

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Van Aken –

**Vergleich der thermischen Antinozizeption
von spinal versus peripher appliziertem Apraclonidin
im Arthritismodell der Ratte**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms–Universität Münster

vorgelegt von:

Oliver Post

aus Bielefeld

2004

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. H. Bürkle

2. Berichterstatter: Hdoz. PD Dr. med. J. Steinbeck

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Februar 2004

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Van Aken -
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. H. Bürkle
Koreferent: Hdoz. PD Dr. med. J. Steinbeck

Zusammenfassung

Post

Oliver

Vergleich der thermischen Antinozizeption von spinal versus peripher appliziertem Apraclonidin im Arthritismodell der Ratte

(Genehmigungsnummer G 84/99 der Tierschutzkommission der Bezirksregierung Münster)

Für Apraclonidin, ein Clonidin-Derivat, das aufgrund seiner veränderten chemischen Struktur eine reduzierte Blut-Hirn-Schrankenpenetration haben soll, wurde die periphere und zentrale antinozizeptive Wirksamkeit untersucht. Dabei wurde im Tiermodell, mit und ohne Kniegelenkentzündung, die thermale antinozizeptive Potenz von intraartikulär und intrathekal appliziertem Apraclonidin evaluiert.

Diese Studie belegt, dass die antinozizeptive Wirkung von peripher verabreichtem Apraclonidin fast ausschließlich über periphere und nur geringfügig über spinale α_2 -adrenerge Rezeptoren zustande kommt.

Im Vergleich zu zentral appliziertem Apraclonidin, das keinerlei Veränderung der thermischen Antinozizeption unter Nichtentzündungs- versus Entzündungsbedingungen bewirkt, verursacht die periphere Apraclonidin-Gabe eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve.

Gemessen an früheren Untersuchungen mit Clonidin bringt die periphere Applikation von Apraclonidin Vorteile hinsichtlich der Reduktion von supraspinalen Nebenwirkungen.

*Für Maria und Willi
als Dank für ihre immerwährende Unterstützung
und Freundschaft.*

Vergleich der thermischen Antinozizeption von spinal versus peripher appliziertem Apraclonidin im Arthritismodell der Ratte

1	Einleitung	3
1.1	Titel der Arbeit	3
1.2	Ziel der Arbeit	3
1.3	Theoretische Grundlagen	3
1.3.1	Einführung	3
1.3.2	α -adrenerge Agonisten	4
1.3.3	Clonidin	6
1.3.4	Apraclonidin	7
1.3.5	Yohimbin	8
2	Material und Methoden	9
2.1	Versuchstiere	9
2.1.1	Identifikation der Ratten	9
2.1.2	Messung der Knieumfänge	9
2.2	Spinalkatheter	10
2.2.1	Herstellung des Intrathekalkatheters	10
2.2.2	Implantation des Intrathekalkatheters	10
2.2.3	Postoperative Versuchsbedingungen	11
2.3	Kniegelenkentzündung	11
2.4	Medikamentenapplikation	12
2.4.1	Intraartikuläre Injektion	12
2.4.2	Subcutane Applikation	12
2.4.3	Intrathekale Applikation	13
2.5	Versuchsgruppen	13
2.6	Thermische Testung	16
2.6.1	Die modifizierte Hargreaves Box	16
2.6.2	Testphase	17
2.6.3	Zeitlicher Ablauf der Testung	17
2.7	Supraspinale Nebenwirkungen	19
2.8	Datenauswertung	20

3	Ergebnisse	22
3.1	Allgemeines	22
3.2	Kniegelenkentzündung durch intraartikuläre Kaolin/Carrageenan Injektion	22
3.3	Intraartikuläre (periphere) Applikation von Apraclonidin	23
3.3.1	Thermische Antinozizeption	23
3.4	Subcutane (systemische) Applikation von Apraclonidin	29
3.4.1	Thermische Antinozizeption	29
3.5	Intrathekale (spinale) Applikation von Apraclonidin	31
3.5.1	Thermische Antinozizeption	31
3.6	Vorbehandlung mit dem α_2-Antagonisten Yohimbin	34
3.6.1	Thermische Antinozizeption	34
3.7	Supraspinaler Index und Nebenwirkungen	38
4	Diskussion	41
4.1	Diskussion des Modells	41
4.2	Kochsalz-Kontrollgruppen	41
4.3	Applikation von Apraclonidin	43
4.4	Nebenwirkungen	45
4.5	Weitere Ergebnisse	46
5	Zusammenfassung	48
6	Danksagung	49
7	Literaturverzeichnis	50
8	Lebenslauf	58
9	Genehmigungsbescheide der Bezirksregierung Münster	60

1. Einleitung

1.1 Titel der Arbeit

Vergleich der thermischen Antinozizeption von spinal versus peripher appliziertem Apraclonidin im Arthritismodell der Ratte.

1.2 Ziel der Arbeit

Für Apraclonidin, ein Clonidin-Derivat, das aufgrund seiner veränderten chemischen Struktur eine reduzierte Blut-Hirn-Schrankenpenetration haben soll, wurde die periphere und zentrale antinozizeptive Wirksamkeit untersucht. Dabei wurde im Tiermodell mit und ohne Kniegelenkentzündung die thermale antinozizeptive Potenz von intraartikulär (IA) und intrathekal (IT) appliziertem Apraclonidin evaluiert. Ferner wurde untersucht, ob peripher verabreichtes Apraclonidin, wie intrathekal appliziertes, die neuronale Sensibilisierung hemmen kann.

1.3 Theoretische Grundlagen

1.3.1 Einführung

Vor mehr als 30 Jahren wurde Clonidin, ein α_2 -adrenerger Agonist in den klinischen Gebrauch als Antihypertensivum eingeführt (Barnett et al. 1968 [8]). Abgesehen von dieser Einsatzmöglichkeit fand Clonidin seine Verwendung in der Therapie verschiedenster psychischer Störungen, der Therapie von kindlichen Wachstumsstörungen, (Aantaa et al. 1993 [1]; Gold et al. 1980 [40]; Wilkins et al. 1983 [85]; Bond 1986 [11]; Pintor et al. 1987 [68]), sowie in der veterinärmedizinischen Anästhesie.

In den letzten Jahren untersuchten experimentelle und klinische Studien zunehmend den analgetischen und anästhesiologischen Nutzen dieser Wirkstoffgruppe. So wurde herausgefunden, dass Clonidin über α_2 -adrenerge Rezeptoren im zentralen und peripheren Nervensystem eine dosisabhängige Analgesie bei Tier und Mensch erzielt (Buerkle et al. 1999 [16]; Eisenach et al. 1995 [35]). Daraus hat sich ein neues Einsatzgebiet für die Therapie neuropathischer und inflammatorischer Schmerzen ergeben.

Eine Einschränkung der klinischen Anwendung von α_2 -adrenerger Agonisten resultiert aber aus der Folge von zentralen Nebenwirkungen, wie Sedation, oder kardiovaskulären Nebenwirkungen, wie Bradykardie und Hypotension. Daher ist man an der Entwicklung und klinischen Einführung von selektiven Agonisten, wie Apraclonidin, interessiert.

1.3.2 α -adrenerge Agonisten

α -adrenerge Agonisten werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Pharmakologie in 2 Typen unterteilt (Bylund et al. 1983 [20]): in α_1 - und α_2 - adrenerge Agonisten. Diese Unterteilung resultiert aus der jeweiligen Reaktion mit dem α_1 -selektiven Antagonisten Prazosin und dem α_2 -selektiven Antagonisten Yohimbine. Darüber hinaus werden α_2 -Rezeptoren, basierend auf pharmakologischen und molekulargenetischen Untersuchungen (Bylund 1988 [19]), in weitere 3 Untertypen eingeteilt: in α_2A , α_2B und α_2C . Schließlich werden die α_2 -adrenergen Agonisten pharmakologisch in drei Hauptgruppen eingeordnet, in Phenylethylamine, in Oxalozepine und in Imidazoline, wie zum Beispiel Clonidin und Apraclonidin.

α_2 -adrenerge Agonisten bewirken über G-Proteine eine Hemmung der Adenylatzyklase. Dadurch kommt es zu einem Abfall von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einer verminderten Stimulation der cAMP-abhängigen Proteinkinase und damit zur verminderten Phosphorylierung von Regulatorproteinen. Weitere Wirkmöglichkeiten bestehen in der Veränderung der Membranleitfähigkeit durch den Ausstrom von Kalium über kalziumgesteuerte Kaliumkanäle und in der Inhibierung des Kalziumeinstroms in Nervendigungen über spannungsgesteuerte Kalziumkanäle (Mizobe et al. 1995 [63]).

Aufgrund der weitgestreuten Verteilung von α_2 -Rezeptoren im gesamten Körper gibt es ein großes Wirkspektrum :

Zentrales Nervensystem

- *Sedation* (Doze et al. 1989 [33])
- *Anxiolyse* (Carabine et al. 1991 [21] ; Wright et al. 1990 [86] ; Uhde et al. 1989 [82])
- *Analgesie* (Pertovaara et al. 1991 [66] ; Wang et al. 1985 [84]; Yaksh et al. 1981 [87]; Buerkle et al. 1999 [16] ; Eisenach et al. 1995 [35])

- *Therapie von Alkohol- und Benzodiazepinentzugssyndromen* (Ashton 1987 [6]; Cushman et al. 1989 [28]; Yam et al. 1992 [89])
- *Erniedrigung des Anästhetikabedarfs* (Kaukinen et al. 1979 [52]; Bloor et al. 1982 [10]; Maze et al. 1988 [59], Segal et al. 1988 [73]; Vickery et al. 1988 [83])
- *Erniedrigung des Augeninnendruckes* (Ghingnone et al. 1988 [39]; Jaakola et al. 1992 [47]; Kumar et al. 1992 [54]; Kriegelstein et al. 1978 [53])
- *Therapie des postoperativen Shiverings* (Joris et al. 1993 [49])

Kardiovaskuläres System (periphere und zentrale Wirkweise)

- *Bradykardie* (De Jonge et al. 1981 [30])
- *Vasokonstriktion (Arterien und Venen)* (Ruffolo 1985 [70])
- *Hypotension* (Frisk-Holmberg et al. 1984 [37]; Tibirica et al. 1991 [81]; Bousquet et al. 1984 [12]; Bousquet et al. 1989 [13])
- *Antiarrhythmogene Wirkung* (Hayashi et al. 1991 [46]; Hayashi et al. 1993 [45]; Kamibayashi et al. 1995 [50])

Respiratorisches System

- *geringfügige Atemwegsdepression* (Nguyen et al. 1992 [64]), *bemerkenswerte atemdepressive Wirkung von Clonidin nur nach massiven Dosen* (Anderson et al., 1989 [3]; Olsson et al. 1983 [65])
- *keine Potenzierung der Opioid-induzierten Atemdepression durch Clonidin* (Bailey et al. 1991 [7]; Jarvis et al. 1992 [48])
- *Verbesserung der asthmabedingten Bronchokonstriktion durch Clonidin* (Lindgren et al. 1986 [57])

Endokrines System

- *Sympathikolyse* (Langer 1974 [55])
- *Ausschüttung des Wachstumshormons* (Grossman et al. 1987 [42])
- *Verminderung der Insulinausschüttung* (Angel et al. 1988 [4]; Massara et al. 1983 [58])

Gastrointestinales System

- *antisialogene Wirkung* (Karhuvaara et al. 1991 [51])
- *Hemmung der intestinalen Wasser- und Ionensekretion in den Darm* (McArthur et al. 1982 [60])
- *Modulation der Magensäurefreisetzung* (Blandiaai et al. 1990 [9])

Renales System

- *Diuresesteigerung, durch: Hemmung der Ausschüttung des Antidiuretischen Hormons (ADH)* (Peskind et al. 1987 [67]), *Antagonisierung der renal-tubulären ADH-Wirkung* (Stanton et al. 1987 [77]), *Steigerung der glomerulären Filtrationsrate* (Strandhoy 1985 [78]) *und Ausschüttung des Atrialen Natriuretischen Faktors (ANF)* (Chen et al. 1989 [23])

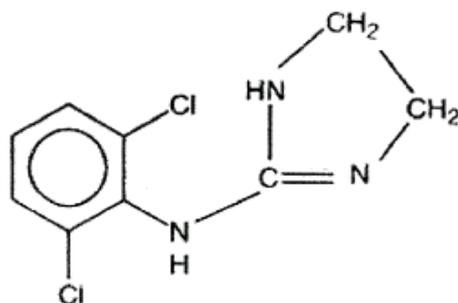
Hämatologisches System

- *Thrombozytenaggregation* (Ruffolo et al. 1988 [71])

1.3.3 Clonidin

Abbildung 1: Strukturformel von Clonidin

2-[(2,6-Dichlorphenyl)imino]imidazolidin



Clonidin (siehe Abbildung 1), ein Imidazol-Derivat, ist ein selektiver Partialagonist des α_2 -Rezeptors mit einem ungefähren Verhältnis von 200:1 (α_2 : α_1). Es wird rasch nach oraler Applikation absorbiert und erreicht seine höchste Plasmakonzentration nach 60

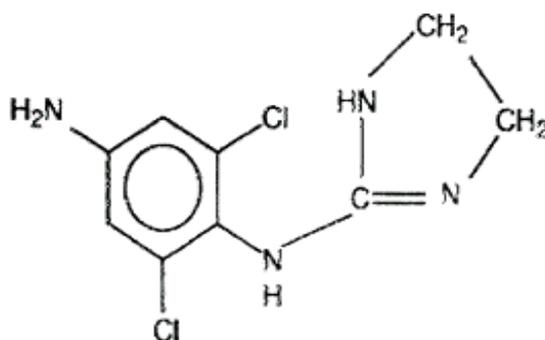
bis 90 Minuten. Die Eliminationshalbwertszeit beträgt zwischen 9 und 12 Stunden, wobei 50 % des Medikamentes in Form inaktiver Metabolite über die Leber und der Rest unverändert über die Nieren ausgeschieden wird (Mizobe et al. 1995 [63]).

