

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen
Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Angefertigt an der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Pannen)

**Die Wirkung des Neuropeptids Nocistatin auf das chronische
Schmerzverhalten in einem Modell für neuropathischen Schmerz bei
der Ratte**

INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Rosemarie Sabrina Gabriele Grütters geb. Krug
aus Solingen

München, 2012

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

Dekan: Univ.- Prof. Dr. J. Braun

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

Korreferent: Univ.- Prof. Dr. Ammer

Tag der Promotion: 11. Februar 2012

Gefördert und unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)

Wissenschaftliche Betreuung:

Univ.-Prof. Dr. M. Stangassinger

Ludwig-Maximilians-Universität München

Tierärztliche Fakultät

Veterinärwissenschaftliches Department

Lehrstuhl für Physiologie

Veterinärstr. 13

D-80539 München

und

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Inge Bauer,

Dr. med. Henning Hermanns

Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Klinik für Anästhesiologie

Moorenstraße 5

40225 Düsseldorf

Meiner Familie

„Ob du denkst, du kannst es, oder du kannst es nicht: Du wirst auf jeden
Fall Recht behalten“ Henry Ford (1863- 1947)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Schmerz: Definition und Funktion	1
1.2 Einteilung von Schmerz	2
1.3 Neuropathischer Schmerz	4
1.4 Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen	8
1.4.1 Periphere Sensibilisierung	9
1.4.2 Zentrale Sensibilisierung	11
1.5 Glycinerge Mechanismen	16
1.6 Nocistatin (NST) und sein Einfluss auf die inhibitorische Neurotransmission	19
1.7 Ziele der Untersuchung	22
2 Materialien und Methoden	23
2.1 Versuchstiere	23
2.2 Haltung und Fütterung	23
2.3 Materialien	24
2.4 Allgemeiner Versuchsablauf	25
2.5 Verhaltensuntersuchungen	27
2.5.1 Mechanische Allodynie (Dynamic Plantar Aesthesiometer®)	27
2.5.2 Thermale Hyperalgesie (Plantartest®)	29
2.6 Operative Eingriffe	31
2.6.1 Operationsvorbereitungen	31
2.6.2 Intrathekale Katheterisierung	31
2.6.2.1 Versuchsmaterial	32
2.6.2.2 Operationsmethode zur Implantation der Intrathekalkatheter und der Mikroinfusionspumpe	33
2.6.3 Induktion einer Neuropathie nach dem Bennett- Modell „Chronic Constriction Injury (CCI)“	37
3 Statistische Auswertungen	40
3.1 Verwendete Daten	40
3.2 Wirkung von Nocistatin	40
3.3 Postoperative Ausprägung der Allodynie in der Kontrollgruppe	41
3.4 Vergleich von NaCl, DMSO und ACSF auf die Ausprägung der Allodynie	41

4 Ergebnisse	42
4.1 Erfolgsrate der Untersuchung	42
4.1.1 Tierschutzaspekte: Monitoring, Gewichtsverläufe und klinische Aspekte	45
4.1.2 Gewichtsentwicklung der Tiere im Versuch	47
4.2 Ausprägung der Allodynie in der Kontrollgruppe	49
4.3 Effekte von Nocistatin auf die induzierte Neuropathie	50
4.3.1 Effekte von Nocistatin auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der linken Pfote	50
4.3.2 Effekte von Nocistatin auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote	53
4.4 Effekte von DMSO und ACSF auf die induzierte Neuropathie	55
4.4.1 Wirkungen von DMSO und ACSF auf die Ausprägung der mechanischen Allodynie der linken Pfote	55
4.4.2 Wirkungen von DMSO und ACSF auf die Ausprägung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote	57
5 Diskussion	59
5.1. Operative Maßnahmen und Tiermodell	59
5.2 Verwendete Substanzen	62
5.3 Tierschutzaspekte: Analgesie, Monitoring, Gewichtsverläufe, klinische Beobachtungen und Entwicklung eines Pain Scores	64
5.4 Postoperative Ausprägung der Allodynie in der Kontrollgruppe und Evaluation der Verhaltensuntersuchungen	66
5.5 Einfluss von Nocistatin auf die induzierte Neuropathie	67
6 Schlussfolgerung und Ausblick	70
7 Zusammenfassung	72
8 Summary	73
8.1 Effects of the Neuropeptide Nocistatin on the Nociceptive Behaviour in a Chronic Pain Model for Neuropathic Pain in Rats	73
9 Abkürzungsverzeichnis	74
10 Literaturverzeichnis	77
11 Danksagung	95

1 Einleitung

1.1 Schmerz: Definition und Funktion

Schmerz ist eine wissenschaftliche Herausforderung. Laut Definition der *International Association for the Study of Pain* ist Schmerz „eine unangenehme Empfindung und ein emotionales Erlebnis, das mit einem aktuellen oder potenziellen Gewebeschaden einhergeht“ (Merskey and Bogduk 1994).

Schmerz ist weder einheitlich qualifizierbar noch neutral messbar und ist immer subjektiv. Dieser Umstand macht die Erkennung und Beurteilung von Schmerzen vor allem bei Tieren zu einer besonderen Herausforderung.

Schmerz hat eine Schutz- und Warnfunktion für den Organismus. Um den Körper vor potenzieller Schädigung zu bewahren, ist ein Warnsystem von großer Bedeutung. Diese Aufgabe erfüllt bei einem gesunden Organismus das nozizeptive Stimulus-abhängige sensorische System. Dieses sorgt dafür, dass bedrohliche Reize für die Dauer ihrer Bedrohung als schmerzhaft empfunden werden und ist gleichzeitig in der Lage, durch selektive, schwellenwertabhängige Fähigkeiten, potentiell schädigende Reize von harmlosen zu unterscheiden (Costigan, Scholz et al. 2009).

Schmerz ist eine lebenserhaltende biologische Funktion des Organismus. Angeborene (kongenitale) und erworbene Analgesie (z.B. durch Lepra) führen zu unabsichtlichen Verletzungen und Verstümmelungen (Handwerker 1999).

Neben der Problematik der Behandlung, besonders von chronischen Schmerzen, liegt eine wesentliche Schwierigkeit in ihrer Beurteilung (Henke and Erhardt 2001). Die Unfähigkeit von Individuen, Schmerz verbal zu kommunizieren, trifft keine Aussage über die Möglichkeit der Schmerzempfindung und die Notwendigkeit einer adäquaten analgetischen Behandlung. Schmerz ist immer ein subjektives Empfinden. Darüber hinaus stellt er fast immer ein multifaktorielles Geschehen dar, welches häufig mit irrationalen Werten, wie Angst und Stress einhergeht (Henke and Erhardt 2001). Diese Komplexität sowie die zahlreichen und unzureichend untersuchten pathophysiologischen Prozesse, welche in der Entwicklung chronischer Schmerzen eine hervorstechende Rolle spielen (Hansson and Dickenson 2005), führen mit dazu, dass

lediglich 40-60 % der Patienten durch Behandlung eine teilweise Linderung ihrer chronischen Schmerzen erleben (Dworkin, O'Connor et al. 2007).

Die vorliegende Definition vermeidet, Schmerz mit einem Stimulus in Beziehung zu setzen. Schmerz ist immer eine Emotion, d.h. allein eine Noxe durch die eine Aktivität im nozizeptiven System hervorgerufen wird ist nicht gleichzusetzen mit Schmerz. Schmerzen haben allerdings häufig einen physikalischen Ursprung (ISAP 1994).

Die Häufigkeit von Schmerzerkrankungen heutzutage stellt eine Herausforderung an die Medizin dar. Allein für neuropathischen Schmerz ist eine Prävalenz von 1% (Davis 2007) bis zu 8% (Torrance, Smith et al. 2006; Bouhassira, Lanteri-Minet et al. 2008) beschrieben. Hinzu kommt, dass die etablierten Medikamente häufig inadäquat sind sowie die analgetische Wirkung unterschiedlich und die richtige Dosierung schwer zu ermitteln ist. Problematisch sind des Weiteren konstant auftretende Nebenwirkungen (Dworkin, O'Connor et al. 2007).

Ziel dieser Arbeit ist es, die Grundlagen in Bezug auf die Entstehung und Behandlung von neuropathischen Schmerzen *in vivo* weiter zu erforschen.

Das spezielle Augenmerk liegt hierbei auf der Wirkung eines viel versprechenden Neuropeptides (Nocistatin) auf das chronische Schmerzverhalten in einem Modell für neuropathischen Schmerz bei der Ratte.

1.2 Einteilung von Schmerz

Die generelle Einteilung von Schmerz erfolgt häufig entsprechend seinem Verlauf in zwei Kategorien: **Akut und chronisch**

1. **Akuter Schmerz** wird mit medizinischen oder chirurgischen Eingriffen, einem medizinischen Zustand oder Befund, oder einer akuten Verletzung in Verbindung gebracht. Akuter Schmerz hat einen kurzen zeitlichen Verlauf (Payne 2000) und es gibt einen erkennbaren Auslöser (Noxe) (Russo and Brose 1998).
2. **Chronischer Schmerz** wurde früher durch eine zeitliche Angabe definiert (Main and Spanswick 2001). Heute spielen der Charakter des Schmerzes und das Fehlen einer Kausalität zwischen Gewebeschädigung und Schmerz eine größere Rolle.

Häufig treten neben den somatischen zum Teil auch psychologische und soziale Faktoren auf (Schaible 2007).

Chronischer Schmerz wird auch mit Krankheitsverläufen mit hoher Mortalitätsrate in Verbindung gebracht (z.B. Tumorschmerz) oder entsteht erst sekundär durch Behandlungsmethoden (z.B. Chemotherapie) (Payne 2000).

Gebräuchlich ist weiterhin die Einteilung von Schmerz nach der Art seiner Entstehung in drei Kategorien (Handwerker 1999; Schaible 2007):

1. Akuter physiologischer nozizeptiver Schmerz:

Dieser Schmerz ist eine physiologische Empfindung auf einen Reiz, um das betroffene Gewebe vor Schädigung zu schützen. Er löst in der Regel eine reflektorische Reaktion aus (z. B. Wegziehreflex).

2. Pathophysiologischer nozizeptiver Schmerz (Nozizeptorschmerz):

Dieser Schmerz tritt nach Gewebetraumen auf, wobei periphere und zentrale neuronale Strukturen intakt sind (z.B. chronische Entzündungsschmerzen, chronische Rückenschmerzen, Tumorschmerz) (Freynhagen and Baron 2006; Baron and Treede 2007).

3. Neuropathischer Schmerz

Der neuropathische Schmerz entsteht durch eine Verletzung, Erkrankung oder Degeneration der Neurone des peripheren oder zentralen Nervensystems. Er hat häufig einen brennenden oder stechenden Charakter, tritt häufig spontan auf und geht mit Hyperalgesie und Allodynie einher. Für neuropathische Schmerzen existieren eine Vielzahl an Ursachen: Diese reichen von traumatischen Verletzungen bis hin zu einer Reihe von Erkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, Herpes zoster, Multiple Sklerose) (Handwerker 1999; Schmader 2002; Vrethem, Boivie et al. 2002; Schaible 2007). Die vorliegende Untersuchung setzt sich mit dieser Schmerzkategorie auseinander.

1.3 Neuropathischer Schmerz

Die *International Association for the Study of Pain (IASP)* definiert neuropathischen Schmerz als einen „Schmerz, der durch eine primäre Schädigung des peripheren oder zentralen Nervensystems ausgelöst oder verursacht wird“ (Merskey and Bogduk 1994).

Neuropathischer Schmerz ist ein pathologischer Schmerz und somit abzugrenzen vom Nozizeptorschmerz, bei dem die peripheren und zentralen Strukturen der Nozizeption intakt sind (Maag, Stengel et al. 2006). Durch Läsionen im Nervensystem werden neuronale Strukturen und Funktionen verändert (Freynhagen and Baron 2006; Costigan, Scholz et al. 2009). Folge dieser Prozesse ist eine Reduktion des nozizeptiven Schwellenwertes, so dass Noxen verstärkt werden und physiologische, nicht schmerzhaft Reize einen Schmerz erzeugen. Charakteristisch für neuropathischen Schmerz ist auch die spontane Entstehung ohne Stimulus (Freynhagen and Baron 2006; Scholz and Woolf 2007). Der entstehende Schmerz ist in diesem Fall der Ausdruck einer maladaptiven Plastizität im Schmerz verarbeitenden System (Costigan, Scholz et al. 2009). Erst diese pathophysiologischen Prozesse führen zum Auftreten einer neuropathischen Schmerzsymptomatik und zur Chronifizierung. Langfristig sind irreversible neuroplastische Veränderungen möglich, die letztlich eine eigenständige Erkrankung darstellen (Maag, Stengel et al. 2006).

Die Ursachen von neuropathischem Schmerz sind so vielseitig wie seine Symptomatik und seine Mechanismen. Sie reichen von peripheren fokalen und multifokalen Nervenschädigungen über periphere generalisierte Polyneuropathien mit toxischem, metabolischem, hereditärem oder inflammatorischem Hintergrund bis hin zu ZNS-Läsionen und systemischen Erkrankungen wie z. B. multiple Sklerose und Diabetes mellitus (Hansson 2002; Baron 2006; Ducreux, Attal et al. 2006). Als Beispiele für neuropathischen Schmerz in der Tiermedizin gelten z.B. Podotrochleose und Hufrehe (Jones, Vinuela-Fernandez et al. 2007; Driessen, Bauquier et al.).

Eine gängige Methode neuropathische Schmerzen zu klassifizieren, ist eine klinisch-ätiologische Einteilung, bei der folgende Entitäten unterschieden werden (Freynhagen and Baron 2006; Maag, Stengel et al. 2006):

- **Periphere fokale schmerzhafte Neuropathien**
- **Periphere generalisierte Neuropathien (Polyneuropathie)**
- **Zentrale neuropathische Schmerzsyndrome**

Beispiele zu diesen unterschiedlichen Entitäten sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Klinisch-ätiologische Einteilung neuropathischer Schmerzsyndrome (modifiziert nach (Maag, Stengel et al. 2006))

Periphere fokale schmerzhafte Neuropathien	Periphere generalisierte Neuropathien (Polyneuropathie)	Zentrale neuropathische Schmerzsyndrome
Engpasssyndrom	Diabetes mellitus	Multiple Sklerose
Chronische Radikulopathien	Toxisch: Alkohol	Hirnfarkt (v. a. Thalamus und Hirnstamm)
Posttraumatische Neuropathie	Hypothyreose	Querschnittläsion
Phantomschmerz	Vitamin-B-Mangel	Parkinson-Syndrom
Akuter Herpes Zoster – postzosterische Neuralgie	Morbus Fabry	
Trigeminusneuralgie	Amyloidose	
Diabetische Mononeuropathie	Multiples Myelom	
Ischämische Neuropathie	Aids-Neuropathie	
Polyarteriitis nodosa	Dominant erbliche sensorische Neuropathie	
Neuralgische Schulteramyotrophie	Guillain-Barré-Syndrom	
	Borrelieninfektion	
	Toxisch: Chemotherapeutika, antiretrovirale Substanzen, Cyclosporin, FK 506, Choramphenicol, Metronidazol, Gold, Arsen, Thallium	

In der Regel ist dieser ätiologische Ansatz unzulänglich, da er den wesentlichen Charakter des neuropathischen Schmerzes nicht erfassen kann, der in der Manifestation der pathologischen neuronalen Veränderungen besteht. Die Primärerkrankung und die dadurch verursachten Schädigungen des Nervensystems sind nur der „Startschuss“ für eine Kaskade an Veränderungen, die letztlich zum neuropathischen Schmerz führen (Costigan, Scholz et al. 2009). Abbildung 1 zeigt ein Schema der möglichen Schmerzentwicklung von der Ätiologie bis zum Syndrom.

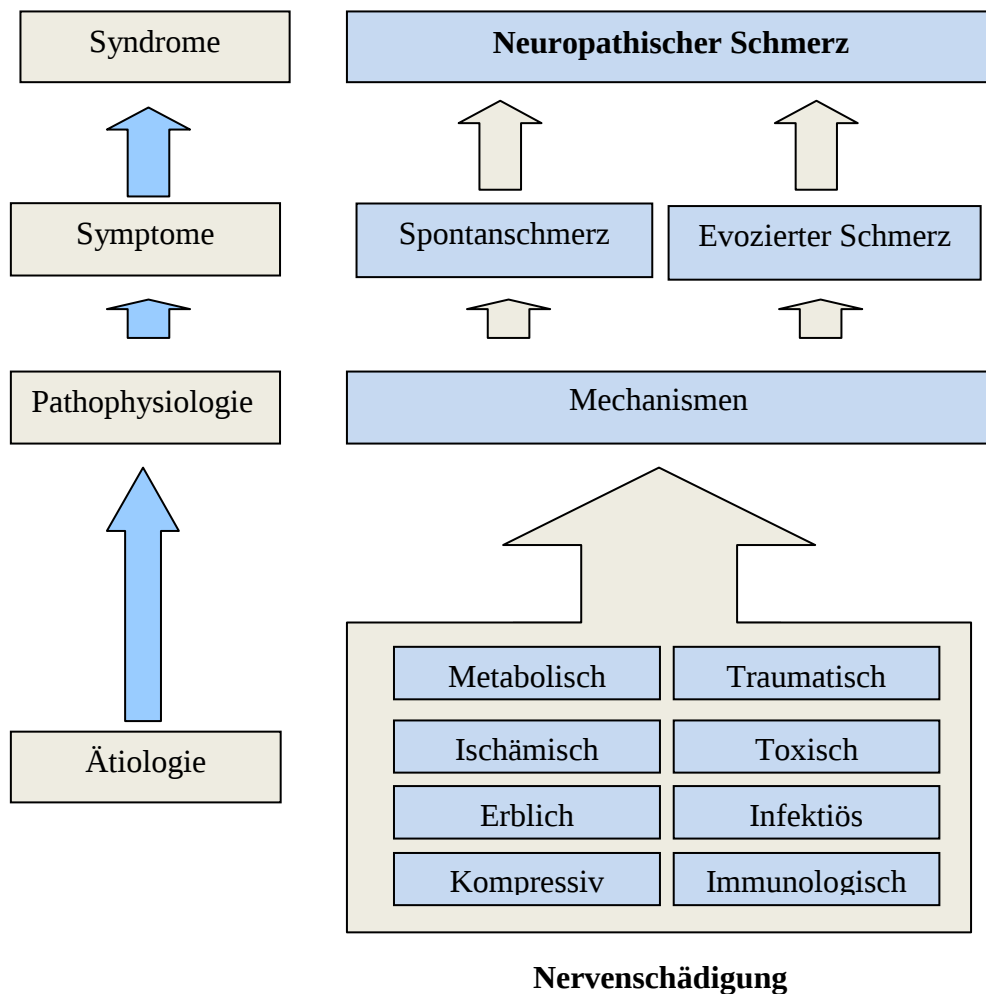


Abbildung 1: Schema zur Ätiologie von neuropathischem Schmerz modifiziert aus (Woolf and Mannion 1999)

Neuropathische Schmerzsyndrome sind sensorische Fehlsteuerungen, die infolge von Läsionen und Umstrukturierungen zentraler oder peripherer schmerzleitender Bahnen entstehen (Dickenson, Matthews et al. 2002). Klinisch werden negative und positive sensorische Symptome unterschieden. Unter negativen Symptomen werden reduzierte Empfindungen auch von nicht-schmerzhaften Reizen verstanden. Dazu gehört u. a. Hypästhesie (herabgesetzte Empfindlichkeit gegenüber Reizen), Pallhypästhesie (vermindertes Vibrationsempfinden), Hypalgesie (reduziertes Schmerzempfinden) und Thermhypästhesie (vermindertes Temperaturempfinden). Positive sensorische Symptome lassen sich unterteilen in Stimulus-unabhängige Spontanschmerzen und Stimulus-abhängige evozierte Schmerzen.

- **Spontanschmerzen** sind Schmerzen, die plötzlich mit brennendem, stechendem oder elektrisierendem Charakter auftreten oder ständig in unterschiedlicher Intensität vorhanden sind (Dauerschmerz) (Woolf and Mannion 1999; Freynhagen and Baron 2006; Maag, Stengel et al. 2006). Als weitere Form von spontanen Missempfindungen sind Par- und Dysästhesien (Kribbeln, Ameisenlaufen) beschrieben, die schmerzhaft sein können (Freynhagen and Baron 2006; Maag, Stengel et al. 2006).
- **Evozierte Schmerzen** werden durch einen Stimulus ausgelöst und können in einem gewissen Rahmen qualitativ und quantitativ beurteilt werden. Dies führt zu ihrer Nutzung in der Schmerzforschung. Die am häufigsten beschriebene Art von evozierten Schmerzen bei peripheren Neuropathien ist die mechanische *Allodynie* (Freynhagen and Bennett 2009; Maier, Baron et al. 2010). Des Weiteren wird auch *Hyperalgesie* als Form von evozierten Schmerzen beschrieben.

Allodynie bedeutet, dass ein normalerweise nicht schmerzhafter Reiz als schmerzhaft empfunden wird und beschreibt eine Veränderung in der Qualität der Reizwahrnehmung (Merskey and Bogduk 1994).

Hyperalgesie beschreibt eine intensive Schmerzantwort auf einen nur leicht schmerzhaften Reiz. Man spricht daher von einer Veränderung der Quantität der Reizwahrnehmung (Baron 2000; Dworkin 2002).

Die nozizeptive Funktion kann bewertet werden, indem man die Reizintensität und die sensorische Reizantwort darauf zueinander in Beziehung setzt. Abbildung 2 zeigt die vereinfachte Darstellung einer physiologischen und pathologischen Reizantwort (Hogan 2002).

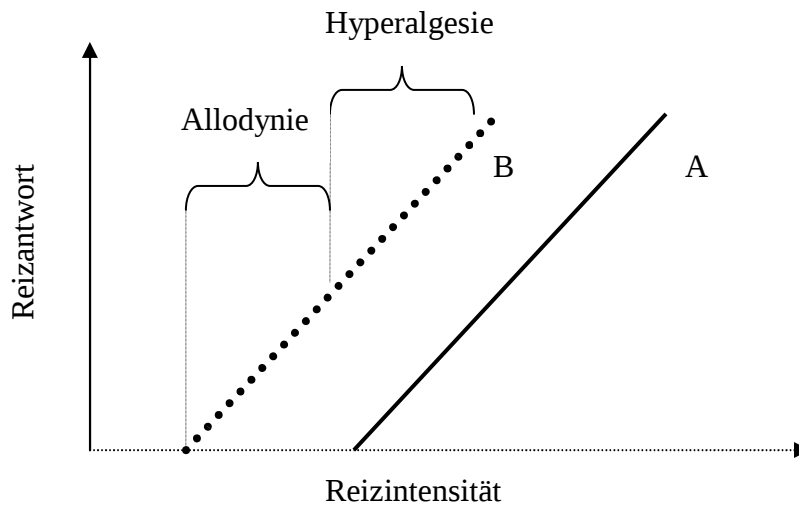


Abbildung 2: Die nozizeptive Funktion kann bewertet werden, indem man die Reizintensität und die sensorische Reizantwort darauf zueinander in Beziehung setzt. Vereinfacht dargestellt ist hier die physiologische Reizantwort eines gesunden Individuums (A) und die eines Lebewesens mit einer ausgeprägten Neuropathie (B). Ein Reiz, der physiologischerweise nicht schmerzhaft ist, ist bei einer ausgeprägten Neuropathie schmerzhaft (Allodynie). Die Intensivierung im Schmerzverhalten auf einen schmerzhaften Reiz eines neuropathischen Individuums gegenüber einem gesunden nennt man Hyperalgesie. Abbildung adaptiert nach Hogan, Q. Animal Pain Models, Regional Anesthesia and Pain Medicine; 2002 (Hogan 2002).

1.4 Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen

Im Verlauf der Entwicklung neuropathischer Schmerzen kommt es zu einer Vielzahl von pathologischen Veränderungen im somatosensorischen System. Sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem finden im Zusammenhang mit der Schmerzausbildung eine Vielzahl von Veränderungen statt, die in ihrer Summe zum komplexen Phänotyp neuropathischer Schmerzen führen.

Neben neuronalen Umstrukturierungsvorgängen spielen Veränderungen in Schwann'schen Zellen, Satellitenzellen im Spinalganglion, Komponenten des Immunsystems, der Mikroglia und den Astrozyten eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Unterhaltung von neuropathischem Schmerz (Scholz and Woolf 2007).

Die Kenntnis der sich bei neuropathischem Schmerz entwickelnden Pathomechanismen ist wichtig, um Ansatzpunkte für Forschung, Diagnostik und Therapie zu entwickeln und Patienten somit mechanismusbezogene Behandlungsoptionen ermöglichen zu können. Trotz erheblicher Anstrengungen sind dabei die molekularen Mechanismen, die in ihrer Summe zum Phänomen neuropathischer Schmerzen führen, bisher nur unvollständig verstanden.

1.4.1 Periphere Sensibilisierung

Schmerzempfindungen sind physiologisch auf die Aktivitäten von unmyelinisierten, langsam leitenden C-Fasern und dünn myelinisierten A δ -Fasern (Lai, Porreca et al. 2004) und ihren Nozizeptoren zurückzuführen (Baron 2006). Diese Nozizeptoren sind in der Abwesenheit von Reizen inaktiv und werden erst durch einen adäquaten Schmerzreiz stimuliert (Baron 2006).

Nach einer peripheren Nervenschädigung kommt es zu einer Vielzahl von Veränderungsvorgängen im peripheren Nervensystem:

- **Endzündungsreaktion**

Die Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Serotonin, Histamin und Prostaglandin-E₂ (PGE₂) aus Mastzellen, Bradykinin, Nerve Growth Factor (NGF) und Interleukin-1 β (IL1 β) aus Makrophagen, sowie Adenosin-Tri-Phosphat (ATP), Wasserstoffionen (H⁺) und Bradykinin aus geschädigten Zellen führen zur Aktivierung intrazellulärer Proteinkinasen und somit zu einer verstärkten Phosphorylierung von intrazellulären Enzymen, Proteinen und Rezeptoren (Costigan and Woolf 2000). Dadurch kann die Aktivierungsschwelle der Rezeptoren herabgesetzt werden (Schaible 2007).

