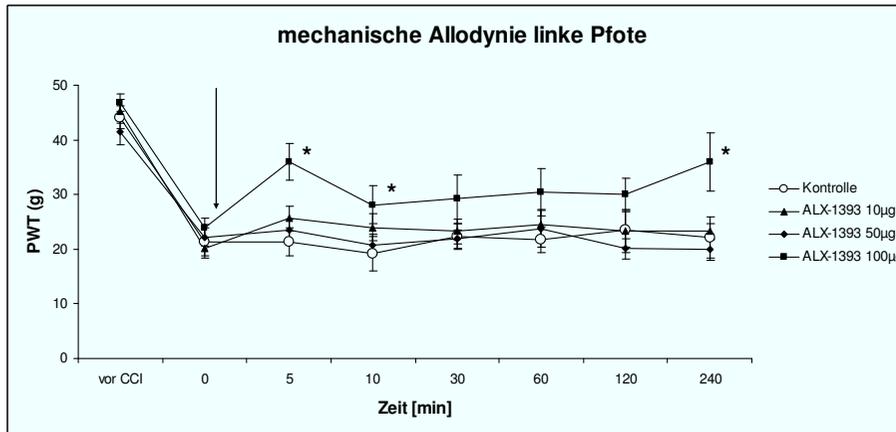


Bild 3.11: Effekte von ALX-1393 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI Modell für neuropathischen Schmerz. Messung der mechanischen Allodynie der linken Pfote mit dem Aesthesiometer. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$ bzw. 6).

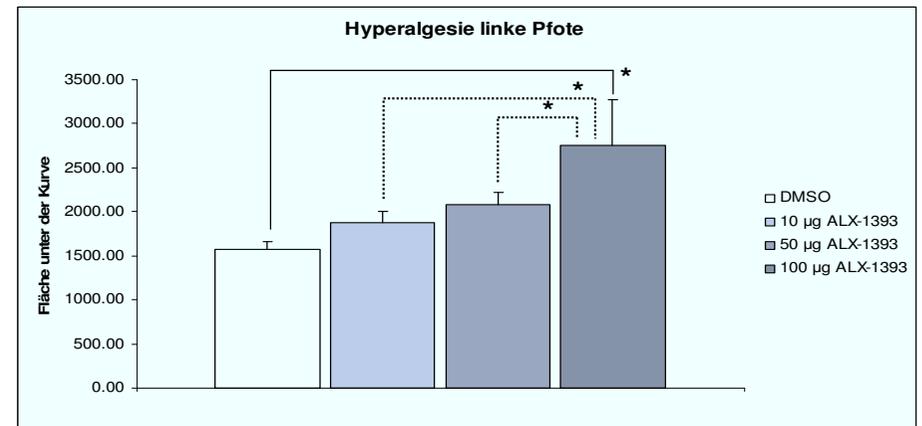
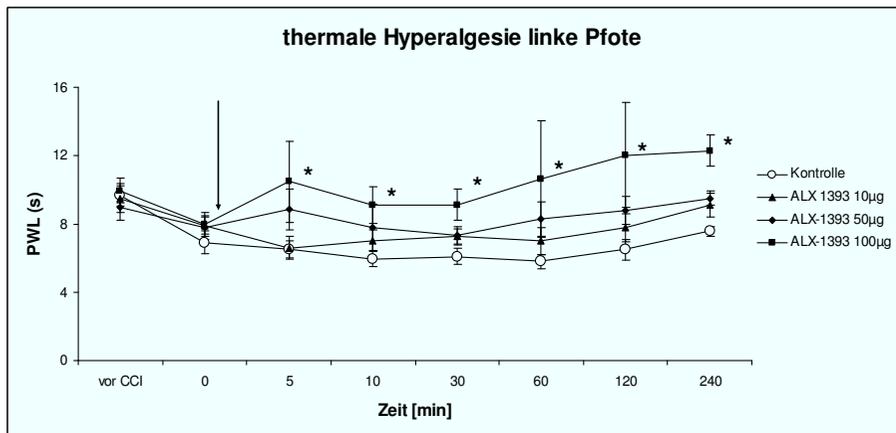


Bild 3.12: Effekte von ALX-1393 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung der thermalen Hyperalgesie der linken Pfote mit dem Plantar Test. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$ bzw. 6).

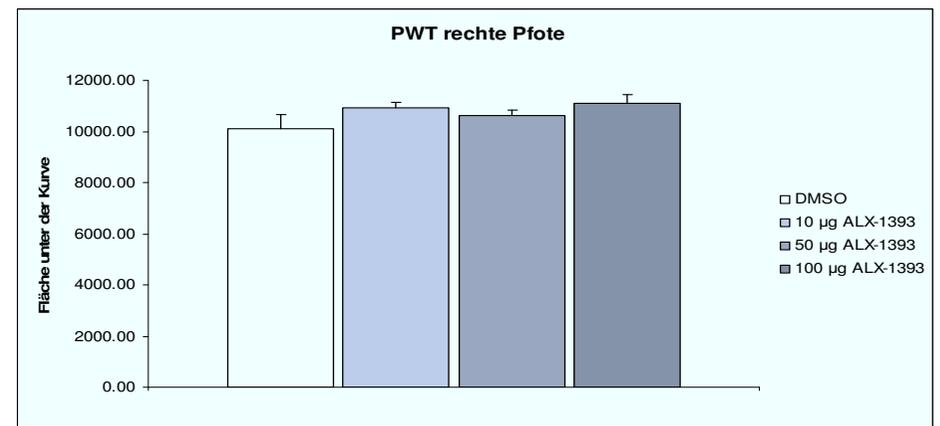
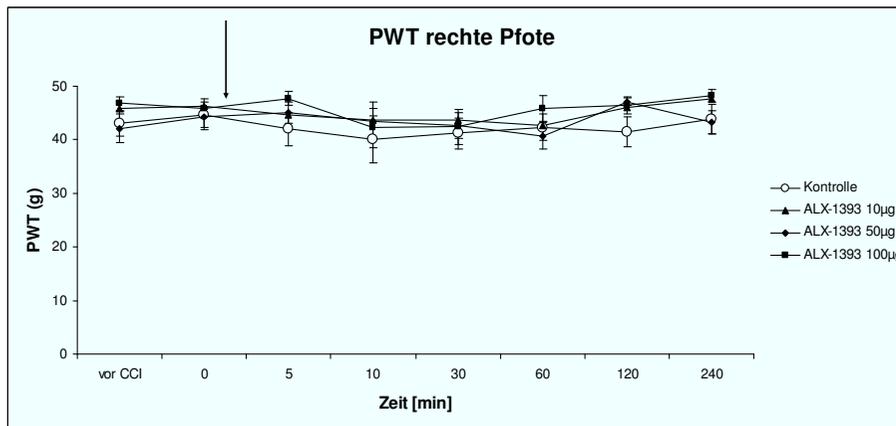


Bild 3.13: Effekte von ALX-1393 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung des mechanischen PWT der rechten unverletzten Pfote mit dem Aesthesiometer. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$ bzw. 6).

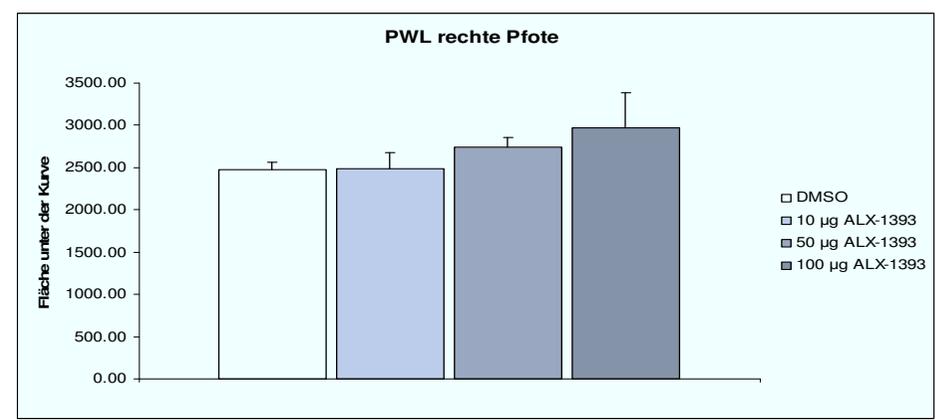
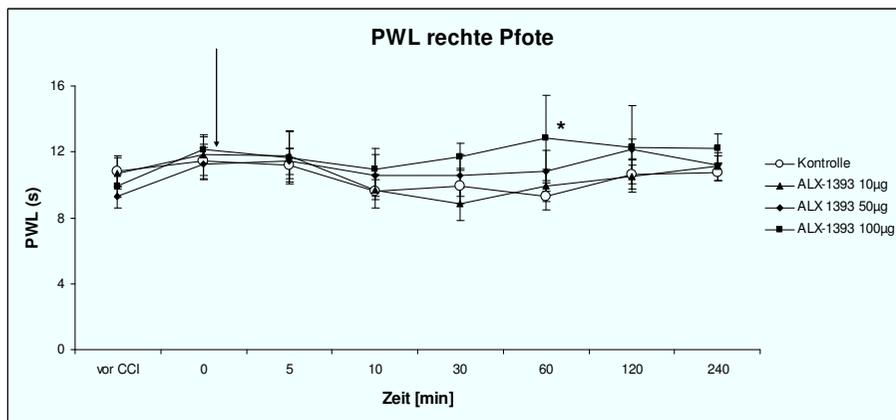


Bild 3.14: Effekte von ALX-1393 auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Messung der thermalen PWL der rechten unverletzten Pfote mit dem Plantar Test. Links: Darstellung des zeitlichen Verlaufs. Rechts: Darstellung der Fläche unter der Kurve. (Mittelwert \pm SEM; * $p \leq 0,05$; $n = 8$ bzw. 6).

3.3.3 Neuromotorische Auswirkungen nach der Applikation von ALX-1393

Nach der intrathekalen Applikation von **100 µg ALX-1393** waren bei vier von acht Tieren neuromotorische Auffälligkeiten zu beobachten. Diese Tiere wurden umgehend neurologisch untersucht (siehe Abschnitt 2.6; Seite 31).

Bei zwei Tieren kam es zu reversiblen Lähmungserscheinungen. Diese Tiere konnten, nachdem die Lähmung vorübergegangen war, weiter in die Untersuchung aufgenommen werden. Bei zwei weiteren Tieren waren die Lähmungen permanent, sodass keine weiteren Messungen durchgeführt werden konnten. Die Messdaten der Versuchsgruppe, die mit 100 µg ALX-1393 behandelt wurden, stammen also insgesamt von sechs Tieren (n = 6), von denen vier Tiere keine neuromotorischen Wirkungen und zwei Tiere reversible neuromotorische Wirkungen zeigten.

Alle Tiere waren während des gesamten Beobachtungszeitraums bei vollem Bewusstsein.

- Ein Tier zeigte 5 Minuten nach der Applikation eine Paralyse beider Vordergliedmaßen. Die Reflexe an den Hintergliedmaßen waren vorhanden und vollständig. Nach 10 Minuten konnte die Ratte wieder eine normale Haltung einnehmen. Die neurologische Untersuchung ergab jetzt keinen besonderen Befund. Die restlichen Messungen konnten wie geplant durchgeführt werden.
- Ein weiteres Tier zeigte 5 Minuten nach der Applikation eine vollständige Paralyse beider Hintergliedmaßen. Die Schmerzwahrnehmung war vorhanden. Nach 10 Minuten waren sowohl die Hinter- als auch die Vordergliedmaßen vollständig schlaff gelähmt. Die Ratte konnte sich aus der Rückenlage nicht selbstständig wieder in die Bauchlage bringen. Das Tier reagierte nicht mehr auf schmerzhafte Reize. Die Atmung erschien erschwert. Nach 30 Minuten konnte sich das Tier wieder normal aufrichten und es reagierte wieder auf schmerzhafte Reize. Die Reflexe an der rechten Hintergliedmaße waren schwach vorhanden. Die linke Hintergliedmaße war immer noch schlaff gelähmt. Nach 60 Minuten konnte die Ratte wieder eine normale Haltung einnehmen und die neurologische Untersuchung ergab jetzt keinen besonderen Befund. Die nachfolgenden Messungen konnten wie geplant durchgeführt werden.

- Ein Tier kratzte sich 5 Minuten nach der Applikation heftig hinter den Ohren. Nach 10 Minuten prägte sich eine vollständige Paralyse aller Gliedmaßen aus. Das Tier konnte sich nicht mehr aufrichten und es zeigte eine erschwerte Atmung. Nach 30 Minuten konnte sich die Ratte wieder aus der Rückenlage in die Bauchlage bringen. Die Vorderbeine waren immer noch gelähmt. Auch nach 240 Minuten blieben die Vorderbeine gelähmt. Es wurden keine Messungen durchgeführt.
- Ein Tier zeigte 5 Minuten nach der Applikation eine beginnende Lähmung durch Gleichgewichtsstörungen beim Wegziehen der Füße. Nach 10 Minuten prägte sich eine Paralyse beider Hintergliedmaßen aus. Die Atmung war erschwert. Nach 30 Minuten waren die Hintergliedmaßen immer noch vollständig gelähmt und schmerzfrei. Nach 60 Minuten waren die Reflexe am rechten Hinterbein vollständig und vorhanden. Die linke Hintergliedmaße blieb gelähmt. Schmerzhaft Reize wurden jedoch wieder wahrgenommen. Nach 120 Minuten war der Flexorreflex hinten links und rechts vorhanden, an der linken Hintergliedmaße jedoch verzögert. Bis zum Ende der Untersuchung blieb eine mittelgradige Parese der linken Hintergliedmaße bestehen. Das Tier reagierte sehr empfindlich auf Berührungen. Es wurden keine Messungen durchgeführt.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

3.4.1 Zusammenfassung der Wirkungen von ALX-5407

Der GlyT1-Inhibitor ALX-5407 hat dosisabhängig unterschiedliche Wirkungen auf die Nozizeption von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz: In der niedrigen (10 µg) und der hohen (100 µg) Dosierung treten antinozizeptive Effekte, in der mittleren Dosierung (50 µg) treten pronozizeptive Effekte auf. Die pronozizeptive Wirkung ist vor allem an der rechten, unverletzten Pfote zu erkennen. In keiner Dosierung treten erkennbare Nebenwirkungen auf. (**Tabelle 3.2**).

3.4.2 Zusammenfassung der Wirkungen von ALX-1393

Der GlyT2-Inhibitor ALX-1393 hat dosisabhängig tendenziell antinozizeptive Wirkungen auf die Nozizeption von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Signifikante stark antinozizeptive Effekte treten nur in der hohen (100 µg) Dosierung auf. In keiner Dosierung treten pronozizeptive Wirkungen auf. Nach der Applikation der hohen Dosierung können zusätzliche neuromotorische Wirkungen beobachtet werden. Diese äußern sich als Parese, Paralyse, Atemdepression und Anästhesie (**Tabelle 3.2**).

Tabelle 3.2: Effekte der GlyT-Inhibitoren

		ALX-5407			ALX-1393		
		10 µg	50 µg	100 µg	10 µg	50 µg	100 µg
Linke Pfote	Mechanische Allodynie	Anti * [§]	Pro [§]	Anti * [§]	—	—	Anti * ^{#§}
	Thermale Hyperalgesie	—	—	Anti *	—	—	Anti * ^{#§}
Rechte Pfote	Mechanischer PWT	Anti [§]	Pro * ^{#§}	Anti [§]	—	—	—
	Thermale PWL	—	—	—	—	—	Anti *
Zusätzliche neuromotorische Wirkungen		—	—	—	—	—	Parese Paralyse Atemdepression Anästhesie

— : keine signifikante Wirkung; Anti: antinozizeptive Wirkung; Pro: pronozizeptive Wirkung; *: signifikantes Ergebnis aus den Verlaufskurven im Vergleich zur Kontrolle; #: signifikantes Ergebnis der Fläche unter der Kurve im Vergleich zur Kontrolle; §: signifikantes Ergebnis der Fläche unter der Kurve im Vergleich der Gruppen untereinander; (n = 8 bzw. 6; *p ≤ 0,05).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Schmerz beinhaltet — laut Definition der IASP — eine bewusste Wahrnehmung bzw. Empfindung (**Tabelle 1.1**). Um eine Aussage darüber machen zu können, ob Glycin-Transporter-Inhibitoren antinozizeptive (Schmerz-lindernde) oder pronozizeptive (Schmerz-fördernde) Eigenschaften haben, sind daher Verhaltensbeobachtungen von unbetäubten, wachen Tieren unumgänglich. Auch die vielfältigen Pathomechanismen, die bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von chronischen neuropathischen Schmerzen eine Rolle spielen (siehe **Tabelle 1.3**), lassen sich nicht in ihrer Komplexität *in vitro* nachstellen. Der Tierversuch ist somit bei der Erforschung chronischer Schmerzen nicht vollständig zu ersetzen. Um weitere Informationen über die Mechanismen der Schmerzverarbeitung und im Speziellen den Einfluss der Glycin-Transporter-Inhibitoren zu erlangen, könnte der Tierversuch sinnvoll durch elektrophysiologische Messungen mithilfe der Patch Clamp Technik und immunohistochemische Methoden ergänzt werden.