Die spinalen antinozizeptiven Wirkmechanismen des Clonidins finden, wie auch bei den anderen α_2 -adrenergen Agonisten, sowohl auf präsynaptischer als auch auf postsynaptischer Seite statt. Neben der präsynaptischen Inhibierung der Freisetzung von Neurotransmittern, wie Calcitonin - Gen assoziiertes Peptid, Substanz P, Vasoaktives intestinales Polypeptid und Glutamat, hat Clonidin einen exzitatorischen Effekt auf spinale nicht-nozizeptive Neurone (low treshold neurons) und einen inhibitorischen Effekt auf spezifisch nozizeptive Neurone (high treshold neurons) und multirezeptive Neurone (wide dynamic range neurons) im Rückenmarkshinterhorn der Ratte (Millar et al. 1993 [61]). Dies lässt vermuten, dass Clonidin eine Übererregbarkeit von multirezeptiven Neuronen, wie sie bei chronischem Schmerz vorliegt, hemmen kann. Somit würden α_2 -adrenerge Agonisten direkt antagonistische Anteile an N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA) auf multirezeptiven Neuronen besitzen (Buerkle et al. 2002 [14]; Faber et al. 1998 [36]).

1.3.4 Apraclonidin

Abbildung 2: Strukturformel von Apraclonidin

2-[(4-Amino-2,6-dichlorphenyl)imino]imidazolidin



Apraclonidin (siehe Abbildung 2), ein Clonidinderivat, besitzt im Vergleich zu Clonidin eine zusätzliche Aminogruppe, welche zu einer reduzierten Blut-Hirn-Schrankenpenetration führt. Daher verursacht Apraclonidin auch keine systemische

Hypotension (Coleman et al. 1990 [26]) und wird dem Clonidin in der Ophthalmologie zur Reduktion des Augeninnendruckes vorgezogen. Dies geschieht durch die Verminderung von Produktion und Freisetzung des Kammerwassers (Kriegelstein et al. 1978 [53]) und findet seinen Einsatz in der Glaukom-Therapie (Chen et al. 2001 [24]; Robin et al. 1995 [69]; Araujo et al. 1995 [5]).

Lin und seine Kollegen [56] wiesen nach, dass Apraclonidin als peripherer α_2 -adrenerger Agonist ohne Involvierung zentraler α_2 -Rezeptoren die spinale Ausschüttung von exzitatorisch wirksamen Aminosäuren hemmt und damit deren spinale Konzentration. Letztere wird im Rahmen von Entzündung und dazugehöriger zentraler Sensibilisierung für die entstehende thermische und taktile Überempfindlichkeit verantwortlich gemacht.

1.3.5 Yohimbin

Yohimbin, ein α_2 -adrenerger Antagonist, gehört zur Gruppe der Alkaloide. Aufgrund seiner Wirksamkeit als kompetitiver Antagonist, welche proportional zur Bindungsfähigkeit am α_2 -Adrenorezeptor ist (Buerkle et Yaksh 1998 [18]), wird er in Studien zur Untersuchung α_2 -adrenerger Mechanismen eingesetzt (Takano et Yaksh 1992 [80]).

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchung und alle damit verbundenen Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Richtlinien zur tierexperimentellen Arbeit der internationalen Schmerzforschungsgesellschaft (IASP) sowie der Tierschutzkommission der Bezirksregierung Münster (WWU) (Genehmigungsnummer G 84/99) durchgeführt.

Bei den Experimenten kamen 93 männlichen Sprague Dawley Ratten zum Einsatz. Verwendet wurden adulte Ratten mit einem Gewicht von 270-360 Gramm (Harlan Winkelmann GmbH®, Borcheln).

Die Tiere wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung der WWU Münster einzeln in Makrolonkäfigen bei einem 12-Stunden Hell-Dunkel-Zyklus gehalten, wobei Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung standen.

Nach der durch den Versuchsplan erforderlichen Beobachtungszeit von circa 25 Stunden, in welcher die verschiedenen Versuche durchgeführt wurden, wurden die Tiere nach Einleitung einer Narkose mittels Halothan® (Rüsch Hospital Vertriebs GmbH®, Böblingen) durch die intravenöse Injektion von Barbiturat (Trapanal®, Byk Gulden®, Konstanz) getötet.

2.1.1 Identifikation der Ratten

Jedes der Tiere wurde mit einer Identifikationsnummer versehen. Des Weiteren wurden das Gewicht und die Knieumfänge des Tieres bestimmt und alle Besonderheiten, wie zum Beispiel Operationsdaten oder Verhaltensauffälligkeiten, dokumentiert.

2.1.2 Messung der Knieumfänge

Zur Kontrolle der Entzündungsreaktion wurde bei den Tieren eine Bestimmung der Knieumfänge durchgeführt. Dies geschah an beiden Hinterpfoten zu Beginn der Versuchsreihe am ersten Tag und nach genau 24 Stunden am zweiten Tag.

Gemessen wurde unterhalb der Patella, wobei das Kniegelenk in einer Flexionsstellung von circa 70-80° gehalten wurde.

2.2 *Spinalkatheter*

2.2.1 *Herstellung des Intrathekalkatheters*

Die Herstellung des Intrathekal-(IT-)Katheters wurde nach einem Verfahren von Yaksh und Rudy, 1976 [88] durchgeführt. Dazu wurde ein 10 cm langer Polyethylenschlauch (PE-10; 0,58 mm Innendurchmesser; 0,96 mm Außendurchmesser; Becton Dickinson®, USA) mit einem lockeren Knoten versehen, der so angelegt wurde, dass er den IT-Katheter in ein 7 cm und ein 3 cm langes Stück einteilte und das Lumen nicht verschloss. Zur Fixierung wurde der Knoten in Dental-Acryl-Lösung, einem Kunststoff-Kaltpolymerisat (Paladur®, Kulzer®), getaucht und gehärtet. Am nächsten Tag wurde das 7 cm lange Ende des PE-10 Schlauches dann manuell auf 12 cm gedehnt, um eine weichere Konsistenz und einen kleineren Außendurchmesser des Katheters zu erzielen. Damit sollte die Traumatisierung des Rückenmarkes durch den IT-Katheter auf ein Minimum reduziert werden. Nach einem weiteren Tag wurde das gedehnte Ende auf 8,5 cm gekürzt und mittels NaCl 0,9 % auf seine Dichtigkeit hin überprüft.

2.2.2 *Implantation des Intrathekalkatheters*

Die Implantation des Intrathekalkatheters geschah durch ein von Buerkle et al. 1999 [16] beschriebenes Verfahren.

So wurde zu Beginn eine Sondierung des Spinalraumes am zisternalen Anteil in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Die Tiere wurden mittels Maskennarkose durch ein Halothan (2-3 %) Sauerstoff-Luftgemisch betäubt und nach entsprechender Rasur im zu operierenden Bereich mittels Alkohollösung desinfiziert, um anschließend für die exakte Lokalisierung des IT-Katheters unter Beibehaltung der Narkose in einem stereotaktischen Kopfhalter plziert zu werden. Es wurde dann, nach Hautschnitt (circa 0,5 cm) und schichtweiser Präparation, die Membrana Atlanto-occipitale dargestellt, unter welche nach Inzision der IT-Katheter in den Spinalraum zur Medikamentengabe

eingbracht wurde. Die Länge des IT-Katheters betrug 8,5 cm und endete auf Höhe der lumbalen Vergrößerung des Spinalmarks. Die kraniale Fixierung des Katheters erfolgte mittels eines kleinen Knotens und einer subkutanen Naht. Nach schichtweisem Verschluss von Zisterne und Muskulatur wurde das Katheterende subkutan rostralwärts nach außen geleitet.

2.2.3 Postoperative Versuchsbedingungen

Für die intrathekale Applikation des Medikamentes wurden nur solche Tiere verwendet, welche nach der Platzierung des Intrathekalkatheters normal auslösbare Reflexe aufwiesen und keinerlei motorische oder sensorische Defizite zeigten.

Zur Überprüfung der korrekten Lage des IT-Katheters wurde den Ratten am ersten postoperativen Tag 10 µg Lidocain (Xylocain® 2 %, Astra GmbH®, Wedel) über den Katheter appliziert. Als Kriterium für eine korrekte Lage wurde die symmetrische Lähmung der hinteren Extremität angesehen.

Nach dem Platzieren des Intrathekalkatheters wurde eine Rekonvaleszenzphase von 5 Tagen eingehalten.

2.3 Kniegelenkentzündung

Die Kniegelenksentzündung wurde durch 100 µl eines 3 % Kaolin/Carrageenan-Gemisches, im Verhältnis 1:1, induziert.

Kaolin ist ein Gemisch aus hydratisiertem Aluminiumsilikat und zeichnet sich durch eine Partikelgröße von 0,1-4 µm aus.

Carrageenan besteht in seiner Form als „Carrageenan Lambda Type IV®“ aus einem Gemisch von 0,6 % Kalzium, 4,7 % Kalium und 4,7 % Natrium.

Beide Produkte kommen von der Firma Sigma Chemical®, St. Louis, USA.

Nach der Bestimmung der Baseline-Werte wurden die Tiere in eine Narkosebox gesetzt und kurz mit einem 2-3 % Halothan-Sauerstoff-Luftgemisch betäubt. Das rechte Kniegelenk wurde mit Alkohol desinfiziert und daraufhin mit einer 27 Gauge-Nadel durch das Lig. patellae punktiert.

Verabreicht wurden insgesamt 0,1 ml des Kaolin/Carrageenan-Gemisches.

Um eine exakte Medikamentenapplikation in den Kniegelenksspalt sicherstellen zu können, wurde im Vorfeld der Studie die intraartikuläre Injektion mit Hilfe von Methyleneblau (0,1 ml) an toten Ratten getestet und durch eine anschließende Obduktion überprüft.

2.4 Medikamentenapplikation

2.4.1 Intraartikuläre Injektion

Vor der intraartikulären Injektion wurden die Ratten in eine Narkosebox gesetzt und bis zum Eintritt der Regungslosigkeit mit einem 2-3 % Halogen-Sauerstoff-Luftgemisch anästhesiert.

Danach wurde das rechte Knie mit Alkohol desinfiziert und mit einer 27 Gauge-Nadel durch das Ligamentum patellae punktiert.

Es wurde je nach Versuchsgruppenzugehörigkeit entweder 0,1 ml Apraclonidin-HCl (Alcon®), NaCl 0,9 %, oder Yohimbin (Yohimbin Hydrochlorid, Sigma Chemical®, St. Louis, USA) appliziert.