- **Hochregulierung von Capsaicinrezeptoren auf nicht geschädigten C- und A- Fasern**

Dieses Phänomen bietet einen Erklärungsansatz für die Entstehung der thermalen Hyperalgesie und dem daraus resultierenden brennenden Dauerschmerz (Hong and Wiley 2005; Maag, Stengel et al. 2006).

- **Sensibilisierung und Überempfindlichkeit der afferenten Neurone**

Geschädigte Nerven entwickeln eine permanente pathologische Ruheaktivität aufgrund der Anhäufung und Zusammenlagerung von Natriumkanälen (Na^+ -Kanälen) um das verletzte Axon (Roza, Laird et al. 2003; Lai, Porreca et al. 2004). Diese anormale Aktivität verbreitet sich schnell über die Zellkörper bis ins Rückenmark. Nervenfasern und Zellen beginnen sich gegenseitig zu reizen (D'Mello and Dickenson 2008). Durch eine Anhäufung von Na^+ -Kanälen wird das Membranpotential erniedrigt und es kommt zur Überaktivität und zu ektopen Impulsbildungen, d. h., es werden Aktionspotentiale ohne erkennbaren Reiz freigesetzt (Lai, Hunter et al. 2003). Diese ektopen Entladungen können Ursache plötzlich einschießender Schmerzen sein, die in keiner Beziehung zu einem noxischen Reiz auf das Gewebe stehen (Schaible 2007).

- **Rezeptorexpression**

Auf nicht geschädigten C-Fasern werden durch die Ausschüttung von Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α und NGF aus zerfallenden Markscheiden (Schwann'sche Zellen) neue Rezeptoren exprimiert (Wu, Ringkamp et al. 2002).

- **Sympathische Unterhaltung des Schmerzes**

Durch die Expression von α -Adrenorezeptoren auf unverletzten Neuronen entsteht eine chemische Sensibilisierung der Afferenzen gegenüber noradrenergen Substanzen (McLachlan, Janig et al. 1993; Woolf and Mannion 1999; Freynhagen and Baron 2006).

In Folge dessen kommt es zu einer pathologischen Interaktion zwischen sympathischen und afferenten Neuronen, welche die Grundlage für einen sympathisch-unterhaltenen Schmerz liefert (Freynhagen and Baron 2006).

1.4.2 Zentrale Sensibilisierung

Als Konsequenz der peripheren Nozizeptor-Hyperaktivität finden dramatische sekundäre Veränderungen im Dorsalhorn des Rückenmarks statt (Baron 2006).

Bei der Entstehung einer zentralen Sensibilisierung und somit von chronischem neuropathischem Schmerz spielen viele verschiedene Mechanismen eine Rolle. Wichtige Verschaltungsvorgänge im Dorsalhorn des Rückenmarks sind schematisch in Abbildung 3 dargestellt (Baron 2006). Fortdauernde Aktivität von peripheren C-Fasern (periphere Sensibilisierung) führt zu einem Anstieg der generellen Erregbarkeit von zentralen Neuronen, woraus verschiedene dynamische und neuroplastische Veränderungen im ZNS resultieren (Woolf and Salter 2000; Jensen and Baron 2003; Baron 2006).

Die Prozesse der zentralen Sensibilisierung durch andauernde, von der Peripherie ausgehende Stimulation lassen sich wie folgt unterteilen:

- **Neuroplastische Reorganisation im Rückenmark**

Physiologischerweise enden die nozizeptiven, dünnen, leicht myelinisierten A δ -Fasern und die unmyelinisierten C-Fasern in den oberflächlichen Laminae I und II des Hinterhorns, während die dicken, myelinisierten A β -Fasern in den Laminae III und IV enden (Bridges, Thompson et al. 2001).

Durch eine periphere Nervenschädigung können C-Fasern absterben oder einen Substanzverlust erleiden. Als Folge daraus entstehen freie synaptische Bindungsstellen an Neuronen in der Lamina II des Dorsalhorns (substantia gelatinosa), die physiologisch von C-Fasern kontaktiert werden (Lisney 1989).

A β -Fasern sprießen in die oberflächlichen Schichten des Dorsalhorns ein und kontaktieren die frei gewordenen Bindungsstellen. Als Konsequenz erhalten diese Neurone nun Signale von sensorischen A β -Fasern mit niedrigem Schwellenwert, welches zu einer Missinterpretation der eingehenden Reize führt. Berührungsreize werden so als Schmerz wahrgenommen (Woolf, Shortland et al. 1992).

Dieser Ansatz bietet eine plausible Erklärung für die Entstehung einer Allodynie.

Eine schematische Darstellung (Abbildung 3) der pathophysiologischen Verschaltungsmechanismen verdeutlicht die Zusammenhänge. C-Fasern vermitteln

Schmerz- und Temperaturreize und enden in den oberen Laminae des Rückenmarks (oranges Neuron). A-Fasern aus der Peripherie vermitteln nicht-noxische Reize (Druck, Berührung) und enden in den tieferen Laminae des Rückenmarks und projizieren direkt in die Hinterstränge. Das spinothalamische Projektionsneuron ist vom WDR-Typ (wide dynamic range), d.h., es enthält direkten synaptischen Einfluss von nozizeptiven Fasern und multisynaptischen Einfluss von A-Fasern (blaues Neuronensystem). γ -Aminobuttersäure (GABA)-erge Interneurone (graues Neuron) hemmen die WDR-Neurone. Deszendierende modulierende Neurone (grüne deszendierende Endigung) hemmen ebenfalls WDR-Neurone. Spinale Gliazellen stehen ebenfalls in Kommunikation mit den WDR-Neuronen (Baron 2006).

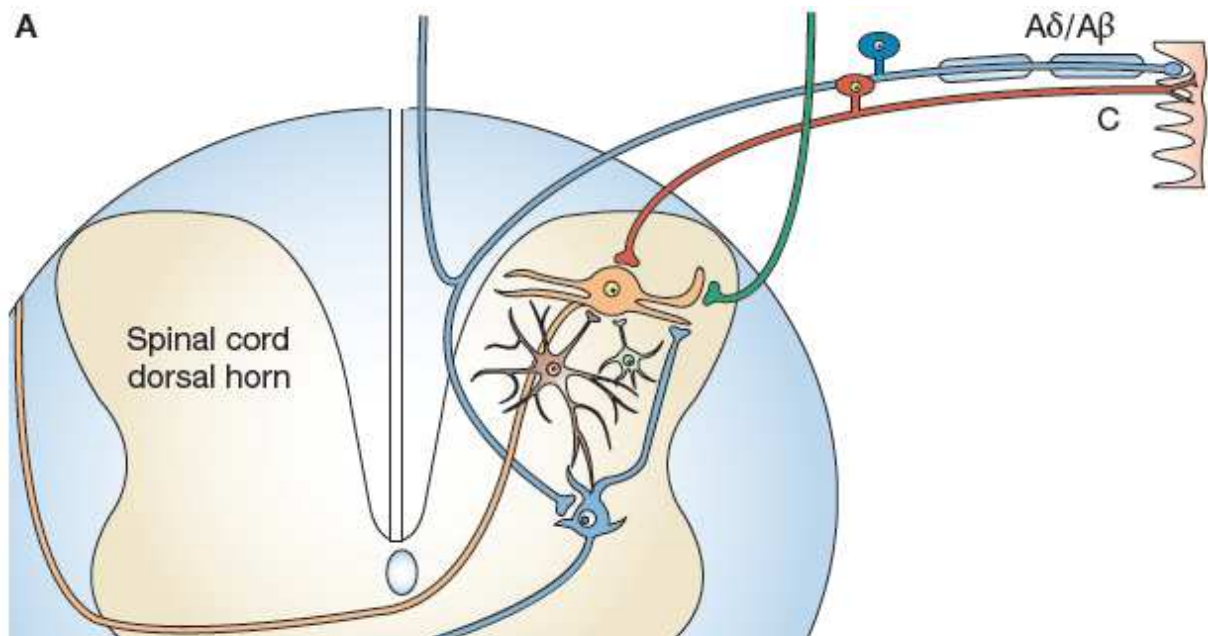


Abbildung 3: Pathophysiologische Mechanismen der Schmerzchronifizierung bei Neuropathien (Schema) (modifiziert nach Baron, R Nat Clin Pract Neurol. 2006) Neuronale Verschaltung im Dorsalhorn des Rückenmarks.

- **Die Rolle der Gliazellen**

Eine wichtige Rolle in der Entwicklung von chronischem Schmerz spielen zentral immunologische Mechanismen, die durch die Beteiligung von Gliazellen entstehen und von ihnen unterhalten werden. Ausgelöst durch Läsionen des somatosensorischen Systems werden die auf Gliazellen exprimierten Purinrezeptoren (P2X/Y Rezeptoren) durch ATP aus geschädigten Zellen aktiviert (Inoue 2002).

Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren werden bioaktive Substanzen, wie Zytokine, Plasminogen, Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPK) und Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) freigesetzt (Ferrari, Chiozzi et al. 1997; Hide, Tanaka et al. 2000; Honda, Sasaki et al. 2001; Inoue 2002; Suzuki, Hide et al. 2004). Proinflammatorische Zytokine haben die Eigenschaft, sich gegenseitig zu aktivieren (Watkins, Nguyen et al. 1999). Die Wirkung von BDNF beruht darauf, dass der transmembrane Anionengradient in der Lamina I des Dorsalhorns durch eine Herabregulierung des Kalium-Chlorid-Kotransporters-2 (KCC2) zusammenbricht (Coull, Boudreau et al. 2003). KCC2 sind K^+Cl^- -Iontentransporter, welche eine GABA- und Glycin-aktivierte Hyperpolarisation ermöglichen und somit eine wesentliche Rolle bei der neuronalen Inhibition spielen (Hasbargen, Ahmed et al. 2010).

Bei Herabregulierung von KCC2 werden ursprünglich hyperpolarisierende Effekte von GABA und Glycin zu depolarisierenden Effekten, und die inhibitorische Wirkung von Glycin und GABA hebt sich auf (Thompson, Bennett et al. 1999; Coull, Beggs et al. 2005).

Mikroglia spielen demnach eine Schlüsselrolle bei Schädigungen des zentralen Nervensystems z.B. durch Traumata oder durch Ischämie, bei Autoimmunerkrankungen (z. B. Multiple Sklerose) und bei neurodegenerativen Erkrankungen (Scholz and Woolf 2007). Sie haben großen Anteil an der Entstehung neuropathischer Schmerzen.

- **Spinale Disinhibition**

Ein weiterer vermuteter zentraler Pathomechanismus ist der Verlust an synaptischer Inhibition (Disinhibition). Unter physiologischen Umständen stehen die Hinterhornneurone unter einer strengen inhibitorischen Kontrolle von GABA und

Glycin (Sivilotti and Woolf 1994). Ein Wegfall dieser inhibitorischen Mechanismen ermöglicht eine Schmerzauslösung und Erregungsweiterleitung schon bei geringen Reizintensitäten.

Die meisten Dorsalhornneurone werden durch GABA und/oder Glycin inhibiert. Die Verteilung von GABA und Glycin variiert allerdings in den verschiedenen Laminae (Todd and Sullivan 1990; Oliva, Jiang et al. 2000; Zeilhofer, Studler et al. 2005).

Es sind drei verschiedene Aktivierungsformen der inhibitorischen glycinergen Innervation des Dorsalhorns beschrieben:

1. Spinale glycinerge Interneurone können direkt über mechanosensitive primäre afferente Nervenfasern aktiviert werden (Narikawa, Furue et al. 2000; Lu and Perl 2003) .
2. Absteigende antinozizeptive Fasern können lokale glycinerge Interneurone aktivieren (Kato, Yasaka et al. 2006).
3. Ein glycinerger Input des Dorsalhorns kann direkt von absteigenden glycinergen Neuronen aus der Medulla oblongata stammen (Zeilhofer 2005).

Als eine mögliche Ursache für den Verlust der zentralen Inhibition wird unter anderem der Untergang von peripheren A β -Fasern und somit eine verminderte Aktivierung von inhibitorischen Interneuronen im Rahmen der gate-control Theorie diskutiert (Melzack and Wall 1965).

Weiterhin wird diskutiert, dass der apoptotische Untergang von inhibitorischen Neuronen möglicherweise durch eine exzitotoxische Wirkung infolge eines übermäßigen Kalziumeinstroms über den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR) verursacht wird (Moore, Kohno et al. 2002). Dieser Mechanismus konnte in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen jedoch nicht bestätigt werden (Polgar, Gray et al. 2004; Polgar, Hughes et al. 2005; Polgar and Todd 2008; Hermanns, Muth-Selbach et al. 2009).

- **Veränderung synaptischer Neurotransmitteraktivität**

Zentrale Endigungen von C-Fasern und Interneuronen setzen im Dorsalhorn unter anderem den wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter, Glutamat, frei (Freynhagen and Baron 2006). Glutamat bindet mit unterschiedlicher Affinität an verschiedene ionotrope und metabotrope Rezeptoren, wobei es eine hohe Bindungsaffinität zum NMDA- Rezeptor hat, der normalerweise nicht an der Schmerzleitung teilnimmt, und eine geringere Affinität zum α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor (AMPA) (Costigan and Woolf 2000; Zimmermann 2001). Bei physiologisch ruhendem Membranpotential ist die Glutamat-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors durch ein Mg^{2+} Ion geblockt, so dass Glutamat vorrangig an den AMPA-Rezeptor bindet, welcher den Beginn, die Dauer, die Intensität und die Lokalisation der peripheren Noxe signalisiert (Yoshimura and Nishi 1993). Er ist verantwortlich für die initiale Antwort der Rückenmarksneurone sowohl für den Schmerz- als auch für den Berührungsreiz (Dickenson and Sullivan 1987). In diesem Zusammenhang wird von der Entstehung eines exzitatorischen postsynaptischen Potentials (EPSP) gesprochen (Schaible 2007). Durch einen verstärkten afferenten Input kommt es zu einer verstärkten und verlängerten Reizantwort der dorsalen Rückenmarksneurone für darauf folgende C-Faser- vermittelte Reize. Dieses Phänomen wird als wind-up bezeichnet (Dickenson and Sullivan 1987; Li, Simone et al. 1999).

Aufgrund dieser Depolarisierung kommt es zu einer Freisetzung des Mg^{2+} Ions und zu einer Aktivierung des NMDAR (D'Mello and Dickenson 2008) und somit zu der Entstehung eines EPSP. Durch den gleichzeitig stattfinden Ca^{2+} -Einstrom kommt es zu der Phosphorylierung des NMDAR und dementsprechend schneller zur Depolarisation durch nachfolgende Potentiale (Guo, Zou et al. 2002; Rondon, Privat et al. 2010).

Diese beschriebenen Prozesse spielen eine elementare Rolle in der Aktivierung und Sensibilisierung von Rückenmarksneuronen (Dickenson and Sullivan 1987) und bieten, zusammen mit den anderen beschriebenen zentralen Prozessen (s.o.), die Grundlagen für eine komplexe neuronale Antwort im Rückenmark (zentrale Sensibilisierung) (Schaible 2007). Als Auswirkung kann sich das klinische Bild der Allodynie und Hyperalgesie zeigen (Woolf 1983).

1.5 Glycinerge Mechanismen

In der *Substantia gelatinosa* des Dorsalhorns finden hochkomplexe neurotransmittergesteuerte Verschaltungsvorgänge von Afferenzen auf zentrale Neurone statt. Eine dominante inhibitorische Rolle spielen hierbei glycinerge und GABAerge Interneurone (Zeilhofer 2001; Zeilhofer 2005).

Glycin ist die einfachste und kleinste α -Aminosäure. Chemisch wird sie als Aminoessigsäure bezeichnet und ist durch die Summenformel $C_2H_5NO_2$ definiert (Löffler 2003). Die Strukturformel ist in Abbildung 4 dargestellt.

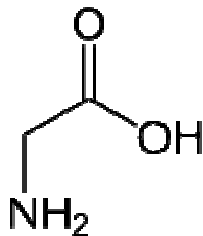


Abbildung 4: Strukturformel Glycin (Löffler 2003)

Neben den Aufgaben im Stoffwechsel und als Baustein von Proteinen hat Glycin eine weitere wichtige Aufgabe als inhibitorischer Neurotransmitter (Löffler 2003). Entdeckt wurde Glycin als Neurotransmitter 1965, als eine hohe Glycinkonzentration im Rückenmarksgewebe gefunden wurde (Aprison and Werman 1965). Weitere Forschung zeigte, dass Glycin eine inhibitorische Rolle spielt (Curtis and Watkins 1960; Werman, Davidoff et al. 1967), von Neuronen synthetisiert wird (Shank and Aprison 1970) und durch elektrische Stimulation freigesetzt werden kann (Hopkin and Neal 1970). Damit erfüllte Glycin die von Werman et al. aufgestellten Kriterien, um als Neurotransmitter definiert zu werden (Werman 1966). Glycin und GABA sind verantwortlich für schnelle inhibitorische Neurotransmission (Zeilhofer 2005). Beide Transmitter bewirken die Öffnung von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen und somit eine Hyperpolarisation der Zelle durch den Einstrom von Chlorid- (Cl^-) und Bicarbonat-Ionen (HCO_3^-). Es wird hierbei von der Entstehung eines Inhibitorischen Postsynaptischen Potenzials (IPSP) gesprochen.

Die Summation mehrerer IPSPs sorgt für eine verminderte Erregbarkeit der Nervenzelle und hat somit eine hemmende Wirkung auf die Erregungsausbreitung (Frey 2002; Zeilhofer 2005; Bowery and Smart 2006).

Die überwiegende Anzahl der inhibitorischen Interneurone im Rückenmark enthalten sowohl GABA als auch Glycin in ihren präsynaptischen Einheiten. Rein glycinerge Neurone sind vor allem in Laminae IV und V zu finden (Todd, Watt et al. 1996; Oliva, Jiang et al. 2000; Zeilhofer, Studler et al. 2005).

Die kombinierte Speicherung und Freisetzung beider inhibitorischen Neurotransmitter in den präsynaptischen Einheiten wird unter anderem durch den nicht-selektiven Transport von beiden Aminosäuren durch den „vesicular inhibitory amino acid transporter“ = VIAAT ermöglicht (Dumoulin, Rostaing et al. 1999).

Inhibitorische (auch Strychnin-sensitive) Glycinrezeptoren gehören zur Familie der nicotineren Acetylcholin-Rezeptoren und sind pentamerische, aus α - und β -Untereinheiten bestehende Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (Grudzinska, Schemm et al. 2005; Betz, Gomeza et al. 2006).

Neben seiner inhibitorischen Wirkung am Strychnin-sensitiven Glycinrezeptor hat Glycin darüber hinaus eine exzitatorische Funktion als obligater Koagonist von Glutamat am NMDAR (Johnson and Ascher 1987; Corsi, Fina et al. 1996) und spielt so bei der Entstehung der zentralen Sensibilisierung im neuropathischen Schmerzgeschehen eine wichtige Rolle. Die experimentelle Hemmung der Glycinbindungsstelle am NMDA-Rezeptor durch einen Antagonisten zeigte eine deutliche Verminderung von neuropathischem Schmerz im Chronic Constriction Injury Modell (CCI – Modell) (Quartaroli, Carignani et al. 1999).

Glycin gelangt durch ein „spill-over“, d.h. ein „Überschwappen“ von Glycin, aus der glycinergen an die glutamaterge Synapse (Ahmadi, Muth-Selbach et al. 2003).

Für die Entstehung eines exzitatorischen Potentials am NMDAR sind drei Voraussetzungen zu erfüllen:

1. Aktivierung des NMDAR durch Freisetzung des gebundenen Mg^{2+} -Ions ausgelöst durch eine Depolarisation der postsynaptischen Membran.
2. Bindung von Glutamat an die Glutamat-Bindungsstelle.
3. Bindung von Glycin als Co-Agonist an die Glycin-Bindungsstelle des NMDA- Rezeptors (Johnson and Ascher 1987).

Glycinerge Prozesse und Glycintransporter

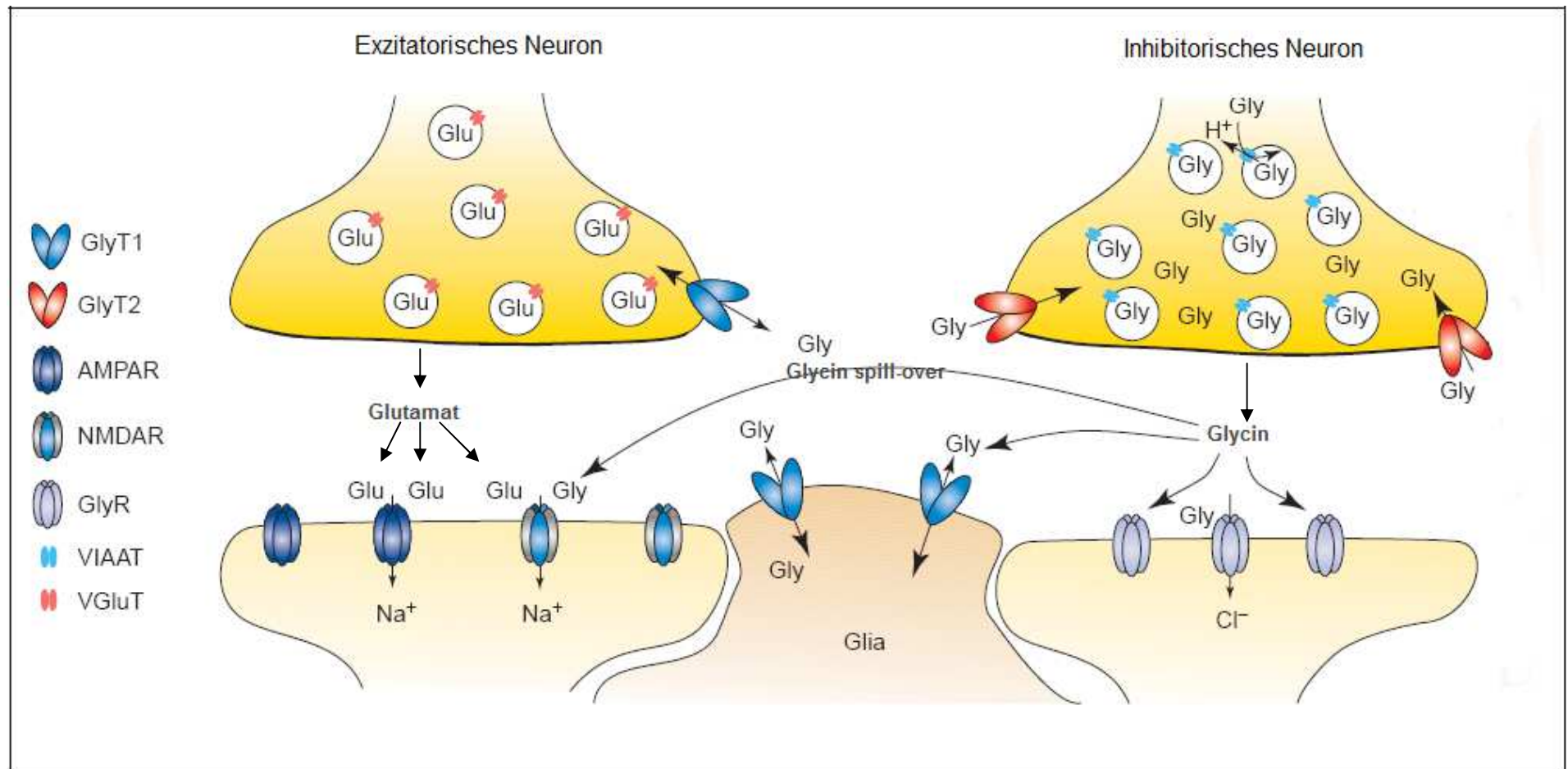


Abbildung 5: Glycinerge Prozesse und Glycintransporter an Synapsen (adaptiert nach (Roux and Supplisson 2000; Eulenburg, Armsen et al. 2005))

Wie in Abbildung 5 schematisch dargestellt, wird Glycin aus dem inhibitorischen Neuron in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet in erster Linie, unter der Erzeugung eines IPSP, an den postsynaptischen Glycinrezeptor (GlyR). Bei einer hohen Glycinkonzentration im Spalt der inhibitorischen Synapse kann ein Glycin „spill-over“ in den Spalt der exzitatorischen Synapse stattfinden (Ahmadi, Muth-Selbach et al. 2003). Glycin bindet dann als obligater Co-Agonist zusammen mit Glutamat (Glu) an die Glycinbindungsstelle des NMDAR, wodurch es zur Freisetzung eines EPSP kommt (Johnson and Ascher 1987). Der Glycinabbau aus dem synaptischen Spalt (Clearance) erfolgt mit Hilfe von zwei verschiedenen Glycintransportern (GlyT1 und GlyT2), die das Glycin zurück in das Neuron transportieren, wo es mit Hilfe eines spezifischen Transporters VIAAT in synaptische Vesikel eingebaut wird (Glycin Recycling) (Dumoulin, Rostaing et al. 1999; Roux and Supplisson 2000) und wieder für die inhibitorische Neurotransmission zur Verfügung steht (Dumoulin, Rostaing et al. 1999).

1.6 Nocistatin (NST) und sein Einfluss auf die inhibitorische Neurotransmission

Nocistatin ist ein aus 17 Aminosäuren bestehendes biologisch aktives Neuropeptid, welches von demselben Vorläuferprotein wie Nociceptin (auch bekannt als orphanin FQ), dem Prepronociceptin hergestellt wird (Yamamoto and Sakashita 1999; Johnson and Connor 2007). Beide Neurotransmitter spielen eine Rolle bei der Nozizeption und der Entstehung von Schmerzen (Okuda-Ashitaka, Minami et al. 1998) und sind folglich für die Schmerzforschung hochinteressant.

Nocistatin wurde ursprünglich als Antagonist der Nociceptin-induzierten Hyperalgesie und Allodynie angesehen (Hara, Minami et al. 1997; Okuda-Ashitaka, Minami et al. 1998; Xu, Grass et al. 1999; Zhao, Li et al. 1999). Weitere Untersuchungen zeigten eine eigenständige Wirkung von Nocistatin als aktives Peptid mit unterschiedlichen Effekten auf die Schmerzentwicklung und Nozizeption (Nakagawa, Kaneko et al. 1999; Zeilhofer, Selbach et al. 2000). Diese Wirkung wird dem Carboxyl-Terminus des Hexapeptids (Glu-Gln-Lys-Gln-Leu-Gln) von Nocistatin zugeschrieben (Okuda-Ashitaka, Minami et al. 1998). Nocistatin konnte bisher aus dem Gehirn von Rindern, Mäusen, Ratten und Menschen, sowie aus humaner Cerebrospinalflüssigkeit isoliert werden (Lee, Fung et al. 1999; Okuda-Ashitaka and Ito 2000).