4.1.1 Die Glycin-Transporter-Inhibitoren ALX-5407 und ALX-1393

4.1.1.1 Der Glycin-Transporter-1-Inhibitor ALX-5407

ALX-5407 war der erste potente und selektive GlyT1-Inhibitor und ist daher von sehr wichtiger Bedeutung bei der Erforschung der Funktion und Pharmakologie des GlyT1 (Atkinson et al. 2001; Aubrey and Vandenberg 2001; Herdon et al. 2001), sowie seiner Bedeutung bei der Regulierung der NMDAR-vermittelten Neurotransmission (Berger et al. 1998; Bergeron et al. 1998; Chen et al. 2003). ALX-5407 hat eine EC_{50} von 2,8 nM und bindet irreversibel an den GlyT1. Zu Beginn unserer Studie war ALX-5407 noch nicht intrathekal verabreicht worden, um dessen Wirkung auf die Nozizeption zu untersuchen. Die von uns gewählten Dosierungen (10, 50 und 100 μ g ALX-5407 intrathekal pro Tier) orientieren sich an der Studie von Lechner et al., die den GlyT2-Inhibitor ALX-1393 schon in einer Dosierung von 40 μ g intrathekal verabreicht haben (Lechner 2000).

4.1.1.2 Der Glycin-Transporter-2-Inhibitor ALX-1393

ALX-1393 ist ein selektiver GlyT2-Inhibitor (Xu et al. 2005; Luccini and Raiteri 2007), der Ratten schon in einer Dosierung von 40 µg intrathekal verabreicht wurde und in einem Modell für entzündlichen Schmerz eine analgetische Wirkung hatte (Lechner 2000). Die von uns gewählten Dosierungen (10, 50 und 100 µg ALX-1393 intrathekal) orientieren sich an dieser Studie. Andere hochselektive Inhibitoren des GlyT2 (Caulfield et al. 2001; Ho et al. 2004; Wolin et al. 2004a; Wolin et al. 2004b) sind noch nicht *in vivo* getestet worden.

4.1.1.3 Intrathekale Dosierungen

Zu Beginn unserer Studie waren die Glycin-Transporter-Inhibitoren zwar schon von verschiedenen Arbeitsgruppen speziell im Bereich der Schizophrenie-Forschung (Chen et al. 2003; Kinney et al. 2003; Perry et al. 2008) und der Schmerzforschung (Lechner 2000) in unterschiedlichen Dosierungen *in vivo* verabreicht worden, ihr Einfluss nach intrathekaler Applikation auf neuropathische Schmerzen wurde jedoch erstmalig in unserer Studie und in den gleichzeitig veröffentlichten Studien von Morita et al. (Morita et al. 2008) und Tanabe et al. (Tanabe et al. 2008) untersucht.

Hierbei wurden sehr unterschiedliche Dosierungen pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht, wie aus **Tabelle 4.1** ersichtlich wird:

Tabelle 4.1: Intrathekale(i.t.) Dosierungen von ALX-5407 und ALX-1393 in µg/kg KG

Glycin-Transporter-Inhibitor	~µg/kg	Spezies	Literaturangabe
ALX-5407	29	Ratte	(Hermanns et al. 2008a)
	143		
	286		
	1.2	Maus	(Tanabe et al. 2008)
	4		
ALX-1393	29	Ratte	(Hermanns et al. 2008a)
	143		
	286		
	0.04	Maus	(Morita et al. 2008)
	0.12		
	0.4		
	114	Ratte	(Lechner 2000)

~ = ungefähr; i.t. = intrathekal.

Die von uns verwendeten Dosierungen orientieren sich an der Studie von Lechner et al. (Lechner 2000), die den GlyT2-Inhibitor ALX-1393 im Mikrogramm-Bereich intrathekal verabreicht haben und damit sehr viel höher liegen, als die jeweiligen

Dosierungen von Morita und Tanabe (Morita et al. 2008; Tanabe et al. 2008) (siehe **Tabelle 4.1**). So können Morita et al. nach der intrathekalen Applikation von nur $\sim 0.4 \mu\text{g/kg}$ KG ALX-1393 bei Mäusen antinozizeptive Effekte beobachten (Morita et al. 2008), während in der vorliegenden Studie signifikante antinozizeptive Wirkungen von ALX-1393 bei Ratten erst bei einer Dosierung von $\sim 286 \mu\text{g/kg}$ KG registriert wurden.

Da kleinere Tiere im Vergleich zu größeren Tieren, bedingt durch ihren schnelleren Stoffwechsel und ihre auf das Körpergewicht bezogene größere Körperoberfläche, normalerweise immer höhere Dosierungen eines Wirkstoffs bzw. einer Substanz pro Kilogramm Körpergewicht benötigen (Löscher et al. 2000), sind die oben beschriebenen Beobachtungen unerwartet. Anscheinend liegen starke Spezies-spezifische Unterschiede in der Verstoffwechslung der GlyT-Inhibitoren und der Empfindlichkeit gegenüber diesen Substanzen bei Mäusen und Ratten vor.

Möglicherweise hat auch die Art des Lösungsmittels einen Einfluss auf die Dosierung und Effektivität der Glycin-Transporter-Inhibitoren. Während die GlyT-Inhibitoren in unserer Studie nach Herstellerangaben in 100%igem DMSO gelöst wurden, benutzten Morita et al. (Morita et al. 2008) und Tanabe et al. (Tanabe et al. 2008) verschiedene Konzentrationen von 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin. Die verschiedenen Lösungsmittel könnten zu veränderten pharmakologischen Eigenschaften der GlyT-Inhibitoren führen, und so die unterschiedliche Effektivität der stark unterschiedlichen Dosierungen in den genannten Studien erklären (siehe auch Kapitel 4.1.2).

Möglicherweise haben die GlyT-Inhibitoren auch tatsächlich in einem sehr großen Dosisbereich messbare Wirkungen auf die Nozizeption. So ist es zumindest denkbar, dass z. B. das Fehlen einer antinozizeptiven Wirkung bei der von uns verwendeten niedrigen Dosierung ALX-1393 durch Wechselwirkungen von Glycin am exzitatorischen NMDAR bedingt sind. Über diesen Mechanismus könnte der antinozizeptive Effekt, den eine noch geringere Dosierung möglicherweise ausübt, überlagert werden. Bei einer höheren Dosierung wäre dann wieder eine dominierende antinozizeptive Wirkung denkbar; diese konnte auch so von uns gemessen werden.

4.1.1.4 Applikationswege

In der vorliegenden Arbeit wurden die GlyT-Inhibitoren durch einen intrathekalen Katheter in den Subarachnoidalraum appliziert. Dieser Applikationsweg hat den Vorteil,

dass die GlyT-Inhibitoren sicher, direkt und ohne zeitliche Verzögerung in unmittelbare räumliche Nähe zum Ort der primären Schmerzverarbeitung (Dorsalhorn des Rückenmarks) verbracht werden können. Die Messwerte der Schmerztestungen, die sich direkt an die intrathekale Applikation anschließen, spiegeln somit den Einfluss der GlyT-Inhibitoren wieder. Pharmakokinetische Einflussfaktoren (Aufnahme, Verteilung, Metabolismus, Ausscheidung), denen Substanzen z. B. nach oraler, intraperitonealer und subkutaner Applikation ausgesetzt sind, werden durch den direkten intrathekalen Applikationsweg weitestgehend minimiert.

Nachteil der intrathekalen Verabreichung ist der hohe chirurgische Aufwand der Katheter-Implantation (siehe Abschnitt 2.5.3) und die mit diesem Eingriff verbundenen erheblichen Ausfälle (**Tabelle 3.1**). In mehreren Studien konnte die Effektivität von oral (Perry et al. 2008), intraperitoneal (Lipina et al. 2005) und intravenös (Chen et al. 2003) verabreichten GlyT-Inhibitoren schon nachgewiesen werden.

Es ist daher sinnvoll, die Effektivität der GlyT-Inhibitoren auf die Ausprägung neuropathischer Schmerzen auch nach oraler, intraperitonealer und subkutaner Applikation zu testen, da diese sehr viel einfacher durchzuführen sind und für das Versuchstier keine große Belastung darstellen. Auch im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz der GlyT-Inhibitoren bei der Schmerztherapie sind andere Applikationsarten der intrathekalen Applikation vorzuziehen.

4.1.2 Die Kontrollsubstanzen bzw. Lösungsmittel DMSO und NaCl

Die beiden GlyT-Inhibitoren ALX-5407 und ALX-1393 sind laut Herstellerangaben in 100%igem DMSO löslich. Daher wurde 100%iges DMSO als Lösungsmittel bzw. als Kontrolle gewählt.

DMSO hat eine geringe Toxizität und wird häufig als potentes Lösungsmittel für wasserunlösliche Substanzen eingesetzt (Vignes 2000). In etlichen Studien konnte jedoch eine Wirkung von DMSO unter anderem auf die Nozizeption festgestellt werden (Becker et al. 1969; Evans et al. 1993; Kubota et al. 1998; Gurtovenko and Anwar 2007; Fossum et al. 2008). Daher muss ein Einsatz von DMSO, gerade bei der Erforschung von Schmerzen, kritisch betrachtet werden. Auch die Bewegungsaktivität wird durch DMSO vermindert (Colucci et al. 2008). In einer Studie von Lu et al. konnte auch eine Beeinflussung der glutamatergen Neurotransmission nachgewiesen werden, wobei

DMSO in einer 0,5 bis 1,5%igen Konzentration die Wirkung von Glutamat am NMDAR und AMPAR vermindert (Lu and Mattson 2001).

Um diese mögliche Wirkung von DMSO auf das nozizeptive Verhalten der Ratten zu quantifizieren, wurde einer zweiten Kontrollgruppe NaCl verabreicht. Die beiden Kontrollsubstanzen DMSO und NaCl haben keine signifikant unterschiedliche Wirkung auf die Nozizeption (siehe Abschnitt 3.1.3). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass DMSO die pharmakologischen Eigenschaften (Resorption, Verteilung, Metabolismus und Elimination) der Glycin-Transporter-Inhibitoren beeinflusst.

Um den physiologischen Gegebenheiten möglichst nahe zu kommen, wäre es daher sinnvoll, die GlyT-Inhibitoren in künstlichem Liquor cerebrospinalis statt in DMSO zu lösen bzw. als zweite Kontrollgruppe Liquor-Ersatz statt NaCl zu verabreichen. Angaben zur Löslichkeit von ALX-5407 und ALX-1393 in künstlichem Liquor cerebrospinalis liegen jedoch nicht vor.

Eine mögliche Alternative zu DMSO ist das Lösungsmittel 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HBC), das schon von mehreren Arbeitsgruppen *in vivo* intrathekal verwendet wurde (Chen et al. 2003; Lipina et al. 2005; Morita et al. 2008; Tanabe et al. 2008). Für dieses Lösungsmittel liegen keine Hinweise auf eine Beeinflussung der Nozizeption vor (Yaksh et al. 1991). Angaben über die Löslichkeit der Glycin-Transporter-Inhibitoren in HBC liegen jedoch ebenfalls nicht vor.

4.1.3 Die Schmerztestungen

Der Einfluss der GlyT-Inhibitoren auf neuropathischen Schmerz wurde in dieser Studie durch die Messung der mechanischen Allodynie und der thermalen Hyperalgesie quantifiziert. Diesen beiden Charakteristika für neuropathischen Schmerz liegen zwar teilweise unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde (Costigan and Woolf 2000; Suzuki and Dickenson 2000; Bridges et al. 2001), da eine genaue Abgrenzung der beiden Eigenschaften jedoch nur per Definition möglich ist und wir aufgrund von Verhaltensbeobachtungen nicht auf die zugrunde liegenden ursächlichen Pathomechanismen schließen können, werden in der Diskussion der Ergebnisse beide Messwerte gemeinsam als Größenordnung für den neuropathischen Schmerz und die Wirkung der jeweiligen GlyT-Inhibitoren betrachtet. Zur Veranschaulichung des Zusammenhangs der Allodynie und Hyperalgesie siehe auch **Bild 1.1**.

Zusätzlich zur Messung und Quantifizierung evozierter Schmerzen wäre auch die Quantifizierung spontaner chronischer Schmerzen, die ein Hauptsymptom klinischer neuropathischer Schmerzen darstellen, sinnvoll. Im Verlauf dieser Dissertation wurde unter anderem zu diesem Zweck ein Pain Score für Ratten im CCI-Modell entwickelt (siehe 8.2). Der Einsatz dieses Pain Scores bei zukünftigen Studien wird zeigen, ob er ein geeignetes Instrument ist, die chronischen spontanen Schmerzen in diesem Modell zu quantifizieren.

4.1.3.1 Die Messung des PWT und der Allodynie mit dem Aesthesiometer[®]

Die Messung des mechanischen Paw withdrawal threshold (PWT) und der mechanischen Allodynie mithilfe des Aesthesiometers ist einfach durchzuführen. Dank des Spiegels kann das von Frey-Filament exakt unter der Pfote der Ratte platziert werden (**Bild 2.3**). Auch Ratten, die nach der CCI-Operation eine Schonhaltung der linken Gliedmaße einnehmen, können so exakt gemessen werden.

4.1.3.2 Die Messung der PWL und der Hyperalgesie mit dem Plantar Test[®]

Die Messung der thermalen Paw withdrawal latency (PWL) und der thermalen Hyperalgesie mithilfe des Plantar Tests war, im Gegensatz zur Messung des mechanischen PWT nicht ganz so einfach durchzuführen. Nach der CCI-Operation konnten häufig verschiedene Schonhaltungen beobachtet werden, die die Messung erschwerten.

Zum einen verlagerten die Tiere, bedingt durch eine Schonhaltung der linken Gliedmaße, ihr Gewicht häufig auf die rechte Seite. Dadurch war die rechte Pfote weniger gut sichtbar, weil sie unter einer Hautfalte des Tieres verschwand. Eine genaue Positionierung des Infrarotstrahlers unter der Pfote wurde somit erschwert (siehe **Bild 2.5**). Vergleicht man die physiologischen PWL-Werte der rechten Pfote vor der CCI-Operation mit den Werten nach der CCI-Operation, dann fällt auf, dass diese nach der CCI-Operation signifikant verlängert sind (siehe **Bild 3.2**). Auch Satoh und Omote konnten in ihrer Studie nach einer CCI-Operation verlängerte PWL der unverletzten Pfote beobachten (Satoh and Omote 1996). Mit großer Wahrscheinlichkeit sind diese Ergebnisse Messfehler, die sich aus der Tatsache ergeben, dass die exakte Positionierung des Infrarotstrahls, im Gegensatz zur exakten Positionierung des von Frey-Filaments durch einen

Spiegel, nicht immer möglich ist. Die Messwerte der rechten Pfote sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit fehlerhaft verlängert.

Zum anderen kam es zu einer Schonhaltung der linken, CCI-operierten Gliedmaße. Die linke Pfote wurde häufig aufgekümmert und eingerollt gehalten, sodass die plantare Oberfläche der Pfote nicht plan auflag. Oft hielten die Tiere die linke Pfote auch hoch und setzten sie gar nicht auf. Während das Metallfilament des Aesthesimeters sich so weit nach oben bewegt, bis es die plantare Oberfläche der Pfote berührt und so auch Pfoten gemessen werden können, die hochgehalten werden, muss der Infrarotstrahl zuerst die Distanz durch die Luft überbrücken. Hierdurch wird der Hitzereiz erst nach einer längeren Zeit als schmerzhaft empfunden, wodurch die Messwerte der thermalen Hyperalgesie der linken Pfote fehlerhaft verlängert sein können.

Die Messung der thermalen Hyperalgesie scheint, im Gegensatz zur Messung der mechanischen Allodynie mit einem erhöhten Risiko von Fehlmessungen belastet zu sein. Hierbei kommt es zu fehlerhaft verlängerten Werten sowohl an der linken, neuropathischen als auch an der rechten, gesunden Pfote. Dies ist bei der Interpretation der erhobenen Daten zu berücksichtigen.

4.1.4 Das Chronic Constriction Injury Modell

Das von Bennett und Xie entwickelte Modell einer peripheren Mononeuropathie ist ein häufig genutztes Modell, um neuropathische Schmerzen zu erforschen (Bennett and Xie 1988). Die Operation ist einfach durchzuführen und führte in dieser Studie bei allen operierten Tieren zur erfolgreichen Ausprägung einer mechanischen Allodynie und einer thermalen Hyperalgesie an der linken Pfote (**Bild 3.1** und **Bild 3.2**). Die Messwerte der linken Pfote nach Applikation der GlyT-Inhibitoren spiegeln demnach den Einfluss der GlyT-Inhibitoren auf die Nozizeption der neuropathischen Gliedmaße wieder.

Pathophysiologische Prozesse nach der CCI-Operation der linken Pfote finden auf der rechten Seite nicht bzw. nur in einem sehr geringen Umfang statt (Bennett and Xie 1988; Jergova and Cizkova 2007; Echeverry et al. 2008). Berichte über neuropathische Schmerzen auf der kontralateral der Nervenläsion befindlichen Seite wie z. B. nach dem Spinal-Nerve-Ligation-Modell bei Ratten (Arguis et al. 2008) und nach einer intradermalen Capsaicin-Injektion beim Menschen (Shenker et al. 2008), liegen für das CCI-

Modell nicht vor. Auch unsere Ergebnisse zeigen keine Veränderung des PWT der rechten Pfote vor und nach der CCI-Operation der linken Pfote (**Bild 3.1**). Somit repräsentieren die Messwerte der rechten Pfote den Einfluss der GlyT-Inhibitoren auf die Nozizeption der gesunden, nicht neuropathischen Gliedmaße. Die von uns beobachteten verlängerten PWL der rechten Pfote sind aller Wahrscheinlichkeit nach auf Fehlmessungen zurückzuführen (siehe auch Kapitel 4.1.3.2).