2.4.2 Subkutane Applikation

Wie zuvor bei der intraartikulären Injektion beschrieben, wurden die Tiere vor der subkutanen Injektion anästhesiert.

Nach diesem Vorgang wurde das rechte Knie mit Alkohol desinfiziert und mit Hilfe einer 27 Gauge-Nadel 0,1 ml Apraclonidin über dem Kniegelenk subkutan injiziert.

2.4.3 Intrathekale Applikation

Damit die intrathekale Applikation durchgeführt werden konnte, wurden die Ratten, wie schon zuvor erwähnt, anästhesiert.

Das Set zur Applikation des Medikamentes bestand aus einer 1 ml-Spritze mit 10 µl-Skalierung, einem PE-Schlauch mit 0,58 mm Innendurchmesser und 0,96 mm

Außendurchmesser (10 µl entsprechen 3,8 cm, entsprechende Skalierung) und zwei Adaptern (ein Adapter als Verbindung zwischen Spritze und PE-Schlauch und ein Adapter als Verbindung zwischen PE-Schlauch und intrathekalem Katheter).

Vor jeder Benutzung wurden der PE-Schlauch und die Adapter mit Alkohol desinfiziert und anschließend ausgiebig mit NaCl 0,9 % gespült.

Danach wurde der PE-Schlauch und die 1 ml-Spritze mit NaCl 0,9 % gefüllt, abgesehen von den letzten 3,8 cm des PE-Schlauches an der Katheterspitze, welche mit dem zu verabreichendem Apraclonidin oder Yohimbin gefüllt wurden.

Der Adapter der Katheterspitze des PE-Schlauches wurde mit dem IT-Katheter konnektiert und dann über einen Zeitraum von 90 Sekunden zuerst 10 µl Apraclonidin und darauffolgend 20 µl NaCl 0,9 % zum Spülen des IT-Katheters injiziert. Die gleichmäßige und langsame Verabreichung des Medikamentes sollte die Verwirbelung an der Austrittsstelle des IT-Katheters im Rückenmark und eine erhöhte Druckbildung, welche zu einem Aufsteigen des Medikamentes in höhere Bereiche des Rückenmarks hätte führen können, verhindern. Die 20 µl NaCl 0,9 % zur Spülung des Katheters entsprachen der IT-Katheterlänge und gewährleisteten eine vollständige Spülung des Katheters. Zum Schluss wurde nach Entfernung des PE-Schlauches das Lumen des IT-Katheter wieder mit einem Stück Draht mit dem Innendurchmesser von 0,58 mm verschlossen.

2.5 Versuchsgruppen

Die Studie umfasste insgesamt 18 Gruppen, jeweils mit einer Anzahl von vier bis sechs Tieren.

Diese 18 Gruppen setzten sich zusammen aus einer Kochsalz-Gruppe, vier intrathekalen Medikamentengruppen, sechs intraartikulären Medikamentengruppen, einer subkutanen Medikamentengruppe und sechs Antagonisten-Gruppen.

Die Tiere der Kochsalz-Gruppe bekamen 100 µl NaCl 0,9 % intraartikulär gespritzt. Die Dosierungen der intrathekalen Medikamentengruppe variierten zwischen 3 µg, 5 µg und 10 µg in 10 µl Kochsalzlösung gelöst, die der intraartikulären Medikamentengruppe zwischen 3 µg, 10 µg und 30 µg, jeweils in 100 µl Kochsalzlösung gelöst. Die Tiere der subkutanen Medikamentengruppe erhielten 30 µg in 100 µl gelöst und der Antagonisten-Gruppe wurde entweder 10 µl intrathekal oder 100 µl intraartikulär des

Yohimbin injiziert. Bei der Auswahl der Dosierungen für die intraartikuläre Applikation wurden die Studien von Abram et al. 1995 [2] herangezogen, daran orientierend auch die Dosierungen der anderen Versuchsgruppen.

Die Dosierungen der einzelnen Versuchsgruppen waren der versuchsdurchführenden Person nicht bekannt, da die Studie als Doppel-Blind-Studie konzipiert war.

Tabelle 1: Übersicht über die Zusammensetzung der Versuchstiergruppen

Gruppen- Bezeichnung	Anzahl der Tiere	Entzündung	Medikament	Dosierung
A	4	Kaolin- Carrageenan	NaCl 0,9 %	100µl IA
B 1	5 (6*)	NaCl 0,9 %	Apraclonidin	3µg/10µl IT
B 2	4	Kaolin- Carrageenan	Apraclonidin	3µg/10µl IT
B 3	4	Kaolin- Carrageenan	Apraclonidin	5µg/10µl IT
B 4	4	Kaolin- Carrageenan	Apraclonidin	10µg/ 10µl IT
C 1	5	NaCl 0,9 %	Apraclonidin	3µg/ 100µl IA
C 2	6	Kaolin- Carrageenan	Apraclonidin	3µg/ 100µl IA
C 3	5	NaCl 0,9 %	Apraclonidin	10µg/ 100µl IA
C 4	6	Kaolin- Carrageenan	Apraclonidin	10µg/ 100µl IA
C 5	5	NaCl 0,9 %	Apraclonidin	30µg/ 100µl IA
C 6	6	Kaolin- Carrageenan	Apraclonidin	30µg/ 100µl IA
D 1	5	Kaolin- Carrageenan	Apraclonidin	30µg/ 100µl SC
E 1	6	Kaolin- Carrageenan	Yohimbin + Apraclonidin	100µl IA 30µg/100µl IA
E 2	5	Kaolin- Carrageenan	Yohimbin + Apraclonidin	100µl IA 30µg/100µl SC
E 3	5	Kaolin- Carrageenan	Yohimbin	100µl IA
E 4	6	Kaolin- Carrageenan	Yohimbin + Apraclonidin	10µl IT 30µg/100µl IA
E 5	5	Kaolin- Carrageenan	Yohimbin	10µl IT
E 6	5 (6**)	Kaolin- Carrageenan	Yohimbin + Apraclonidin	10µl IT 30µg/10µl IT

Tab 1.: In Klammern steht die Anzahl der Tiere in ursprünglicher Gruppenstärke. Ausgeschlossen wurden * 1 Tier mit undurchlässigem IT-Katheter; ** 1 Tier mit Verhaltensauffälligkeiten.

2.6 Thermische Testung

2.6.1 Die modifizierte Hargreaves Box

Zur Messung der thermischen Nozizeption wurde die thermal withdrawal response (TWR) überprüft, unter Zuhilfenahme der modifizierten Hargreaves Box, beschrieben von Hargreaves et al. 1998 [43]; Chaplan et al. 1994 [22].

Der Untersucher, dem die Art und Dosis des Medikamentes unbekannt war, setzte die Ratten zu Beginn der Versuchsreihe in Klarsichtplastikboxen (9 x 22 x 5 cm) auf die Glasplattenoberfläche der Hargreaves Box, welche durch eine Feedback-kontrollierte Heizlüftung konstant auf 30° Celsius gehalten wurde. Vor Beginn der thermischen Stimulation wurde den Tieren 20 Minuten Zeit zur Adaptation an die neuen Umgebungsbedingungen gegeben (Dirig et al. 1997 [32], Cui et al. 1997 [27]).

Der thermale Stimulus bestand aus einer unter der Glasplatte frei beweglichen Halogenbirne, deren Lichtstrahl auf das zu untersuchende Objekt fokussiert werden konnte. Untersucht wurden die Plantarflächen beider Hinterpfoten, das heißt sowohl die Plantarfläche ipsilateral des Knies mit der induzierten Entzündung als auch die Plantarfläche der kontralateralen Hinterpfote, welche keine Entzündung aufwies. Durch den thermischen Stimulus konnte die Glasplatte unter der zu untersuchenden Plantarfläche bis auf 50° Celsius erhitzt werden. Der thermische Stimulus endete automatisch, wenn entweder das Wegziehen der stimulierten Pfote durch eine Photodiode registriert, oder ein Zeitintervall von 20,48 Sekunden (cut-off Zeitpunkt) durch eine in die Box integrierte Stoppuhr erreicht wurde.

Die Temperatur der Glasplattenoberfläche wurde durch eine Temperaturmesssonde festgestellt und kontinuierlich über ein Display angezeigt. Die Wärmeintensität der Halogenbirne wurde durch dieselbe Temperaturmesssonde gemessen und täglich entsprechend kalibriert. Dies geschah durch Anpassung an die Temperaturveränderung, welche nach 10 Sekunden festgestellt werden konnte ($t^{1/2} = 0,2$ Sekunden). Die Stimulationstemperatur von 50° Celsius wurde ab der 11. Sekunde bis zum Erreichen des cut-off-Wertes nach 20.48 Sekunden konstant gehalten.

2.6.2 Testphase

Die thermische Stimulation begann nach einer Adaptationsphase der Ratten auf der Hargreaves Box von 20 Minuten.

Zuerst wurde die Extremität mit der induzierten Entzündung ausgetestet. Der Lichtstrahl der Halogenbirne wurde dazu auf die Plantarfläche der rechten Hinterpfote fokussiert und dann die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote gemessen. Nach einer Ruhephase für das Tier von 30 bis 60 Sekunden, wurde dann die kontralaterale Hinterpfote stimuliert, die keine Entzündung aufwies.

Als Kriterien einer Wegzieh-Reaktion galten:

- Plötzliches Wegziehen der stimulierten Pfote
- Lecken der stimulierten Pfote
- Anheben der stimulierten Pfote
- Sichtbare Kontraktion der Beinmuskulatur der stimulierten Extremität

Bewegungen des Tieres, die nach einem anderen Muster abliefen, wurden als Spontanaktivität eingestuft und nicht als direkte Reaktion auf den thermischen Stimulus gewertet.

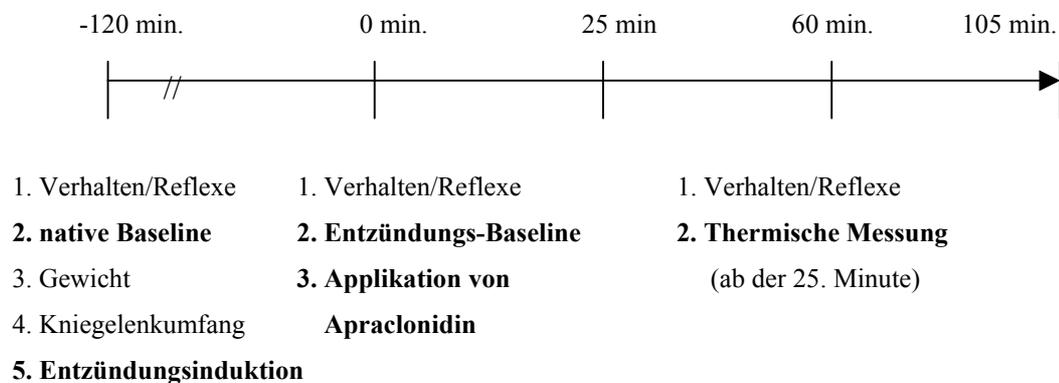
Die thermische Messung wurde pro Messintervall und Ratte dreimal auf der Seite mit der induzierten Entzündung und zweimal auf der kontralateralen, nicht entzündeten Seite durchgeführt.

2.6.3 Zeitlicher Ablauf der Testung

Zu Beginn des ersten Testtages wurden die Ratten zur Adaptation in die Plexiglasboxen auf die Hargreaves Box gesetzt. Dort verblieben sie dann 20 Minuten. Nachdem die Tiere sich an ihre Umgebung angepasst und ihr exploratives Verhalten eingestellt hatten, wurden, wie zuvor beschrieben, ihr Verhalten und ihre Reflexe überprüft. Daran schloss sich die Bestimmung der nativen Baseline an. Zur Induktion der Kniegelenkentzündung wurden die Ratten kurz mit Halothan narkotisiert, im betäubten Zustand gewogen und die Kniegelenkumfänge gemessen. Nach der Narkose wurden die Tiere in ihre Käfige mit Futter und Wasser gesetzt und es wurde ihnen eine Ruhepause von 100 Minuten eingeräumt. Diese war notwendig, um eine maximale Entzündungsreaktion im Kniegelenk der rechten Hinterpfote zu erreichen. Hierauf

folgte wieder eine 20minütige Adaptationszeit in den Plexiglasboxen auf der Hargreaves Box, bevor die Entzündungsbaseline für alle Tiere bestimmt wurde. Anschließend wurden die Ratten wieder narkotisiert, das Apraclonidin injiziert und die Tiere in ihre Plexiglasboxen zurückgebracht. Jeweils nach 25, 60 und 105 Minuten wurden die Reaktionszeiten auf das Apraclonidin hin überprüft und der supraspinale Index zur Beobachtung von Verhaltensauffälligkeiten angewandt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Zeitabstände für jedes Tier exakt eingehalten wurden. Nach Abschluss des ersten Versuchstages wurden die Ratten wieder in ihre Käfige gebracht, wo ihnen Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung standen. 24 Stunden nach Beginn des ersten Versuchstages wurden dann die Kniegelenkumfänge erneut bestimmt. Danach wurden die Tiere euthanasiert.