Nociceptin agiert als Ligand am Opioid-Rezeptor-Like 1 Rezeptor (ORL-1) (Meunier 1997). Nocistatin hingegen bindet nicht an den ORL-1 Rezeptor, sondern mit hoher Affinität an einen anderen, noch nicht definierten Membranrezeptor in Gehirn und Rückenmark (Okuda-Ashitaka, Minami et al. 1998). Ergebnisse verschiedener Studien mit Nocistatin lassen darauf schließen, dass Nocistatin zwar nicht an den ORL-1 bindet, es aber eine spezielle Bindungsstelle in Gehirn und Rückenmark für Nocistatin geben muss (Lee, Fung et al. 1999; Johnson and Connor 2007). Eine weitere Studie gibt Anhaltspunkte dafür, dass Nocistatin über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in Neuronen wirken könnte (Fantin, Fischetti et al. 2007). Aufgrund der Feststellung, dass Nocistatin an Neuronen im Dorsalhorn die Ausschüttung der inhibitorischen Neurotransmitter GABA und Glycin in den synaptischen Spalt hemmt (Zeilhofer, Selbach et al. 2000; Ahmadi, Muth-Selbach et al. 2003), geht man davon aus, dass sich ein Rezeptor für Nocistatin im präsynaptischen Bereich befinden muss, von wo aus die Ausschüttung des Neurotransmitters beeinflusst werden kann (Johnson and Connor 2007).

Im Dorsalhorn des Rückenmarkes hat Nocistatin Einfluss auf die Freisetzung der inhibitorischen Neurotransmitter GABA und Glycin, nicht aber auf die Freisetzung von Glutamat (Okuda-Ashitaka, Minami et al. 1998; Muth-Selbach, Dybek et al. 2004).

Untersuchungen von intra- oder supra-spinal appliziertem Nocistatin im Tiermodell zeigten sowohl antinozizeptive als auch keine oder pronozizeptive Effekte (Nakagawa, Kaneko et al. 1999; Xu, Hashemi et al. 1999; Yamamoto and Sakashita 1999; Nakano, Minami et al. 2000; Zeilhofer, Selbach et al. 2000; Muth-Selbach, Dybek et al. 2004).

Die Arbeitsgruppe von Muth-Selbach et al. setzte sich 2004 mit diesem Phänomen auseinander und konnte in ihrer Untersuchung differentielle dosisabhängige Wirkungen von intrathekal appliziertem Nocistatin im Chronic Constriction Injury (CCI) Modell für neuropathischen Schmerz bei der Ratte feststellen (Muth-Selbach, Dybek et al. 2004). So zeigten hohe Dosen intrathekal applizierten Nocistatins einen pronozizeptiven Effekt im Verhaltensexperiment, wohingegen niedrige Dosen einen antinozizeptiven Effekt aufwiesen. Die pronozizeptive Wirkung von Nocistatin in höheren Konzentrationen ist auf die Verhinderung der glycinergen und GABAergen Neurotransmission am inhibitorischen Neuron im Dorsalhorn zurückzuführen, woraus eine Reduktion der Aktivierung von postsynaptischen GABA- und Glycin- Rezeptoren resultiert (Muth-Selbach, Dybek et al. 2004). Die antinozizeptive Wirkung hingegen ist

auf eine Verminderung der Glycin- Neurotransmission zurückzuführen. Ein Glycin „spill-over“ an die exzitatorische Synapse kann so nicht mehr stattfinden und die Aktivierung des NMDA-Rezeptors ist nicht mehr möglich (Zeilhofer, Selbach et al. 2000).

Die Ergebnisse der bisherigen Studien legen nahe, dass Nocistatin eine viel versprechende Substanz mit möglichem Potential zur Therapie neuropathischer Schmerzen darstellt. Eine weitere Erforschung dieses Neuropeptides und seiner Rolle bei der Schmerztransmission ist daher naheliegend.

1.7 Ziele der Untersuchung

In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch eine Bolusapplikation von Nocistatin ein antinozizeptiver Effekt bei bereits etablierten neuropathischen Schmerzen nachgewiesen werden (Muth-Selbach, Dybek et al. 2004). Das komplexe Zusammenspiel exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission im Rückenmark, unterliegt vor allem in der Frühphase der Entwicklung neuropathischer Schmerzen, massiven Veränderungen (Morita, Motoyama et al. 2008; Dohi, Morita et al. 2009). Aufgrund dieser Tatsache ist es denkbar, dass eine pharmakologische Intervention, in Form einer Langzeitapplikation von Nocistatin, in dieser Phase einen Einfluss auf die Entwicklung neuropathischer Schmerzen haben kann. In allen bisherigen Untersuchungen wurde die Wirkung von Nocistatin lediglich als Bolusapplikation bei bereits etabliertem neuropathischem Schmerz untersucht.

Primäres Ziel der vorliegenden Untersuchung

Es war zu klären, ob eine kontinuierliche Dauerapplikation von Nocistatin über 24 Stunden in der Frühphase der Schmerzentwicklung direkt an den Ort der Veränderungen in der Lage ist, die Entstehung neuropathischer Schmerzen zu verhindern oder in ihrer Ausprägung zu vermindern.

Um Substanzen in der Schmerzforschung einsetzen zu können, müssen sie als ZNS-verträgliche Injektionslösungen verabreichbar sein. Die einzusetzenden Lösungsmittel dürfen keine Interaktionen mit dem Wirkstoff oder den eingesetzten Materialien zeigen und dürfen keine eigene pharmakologische Wirkung in Bezug auf die Schmerzentwicklung haben. Auch eine Schädigung des Gewebes darf nicht auftreten.

Erweitertes Ziel der vorliegenden Untersuchung

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand darin, die Eignung von Dimethylsulfoxid (DMSO) und Artificial cerebrospinal fluid (ACSF) im Vergleich mit physiologischer Kochsalzlösung als Lösungsmittel für die Injektion in den Intrathekalraum im Hinblick auf oben genannte Anforderungen zu untersuchen. Dadurch sollte ein geeignetes Lösungsmittel für die intrathekale Applikation in chronischen Schmerzmodellen etabliert werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Untersuchungen erfolgten nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen (AZ 50.05-230-43/06).

Für die Untersuchungen wurden 59 männliche Wistar Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 300 und 400 g eingesetzt. Die Tiere wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter tierärztlicher Aufsicht und standardisierten Bedingungen gezüchtet und gehalten, somit entfallen Quarantänebestimmungen und Adaptionszeiten.

2.2 Haltung und Fütterung

Die Tiere wurden während der Versuchszeit von 2 Wochen einzeln in Makrolon[®]-Käfigen Typ III gehalten. Als Einstreu diente entstaubtes Weichholzgranulat der Fa. Rettenmaier & Söhne GmbH u. Co KG, Rosenberg. Es wurde von den Tierpflegern zweimal pro Woche gewechselt. Die Haltung erfolgte im SPF Tierstall der Tierversuchsanlage der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf unter konstanten Klimabedingungen. Die Raumtemperatur lag zwischen 21 und 24° C bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60%. Die Beleuchtung wurde automatisch in einem 12/12 Stunden Rhythmus zwischen hell und dunkel durch weißes Kunstlicht geregelt (Lichtintensität in der Hell-Phase beträgt 320 Lux). Die Licht/Tagphase dauerte dabei von 6:00 Uhr bis 18:00 Uhr, die Dunkel/Nachtphase von 18:00 Uhr bis 6:00 Uhr. Die Ratten wurden *ad libitum* mit Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse (Ssniff R/M-Haltung, 10mm, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert. Ebenfalls stand ihnen entkeimtes Wasser (ozoniert, mit HCl angesäuert) mit einem pH-Wert von 2,6 bis 3 *ad libitum* zur Verfügung.

2.3 Materialien

Natriumchlorid (NaCl) 0,9%

Natriumchloridlösung in einer Konzentration von 0,9% enthält 154 mmol/l NaCl und besitzt somit eine theoretische Osmolarität von 308 mosmol/l. Aufgrund der somit vorhandenen Isotonität zum Blut und der guten Kompatibilität mit anderen Arzneimitteln wird die isotonische Kochsalzlösung häufig als Transportsubstanz für viele Arzneimittel verwendet. 0,9%ige isotone Kochsalzlösung (Fa. Braun, Melsungen) wurde in der vorliegenden Untersuchung zur Lösung von Nocistatin verwendet. Daher diente eine mit 0,9%igem NaCl behandelte Versuchsgruppe als Kontrollgruppe.

Dimethylsulfoxid (DMSO) 100%

DMSO ist eine farblose, gering toxische, amphiphile Flüssigkeit, die sowohl lipophile als auch hydrophile Eigenschaften aufweist. Dadurch verfügt es über eine gute und schnelle Penetration von biologischen Membranen. DMSO steht in der Diskussion, eine eigene pharmakologische Wirkung auf die Schmerzentwicklung zu haben (Pope and Oliver 1966; Murdoch 1982; Dirig, Isakson et al. 1998). Das in diesen Untersuchungen verwendete 100%ige DMSO stammte von der Firma Sigma, Schnelldorf.

Artificial Cerebrospinal Fluid (ACSF)

ACSF ist eine künstlich hergestellte Liquorflüssigkeit, bestehend aus 124 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,25 mM NaH₂PO₄, 2 mM MgSO₄, 10 mM Glucose, ad 1000 mL dH₂O. ACSF soll die Zusammensetzung und Fähigkeiten von Liquor nachahmen und besonders gewebeschonend sein (Kazim, Enam et al. 2010).

Nocistatin

In dieser Untersuchung wurde Nocistatin (N215-500UG) von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) in fünf Konzentrationen, 0,01 µg/200 µL, 0,05 µg/200 µL, 0,5 µg/200 µL, 1 µg/200 µL und 50 µg/200 µL, eingesetzt. Nocistatin wurde in 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst, aliquotiert, verblindet und bei -20°C eingefroren. Jeweils 200 µl wurden mit Hilfe der Mini-Infusionspumpen intrathekal infundiert.

2.4 Allgemeiner Versuchsablauf

Das experimentelle Protokoll gliedert sich in die folgenden Schritte:

1. Klinische Untersuchung der Tiere.
2. Messung der mechanischen Allodynie am unmanipulierten Tier zur Ausgangswertbestimmung.
3. Induktion einer Neuropathie nach dem Bennett-Modell mittels Ligatur des linken *N. ischiadicus* mit 4 lockeren Catgut Fäden unter Allgemeinanästhesie mit Pentobarbital (Chronic Constriction Injury (CCI)).
4. Katheter- und Pumpenimplantation: Nach Stichinzision der *Membrana atlantooccipitalis* wurde ein dünner Polyethylenschlauch in den Spinalraum bis in Höhe des Lumbalmarks vorgeschoben, woran eine osmotische Mini-Infusionspumpe (Alzet[®]) angeschlossen wurde, die kontinuierlich über 24 Stunden die verschiedenen Nocistatinkonzentrationen (Kontrollgruppe mit NaCl) in den Spinalkanal abgab.
5. 24 Stunden post OP erfolgt die erste sensorische Testung und im Anschluss die Entfernung der Pumpen.
6. Im weiteren Versuchsverlauf wurden die Tiere alle zwei Tage über einen Zeitraum von 14 Tagen einer sensorischen Testung unterzogen und am Ende des Versuches durch eine Überdosis Pentobarbital getötet.
7. Stichprobenartige Obduktion der Tiere, inkl. Lageüberprüfung der intrathekalen Katheter.

In Abbildung 6 ist der zeitliche Versuchsablauf bei allen Gruppen schematisch dargestellt. In Tabelle 2 sind die Gruppeneinteilung, die Gruppenstärke (n) und die Dosierungen der verabreichten Substanzen dargestellt.

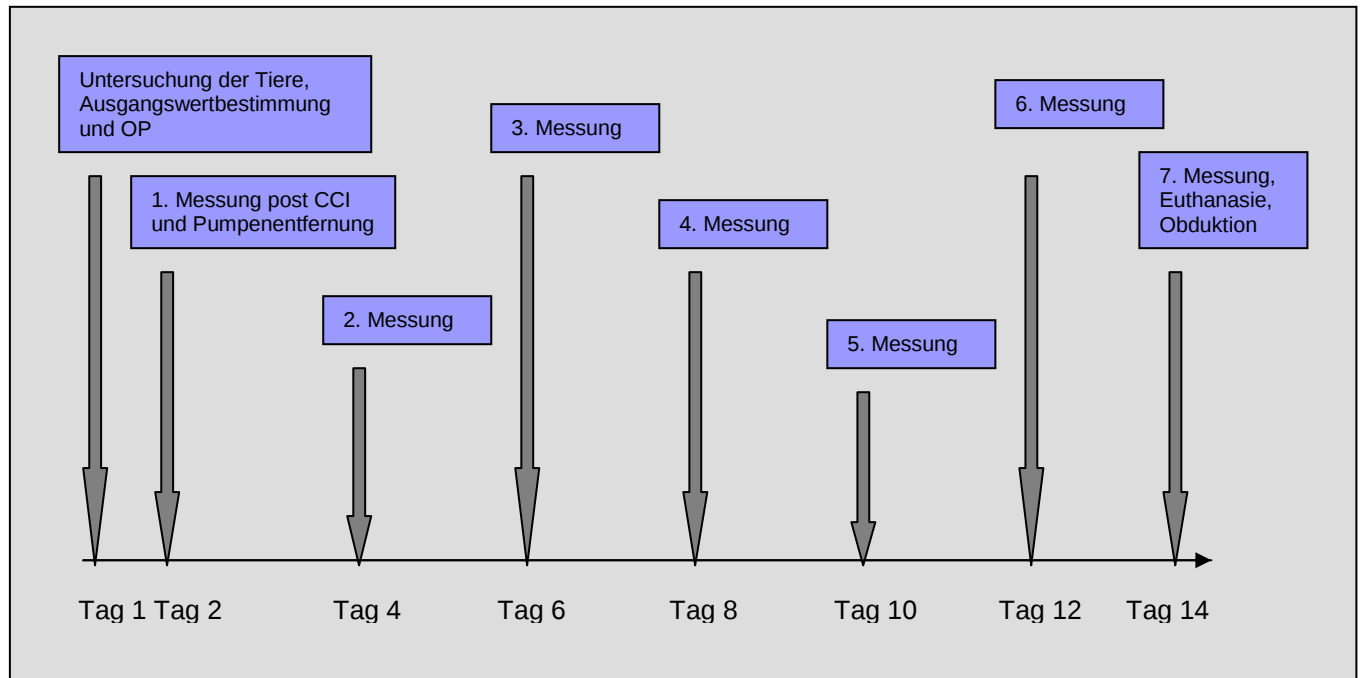


Abbildung 6: Schematischer Versuchsplan. Zur „Ausgangswertbestimmung“ und „Messung“ werden die Tiere der beschriebenen Verhaltensuntersuchung unterzogen. „OP“ beinhaltet alle beschriebenen operativen Eingriffe.

Tabelle 2: Gruppeneinteilung, Dosierungen und Gruppenstärke

Gruppe	Verabreichte Substanz	Dosis	Anzahl der Tiere (n)
1	Nocistatin	0,01 µg	6
2	Nocistatin	0,05 µg	6
3	Nocistatin	0,5 µg	6
4	Nocistatin	1 µg	6
5	Nocistatin	50 µg	6
6	NaCl 0,9%		6
7	DMSO 100%		6
8	ASCF		6

2.5 Verhaltensuntersuchungen

In Verhaltensexperimenten wurden evozierte Schmerzen in Form der mechanischen Allodynie, die für die Ausprägung eines chronischen Schmerzes als wichtigster Parameter gilt, gemessen. Darüber hinaus wurde die Messung für eine weitere Form von evozierten Schmerzen, die thermale Hyperalgesie, untersucht und als mögliche Verhaltenstestung in Betracht gezogen. Alle Verhaltensmessungen fanden unter den ethischen Gesichtspunkten der IASP zu Untersuchungen von experimentellem Schmerz am wachen Tier statt (Zimmermann 1983).

Die Ausgangswertbestimmung der mechanischen Allodynie und der thermalen Hyperalgesie wurde vor Manipulation der Tiere durchgeführt. Die mechanische Allodynie wurde durch den Pfotenrückzugsschwellenwert (Paw Withdrawal Threshold = PWT) in Gramm mit Hilfe des Aesthesiometers an beiden Hinterpfoten der Ratte mehrfach bestimmt. Zur Bestimmung der thermalen Hyperalgesie wurde die Pfotenrückzugslatenz (Paw Withdrawal Latency = PWL) in Sekunden mit Hilfe des Plantartests[®] an beiden Hinterpfoten der Ratte gemessen. Die Messung der thermalen Hyperalgesie hat sich bei der Etablierung der Methodik als nicht verlässlich erwiesen, woraufhin sie in der Hauptuntersuchung nicht angewendet wurde. Jede Pfote wurde somit mit dem Aesthesiometer zur Bestimmung der mechanischen Allodynie an jedem Untersuchungstag sechs Mal gemessen. Aus den einzelnen Messungen wurde der Mittelwert errechnet. Die gleichen Bestimmungen wurden an den weiteren Versuchstagen durchgeführt.

2.5.1 Mechanische Allodynie (Dynamic Plantar Aesthesiometer[®])

Das Dynamic Plantar Aesthesiometer[®] (Ugo Basile, Italien Cat.No. 37400) ermöglicht durch Messung des Pfotenrückzugsschwellenwertes eine quantitative Aussage zur Entstehung einer mechanischen Allodynie, woraus auf einen bestehenden neuropathischen Schmerz geschlossen werden kann. Dieses Gerät basiert auf den in der Neurologie und Schmerzforschung seit Langem eingesetzten „von Frey“ Filamenten (von Frey 1896). Die Messung der Allodynie kann durchgeführt werden, ohne die Tiere in Stress zu versetzen und ohne dass sie direkt vom Untersucher beeinflusst oder fixiert werden müssen. Dies ermöglicht objektive und reproduzierbare Ergebnisse.

Aufbau und Funktionsweise:

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 7 dargestellt. Die Tiere sitzen auf einem erhöht angebrachten feinmaschigen Drahtgitternetz, worunter sich die frei bewegliche Messapparatur mit dem abgerundeten Metallfilament (von Frey Filament) befindet. Auf dem Drahtgitterboden sind zwei Plexiglasboxen ((L) 39 x (B) 21 x (H) 14 cm) montiert, in denen sich die Tiere frei bewegen können, und die mit einem Deckel geschlossen werden. Die Messapparatur besteht aus einem zylindrischen Aluminiumgehäuse und einem Spiegel, der die Positionierung unter der Pfote der Ratte erleichtert. Das Metallfilament (Durchmesser 0,5 mm) wird von einem sich in dem Gehäuse befindlichen elektrodynamischen Motor nach oben bewegt. In der vorliegenden Untersuchung wurde der Druck kontinuierlich und proportional zur Zeit in 0,5 g Schritten gesteigert, so dass nach 20 Sekunden ein maximaler Druck von 50 g erreicht wurde. Die Messung stoppt automatisch, sobald die Ratte ihre Pfote dem Reiz entzieht. Die erlangte Kraft wird ebenso wie die Latenzzeit der Messung in einem digitalen Display angezeigt und wurde schriftlich notiert.

Der Reiz, der von dem von Frey Filament erzeugt wird, ist ein nicht schmerzhafter Reiz.

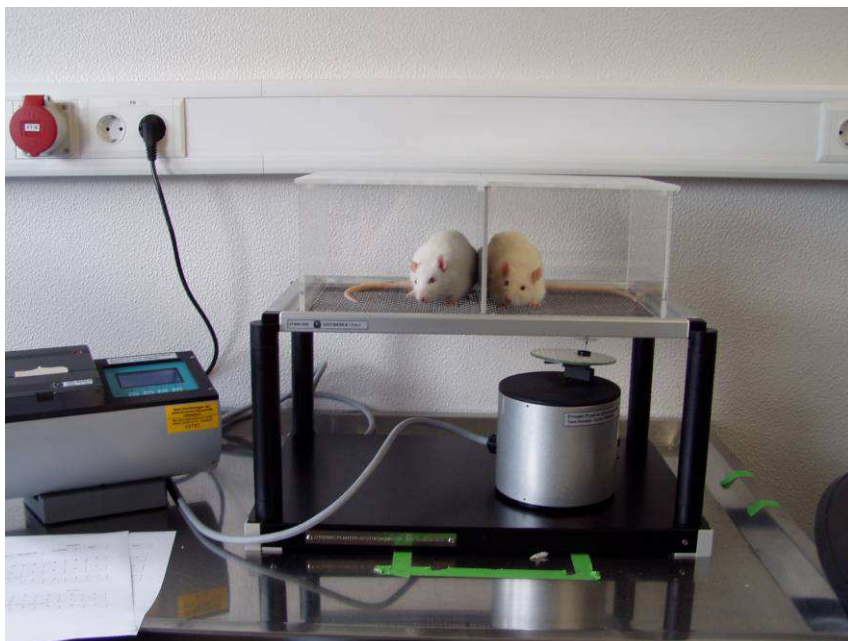


Abbildung 7: Aufbau des Dynamic Plantar Aesthesiometers® mit Tieren im Versuch

2.5.2 Thermale Hyperalgesie (Plantartest[®])

Die Messung mit dem Plantartest[®] (Plantar Test 7370[®] Firma Ugo Basile; Italien) ermöglicht laut Literatur und vorausgehenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe eine standardisierte Verhaltenstestung am wachen Tier und erlaubt eine Dokumentation von veränderter thermaler Wahrnehmung in Folge von neuropathischen Schmerzzuständen (Simpson, Gondo et al. 1997). Erstmals wurde dieses Verfahren 1988 von Hargreaves beschrieben (Hargreaves, Dubner et al. 1988).

Aufbau und Funktionsweise:

Der Versuchsaufbau ist in Abbildung 8 dargestellt. Die Tiere befinden sich während der Messung in einer (L) 24 x (B) 19 x (H) 15 cm (Fa. Ugo Basile) großen Plexiglasbox, wovon drei Boxen aneinandergebaut sind. Die Tiere können sich in den Boxen frei bewegen. Vor Beginn der Untersuchung erfolgt eine 10-minütige Akklimatisierungsphase. Diese ermöglicht, dass sich die Tiere möglichst stressfrei und unabhängig von äußeren Einflüssen bewegen. Unterhalb des Plexiglasbodens befindet sich eine frei bewegliche Infrarotlichtquelle, die nach Aktivierung einen gerichteten Wärmereiz (die I.R.-Intensität beträgt 50 Watt/Sekunde) ermöglicht und mit Hilfe eines Fadenkreuzes unter der Ratte positioniert wird. Die Infrarotlichtquelle wurde präzise unter der Hinterpfote positioniert. Diese Messung wurde an beiden Hinterpfoten sechs Mal durchgeführt. Die rechte, gesunde Pfote fungiert hierbei als Referenzwert. Wenn das Tier Schmerz empfindet und die Pfote wegzieht, stoppt die Wärmequelle automatisch und zeigt die Pfotenrückzuglatenz oder Paw withdrawal latency (PWL) mit 0,1 sek. Genauigkeit auf einem digitalen Display an (siehe Abbildung 8). Um Gewebeschäden zu vermeiden, schaltet sich die Infrarotlichtquelle nach maximal 30 Sekunden selbstständig aus.

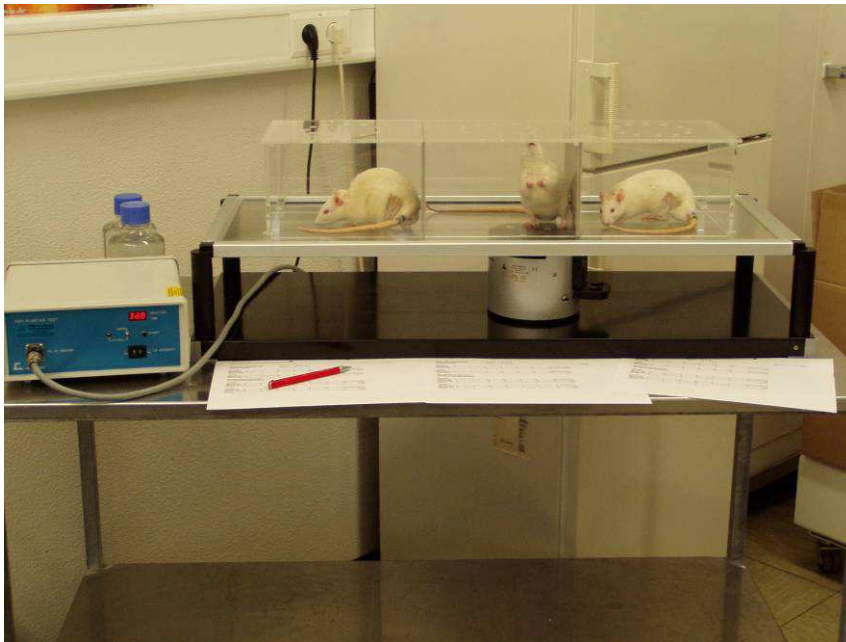


Abbildung 8: Aufbau des Plantartest® mit Tieren im Versuch

Grundvoraussetzung für die Anwendung dieser Messapparatur ist jedoch, dass die plantare Pfortenseite der beiden Hinterpfoten des Versuchstieres direkten Kontakt zu der Plexiglasplatte, auf dem das Tier positioniert ist, hat. Wenn das Tier die Hinterpfote nicht oder nicht vollständig belastet, kann keine direkte Wärmeübertragung der Infrarotlichtquelle auf die Pfote mehr erfolgen und die Messung kann nicht korrekt durchgeführt werden. Bei der Etablierung der Methodik stellte sich heraus, dass es durch die Entwicklung eines neuropathischen Schmerzes an der linken Hintergliedmaße bei der überwiegenden Anzahl der Tiere zur Ausprägung einer Schonhaltung der Pfote kam. Die Tiere belasteten die Pfote gar nicht oder nicht vollständig, krümmten die Zehen auf oder hielten die ganze Gliedmaße hoch. Dies ließ eine korrekte Messung im Rahmen der Fragestellung nicht zu. Aus diesem Grunde wurde die Messung der thermalen Hyperalgesie mit diesem Modell in dieser Untersuchung als nicht geeignet betrachtet und als Verhaltenstestung in der Hauptuntersuchung nicht mehr durchgeführt.