Von 122 operierten Tieren zeigte ein Tier eine Autotomie der linken Pfote nach der CCI-Operation (**Tabelle 3.1**). Hierbei kam es zu einem kompletten Verlust aller Phalangen von vier Zehen. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem Ergebnis von Bennett und Xie, die auch bei 2 von 148 operierten Tieren eine Autotomie beobachteten, bei der mehr als eine Zehe oberhalb der distalen Phalanx abgenagt wurde (Bennett and Xie 1988).

4.1.5 Die intrathekale Katheterisierung

Um die Glycin-Transporter-Inhibitoren direkt in die Nähe des Dorsalhorns des Rückenmarks applizieren zu können, wurde ein intrathekaler Katheter (PE10) in den subarachnoidalen Raum eingeführt (Yaksh and Rudy 1976). Der intrathekale Katheter hatte einen äußeren Durchmesser von 0,61 mm. Bedenkt man, dass der Wirbelkanal von einer Ratte mit einem Körpergewicht von 300 g einen durchschnittlichen Durchmesser von 3,68 mm und das Rückenmark einen durchschnittlichen Durchmesser von 3,08 mm hat, dann bleiben nur 0,60 mm für den subarachnoidalen Raum übrig (Hubel and Stromberg 1986). Das Risiko einer direkten Verletzung des Rückenmarks oder der versorgenden Blutgefäße durch den Katheter, der in den subarachnoidalen Raum vorgeschoben wird, ist dementsprechend hoch.

Insgesamt fielen etwa 48 Prozent aller operierten Tiere aus der Studie aus (**Tabelle 3.1**). In einer Studie von Tsang kam es nach intrathekaler Katheterisierung mit einem PE10 Katheter zu einer Ausfallquote von insgesamt 57 Prozent (Tsang et al. 1997).

Da sowohl die postoperativen Lähmungen, der Tod während der OP, der Verlust des Katheters und die Wundinfektion im Nackenbereich als direkte Folge der intrathekalen Katheterisierung zu betrachten sind, ist die intrathekale Katheterisierung in dieser Studie für 100 Prozent der ausgefallenen Tiere verantwortlich (**Tabelle 3.1**). Im Sinne der 3R's von Russel und Burch (Reduction, Refinement, Replacement) (Russel and

Burch 1959) ist es daher zwingend erforderlich bei ähnlichen Studien in der Zukunft dünnere Katheter (z. B. der Fa. Alzet[®]) zu benutzen. Hierdurch würde es durch eine Verbesserung (Refinement) der Methode zu einer Verminderung (Reduction) der Tierzahlen kommen. Außerdem könnte auch durch die Wahl einer anderen Applikationsart die hohen Verluste durch die intrathekale Katheterisierung vermieden werden.

4.1.5.1 Postoperative Lähmungen (Tabelle 3.1)

Insgesamt kam es bei 37,7 Prozent der operierten Tiere zu post-operativen Lähmungserscheinungen. In der von Tsang durchgeführten Studie fielen ebenfalls 38 Prozent der operierten Tiere durch Lähmungserscheinungen aus (Tsang et al. 1997). Verantwortlich für die postoperativen Lähmungen waren in der Studie von Tsang intrathekale Blutungen (Tsang et al. 1997). Andere Studien, in denen ebenfalls eine intrathekale Katheterisierung mit dem PE10 Katheter durchgeführt wurde, berichten von Ausfallquoten durch postoperative Lähmungen von 21 (Poon et al. 2005), bzw. 10 Prozent (Dobos et al. 2003). In einer von unserer Arbeitsgruppe anschließend durchgeführten Studie, wurden Katheter mit einem Außendurchmesser von 0,36 mm (Alzet[®]) eingesetzt. In dieser Studie kam es zu keinen postoperativen Lähmungserscheinungen (unveröffentlichte Daten unserer Arbeitsgruppe). Auch Tsang et al. konnten durch den Gebrauch dünnerer Katheter (Außendurchmesser 0,35 mm) die Anzahl der Tiere mit postoperativen Lähmungserscheinungen vermindern (38 Prozent mit PE10 Katheter vs. 9,5 Prozent mit den dünneren Kathetern) (Tsang et al. 1997).

4.1.5.2 Tod während der Operation (Tabelle 3.1)

Etwa sechs Prozent der operierten Tiere fielen durch Tod während der Operation bzw. während der Narkose aus der Studie aus. In der Studie von Tsang starben 19 Prozent der Tiere direkt während der Operation (Tsang et al. 1997). Bei diesen Tieren war es zu direkten Verletzungen des Gehirns bzw. des Rückenmarks durch den PE10 Katheter gekommen (Tsang et al. 1997). Es kann davon ausgegangen werden, dass es auch in unserer Studie zu direkten Verletzungen des Rückenmarks während der Katheterisierung gekommen ist, und somit die Katheterisierung hauptverantwortlich für den Tod während der Operation ist. Es ist nicht auszuschließen, dass einige Todesfälle während der Operation auch auf eine mögliche Überdosierung des Narkosemittels Pentobarbital zurückzuführen sind. Pentobarbital hat nur eine geringe therapeutische Breite. Andere

Narkotika wie z. B. Ketamin können jedoch die Rezeptoren, die an der glycinergen und glutamatergen Neurotransmission teilnehmen, direkt beeinflussen und die Ausbildung einer Hyperalgesie erheblich vermindern. Sie fallen daher als Alternative aus.

4.1.5.3 Verlust des intrathekalen Katheters (Tabelle 3.1)

Vier Tiere (3,3 Prozent der operierten Tiere) konnten nicht in die Studie aufgenommen werden, da sie im Verlauf des Versuchs den intrathekalen Katheter verloren und ihnen aufgrund des fehlenden Katheters keine Substanzen intrathekal verabreicht werden konnten. Der Verlust des Katheters kam nur in der Anfangsphase der Studie vor, und wurde durch ein sorgfältigeres Festkleben des Katheters am Hinterhauptsbein, sowie ein zusätzliches Verknoten und Festnähen des Katheters in der Wunde verhindert.

4.1.5.4 Wundinfektion (Tabelle 3.1)

Nur eins von 122 operierten Tieren fiel aufgrund einer Wundinfektion im Nackenbereich aus.

4.1.6 Das post OP Monitoring

Das Körpergewicht der Tiere wurde täglich kontrolliert und dokumentiert (siehe Abschnitt 3.1.4.). Der Gewichtsverlust von durchschnittlich etwa 9 Prozent, tritt laut der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) bei Belastungen auf, die als mittelgradig einzustufen sind (FELASA 1994). Andere Befunde, die auf Schmerzen oder Leiden hinweisen wie z. B. die bei Ratten typische „Brillenbildung“ wurden notiert, aber nicht quantifiziert.

Um die Dokumentation tierschutzrelevanter Informationen zu erleichtern und mögliche postoperative und spontane chronische Schmerzen quantifizieren zu können, wurde im Verlauf dieser Dissertation ein Pain Score entwickelt (siehe Abschnitt 8.2). Dieser Pain Score lehnt sich an vorhandene Pain Scores an (French et al. 2000; Roughan and Flecknell 2001; Mogil and Crager 2004; Roughan and Flecknell 2004) und modifiziert diese für den Einsatz, speziell für das Chronic Constriction Injury Modell. Ob der Pain Score ein geeignetes Hilfsmittel ist, um die postoperativen und chronischen Schmerzen zu quantifizieren, muss durch den Einsatz des Pain Scores in zukünftigen Studien evaluiert werden.

Die Tatsache, dass die Tiere in der vorliegenden Arbeit ca. 9 Prozent an Körpergewicht verloren, deutet darauf hin, dass in der postoperativen Phase Belastungen aufgetreten sind und die Tiere möglicherweise von einer peri- bzw. postoperativen Analgesie profitieren könnten.

Üblicherweise werden Tieren im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz keine analgetischen Substanzen verabreicht, da die Befürchtung besteht, diese könnten die Ergebnisse des Versuchs beeinflussen. Des Weiteren besteht die Befürchtung, dass die so gewonnenen Daten von anderen Schmerzforschern, die keine analgetische Behandlung der Versuchstiere durchführen, angezweifelt werden könnten.

Mithilfe eines Pain Scores und auch mit den schon eingesetzten Schmerztestungen (Aesthesiometer und Plantar Test) sollte in einer Folgestudie untersucht werden, ob der Einsatz analgetischer Substanzen vor allem in den ersten ein bis zwei Tagen nach der Operation (Behandlung des postoperativen Wundschmerzes) für die Tiere eine Verbesserung der Versuchsbedingungen darstellt und ob es zu einer Beeinflussung der Ergebnisse kommt.

Sollte sich herausstellen, dass eine kurzfristige postoperative Analgesie die Belastungen der Versuchstiere im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz vermindert und es nicht zu einer Beeinflussung der Ausprägung neuropathischer Schmerzen kommt, dann könnten die Bedingungen der Versuchstiere in diesem Modell verbessert werden.

4.2 Die Wirkung des Glycin-Transporter-1-Inhibitors ALX-5407

Der GlyT1-Inhibitor ALX-5407 hatte in dieser Studie sowohl pronozizeptive als auch antinozizeptive Wirkungen auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. Nebenwirkungen wurden nicht beobachtet (Siehe Abschnitt 3.2 und **Tabelle 3.2**).

ALX-5407 hemmt den GlyT1 (Atkinson et al. 2001) und verhindert so die Aufnahme von Glycin. Durch Mikrodialyse konnte nachgewiesen werden, dass die extrazelluläre Glycinkonzentration im präfrontalen Cortex von Ratten 30 Minuten nach der oralen Verabreichung von 10 mg/kg ALX-5407 um 40 Prozent gegenüber des Basalwertes ansteigt (Atkinson et al. 2001). Dieser Effekt hält über die gesamte gemessene Zeitdauer von 90 Minuten an. Die Erhöhung der Glycinkonzentration durch die Verabreichung einer niedrigeren Dosierung (1 mg/kg ALX-5407) ist weniger stark ausgeprägt und hält auch weniger lange an. In einer Untersuchung von Whitehead et al. konnte nachgewiesen werden, dass der selektive GlyT1-Inhibitor Org-24598 die Glycinkonzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks von Ratten dosisabhängig erhöht (Whitehead et al. 2004).

Es ist daher anzunehmen, dass auch in unserer Studie die Glycinkonzentration im Dorsalhorn des Rückenmarks proportional zu den applizierten ALX-5407 Dosen ansteigt.

Die in unserer Studie beschriebenen antinozizeptiven Effekte von ALX-5407 hielten über einen Zeitraum von 240 Minuten an. Im Gegensatz hierzu beobachteten Tanabe et al. einen antinozizeptiven Effekt, der sich im Verlauf der Untersuchung abschwächte und am Ende der Untersuchung (nach 120 Minuten) nur noch knapp oberhalb der Ausgangswerte lag (Tanabe et al. 2008). Die von uns beobachtete langanhaltende Wirkung von ALX-5407 könnte zum einen durch die starke Bindungskraft von ALX-5407 und zum anderen durch die von uns verabreichten hohen Konzentrationen zu erklären sein (siehe **Tabelle 4.1**).

Der GlyT1 befindet sich hauptsächlich in der Zellmembran von Astrozyten, die sowohl glutamaterge Synapsen als auch glycinerge Synapsen umgeben. Die Hauptaufgabe des GlyT1 ist es, Glycin aus dem synaptischen Spalt aufzunehmen. Der GlyT1 limitiert

auch den Spill-over von Glycin aus der glycinergen zur glutamatergen Synapse. Speziell in der Nähe von NMDAR hat er außerdem die Aufgabe, die Glycinkonzentration unter der Sättigungsgrenze für Glycin an der Glycin-Bindungsstelle am NMDAR zu halten (Supplisson and Roux 2002).

Eine Inhibition des GlyT1 birgt somit die Möglichkeit, durch die Beeinflussung der Glycinkonzentration, sowohl die inhibitorische Neurotransmission über den GlyR, als auch die exzitatorische Neurotransmission über den NMDAR positiv zu beeinflussen. Aus diesem Grund war es denkbar, dass durch eine Hemmung des GlyT1 durch ALX-5407 sowohl antinozizeptive Effekte als auch pronozizeptive Effekte auftreten können. In einer früheren Studie dieser Arbeitsgruppe konnten nach der intrathekalen Verabreichung von Nocistatin, einem Neuropeptid, das die Ausschüttung von Glycin und GABA verhindert, ebenfalls dosisabhängig sowohl pro- als auch antinozizeptive Wirkungen beobachtet werden, wobei die pronozizeptiven Effekte NMDAR-vermittelt waren (Muth-Selbach et al. 2004).

4.2.1 Die antinozizeptive Wirkung von ALX-5407

In einer Dosierung von 10 µg und 100 µg hatte der GlyT1-Inhibitor ALX-5407 antinozizeptive Wirkungen.

Die antinozizeptive Wirkung des GlyT1-Inhibitors ALX-5407 ist höchstwahrscheinlich auf eine verstärkte Aktivierung von inhibitorischen GlyR durch die erhöhte Glycinkonzentration zurückzuführen.

In Studien, in denen Glycin direkt intrathekal verabreicht wurde, konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Glycinkonzentration die Ausprägung einer Allodynie und Hyperalgesie im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz verhindern (Huang and Simpson 2000) bzw. reduzieren (Simpson et al. 1996; 1997) kann. Um nachzuweisen, dass die antinozizeptive Wirkung einer erhöhten Glycinkonzentration über den GlyR vermittelt wird, kann der selektive Hemmer des GlyR, Strychnin, zum Einsatz kommen. Morita et al. zeigen in einer Studie, die fast zeitgleich mit unseren Daten veröffentlicht wurde, dass die intrathekale Verabreichung von Strychnin die zuvor beobachteten antinozizeptiven Effekte des GlyT1-Inhibitors Org-25935 verhindert (Morita et al. 2008). Die verminderten antinozizeptiven Effekte durch eine Hemmung des GlyR mit Strychnin beweist, dass die antinozizeptive Wirkung über den GlyR vermittelt wurde.

Auch Satoh und Omote (Satoh and Omote 1996) können nach der Verabreichung von Strychnin und der dadurch bedingten Hemmung des GlyR eine stärkere Ausprägung der thermalen Hyperalgesie beobachten. Ein weiterer Beweis für die GlyR-vermittelte analgetische Wirkung einer durch GlyT1 erhöhten Glycinkonzentration zeigt ebenfalls die Studie von Morita et al: Ein Knock-down des GlyR α 3 führt dazu, dass der GlyT1-Inhibitor Org-25935 seine antinozizeptive Wirkung nicht mehr ausübt (Morita et al. 2008).

Die Hemmung des GlyT1 führt auch in der Nähe des NMDAR zu einer erhöhten Glycinkonzentration und dadurch auch zu einer verstärkten Aktivierung des exzitatorischen Rezeptors. Primäre Afferenzen (A β -, A δ - und C-Fasern) nehmen im Rückenmark synaptischen Kontakt sowohl direkt zu Projektionsneuronen als auch zu lokalen Interneuronen auf. Befindet sich nun der durch die erhöhte Glycinkonzentration verstärkt aktivierte NMDAR in der postsynaptischen Zellmembran eines inhibitorischen Interneurons, dann wird dieses Interneuron mit einer verstärkten Ausschüttung von Glycin und GABA reagieren. Als Endergebnis der NMDAR-Aktivierung könnte so eine verstärkte Inhibition und somit eine antinozizeptive Wirkung entstehen (Petrenko et al. 2003). Hinweise auf diesen Wirkmechanismus können einer *in vivo* Studie von Gu und Huang entnommen werden. Sie zeigt, dass die antinozizeptive Wirkung von Gabapentin einer erhöhten Aktivität von NMDAR zuzuschreiben ist (Gu and Huang 2002). Neuere Studien können diesen antinozizeptiven Wirkmechanismus von Gabapentin über eine NMDAR-Aktivierung jedoch nicht bestätigen (Cheng and Chiou 2006).

Die durch den GlyT2 aufgenommene Menge an Glycin bestimmt den Phänotyp des inhibitorischen Neurons (Rousseau et al. 2008). So konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung (Rousseau et al. 2008) oder ein Fehlen des GlyT2 (Gomez et al. 2003b) dazu führt, dass das inhibitorische Neuron an intrazellulärem Glycin verarmt. Infolgedessen werden die präsynaptischen Vesikel dann hauptsächlich mit GABA befüllt.

Nach einer Hemmung des GlyT1 steigt nun die extrazelluläre Glycinkonzentration an. Der GlyT2 arbeitet ungehindert weiter. Es ist denkbar, dass es dem Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter (VIAAT) hierdurch ermöglicht wird, Glycin verstärkt in präsynaptische Vesikel einzubauen. Da GABA und Glycin beide unspezifisch durch

VIAAT transportiert werden (Wojcik et al. 2006), wird eine erhöhte intrazelluläre Glycinkonzentration im Sinne einer kompetitiven Hemmung dazu führen, dass die Vesikel hauptsächlich mit Glycin gefüllt sind und die glycinerge Neurotransmission im Gegensatz zur GABAergen Neurotransmission zunimmt. Eine Verschiebung der inhibitorischen Neurotransmission von einer normalerweise gemischten GABA/glycinergen Neurotransmission zu einer hauptsächlich glycinergen Neurotransmission durch eine erhöhte Verfügbarkeit von Glycin, könnte für die Veränderungen der Schmerzwahrnehmung in dieser Studie mit verantwortlich sein.