Abbildung 3: Zeitlicher Ablauf der Testung am 1. Tag



2.7 *Supraspinale Nebenwirkungen*

Um Verhaltensveränderungen vor und nach Applikation von Medikamenten feststellen zu können, wurde ein Index zur Messung von supraspinalen Nebenwirkungen verwendet. Dieser Index umfasst vier verhaltensbiologische Parameter, welche in Dosis-abhängiger Weise durch Opioide geblockt werden können (Buerkle und Yaksh 1996 [17]):

- Ohrmuschelreflex (ausgelöst durch leichte Berührung der inneren Ohrmuschel mit PE-10 Schlauch)
- Cornealreflex (ausgelöst durch leichte Berührung der Cornea mit PE-10 Schlauch)
- Evozierte Bewegungen (ausgelöst durch Anklopfen an die Plexiglaswand)
- Spontane Bewegungen (Putzen, Kauen, Umherbewegen)
- Aufrichtreflex (nach Drehen auf den Rücken)

Die Bewertung der Reflexe wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 0 Punkte: normale Spontanbewegungen, sofortige Reflexantwort
- 1 Punkt: Spontanbewegungen und Reflexantwort sind qualitativ und quantitativ abgeschwächt, aber auslösbar
- 2 Punkte: Spontanbewegungen und Reflexantworten über einen Zeitraum von einer Minute nicht zu beobachten

Zur Einschätzung der supraspinalen Nebenwirkungen müssen die Punktwerte der einzelnen Parameter summiert werden, was einen maximalen Punktwert von 10 (5x2) erlaubt. Diese Testung der supraspinalen Nebenwirkungen wurde begleitend zur antinozizeptiven Testung durchgeführt.

2.8 Datenauswertung

Eine Verzögerung oder ein Ausfall des thermisch provozierten Wegziehreflexes, beschreibt die vorherrschende antinozizeptive Aktivität. Diese Antinozizeption wird als Prozentwert des maximal möglichen Effektes (**Maximal Possible Effect = MPE**) ausgedrückt.

$$\% \text{ MPE} = \frac{(\text{Reflexlatenzzeit mit Medikament} / \text{NaCl } 0,9\% - \text{Baseline-Latenzzeit}) \times 100}{(\text{cut-off-Wert} - \text{Baseline-Latenzzeit})}$$

Baseline = Ausgangs-/ Entzündungswert in Sekunden

cut-off-Wert = Abschaltwert der Hargreaves Box (20,48 Sekunden)

Die Dosis-Wirkungskurven werden als Prozentwert des maximal possible effect (%MPE) dargestellt, die Werte sind gemittelt (SD).

Als Maß für den Grad der Antinozizeption werden dann Werte zwischen 0 % (Baseline) und 100 % (cut-off-Wert) erreicht. Die Hyperalgesie ist durch negative Werte gekennzeichnet, resultierend aus Latenzzeiten, welche geringer als die Baseline-Latenzzeit sind.

Um zeigen zu können, welche antinozizeptive Wirkung Apraclonidin im entzündeten Kniegelenkmodell entfaltet, mussten die im Versuch ermittelten Werte in Bezug zu einem Entzündungswert gesetzt werden. Dieser Bezugswert war die Entzündungsbaseline, die 120 Minuten nach Induktion der Kniegelenksentzündung ermittelt wurde. Gleiches galt auch für die Kochsalzgruppe, welche die Wirkung des Kaolin/Carrageenan-Gemisches im nicht entzündeten Kniegelenkmodell darstellen sollte.

Zur Überprüfung der gemessenen und errechneten Werte auf Signifikanzen wurde der Kruskal-Wallis-Test benutzt, der als nicht-parametrischer Mehr-Stichproben-Test für unabhängige Stichproben dem Vergleich mehrerer Verteilungsfunktionen respektive ihrer zentralen Tendenzen (Mittelwerte) dient. Zum nicht-parametrischen Vergleich für 2 abhängige Stichproben wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Als statistisch

signifikant wurde hierbei ein Unterschied von $p \leq 0.05$ definiert. Die Berechnung der ED_{50} und des 95 % Konfidenz-Intervalls wurde mit Hilfe eines Programms von Yoshito Takano durchgeführt, welches auf Tallarida und Murray zurückgeht. „Area under the curve (AUC)“-Werte als Prozentwerte der thermischen Antinozizeption wurden aus den zuvor ermittelten %MPE-Werten berechnet. Der Verlauf der Kniegelenkumfänge wurde unter Zuhilfenahme des T-Tests für abhängige Stichproben verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Die Versuchsbedingungen der verhaltensbiologischen Studie wurden stets konstant gehalten. Die Basistemperatur der Bodenplatte der modifizierten Hargreaves Box betrug während der thermischen Testung 30° Celsius und konnte mittels einer Stromstärke von 4,5 A nach 11 Sekunden ($SD \leq 1.0$ Sekunden) auf die Stimulationstemperatur von 50° Celsius erhöht werden, die dann bis zum cut-off-Wert bei 20 Sekunden konstant blieb. Die Ausgangszeiten des Fußrückziehreflexes betrugen für die rechte Hinterpfote $11,0 \pm 0,7$ Sekunden und für die linke Hinterpfote $11,0 \pm 0,9$ Sekunden.

Das Gewicht der Versuchstiere lag zum Versuchsbeginn bei 300 ± 20 Gramm.

3.2 Kniegelenkentzündung durch intraartikuläre Kaolin-Carrageenan Injektion

Die Kniegelenkentzündung der rechten Hinterpfote war zwei Stunden nach Induktion der intraartikulären Entzündung komplett ausgebildet und stellte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum durch eine signifikant verminderte thermische Antinozizeption dar ($p \leq 0,05$). Diese Entzündung der rechten Hinterpfote zeichnete sich durch eine verminderte Spontanbewegung, eine Schonhaltung mit Gewichtsentlastung der betreffenden Pfote und einer Größenzunahme des Kniegelenkumfanges aus.

Während die nicht behandelte linke Hinterpfote nach 24 Stunden keinen signifikanten Größenunterschied erkennen ließ, zeigten die Tiergruppen mit induzierter Kniegelenkentzündung alle nach 24 Stunden eine signifikante Größenzunahme ($p \leq 0,05$) (Abb.4)

Bei der Versuchsgruppe A nahm der Umfang von $6,0 \pm 0,1$ cm auf $8,6 \pm 0,1$ cm zu, bei den Gruppen B2 - B4 von $6,2 \pm 0,2$ cm auf $8,4 \pm 0,2$ cm, bei den Gruppen C2, C4 und C6 von $6,3 \pm 0,1$ cm auf $8,0 \pm 0,1$ cm und bei der Gruppe D1 von $6,0 \pm 0,1$ cm auf $8,0 \pm 0,1$ cm. Dabei war die Größenzunahme der Beinumfangs nicht abhängig von der verwendeten Medikamentendosis.

Abbildung 4

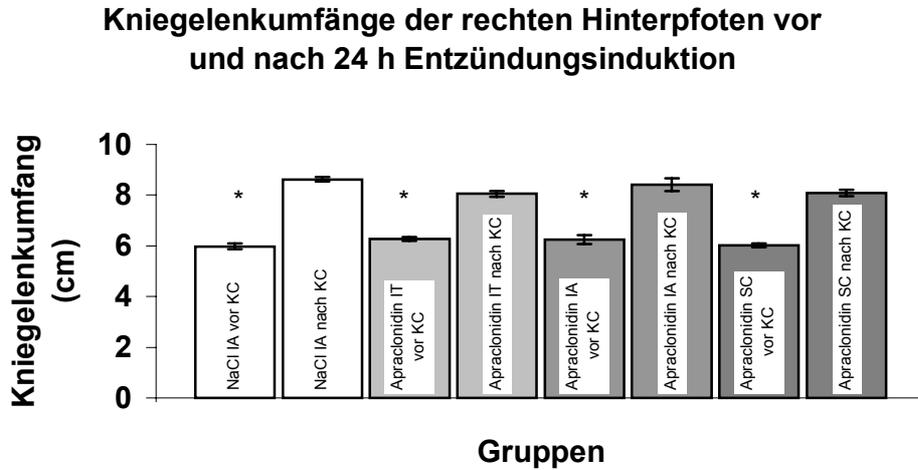


Abb. 4: Veränderung der Kniegelenkumfänge der rechten Hinterpfote vor Entzündungsinduktion (KC) und 24 h später. Darstellung als Mittelwert \pm Standardabweichung für n=4 bis n=18; * signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$), t-Test für abhängige Stichproben.

3.3 Intraartikuläre (periphere) Applikation von Apraclonidin

3.3.1 Thermische Antinozizeption

Bei der Untersuchung der thermischen Antinozizeption nach intraartikulärer Gabe von Apraclonidin stellten sich folgende Ergebnisse heraus:

- Es kam zu einer dosisabhängigen Antinozizeption bei allen Gruppen.
- Bei den Kontrollgruppen ohne Entzündung aber gleicher Medikamentendosis fiel die antinozizeptive Wirkung höher aus. Insbesondere bei den Dosierungen 3 μg und 30 μg ($p \leq 0,05$) ließen sich signifikant höhere Wirkungsergebnisse beobachten (Abb.5).
- Signifikant war die Antinozizeption für alle Dosierungen ab der 25. Minute nach Applikation von Apraclonidin ($p \leq 0,05$) (Abb.6,7)

- Als ED₅₀-Wert wurden für die Gruppen unter Entzündung 26,3 µg ermittelt (95 % Konfidenzintervall 12,8 – 54,0 µg; 60 Minute) und für die Kontrollgruppe unter NaCl 0,9 % 7,7 µg (95 % Konfidenzintervall 5,4 – 11,0 µg; 60. Minute).
- Abgesehen von der Medikamentengruppe 3 µg Apraclonidin IA + Entzündung war die thermische Antinozizeption der linken Hinterpfote bei induzierter rechter Kniegelenkentzündung im zeitlichen Verlauf immer geringer ausgebildet, ohne dabei jedoch signifikant unterschiedlich zu sein (Abb.5).
- Beim Vergleich der %AUC-Werte über 105 Minuten ergaben sich im Vergleich der Gruppen gleicher Dosierung - mit und ohne Entzündungsinduktion - Unterschiede in der thermischen Antinozizeption. Während diese jedoch für die Dosierung von 10 µg nicht signifikant waren, zeigten sich für die Dosierungen von 3 µg und für 30 µg signifikante Unterschiede ($p \leq 0,05$) (Abb.8).