Das Hauptaugenmerk der Untersuchung liegt demzufolge auf dem wichtigsten Merkmal bei der Ausprägung einer Neuropathie, der mechanischen Allodynie, die in dieser Untersuchung verlässlich gemessen werden konnte.

2.6 Operative Eingriffe

2.6.1 Operationsvorbereitungen

Alle operativen Eingriffe fanden im Operationsbereich der Tierversuchsanlage statt. Die Tiere wurden vor den Eingriffen gründlich klinisch untersucht, gewogen und erhielten eine Farbmarkierung am Schwanz.

Die Tiere wurden mit 60 mg/kg Pentobarbital (Narcoren®, Merial) als *intraperitoneale* Injektion (i.p.) in Narkose gelegt. Pentobarbital ist in diesen Untersuchungen verwendet worden, da es keinen messbaren Einfluss auf die Ausprägung einer Neuropathie hat (Muth-Selbach, Dybek et al. 2004). Nach dem Erlöschen von Flucht-, Stell-, und Lidreflexen wurden die Tiere im Nackenbereich und am linken Oberschenkel gründlich rasiert und desinfiziert (Dibromol® Tinktur farblos, Trommsdorff Arzneimittel), die Augen wurden durch Vidisic Augengel® (Dr. Mann Pharma) vor dem Austrocknen geschützt. Um einem Abfall der Körpertemperatur vorzubeugen, wurden die Tiere während der gesamten Narkose auf eine Wärmematte gelegt. Um einer Dehydratation entgegenzuwirken, wurde den Tieren nach Narkoseeinleitung 5 ml körperwarme NaCl-Lösung *subcutan* (s.c.) appliziert. Die Tiere wurden über die gesamte Dauer der Operation bis zum vollständigen Erwachen aus der Narkose tierärztlich überwacht.

2.6.2 Intrathekale Katheterisierung

Um die unterschiedlichen Nocistatin-Dosierungen einschließlich der NaCl-Lösung in der Kontrollgruppe direkt an ihren putativen Wirkort, das lumbale Rückenmark, zu applizieren, wurde ein intrathekaler Katheter implantiert. An den in den Wirbelkanal verbrachten Katheter wurde am proximalen Ende eine Mini-Infusionspumpe installiert, die eine kontinuierliche Substanzapplikation über 24 Stunden nach dem osmotischen Prinzip ermöglicht.

2.6.2.1 Versuchsmaterial

Katheter

In diesen Untersuchungen wurden spezielle „Rat intrathecal Catheter“ der Firma DURECT Cooperation, ALZET osmotic Pumps (Cupertino, USA, Order No.: 0007740) verwendet (siehe Abbildung 9), die für Versuchstiere ab einer Größe von 300 g Körpergewicht zur intrathekalen Implantation geeignet sind. Der Innendurchmesser des Katheters beträgt 0,18 mm, der Außendurchmesser beträgt 0.36 mm. Die Länge des Katheterteils, welches in den Wirbelkanal vorgeschoben wird, beträgt 10 cm, wobei der Katheter individuell gekürzt werden kann. Das Material des Katheters ist Polyurethan. Innen liegend befindet sich ein Führungsdraht aus teflonummanteltem rostfreiem Stahl, der nach der Implantation entfernt wird. Die gesamte Katheterlänge beträgt 23,7 cm.

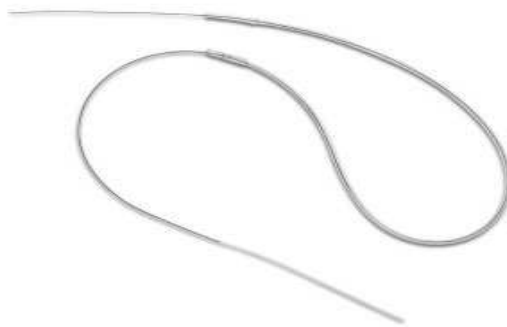


Abbildung 9: Darstellung „Rat intrathecal Catheter“ (DURECT Corporation)

Mini-Infusionspumpen

Für diese Untersuchungen wurden osmotische Pumpen der Firma DURECT Cooperation, ALZET osmotic Pumps (Cupertino, USA) verwendet. Das Modell 2001D (dargestellt in Abbildung 10) hat eine Füllgröße von 200 μ l und fördert über einen Zeitraum von 24 h kontinuierlich eine Menge von 8 μ l / Stunde. Diese Mini-Infusionspumpen beruhen auf einem osmotischen Wirkprinzip: Zwischen dem flexiblen Wirkstoffreservoir in der Pumpe und der Außenhülle, welche eine semipermeable Membran darstellt, befindet sich eine Salzmanschette. Die hohe Osmolarität der Salzmanschette im Vergleich zum umgebenen Gewebe, in das die Pumpe implantiert wurde, bewirkt die Eindiffusion des Wassers in die Pumpe. Wenn das Wasser in die

Salzmanschette eindringt, wird das flexible innen liegende Wirkstoffreservoir zusammengedrückt und verdrängt so die Testsubstanz kontrolliert aus der Pumpe. Die Abgabemenge der Pumpe wird durch die definierte Permeabilität der äußeren Membran vorgegeben. Die Pumpen sind zum einmaligen Gebrauch bestimmt (Theeuwes and Yum 1976).

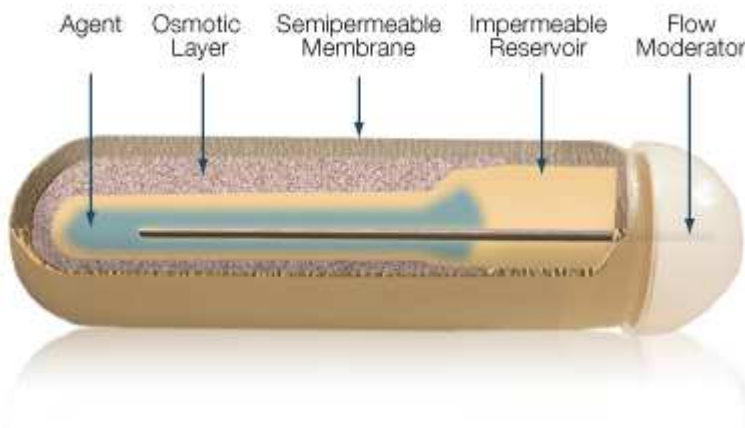


Abbildung 10: Darstellung des Aufbaus der Mini-Infusionspumpe der Fa. Alzet (DURECT Corporation)

2.6.2.2 Operationsmethode zur Implantation der Intrathekalkatheter und der Mikroinfusionspumpe

Die Methode der hier durchgeführten intrathekalen Katheterisierung wurde erstmals 1976 beschrieben (Yaksh and Rudy 1976). Sie dient dazu, die zu testenden Substanzen direkt an den gewünschten Wirkort, das Dorsalhorn im lumbalen Rückenmark, zu verbringen.

Der Kopf der Ratten wurde zur Stabilisierung in einen so genannten Stereotakt (Trent Wells. Inc., So.Gate, Calif., USA) eingespannt, der eine dorso-ventrale Bewegung des Kopfes zulässt, jedoch beidseits lateral fixiert. Die Ratte befindet sich hierbei in Bauchlage. Es wurde darauf geachtet, das Tier in einer möglichst physiologischen Haltung, gerade und gestreckt in der *corda dorsalis*, zu fixieren. Nach wiederholter Desinfektion des OP-Feldes wurde mit einem Skalpell (13er Klinge, Fa. Braun Aesculab) ein Hautschnitt von ca. 1 cm Länge auf einer Linie zwischen *Os occipitale*

(*Tubercula occipitalis* als Orientierungspunkt) und dem *Processus spinosus* des *Axis* geführt. Anschließend wurden die sehnigen Anteile der darunter liegenden Kopfmuskeln (Faszien der *Mm. rectus capitis dorsalis major* und *minor*) durchtrennt und mit Hilfe eines Wundspreizers zur Seite gehalten. Die darunter liegende *Membrana atlantooccipitalis dorsalis* wurde mit Hilfe eines scharfen Löffels freigelegt. Darunter befindet sich das *Foramen atlantooccipitale*. Die freigelegte *Membrana atlantooccipitalis dorsalis* wurde vorsichtig mit einem 11er Skalpell angeritzt. Abbildung 11 zeigt den Operationssitus nach Freilegen der *Membrana atlantooccipitalis*. Durch die enge Verwachsung der *Membrana atlantooccipitalis* mit der *Dura mater* und die Verbindung zur *Arachnoidea*, die der *Dura mater* lose anliegt, wird auf diesem Wege der subarachnoidale Raum eröffnet. *Liquor cerebrospinalis* fließt aus dem intrathekalen Raum bis zum Erlangen eines Druckausgleiches ab.

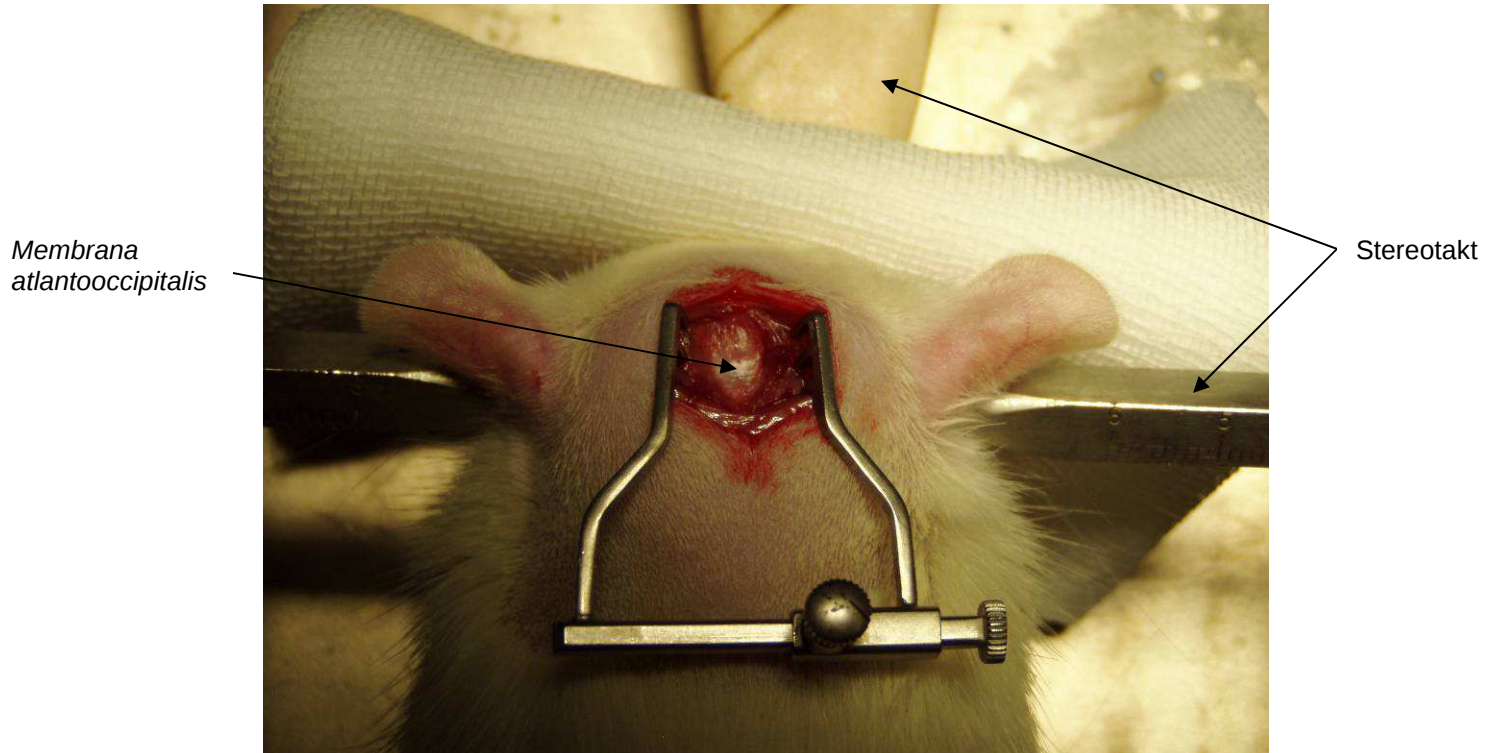


Abbildung 11: Operationssitus nach Freilegung der schimmernden *Membrana atlantooccipitalis*. Die Ratte ist unter Allgemeinanästhesie im Stereotakt fixiert. Ein Wundspreizer ermöglicht freie Sicht auf die Membran.

Der Kopf des Tieres wurde nun maximal nach ventral gebeugt, der Katheter vorsichtig in caudo-dorsaler Richtung in den intrathekalen Raum eingeführt und ca. zehn Zentimeter bis zum lumbalen Teil der Wirbelsäule nach caudal vorgeschoben. Anschließend wurde der Führungsdraht entfernt und der Katheter vorläufig mit Hilfe eines Zweikomponentenklebers (Stabiloplast Kunststoff 488, Renfert GmbH), der gleichzeitig das Liquorloch an der Inzision der Membran verschließt, fixiert. Abbildung 12 zeigt den Operationssitus direkt nach Implantation des Katheters durch die *Membrana atlantooccipitalis*. Der Verlauf des Katheters im Subarachnoidalraum ist schematisch in Abbildung 13 dargestellt.



Implantierter
intrathekaler Katheter

Abbildung 12: Operationssitus unmittelbar nach der Katheterimplantation. Der Katheter ist durch die Inzision der *Membrana atlantooccipitalis* in den Subarachnoidalraum bis zum lumbalen Bereich des Rückenmarkes vorgeschoben worden. An das herausragende Stück des Katheters wird die Mini-Infusionspumpe adaptiert.

Die Muskeln wurden mit sterilem resorbierbarem Nahtmaterial (5-0 Vicryl, Ethicon) adaptiert wobei eine Katheterschleife zur weiteren Fixation des Katheters mit eingenäht wurde. Im Anschluss an die Muskelnäht wurde im Nackenbereich des Tieres stumpf die Haut von der Unterhaut getrennt, um die Mikroinfusionspumpe 24 Stunden subkutan zwischen den Schulterblättern der Ratte unterbringen zu können. Die zuvor aktivierte Pumpe wurde an den Katheter adaptiert, unter die Haut verbracht und die Haut wurde mit Hautklammern verschlossen (Leukoclip® SD). Nach 24 Stunden wurden die Pumpen in einer kurzen Isofluran-Narkose wieder entfernt. Dabei wurde die Hautnaht geöffnet, die Pumpe vom Katheter gelöst, der Katheter mithilfe einer Feuerzeugflamme verschlossen und die Haut wieder mit Hautklammern verschlossen.

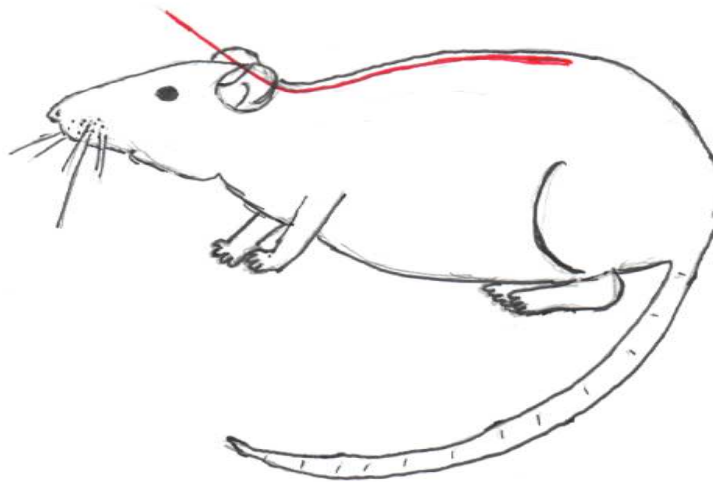


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Lage des Katheters (rot) im Subarachnoidalraum der Ratte

An diese Operation schloss sich die Nervenläsion nach dem Bennett-Modell (Chronic Constriction Injury) an (Bennett and Xie 1988). Die Lage der Katheter wurde stichprobenartig durch eine postmortale intrathekale Methylenblau-Injektion im Rahmen einer Obduktion verifiziert.

2.6.3 Induktion einer Neuropathie nach dem Bennett-Modell „Chronic Constriction Injury (CCI)“

Die Induktion einer Neuropathie mittels „Chronic Constriction Injury“ wurde von (Bennett and Xie 1988) als Modell für neuropathischen Schmerz etabliert.

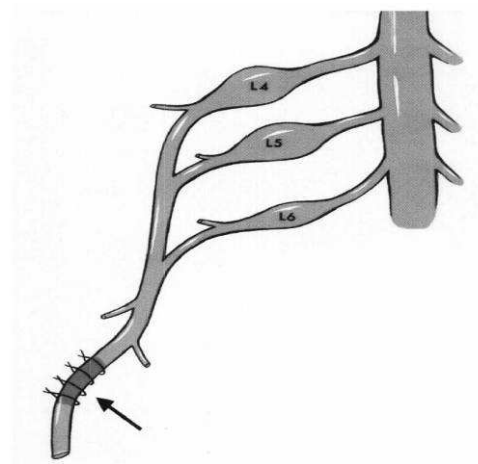


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Ligaturen des *Nervus ischiadicus* nach dem Bennett-Modell (Hogan 2002)

Die CCI wurde in diesen Untersuchungen bei allen Tieren nur am linken *N. ischiadicus* durchgeführt. Die rechte Hinterpfote blieb somit untraumatisiert und diente über den Zeitraum des Versuches als „Kontrollpfote“.

Für den operativen Eingriff wurde das Tier auf die rechte Körperseite gelegt, steril abgedeckt und die rasierte Hautfläche des linken Oberschenkels wurde wiederholt desinfiziert (Dibromol® Tinktur farblos, Trommsdorff Arzneimittel). Die Haut wurde auf einer cranioventro-caudodorsalen Linie zwischen Knie und *Tuber coxae* mit einem 13er Skalpell auf einer Länge von ca.1,5 cm durchtrennt. Der darunter liegende *M. biceps femoris* wurde stumpf präpariert und in seine Bäuche aufgetrennt. Darunter erscheint der *N. ischiadicus* auf Höhe seiner Trifurkation. Der Nerv wurde ohne direkte Berührung vorsichtig freipräpariert. Proximal der Trifurkation wurde der *N. ischiadicus* mit vier lockeren Catgutfäden (3-0), wie schematisch in Abbildung 14 dargestellt, im

Abstand von ca. 1-2 mm ligiert. Der Faden wurde nur so leicht angezogen, bis eine leichte reflexartige Reaktion des Beines auf die Berührung des Nerves festgestellt wurde. Der gewünschte Grad der Nervenkonstriktion war damit erreicht. Abbildung 15 zeigt den Operationssitus des freigelegten Nerves, Abbildung 16 den Operationssitus des bereits ligierten *N. ischiadicus*. Die Muskulatur wurde anschließend mit resorbierbarem Nahtmaterial (5-0 Vicryl, Ethicon) fixiert. Die Haut wurde mit Hautklammern (Leukoclip® SD) verschlossen.



Abbildung 15: Operationssitus mit freigelegtem *Nervus ischiadicus*



Abbildung 16: Operationssitus mit ligiertem *Nervus ischiadicus*

Sobald die Tiere aus der Narkose erwacht waren und sich gezielt bewegen konnten, wurden sie in Einzelkäfige umgesetzt (Makrolonkäfige vom Typ III R).

Die nach dem Bennett-Modell für neuropatischen Schmerz installierten lockeren Ligaturen erzeugen eine intraneurale Ödematisierung des linken *N. ischiadicus*, welche zu einer Selbststrangulation des Nervens führt. Durch diese „Chronic Constriction Injury (CCI)“ prägt sich nach 10-14 Tagen ein neuropatischer Schmerz aus, der sich vor allem in den für neuropatischen Schmerz typischen Merkmalen, der Allodynie und der Hyperalgesie äußert. Die Tiere zeigen dann häufig eine Schonhaltung der linken Hinterpfote.

3 Statistische Auswertungen

3.1 Verwendete Daten

Alle Messdaten wurden in einer Mastertabelle zusammengefügt und mit Hilfe von SPSS 17, je nach Fragestellung unterschiedlich, statistisch ausgewertet. Dabei wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Nocistatin-Dosierungen wurde für alle Messparameter und den Testgrößen Differenzen zwischen rechts und links, an jedem Versuchstag mit Hilfe der Varianzanalyse und dem Dunnett post-hoc Test durchgeführt. Die graphische Darstellung erfolgt als Verlaufskurve der Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen über die Versuchsdauer. Jeder Datenpunkt präsentiert den Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SEM) einer Versuchsgruppe von 6 Tieren ($n=6$) zu einem Zeitpunkt. Die x-Achse definiert die Zeitpunkte in Tagen. Die y-Achse zeigt bei der Messung mit dem Aesthesiometer die aufgewendete Kraft in Gramm.

Um die Gesamtwirkung der einzelnen Konzentrationen über den gesamten Zeitverlauf besser vergleichen zu können, wurde analog die Fläche unter der Kurve (AUC) ausgewertet. Die Darstellung erfolgt in einem Balkendiagramm, wobei die einzelnen Balken die Mittelwerte von jeweils 6 Tieren ($n=6$) einer Gruppe $\pm$ Standardfehler (SEM) darstellen. Zur Berechnung der Flächen unter der Kurve wurde die Trapezregel zu Grunde gelegt.

3.2 Wirkung von Nocistatin

Der Vergleich zwischen den verschiedenen Nocistatin-Dosierungen wurde für alle Messparameter und den Testgrößen „Differenzen zwischen rechts und links“ an jedem Versuchstag mit Hilfe der Varianzanalyse und dem Dunnett post-hoc Test durchgeführt. Der Dunnett Test testet im Falle eines signifikanten Ergebnisses der ANOVA jede Dosis gegen die Kontrolle (Dosis =0). Analog wurden auch alle AUC Testgrößen über den gesamten Zeitverlauf ausgewertet.

3.3 Postoperative Ausprägung der Allodynie in der Kontrollgruppe

Die NaCl-Gruppe ist in diesem Versuch als Kontrollgruppe definiert. In der Kontrollgruppe wurde Tag 1 (vor OP) mit Tag 14 verglichen. Hierzu wurde der paarweise t-Test verwendet.

3.4 Vergleich von NaCl, DMSO und ACSF auf die Ausprägung der Allodynie

Der Vergleich zwischen NaCl, DMSO und ACSF wurde für den Tag 14 mit Hilfe der Varianzanalyse (ANOVA) und einem post-hoc Test nach Tukey durchgeführt, der im Falle von Unterschieden bei allen Substanzen paarweise die Substanzen auf Unterschiede testet. Dies wurde durchgeführt für den Messparameter Allodynie für die linke und rechte Hinterpfote, den Testgrößen Differenzen zwischen rechter und linker Hinterpfote, den AUC Werten für die Zeitkurven und auch den Differenzen der AUC Werte zwischen rechts und links.

4 Ergebnisse

4.1 Erfolgsrate der Untersuchung

In dieser Untersuchung konnte eine allgemeine prozentuale Erfolgsrate (d. h., die Summe der Tiere die in dem Versuch ausgewertet wurden) von 84,75% erreicht werden. In absoluten Zahlen konnten also 50 von 59 operierten Tieren erfolgreich ausgewertet werden. 9 Tiere sind im Laufe des Versuches verstorben bzw. euthanasiert worden und konnten infolgedessen nicht mit in die Auswertung aufgenommen werden. Das entspricht einer Sterberate von 15,25%. Lediglich ein Tier wurde aufgrund von peripheren Lähmungserscheinungen an der linken Hinterpfote euthanasiert (siehe Tabelle 3).

In der vorliegenden Untersuchung wurden spezielle Katheter der Firma Alzet, die für die intrathekale Implantation bei Ratten über 300 g entwickelt wurden, verwendet (siehe Material und Methoden). Dieser Katheter hat einen Außendurchmesser von 0,36 mm. In einer vorausgegangenen Dissertation (Williams 2009), in der dickere Polyethylenkatheter (PE10 mit einem Außendurchmesser von 0,61 mm) verwendet wurden, konnte eine allgemeine prozentuale Erfolgsrate (d.h., die Summe der Tiere, die in dem Versuch ausgewertet wurden) von 55,38% erreicht werden. In absoluten Zahlen konnten 72 von 130 operierten Tieren erfolgreich ausgewertet werden. Das entspricht einer Sterberate von 44,62% der Versuchstiere. 79,31% dieser Ausfälle waren auf zentrale Lähmungserscheinungen zurückzuführen (siehe Tabelle 4).

In Abbildung 17 sind die Erfolgsraten der beiden Untersuchungen graphisch dargestellt.