Die erhöhte Glycinkonzentration durch die Hemmung des GlyT1 kann auch zu direkten Veränderungen des NMDAR führen und so die exzitatorische Neurotransmission beeinflussen. In einer Patch Clamp Studie von Neuronen des Hippokampus konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer Glycin-induzierten Herunterregulierung des NMDAR und dadurch zu einer verminderten exzitatorischen Neurotransmission kommt (Nong et al. 2003). Eine hohe Glycinkonzentration bereitet demnach den NMDAR auf dessen Internalisierung vor, die dann durch die Bindung von Glutamat ausgelöst wird. Innerhalb von Minuten wird der NMDAR dann aus der Zellmembran entfernt und in die Zelle aufgenommen. Der internalisierte NMDAR steht somit nicht mehr für die exzitatorische Neurotransmission zur Verfügung (Nong et al. 2003). Eine verminderte Exzitation könnte zu den antinozizeptiven Effekten von ALX-5407 beitragen.

Die Tatsache, dass die hohe Dosierung ALX-5407 ähnlich stark ausgeprägte antinozizeptive Wirkungen hat wie die niedrige Dosierung, könnte darauf hinweisen, dass es eine natürliche Grenze für die Beeinflussung der glycinergen Neurotransmission durch GlyT1-Inhibitoren gibt. Heterozygote GlyT1^{+/-} Mäuse reagieren auf exogen zugeführtes Glycin nicht mehr mit einer verstärkten NMDAR-Aktivierung, was darauf hindeutet, dass die Glycinkonzentration, die bei diesen Mäusen erhöht ist, zu einer Sättigung des NMDAR führt (Tsai et al. 2004). Andererseits zeichnen sich sowohl Ratten und Mäuse, denen der GlyT1-Inhibitor ALX-5407 in hoher Dosierung oral zugeführt wurde (Perry et al. 2008), als auch Mäuse, denen der GlyT1 fehlt (Gomez et al. 2003a), durch eine schwache motorische Aktivität, Atemdepression und Hypotonie aus. Diese Symptome sind aller Wahrscheinlichkeit nach über GlyR vermittelt. Somit ist es also denkbar, dass durch eine noch höhere Dosierung des GlyT1-Inhibitors ALX-5407 möglicherweise

noch weitere antinozizeptive Effekte über eine stärkere Aktivierung des inhibitorischen GlyR bis zum Auftreten von Nebenwirkungen erreicht werden könnten.

Während in der vorliegenden Arbeit sowie auch in der Studie von Tanabe (Tanabe et al. 2008) Nebenwirkungen nach der intrathekalen Applikation von ALX-5407 ausblieben, konnten Perry et al. Nebenwirkungen auf die Bewegungs- und Atemtätigkeit von Ratten und Mäusen beobachten (Perry et al. 2008):

Vier bis fünf Stunden nach der oralen Verabreichung von 30 mg/kg ALX-5407 kam es bei Ratten zu einer erhöhten Bewegungsaktivität und ataktischen Bewegungen. Die Phase der Hyperaktivität dauerte ca. zwei bis drei Stunden. Anschließend wurden Atemdepressionen und Seitenlagen beobachtet. 24 Stunden nach der Applikation von ALX-5407 befanden sich die Tiere in Seitenlage und sie atmeten schwer und flach (Perry et al. 2008). Mäuse entwickelten nach der Applikation von ALX-5407 (3-20 mg/kg, i.p.) eine dosisabhängige Atemdepression.

Die Beobachtungen von Perry et al. ähneln sowohl den von Gomeza et al. (Gomeza et al. 2003a) gemachten Beobachtungen an GlyT1^{-/-} Knockout-Mäusen als auch unseren Beobachtungen nach Verabreichung des GlyT2-Inhibitors ALX-1393 und den klinischen Symptomen der humanen glycinergen Enzephalopathie. Höchstwahrscheinlich sind diese Symptome auf eine verstärkte Aktivierung der GlyR zurückzuführen. Sowohl die von uns als auch die von Tanabe et al. (Tanabe et al. 2008) gewählten intrathekalen Dosierungen von ALX-5407 sind sehr viel geringer, als die in der Studie von Perry et al. oral verabreichten Dosierungen (Perry et al. 2008), was die Nebenwirkungen erklären kann. Auf die verschiedenen Dosierungen und Applikationsarten wird in Abschnitt 4.1.1.3 und 4.1.1.4 genauer eingegangen.

Ein weiterer denkbarer Mechanismus, der zu der antinozizeptiven Wirkung des GlyT1-Inhibitors ALX-5407 beitragen könnte, ist die Aktivierung von präsynaptischen GlyR in der Zellmembran glycinerner Neurone, die im Sinne eines positiven Feedbacks zu einer verstärkten Ausschüttung von Glycin führen (Jeong et al. 2003) und somit eine noch stärkere Aktivierung der postsynaptischen inhibitorischen GlyR bewirken. Eine verstärkte Aktivierung präsynaptischer NMDAR in glutamatergen Synapsen im Dorsalhorn des Rückenmarks vermindert die Ausschüttung von Glutamat (Bardoni et al. 2004) und könnte somit über eine verminderte Exzitation antinozizeptiv wirken.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der wahrscheinlichste Wirkmechanismus für die antinozizeptive Wirkung des GlyT1-Inhibitors ALX-5407 die Verstärkung der GlyR-vermittelten inhibitorischen Neurotransmission ist. Zwar kommt es, wie in Abschnitt 4.2.2 beschrieben, bei der mittleren Konzentration zu pronozizeptiven Effekten, die höchstwahrscheinlich über eine Aktivierung der exzitatorischen NMDAR bedingt ist, es überwiegen jedoch nach Verabreichung der niedrigen und der hohen Konzentration die inhibitorischen, höchstwahrscheinlich GlyR-vermittelten Effekte.

4.2.2 Die pronozizeptive Wirkung von ALX-5407

Die intrathekale Verabreichung von ALX-5407 in einer Dosierung von 50 µg hatte in dieser Studie tendenziell pronozizeptive Wirkungen auf die mechanische Allodynie der linken, neuropathischen Pfote (**Bild 3.7**) und eine signifikant pronozizeptive Wirkung auf den mechanischen PWT der rechten, gesunden Pfote (**Bild 3.9**).

Die von uns beobachteten pronozizeptiven Wirkungen sind aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine verstärkte NMDAR-vermittelte Neurotransmission bedingt.

Auch Morita et al. konnten eine pronozizeptive Wirkung nach Verabreichung des GlyT1-Inhibitors Org-25935 auf die Nozizeption von Schein-operierten Tieren feststellen. Außerdem trat die antinozizeptive Wirkung des GlyT1-Inhibitors auf die mechanische Allodynie der neuropathischen Tiere im Vergleich mit der direkt einsetzenden antinozizeptiven Wirkung eines GlyT2-Inhibitors zeitlich verzögert auf (Morita et al. 2008). Durch eine Blockierung der Glycin-Bindungsstelle des NMDAR konnte die pronozizeptive Wirkung des GlyT1-Inhibitors auf die Schein-operierten Tiere stark abgemildert werden. Der verzögerte Eintritt der antinozizeptiven Wirkung des GlyT1-Inhibitors auf die neuropathischen Tiere konnte verhindert und die antinozizeptive Wirkung sogar noch potenziert werden (Morita et al. 2008). Somit ist es wahrscheinlich, dass die Aktivierung des NMDAR durch die erhöhte Glycinkonzentration nach Hemmung des GlyT1 einer antinozizeptiven Wirkung entgegenwirkt bzw. pronozizeptiv wirkt.

Das Spill-over von Glycin aus der glycinergen zur glutamatergen Synapse (Ahmadi et al. 2003) wird normalerweise durch den GlyT1 reduziert. Die Hemmung des GlyT1 wird daher das Glycin Spill-over erleichtern. Somit wird die Glycinkonzentration in der Nähe der NMDAR stark ansteigen. Die Aktivierung des NMDAR durch eine GlyT1-Inhibitor-vermittelte Erhöhung der Glycinkonzentration konnte bereits in vielen *in vivo*

und *in vitro* Studien nachgewiesen werden (Ahmadi et al. 2003; Chen et al. 2003; Kinney et al. 2003; Martina et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit und in der Studie von Morita et al. (Morita et al. 2008) wird zum ersten Mal nachgewiesen, dass eine GlyT1-Inhibitor-vermittelte Aktivierung von NMDAR zur Ausprägung neuropathischer Schmerzen im Tiermodell beiträgt.

Tanabe et al. konnten zwar keine pronozizeptive Wirkungen nach intrathekaler Applikation von ALX-5407 bei Mäusen in einem Modell für neuropathischen Schmerz beobachten, es kam jedoch supraspinal zu einer Verstärkung der LTP im Hippokampus (Tanabe et al. 2008). Dies weist, wie auch schon andere Studien (Tsai et al. 2004), auf den möglichen therapeutischen Einsatz von GlyT1-Inhibitoren bei kognitiven Erkrankungen wie z. B. Morbus Alzheimer und Demenz hin. GlyT1-Inhibitoren werden auch als eine neue therapeutische Option zur Behandlung der Schizophrenie untersucht, bei der möglicherweise eine Unterfunktion des NMDAR vorliegt (Coyle et al. 2003; Javitt 2008).

Neben der Aktivierung des exzitatorischen NMDAR könnte auch eine verstärkte GlyR-Aktivierung zur Ausprägung der neuropathischen Schmerzen bzw. zur pronozizeptiven Wirkung von ALX-5407 beitragen. Im Verlauf einer Neuropathie kann es durch den von Gliazellen ausgeschütteten BDNF zu einer TrkB-vermittelten Herunterregulierung des KCC2 kommen (Rivera et al. 2004; Coull et al. 2005). Hierdurch wird der Anionengradient derartig verändert, dass eine Bindung von Glycin an den GlyR nun eine exzitatorische Wirkung auf das postsynaptische Neuron ausübt (siehe auch Abschnitt 1.2.1, Seite 7). Dies könnte für die pronozizeptive Wirkung des GlyT1-Inhibitors ALX-5407 mit verantwortlich sein (Coull et al. 2003).

Gegen diesen Pathomechanismus als Grundlage für die von uns beobachteten pronozizeptiven Wirkungen spricht, dass die pronozizeptiven Effekte vor allem an der rechten, nicht neuropathischen Pfote beobachtet werden konnten (**Bild 3.9**). Da die rechte Seite nicht operiert wurde, und daher nur eine sehr geringe Aktivierung von Mikrogliazellen auf dieser Seite zu erwarten ist (Jergova and Cizkova 2007; Echeverry et al. 2008), ist es unwahrscheinlich, dass es hier zu den von Coull et al. beschriebenen Veränderungen des Anionengradienten gekommen ist (Coull et al. 2003). Morita et al. zeigen, dass eine Applikation von Strychnin die mechanische Allodynie in einem Modell für neuro-

pathischen Schmerz bis zu 3 Tage nach der Operation abschwächt (Morita et al. 2008). In der frühen Phase nach der Operation findet also offensichtlich eine GlyR-vermittelte Verstärkung der Schmerzwahrnehmung statt. Wird Strychnin zehn Tage nach der Operation verabreicht, wirkt Strychnin wieder pronozizeptiv (Morita et al. 2008). Es ist daher wahrscheinlich, dass der von Coull et al. beschriebene Pathomechanismus hauptsächlich in der Entstehungsphase von neuropathischen Schmerzen eine Rolle spielt.

Warum es gerade an der nicht operierten Pfote bzw. in der Studie von Morita et al. (Morita et al. 2008) bei den Schein-operierten Tieren zu pronozizeptiven Wirkungen des GlyT1-Inhibitors kommt, ist nicht leicht zu verstehen. Die pronozizeptive Wirkung ist — wie oben dargestellt — höchstwahrscheinlich NMDAR-vermittelt. Der NMDAR nimmt an der normalen Schmerzverarbeitung nicht teil, da er durch ein Mg^{2+} -Ion blockiert ist. Erst durch eine lang andauernde Depolarisation der postsynaptischen Zellmembran z. B. im Verlauf einer Neuropathie, wird der Mg^{2+} -Block gelöst. Erst jetzt kann der NMDAR überhaupt an der glutamatergen Neurotransmission teilnehmen. Die Pathomechanismen, die zur Ausprägung der Hyperalgesie und Allodynie an der linken CCI-operierten Pfote führen, haben an der rechten Seite nicht stattgefunden. Dementsprechend sollte auch der NMDAR nicht aktiviert sein und sich auch nicht durch eine Erhöhung der Glycinkonzentration beeinflussen lassen.

Möglicherweise sind andere, sowohl spinale als auch supraspinale Mechanismen, für die pronozizeptive Wirkung von ALX-5407 auf die rechte unverletzte Pfote verantwortlich:

In der Zellmembran von glutamatergen Neuronen im Hirnstamm befinden sich präsynaptische GlyR, deren Aktivierung eine Ausschüttung von Glutamat bewirken (Turecek and Trussell 2001). Es ist vorstellbar, sollte es solche präsynaptischen GlyR auch in der Zellmembran glutamaterger Neurone im Rückenmark geben, dass eine erhöhte Glycinkonzentration nach Hemmung des GlyT1 zu einer verstärkten Glutamat-Ausschüttung führt. Die erhöhte Glutamatkonzentration führt dann über eine Aktivierung von non-NMDAR zur Depolarisation der Zellmembran und zur Rekrutierung von NMDAR, wodurch die exzitatorische Neurotransmission verstärkt wird. Ob ein solcher präsynaptischer GlyR auch in glutamatergen Synapsen des Rückenmarks zu einer verstärkten Ausschüttung von Glutamat führt, ist nicht bekannt, könnte jedoch die pronozi-

zeptive Eigenschaft des GlyT1-Inhibitors auf die unverletzte Pfote erklären. Auch eine Aktivierung von NMDAR, die sich in der präsynaptischen Zellmembran glutamaterger Neurone befinden, führt zu einer verstärkten Ausschüttung von Substanz P und vermutlich Glutamat (Liu et al. 1994; Liu et al. 1997), wodurch die exzitatorische Wirkung auf das postsynaptische Neuron zunehmen könnte.

Möglicherweise kommt es nach der lokalen intrathekalen Applikation des GlyT1-Inhibitors ALX-5407 auch zu einer Diffusion der Substanz in supraspinale Bereiche des ZNS. Da sich der GlyT1 auch hier befindet (Zafra et al. 1995b; Cubelos et al. 2005), ist es möglich, dass es auch in diesen Bereichen zu einer Erhöhung der Glycinkonzentration und einer Beeinflussung der glutamatergen Neurotransmission kommt. Ein Einfluss der Erhöhung der Glycinkonzentration durch GlyT1-Inhibitoren in der Nähe von supraspinalen NMDAR konnte schon in mehreren *in vitro* und *in vivo* Studien nachgewiesen werden (Chen et al. 2003; Tanabe et al. 2008). Hier wurden vor allem positive Wirkungen auf das Erinnerungsvermögen bzw. die Ausprägung einer LTP beobachtet. Möglicherweise ist die Aktivierung supraspinaler NMDAR für die pronozizeptive Wirkung in unserer Studie mit verantwortlich.

Wie im Abschnitt 4.2.1 beschrieben, kann der NMDAR bei einer bestimmten Glycinkonzentration gesättigt sein, sodass eine weitere Erhöhung der Glycinkonzentration nicht mehr zu einer Verstärkung der NMDAR-vermittelten Neurotransmission führen kann (Tsai et al. 2004). Ebenso ist es denkbar, dass auch der GlyR mit Glycin gesättigt sein kann, sodass es zu keiner weiteren inhibitorischen GlyR-vermittelten Neurotransmission kommt. Unter diesen Umständen kann dann möglicherweise die exzitatorische Neurotransmission über den NMDAR vorherrschen und zu den beobachteten pronozizeptiven Wirkungen nach der Verabreichung der mittleren ALX-5407 Konzentration beitragen. Eine durch die hohe Glycinkonzentration ausgelöste Desensitisierung des GlyR ist ein weiterer möglicher Mechanismus, der zu einer verminderten inhibitorischen Wirkung über den GlyR beitragen könnte (Jones and Westbrook 1996; Legendre 2001).

Eine verstärkte Aktivierung der exzitatorischen NMDAR in glutamatergen Synapsen durch die Hemmung des GlyT1 kann bei der Behandlung von Erkrankungen, die mit einer NMDAR-Hypofunktion einhergehen von Vorteil sein. Bei der Behandlung neuro-

pathischer Schmerzen stehen diese NMDAR-vermittelten pronozizeptiven Eigenschaften einem therapeutischen Einsatz der GlyT1-Inhibitoren entgegen. Die Tatsache, dass es in der mittleren Konzentration zu pronozizeptiven, in der niedrigen und der hohen Konzentration jedoch zu antinozizeptiven Wirkungen gekommen ist, zeigt, wie wichtig die Feinabstimmung der Glycinkonzentration bei der Schmerzverarbeitung ist.