Abbildung 5

**Thermische Antinozizeption - Dosis-Wirkungskurve
für Apraclonidin IA in das rechte Kniegelenk mit vs.
ohne Entzündung**

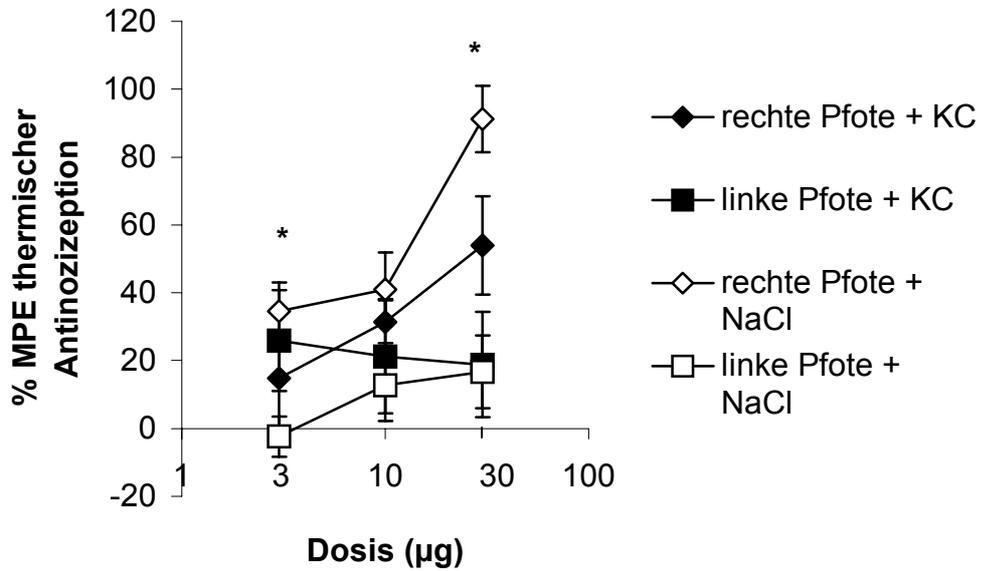


Abb. 5: Vergleich der dosisabhängigen thermischen Antinozizeption nach intraartikulärer (IA) Injektion von Apraclonidin in das entzündete rechte (Entzündungsinduktion durch Kaolin/Carrageenan (KC)) versus das nichtentzündete linke Kniegelenk. %MPE = maximal möglicher antinozizeptiver Effekt (100% MPE = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für n=5-6 Versuchstiere, Signifikanzberechnung nach Kruskal-Wallis : * signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$), logarithmische Darstellung der x-Achse, Darstellung des Messzeitpunktes 60. Minute.

Abbildung 6

Thermische Antinozizeption - Zeiteffektkurve für
Apraclonidin IA bei Entzündung im rechten
Kniegelenk

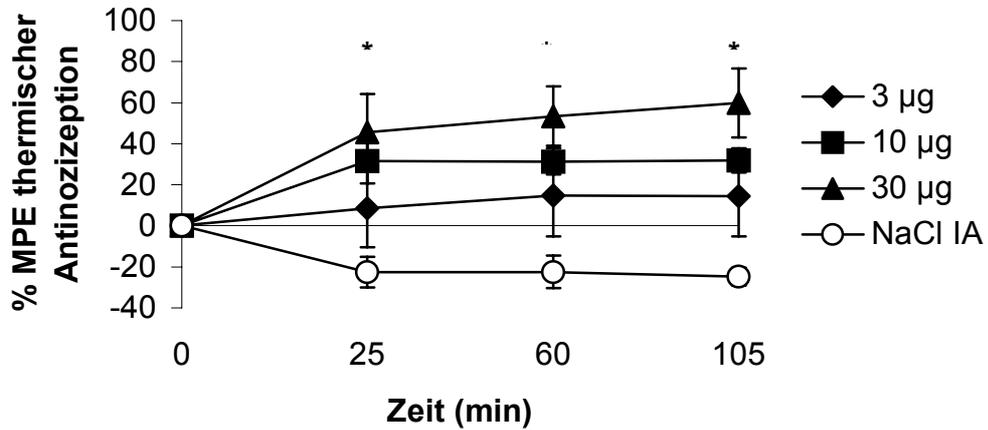


Abb. 6: Zeitlicher Verlauf der thermischen Antinozizeption nach intraartikulärer (IA) Injektion von Apraclonidin in das entzündete rechte Kniegelenk (Entzündungsinduktion durch Kaolin/Carrageenan (KC)). Vergleich mit der Kochsalzgruppe (NaCl IA). %MPE = maximal möglicher antinozizeptiver Effekt (100% MPE = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für $n = 4-6$ Tiere, Signifikanzberechnung nach Kruskal-Wallis: * signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$).

Abbildung 7

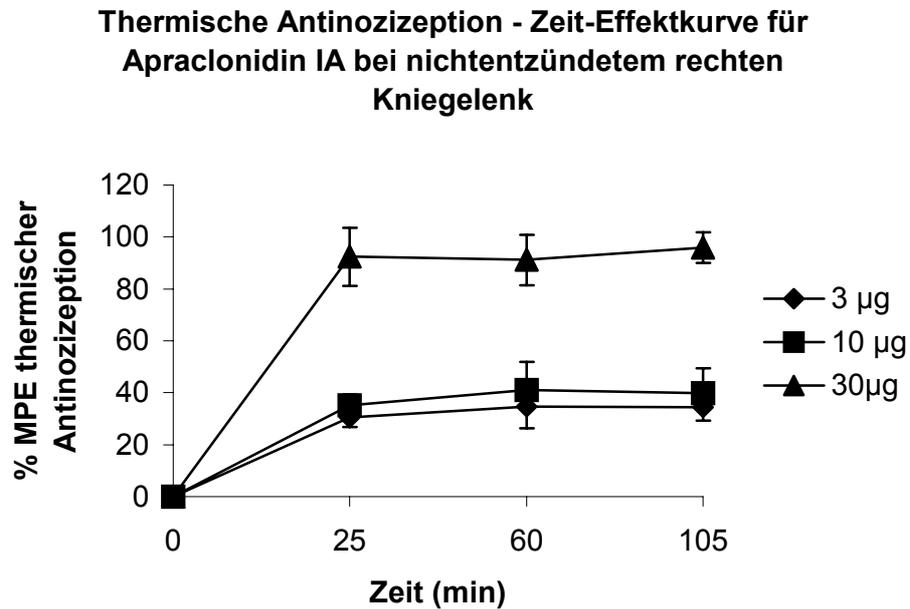


Abb. 7: Zeitlicher Verlauf der thermischen Antinozizeption nach intraartikulärer (IA) Injektion von Apraclonidin in das rechte Kniegelenk ohne vorherige Entzündungsinduktion. %MPE = maximal möglicher antinozizeptiver Effekt (100% MPE = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für n = 5 Tiere.

Abbildung 8

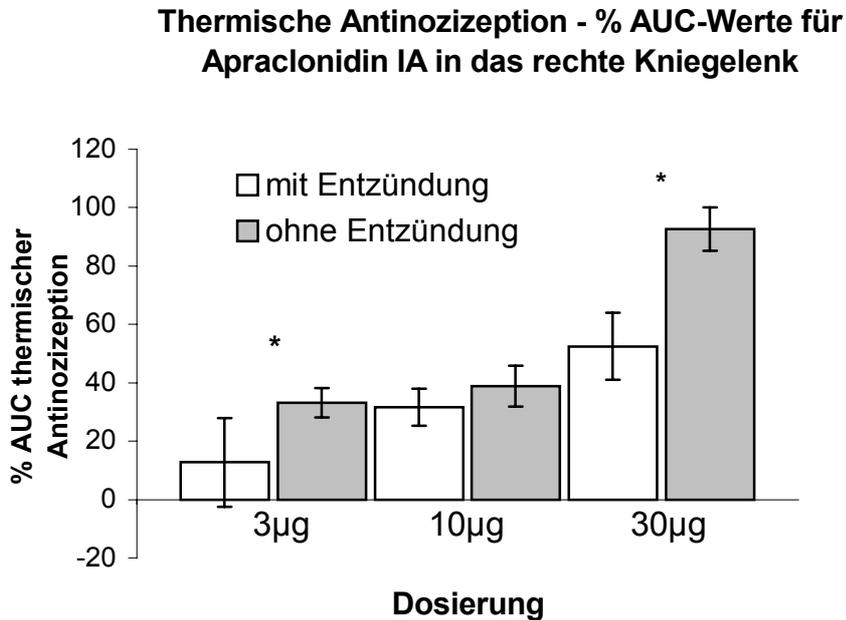


Abb. 8: Vergleich der thermischen Antinozipektion in %AUC nach intraartikulärer (IA) Injektion von Apraclonidin in das entzündete (Entzündungsinduktion durch Kaolin/Carrageenan (KC)) versus das nichtentzündete rechte Kniegelenk. %AUC = maximal möglicher antinozipeptiver Effekt über die Zeit von 105 Minuten (100 %AUC = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation zu allen Messzeitpunkten). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für n=5-6 Versuchstiere, Signifikanzberechnung nach Kruskal-Wallis : * signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$).

3.4 Subcutane (systemische) Applikation von Apraclonidin

3.4.1 Thermische Antinozizeption

Beim Vergleich der antinozizeptiven Wirksamkeit von subcutan applizierten Apraclonidin (in der Dosierung der höchsten untersuchten Wirkungsstufe von 30 µg) zu intraartikulär applizierten Apraclonidin in der gleichen Dosierung, stellten sich folgende Ergebnisse heraus:

- Unter Entzündung konnte nach subcutaner Applikation eine signifikante Steigerung der thermischen Antinozizeption ab der 25. Minute festgestellt werden ($p \leq 0,05$). Der maximale Effekt wurde nach 60 Minuten beobachtet (Abb.9).
- Die antinozizeptive Wirkung nach intraartikulärer Applikation war im Vergleich zur subcutanen Applikation in der rechten Pfote höher ausgebildet, ohne dabei jedoch signifikant zu sein. Bezüglich der linken nicht behandelten Pfote waren die Ergebnisse entgegengesetzt und dabei signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$) (Abb.9).
- Im Vergleich der rechten zur linken Hinterpfote nach subcutaner Applikation zeigte sich, dass die thermische Antinozizeption auf der rechten Seite stärker ausgeprägt war, ohne sich dabei signifikant von der linken Pfote zu unterscheiden (Abb.9).

Abbildung 9

Thermische Antinozipektion - Zeiteffektkurve für
Apraclonidin IA vs. SC bei entzündetem rechten
Kniegelenk

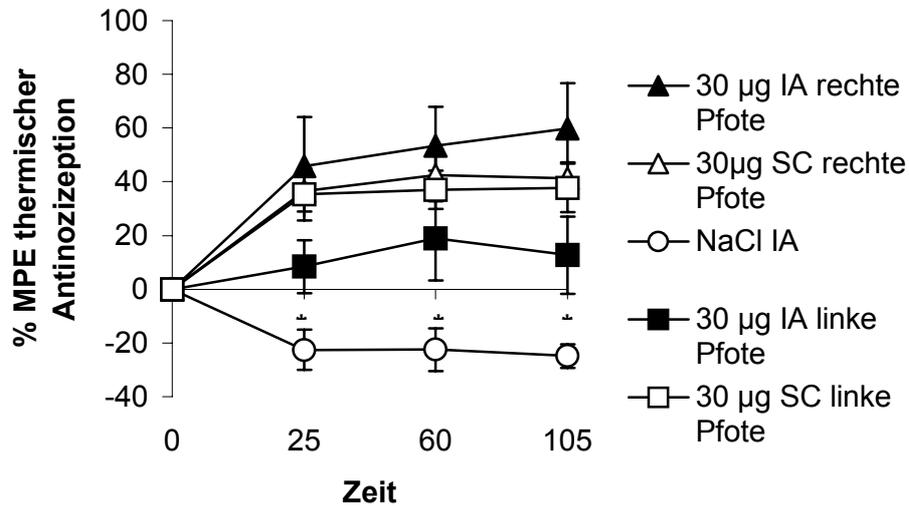


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der thermischen Antinozipektion nach intraartikulärer (IA) und subcutaner (SC) Injektion von Apraclonidin in das entzündete rechte Kniegelenk (Entzündungsinduktion durch Kaolin/Carrageenan (KC)). Vergleich mit der Kochsalzgruppe (NaCl IA). %MPE = maximal möglicher antinozipeptiver Effekt (100% MPE = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für n=4-6 Tiere, Signifikanzberechnung nach Kruskal-Wallis: * signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$).