Tabelle 3: Angaben zur Überlebensrate und zu den Ursachen von Ausfällen in dieser Untersuchung

Alzet-Katheter	Anzahl	%
Operierte Tiere	59	100%
Überlebensrate	50	84,75%
Sterberate	9	15,25%
Grund für Ausfall	Lähmung	1 11,11%
	Narkose und OP	6 66,67%
	Wundinfektion	1 11,11%
	natürlich verstorben	1 11,11%

Tabelle 4: Angaben der Überlebensrate und zu den Ursachen für Ausfälle in einer vorausgegangenen Dissertation (Williams 2009)

PE10 Katheter	Anzahl	%
Operierte Tiere	130	100%
Überlebensrate	72	55,38%
Sterberate	58	44,62%
Grund für Ausfall	Lähmung	46 79,31%
	Narkose und OP	7 12,07%
	Katheterdislokation	4 6,90%
	Wundinfektion	1 1,72%
	Automutilation	1 1,72%

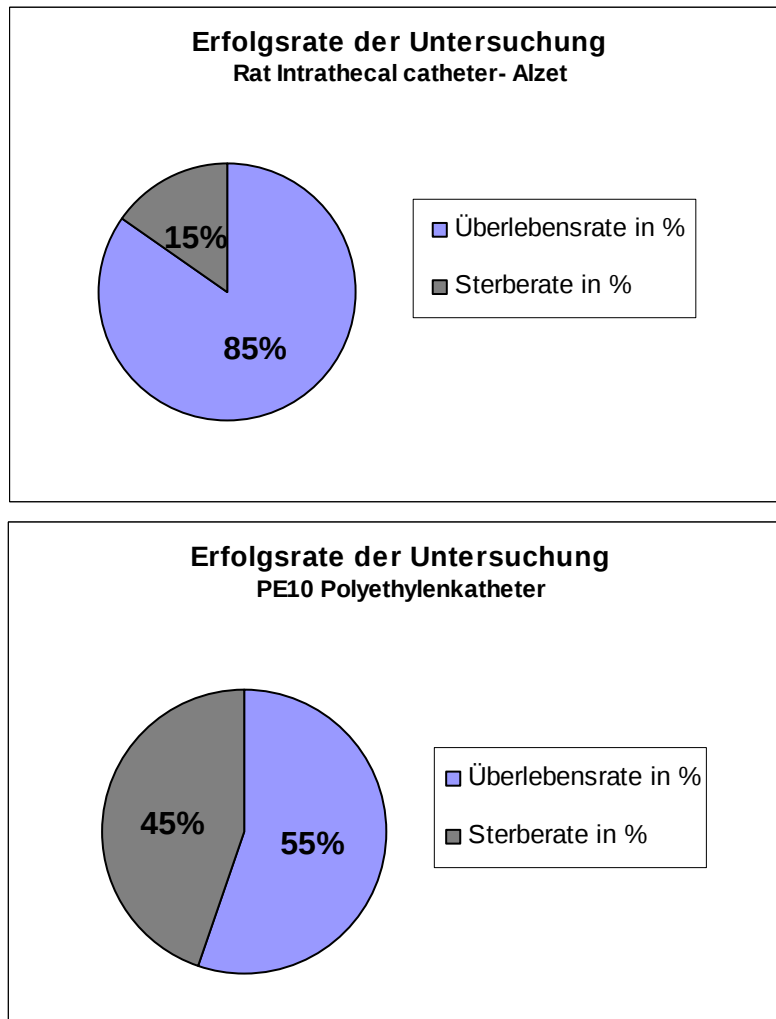


Abbildung 17: Darstellung der Überlebens- und Sterberate von intrathekal katheterisierten Tieren in Prozent. *Oben:* Vorliegende Untersuchung, bei dem die Tiere mit dem „rat intrathecal catheter“ von DURECT Cooperation, ALZET osmotic Pumps katheterisiert wurden. *Unten:* Untersuchung bei dem die Tiere mit dem PE 10 Polyethylenkatheter intrathekal katheterisiert wurde (Williams 2009).

4.1.1 Tierschutzaspekte: Monitoring, Gewichtsverläufe und klinische Aspekte

Monitoring der Tiere prae, intra und post operationem

Alle Tiere, die in den Versuch mit einbezogen wurden, wurden von approbierten Tierärztinnen gründlich klinisch untersucht. Nur Tiere, die einen guten klinischen Gesundheitsstatus aufwiesen, wurden in die Untersuchung genommen. Tiere, die Anzeichen einer klinischen Erkrankung hatten (Haut-, Augenentzündungen, Durchfall) oder Verletzungen aufwiesen (Krallenverletzungen, Bisswunden etc.), wurden nicht in den Versuch genommen. Klinische Parameter wurden an allen Versuchstagen erfasst. Dazu zählten vor allem das Verhalten, das Erscheinungsbild, der Hydratationszustand, die Körperhaltung, der Gang und das Körpergewicht der Tiere. Die Ergebnisse wurden erfasst, aber mit Ausnahme der Gewichtsentwicklung nicht qualitativ ausgewertet.

Im Laufe dieser Untersuchung und der vorangegangenen Untersuchung (Williams 2009) wurde ein Pain Score zur besseren Quantifizierung von neuropathischen Schmerzen und zur Beurteilung des Allgemeinzustands bei Ratten entwickelt, wobei die von Buckwell 1992 (Buckwell 1992) entwickelte Methode zur Belastungsquantifizierung als eine Grundlage verwendet wurde (siehe Tabelle 5). Auch wurden Überlegungen aus anderen bereits entwickelten Pain Scores (Roughan and Flecknell 2001; Roughan and Flecknell 2003; Roughan and Flecknell 2003; Mogil and Crager 2004) einbezogen und im Hinblick auf den neuropathischen Schmerz modifiziert. Mittlerweile findet dieser Pain Score in weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe Anwendung. Der Pain Score soll außerdem bei der Veranlassung einer Euthanasie im Sinne des Tierschutzes helfen.

Wichtig bei der Verwendung des Pain Scores ist, dass die untersuchende Person mit dem physiologischen Verhalten von Ratten vertraut und entsprechend in der Lage ist, pathologische Abweichungen zu erkennen und zu bewerten. Auch muss die Bewertung mit Hilfe des Pain Scores am unmanipulierten Tier stattfinden, was z.B. bedeutet, dass die Gewichtsmessung als letzter Punkt der Untersuchung stattfinden muss.

Tabelle 5 : Pain Score zur Quantifizierung neuropathischer Schmerzen bei Ratten (Williams 2009)

		Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	...	Tag 14
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 struppig und matt						
2:	Fell struppig und matt. Brillenbildung						
3:	Fell struppig und matt. Hgr. Brillenbildung						
	Äußeres Erscheinungsbild: Hydratationszustand						
0:	Fell glatt, glänzend und anliegend. Hautelastizität erhalten						
1:	Ggr. Piloerektion. Hautelastizität ggr. vermindert						
2:	Mgr. Piloerektion. Hautelastizität mgr. vermindert						
3:	Hgr. Piloerektion. 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. Gliedmaße wird leicht belastet						
2:	Mgr. Lahmheit. Gliedmaße wird kaum belastet						
3:	Hgr. Lahmheit. 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

4.1.2 Gewichtsentwicklung der Tiere im Versuch

Alle Tiere wurden zu Beginn des Versuches gewogen, um einen Ausgangswert zu erhalten und eine genaue Dosierung der Narkose zu ermöglichen. Es wurden nur Tiere mit einem Basisgewicht zwischen 300 und 400 g in den Versuch genommen, um eine homogene Tiergruppe zu haben und die Tiere bezogen auf das Gewicht und somit ihres Alters miteinander vergleichen zu können. Das Gewicht wurde im weiteren Verlauf an jedem Versuchstag bestimmt. Um eine übersichtlichere Darstellung zu gewinnen, wurden die Mittelwerte der Gewichtsermittlung aller Tiere zu den einzelnen Versuchstagen errechnet und mit Standardfehler (SEM) in Abbildung 18 dargestellt.

Um eine möglichst optimale Versorgung der Tiere post operativ zu ermöglichen und somit einer Gewichtsreduzierung und einer Dehydratation entgegenzuwirken, wurde den Tieren intra OP 0,9%ige NaCl-Lösung s.c. injiziert und das Futter gut erreichbar auf dem Käfigboden angeboten.

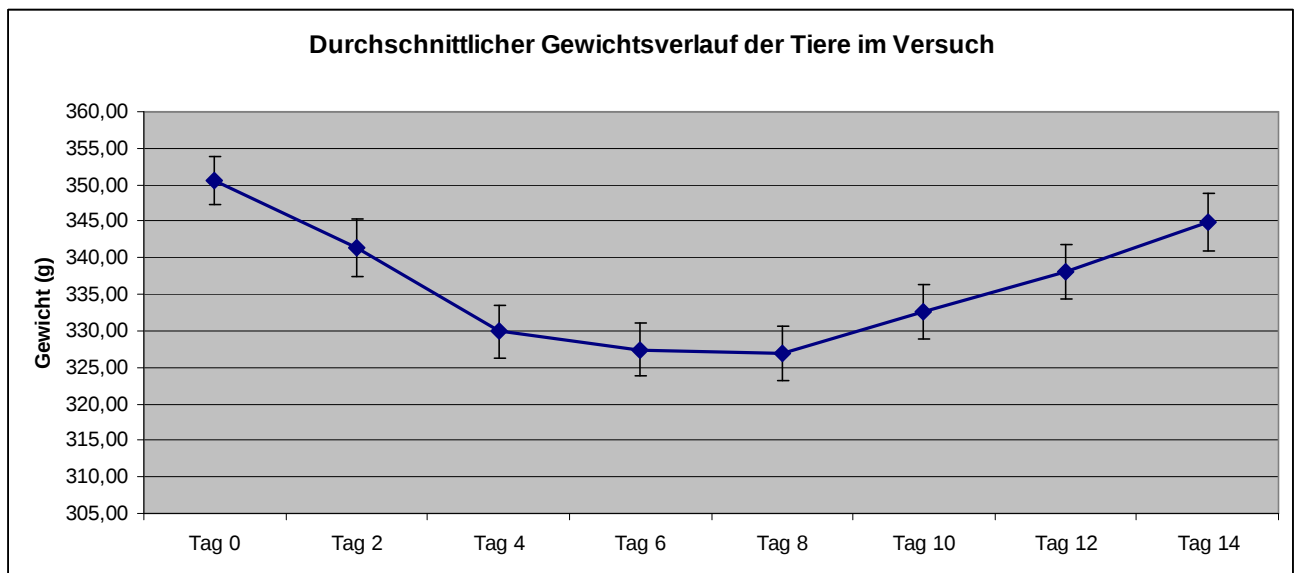


Abbildung 18: Darstellung des durchschnittlichen Gewichtsverlaufes aller in die Untersuchung eingeschlossenen Tiere (n=50). Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM)

Auffällig ist, dass alle Tiere nach der Operation an Gewicht verlieren und meist am 6. oder 8. Versuchstag ihr Minimalgewicht erreichen. Im folgenden Versuchsverlauf ist bei fast allen Tieren wieder eine Gewichtszunahme zu verzeichnen, die aber bis zum Ende des Versuches an Tag 14 bei den meisten Tieren ihren Basiswert noch nicht wieder erreicht hat. Die klinischen Beobachtungen und Untersuchungen bestätigen eine Korrelation mit dem Allgemeinbefinden der Tiere.

Tabelle 6: Durchschnittlicher Gewichtsverlust

Durchschnittlicher Gewichtsverlust in g	26,97
Durchschnittlicher Gewichtsverlust in %	7,84

Die Tiere, die in die Untersuchung eingeschlossen wurden, zeigten im post-OP Verlauf einen durchschnittlichen Gewichtsverlust von 26,97 g bzw. 7,84% (siehe Tabelle 6). Nach Buckwell, 1992 bewertet man einen Gewichtsverlust bis zu 20% als geringgradige Belastung (Buckwell 1992).

4.2 Ausprägung der Allodynie in der Kontrollgruppe

Um den Erfolg des Tiermodells für neuropathischen Schmerz zu bestätigen, wurde der Pfotenrückzugsschwellenwert (PWT in g) der linken Hinterpfote 14 Tage post OP mit jenem vor Intervention in Relation gesetzt. Der Pfotenrückzugsschwellenwert 14 Tage post OP der linken Hinterpfote war im Vergleich mit dem PWT prä OP in der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,001$) erniedrigt. Es hat sich eine deutliche mechanische Allodynie in der Kontrollgruppe an Tag 14 post OP ausgebildet (siehe Abbildung 19).

Der Vergleich der Werte der rechten Pfote vor und 14 Tage nach der Operation wies keinen signifikanten Unterschied auf, d.h., es hat sich erwartungsgemäß keine mechanische Allodynie bei der rechten Pfote ausgebildet. Da die rechte Pfote nicht manipuliert wurde und somit als „Kontrollpfote“ gilt, bestätigt diese Auswertung die Eignung dieses Tiermodells für neuropathischen Schmerz.

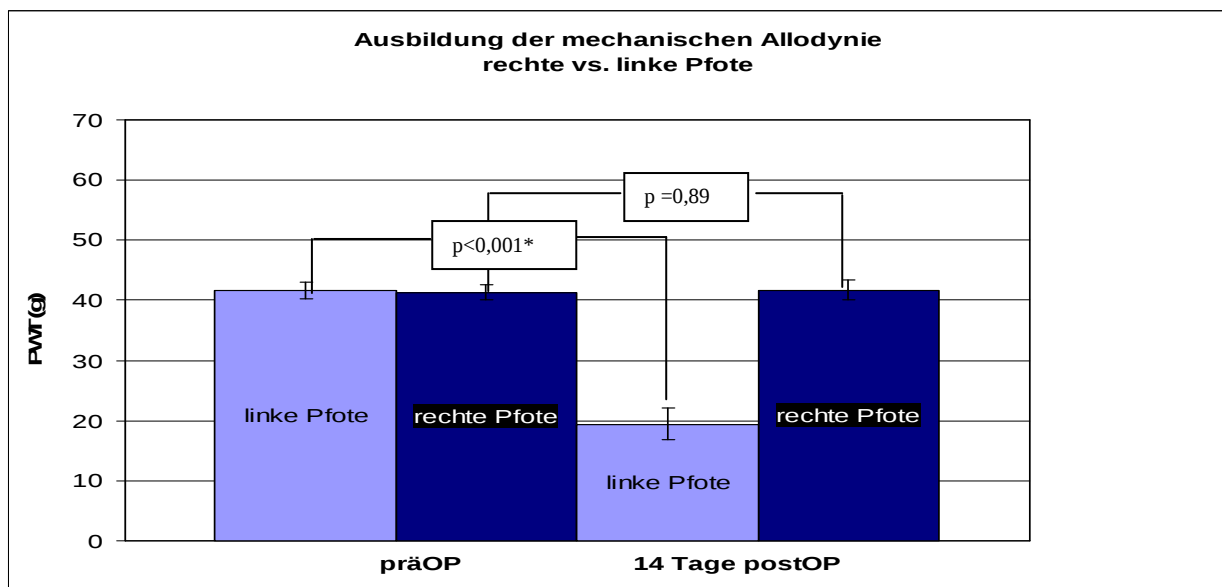


Abbildung 19: Darstellung der Entwicklung des Pfotenrückzugsschwellenwertes (Kraft (g)) im Aesthesiometer in der Kontrollgruppe (NaCl) (Mittelwert $\pm$ SEM; $*p < 0,001$; $n = 6$) jeweils an der rechten und an der linken Pfote vor der Operation und 14 Tage post-OP im Vergleich

4.3 Effekte von Nocistatin auf die induzierte Neuropathie

4.3.1 Effekte von Nocistatin auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der linken Pfote

Die Entwicklung der mechanischen Allodynie (Abbildung 20) der linken, neuropathischen Pfote zeigt einen für die Kontrollgruppe zu erwartenden typischen Verlauf. Man erkennt einen stetigen Abfall der Messwerte bis Tag 8. Danach pendeln sich die Werte um einen Wert von $20,9 \text{ g} \pm 1,4 \text{ g}$ ein. Es hat sich also eine mechanische Allodynie als Ausdruck einer schmerzhaften Neuropathie entwickelt.

Bei den Tieren, die Nocistatin erhielten, zeigt sich ein zur Kontrollgruppe ähnlicher Kurvenverlauf. In jeder dieser Gruppen bildet sich an der linken Pfote eine mechanische Allodynie aus.

Bei den Gruppen, denen Nocistatin in einer Dosierung von $0,05 \mu\text{g}$ und $0,5 \mu\text{g}$ verabreicht wurde, zeigt sich im Vergleich mit allen anderen Gruppen bis Tag 2 eine tendenziell geringere Abnahme der PWT. Ab Tag 2 nehmen in diesen zwei Gruppen die Messwerte rapide ab und sinken auf das Level der anderen Gruppen.

Die Verlaufskurve der Gruppe, die Nocistatin $50 \mu\text{g}$ verabreicht bekam, weist im Vergleich mit allen anderen Gruppen einen tendenziell sanfteren Verlauf auf und erreicht erst an Tag 14 ihren geringsten Wert ($17,7 \text{ g} \pm 3,4 \text{ g}$).

Die Wirkung aller Nocistatin- Dosierungen unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander. Es gibt auch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Nocistatin – Behandlungen und der Kontrollgruppe.

Auch die statistische Auswertung der Fläche unter den PWT-Kurven (siehe Abbildung 21) ergab für den Parameter der mechanischen Allodynie für alle Nocistatin-Konzentrationen im Vergleich untereinander und im Vergleich zu der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied.

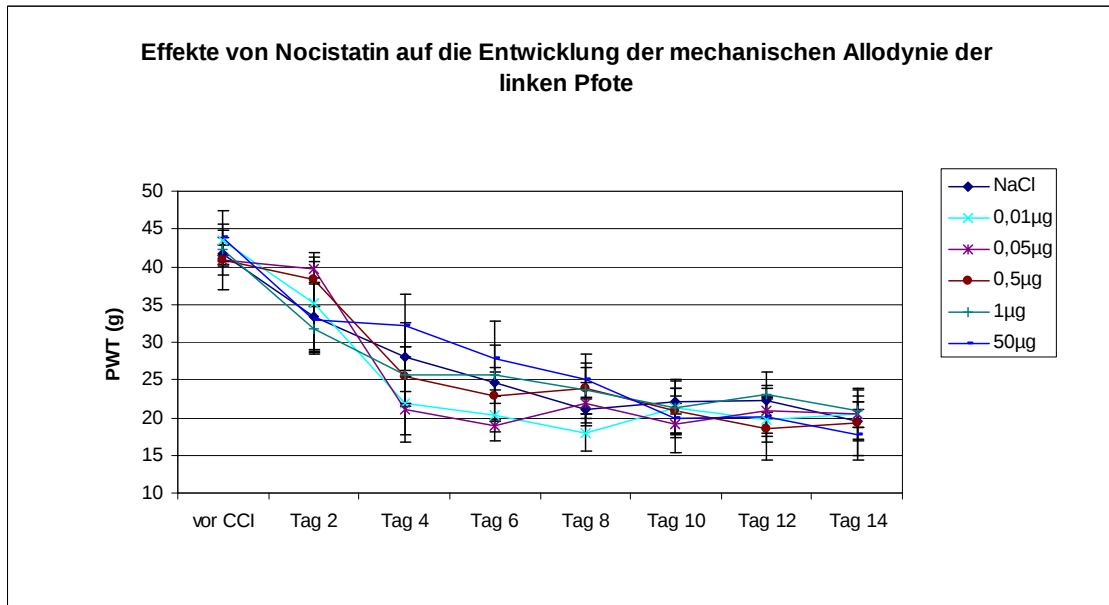


Abbildung 20: Effekt von Nocistatin auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der linken Pfote über 14 Tage. Darstellung des PWT in Gramm. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM), je $n=6$.

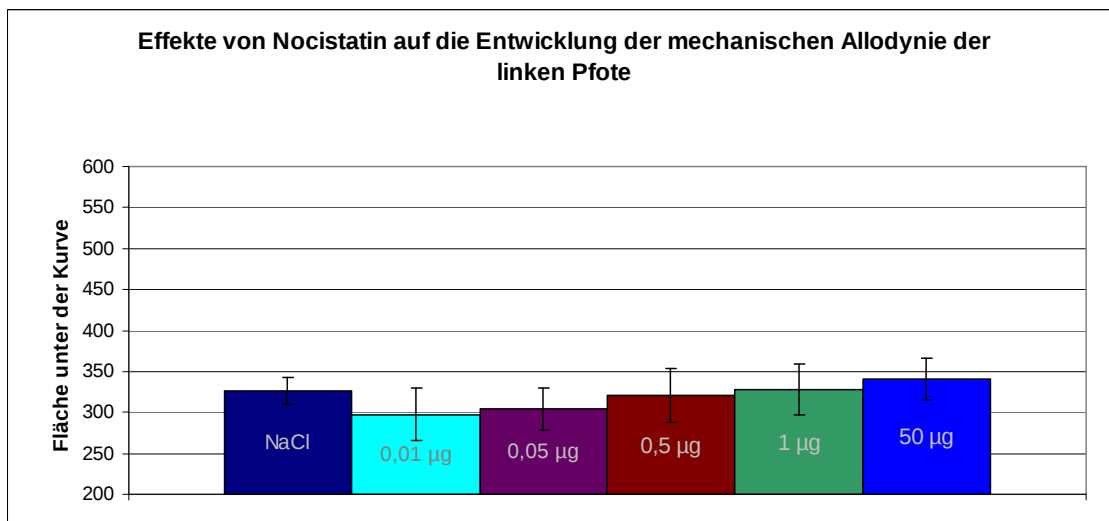


Abbildung 21: Effekt von Nocistatin auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der linken Pfote. Darstellung der Fläche unter den PWT-Kurven. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM), je $n=6$.

Tabelle 7: Wertetabelle der PWT in Gramm der linken Pfote über 14 Tage.
Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM), je n=6.

links	NaCl	DMSO	ACSF	0,01 μ g	0,05 μ g	0,5 μ g	1 μ g	50 μ g
vor CCI	41,63	41,21	43,63	43,51	40,89	40,83	42,31	43,78
SEM	1,33	2,64	1,88	2,04	3,90	2,02	1,59	3,64
Tag 2	33,29	38,80	37,71	35,10	39,61	38,29	31,79	33,04
SEM	4,60	2,88	5,78	6,13	1,13	3,53	2,99	4,59
Tag 4	28,02	31,44	23,57	21,93	21,10	25,39	25,57	32,19
SEM	4,49	5,83	4,34	4,23	4,40	3,99	3,74	4,11
Tag 6	24,74	26,85	18,92	20,33	18,92	22,79	25,73	27,80
SEM	1,83	6,08	1,93	3,32	0,82	3,33	3,92	5,01
Tag 8	21,16	25,59	18,33	17,97	21,79	23,94	23,58	24,97
SEM	1,31	5,63	2,10	2,43	2,85	4,54	3,04	2,20
Tag 10	22,12	25,27	18,08	21,28	19,08	20,85	21,20	19,88
SEM	1,68	4,94	2,18	3,65	3,80	2,96	3,78	2,05
Tag 12	22,28	23,60	16,63	19,79	20,89	18,49	22,98	20,11
SEM	1,59	5,73	2,30	3,11	3,44	4,14	3,01	2,27
Tag 14	19,44	18,83	15,11	20,46	20,40	19,39	20,84	17,71
SEM	2,61	3,79	2,29	1,66	3,23	4,44	2,05	3,42

Tabelle 8: Wertetabelle der PWT in Gramm der rechten Pfote über 14 Tage.
Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM), je n=6.

rechts	NaCl	DMSO	ACSF	0,01 μ g	0,05 μ g	0,5 μ g	1 μ g	50 μ g
vor CCI	41,35	44,53	43,82	43,01	41,29	41,90	41,44	44,35
SEM	1,24	1,91	1,81	2,12	1,78	1,70	2,29	1,78
Tag 2	44,19	46,33	46,18	44,40	47,32	47,08	45,13	46,46
SEM	2,41	1,40	2,43	3,79	0,98	1,17	2,35	1,57
Tag 4	42,31	44,26	46,43	45,87	46,11	46,39	42,44	45,17
SEM	3,08	3,36	1,76	1,46	1,67	1,43	3,12	2,35
Tag 6	42,70	41,65	42,96	45,63	44,14	43,26	43,61	41,66
SEM	1,70	2,39	2,01	1,42	1,92	2,97	2,43	1,88
Tag 8	40,22	45,50	41,86	41,43	44,57	42,89	41,20	45,75
SEM	4,72	1,61	2,69	3,50	1,05	2,24	3,19	1,24
Tag 10	41,56	42,12	40,82	44,23	38,21	43,08	41,11	42,23
SEM	2,64	2,55	2,40	2,99	2,97	2,50	2,18	3,60
Tag 12	40,49	38,97	37,67	41,14	39,21	40,79	39,85	37,04
SEM	1,69	3,57	2,01	1,06	2,06	1,87	2,66	2,34
Tag 14	41,69	38,61	37,53	40,44	35,14	37,01	40,14	38,59
SEM	1,64	1,85	2,94	2,14	3,35	3,57	2,52	3,59

4.3.2 Effekte von Nocistatin auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote

In der Kontrollgruppe zeigt sich bei der rechten (nicht operierten) Pfote über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen keine Veränderung des PWT (siehe Abbildung 22).

Es findet demnach erwartungsgemäß keine Ausprägung einer mechanischen Allodynie statt. Bei den Tieren, die Nocistatin erhielten, zeigt sich ebenfalls ein konstanter Kurvenverlauf mit geringen Schwankungen, die aber keine signifikanten Differenzen untereinander oder im Vergleich zu der Kontrollgruppe aufzeigen. In keiner der Gruppen bildet sich an der rechten Pfote eine mechanische Allodynie aus. Bei allen Gruppen steigen die Werte des PWT jedoch an Tag 2 über den Ausgangswert an. Im weiteren Verlauf fallen die Werte des PWT aller Gruppen aber wieder geringgradig ab, so dass, mit Ausnahme der Kontrollgruppe, alle gemessenen Werte an Tag 14 unter ihren jeweiligen Ausgangswerten liegen. Die Wirkungen aller Nocistatin-Konzentrationen unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant voneinander.

Es gibt keinen signifikanten Unterschied zwischen der Wirkung der Nocistatin – Dosierungen im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Die Flächen unter den PWT-Kurven, welche die Gesamtwirkung der Substanzen auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote darstellt, unterscheiden sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 23).

Fazit:

Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Einfluss der einzelnen Nocistatin – Dosierungen auf die Entwicklung der mechanische Allodynie nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis gilt sowohl für die rechte (nicht operierte) Pfote als auch für die linke (neuropathische) Pfote.