4.3 Die Wirkung des Glycin-Transporter-2-Inhibitors ALX-1393

Der GlyT2-Inhibitor ALX-1393 hatte in dieser Studie eine dosisabhängig tendenziell antinozizeptive Wirkung auf das nozizeptive Verhalten von Ratten im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz. In der hohen Dosierung (100 µg ALX-1393) waren diese Effekte signifikant antinozizeptiv. In dieser Dosierung traten bei vier von acht Tieren zusätzliche neuromotorische Wirkungen auf (Paresen, Paralysen, Atemdepressionen, Anästhesie) (siehe Abschnitt 3.3.3).

Der GlyT2 befindet sich hauptsächlich in der präsynaptischen Zellmembran glycinerner Neurone (Zafra et al. 1995b; Poyatos et al. 1997) und ist dort mit dem GlyR kolokalisiert (Jursky and Nelson 1995). Der GlyT2 ist für die Wiederaufnahme von Glycin aus dem synaptischen Spalt der inhibitorischen, glycinergen Synapse verantwortlich, damit die präsynaptischen Vesikel wieder mit Glycin gefüllt werden können („Glycine Recycling“) (Gomez et al. 2003b). Durch die Hemmung des GlyT2 mit dem GlyT2-Inhibitor ALX-1393 kommt es daher vor allem in der Nähe von inhibitorischen GlyR zu einer erhöhten Glycinkonzentration.

Die Glycinkonzentration wird – vergleichbar wie im Abschnitt 4.2 für den GlyT1-Inhibitor ALX-5407 dargestellt – mit der Dosierung des GlyT2-Inhibitors positiv korrelieren.

4.3.1 Die antinozizeptive Wirkung von ALX-1393

Die Applikation von 100 µg ALX-1393 hat eine starke antinozizeptive Wirkung auf die Nozizeption der linken, neuropathischen Pfote und die Messwerte der thermalen Hyperalgesie liegen teilweise oberhalb der physiologischen Messwerte vor der CCI-Operation (**Bild 3.12**).

Die von uns beobachtete antinozizeptive Wirkung ist aller Wahrscheinlichkeit nach GlyR-vermittelt.

Auch Morita et al. konnten nach der intrathekalen Verabreichung von ALX-1393 eine schnell einsetzende und lang andauernde verminderte mechanische Allodynie in einem Modell für neuropathischen Schmerz beobachten. Diese antinozizeptive Wirkung von ALX-1393 auf die mechanische Allodynie konnte durch eine Hemmung des GlyR mit Strychnin antagonisiert werden. Somit ist die antinozizeptive Wirkung von ALX-1393 über den GlyR vermittelt (Morita et al. 2008).

Nach der Verabreichung des GlyT2-Inhibitors ALX-1393 können in der vorliegenden Studie ausschließlich antinozizeptive Effekte beobachtet werden.

Zum einen erklärt sich dies aus der Tatsache, dass eine Hemmung des GlyT2, der hauptsächlich in der präsynaptischen Zellmembran glycinerner Neurone exprimiert wird, die Glycinkonzentration auch hauptsächlich in der glycinergen Synapse erhöhen wird. Hierdurch kommt es zu einer verstärkten GlyR-Aktivierung, zu einer Verstärkung der Inhibition und letztendlich zu einer Schmerzlinderung.

Zum anderen wird der GlyT1 nach Hemmung des GlyT2 ungestört weiter Glycin aus dem synaptischen Spalt entfernen. So wird ein Spill-over zu benachbarten glutamatergen Synapsen und somit auch eine verstärkte NMDAR-Aktivierung vermutlich verhindert. Die verminderte Exzitation wird dazu beitragen, dass die inhibitorischen Wirkungen von Glycin überwiegen können und es als Endergebnis der glycinergen Neurotransmission zu den beobachteten antinozizeptiven Effekten kommt.

Neben Glycin wird auch GABA mit derselben Affinität von VIAAT in die präsynaptischen Vesikel von inhibitorischen Interneuronen im Dorsalhorn des Rückenmarks eingebaut (Jonas et al. 1998; Wojcik et al. 2006). Durch eine Hemmung des GlyT2 wird, genau wie durch ein GlyT2-Knock-out, weniger Glycin in der präsynaptischen Zelle vorhanden sein. Der VIAAT wird höchstwahrscheinlich mehr GABA in die Vesikel einbauen, wodurch sich die im Rückenmark häufig gemischte GABA/glycinerge inhibitorische Neurotransmission zugunsten der GABAergen Neurotransmission verschiebt (Gomez et al. 2003b; Xu et al. 2005). Die veränderte Zusammensetzung der präsynaptischen Vesikel beeinflusst die inhibitorische Neurotransmission (Chery and de Koninck 1999; Li et al. 2003; Lu et al. 2008) und wird damit auch die Schmerzver-

arbeitung wesentlich beeinflussen. Es ist denkbar, dass die veränderte Zusammensetzung der präsynaptischen Vesikel über eine Verschiebung zugunsten der GABA-ergen Inhibition möglicherweise zu den beobachteten antinozizeptiven Effekten von ALX-1393 beiträgt.

4.3.2 Die neuromotorischen Wirkungen von ALX-1393

Bei vier von acht Tieren kam es direkt nach der Applikation von 100 µg ALX-1393 zu stark ausgeprägten neuromotorischen Wirkungen. Diese Tiere waren teilweise vorübergehend, teilweise bleibend schlaff gelähmt, hatten einen verringerten Muskeltonus, verzögerte Reflexe, waren atemdepressiv und zeigten fehlende Reaktionen auf schmerzhafte Reize (siehe Abschnitt 3.3.3).

Nebenwirkungen dieser Art wurden weder in der Studie von Lechner (Lechner 2000), in der 40 µg ALX-1393, noch in der Studie von Morita et al. (Morita et al. 2008), in der 10 ng ALX-1393 intrathekal verabreicht wurden, beobachtet, was mit großer Wahrscheinlichkeit auf die niedrigeren Dosierungen im Vergleich zu unserer Studie (siehe **Tabelle 4.1**) zurückzuführen ist.

Die neuromotorischen Wirkungen in unserer Studie sind mit großer Wahrscheinlichkeit GlyR-vermittelt.

So ähnelt die klinische Symptomatik der in dieser Studie beobachteten schlaffen Lähmung der klinischen Symptomatik der humanen glycinergen Enzephalopathie. Bei dieser seltenen Erbkrankheit kommt es durch die fehlerhaft arbeitende Glycin-Synthase (baut Glycin ab) zu einer erhöhten Glycinkonzentration (Applegarth and Toone 2004; 2006) und einer verstärkten Glycin-Wirkung am GlyR. Symptome sind unter anderen ein schwacher Muskeltonus, schwache Reaktionen auf äußere Reize, Lethargie und eine schwerwiegende Atemdepression. Perry et al. (Perry et al. 2008) konnten neuromotorische Nebenwirkungen dieser Art nach der oralen Applikation des GlyT1-Inhibitors ALX-5407 beobachten. Auch diese Effekte sind auf eine starke GlyR-Aktivierung zurückzuführen. In einem Modell für spinalen Schock ist die Glycinkonzentration endogen stark erhöht (Simpson et al. 1993). Hierdurch kommt es über die verstärkte Aktivierung von GlyR auf Motoneuronen im Rückenmark (Kandel et al. 2000) zu einer schlaffen Lähmung und dem Verlust der spinalen Reflexe (Simpson et al. 1993). Auch

die Immobilität, die durch Inhalationsnarkotika ausgelöst wird, ist teilweise über den GlyR vermittelt (Zhang et al. 2003).

Die verstärkte Aktivierung des inhibitorischen GlyR über eine Erhöhung der Glycin-konzentration durch den GlyT2-Inhibitor ALX-1393 ist also aller Wahrscheinlichkeit nach für die beobachteten neuromotorischen Wirkungen verantwortlich.

Interessanterweise sind die klinischen Symptome der GlyT2^{-/-} Knockout-Mäuse genau gegensätzlich zu den in dieser Studie beobachteten Wirkungen der Hemmung des GlyT2:

Mäuse, denen das Gen für den GlyT2 fehlt, sind klinisch durch einen erhöhten Muskeltonus, Spastizität und elektrophysiologisch durch eine verminderte Amplitude der durch GlyR-vermittelten IPSP gekennzeichnet (Gomez et al. 2003b). Der Phänotyp der GlyT2-Knockout-Mäuse ähnelt somit stark den Symptomen der humanen Hyperekplexie, bei der die glycinerge Neurotransmission sowohl präsynaptisch am GlyT2 als auch postsynaptisch am GlyR gestört ist (Rees et al. 2006; Harvey et al. 2008).

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist die entwicklungsabhängig unterschiedliche intrazelluläre Chloridkonzentration. Im embryonalen Leben und bis ca. eine Woche post partum arbeitet der KCC2-Transporter, der beim adulten Tier dafür zuständig ist, die intrazelluläre Chloridkonzentration gering zu halten, noch nicht ausreichend (Rivera et al. 1999; Payne et al. 2003; Cordero-Erausquin et al. 2005). Hierdurch bewirkt eine Glycin-vermittelte Aktivierung des GlyR einen Ausstrom von Chlorid-Ionen und eine Depolarisation und dadurch exzitatorische Wirkungen auf das postsynaptische Neuron.

Die von Gomez et al. notierten Symptome (Spastizität und erhöhter Muskeltonus) (Gomez et al. 2003b) könnten demnach, ebenso wie die von uns gemachten Beobachtungen (schlaffe Lähmung und verminderter Muskeltonus) auf eine verstärkte Aktivierung des GlyR zurückzuführen sein.

Diese Hypothese wird von Gomez et al. nicht unterstützt. Bei elektrophysiologischen Messungen von GlyT2^{-/-} Rückenmarkneuronen konnten Gomez et al. nachweisen, dass es zu einer reduzierten Amplitude von IPSP kommt, und eine Inhibition des GlyR durch Strychnin zu einer vollständigen Blockierung dieser inhibitorischen Potenziale führt (Gomez et al. 2003b). Diese Ergebnisse weisen also auf eine verminderte inhibi-

torische Glycin-vermittelte GlyR-Aktivierung hin und unterstützen die Theorie, dass der GlyT2 hauptsächlich für ein Wiederauffüllen der präsynaptischen Vesikel verantwortlich ist (Supplisson and Roux 2002). Die beobachteten Symptome der Spastizität und des erhöhten Muskeltonus sind demnach höchstwahrscheinlich durch eine verminderte Inhibition durch eine Verarmung der präsynaptischen Vesikel an Glycin zu erklären.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte einmalige intrathekale Applikation des GlyT2-Inhibitors ALX-1393 scheint nicht zu einer Verarmung der präsynaptischen Vesikel zu führen, da es zu lang andauernden und stark ausgeprägten antinozizeptiven Wirkungen und keinerlei pronozizeptiven Wirkungen oder einer erhöhten Spastizität und einem erhöhten Muskeltonus gekommen ist. Um die Frage zu klären, ob eine wiederholte Gabe von GlyT2-Inhibitoren zu pronozizeptiven Wirkungen (über eine Verarmung der präsynaptischen Vesikel) führt, wurde in der Studie von Morita et al. 6mal in 4-tägigen Abständen der GlyT2-Inhibitor Org-25543 i.v. verabreicht. Der antinozizeptive Effekt des GlyT2-Inhibitors nahm während des gesamten Versuchsablaufes nicht ab, und war durch Strychnin antagonisierbar (Morita et al. 2008). Somit kommt es also auch durch eine wiederholte Applikation des GlyT2-Inhibitors nicht zu einer Verarmung der präsynaptischen Vesikel an Glycin und dadurch zu einer verminderten glycinergen Neurotransmission.

Da die GlyT2 in den Zeiträumen zwischen den von Morita et al. (Morita et al. 2008) durchgeführten Applikationen jedoch möglicherweise die Vesikel wieder mit Glycin gefüllt haben könnten, wäre es interessant, die Wirkungen einer kontinuierlichen GlyT2-Inhibition zu untersuchen. Käme es, wie in der Studie von Gomeza et al (Gomeza et al. 2003b) zu Nebenwirkungen, die auf eine verminderte glycinerge Inhibition (Spastizität, erhöhter Muskeltonus und Tremor) hinweisen, dann wäre die physiologische Bedeutung der GlyT2, nämlich für eine Wiederauffüllung der präsynaptischen Vesikel zu sorgen, im lebenden, adulten Tier geklärt.

Es wird diskutiert, dass selektive GlyT2-Inhibitoren, die die Glycinkonzentration in der Nähe von inhibitorischen GlyR erhöhen, als potenzielle Muskelrelaxantien, Analgetika und Anästhetika therapeutisch zum Einsatz kommen könnten (Caulfield et al. 2001; Aragon and Lopez-Corcuera 2005). Die von uns beobachteten Wirkungen nach der intrathekalen Verabreichung von 100 µg ALX-1393 bestärken die Vermutung, dass

GlyT2-Inhibitoren in den oben genannten Indikationen von Bedeutung sein könnten: Neben der stark ausgeprägten antinozizeptiven Beeinflussung der mechanischen Allodynie und thermalen Hyperalgesie hatte der GlyT2-Inhibitor ALX-1393 in der hohen Konzentration darüber hinaus auch stark muskelrelaxierende und analgetische Wirkungen. Die Atemdepression war aller Wahrscheinlichkeit ebenfalls durch die starke Muskelrelaxation bedingt. Das Bewusstsein der Tiere war während der gesamten Untersuchung nicht erkennbar beeinträchtigt. Ob die analgetischen und muskelrelaxierenden Wirkungen von ALX-1393 therapeutisch z. B. während einer Spinal-Analgesie oder bei Erkrankungen, die mit einer Spastizität einhergehen genutzt werden können, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Beantwortung der im Abschnitt 1.4 formulierten Fragen wie folgt zu:

- Durch eine einmalige intrathekale Applikation der GlyT-Inhibitoren ALX-5407 und ALX-1393 kann das nozizeptive Verhalten von Ratten im Chronic Constriction Injury Modell für neuropathischen Schmerz signifikant beeinflusst werden.
- Es treten sowohl antinozizeptive als auch pronozizeptive Effekte auf. Die Hemmung des GlyT1 durch ALX-5407 zeigt in dieser Studie sowohl antinozizeptive (höchstwahrscheinlich GlyR-vermittelte), als auch pronozizeptive (höchstwahrscheinlich NMDAR-vermittelte) Wirkungen. Der GlyT2-Inhibitor ALX-1393 hat in dieser Studie ausschließlich antinozizeptive Wirkungen, die mit großer Wahrscheinlichkeit GlyR-vermittelt sind.
- Die Nozizeption der unverletzten, gesunden Pfote wird durch den GlyT1-Inhibitor ALX-5407 signifikant beeinflusst. In einer Dosierung von 50 µg treten pronozizeptive Wirkungen an der rechten Pfote auf.
- Ausschließlich nach der Verabreichung von 100 µg des GlyT2-Inhibitors ALX-1393 können zusätzliche neuromotorische Wirkungen beobachtet werden. Es kommt zu teils reversiblen, teils irreversiblen Paresen, Paralysen, Atemdepressionen und einer stark ausgeprägten Anästhesie.

Die vorliegende Studie zeigt erstmals den Einfluss von intrathekal verabreichten GlyT-Inhibitoren auf die Nozizeption von Ratten im Chronic Constriction Injury Modell für chronischen neuropathischen Schmerz. Die Tatsache, dass sowohl antinozizeptive und pronozizeptive Wirkungen als auch zusätzliche neuromotorische Wirkungen auftreten, zeigt eindrucksvoll die wichtige Rolle der GlyT bei der Feinabstimmung der Glycin-konzentration im synaptischen Spalt und bei der Verarbeitung schmerzhafter Reize bei chronischen neuropathischen Schmerzen.

In Folgestudien sollen nun die Effekte einer präemptiven, kontinuierlichen Applikation der beiden GlyT-Inhibitoren untersucht werden. Möglicherweise kann so, ähnlich wie durch die kontinuierliche Applikation von Glycin, die Ausprägung neuropathischer

Schmerzen reduziert oder verhindert werden. Die stark analgetischen Effekte des GlyT2-Inhibitors ALX-1393 könnten so vielleicht durch eine geringere Dosierung bei einer kontinuierlichen Applikation nebenwirkungsfrei erreicht werden. Auf der anderen Seite könnte eine langandauernde Hemmung des GlyT2, vergleichbar mit der Ausschaltung des GlyT2-Gens (Glyt2^{-/-} Knockout-Mäuse), aber auch zu einer Verarmung der präsynaptischen Vesikel an Glycin und dadurch zu einer verminderten glycinergen Inhibition führen.

Die beobachteten neuromotorischen Wirkungen nach Verabreichung des GlyT2-Inhibitors ALX-1393, insbesondere die stark ausgeprägte Anästhesie und die gute Muskelrelaxation (schlaffe Lähmung), weisen auf einen potenziellen Einsatz als Spinal-Analgetikum und als Muskelrelaxanz hin. In einer Folgestudie könnten hierzu z. B. Vergleiche mit gebräuchlichen Spinal-Analgetika stattfinden. Speziell könnte man sich hier mit der Frage beschäftigen, ob durch die intrathekale Applikation des GlyT2-Inhibitors ALX-1393 eine chirurgische Toleranz erreicht wird.