3.5 Intrathekale (spinale) Applikation von Apraclonidin

3.5.1 Thermische Antinozizeption

Bei der Untersuchung der thermischen Antinozizeption nach intrathekalen Gabe von Apraclonidin stellten sich folgende Ergebnisse heraus:

- Es kam zu einer dosisabhängigen Antinozizeption bei allen Gruppen, diese war sowohl für die rechte als auch für die linke Hinterpfote signifikant ($p \leq 0,05$) (Abb.10).
- Signifikant war die Antinozizeption für alle Dosierungen ab der 25. Minute nach Applikation von Apraclonidin ($p \leq 0,05$) (Abb.11).
- Beim Vergleich von intrathekal zu intraartikulär verabreichten Apraclonidin nach Entzündungsinduktion (IA in der höchsten untersuchten Dosierung von 30 μg) zeigte sich, dass die antinozizeptive Wirkung nach intrathekalen Medikamentengabe höher ausfiel. Dabei war der Unterschied zu 3 μg IT, 5 μg IT und zu 10 μg IT signifikant ($p \leq 0,05$) (Abb.11).
- Auch beim Vergleich von intrathekal zu subcutan applizierten Apraclonidin nach Entzündungsinduktion (SC in der Dosierung von 30 μg) fiel die antinozizeptive Wirkung nach intrathekalen Medikamentengabe höher aus und zwar signifikant für alle intrathekalen Dosierungen ($p \leq 0,05$) (Abb.11).
- Als ED_{50} -Wert wurden für die intrathekalen Gruppen unter Entzündung 0,02 μg ermittelt (95 % Konfidenzintervall 1,87⁻⁴ – 1,8 μg ; 60. Minute).
- Beim Vergleich der rechten entzündeten Pfote mit der nicht entzündeten linken Pfote konnte beobachtet werden, dass die thermische Antinozizeption auf der rechten Seite unter den Dosierungen von 3 μg und 5 μg geringer ausgeprägt war, ohne dabei jedoch signifikant unterschiedlich zu sein. Eine auf beiden Seiten gleichstark ausgeprägte thermische Antinozizeption stellte sich bei der Dosierung von 10 μg ein.

Abbildung 10

**Thermische Antinozizeption - Dosis-Wirkungskurve
für Apraclonidin IT bei entzündetem rechten
Kniegelenk**

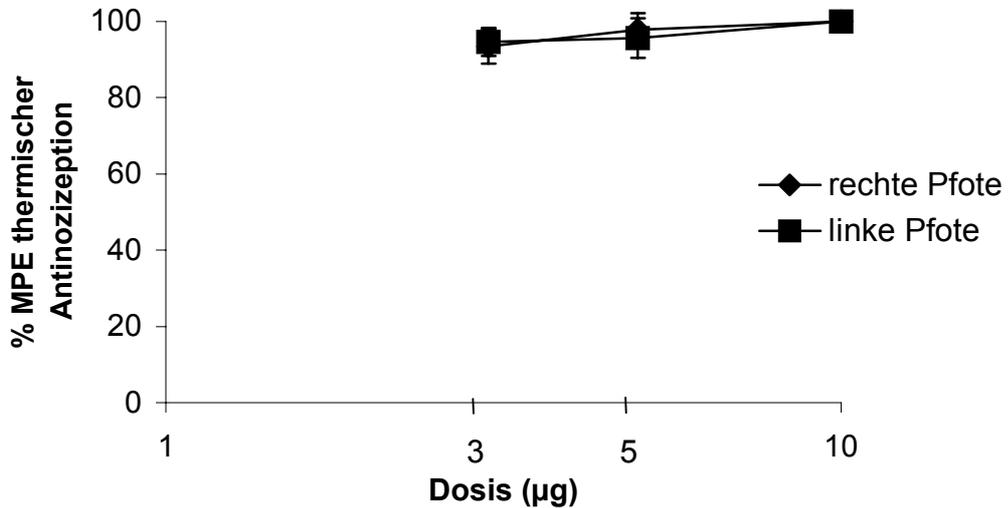


Abb. 10: Vergleich der dosisabhängigen thermische Antinozizeption nach intrathekaler (IT) Injektion von Apraclonidin in das entzündete rechte (Entzündungsinduktion durch Kaolin/Carrageenan (KC)) versus das nichtentzündete linke Kniegelenk. %MPE = maximal möglicher antinozizeptiver Effekt (100% MPE = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für $n = 4$ Versuchstiere, logarithmische Darstellung der x-Achse, Darstellung des Messzeitpunktes 60. Minute.

Abbildung 11

Thermische Antinozizeption - Zeit-Effektkurve für
Apraclonidin IT bei Entzündung im rechten
Kniegelenk

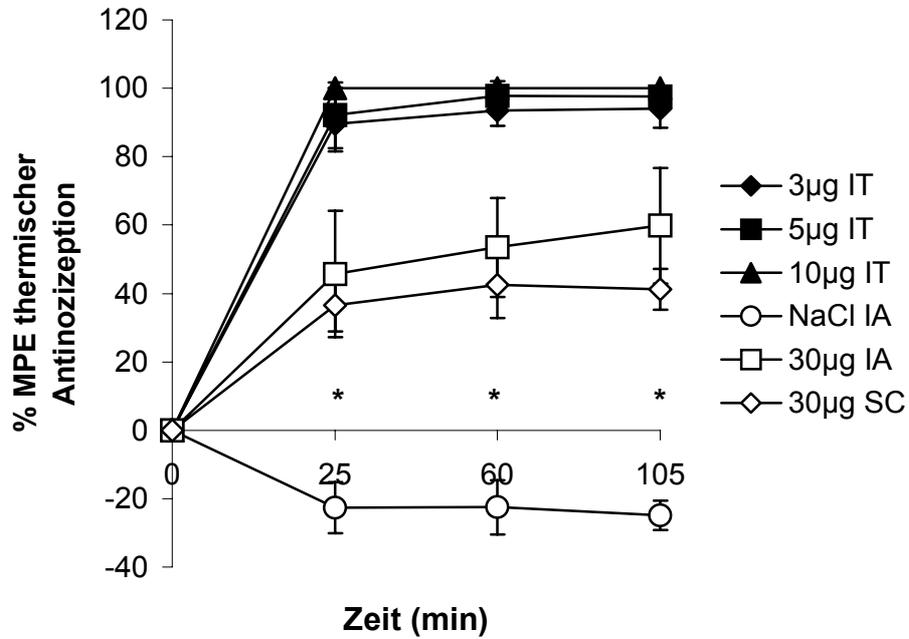


Abb. 11: Zeitlicher Verlauf der thermischen Antinozizeption nach intrathekaler (IT), intraartikulärer (IA) und subcutaner (SC) Injektion von Apraclonidin in das entzündete rechte Kniegelenk (Entzündungsinduktion durch Kaolin/Carrageenan (KC)). Vergleich mit der Kochsalzgruppe (NaCl IA). %MPE = maximal möglicher antinozizeptiver Effekt (100% MPE = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für n=4-6 Tiere, Signifikanzberechnung nach Kruskal-Wallis: * signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$).

3.6 Vorbehandlung mit dem Alpha(2)-Antagonisten Yohimbin

3.6.1 Thermische Antinozizeption

Bei der Untersuchung der thermischen Antinozizeption nach Antagonisierung der Alpha(2)-Rezeptoren und nachfolgender Apraclonidingabe kam es zu folgenden Ergebnissen (Werte beziehen sich auf die 60. Minute):

- Nach Entzündungsinduktion vermindert intraartikulär appliziertes Yohimbin im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kaolin-Carrageenan + NaCl 0,9 %) die thermische Antinozizeption rechts signifikant um -29 % von -22 ± 8 % MPE auf -51 ± 9 % MPE ($p \leq 0,05$).

Im Gegensatz dazu führt der Antagonist intrathekal verabreicht zu einer nicht signifikanten Steigerung der Antinozizeption um +5 % von -22 ± 8 % MPE auf -17 ± 4 % MPE (Abb.12).

- Wird nach Entzündungsinduktion der Antagonist intraartikulär gegeben, gefolgt von Apraclonidin 30 µg IA, so reduziert sich die antinozizeptive Wirkung im Vergleich zu Apraclonidin 30 µg IA nach Entzündung rechts signifikant um -83 % von 53 ± 14 % MPE auf -30 ± 7 % MPE ($p \leq 0,05$) (Abb.13).
- Wird nach Entzündungsinduktion der Antagonist intrathekal gegeben, gefolgt von Apraclonidin 30 µg IT, so reduziert sich die antinozizeptive Wirkung im Vergleich zu Apraclonidin 10 µg IT nach Entzündung nicht signifikant um -12 % von 100 ± 0 % MPE auf 88 ± 13 % MPE (Abb.14).
- Wird nach Entzündungsinduktion der Antagonist intrathekal gegeben, gefolgt von Apraclonidin 30 µg IA, so reduziert sich die antinozizeptive Wirkung im Vergleich zu Apraclonidin 30 µg IA nach Entzündung nicht signifikant um -5 % von 53 ± 14 % MPE auf 48 ± 6 % MPE (Abb.14).
- Wird nach Entzündungsinduktion der Antagonist intrathekal gegeben, gefolgt von Apraclonidin 30 µg IA, so reduziert sich die antinozizeptive Wirkung im Vergleich zu Apraclonidin 10 µg IT nach Entzündung signifikant um -52 % von 100 ± 0 % MPE auf 48 ± 6 % MPE ($p \leq 0,05$) (Abb.14).

- Wird nach Entzündungsinduktion der Antagonist intraartikulär gegeben, gefolgt von Apraclonidin 30 µg SC, so steigert sich die antinozeptive Wirkung im Vergleich zu Apraclonidin 30 µg IA nach Entzündung nicht signifikant um +14% von 43 ± 10 % MPE auf 57 ± 10 % MPE (Abb.13).

Abbildung 12

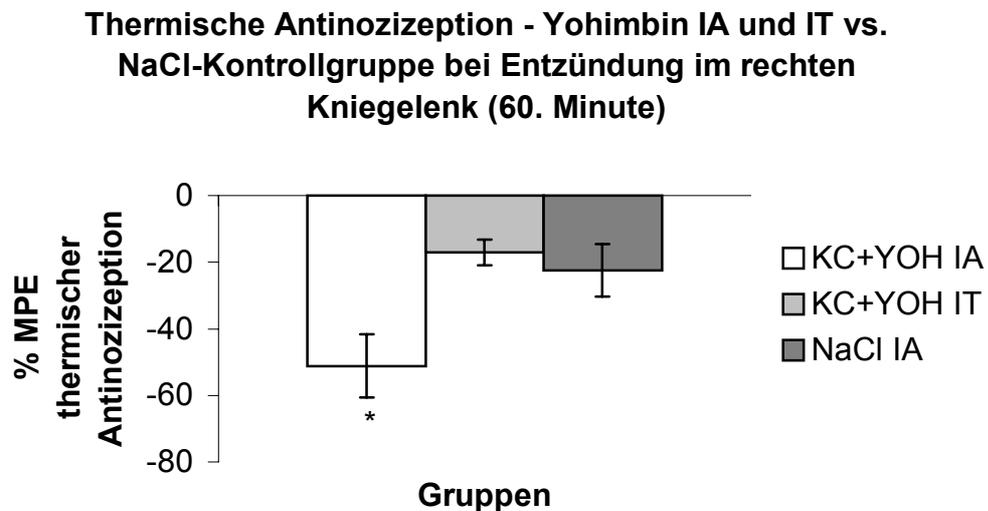


Abb.12: Veränderung der thermischen Antinozeption nach intrathekaler (IT) und intraartikulärer (IA) Injektion des Alpha(2)-Antagonisten Yohimbin in das entzündete rechte Kniegelenk (Entzündungsinduktion durch Kaolin/Carrageenan (KC)). Vergleich mit der Kochsalzgruppe (NaCl IA). %MPE = maximal möglicher antinozeptiver Effekt (100% MPE = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für n=4-5 Tiere, Signifikanzberechnung nach Kruskal-Wallis: * signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$).