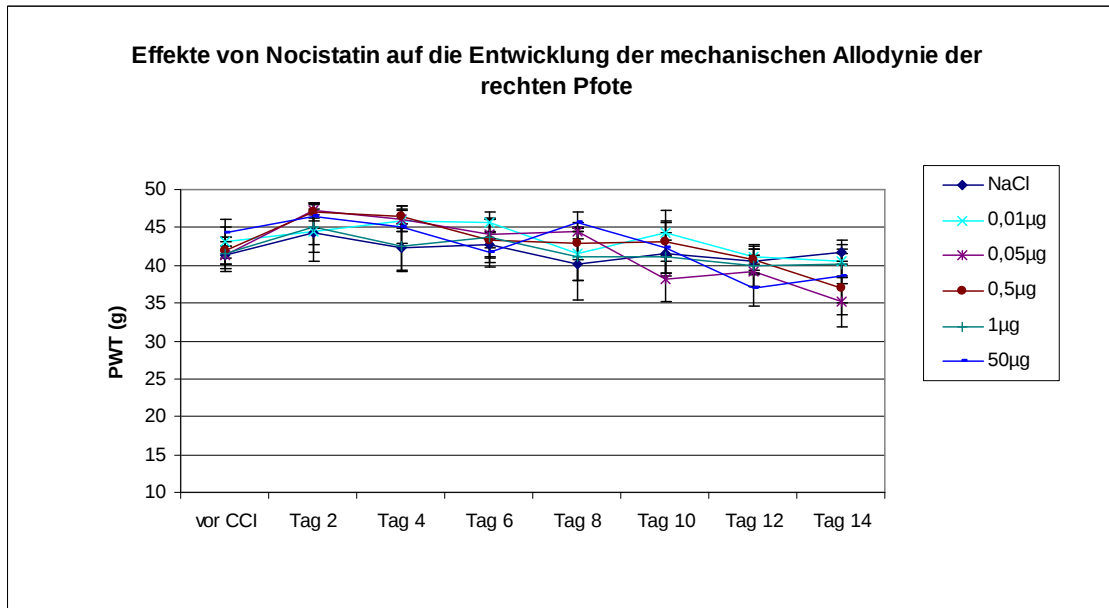


Abbildung 22: Effekt von Nocistatin auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote über 14 Tage. Darstellung des PWT in Gramm. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM), je $n=6$.

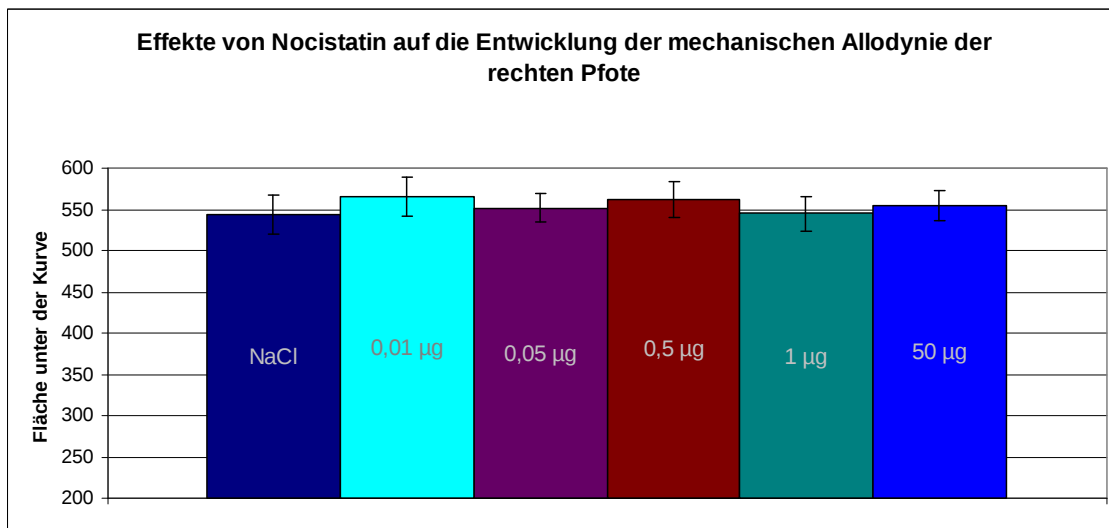


Abbildung 23: Effekt von Nocistatin auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote. Darstellung der Fläche unter den PWT-Kurven. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM), je $n=6$.

4.4 Effekte von DMSO und ACSF auf die induzierte Neuropathie

4.4.1 Wirkungen von DMSO und ACSF auf die Ausprägung der mechanischen Allodynie der linken Pfote

Die Verlaufskurve für die Entwicklung der mechanischen Allodynie (Abbildung 24) an der linken Pfote zeigt einen für die Kontrollgruppe zu erwartenden typischen Verlauf. Man erkennt einen stetigen Abfall der Messwerte bis Tag 8. Danach pendeln sich die Werte um einen Mittelwert von $20,9 \text{ g} \pm 1,4 \text{ g}$ ein. Die entwickelte mechanische Allodynie lässt auf eine zu erwartete Neuropathie schließen. Die PWT-Verlaufskurve der neuropathischen (linken) Pfote in der Gruppe, die DMSO erhielt, verläuft nach Applikation, mit Ausnahme von Tag 14, oberhalb der Kontrollgruppe (NaCl) und oberhalb der Gruppe in der ACSF appliziert wurde (Abbildung 24). Dieser antinozizeptive Trend ist zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikant im Vergleich zur ACSF-Kurve und der der Kontrollgruppe. Ab Tag 3 verläuft die Kurve der ACSF-Gruppe dauerhaft, bis Tag 14, unterhalb den Kurven der anderen zwei Gruppen. Auch hier ist der pronozizeptive Trend zu keinem Zeitpunkt signifikant. Die pronozizeptive Entwicklung aller Gruppen über die zeitliche Dauer des Versuches war zu erwarten und bestätigt den Erfolg der Ausprägung eines neuropathischen Schmerzes an der linken Hinterpfote. Die PWT-Kurven der DMSO- und der ACSF-Gruppe unterscheiden sich zu keinem Zeitpunkt signifikant untereinander und zu der der Kontrollgruppe.

Die Flächen unter der PWT-Kurve der NaCl- (Kontrolle), DMSO- und ACSF- Gruppe, welche die Gesamtwirkung der Substanzen auf die mechanische Allodynie darstellen, unterscheiden sich tendenziell, aber nicht statistisch signifikant voneinander (ACSF vs. Kontrollgruppe ($p=0,650$), DMSO vs. Kontrollgruppe ($p=0,744$), DMSO vs. ACSF ($p=0,261$)). Dargestellt sind die Flächen unter den PWT- Kurven für die Entwicklung der mechanischen Allodynie der linken Pfote in Abbildung 25.

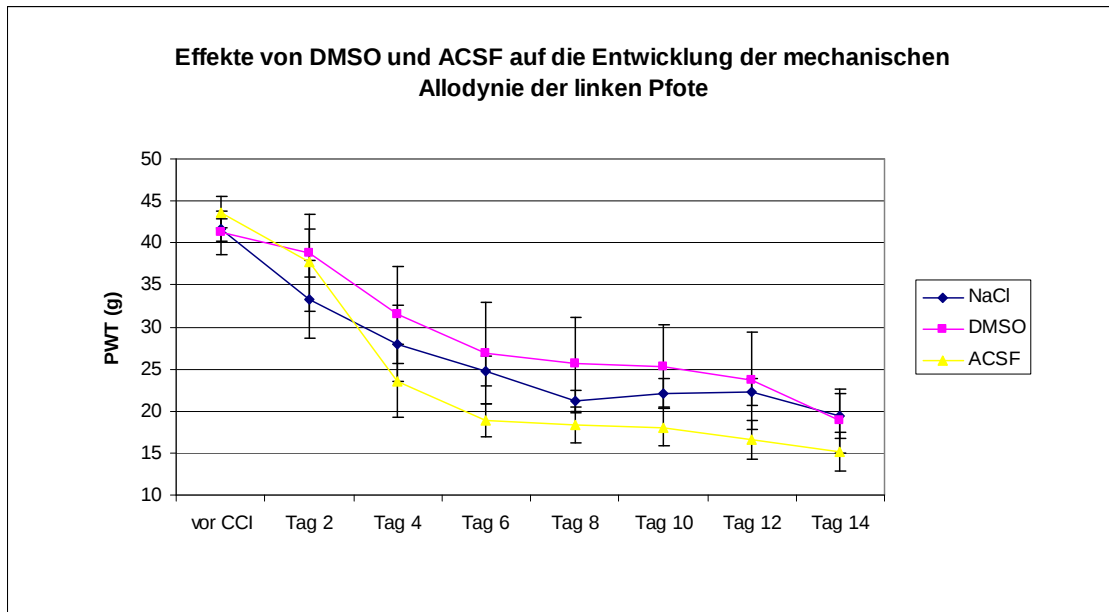


Abbildung 24: Effekt von NaCl (Kontrolle), ACSF und DMSO auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der linken Pfote über 14 Tage. Darstellung des PWT in Gramm. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM), je n=6.

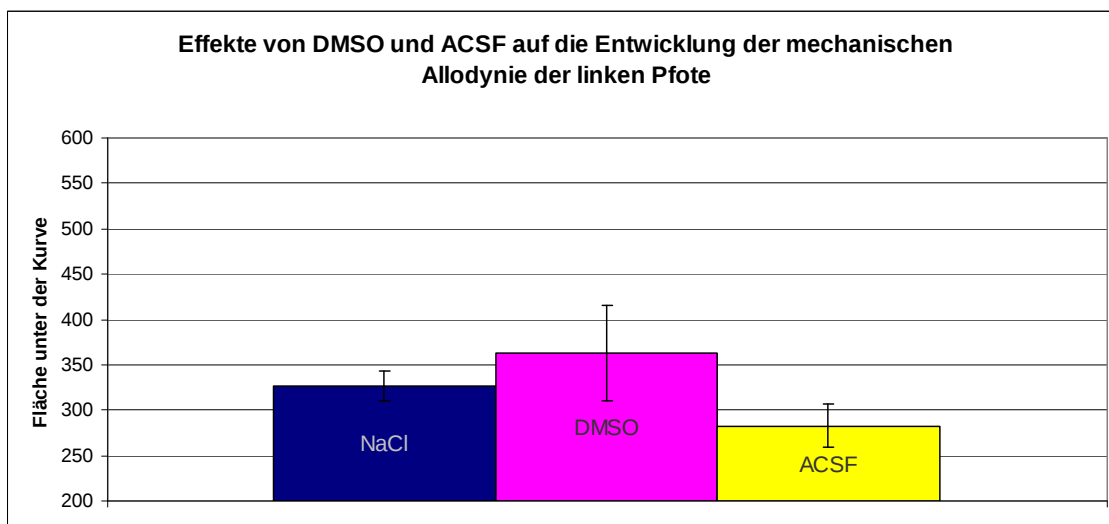


Abbildung 25: Effekt von NaCl (Kontrolle), ACSF und DMSO auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der linken Pfote. Darstellung der Fläche unter der PWT-Kurve. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM), je n=6.

4.4.2 Wirkungen von DMSO und ACSF auf die Ausprägung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote

In der Kontrollgruppe zeigen sich bei den rechten (nicht operierten) Pfoten über den gesamten Beobachtungszeitraum von 14 Tagen nur geringgradige, Schwankungen der PWT um einen Wert von $42,2 \text{ g} \pm 1,9 \text{ g}$ (siehe Abbildung 26). Es findet demnach erwartungsgemäß keine Ausprägung einer mechanischen Allodynie statt. Bei den Tieren, die DMSO und ACSF erhielten, zeigt sich ebenfalls ein konstanter PWT-Kurvenverlauf. Die geringen Schwankungsdifferenzen sind weder untereinander noch im Vergleich zu der Kontrollgruppe signifikant. In keiner der Gruppen bildet sich an der rechten Pfote eine mechanische Allodynie aus (siehe Abbildung 26).

Die Flächen unter der PWT- Kurve der NaCl- (Kontrolle), DMSO- und ACSF- Gruppe, welche die Gesamtwirkung der Substanzen auf die mechanische Allodynie darstellen, unterscheiden sich nicht statistisch signifikant voneinander. Dargestellt sind die Flächen unter der Kurve für die Entwicklung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote in Abbildung 27.

Fazit:

Es konnte kein signifikanter Einfluss von DMSO und ACSF auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis gilt sowohl für die rechte (nicht operierte) Pfote als auch für die linke (neuropathische) Pfote.

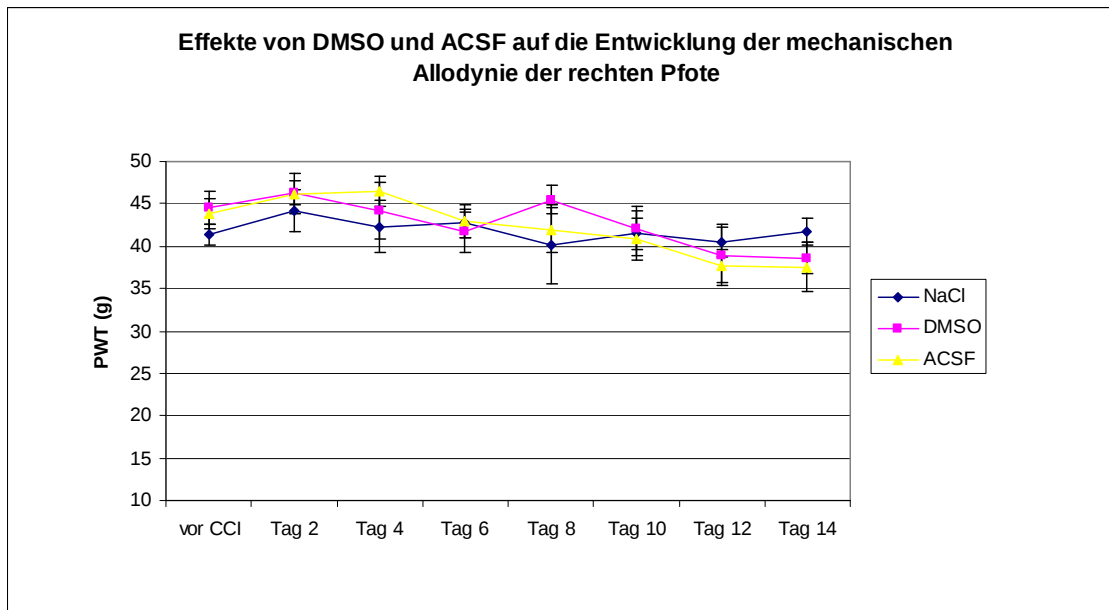


Abbildung 26: Effekt von NaCl (Kontrolle), ACSF und DMSO auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote über 14 Tage. Darstellung der PWT in Gramm (Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM)), je n=6.

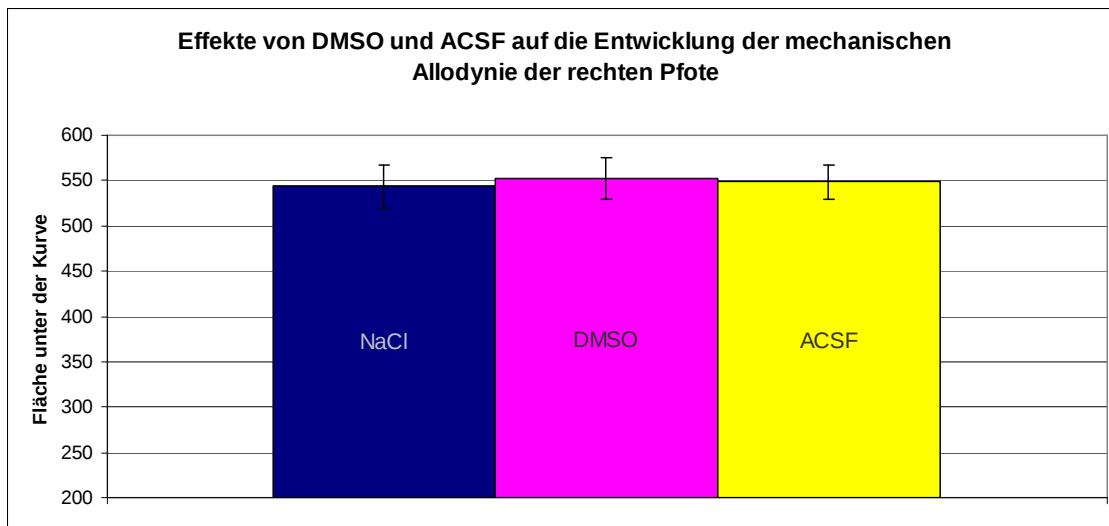


Abbildung 27: Effekt von NaCl (Kontrolle), ACSF und DMSO auf die Entwicklung der mechanischen Allodynie der rechten Pfote. Darstellung der Fläche unter der PWT- Kurve. Dargestellt sind die Mittelwerte $\pm$ Standardfehler (SEM), je n=6.

5 Diskussion

5.1. Operative Maßnahmen und Tiermodell

Anästhesie

Die Tiere werden unter Allgemeinanästhesie im Toleranzstadium operiert. Die Anästhesie wird mit Pentobarbital als intraperitoneale Injektion entsprechend dem Gewicht des Tieres eingeleitet und aufrechterhalten. Pentobarbital ist ein seit langem verwendetes, in der Versuchstiermedizin bewährtes Narkotikum ohne analgetische Wirkung (Adams and Branson 2001). Jedoch hat Pentobarbital eine relativ geringe therapeutische Breite und lange Nachschlafzeiten zur Folge. Auch sind intraoperative Tieraussfälle als „Narkosezwischenfälle“ festzustellen. Mögliche Ursachen hierfür können geringe Überdosierungen oder aber auch das atemdepressive Potential von Pentobarbital sein (Borison 1978). Andere Anästhetika haben vermutlich Einfluss auf die glycinerge und glutamaterge Neurotransmission (z.B. Ketamin (Detsch and Kochs 1997)) und kommen aus diesem Grunde nicht in Frage. Analgetisch wirksame Anästhetika werden im Bereich der Schmerzforschung gemieden. Man will Interaktionen der Substanzen untereinander vermeiden und dadurch ausschließlich die Eigenwirkung von applizierten Analgetika auf die Ausprägung und Entwicklung von neuropathischen Schmerzen darstellen. Des Weiteren könnte durch den Einsatz von analgetisch wirksamen Anästhetika die Vergleichbarkeit mit anderen Schmerzstudien in Frage gestellt werden.

Aus Gründen des Tierschutzes ist jedoch ein deutlicher Entwicklungsbedarf für ein adäquates intra- und postoperatives Schmerzmanagement gegeben. Unsere Arbeitsgruppe ist sich dieser Notwendigkeit bewusst und hat Vorschläge für die Analgesie erarbeitet, die in Folgeprojekten umgesetzt werden sollen. So ist es beispielsweise sinnvoll, um Effekte von analgetischen Narkotika auf die Ausprägung neuropathischer Schmerzen ausschließen zu können, weitere „Analgetika-Kontrollgruppen“ in einen Versuch mit aufzunehmen.

Intrathekale Katheterisierung

Die intrathekale Katheterisierung ermöglicht die Applikation der zu testenden Substanzen direkt an den Ort des Geschehens: das Dorsalhorn. Durch deren Injektion direkt in den Subarachnoidalraum, auf Höhe des Lumbalmarks, wird zuverlässig und unmittelbar der Ort der primären Schmerzverarbeitung erreicht. Somit wird sichergestellt, dass die Test-Substanzen entsprechend ihrer Dosis Wirkung zeigen können, ohne auf dem Weg dorthin Abbauprozessen zu unterliegen. In dieser Untersuchung eignet sich der intrathekale Katheter besonders, da eine Miniinfusionspumpe direkt an den Katheter angeschlossen werden kann, die die Langzeitapplikation in den Subarachnoidalraum erlaubt. Nachteil dieser Kathetertechnik ist der operative Aufwand und die damit verbundene zusätzliche Belastung der Tiere, ebenso wie die spezifische chirurgische Erfahrung des Operateurs. In vorangegangenen Studien ist immer wieder auch eine Großzahl der Tiere aufgrund zentraler Lähmungserscheinungen, verursacht durch die intrathekale Katheterimplantation ausgefallen. Um dies zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Untersuchung spezielle „rat intrathecal catheter“ der Firma DURECT Cooperation eingesetzt, die speziell für diese Fragestellung entwickelt worden waren. Diese Katheter haben einen geringeren Außendurchmesser und sind dadurch leichter zu implantieren. In unseren Untersuchungen hatten wir aufgrund dieser verbesserten Methodik eine Tierausfallquote von nur 15%. Außerdem war kein Tier dabei, das aufgrund zentraler Lähmungserscheinungen ausfiel.

CCI-Modell für neuropathischen Schmerz

Verlässliche und reproduzierbare Tiermodelle für neuropathischen Schmerz befinden sich seit Jahrzehnten in der Entwicklung und unterliegen aufgrund von neuen Erkenntnissen immer wieder auch Weiterentwicklungen. Die Herausforderungen bei der Etablierung solcher Modelle bestehen in deren Reproduzierbarkeit, vor allem aber auch in der Möglichkeit, neuropathischen Schmerz bei Tieren messen zu können. Schmerz ist immer eine subjektive Empfindung und bei Tieren im Verhaltenstest eher als „eine Reaktion, die auf eine unangenehme Wahrnehmung hinweist“ zu verstehen (Hogan 2002). Ein weiterer elementarer Punkt bei der Etablierung solcher Tiermodelle ist deren realistische Übertragbarkeit auf das neuropathische Schmerzgeschehen beim Menschen.

Die meisten Tiermodelle für neuropathischen Schmerz sind mit Ratten und Mäusen entwickelt worden, wobei sich viele Modelle auf den *N. ischiadicus* bei der Ratte fokussieren. Gründe dafür sind die Größe und Ausprägung dieses gemischten Nerves, die gute Erreichbarkeit und die von ihm innervierten Bereiche. Hierzu zählt auch die Unterseite der Hinterpfote, die sich gut als „Testfläche“ in Verhaltensuntersuchungen eignet.

Bisher sind verschiedenste Methoden wie Resektion, Strangulation und Reizung des gesamten Nervenstranges oder von Teilen davon zur Erzeugung von neuropathischem Schmerz in diesen Tiermodellen angewendet und weiterentwickelt worden.

Bei dem Neuroma Modell (Wall and Devor 1983) z. B. wird der gesamte *N. ischiadicus* ligiert und ein Teil reseziert. Probleme, die nach diesen Operationen auftraten, waren vor allem die ektope Aktivität der Nervenstümpfe bis hin zu völliger Empfindungslosigkeit. Auch wurde bei diesem Modell über ein hohes Maß an Belecken und Zerbeißen der neuropathischen Pfote (Autotomie) berichtet (Wall and Devor 1983). Als Weiterentwicklung der totalen Nervenresektion ist man dazu übergegangen, Teilabschnitte zu ligieren oder zu resezieren. Das Modell der “Chronic Constriction Injury” (Bennett and Xie 1988) wurde inzwischen in vielen Studien zur neuropathischen Schmerzforschung etabliert und ermöglicht deshalb auch die Vergleichbarkeit dieser Studien.

Das CCI-Modell ermöglicht eine gut durchführbare, reproduzierbare und verlässliche Auslösung einer peripheren Mononeuropathie. Die damit erzielten Ergebnisse sind untereinander vergleichbar. Auch ist die kontralaterale Seite nicht, wie in anderen Modellen (Arguis, Perez et al. 2008), von der Entwicklung einer Neuropathie beeinflusst. Eine wie bei Bennett und Xie (1988) beschriebene Autotomie hat in unseren Untersuchungen nicht stattgefunden.

5.2 Verwendete Substanzen

Dimethylsulfoxid (DMSO)

DMSO ist eine farblose, gering toxische amphiphile Flüssigkeit, die sowohl lipophile als auch hydrophile Eigenschaften aufweist. Dadurch verfügt es über eine gute und schnelle Penetration von biologischen Membranen. Ebenfalls wirkt DMSO als Penetrationsbeschleuniger. Dies wird insbesondere bei der Anwendung von Arzneimitteln auf der Haut genutzt. Häufig wird DMSO auch als potentes Lösungsmittel eingesetzt. Eine eigene pharmakologische Wirkung von DMSO wird allerdings diskutiert. Verschiedene Studien untersuchten antiinflammatorische, lokalanästhetische, antibakterielle und antithrombotische Wirkungen. Ein Einfluss auf die Nozizeption wird in zahlreichen Studien bestätigt. Dabei wurden sowohl antinozizeptive Wirkungen (Becker, Young et al. 1969; Evans, Reid et al. 1993; Kubota, Fujibayashi et al. 1998; Frey 2002; Colucci, Maione et al. 2008) als auch pronozizeptive Wirkungen bei subkutaner Applikation nachgewiesen (Colucci, Maione et al. 2008). Die Anwendung von DMSO als Lösungsmittel in der Schmerzforschung ist deshalb mit Skepsis zu betrachten.

In dieser Untersuchung war die Wirkung von Lösungsmitteln zur Wirkstoffapplikation in den intrathekalen Raum auf das nozizeptive Verhalten der Ratte eine eigene Fragestellung. DMSO wurde in einer Untersuchungsgruppe auf eine eigene pharmakologische Wirkung in Hinblick auf die Ausprägung der mechanischen Allodynie getestet. DMSO zeigte im Vergleich mit der Kontrollgruppe (NaCl) bei der Messung des PWT der linken Pfote eine geringgradige antinozizeptive Tendenz.

Es konnten allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der DMSO- und der Kontrollgruppe festgestellt werden.

Eine weitere Beobachtung bezieht sich auf die Verwendung von 100%igem DMSO in Verbindung mit den in dieser Untersuchung verwendeten Intrathekalkathetern der Firma DURECT Cooperation, ALZET osmotic Pumps. Bei der Entfernung der Miniinfusionspumpe 24 Stunden nach Implantation fiel auf, dass sich die Polyurethankatheter vor allem am Übergang zwischen Pumpe und Katheter milchig verfärbt hatten und der Katheter in diesem Bereich dilatiert war (siehe Abbildung 28).

Diese Beobachtung wurde ausschließlich in der DMSO-Gruppe gemacht, was darauf schließen lässt, dass das DMSO das Polyurethan der Katheter angegriffen hat.

Dilatation und farbliche Veränderung der Katheter

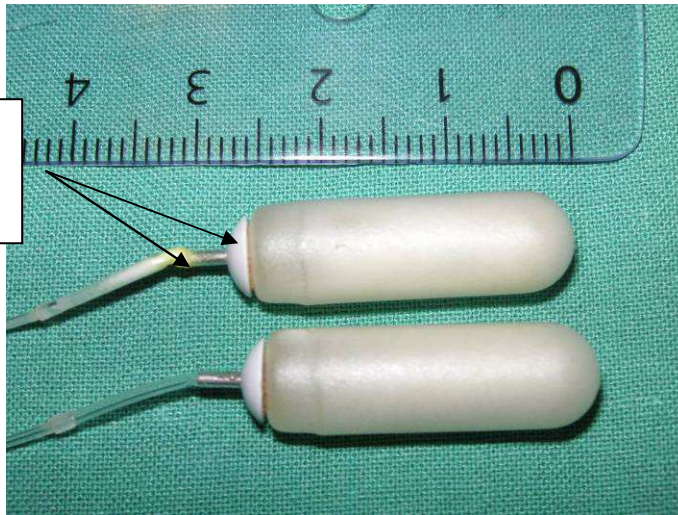


Abbildung 28: Foto der veränderten Pumpen-Katheter-Kombination der DMSO-Gruppe (oben), im Vergleich zu einer unveränderten.