Während die antinozizeptiven Wirkungen des GlyT1-Inhibitors ALX-5407 höchstwahrscheinlich durch eine Aktivierung des GlyR bedingt sind, sind die pronozizeptiven Wirkungen aller Wahrscheinlichkeit nach durch eine Aktivierung des NMDAR zu erklären. Da bei der Behandlung neuropathischer Schmerzen eine Aktivierung der GlyR, bei der Schizophrenie-Behandlung bzw. einer NMDAR-Hypofunktion dagegen eine Aktivierung der NMDAR gewünscht ist, könnte der GlyT1-Inhibitor möglicherweise bei beiden Indikationen zum Einsatz kommen. Es wäre interessant, den GlyT1-Inhibitor ALX-5407 in einer Folgestudie in mehreren Dosierungen zu verabreichen und parallel hierzu die Erhöhung der Glycinkonzentration *in vivo* durch Mikrodialyse zu bestimmen. So könnten im Sinne einer Dosisfindung genauere Aussagen darüber gemacht werden, bei welcher Dosierung welche Rezeptoren stärker aktiviert werden.

Eine weitere Studie könnte sich mit verschiedenen Applikationsarten der GlyT-Inhibitoren beschäftigen. Dies ist sowohl im Sinne des Tierschutzes als auch im Hinblick auf einen möglichen klinischen Einsatz sinnvoll. Könnten die gewünschten Eigenschaften der GlyT-Inhibitoren auch durch eine intraperitoneale oder subkutane Applikation erreicht werden, dann wäre diese Applikationsart der intrathekalen Applikation, die mit einem großen technischen Aufwand und hohen Tierverlusten einhergeht, vorzuziehen.

5 Zusammenfassung

Ein wichtiger Faktor bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen ist ein Verlust der glycinergen Inhibition im Rückenmark. Hier ist Glycin der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter, hat aber, als obligater Koagonist von Glutamat am NMDA-Rezeptor, auch exzitatorische Wirkungen. Die Glycinkonzentration im synaptischen Spalt wird durch den Glycin-Transporter-1 und den Glycin-Transporter-2 reguliert. Über eine Hemmung der Glycin-Transporter kann die glycinerge Neurotransmission beeinflusst werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Frage zu klären, ob die intrathekal verabreichten Glycin-Transporter-Inhibitoren ALX-5407 und ALX-1393 über eine Erhöhung der Glycinkonzentration im synaptischen Spalt die Nozizeption von Ratten in einem Tier-Modell für neuropathischen Schmerz beeinflussen können. Da Glycin sowohl am inhibitorischen Glycin-Rezeptor, als auch am exzitatorischen NMDA-Rezeptor bindet, konnten gegensätzliche Wirkungen erwartet werden.

Als Modell für neuropathischen Schmerz diente das Chronic Constriction Injury Modell, bei dem es zehn bis zwölf Tage nach einer Schädigung des linken N. ischiadicus zur Ausprägung einer Allodynie und Hyperalgesie als messbare Charakteristika für neuropathischen Schmerz kommt. Ein intrathekaler PE10 Katheter wurde in den Wirbelkanal der Ratten eingeführt, um die beiden Glycin-Transporter-Inhibitoren (jeweils drei Dosierungen: 10, 50 und 100 µg gelöst in 10 µl 100%igem DMSO; n = 8) in die direkte Nähe des Dorsalhorns des Rückenmarks verabreichen zu können. Anschließend wurden über einen Zeitraum von 240 Minuten die mechanische Allodynie mithilfe eines von Frey-Filaments und die thermale Hyperalgesie mithilfe einer modifizierten Hargreaves Methode bestimmt.

Der Glycin-Transporter-1-Inhibitor ALX-5407 hatte dosisabhängig gegensätzliche Wirkungen auf die Nozizeption der Ratten: In der niedrigen und der hohen Dosierung konnten antinozizeptive Effekte, in der mittleren Konzentration pronozizeptive Effekte beobachtet werden. Die pronozizeptiven Effekte waren am deutlichsten an der gesunden Pfote zu erkennen. In keiner Dosierung traten erkennbare Nebenwirkungen auf. Der

Glycin-Transporter-2-Inhibitor ALX-1393 hatte ausschließlich in der hohen Dosierung stark antinozizeptive Effekte. In dieser Dosierung waren jedoch auch bei vier von acht Tieren neuromotorische Auffälligkeiten zu beobachten: Es kam zu teilweise vorübergehenden, teilweise permanenten schlaffen Lähmungen, einem herabgesetzten Muskeltonus, einer erschwerten Atmung und einer fehlenden Reaktion auf schmerzhafte Reize.

Die pronozizeptive Wirkung des Glycin-Transporter-1-Inhibitors ALX-5407 ist höchstwahrscheinlich durch eine verstärkte Aktivierung des exzitatorischen NMDA-Rezeptors zu erklären. Die antinozizeptiven Effekte der beiden Glycin-Transporter-Inhibitoren und die neuromotorischen Wirkungen des Glycin-Transporter-2-Inhibitors ALX-1393 sind höchstwahrscheinlich durch eine verstärkte Inhibition über den Glycin-Rezeptor vermittelt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Beeinflussung der Glycinkonzentration über die einmalige intrathekale Verabreichung spezifischer Glycin-Transporter-Inhibitoren *in vivo* eine Möglichkeit darstellt, die Ausprägung neuropathischer Schmerzen signifikant zu beeinflussen. Die Erforschung der glycinergen Neurotransmission mithilfe der Glycin-Transporter-Inhibitoren ALX-5407 und ALX-1393, könnte vielversprechend zur Entwicklung potenter und vielseitiger Medikamente beitragen. Neben der Behandlung von neuropathischen Schmerzen könnten diese möglicherweise auch als Muskelrelaxantien und als Analgetika sowie bei der Behandlung der Schizophrenie und bei kognitiven Erkrankungen zum Einsatz kommen.

6 Summary

Effects of intrathecally applied glycine transporter inhibitors ALX-5407 and ALX-1393 on the nociceptive behaviour of rats in the chronic constriction injury model of neuropathic pain

An important factor in the development and maintenance of neuropathic pain is a loss of glycinergic inhibition in the spinal cord. Here glycine is the major inhibitory neurotransmitter, but it also has excitatory functions as an obligate co-agonist of glutamate at the NMDA receptor. Glycine concentration in the synaptic cleft is controlled by glycine transporter 1 and glycine transporter 2. Inhibition of these two glycine transporters can influence glycinergic neurotransmission.

The goal of this study was to determine whether the intrathecal application of glycine transporter inhibitors ALX-5407 and ALX-1393, which would raise glycine levels in the synaptic cleft, can influence the nociception of rats. As glycine acts on both the inhibitory glycine receptor and the excitatory NMDA receptor, we expected to see differential effects.

Bennett and Xie's chronic constriction injury model was used as a model for neuropathic pain. Hyperalgesia and allodynia develop ten to twelve days after loose ligation of the left sciatic nerve and can be measured to quantify neuropathic pain. An intrathecal PE10 catheter was inserted into the vertebral canal to enable application of both glycine transporter inhibitors (three dosages respectively: 10, 50 and 100 µg dissolved in 10 µl 100 % DMSO; n = 8) in the vicinity of the dorsal horn of the spinal cord. Following the treatment, mechanical paw withdrawal threshold was measured using a von Frey-filament and thermal paw withdrawal latency was measured using a modified Hargreaves method. Both measurements were made for 240 minutes.

The glycine transporter 1 inhibitor ALX-5407 had dose dependent differential effects on the nociception of rats. Antinociceptive effects were obtained after application of the low and the high concentrations and pronociceptive effects were obtained after application of the intermediate concentration. The pronociceptive actions were most prominent

in the uninjured right paw. There were no side effects. The glycine transporter 2 inhibitor ALX-1393 exerted exclusively antinociceptive effects that were significant only after application of the high concentration. Additionally, at the high concentration, we observed severe neurological side effects in four of eight animals (pareses, paralysis, respiratory depression and analgesia).

The pronociceptive effects of glycine transporter 1 inhibitor ALX-5407 can be explained by an increased activation of NMDA receptor through unhampered spill over of synaptically released glycine. The antinociceptive effects of both glycine transporter inhibitors and the neurological side effects of the glycine transporter 2 inhibitor ALX-1393 are likely to be mediated by the glycine receptor.

This study shows, that neuropathic pain behaviour can be significantly influenced *in vivo* by manipulating glycine concentration through a singular intrathecal injection of specific glycine transporter inhibitors. The study of glycinergic neurotransmission with the aid of glycine transporter inhibitors promises future development of potent and versatile therapeutics. These may have potential to treat neuropathic pain, act as muscle relaxants and analgesics and also function as cognitive enhancers and treatments for schizophrenia.

7 Literaturverzeichnis

Adams RH, Sato K, Shimada S, Tohyama M, Puschel AW, Betz H. Gene structure and glial expression of the glycine transporter GlyT1 in embryonic and adult rodents. *J Neurosci* 1995;15(3 Pt 2):2524-2532.

Ahmadi S, Lippross S, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. *Nat Neurosci* 2002;5(1):34-40.

Ahmadi S, Muth-Selbach U, Lauterbach A, Lipfert P, Neuhuber WL, Zeilhofer HU. Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. *Science* 2003;300(5628):2094-2097.

Amir R, Devor M. Functional cross-excitation between afferent A- and C-neurons in dorsal root ganglia. *Neuroscience* 2000;95(1):189-195.

Applegarth DA, Toone JR. Glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinaemia): review and update. *J Inherit Metab Dis* 2004;27(3):417-422.

Applegarth DA, Toone JR. Glycine encephalopathy (nonketotic hyperglycinemia): comments and speculations. *Am J Med Genet A* 2006;140(2):186-188.

Aprison MH, Werman R. The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sci* 1965;4(21):2075-2083.

Aragon C, Lopez-Corcuera B. Structure, function and regulation of glycine neurotransporters. *Eur J Pharmacol* 2003;479(1-3):249-262.

Aragon C, Lopez-Corcuera B. Glycine transporters: crucial roles of pharmacological interest revealed by gene deletion. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26(6):283-286.

Aragon MC, Gimenez C. Efflux and exchange of glycine by synaptic plasma membrane vesicles derived from rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1986;855(2):257-264.

Arguis MJ, Perez J, Martinez G, Ubre M, Gomar C. Contralateral neuropathic pain following a surgical model of unilateral nerve injury in rats. *Reg Anesth Pain Med* 2008;33(3):211-216.

Atkinson BN, Bell SC, De Vivo M, Kowalski LR, Lechner SM, Ognyanov VI, Tham CS, Tsai C, Jia J, Ashton D, Klitenick MA. ALX 5407: a potent, selective inhibitor of the hGlyT1 glycine transporter. *Mol Pharmacol* 2001;60(6):1414-1420.

Aubrey KR, Vandenberg RJ. N[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]-sarcosine (NFPS) is a selective persistent inhibitor of glycine transport. *Br J Pharmacol* 2001;134(7):1429-1436.

Aubrey KR, Vandenberg RJ, Clements JD. Dynamics of forward and reverse transport by the glial glycine transporter, glyt1b. *Biophys J* 2005;89(3):1657-1668.

Backonja MM. Defining neuropathic pain. *Anesth Analg* 2003;97(3):785-790.

Backonja MM, Stacey B. Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. *J Pain* 2004;5(9):491-497.

Bardoni R, Torsney C, Tong CK, Prandini M, MacDermott AB. Presynaptic NMDA receptors modulate glutamate release from primary sensory neurons in rat spinal cord dorsal horn. *J Neurosci* 2004;24(11):2774-2781.

Baron R. [Neuropathic pain. The long path from mechanisms to mechanism-based treatment]. *Anaesthesist* 2000a;49(5):373-386.

Baron R. Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *Clin J Pain* 2000b;16(2 Suppl):S12-20.

Baron R, Levine JD, Fields HL. Causalgia and reflex sympathetic dystrophy: does the sympathetic nervous system contribute to the generation of pain? *Muscle Nerve* 1999;22(6):678-695.

Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain* 1991;47(3):359-367.

Becker DP, Young HF, Nulsen FE, Jane JA. Physiological effects of dimethyl sulfoxide on peripheral nerves: possible role in pain relief. *Exp Neurol* 1969;24(2):272-276.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33(1):87-107.

Berger AJ, Dieudonne S, Ascher P. Glycine uptake governs glycine site occupancy at NMDA receptors of excitatory synapses. *J Neurophysiol* 1998;80(6):3336-3340.

Bergeron R, Meyer TM, Coyle JT, Greene RW. Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(26):15730-15734.

Betz H. Ligand-gated ion channels in the brain: the amino acid receptor superfamily. *Neuron* 1990;5(4):383-392.

Bliss TV, Lomo T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 1973;232(2):331-356.

Blumberg H, Janig W. Activation of fibers via experimentally produced stump neuromas of skin nerves: ephaptic transmission or retrograde sprouting? *Exp Neurol* 1982;76(3):468-482.

Boehm J, Kang MG, Johnson RC, Esteban J, Huganir RL, Malinow R. Synaptic incorporation of AMPA receptors during LTP is controlled by a PKC phosphorylation site on GluR1. *Neuron* 2006;51(2):213-225.

Boivie J, Hansson P, Lindblom U. Touch, temperature and pain in health and disease: mechanisms and assessments. Seattle: IASP press, 1994.

Bouhassira D, Lanteri-Minet M, Attal N, Laurent B, Touboul C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 2007.

Bradaia A, Schlichter R, Trouslard J. Role of glial and neuronal glycine transporters in the control of glycinergic and glutamatergic synaptic transmission in lamina X of the rat spinal cord. *J Physiol* 2004;559(Pt 1):169-186.

Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 2006;10(4):287-333.

Bridges D, Thompson SW, Rice AS. Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth* 2001;87(1):12-26.

Budai D, Wilcox GL, Larson AA. Enhancement of NMDA-evoked neuronal activity by glycine in the rat spinal cord in vivo. *Neurosci Lett* 1992;135(2):265-268.

Caulfield WL, Collie IT, Dickins RS, Epemolu O, McGuire R, Hill DR, McVey G, Morphy JR, Rankovic Z, Sundaram H. The first potent and selective inhibitors of the glycine transporter type 2. *J Med Chem* 2001;44(17):2679-2682.

Chen L, Muhlhauser M, Yang CR. Glycine transporter-1 blockade potentiates NMDA-mediated responses in rat prefrontal cortical neurons in vitro and in vivo. *J Neurophysiol* 2003;89(2):691-703.

Chen NH, Reith ME, Quick MW. Synaptic uptake and beyond: the sodium- and chloride-dependent neurotransmitter transporter family SLC6. *Pflugers Arch* 2004;447(5):519-531.

Cheng JK, Chiou LC. Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin. *J Pharmacol Sci* 2006;100(5):471-486.

Chery N, de Koninck Y. Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 1999;19(17):7342-7355.

Clatworthy AL, Illich PA, Castro GA, Walters ET. Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 1995;184(1):5-8.

Collingridge GL, Singer W. Excitatory amino acid receptors and synaptic plasticity. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11(7):290-296.

Colucci M, Maione F, Bonito MC, Piscopo A, Di Giannuario A, Pieretti S. New insights of dimethyl sulfoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. *Pharmacol Res* 2008;57(6):419-425.

Cordero-Erausquin M, Coull JA, Boudreau D, Rolland M, De Koninck Y. Differential maturation of GABA action and anion reversal potential in spinal lamina I neurons: impact of chloride extrusion capacity. *J Neurosci* 2005;25(42):9613-9623.

Costigan M, Woolf CJ. Pain: molecular mechanisms. *J Pain* 2000;1(3 Suppl):35-44.

Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 2005;438(7070):1017-1021.

Coull JA, Boudreau D, Bachand K, Prescott SA, Nault F, Sik A, De Koninck P, De Koninck Y. Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 2003;424(6951):938-942.

Cousins MJ, Brennan F, Carr DB. Pain relief: a universal human right. *Pain* 2004;112(1-2):1-4.

Coyle JT, Tsai G, Goff D. Converging evidence of NMDA receptor hypofunction in the pathophysiology of schizophrenia. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1003:318-327.

Cubelos B, Gimenez C, Zafra F. Localization of the GLYT1 glycine transporter at glutamatergic synapses in the rat brain. *Cereb Cortex* 2005;15(4):448-459.

Curtis DR, Watkins JC. The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* 1960;6:117-141.

Danysz W, Parsons AC. Glycine and N-methyl-D-aspartate receptors: physiological significance and possible therapeutic applications. *Pharmacol Rev* 1998;50(4):597-664.

Davies M, Brophy S, Williams R, Taylor A. The prevalence, severity, and impact of painful diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29(7):1518-1522.

Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000;87(2):149-158.

Dib-Hajj SD, Fjell J, Cummins TR, Zheng Z, Fried K, LaMotte R, Black JA, Waxman SG. Plasticity of sodium channel expression in DRG neurons in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 1999;83(3):591-600.

Dickenson AH. A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics. *Trends Pharmacol Sci* 1990;11(8):307-309.

Dobos I, Toth K, Kekesi G, Joo G, Csullog E, Klimscha W, Benedek G, Horvath G. The significance of intrathecal catheter location in rats. *Anesth Analg* 2003;96(2):487-492, table of contents.

Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Levi S, Isambert MF, Henry JP, Triller A, Gasnier B. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci* 1999;112 (Pt 6):811-823.

Dworkin RH. An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. *Clin J Pain* 2002;18(6):343-349.

Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M, Farrar JT, Finnerup NB, Jensen TS, Kalso EA, Loeser JD, Miaskowski C, Nurmikko TJ, Portenoy RK, Rice AS, Stacey BR, Treede RD, Turk DC, Wallace MS. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 2007;132(3):237-251.