Abbildung 13

Thermische Antinozizeption - Yohimbin IA vs. Kontrollgruppen bei Entzündung im rechten Kniegelenk (60. Minute)

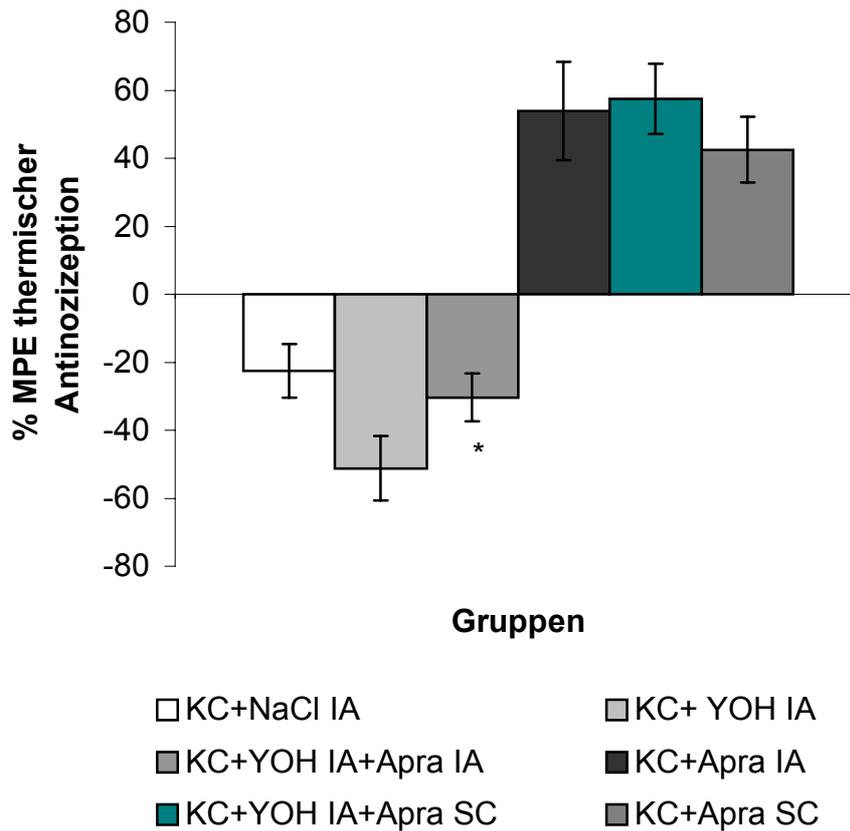


Abb.13: Veränderung der thermischen Antinozizeption nach intraartikulärer (IA) Injektion des Alpha(2)-Antagonisten Yohimbin in das entzündete rechte Kniegelenk (Entzündungsinduktion durch Kaolin/Carrageenan (KC)). Vergleich mit der Kochsalzgruppe (NaCl IA) und mit der alleinigen Applikation von Apraclonidin 30µg IA und SC. %MPE = maximal möglicher antinozizeptiver Effekt (100% MPE = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für n=4-6 Tiere, Signifikanzberechnung nach Kruskal-Wallis: * signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$).

Abbildung 14

Thermische Antinozizeption - Yohimbin IT vs. Kontrollgruppen bei Entzündung im rechten Kniegelenk (60. Minute)

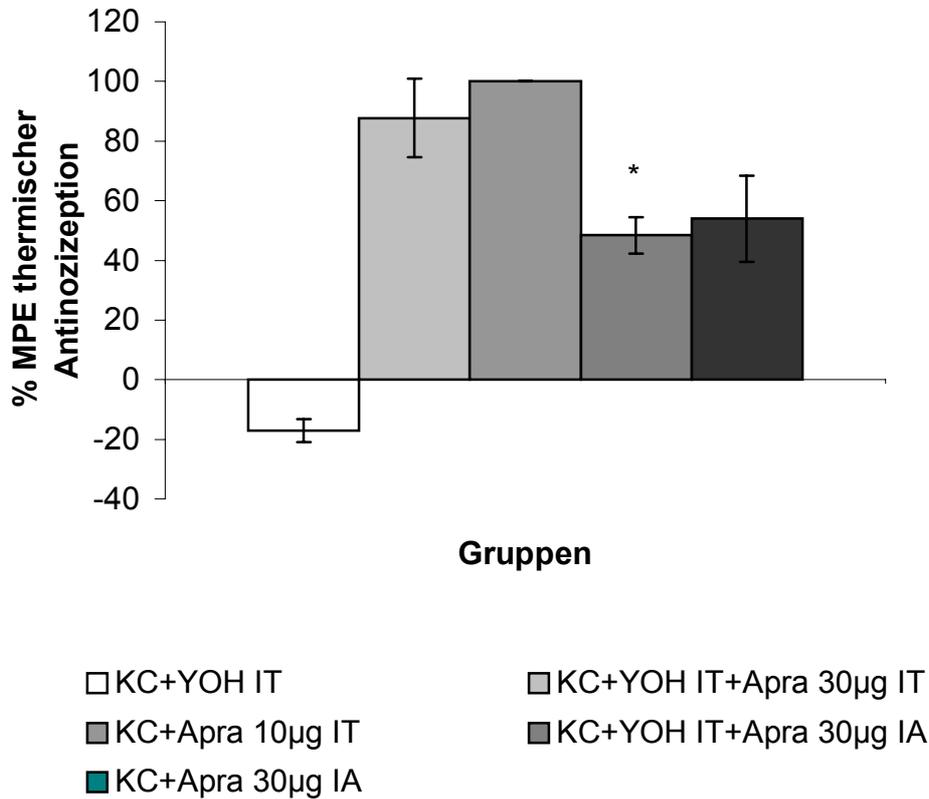


Abb.14: Veränderung der thermischen Antinozizeption nach intrathekaler (IT) Injektion des Alpha(2)-Antagonisten Yohimbin in das entzündete rechte Kniegelenk (Entzündungsinduktion durch Kaolin/Carrageenan (KC)). Vergleich mit der alleinigen Applikation von Apraclonidin 30µg IA und 10µg IT. %MPE = maximal möglicher antinozizeptiver Effekt (100% MPE = kein Fußrückziehreflex nach 20,48 Sekunden thermischer Stimulation). Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert \pm die Standardabweichung für n=4-6 Tiere, Signifikanzberechnung nach Kruskal-Wallis: * signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$).

3.7 Supraspinaler Index und Nebenwirkungen

Bei der Beobachtung der supraspinalen und systemischen Nebenwirkungen konnten folgende Ergebnisse festgestellt werden:

- Bei allen Versuchsgruppen waren zu jedem Zeitpunkt sämtliche Reflexe und die Spontanaktivität erhalten (Tab.2).
- Eine verminderte Spontanaktivität konnte bei den Gruppen KC + 30 µg Apraclonidin IA und KC + Apraclonidin 30 µg SC beobachtet werden (Tab.2).
- Eine verminderte spontane und evozierte Aktivität und ein verlangsamter Aufrichtreflex konnte bei den Gruppen KC + Apraclonidin 3 µg, 5 µg und 10 µg IT demonstriert werden (Tab.2).
- Eine gesteigerte Diurese, die zwischen der 20. und 60. Minute nach Applikation von Apraclonidin auftrat und über die gesamte Versuchsdauer anhielt, konnte bei folgenden Gruppen festgestellt werden: KC + Apraclonidin 3 µg, 10 µg und 30 µg IA, Apraclonidin 10 µg und 30 µg IA, KC + Apraclonidin 30 µg SC, KC + Apraclonidin 3 µg, 10 µg IT (Tab.3).
- Bei den Antagonisten-Gruppen konnte nur bei der Gruppe KC + Yohimbin IA + Apraclonidin 30 µg SC eine gesteigerte Diurese nachgewiesen werden (Tab.3).

Eine verminderte spontane und evozierte Aktivität und ein verlangsamter Aufrichtreflex gab es nur bei der Gruppe KC + Yohimbin IT + Apraclonidin 30 µg IT (Tab.2).

Tabelle 2

Supraspinale Effekte

Gruppe	Aufricht-Reflex	evozierte Aktivität	Ohrmuschel-Reflex	Korneal-Reflex	Spontan-Aktivität
KC+NaCl 0,9 %	0	0	0	0	0
KC+Apra 3µg IA	0	0	0	0	0
NaCl+Apra 3µg IA	0	0	0	0	0
KC+Apra 10µg IA	0	0	0	0	0
NaCl+Apra 10µg IA	0	0	0	0	0
KC+Apra 30µg IA	0	0	0	0	1
NaCl+Apra 30µg IA	0	0	0	0	0
KC+Apra 3µg IT	1	1	0	0	1
KC+Apra 5µg IT	1	1	0	0	1
KC+Apra 10µg IT	1	1	0	0	1
KC+Apra 30µg SC	0	0	0	0	1
KC+Yohimbin IA	0	0	0	0	0
KC+Yohimbin IT	0	0	0	0	0
KC+Yohimbin IA+ Apra 30µg IA	0	0	0	0	0
KC+Yohimbin IA+ Apra 30µg SC	0	0	0	0	0
KC+Yohimbin IT+ Apra 30µg IT	1	1	0	0	1
KC+Yohimbin IT+ Apra 30µg IA	0	0	0	0	0

Tab.2: Supraspinale Effekte für den Zeitraum von der 25. bis zur 105. Minute nach Apraclonidin-Injektion. Der maximale supraspinale Index beträgt pro Gruppe 10 (5x2), siehe Kapitel 2.6.3 *Supraspinale Nebenwirkungen*.

Tabelle 3

Systemische Nebenwirkungen

Gruppe	Diurese
KC+NaCl 0,9 %	normal
KC+Apra 3µg IA	gesteigert
Apra 3µg IA	normal
KC+Apra 10µg IA	gesteigert
Apra 10µg IA	gesteigert
KC+Apra 30µg IA	gesteigert
Apra 30µg IA	gesteigert
KC+Apra 3µg IT	gesteigert
KC+Apra 5µg IT	normal
KC+Apra 10µg IT	gesteigert
KC+Apra 30µg SC	gesteigert
KC+Yohimbin IA	normal
KC+Yohimbin IT	normal
KC+Yohimbin IA+Apra 30µg IA	normal
KC+Yohimbin IA+Apra 30µg SC	gesteigert
KC+Yohimbin IT+Apra 30µg IT	normal
KC+Yohimbin IT+Apra 30µg IA	normal

Tab.3: Systemische Nebenwirkungen für den Zeitraum von der 25. bis zur 105. Minute nach Apraclonidin-Injektion.

4. Diskussion

4.1 Diskussion des Modells

Das in dieser Studie verwendete Modell einer experimentell induzierten Entzündung ist ein etabliertes und gut definiertes Verfahren der aktuellen Schmerzforschung. Es dient der Evaluation von Schmerz, seiner Pathophysiologie und Biochemie, sowie der Testung analgetisch potenter Pharmaka durch Hemmung peripherer und zentraler Sensibilisierungsmechanismen (Yang et al. 1996 [90]; Smith et al. 1985 [76]; Diehl et al. 1988 [31]; Tabo et al. 1998 [79]). Dies gilt im Weiteren auch für die Implantation des intrathekalen Katheters (Yaksh und Rudy 1976 [88]; Buerkle et al. 1999 [16]) und die Testung der thermischen Antinozizeption durch die Hargreaves Box (Hargreaves et al. 1988 [43]).

Die Homogenität der einzelnen Medikamentengruppen konnte durch geringe Standardabweichungen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurde die Zuverlässigkeit des Modells durch die zunehmende und langandauernde Schmerzfreiheit mit Steigerung der Analgetikadosis unterstrichen.

Die intraartikuläre Injektion von antinozizeptiven Medikamenten begründet ein Modell zum Nachweis einer peripher vermittelten Analgesie, wobei das Arthritismodell der Ratte durch seine persistierende Entzündung auch Aussagen zur Auswirkung dieser Entzündung auf die zu untersuchende Analgesie zulässt.

4.2 Kochsalz-Kontrollgruppen

Zur Kontrolle der inflammatorischen Wirksamkeit des 3 %igen Kaolin/Carrageenan-Gemisches und der antinozizeptiven Potenz des Medikamentes Apraclonidin wurden Kontrollgruppen mit Natriumchlorid 0,9 % hinzugezogen.

Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Yang et al. 1996 [90] konnte 120 Minuten nach Induktion der Kniegelenkentzündung eine signifikant verminderte thermische Antinozizeption festgestellt werden ($p \leq 0,05$), die über den gesamten Beobachtungszeitraum bestehen blieb. Als Auswirkung der Kniegelenkirritation ließen sich typische entzündungs- und schmerzbedingte Verhaltensänderungen beobachten,

wie Hinken, Humpeln, Hochheben und Schützen der betroffenen Extremität. Während die nicht behandelte linke Hinterpfote nach 24 Stunden keinen signifikanten Größenunterschied erkennen ließ, zeigten alle Tiergruppen mit induzierter Kniegelenkentzündung nach 24 Stunden eine signifikante Größenzunahme ($p \leq 0,05$). Des Weiteren blieben die Latenzzeiten der nichtbehandelten linken Pfoten konstant und offenbarten so eine fehlende Beeinflussung durch die kontralaterale Entzündung.