Die äußerliche Unversehrtheit und Durchgängigkeit der Katheter waren nach wie vor gegeben. Aufgrund dieser Feststellung, dass es bei der Verwendung von 100%igem DMSO in Verbindung mit den Intrathekalkathetern der Firma DURECT Cooperation, ALZET osmotic Pumps zu Veränderungen der Katheter kommt, sollte reines DMSO nicht als Lösungsmittel in diesen Kathetern verwendet werden.

Natriumchlorid (NaCl)

In dieser Untersuchung wurde eine isotonischen Natriumchlorid-Lösung (0,9% NaCl) verwendet. Eine eigene pharmakologische Aktivität im Hinblick auf die Beeinflussung der Nozizeption war nicht zu erwarten. Die physiologische Natriumchlorid-Lösung fungierte in unserem Versuch für alle Nocistatin-Dosierungen als Lösungsmittel. Nocistatin ist darin sehr gut löslich. Des Weiteren wurde NaCl als Kontrollgruppe verwendet.

Artificial cerebrospinal fluid (ACSF)

ACSF wurde entwickelt, um die Eigenschaften von natürlichem Liquor nachzuahmen und somit als Liquorersatz verwendet werden zu können, mit dem Bestreben, die Nervenzellen bestmöglich zu versorgen und weder zu reizen noch zu schädigen. Bestandteile sind NaCl, KCl, NaH_2PO_4 , MgSO_4 , Glucose und aqua dest.. Neueste Studien empfehlen ACSF als Spüllösung für neuronale Eingriffe an Stelle von physiologischer Kochsalzlösung (Kazim, Enam et al. 2010). In einer patch-clamp-Studie ist man noch einen Schritt weiter gegangen und hat NaCl als Bestandteil von ACSF durch equi-osmotisches Glycerol ersetzt und somit die Lebensdauer von neuronalen Zellen *in vitro* im Vergleich zur Behandlung der Zellen mit herkömmlichen ACSF deutlich verlängert, da die Zellen nicht von passiv eintretenden Cl^- -Ionen geschädigt werden können (Ye, Zhang et al. 2006). ACSF wurde in der vorliegenden Untersuchung als Lösungsmittel in einer eigenen Gruppe getestet, mit der Überlegung es in weiteren Versuchen als neuro-affines Lösungsmittel bei intrathekalen Applikationen verwenden zu können. Auch die ACSF-Gruppe unterlag der Fragestellung, ob die Substanz ggf. eine eigene pharmakologische Wirkung auf die Ausprägung von neuropathischem Schmerz hat. Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Lösungsmitteln DMSO, ACSF und NaCl (Kontrolle) festgestellt. Auch waren in der ACSF-Gruppe keine Veränderungen an den Mini-Infusionspumpen oder an den Kathetern festzustellen. ACSF scheint also ohne Einschränkung als Vehikel für Testsubstanzen in der Schmerzforschung geeignet zu sein.

5.3 Tierschutzaspekte: Analgesie, Monitoring, Gewichtsverläufe, klinische Beobachtungen und Entwicklung eines Pain Scores

Schmerzforschung ist stets eine Herausforderung für die Wissenschaft. Schmerzbekämpfung bei Tieren ist im § 1 des Tierschutzgesetzes geregelt, der besagt: „Niemand darf einem Tier ohne vernünftigen Grund Schmerzen, Leiden oder Schaden zufügen“. Erkennung und Quantifizierung von Schmerzen ist bei Tieren eine besondere Herausforderung. Da Schmerz eine subjektive Emotion ist, kann der Mensch nur aufgrund eigener Erfahrungen die Schmerzen eines Tieres interpretieren (Sager 2010).

Da Schmerz laut Definition eine subjektive Empfindung ist (siehe 1.1) und der Entwicklung eines neuropathischen Schmerzes sehr komplexe und vielfältige Pathomechanismen zu Grunde liegen, sind Verhaltensuntersuchungen am lebenden Tier unerlässlich, um Effekte von potentiellen Therapeutika auf das Schmerzverhalten zu untersuchen. Diese *in vivo* Untersuchungen zur Erforschung von Schmerzmechanismen und zur Wirkweise von einzelnen Substanzen können und sollten durch weitere z.B. Laboruntersuchungen ergänzt werden (z.B. Patch-clamp-Messungen und immunhistologische Untersuchungen).

Obwohl sich die Schmerzforschung in den letzten Jahrzehnten drastisch weiterentwickelt hat, sind das Schmerzmanagement und das endgültige Verständnis der Zusammenhänge in der Schmerzentwicklung bis heute unbefriedigend. Ein Großteil von Verhaltensstudien wurde mit freiwilligen humanen Probanden durchgeführt und hat einen Einblick vor allem in die menschliche Schmerzempfindung gegeben. Die Erforschung von molekularen und zellulären Zusammenhängen und die Untersuchung neuer therapeutischer Substanzen in der Schmerzforschung machen den Einsatz von Tiermodellen unumgänglich (Mogil, Davis et al. 2010).

Die Unerlässlichkeit, an lebenden Versuchstieren zu forschen, stellt einen hohen Anspruch an die Wissenschaftler und verlangt nach stetiger Verbesserung von Methoden und Modellen. Diesen Anspruch, die 3 R's in Tierversuchen umzusetzen sollte jeder Wissenschaftler haben, der mit lebenden Tieren betraut wird. Die 3 R's in der Labortiermedizin stehen für „Refinement, Reduction und Replacement“ (Verfeinerung, Reduktion und Ersatz) und wurden erstmals von Russell und Burch (1959) erwähnt und bilden bis heute eine wichtige Vorgabe für das wissenschaftliche Arbeiten mit Versuchstieren (Balls and Straughan 1996).

Eine wesentliche methodische Verbesserung in unserer Untersuchung bestand darin, dass die bisher in unserer Arbeitsgruppe üblichen dickeren PE10 Katheter durch spezielle Intrathekalkatheter für Ratten ersetzt wurden. Die Tierausschallquote konnte dadurch im Vergleich zu vorhergehenden Untersuchungen deutlich gesenkt werden. Des Weiteren wurde im Verlauf der vorliegenden Untersuchung ein Pain Score für neuropathischen Schmerz bei Ratten entwickelt, der die Beurteilung des Allgemeinbefindens und den Grad der Belastung der einzelnen Tiere in zukünftigen

Studien erleichtern soll und dem Untersucher gleichzeitig einen eindeutigeren Hinweis auf den Zeitpunkt für eine möglicherweise notwendig werdende Euthanasie des Tieres geben kann.

5.4 Postoperative Ausprägung der Allodynie in der Kontrollgruppe und Evaluation der Verhaltensuntersuchungen

Die Ausprägung einer mechanischen Allodynie an der linken traumatisierten Hinterpfote konnte bei den Tieren der Kontrollgruppe eindeutig nachgewiesen werden. Es besteht ein signifikanter Unterschied des Pfotenrückzugsschwellenwertes im Vergleich von Tag 0 zu Tag 14 zwischen der rechten und der linken Pfote. Es handelt sich hierbei also um ein geeignetes Tiermodell für eine Untersuchung zur Beeinflussung neuropathischer Schmerzen.

Die Verhaltensuntersuchungen wurden mit einer bewährten und speziell für diesen Zweck entwickelten Apparatur durchgeführt. Das Aesthesiometer zur Bestimmung der mechanischen Allodynie stellt eine Weiterentwicklung der manuell anzuwendenden „von Frey“ Filamenten dar und ist in der Praxis sehr gut einsetzbar. Der Aufbau der Apparatur ermöglicht eine präzise Positionierung des Metallfilaments unter der Pfote und ist durch die 3-Dimensionalität auch bei Schonhaltung der Pfote präzise anzuwenden. Die digitale Anzeige von Kraft und Zeit ermöglicht darüber hinaus eine genaue Dokumentation.

Unter Tierschutzaspekten ist diese Verhaltensmessung ebenfalls als gut geeignet zu betrachten: Die Tiere können sich frei in ihrer Untersuchungsbox bewegen und werden keinem Stress durch Fixation ausgesetzt. Allen Tieren wird vor den eigentlichen Messungen eine Gewöhnungszeit in der Apparatur zugestanden. Die Messapparatur ist so konstruiert, dass die Reizbelastung in dem Moment beendet wird, in dem das Tier die Pfote wegzieht. Sobald ein Reiz unangenehm wird und das Tier dieses durch eine Wegziehreaktion der Pfote signalisiert, wird die Messung augenblicklich beendet. Das Tier ist keinen weiteren Schmerzen oder gar Verletzungen ausgesetzt.

5.5 Einfluss von Nocistatin auf die induzierte Neuropathie

In dieser Untersuchung konnte zu keinem Zeitpunkt des Untersuchungszeitraumes ein signifikanter Effekt verschiedener Nocistatin-Dosierungen auf die Entwicklung des nozizeptiven Verhaltens nach „Chronic Constriction Injury“ festgestellt werden. Dieses Ergebnis gilt sowohl für die linke (neuropathische) als auch für die rechte (nicht operierte) Hinterpfote. Die inhibitorische Neurotransmission im Dorsalhorn des Rückenmarks ist in erheblichem Ausmaß an der Entwicklung von neuropathischem Schmerz beteiligt (Woolf and Salter 2000). Insbesondere die Dysfunktion des komplexen Zusammenspiels zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Signalübertragung konnte als wesentlicher pathogenetischer Faktor identifiziert werden. Durch seine Doppelfunktion in der Neurotransmission, zum einen als inhibitorischer Neurotransmitter, zum anderen als obligater NMDA-Rezeptor Koagonist an der exzitatorischen Synapse, spielt Glycin zweifelsfrei in der pathophysiologischen Entwicklung von neuropathischen Schmerzen eine Schlüsselrolle. Aus diesem Grunde können sowohl Veränderungen am GlyR als auch am NMDAR das nozizeptive Verhalten beeinflussen. So kann einerseits eine Verminderung der glycinergen Inhibition durch Hemmung der Glycinfreisetzung (Ito, Okuda-Ashitaka et al. 2001) oder durch GlyR-Blocker im Dorsalhorn (Loomis, Khandwala et al. 2001) eine Allodynie auslösen. Andererseits konnte gezeigt werden, dass Glycin- und GABA-Rezeptor Agonisten, die Ausprägung einer Allodynie vermindern (Zeilhofer 2005). Auch kann ein direkter Eingriff in die glycinerge Neurotransmission, z. B. durch kontinuierliche intrathekale Verabreichung von Glycin, die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie verhindern (Huang and Simpson 2000). Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die Verminderung glycinerger Aktivität an der Entstehung von pathologischem Schmerz beteiligt ist.

Das Neuropeptid Nocistatin (NST) hat signifikante Effekte auf die inhibitorische Neurotransmission (Zeilhofer, Selbach et al. 2000) und kann dadurch einen antinozizeptiven Effekt bei bereits etabliertem neuropathischen Schmerz bewirken (Muth-Selbach, Dybek et al. 2004). Diese antinozizeptive Wirkung ist sehr wahrscheinlich auf die Hemmung von Glycin-abhängigen NMDA-Rezeptoren zurückzuführen (Muth-Selbach, Dybek et al. 2004).

In einigen Studien konnte ein Einfluss von intrathekal verabreichtem NST auf die Nozizeption im Tiermodell nachgewiesen werden (Okuda-Ashitaka, Minami et al. 1998; Xu, Hashemi et al. 1999; Nakano, Minami et al. 2000; Muth-Selbach, Dybek et al. 2004). In bisherigen Studien wurde Nocistatin therapeutisch, d.h., nur bei einer bereits ausgeprägten Neuropathie, verabreicht. Der präventive Einfluss von kontinuierlich appliziertem Nocistatin war bisher in keiner Studie bearbeitet worden.

Aus diesem Grunde war es Ziel dieser Untersuchung, zu klären, ob die kontinuierliche subarachnoidale Verabreichung von NST über einen Zeitraum von 24 Stunden, beginnend unmittelbar im Anschluss an die experimentell induzierte Nervenkonstriktion, die Entwicklung von mechanischer Allodynie verhindern bzw. beeinflussen kann. Eine weitere Grundlage für die Verabreichung von NST unmittelbar nach der Nervenkonstriktion liefert die Erkenntnis, dass die glycinerge inhibitorische Kontrolle vor allem in der frühen Phase der Entwicklung von chronischen Schmerzen nach einem Nerventrauma gestört wird (Dohi, Morita et al. 2009). Die Umkehrung der synaptischen Disinhibition in diesem frühen Stadium könnte einen Therapieansatz bei der Behandlung von neuropathischen Schmerzen bieten.

Die in der Therapiestudie von Muth-Selbach et al. (2004) nachgewiesenen, dosisabhängigen pro- und antinozizeptiven Effekte von Nocistatin, konnten in unserer präventiv angelegten Untersuchung nicht bestätigt werden. Die verwendeten Konzentrationen von Nocistatin, wurden den Dosierungen vorangegangener Studien (Muth-Selbach, Dybek et al. 2004) angepasst. Dort zeigte NST, als Bolus appliziert, bei bereits etabliertem neuropathischem Schmerz, einen antinozizeptiven Effekt. Die Diskrepanz, dass Nocistatin bei bereits manifestiertem neuropathischem Schmerz einen signifikanten Einfluss auf die Nozizeption zeigt, während durch eine kontinuierliche Verabreichung direkt nach Nervenkonstriktion kein signifikanter Einfluss auf die Entwicklung einer Allodynie darstellbar war, könnte auf den zeitabhängigen Umbau der glycinergen Neurotransmission zurückzuführen sein. Es ist möglich, dass Nocistatin erst dann eine antinozizeptive Wirkung bewirkt, wenn die glycinerge Inhibition bereits gestört ist. Vor diesem Hintergrund wäre es tatsächlich fraglich, ob ein bereits ausgeprägter neuropathischer Schmerz durch eine Dauerinfusion mit Nocistatin beeinflusst werden kann. Es könnte aber auch sein, dass Nocistatin über einen noch längeren Zeitraum (z. B. 7 Tage) appliziert werden müsste, um die Ausprägung einer

Neuropathie zu verhindern. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass die Rezeptoren an denen Nocistatin wirkt, aufgrund der Dauerinfusion von NST in unserer Studie eine Toleranz entwickelten, wodurch Nocistatin keine Wirkung mehr erzielen konnte.

Diese Untersuchung gab erstmalig einen Einblick in die Wirkung von Nocistatin, das bereits in der Frühphase der Schmerzentwicklung direkt an den Ort der Veränderungen kontinuierlich appliziert wurde. Obwohl Nocistatin in dieser Ausrichtung nicht in der Lage war die Entstehung neuropathischer Schmerzen zu verhindern oder in ihrer Ausprägung zu mindern, bietet diese Untersuchung eine wichtige Grundlage.

6 Schlussfolgerung und Ausblick

In dieser Untersuchung wurde erstmalig der Effekt von Nocistatin als intrathekale Dauerinfusion auf die Ausprägung des nozizeptiven Verhaltens nach Induktion einer Neuropathie bei der Ratte untersucht. Die kontinuierliche intrathekale Verabreichung von Nocistatin in einem breiten Dosisspektrum hatte in dieser Untersuchung keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Ausbildung und Ausprägung des nozizeptiven Verhaltens bei der Ratte im CCI-Modell für neuropathischen Schmerz.

Die Tatsache, dass Nocistatin bei bereits manifestiertem neuropathischem Schmerz einen signifikanten Einfluss auf die Nozizeption hat, während durch eine kontinuierliche Verabreichung direkt nach Nervenkonstriktion kein signifikanter Einfluss auf die Entwicklung einer Allodynie festzustellen war, kann auf den zeitabhängigen Umbau der glycinergen Neurotransmission zurückzuführen sein. Es ist möglich, dass Nocistatin erst eine antinozizeptive Wirkung bewirkt, wenn die glycinerge Inhibition bereits gestört ist. Aus dieser Überlegung heraus stellt sich die Frage, ob ein bereits ausgeprägter neuropathischer Schmerz durch eine Dauerinfusion mit Nocistatin beeinflusst werden kann.

Des Weiteren besteht auch die Möglichkeit, dass Nocistatin, um eine Ausprägung der Neuropathie zu verhindern, über einen noch längeren Zeitraum appliziert werden müsste. Konkrete Fragestellungen hierzu ergeben sich aus den Ergebnissen dieser Untersuchung: Hat Nocistatin einen Einfluss auf die Entwicklung von neuropathischem Schmerz, wenn es über einen längeren Zeitraum (z. B. 7 Tage) kontinuierlich appliziert wird?

Diese Untersuchung gab erstmalig einen Einblick in die Wirkung von Nocistatin als kontinuierliche Applikation in der Frühphase der Schmerzentwicklung direkt an den Ort der Veränderungen. Trotz des Ergebnisses, dass Nocistatin in dieser Untersuchung nicht in der Lage war die Entstehung neuropathischer Schmerzen zu verhindern oder in ihrer Ausprägung zu mindern, bietet diese Untersuchung eine Grundlage für weitere Untersuchungen. Die vorliegende Studie wirft eine Reihe weiterer interessanter Fragestellungen und Theorien auf. Zur Bestätigung dieser Theorien bedarf es weiterer Forschung, vor allem in Bezug auf die konkrete Wirkweise und den konkreten Wirkort / Rezeptor für Nocistatin.

Nocistatin hat sein analgetisches Potential in zahlreichen Studien unter Beweis gestellt und sollte als therapeutische Option in der Behandlung und Prävention von neuropathischen Schmerzen weiter im Fokus der Schmerzforscher bleiben.

Darüber hinaus konnte in dieser Untersuchung kein signifikanter Unterschied zwischen den intrathekal verabreichten Kontrollsubstanzen NaCl, DMSO und ACSF bei Messung des nozizeptiven Verhaltens festgestellt werden. Prinzipiell scheinen also alle untersuchten Substanzen als Trägerlösungen im Rahmen von experimentellen Schmerzstudien geeignet zu sein.

Der Einsatz von reinem DMSO ist bei der Verwendung von „rat intrathecal catheter“ von DURECT Cooperation, ALZET osmotic Pumps nicht zu empfehlen, da es zu einer Interaktion mit dem Kathetermaterial kommt. Der Einsatz von speziellen „Rat intrathecal catheters“ der Firma Alzet senkt die Ausfallrate der Tiere deutlich, im Vergleich zu herkömmlichen Polyethylenschläuchen in Bezug auf Ausfälle durch zentrale Lähmungen.

7 Zusammenfassung

Das endogene Neuropeptid Nocistatin (NST) hemmt die Freisetzung der zwei wichtigsten schnellen inhibitorischen Neurotransmitter im Rückenmark, Glycin und GABA. Intrathekal appliziertes NST modifiziert dosis-abhängig biphasisch nozizeptives Verhalten bei einer bereits ausgeprägten Neuropathie: Hohe Dosen wirken pronozizeptiv, niedrige Dosen hingegen antinozizeptiv, am ehesten als Folge einer Hemmung glycinabhängiger NMDA-Rezeptor Aktivierung. Fragestellung der vorliegenden Untersuchung war, ob eine kontinuierliche intrathekale Infusion von niedrig dosiertem NST über 24 Stunden, direkt im Anschluss an eine Nervenkonstriktion, die Entwicklung von neuropathischen Schmerzen im Tiermodell verhindern oder reduzieren kann. Die Untersuchung erfolgte nach Genehmigung der zuständigen Behörde im Modell der Chronic Constriction Injury (CCI) an männlichen Wistar Ratten. Nach Konstriktion des linken *N. ischiadicus* wurde über 24 Stunden durch einen intrathekalen Katheter mittels einer subkutan ausgeleiteten osmotischen Mini-Infusionspumpe NST in fünf Konzentrationen (0,01, 0,05, 0,5, 1 und 50 µg) gelöst in 200µl 0,9%igem NaCl infundiert (je n=6). Als Kontrollgruppe dienten 6 Tiere, denen nur NaCl intrathekal appliziert wurde. Über einen Zeitraum von 14 Tagen wurde jeden zweiten Tag die Ausprägung der mechanischen Allodynie an beiden Hinterpfoten mittels von-Frey Filamenten (Plantar Aesthesiometer) gemessen. Die Ergebnisse der Gruppen wurden mittels ANOVA und Dunnett post-hoc Test verglichen. In der Kontrollgruppe entwickelte sich innerhalb von 14 Tagen eine mechanische Allodynie, der Pfotenrückzugsschwellenwert (PWT) für die linke Hinterpfote war signifikant verkürzt. Auf der rechten Seite gab es keine Veränderungen. In keiner der Interventionsgruppen war zu einem bestimmten Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bezüglich des nozizeptiven Verhaltens feststellbar. Auch der gesamtanalgetische Effekt über 14 Tage (AUC) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Die Entwicklung einer mechanischen Allodynie im CCI-Modell bei Ratten lässt sich durch kontinuierliche intrathekale Gabe von NST über 24 Stunden, beginnend direkt nach der Konstriktion, nicht signifikant beeinflussen. Möglicherweise muss NST über einen längeren Zeitraum infundiert werden, um die Entstehung einer Neuropathie zu verhindern. Denkbar ist auch, dass die Beeinflussung der Glycinkonzentration im synaptischen Spalt durch NST erst im pathologischen Zustand, nozizeptives Verhalten beeinflussen kann. Weiterführende Untersuchungen sind notwendig um diese Wirkweise aufzuklären.

8 Summary

8.1 Effects of the Neuropeptide Nocistatin on the Nociceptive Behaviour in a Chronic Pain Model for Neuropathic Pain in Rats

The endogenous neuropeptide NST (Nocistatin) inhibits the two most important fast-acting neurotransmitters in the dorsal horn: GABA and glycine. Intrathecally applied NST dose-dependently modifies nociceptive behaviour in an already developed neuropathy in a biphasic manner: high doses result in a pronociceptive effect, low doses act antinociceptive, as a consequence of a glycine-dependent inhibition of the NMDA-receptor. The present study investigated whether the continuous intrathecal application of low dose NST over a period of 24 hours in response to a nerve constriction reduced or prevented neuropathic pain. It focused on the development of mechanical allodynia as the most important symptom of neuropathic pain in male Wistar rats after Chronic Constriction Injury (CCI). The spinal infusion of five different doses NST via intrathecal catheters connected to an osmotic miniinfusion pump was started directly after the surgical procedure and lasted for 24 hours. The control group of animals (n=6) received intrathecal NaCl 0.9%. The development of mechanical allodynia in the rat's hind paw was measured every second day over a 14 day period. Mechanical allodynia was assessed by means of "von Frey" filaments (Plantar Aesthesiometer). The results were statistically compared with analyses of variance (ANOVA) and Dunnett post hoc test. The paw withdrawal threshold of the left (injured) hind paw was significantly reduced in the control group, indicating mechanical allodynia. Thus, mechanical allodynia developed on the left side as expected. No changes in paw withdrawal threshold were detected on the right side.

Despite a wide range of doses used, the continuous spinal application of NST had no significant effect at any time point on the development of mechanical allodynia. Nociceptive behaviour of the injured paw developed equally in all groups compared with the baseline values in all groups. Accordingly, the total analgesic effect (area under the curve) showed no significant difference between the groups, which received different doses of NST, and in comparison with the control group.

It could be conceivable that NST has to be administered continuously over a longer time period (up to 7 days) to have an impact on the development of neuropathic pain. Furthermore, it is possible that NST exerts only effects on already established neuropathic pain. Further investigations will be necessary to elucidate this issue.

9 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ACSF	Artificial cerebrospinal fluid
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
AMPAR	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve (Fläche unter der Kurve)
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
CCI	Chronic Constriction Injury
Cl ⁻	Chlorid-Ion
Cm	Zentimeter
D	Tag
DMSO	Dimethylsulfoxid
EPSP	Exzitatorisches PostSynaptisches Potential
Fa.	Firma
G	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
Gly	Glycin
GlyR	GlycinRezeptor
GlyT	GlycinTransporter
GlyT1	GlycinTransporter 1
GlyT2	GlycinTransporter 2
i.p.	Intraperitoneal
i.t.	Intrathecal
IASP	International Association for the Study of Pain
IL	Interleukin
IPSP	Inhibitorisches PostSynaptisches Potential
K ⁺	Kalium Ion

KCC2	K ⁺ -Cl ⁻ -Kotransporter
KCl	Kaliumchlorid
Leu	Leucin
Lys	Lysin
MAPK	Mitogen Aktivierte Proteinkinase
Mg ²⁺	Magnesium Ion
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mm.	Musculi
mmol	Millimol
N	Anzahl der Tiere einer Gruppe
N/OFQ	nociceptin/orphaninFQ
Na ⁺	Natrium Ion
NaCl	NatriumChlorid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogenphosphat
NGF	Nerv Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
NST	Nocistatin
OP	Operation
ORL	Orphan-opioid-like
P2X/Y	Purinorezeptor
PE10	Polyethylenkatheter
PGE ₂	Prostaglandin-E ₂
PTX	PertussisToXin
PWL	Paw Withdrawal Latency (Pfoten Rückzugs Latenz)
PWT	Paw Withdrawal Threshold (Pfoten Rückzugs Schwellenwert)
s (sec)	Sekunde
s.c.	Subkutan
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SLC6	Sodium- and chloride- dependent neurotransmitter transporter
SPSS	Statistik Program

TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
TRPV-1	Capsaicin Rezeptor
TTX-R	Tetrodotoxin resistente Natriumkanäle
TTX-S	Tetrodotoxin sensible Natriumkanäle
VIAAT	Vesicular Inhibitory Amino Acid Transporter
VGluT	Vesicular Glutamat Transporter
WDR-Neuron	wide dynamic range-Neuron
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Literaturverzeichnis

Adams, H. and K. Branson (2001). Veterinary Pharmacology and Therapeutics, Wiley-Blackwell.

Ahmadi, S., U. Muth-Selbach, A. Lauterbach, P. Lipfert, W. L. Neuhuber and H. U. Zeilhofer (2003). Facilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine. *Science* 300(5628): 2094-7.