Echeverry S, Shi XQ, Zhang J. Characterization of cell proliferation in rat spinal cord following peripheral nerve injury and the relationship with neuropathic pain. *Pain* 2008;135(1-2):37-47.

Eulenburg V, Arnsen W, Betz H, Gomeza J. Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem Sci* 2005;30(6):325-333.

Eulenburg V, Becker K, Gomeza J, Schmitt B, Becker CM, Betz H. Mutations within the human GLYT2 (SLC6A5) gene associated with hyperekplexia. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;348(2):400-405.

Evans MS, Reid KH, Sharp JB, Jr. Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. *Neurosci Lett* 1993;150(2):145-148.

FELASA. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) Working Group on Pain and Distress accepted by the FELASA Board of Management November 1992. *Lab Anim* 1994;28(2):97-112.

Fossum EN, Lisowski MJ, Macey TA, Ingram SL, Morgan MM. Microinjection of the vehicle dimethyl sulfoxide (DMSO) into the periaqueductal gray modulates morphine antinociception. *Brain Res* 2008;1204:53-58.

French E, VandeWoude S, Granowski J, Maul D. Assessment of Pain in Laboratory animals. 2000 National AALAS meeting.

Frey von M. Ueber den Gebrauch von Reizhaaren. In: Untersuchungen über die Sinnesfunctionen der menschlichen Haut. Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz. 1896;208-217.

Gabernet L, Pauly-Evers M, Schwerdel C, Lentz M, Bluethmann H, Vogt K, Alberati D, Mohler H, Boison D. Enhancement of the NMDA receptor function by reduction of glycine transporter-1 expression. *Neurosci Lett* 2005;373(1):79-84.

Gomez J, Hulsmann S, Ohno K, Eulenburg V, Szoke K, Richter D, Betz H. Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron* 2003a;40(4):785-796.

Gomez J, Ohno K, Hulsmann S, Armsen W, Eulenburg V, Richter DW, Laube B, Betz H. Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperreflexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron* 2003b;40(4):797-806.

Graham D, Pfeiffer F, Betz H. Photoaffinity-labelling of the glycine receptor of rat spinal cord. *Eur J Biochem* 1983;131(3):519-525.

Gu Y, Huang LY. Gabapentin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor mediated currents in rat GABAergic dorsal horn neurons. *Neurosci Lett* 2002;324(3):177-180.

Guo W, Zou S, Guan Y, Ikeda T, Tal M, Dubner R, Ren K. 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.

Gurtovenko AA, Anwar J. Ion transport through chemically induced pores in protein-free phospholipid membranes. *J Phys Chem B* 2007;111(47):13379-13382.

Hansson P. Neuropathic pain: clinical characteristics and diagnostic workup. *Eur J Pain* 2002;6 Suppl A:47-50.

Hansson PT, Dickenson AH. Pharmacological treatment of peripheral neuropathic pain conditions based on shared commonalities despite multiple etiologies. *Pain* 2005;113(3):251-254.

Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988;32(1):77-88.

Harvey RJ, Depner UB, Wassle H, Ahmadi S, Heindl C, Reinold H, Smart TG, Harvey K, Schutz B, Abo-Salem OM, Zimmer A, Poisbeau P, Welzl H, Wolfer DP, Betz H, Zeilhofer HU, Muller U. GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE2-mediated inflammatory pain sensitization. *Science* 2004;304(5672):884-887.

Harvey RJ, Topf M, Harvey K, Rees MI. The genetics of hyperekplexia: more than startle! *Trends Genet* 2008;24(9):439-447.

Herdon HJ, Godfrey FM, Brown AM, Coulton S, Evans JR, Cairns WJ. Pharmacological assessment of the role of the glycine transporter GlyT-1 in mediating high-affinity glycine uptake by rat cerebral cortex and cerebellum synaptosomes. *Neuropharmacology* 2001;41(1):88-96.

Hermanns H, Muth-Selbach U, Williams R, Krug S, Lipfert P, Werdehausen R, Braun S, Bauer I. Differential effects of spinally applied glycine transporter inhibitors on nociception in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2008a;445(3):214-219.

Hermanns H, Muth-Selbach U, Williams R, Krug S, Lipfert P, Freynhagen R, Bauer I. Hemmung von Glycintransportern: Ein neuer analgetischer Mechanismus bei neuropathischem Schmerz? *Deutscher Anästhesie Congress* 2008b.

Ho KK, Appell KC, Baldwin JJ, Bohnstedt AC, Dong G, Guo T, Horlick R, Islam KR, Kultgen SG, Masterson CM, McDonald E, McMillan K, Morphy JR, Rankovic Z, Sundaram H, Webb M. 2-(Aminomethyl)-benzamide-based glycine transporter type-2 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14(2):545-548.

Hogan Q. Animal pain models. *Reg Anesth Pain Med* 2002;27(4):385-401.

Hosl K, Reinold H, Harvey RJ, Muller U, Narumiya S, Zeilhofer HU. Spinal prostaglandin E receptors of the EP2 subtype and the glycine receptor alpha3 subunit, which mediate central inflammatory hyperalgesia, do not contribute to pain after peripheral nerve injury or formalin injection. *Pain* 2006;126(1-3):46-53.

Hu P, Bembrick AL, Keay KA, McLachlan EM. Immune cell involvement in dorsal root ganglia and spinal cord after chronic constriction or transection of the rat sciatic nerve. *Brain Behav Immun* 2007;21(5):599-616.

Huang W, Simpson RK. Long-term intrathecal administration of glycine prevents mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurol Res* 2000;22(2):160-164.

Hubel R, Stromberg M. *Anatomy and embryology of the laboratory rat*: BioMed Verlag, 1986.

Iversen L. Neurotransmitter transporters and their impact on the development of psychopharmacology. *Br J Pharmacol* 2006;147 Suppl 1:S82-88.

Javitt DC. Glycine transport inhibitors and the treatment of schizophrenia. *Biol Psychiatry* 2008;63(1):6-8.

Jensen MP, Chodroff MJ, Dworkin RH. The impact of neuropathic pain on health-related quality of life: review and implications. *Neurology* 2007;68(15):1178-1182.

Jeong HJ, Jang IS, Moorhouse AJ, Akaike N. Activation of presynaptic glycine receptors facilitates glycine release from presynaptic terminals synapsing onto rat spinal sacral dorsal commissural nucleus neurons. *J Physiol* 2003;550(Pt 2):373-383.

Jergova S, Cizkova D. Microglial activation in different models of peripheral nerve injury of the rat. *J Mol Histol* 2007;38(3):245-251.

Johnson JW, Ascher P. Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 1987;325(6104):529-531.

Johnston GA, Iversen LL. Glycine uptake in rat central nervous system slices and homogenates: evidence for different uptake systems in spinal cord and cerebral cortex. *J Neurochem* 1971;18(10):1951-1961.

Jonas P, Bischofberger J, Sandkuhler J. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 1998;281(5375):419-424.

Jones E, Vinuela-Fernandez I, Eager RA, Delaney A, Anderson H, Patel A, Robertson DC, Allchorne A, Sirinathsinghji EC, Milne EM, MacIntyre N, Shaw DJ, Waran NK, Mayhew J, Fleetwood-Walker SM. Neuropathic changes in equine laminitis pain. *Pain* 2007;132(3):321-331.

Jones MV, Westbrook GL. The impact of receptor desensitization on fast synaptic transmission. *Trends Neurosci* 1996;19(3):96-101.

Jursky F, Nelson N. Localization of glycine neurotransmitter transporter (GLYT2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor. *J Neurochem* 1995;64(3):1026-1033.

Jursky F, Nelson N. Developmental expression of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in mouse brain. *J Neurochem* 1996;67(1):336-344.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Spinal Reflexes. In: *Principles of Neuronal Sciences*. 2000;713-736.

Kato G, Yasaka T, Katafuchi T, Furue H, Mizuno M, Iwamoto Y, Yoshimura M. Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats. *J Neurosci* 2006;26(6):1787-1794.

Kawamata M, Omote K. Involvement of increased excitatory amino acids and intracellular Ca²⁺ concentration in the spinal dorsal horn in an animal model of neuropathic pain. *Pain* 1996;68(1):85-96.

Keller AF, Beggs S, Salter MW, De Koninck Y. Transformation of the output of spinal lamina I neurons after nerve injury and microglia stimulation underlying neuropathic pain. *Mol Pain* 2007;3:27.

Kemp JA, McKernan RM. NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci* 2002;5 Suppl:1039-1042.

Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 1992;50(3):355-363.

Kinney GG, Sur C, Burno M, Mallorga PJ, Williams JB, Figueroa DJ, Wittmann M, Lemaire W, Conn PJ. The glycine transporter type 1 inhibitor N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sarcosine potentiates NMDA receptor-mediated responses in vivo and produces an antipsychotic profile in rodent behavior. *J Neurosci* 2003;23(20):7586-7591.

Kleckner NW, Dingledine R. Requirement for glycine in activation of NMDA-receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Science* 1988;241(4867):835-837.

Kubota K, Fujibayashi K, Saito K. Enhancing effect of dimethyl sulfoxide on nociceptive transmission in isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Pharmacol* 1998;351(2):173-179.

Larson AA, Beitz AJ. Glycine potentiates strychnine-induced convulsions: role of NMDA receptors. *J Neurosci* 1988;8(10):3822-3826.

Lechner. Novel glycine transporter 2 inhibitors are analgesic in a rat model of inflammatory pain. *Soc Neurosci Abs* 2000;26 (1-2).

Lechner SM. Glutamate-based therapeutic approaches: inhibitors of glycine transport. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6(1):75-81.

Legendre P. The glycinergic inhibitory synapse. *Cell Mol Life Sci* 2001;58(5-6):760-793.

Li P, Kerchner GA, Sala C, Wei F, Huettner JE, Sheng M, Zhuo M. AMPA receptor-PDZ interactions in facilitation of spinal sensory synapses. *Nat Neurosci* 1999;2(11):972-977.

Li Y, Wu LJ, Legendre P, Xu TL. Asymmetric cross-inhibition between GABA_A and glycine receptors in rat spinal dorsal horn neurons. *J Biol Chem* 2003;278(40):38637-38645.

Lim R, Hoang P, Berger AJ. Blockade of glycine transporter-1 (GLYT-1) potentiates NMDA receptor-mediated synaptic transmission in hypoglossal motoneurons. *J Neurophysiol* 2004;92(4):2530-2537.

Lipina T, Labrie V, Weiner I, Roder J. Modulators of the glycine site on NMDA receptors, D-serine and ALX 5407, display similar beneficial effects to clozapine in mouse models of schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl)* 2005;179(1):54-67.

Liu H, Mantyh PW, Basbaum AI. NMDA-receptor regulation of substance P release from primary afferent nociceptors. *Nature* 1997;386(6626):721-724.

Liu H, Wang H, Sheng M, Jan LY, Jan YN, Basbaum AI. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptors in the spinal cord dorsal horn. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(18):8383-8387.

Liu QR, Lopez-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N. Cloning and expression of a spinal cord- and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem* 1993;268(30):22802-22808.

Löscher W, Ungemach FR, Kroker R., *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 2000.

Lopez-Corcuera B, Geerlings A, Aragon C. Glycine neurotransmitter transporters: an update. *Mol Membr Biol* 2001;18(1):13-20.

Lopez-Corcuera B, Martinez-Maza R, Nunez E, Roux M, Supplisson S, Aragon C. Differential properties of two stably expressed brain-specific glycine transporters. *J Neurochem* 1998;71(5):2211-2219.

Lu C, Mattson MP. Dimethyl sulfoxide suppresses NMDA- and AMPA-induced ion currents and calcium influx and protects against excitotoxic death in hippocampal neurons. *Exp Neurol* 2001;170(1):180-185.

Lu T, Rubio ME, Trussell LO. Glycinergic transmission shaped by the corelease of GABA in a mammalian auditory synapse. *Neuron* 2008;57(4):524-535.

Lu Y, Perl ER. A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 2003;23(25):8752-8758.

Luccini E, Raiteri L. Mechanisms of [(3)H]glycine release from mouse spinal cord synaptosomes selectively labeled through GLYT2 transporters. *J Neurochem* 2007;103(6):2439-2448.

Maag R, Stengel M, Baron R. Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen. *Diabetologie* 2006(2):104-113.

Mahendrasingam S, Wallam CA, Hackney CM. An immunogold investigation of the relationship between the amino acids GABA and glycine and their transporters in terminals in the guinea-pig anteroventral cochlear nucleus. *Brain Res* 2000;887(2):477-481.

Malkmus SA, Yaksh TL. Intrathecal catheterization and drug delivery in the rat. *Methods Mol Med* 2004;99:109-121.

Mallorga PJ, Williams JB, Jacobson M, Marques R, Chaudhary A, Conn PJ, Pettibone DJ, Sur C. Pharmacology and expression analysis of glycine transporter GlyT1 with [3H]-(N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'phenylphenoxy)propyl])sarcosine. *Neuropharmacology* 2003;45(5):585-593.

Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 2005;6(7):521-532.

Martina M, Gorfinkel Y, Halman S, Lowe JA, Periyalwar P, Schmidt CJ, Bergeron R. Glycine transporter type 1 blockade changes NMDA receptor-mediated responses and LTP in hippocampal CA1 pyramidal cells by altering extracellular glycine levels. *J Physiol* 2004;557(Pt 2):489-500.

Mayer ML, Westbrook GL, Guthrie PB. Voltage-dependent block by Mg²⁺ of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature* 1984;309(5965):261-263.

Melzack R, Wall PD. Pain mechanisms: a new theory. *Science* 1965;150(699):971-979.

Mendell LM, Wall PD. Responses Of Single Dorsal Cord Cells To Peripheral Cutaneous Unmyelinated Fibres. *Nature* 1965;206:97-99.

Merskey H, Bogduk N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 1994;2 nd.

Millan MJ. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 1999;57(1):1-164.

Millan MJ. N-methyl-D-aspartate receptor-coupled glycineB receptors in the pathogenesis and treatment of schizophrenia: a critical review. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2002;1(2):191-213.

Mogil JS, Cramer SE. What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 2004;112(1-2):12-15.

Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 2002;22(15):6724-6731.

Morita K, Motoyama N, Kitayama T, Morioka N, Kifune K, Dohi T. Spinal Anti-Allodynia Action of Glycine Transporter Inhibitors in Neuropathic Pain Models in Mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2008.

Muller F, Heinke B, Sandkuhler J. Reduction of glycine receptor-mediated miniature inhibitory postsynaptic currents in rat spinal lamina I neurons after peripheral inflammation. *Neuroscience* 2003;122(3):799-805.

Muth-Selbach U, Dbek E, Kollosche K, Stegmann J-U, Holthusen H, Lipfert P, Zeilhofer H-U. The Spinal Antinociceptive Effect of Nocistatin in Neuropathic Rats Is Blocked by D-Serine. *Anesthesiology* 2004;101(3):753-758.

Nakamura S, Myers RR. Myelinated afferents sprout into lamina II of L3-5 dorsal horn following chronic constriction nerve injury in rats. *Brain Res* 1999;818(2):285-290.

Narikawa K, Furue H, Kumamoto E, Yoshimura M. In vivo patch-clamp analysis of IPSCs evoked in rat substantia gelatinosa neurons by cutaneous mechanical stimulation. *J Neurophysiol* 2000;84(4):2171-2174.

Nelson N. The family of Na⁺/Cl⁻ neurotransmitter transporters. *J Neurochem* 1998;71(5):1785-1803.

Nong Y, Huang YQ, Ju W, Kalia LV, Ahmadian G, Wang YT, Salter MW. Glycine binding primes NMDA receptor internalization. *Nature* 2003;422(6929):302-307.

Nowak L, Bregestovski P, Ascher P, Herbet A, Prochiantz A. Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 1984;307(5950):462-465.

Nuytten D, Kupers R, Lammens M, Dom R, Van Hees J, Gybels J. Further evidence for myelinated as well as unmyelinated fibre damage in a rat model of neuropathic pain. *Exp Brain Res* 1992;91(1):73-78.

O'Hagan BJ. Neuropathic pain in a cat post-amputation. *Aust Vet J* 2006;84(3):83-86.

Olney JW. Glutamate-induced retinal degeneration in neonatal mice. Electron microscopy of the acutely evolving lesion. *J Neuropathol Exp Neurol* 1969;28(3):455-474.

Payne JA, Rivera C, Voipio J, Kaila K. Cation-chloride co-transporters in neuronal communication, development and trauma. *Trends Neurosci* 2003;26(4):199-206.

Perry KW, Falcone JF, Fell MJ, Ryder JW, Yu H, Love PL, Katner J, Gordon KD, Wade MR, Man T, Nomikos GG, Phebus LA, Cauvin AJ, Johnson KW, Jones CK, Hoffmann BJ, Sandusky GE, Walter MW, Porter WJ, Yang L, Merchant KM, Shannon HE, Svensson KA. Neurochemical and behavioral profiling of the selective GlyT1 inhibitors ALX5407 and LY2365109 indicate a preferential action in caudal vs. cortical brain areas. *Neuropharmacology* 2008;55(5):743-754.

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.

Polgar E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ. Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain* 2004;111(1-2):144-150.

Polgar E, Hughes DI, Riddell JS, Maxwell DJ, Puskar Z, Todd AJ. Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Pain* 2003;104(1-2):229-239.

Poon YY, Chang AY, Ko SF, Chan SH. An improved procedure for catheterization of the thoracic spinal subarachnoid space in the rat. *Anesth Analg* 2005;101(1):155-160, table of contents.

Poyatos I, Ponce J, Aragon C, Gimenez C, Zafra F. The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;49(1-2):63-70.

Prescott SA, Sejnowski TJ, De Koninck Y. Reduction of anion reversal potential subverts the inhibitory control of firing rate in spinal lamina I neurons: towards a biophysical basis for neuropathic pain. *Mol Pain* 2006;2:32.

Raiteri L, Raiteri M, Bonanno G. Glycine is taken up through GLYT1 and GLYT2 transporters into mouse spinal cord axon terminals and causes vesicular and carrier-mediated release of its proposed co-transmitter GABA. *J Neurochem* 2001;76(6):1823-1832.

Raiteri L, Stigliani S, Siri A, Passalacqua M, Melloni E, Raiteri M, Bonanno G. Glycine taken up through GLYT1 and GLYT2 heterotransporters into glutamatergic axon terminals of mouse spinal cord elicits release of glutamate by homotransporter reversal and through anion channels. *Biochem Pharmacol* 2005;69(1):159-168.

Raiteri L, Stigliani S, Usai C, Diaspro A, Paluzzi S, Milanese M, Raiteri M, Bonanno G. Functional expression of release-regulating glycine transporters GLYT1 on GABAergic neurons and GLYT2 on astrocytes in mouse spinal cord. *Neurochem Int* 2008;52(1-2):103-112.

Rees MI, Harvey K, Pearce BR, Chung SK, Duguid IC, Thomas P, Beatty S, Graham GE, Armstrong L, Shiang R, Abbott KJ, Zuberi SM, Stephenson JB, Owen MJ, Tijssen MA, van den Maagdenberg AM, Smart TG, Supplisson S, Harvey RJ. Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nat Genet* 2006;38(7):801-806.

Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M, Kaila K. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 1999;397(6716):251-255.

Rivera C, Voipio J, Thomas-Crusells J, Li H, Emri Z, Sipila S, Payne JA, Minichiello L, Saarma M, Kaila K. Mechanism of activity-dependent downregulation of the neuron-specific K-Cl cotransporter KCC2. *J Neurosci* 2004;24(19):4683-4691.

Rog DJ, Nurmikko TJ, Friede T, Young CA. Validation and reliability of the Neuropathic Pain Scale (NPS) in multiple sclerosis. *Clin J Pain* 2007;23(6):473-481.

Roughan JV, Flecknell PA. Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. *Pain* 2001;90(1-2):65-74.

Roughan JV, Flecknell PA. Behaviour-based assessment of the duration of laparotomy-induced abdominal pain and the analgesic effects of carprofen and buprenorphine in rats. *Behav Pharmacol* 2004;15(7):461-472.

Rousseau F, Aubrey KR, Supplisson S. The glycine transporter GlyT2 controls the dynamics of synaptic vesicle refilling in inhibitory spinal cord neurons. *J Neurosci* 2008;28(39):9755-9768.

Roux MJ, Supplisson S. Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron* 2000;25(2):373-383.

Rusbridge C, Jeffery ND. Pathophysiology and treatment of neuropathic pain associated with syringomyelia. *Vet J* 2008;175(2):164-172.

Russel WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*, 1959.

Sakata K, Sato K, Schloss P, Betz H, Shimada S, Tohyama M. Characterization of glycine release mediated by glycine transporter 1 stably expressed in HEK-293 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;49(1-2):89-94.

Sato K, Yoshida S, Fujiwara K, Tada K, Tohyama M. Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Res* 1991;567(1):64-70.

Satoh O, Omote K. Roles of monoaminergic, glycinergic and GABAergic inhibitory systems in the spinal cord in rats with peripheral mononeuropathy. *Brain Res* 1996;728(1):27-36.

Schaible HG. [Pathophysiology of pain]. *Orthopade* 2007;36(1):8, 10-12, 14-16.

Schmader KE. Epidemiology and impact on quality of life of postherpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. *Clin J Pain* 2002;18(6):350-354.

Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43(2):205-218.

Shenker NG, Haigh RC, Mapp PI, Harris N, Blake DR. Contralateral hyperalgesia and allodynia following intradermal capsaicin injection in man. *Rheumatology (Oxford)* 2008;47(9):1417-1421.

Simpson RK, Jr., Gondo M, Robertson CS, Goodman JC. The influence of glycine and related compounds on spinal cord injury-induced spasticity. *Neurochem Res* 1995;20(10):1203-1210.

Simpson RK, Jr., Gondo M, Robertson CS, Goodman JC. Reduction in the mechanonociceptive response by intrathecal administration of glycine and related compounds. *Neurochem Res* 1996;21(10):1221-1226.

Simpson RK, Jr., Gondo M, Robertson CS, Goodman JC. Reduction in thermal hyperalgesia by intrathecal administration of glycine and related compounds. *Neurochem Res* 1997;22(1):75-79.

Simpson RK, Jr., Robertson CS, Goodman JC. Glycine: an important potential component of spinal shock. *Neurochem Res* 1993;18(8):887-892.

Singer P, Feldon J, Yee BK. The glycine transporter 1 inhibitor SSR504734 enhances working memory performance in a continuous delayed alternation task in C57BL/6 mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2008.

Sivilotti L, Woolf CJ. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol* 1994;72(1):169-179.

Smith KE, Borden LA, Hartig PR, Branchek T, Weinshank RL. Cloning and expression of a glycine transporter reveal colocalization with NMDA receptors. *Neuron* 1992;8(5):927-935.

Sommer C. Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2003;16(5):623-628.

Spike RC, Watt C, Zafra F, Todd AJ. An ultrastructural study of the glycine transporter GLYT2 and its association with glycine in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 1997;77(2):543-551.

Stahl SM. Novel therapeutics for schizophrenia: targeting glycine modulation of NMDA glutamate receptors. *CNS Spectr* 2007;12(6):423-427.

Supplisson S, Bergman C. Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes. *J Neurosci* 1997;17(12):4580-4590.

Supplisson S, Roux MJ. Why glycine transporters have different stoichiometries. *FEBS Lett* 2002;529(1):93-101.

Suzuki R, Dickenson AH. Neuropathic pain: nerves bursting with excitement. *Neuroreport* 2000;11(12):R17-21.

Tanabe M, Takasu K, Yamaguchi S, Kodama D, Ono H. Glycine transporter inhibitors as a potential therapeutic strategy for chronic pain with memory impairment. *Anesthesiology* 2008;108(5):929-937.

Titmus MJ, Korn H, Faber DS. Diffusion, not uptake, limits glycine concentration in the synaptic cleft. *J Neurophysiol* 1996;75(4):1738-1752.

Torrance N, Smith BH, Bennett MI, Lee AJ. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain* 2006;7(4):281-289.

Tracey DJ, Walker JS. Pain due to nerve damage: are inflammatory mediators involved? *Inflamm Res* 1995;44(10):407-411.

Tsai G, Ralph-Williams RJ, Martina M, Bergeron R, Berger-Sweeney J, Dunham KS, Jiang Z, Caine SB, Coyle JT. Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(22):8485-8490.

Tsang BK, He Z, Ma T, Ho IK, Eichhorn JH. Decreased paralysis and better motor coordination with microspinal versus PE10 intrathecal catheters in pain study rats. *Anesth Analg* 1997;84(3):591-594.

Tsuda M, Inoue K, Salter MW. Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci* 2005;28(2):101-107.

Turecek R, Trussell LO. Presynaptic glycine receptors enhance transmitter release at a mammalian central synapse. *Nature* 2001;411(6837):587-590.

Vignes R. Dimethyl Sulfoxide. A "new" clean, unique, superior solvent. American Chemical Society Annual Meeting. 2000.

Wall PD, Gutnick M. Properties of afferent nerve impulses originating from a neuroma. *Nature* 1974;248(5451):740-743.

Wasner G, Baron R. [Sympathetic nervous system and pain--some open questions]. *Schmerz* 1998;12(4):276-281.

Watkins LR, Milligan ED, Maier SF. Glial activation: a driving force for pathological pain. *Trends Neurosci* 2001;24(8):450-455.

Whitehead KJ, Pearce SM, Walker G, Sundaram H, Hill D, Bowery NG. Positive N-methyl-D-aspartate receptor modulation by selective glycine transporter-1 inhibition in the rat dorsal spinal cord in vivo. *Neuroscience* 2004;126(2):381-390.

Wojcik SM, Katsurabayashi S, Guillemin I, Friauf E, Rosenmund C, Brose N, Rhee JS. A shared vesicular carrier allows synaptic corelease of GABA and glycine. *Neuron* 2006;50(4):575-587.

Wolin RL, Santillan A, Jr., Barclay T, Tang L, Venkatesan H, Wilson S, Lee DH, Lovenberg TW. Novel glycine transporter type-2 reuptake inhibitors. Part 2: beta- and gamma-amino acid derivatives. *Bioorg Med Chem* 2004a;12(16):4493-4509.

Wolin RL, Venkatesan H, Tang L, Santillan A, Jr., Barclay T, Wilson S, Lee DH, Lovenberg TW. Novel glycine transporter type-2 reuptake inhibitors. Part 1: alpha-amino acid derivatives. *Bioorg Med Chem* 2004b;12(16):4477-4492.

Woolf CJ, Bennett GJ, Doherty M, Dubner R, Kidd B, Koltzenburg M, Lipton R, Loeser JD, Payne R, Torebjork E. Towards a mechanism-based classification of pain? *Pain* 1998;77(3):227-229.

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE. Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 1992;355(6355):75-78.

Xu TX, Gong N, Xu TL. Inhibitors of GlyT1 and GlyT2 differentially modulate inhibitory transmission. *Neuroreport* 2005;16(11):1227-1231.

Yaksh TL, Jang JD, Nishiuchi Y, Braun KP, Ro SG, Goodman M. The utility of 2-hydroxypropyl-beta-cyclodextrin as a vehicle for the intracerebral and intrathecal administration of drugs. *Life Sci* 1991;48(7):623-633.

Yaksh TL, Rudy TA. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 1976;17(6):1031-1036.

Zafra F, Aragon C, Olivares L, Danbolt NC, Gimenez C, Storm-Mathisen J. Glycine transporters are differentially expressed among CNS cells. *J Neurosci* 1995a;15(5 Pt 2):3952-3969.

Zafra F, Gomeza J, Olivares L, Aragon C, Gimenez C. Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS. *Eur J Neurosci* 1995b;7(6):1342-1352.

Zeilhofer HU. The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci* 2005;62(18):2027-2035.

Zhang Y, Laster MJ, Hara K, Harris RA, Eger EI, 2nd, Stabernack CR, Sonner JM. Glycine receptors mediate part of the immobility produced by inhaled anesthetics. *Anesth Analg* 2003;96(1):97-101, table of contents.

Zhou HY, Zhang HM, Chen SR, Pan HL. Increased C-fiber nociceptive input potentiates inhibitory glycinergic transmission in the spinal dorsal horn. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;324(3):1000-1010.

Zhou L, Chillag KL, Nigro MA. Hyperekplexia: a treatable neurogenetic disease. *Brain Dev* 2002;24(7):669-674.

Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16(2):109-110.

Zou X, Lin Q, Willis WD. Enhanced phosphorylation of NMDA receptor 1 subunits in spinal cord dorsal horn and spinothalamic tract neurons after intradermal injection of capsaicin in rats. *J Neurosci* 2000;20(18):6989-6997.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AMPAR	AMPA Rezeptor
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CaMKII	Calcium-Calmodulin abhängige Proteinkinase II
CCI	Chronic Constriction Injury
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Half maximal effective concentration
EP2	Prostaglandin-E2 Rezeptor
EPSP	Exzitatorisches Postsynaptisches Potenzial
EFIC	European Federation of IASP Chapters
FELASA	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
[Gly]	Glycin Konzentration
GlyT	Glycin-Transporter
GlyT1	Glycin-Transporter-1
GlyT2	Glycin-Transporter-2
GlyR	Glycin Rezeptor
HBC	2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin
HCl	Salzsäure

IASP	International Association for the Study of Pain
i.p.	Intraperitoneal
IPSP	Inhibitorisches Postsynaptisches Potenzial
i.t.	Intrathekal
KCC2	Kalium-Chlorid-Kotransporter-2
KG	Körpergewicht
LTP	Long Term Potentiation
NaCl	Natriumchlorid
NFPS	N[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4`phenylphenoxy)propyl]Sarkosin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	NMDA Rezeptor
OP	Operation
p	Signifikanz
PGE	Prostaglandin E
PKC	Protein Kinase C
PWL	Paw Withdrawal Latency. Die Pfotenrückzugs-Latenzzeit in sec
PWT	Paw Withdrawal Threshold. Der Pfotenrückzugs-Schwellenwert in g
SEM	Standard Error of Mean (Standardfehler des Mittelwerts)
TrkB	Tropomyosin-related Kinase B Rezeptor
VIAAT	Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter
vs.	versus
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

8.2 Pain Score für Ratten im Chronic Constriction Injury Modell

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	...	Tag 12
Punkte Körpergewicht						
0: 0 % Abnahme bzw. Gewichtszunahme						
1: 0-10 % Abnahme						
2: 10-20 % Abnahme						
3: >20% Abnahme						
Äußeres Erscheinungsbild: Fellpflege						
0: Fell glatt, glänzend und anliegend						
1: Fell leicht struppig und matt. Ggr. Brillenbildung						
2: Fell struppig und matt. Mgr. Brillenbildung						
3: Fell extrem struppig und matt. Hgr. Brillenbildung						
Äußeres Erscheinungsbild: Hydratationszustand						
0: Fell glatt, glänzend und anliegend. Hautelastizität erhalten						
1: Ggr. Piloerection. Hautelastizität ggr. vermindert						
2: Mgr. Piloerection. Hautelastizität mgr. vermindert						
3: Hgr. Piloerection. Hautelastizität hgr. vermindert						
Autotomie						
0: keine Autotomie						
1: wunde Stellen an der Pfote						
2: abgebissene Krallen						
3: Autotomie						
Gang und Körperhaltung bei Bewegung						
0: normaler Gang und normale Körperhaltung						
1: Ggr. Lahmheit/Lähmung. Gliedmaße wird leicht belastet						
2: Mgr. Lahmheit/Lähmung. Gliedmaße wird kaum belastet						
3: Hgr. Lahmheit/Lähmung. Gliedmaße wird gar nicht belastet						
Gesamt Pain Score						
0: Physiologischer Zustand						
1-5: Ggr. Abweichung vom physiologischen Zustand						
6-10: Mgr. Abweichung vom physiologischen Zustand						
11-15: Hgr. Abweichung vom physiologischen Zustand						

Ggr. = Geringgradig; Mgr. = Mittelgradig; Hgr. = Hochgradig.

Voraussetzungen für die Nutzung des Pain Scores:

- Der Untersucher ist mit der Physiologie, dem normalen Erscheinungsbild und Verhalten der Ratten vertraut.
- Zuerst werden die Tiere nur beobachtet, um Stress-bedingte Verhaltensänderungen durch Manipulationen zu vermeiden. Zum Schluss wird das Gewicht bestimmt.
- Dieser Pain Score ist noch nicht angewandt worden und seine Aussagekraft muss sich in der praktischen Anwendung erst noch herausstellen.

8.3 Danksagung

Ich bedanke mich vielmals bei Herrn Dr. Henning Hermanns für die freundliche Einarbeitung und die kompetente Betreuung meiner Dissertation an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Frau Priv.-Doz. Dr. Inge Bauer danke ich herzlich für ihre professionelle Unterstützung durch zahlreiche Anregungen und Hinweise und ihr stets offenes Ohr für meine Fragen und Anliegen. Frau Dr. Muth-Selbach danke ich für die Überlassung des faszinierenden und aktuellen Themas. Mein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern und Doktoranden im Institut für experimentelle Anästhesiologie und in der Tierversuchsanlage für die angenehme Arbeitsatmosphäre und eine sehr schöne Zeit in Düsseldorf.

Herrn Prof. Dr. Stangassinger danke ich herzlich für die sehr gute Zusammenarbeit und seine Bereitschaft, meine Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München zu vertreten.

Für die finanzielle Unterstützung, die es mir ermöglicht hat, mich ganz auf die wissenschaftliche Arbeit zu konzentrieren, bedanke ich mich bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (MU2712/1-1).

Ich danke meinen Eltern Helmi und Peter Wevers und meinen Brüdern Martin und Philipp für ihre tatkräftige Unterstützung und ihre liebevolle Beratung in allen Lebenslagen, während des Studiums und während der Doktorarbeit. Meiner Kindergarten-Freundin und Trauzeugin Heike Kühn danke ich ganz herzlich für die täglichen „Kontrollanrufe“ während der Schreibphase, die mir sehr dabei geholfen haben, immer am Ball zu bleiben. Mein besonderer Dank gilt auch meiner Freundin Katrin Scholz für die Hilfe bei der Anpassung der Grafik auf Seite 15, die einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des Textes leistet.

Ganz besonders danke ich meiner Freundin und Mitdotorandin Sabrina Krug für ihre offene, unkomplizierte und energiegeladene Art. Durch Sabrinas gute Laune und ihren Optimismus sind die vielen Stunden im OP und an der Uni wie im Flug vergangen. Unsere gute Teamarbeit wird mir immer als etwas Besonderes im Gedächtnis bleiben.

Meinem Mann, besten Freund und Partner Mark Williams danke ich für seine Unterstützung, seine Liebe und seinen festen Glauben in mich und meine Fähigkeiten.