Aprison, M. H. and R. Werman (1965). The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life Sci* 4(21): 2075-83.

Arguis, M. J., J. Perez, G. Martinez, M. Ubre and C. Gomar (2008). Contralateral neuropathic pain following a surgical model of unilateral nerve injury in rats. *Reg Anesth Pain Med* 33(3): 211-6.

Balls, M. and D. W. Straughan (1996). The three Rs of Russell & Burch and the testing of biological products. *Dev Biol Stand* 86: 11-8.

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

Baron, R. (2006). Mechanisms of disease: neuropathic pain--a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol* 2(2): 95-106.

Baron, R. and R. D. Treede (2007). [Diagnosis of neuropathic pain]. *Dtsch Med Wochenschr* 132(41): 2139-44.

Becker, D. P., H. F. Young, F. E. Nulsen and J. A. Jane (1969). Physiological effects of dimethyl sulfoxide on peripheral nerves: possible role in pain relief. *Exp Neurol* 24(2): 272-6.

Bennett, G. J. and Y. K. Xie (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33(1): 87-107.

Betz, H., J. Gomeza, W. Armsen, P. Scholze and V. Eulenburg (2006). Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission. *Biochem Soc Trans* 34(Pt 1): 55-8.

Borison, H. L. (1978). Central nervous respiratory depressants--anesthetics, hypnotics, sedatives and other respiratory depressants. *Pharmacol Ther B* 3(3): 377-95.

Bouhassira, D., M. Lanteri-Minet, N. Attal, B. Laurent and C. Touboul (2008). Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. *Pain* 136(3): 380-7.

Bowery, N. G. and T. G. Smart (2006). GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S109-19.

Bridges, D., S. W. Thompson and A. S. Rice (2001). Mechanisms of neuropathic pain. *Br J Anaesth* 87(1): 12-26.

Buckwell, A. (1992). Limiting clinical signs appendices. *Laboratory Animal Science Association Newsletter* Winter (16-17).

Colucci, M., F. Maione, M. C. Bonito, A. Piscopo, A. Di Giannuario and S. Pieretti (2008). New insights of dimethyl sulphoxide effects (DMSO) on experimental in vivo models of nociception and inflammation. *Pharmacol Res* 57(6): 419-25.

Corsi, M., P. Fina and D. G. Trist (1996). Co-agonism in drug-receptor interaction: illustrated by the NMDA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 17(6): 220-2.

Costigan, M., J. Scholz and C. J. Woolf (2009). Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32: 1-32.

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

Coull, J. A., S. Beggs, D. Boudreau, D. Boivin, M. Tsuda, K. Inoue, C. Gravel, M. W. Salter and Y. De Koninck (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438(7070): 1017-21.

Coull, J. A., D. Boudreau, K. Bachand, S. A. Prescott, F. Nault, A. Sik, P. De Koninck and Y. De Koninck (2003). Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. *Nature* 424(6951): 938-42.

Curtis, D. R. and J. C. Watkins (1960). The excitation and depression of spinal neurones by structurally related amino acids. *J Neurochem* 6: 117-41.

D'Mello, R. and A. H. Dickenson (2008). Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth* 101(1): 8-16.

Davis, M. P. (2007). What is new in neuropathic pain? *Support Care Cancer* 15(4): 363-72.

Detsch, O. and E. Kochs (1997). [Effects of ketamine on CNS-function]. *Anaesthesist* 46 Suppl 1: S20-9.

Dickenson, A. H., E. A. Matthews and R. Suzuki (2002). Neurobiology of neuropathic pain: mode of action of anticonvulsants. *Eur J Pain* 6 Suppl A: 51-60.

-
- Dickenson, A. H. and A. F. Sullivan (1987).** Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following C fibre stimulation. *Neuropharmacology* 26(8): 1235-8.
- Dirig, D. M., P. C. Isakson and T. L. Yaksh (1998).** Effect of COX-1 and COX-2 inhibition on induction and maintenance of carrageenan-evoked thermal hyperalgesia in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 285(3): 1031-8.
- Dohi, T., K. Morita, T. Kitayama, N. Motoyama and N. Morioka (2009).** Glycine transporter inhibitors as a novel drug discovery strategy for neuropathic pain. *Pharmacol Ther* 123(1): 54-79.
- Driessen, B., S. H. Bauquier and L. Zarucco (2010).** Neuropathic pain management in chronic laminitis. *Vet Clin North Am Equine Pract* 26(2): 315-37.
- Ducreux, D., N. Attal, F. Parker and D. Bouhassira (2006).** Mechanisms of central neuropathic pain: a combined psychophysical and fMRI study in syringomyelia. *Brain* 129(Pt 4): 963-76.
- Dumoulin, A., P. Rostaing, C. Bedet, S. Levi, M. F. Isambert, J. P. Henry, A. Triller and B. Gasnier (1999).** Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci* 112 (Pt 6): 811-23.
- DURECT Corporation** ALZET Osmotic Pumps. www.alzet.com.
- Dworkin, R. H. (2002).** An overview of neuropathic pain: syndromes, symptoms, signs, and several mechanisms. *Clin J Pain* 18(6): 343-9.

Dworkin, R. H., A. B. O'Connor, M. Backonja, J. T. Farrar, N. B. Finnerup, T. S. Jensen, E. A. Kalso, J. D. Loeser, C. Miaskowski, T. J. Nurmikko, R. K. Portenoy, A. S. Rice, B. R. Stacey, R. D. Treede, D. C. Turk and M. S. Wallace (2007).

Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 132(3): 237-51.

Eulenburg, V., W. Armsen, H. Betz and J. Gomeza (2005). Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends Biochem Sci* 30(6): 325-33.

Evans, M. S., K. H. Reid and J. B. Sharp, Jr. (1993). Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers: a possible mechanism of analgesia. *Neurosci Lett* 150(2): 145-8.

Fantin, M., C. Fischetti, C. Trapella and M. Morari (2007). Nocistatin inhibits 5-hydroxytryptamine release in the mouse neocortex via presynaptic Gi/o protein linked pathways. *Br J Pharmacol* 152(4): 549-55.

Ferrari, D., P. Chiozzi, S. Falzoni, S. Hanau and F. Di Virgilio (1997). Purinergic modulation of interleukin-1 beta release from microglial cells stimulated with bacterial endotoxin. *J Exp Med* 185(3): 579-82.

Frey, H.-H., Löscher, W. (2002). Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie der Veterinärmedizin, Enke Verlag.

Freyenhagen, R. and R. Baron (2006). Kompendium Neuropathischer Schmerz, Aesopus Verlag e.K.

Freyenhagen, R. and M. I. Bennett (2009). Diagnosis and management of neuropathic pain. *Bmj* 339: b3002.

Grudzinska, J., R. Schemm, S. Haeger, A. Nicke, G. Schmalzing, H. Betz and B. Laube (2005). The beta subunit determines the ligand binding properties of synaptic glycine receptors. *Neuron* 45(5): 727-39.

Guo, W., S. Zou, Y. Guan, T. Ikeda, M. Tal, R. Dubner and K. Ren (2002). Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* 22(14): 6208-17.

Handwerker, H. O. (1999). Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes. Berlin, Springer Verlag.

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

Hansson, P. T. and A. H. Dickenson (2005). Pharmacological treatment of peripheral neuropathic pain conditions based on shared commonalities despite multiple etiologies. *Pain* 113(3): 251-4.

Hara, N., T. Minami, E. Okuda-Ashitaka, T. Sugimoto, M. Sakai, M. Onaka, H. Mori, T. Imanishi, K. Shingu and S. Ito (1997). Characterization of nociceptin hyperalgesia and allodynia in conscious mice. *Br J Pharmacol* 121(3): 401-8.

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

Hasbargen, T., M. M. Ahmed, G. Miranpuri, L. Li, K. T. Kahle, D. Resnick and D. Sun (2010). Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci* 1198: 168-72.

Henke, J. and W. Erhardt (2001). Schmerzmanagement bei Klein und Heimtieren. Stuttgart, Enke Verlag.

Hermanns, H., U. Muth-Selbach, P. Lipfert, S. Braun, R. Werdehausen and I. Bauer (2009). Loss of spinal glycinergic neurons is not necessary for development of neuropathic pain in transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein in glycinergic neurons. *Neuroscience* 159(3): 1148-53.

Hide, I., M. Tanaka, A. Inoue, K. Nakajima, S. Kohsaka, K. Inoue and Y. Nakata (2000). Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor- α release from rat microglia. *J Neurochem* 75(3): 965-72.

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

Honda, S., Y. Sasaki, K. Ohsawa, Y. Imai, Y. Nakamura, K. Inoue and S. Kohsaka (2001). Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors. *J Neurosci* 21(6): 1975-82.

Hong, S. and J. W. Wiley (2005). Early painful diabetic neuropathy is associated with differential changes in the expression and function of vanilloid receptor 1. *J Biol Chem* 280(1): 618-27.

Hopkin, J. M. and M. J. Neal (1970). The release of ^{14}C -glycine from electrically stimulated rat spinal cord slices. *Br J Pharmacol* 40(1): 136P-138P.

Huang, W. and R. K. Simpson (2000). Long-term intrathecal administration of glycine prevents mechanical hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain. *Neurol Res* 22(2): 160-4.

Inoue, K. (2002). Microglial activation by purines and pyrimidines. *Glia* 40(2): 156-63.

ISAP, I. A. f. t. S. o. P.-. (1994). IASP Pain Terminology

The following pain terminology is from "Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage" (pp 209-214) Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy, edited by H. Merskey and N. Bogduk, IASP Press, Seattle, © 1994.

Ito, S., E. Okuda-Ashitaka and T. Minami (2001). Central and peripheral roles of prostaglandins in pain and their interactions with novel neuropeptides nociceptin and nocistatin. *Neurosci Res* 41(4): 299-332.

Jensen, T. S. and R. Baron (2003). Translation of symptoms and signs into mechanisms in neuropathic pain. *Pain* 102(1-2): 1-8.

Johnson, E. E. and M. Connor (2007). Towards a receptor for nocistatin? *Br J Pharmacol* 152(4): 415-6.

Johnson, J. W. and P. Ascher (1987). Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* 325(6104): 529-31.

Jones, E., I. Vinuela-Fernandez, R. A. Eager, A. Delaney, H. Anderson, A. Patel, D. C. Robertson, A. Allchorne, E. C. Sirinathsinghji, E. M. Milne, N. MacIntyre, D. J. Shaw, N. K. Waran, J. Mayhew and S. M. Fleetwood-Walker (2007). Neuropathic changes in equine laminitis pain. *Pain* 132(3): 321-31.

Kato, G., T. Yasaka, T. Katafuchi, H. Furue, M. Mizuno, Y. Iwamoto and M. Yoshimura (2006). 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* 26(6): 1787-94.

Kazim, S. F., S. A. Enam and M. S. Shamim (2010). Possible detrimental effects of neurosurgical irrigation fluids on neural tissue: An evidence based analysis of various irrigants used in contemporary neurosurgical practice. *Int J Surg*.

Kubota, K., K. Fujibayashi and K. Saito (1998). Enhancing effect of dimethyl sulfoxide on nociceptive transmission in isolated spinal cord of newborn rat. *Eur J Pharmacol* 351(2): 173-9.

Lai, J., J. C. Hunter and F. Porreca (2003). The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr Opin Neurobiol* 13(3): 291-7.

Lai, J., F. Porreca, J. C. Hunter and M. S. Gold (2004). Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 371-97.

Lee, T. L., F. M. Fung, F. G. Chen, N. Chou, E. Okuda-Ashitaka, S. Ito, Y. Nishiuchi, T. Kimura and S. Tachibana (1999). Identification of human, rat and mouse nocistatin in brain and human nocistatin in brain and human cerebrospinal fluid. *Neuroreport* 10(7): 1537-41.

Li, J., D. A. Simone and A. A. Larson (1999). Windup leads to characteristics of central sensitization. *Pain* 79(1): 75-82.

Lisney, S. J. (1989). Regeneration of unmyelinated axons after injury of mammalian peripheral nerve. *Q J Exp Physiol* 74(6): 757-84.

Löffler, G., P.E. Petrides (2003). *Biochemie und Pathobiochemie*, Springer Verlag.

Loomis, C. W., H. Khandwala, G. Osmond and M. P. Hefferan (2001). Coadministration of intrathecal strychnine and bicuculline effects synergistic allodynia in the rat: an isobolographic analysis. *J Pharmacol Exp Ther* 296(3): 756-61.

-
- Lu, Y. and E. R. Perl (2003).** A specific inhibitory pathway between substantia gelatinosa neurons receiving direct C-fiber input. *J Neurosci* 23(25): 8752-8.
- Maag, R., M. Stengel and R. Baron (2006).** Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen. *Diabetologe*(2): 104-113.
- Maier, C., R. Baron, T. R. Tolle, A. Binder, N. Birbaumer, F. Birklein, J. Gierthmuhlen, H. Flor, C. Geber, V. Hugel, E. K. Krumova, G. B. Landwehrmeyer, W. Magerl, C. Maihofner, H. Richter, R. Rolke, A. Scherens, A. Schwarz, C. Sommer, V. Tronnier, N. Uceyler, M. Valet, G. Wasner and R. D. Treede (2010).** Quantitative sensory testing in the German Research Network on Neuropathic Pain (DFNS): somatosensory abnormalities in 1236 patients with different neuropathic pain syndromes. *Pain* 150(3): 439-50.
- Main, C. and C. Spanswick (2001).** Pain management: an interdisciplinary approach. London, Elsevier.
- McLachlan, E. M., W. Janig, M. Devor and M. Michaelis (1993).** Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 363(6429): 543-6.
- Melzack, R. and P. D. Wall (1965).** Pain mechanisms: a new theory. *Science* 150(699): 971-9.
- Merskey, H. and N. Bogduk (1994).** Classification of chronic pain. Seattle, Task Force on Taxonomy.
- Meunier, J. C. (1997).** Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol* 340(1): 1-15.

-
- Mogil, J. S. and S. E. Crager (2004).** What should we be measuring in behavioral studies of chronic pain in animals? *Pain* 112(1-2): 12-5.
- Mogil, J. S., K. D. Davis and S. W. Derbyshire (2010).** The necessity of animal models in pain research. *Pain* 151(1): 12-7.
- Moore, K. A., T. Kohno, L. A. Karchewski, J. Scholz, H. Baba and C. J. Woolf (2002).** Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J Neurosci* 22(15): 6724-31.
- Morita, K., N. Motoyama, T. Kitayama, N. Morioka, K. Kifune and T. Dohi (2008).** Spinal Anti-Allodynia Action of Glycine Transporter Inhibitors in Neuropathic Pain Models in Mice. *J Pharmacol Exp Ther.*
- Murdoch, L. (1982).** Dimethyl sulfoxide (DMSO)--an overview. *Can J Hosp Pharm* 35(3): 79-85.
- Muth-Selbach, U., E. Dybek, K. Kollosche, J. U. Stegmann, H. Holthausen, P. Lipfert and H. U. Zeilhofer (2004).** The spinal antinociceptive effect of nocistatin in neuropathic rats is blocked by D-serine. *Anesthesiology* 101(3): 753-8.
- Nakagawa, T., M. Kaneko, S. Inamura and M. Satoh (1999).** Intracerebroventricular administration of nocistatin reduces inflammatory hyperalgesia in rats. *Neurosci Lett* 265(1): 64-6.
- Nakano, H., T. Minami, K. Abe, T. Arai, M. Tokumura, N. Ibii, E. Okuda-Ashitaka, H. Mori and S. Ito (2000).** Effect of intrathecal nocistatin on the formalin-induced pain in mice versus that of nociceptin/orphanin FQ. *J Pharmacol Exp Ther* 292(1): 331-6.

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

Okuda-Ashitaka, E. and S. Ito (2000). Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. *Peptides* 21(7): 1101-9.

Okuda-Ashitaka, E., T. Minami, S. Tachibana, Y. Yoshihara, Y. Nishiuchi, T. Kimura and S. Ito (1998). Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature* 392(6673): 286-9.

Oliva, A. A., Jr., M. Jiang, T. Lam, K. L. Smith and J. W. Swann (2000). Novel hippocampal interneuronal subtypes identified using transgenic mice that express green fluorescent protein in GABAergic interneurons. *J Neurosci* 20(9): 3354-68.

Payne, R. (2000). Chronic pain: challenges in the assessment and management of cancer pain. *J Pain Symptom Manage* 19(1 Suppl): S12-5.

Polgar, E., S. Gray, J. S. Riddell and A. J. Todd (2004). 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* 111(1-2): 144-50.

Polgar, E., D. I. Hughes, A. Z. Arham and A. J. Todd (2005). Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *J Neurosci* 25(28): 6658-66.

Polgar, E. and A. J. Todd (2008). Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA(A) receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn. *Neuroscience* 156(1): 193-202.

Pope, D. C. and W. T. Oliver (1966). Dimethyl sulfoxide (DMSO). Can J Comp Med Vet Sci 30(1): 3-8.

Quartaroli, M., C. Carignani, G. Dal Forno, M. Mugnaini, A. Ugolini, R. Arban, L. Bettelini, G. Maraia, F. Belardetti, A. Reggiani, D. G. Trist, E. Ratti, R. Di Fabio and M. Corsi (1999). Potent antihyperalgesic activity without tolerance produced by glycine site antagonist of N-methyl-D-aspartate receptor GV196771A. J Pharmacol Exp Ther 290(1): 158-69.

Rondon, L., A. M. Privat, L. Daulhac, N. Davin, A. Mazur, J. Fialip, A. Eschaliere and C. Courteix (2010). Mg attenuates chronic hypersensitivity and spinal cord NMDA receptor phosphorylation in a rat model of diabetic neuropathic pain. J Physiol.

Roughan, J. V. and P. A. Flecknell (2001). Behavioural effects of laparotomy and analgesic effects of ketoprofen and carprofen in rats. Pain 90(1-2): 65-74.

Roughan, J. V. and P. A. Flecknell (2003). Evaluation of a short duration behaviour-based post-operative pain scoring system in rats. Eur J Pain 7(5): 397-406.

Roughan, J. V. and P. A. Flecknell (2003). Pain assessment and control in laboratory animals. Lab Anim 37(2): 172.

Roux, M. J. and S. Supplisson (2000). Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. Neuron 25(2): 373-83.

Roza, C., J. M. Laird, V. Souslova, J. N. Wood and F. Cervero (2003). The tetrodotoxin-resistant Na⁺ channel Nav1.8 is essential for the expression of spontaneous activity in damaged sensory axons of mice. J Physiol 550(Pt 3): 921-6.

Russo, C. M. and W. G. Brose (1998). Chronic pain. Annu Rev Med 49: 123-33.

Sager, M. (2010). Schmerz beim Versuchstier. Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz e.V. Merkblatt 32.

Schaible, H. G. (2007). [Pathophysiology of pain]. Orthopade 36(1): 8, 10-2, 14-6.

Schmader, K. E. (2002). Epidemiology and impact on quality of life of postherpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. Clin J Pain 18(6): 350-4.

Scholz, J. and C. J. Woolf (2007). The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. Nat Neurosci 10(11): 1361-8.

Shank, R. P. and M. H. Aprison (1970). The metabolism in vivo of glycine and serine in eight areas of the rat central nervous system. J Neurochem 17(10): 1461-75.

Simpson, R. K., Jr., M. Gondo, C. S. Robertson and J. C. Goodman (1997). Reduction in thermal hyperalgesia by intrathecal administration of glycine and related compounds. Neurochem Res 22(1): 75-9.

Sivilotti, L. and C. J. Woolf (1994). The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. J Neurophysiol 72(1): 169-79.

Suzuki, T., I. Hide, K. Ido, S. Kohsaka, K. Inoue and Y. Nakata (2004). Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. J Neurosci 24(1): 1-7.

Theeuwes, F. and S. I. Yum (1976). Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations. Ann Biomed Eng 4(4): 343-53.

-
- Thompson, S. W., D. L. Bennett, B. J. Kerr, E. J. Bradbury and S. B. McMahon (1999).** Brain-derived neurotrophic factor is an endogenous modulator of nociceptive responses in the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14): 7714-8.
- Todd, A. J. and A. C. Sullivan (1990).** Light microscope study of the coexistence of GABA-like and glycine-like immunoreactivities in the spinal cord of the rat. *J Comp Neurol* 296(3): 496-505.
- Todd, A. J., C. Watt, R. C. Spike and W. Sieghart (1996).** Colocalization of GABA, glycine, and their receptors at synapses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 16(3): 974-82.
- Torrance, N., B. H. Smith, M. I. Bennett and A. J. Lee (2006).** The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. *J Pain* 7(4): 281-9.
- von Frey, M. (1896).** Über den Gebrauch von Reizhaaren. Untersuchungen über die Sinnesfunktion der menschlichen Haut. Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz: 208-217.
- Vrethem, M., J. Boivie, H. Arnqvist, H. Holmgren and T. Lindstrom (2002).** Painful polyneuropathy in patients with and without diabetes: clinical, neurophysiologic, and quantitative sensory characteristics. *Clin J Pain* 18(2): 122-7.
- Wall, P. D. and M. Devor (1983).** Sensory afferent impulses originate from dorsal root ganglia as well as from the periphery in normal and nerve injured rats. *Pain* 17(4): 321-39.
- Watkins, L. R., K. T. Nguyen, J. E. Lee and S. F. Maier (1999).** Dynamic regulation of proinflammatory cytokines. *Adv Exp Med Biol* 461: 153-78.

Werman, R. (1966). Criteria for identification of a central nervous system transmitter. *Comp Biochem Physiol* 18(4): 745-66.

Werman, R., R. A. Davidoff and M. H. Aprison (1967). Inhibition of motoneurons by iontophoresis of glycine. *Nature* 214(5089): 681-3.

Williams, R. (2009). 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.

Woolf, C. J. (1983). Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306(5944): 686-8.

Woolf, C. J. and R. J. Mannion (1999). Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. *Lancet* 353(9168): 1959-64.

Woolf, C. J. and M. W. Salter (2000). Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288(5472): 1765-9.

Woolf, C. J., P. Shortland and R. E. Coggeshall (1992). Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355(6355): 75-8.

Wu, G., M. Ringkamp, B. B. Murinson, E. M. Pogatzki, T. V. Hartke, H. M. Weerahandi, J. N. Campbell, J. W. Griffin and R. A. Meyer (2002). Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci* 22(17): 7746-53.

Xu, I. S., S. Grass, Z. Wiesenfeld-Hallin and X. J. Xu (1999). Effects of intrathecal orphanin FQ on a flexor reflex in the rat after inflammation or peripheral nerve section. *Eur J Pharmacol* 370(1): 17-22.

-
- Xu, I. S., M. Hashemi, G. Calo, D. Regoli, Z. Wiesenfeld-Hallin and X. J. Xu (1999).** Effects of intrathecal nocistatin on the flexor reflex and its interaction with orphanin FQ nociceptin. *Neuroreport* 10(17): 3681-4.
- Yaksh, T. L. and T. A. Rudy (1976).** Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 17(6): 1031-6.
- Yamamoto, T. and Y. Sakashita (1999).** Effect of nocistatin and its interaction with nociceptin/orphanin FQ on the rat formalin test. *Neurosci Lett* 262(3): 179-82.
- Ye, J. H., J. Zhang, C. Xiao and J. Q. Kong (2006).** Patch-clamp studies in the CNS illustrate a simple new method for obtaining viable neurons in rat brain slices: glycerol replacement of NaCl protects CNS neurons. *J Neurosci Methods* 158(2): 251-9.
- Yoshimura, M. and S. Nishi (1993).** Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic currents. *Neuroscience* 53(2): 519-26.
- Zeilhofer, H. U. (2001).** Das Rückenmark als Filter nozizeptiven Inputs: Neue Aspekte aus der pharmakologischen Grundlagenforschung. *Zeitschrift für Rheumatologie*, Steinkopff Verlag. 60.
- Zeilhofer, H. U. (2005).** The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci* 62(18): 2027-35.
- Zeilhofer, H. U. (2005).** Synaptic modulation in pain pathways. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 154: 73-100.
- Zeilhofer, H. U., U. M. Selbach, H. Guhring, K. Erb and S. Ahmadi (2000).** Selective suppression of inhibitory synaptic transmission by nocistatin in the rat spinal cord dorsal horn. *J Neurosci* 20(13): 4922-9.

Zeilhofer, H. U., B. Studler, D. Arabadzisz, C. Schweizer, S. Ahmadi, B. Layh, M. R. Bosl and J. M. Fritschy (2005). Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice. *J Comp Neurol* 482(2): 123-41.

Zhao, C. S., B. S. Li, G. Y. Zhao, H. X. Liu, F. Luo, Y. Wang, J. H. Tian, J. K. Chang and J. S. Han (1999). Nocistatin reverses the effect of orphanin FQ/nociceptin in antagonizing morphine analgesia. *Neuroreport* 10(2): 297-9.

Zimmermann, M. (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2): 109-10.

Zimmermann, M. (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429(1-3): 23-37.

11 Danksagung

Einen großen Dank möchte ich aussprechen an alle, die diese Arbeit möglich gemacht haben. Allen voran danke Herrn Dr. Henning Hermanns für die großartige Einarbeitung und Betreuung, die aufmunternden Worte und seine Unterstützung in jeder Fragestellung. Bei Frau Priv.-Doz. Dr. Inge Bauer möchte ich ebenfalls für die gute Betreuung und die zahlreichen Anregungen und Korrekturen bedanken. Es hat sehr viel Spaß gemacht in diesem Team zu arbeiten.

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

Frau Dr. Muth-Selbach danke ich für die Überlassung des aktuellen Themas.

Mein großer Dank gilt auch allen Mitarbeitern im Institut für experimentelle Anästhesiologie und der Tierversuchsanlage der Universität Düsseldorf für die gute Zusammenarbeit.

Der deutschen Forschungsgesellschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Ruth, Dir danke ich von ganzem Herzen für die unvergessliche, einzigartige Zeit unserer Zusammenarbeit und die daraus entstandene Freundschaft.

Bei meiner Familie, allen voran meinen Eltern und meiner Schwester Estelle, möchte ich für die Unterstützung jeglicher Art in allen Lebenslagen bedanken. Meiner Mutter im Speziellen danke ich für die beharrliche Motivierung. Es ist schön, dass es euch gibt!

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Mann Sven, für seine Liebe und seinen unermüdlichen Glauben in mich.