Durch die Applikation des Kaolin/Carrageenan-Gemisches kommt es zur Ausbildung einer persistierenden Inflammation, die einen Aktivitätsanstieg von Hautafferenzen Typ A β (dicke Myelinisierung), Typ A δ (dünne Myelinisierung) und Typ C (unmyelinisiert) bewirkt.

Diese Sensibilisierung führt zu einer verstärkten Ausschüttung von exzitatorischen Aminosäuren in den Hinterhornneuronen (Sluka and Westlund, 1993 [75]). Der damit verbundene Anstieg von Glutamat korreliert mit der Herabsetzung der „paw withdrawal latency“ (Sluka et al. 1997 [74]) und gilt als Maß der entstandenen Hyperalgesie.

Weiterhin kommt es zur Nozizeptorsensibilisierung durch sympathomimetische Neuropeptide, Noradrenalin, Dopamin und Serotonin, welche sowohl direkt über α -adrenerge oder dopaminerge Rezeptoren als auch indirekt über Zyklooxygenase-Metaboliten wirken.

Die in diesem Arthritis-Modell entstehende thermische Hyperalgesie wird durch zentrale Sensibilisierung auf spinaler Ebene bedingt, da die Entzündung im Kniegelenk induziert wurde, die Testung der thermischen Antinozizeption jedoch im Plantarbereich der Pfote stattfand (Sluka and Westlund, 1993 [75]).

4.3 Applikation von Apraclonidin

In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass der peripher und intrathekal applizierte α_2 -adrenerge Agonist Apraclonidin im Arthritismodell der Ratte eine dosisabhängige antinozizeptive Wirkung entfaltet.

α_2 -adrenerge Agonisten, wie Clonidin, produzieren eine dosisabhängige Analgesie bei Tieren und Menschen durch Wirkung an α_2 -adrenergen Rezeptoren, welche ubiquitär im peripheren und zentralen Nervensystem verteilt sind. Diesbezüglich gibt es eine Vielzahl an Literatur, die die Vorzüge der Schmerzbehandlung mit α_2 -adrenerge Agonisten bei neuropathischem oder inflammatorischem Schmerz belegt (Mizobe und Maze 1995 [63]; Eisenach et al. 1996 [34])

So konnte in der thermischen Testung eine Steigerung der Antinozizeption bei vorbestehender Kniegelenkentzündung um $+75\%$ von $-22 \pm 8\%$ MPE auf $53 \pm 14\%$ MPE in der höchsten Dosierung von $30\ \mu\text{g}$ Apraclonidin nach intraartikulärer Gabe erzielt werden. Der ED_{50} -Wert betrug dabei für die Gruppen unter Entzündung $26,3\ \mu\text{g}$ (95 % Konfidenzintervall $12,8 - 54,0\ \mu\text{g}$; 60. Minute) und für die Kontrollgruppe unter NaCl $0,9\%$ $7,7\ \mu\text{g}$ (95 % Konfidenzintervall $5,4 - 11,0\ \mu\text{g}$; 60. Minute). Dabei unterschieden sich die mit Apraclonidin behandelten Ratten deutlich von denen, die der unbehandelten Kniegelenkentzündung ausgesetzt waren. Schmerztypische Verhaltensweisen wie Hinken, Humpeln, Hochheben und Schützen der betroffenen Extremität waren nur in abgeschwächter Form oder gar nicht zu beobachten.

Eine dosisabhängige thermische Antinozizeption konnte ebenfalls bei der intrathekalen und subkutanen Gabe von Apraclonidin festgestellt werden.

Während die thermische Antinozizeption nach subkutaner Injektion von Apraclonidin $30\ \mu\text{g}$ im Vergleich zu intraartikulären $30\ \mu\text{g}$ nicht signifikant geringer ausgeprägt war ($43 \pm 10\%$ MPE versus $53 \pm 14\%$ MPE), war die thermische Antinozizeption nach intrathekaler Gabe von Apraclonidin $10\ \mu\text{g}$ im Vergleich zu intraartikulären $30\ \mu\text{g}$ ($100 \pm 0\%$ MPE versus $53 \pm 14\%$ MPE) signifikant gesteigert ($p \leq 0,05$). Dies zeigte sich besonders deutlich im intrathekalen ED_{50} -Wert unter Entzündung von $0,02\ \mu\text{g}$ (95 % Konfidenzintervall $1,87^{-4} - 1,8\ \mu\text{g}$; 60. Minute).

Dass Apraclonidin seine analgetische Wirkung über periphere α_2 -adrenerge Rezeptoren entfaltet, konnte durch den Vergleich der beiden Tiergruppen Araclonidin $30\ \mu\text{g}$

intraartikulär nach Entzündung und Apraclonidin 30 µg intraartikulär nach Entzündung und Antagonisierung mit dem α_2 -selektiven Antagonisten Yohimbin, der intraartikulär appliziert wurde, bewiesen werden. So wurde durch die periphere α_2 -adrenerge Rezeptorblockade die thermische Antinozizeption signifikant ($p \leq 0,05$) um -83% von $53 \pm 14\%$ MPE auf $-30 \pm 7\%$ MPE gesenkt. Des Weiteren fiel auf, dass - falls der Antagonist nach Entzündungsinduktion intrathekal gegeben wurde, gefolgt von Apraclonidin 30 µg IA - sich die antinozizeptive Wirkung im Vergleich zu Apraclonidin 30 µg IA nach Entzündung nicht signifikant um -5% von $53 \pm 14\%$ MPE auf $48 \pm 6\%$ MPE senkte. Daraus lässt sich schließen, dass die antinozizeptive Wirkung von Apraclonidin nach peripherer Gabe fast ausschließlich über periphere und kaum über spinale α_2 -adrenerge Rezeptoren zustande kommt.

Neben der Möglichkeit, seine analgetische Wirkung über periphere α_2 -adrenerge Rezeptoren zu entfalten, kann Apraclonidin aber auch über spinale α_2 -adrenerge Rezeptoren wirken. Eine Dosis von 10 µg Apraclonidin intrathekal appliziert, reicht dabei aus, um einen MPE von 100 % zu erreichen. Selbst nach vorheriger intrathekaler Antagonisierung mit Yohimbin und darauffolgender intrathekaler Gabe von Apraclonidin 30 µg, sank die thermische Antinozizeption nur nicht signifikant um -12% von $100 \pm 0\%$ MPE auf $88 \pm 13\%$ MPE.

Die periphere Gabe von Apraclonidin scheint der systemischen Gabe überlegen zu sein. Denn die antinozizeptive Wirkung nach intraartikulärer Applikation war im Vergleich zur subcutanen Applikation in der rechten Pfote höher ausgebildet, ohne dabei jedoch signifikant zu sein. Bezüglich der linken nicht behandelten Pfote waren die Ergebnisse entgegengesetzt und dabei signifikant unterschiedlich ($p \leq 0,05$). Dies ist durch die systemische analgetische Wirkung von Apraclonidin zu erklären, welche natürlich auch die unbehandelte linke Pfote erreichte. Diesbezüglich zeigten schon Gentili et al. [38] und Schäpsmeier [72] in präklinischen und klinischen Studien, dass die intraartikuläre analgetische Wirkung von Clonidin der systemischen Wirkung überlegen ist. Auch andere Studien bewiesen, dass sowohl oberflächlich als auch intraartikulär appliziertes Clonidin eine periphere Analgesie vermittelt (Buerkle et al. 2000 [15], Davis et al. 1991 [29]).

Die Entwicklung der peripheren und zentralen Nozizeptorsensibilisierung wird, wie schon in der Einleitung beschrieben, durch die Ausschüttung von prä- und

postsynaptischen exzitatorischen Neurotransmittern, wie Glutamat, oder Substanz P, ausgelöst (Coderre et Melzack, 1992 [25]). Apraclonidin hemmt diese Ausschüttung und damit die Liquorkonzentration von exzitatorischen Aminosäuren nach peripherer und zentraler Nozizeptorsensibilisierung (Lin et al. 2002 [56]).

In einer von Lin und Kollegen noch nicht veröffentlichten Studie konnte nachgewiesen werden, dass Apraclonidin im Tiermodell einer induzierten peripheren Arthritis nach lokaler intraplantaren Injektion von 0,3 mg, eine nahezu vollständige Hemmung der Freisetzung von exzitatorisch wirksamen Aminosäuren, wie Glutamat, Aspartat und Citrullin, bewirkte. Im Vergleich dazu stiegen in der Kontrollgruppe nach Entzündungsinduktion - aufgrund der peripheren und zentralen Nozizeptorsensibilisierung - die Liquorkonzentrationen der exzitatorischen Aminosäuren an. Da keinerlei zentrale Effekte beobachtet wurden, postulierten Lin und Kollegen, dass der α_2 -adrenerge Agonist Apraclonidin die Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern auf peripherem Wege unter Ausschluss zentraler α_2 -Rezeptoren blockiert.

4.4 Nebenwirkungen

Bezüglich der supraspinalen Nebenwirkungen konnte festgestellt werden, dass nach peripherer und systemischer Gabe von Apraclonidin in der höchsten Dosierungsstufe von 30 μg , die beobachteten supraspinalen Effekte minimal waren. So wurden bei einem maximalen supraspinalen Index von 10 Punkten bei beiden Gruppen lediglich 1 Punkt erreicht, der eine reduzierte Spontanaktivität betraf. Diese Beobachtung stimmt auch mit der zuvor diskutierten peripheren Analgesie überein, die nur minimale spinale Komponenten aufwies. Selbst nach intrathekalen Applikation von Apraclonidin in allen drei Dosierungsstufen wurde nur ein supraspinaler Index von 3 Punkten erreicht, wobei dieser Wert durch eine verminderte spontane und induzierte Aktivität bedingt wurde. Zu keinem Zeitpunkt der Versuchsreihe gab es jedwede neurologische Ausfälle.

Wenngleich die aufgezeigten supraspinalen Nebenwirkungen nach peripherer Apraclonidingabe nur minimal und in Bezug auf die gemessene periphere thermische Antinozizeption nicht signifikant waren, konnten die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen um Coleman [26] und Lin [56], welche keine zentralen

Nebenwirkungen feststellen konnten und somit eine Unüberwindbarkeit der Blut-Hirn-Schranke für Apraclonidin demonstrierten, nicht bestätigt werden.

Im Vergleich zu dieser Studie konnte Schäpsmeier [72] unter dem gleichen methodischen Ansatz für Clonidin nachweisen, dass 30 µg Clonidin intraartikulär injiziert einen supraspinalen Index von 3 bis 4 Punkten erreichte. Dieser höhere Wert ist durch die Penetrationsmöglichkeit der Blut-Hirn-Schranke durch Clonidin erklärbar und belegt den enormen Vorteil den Apraclonidin als peripheres Analgetikum aufweist.

Bezüglich der systemischen Nebenwirkungen konnte nachgewiesen werden, dass - abgesehen von den Gruppen Apraclonidin 3 µg IA ohne Entzündung und Apraclonidin 5 µg IT nach Entzündung - alle nicht antagonisierten Versuchsgruppen nach Apraclonidingabe systemische Nebenwirkungen in Form einer gesteigerten Diurese erkennen ließen. Eine solche Diuresesteigerung ist durch die Hemmung der Ausschüttung des Antidiuretischen Hormons (ADH) (Peskind et al. 1987 [67]), die Antagonisierung der renal-tubulären ADH-Wirkung (Stanton et al. 1987 [77]), die Steigerung der glomerulären Filtrationsrate (Strandhoy 1985 [78]) und die Ausschüttung des Atrialen Natriuretischen Faktors (ANF) (Chen et al. 1989 [23]) erklärbar. Eine systemische antihypertensive Wirkung, wie sie selbst nach lokaler Clonidingabe bei der Glaukom-Therapie zu beobachten ist (Harrison und Kaufmann 1977 [44]), konnte aufgrund des fehlenden Monitorings für Apraclonidin weder bestätigt noch widerlegt werden. Andere systemische Nebenwirkungen (beispielsweise Übelkeit und Erbrechen), wie sie in einer Untersuchung von Miller und Rhaesa [62] bei Katzen nach lokaler Applikation von 30 µl Apraclonidin ins Auge auftraten, konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

4.5 Weitere Ergebnisse

In dieser Studie konnte belegt werden, dass Apraclonidin zu keiner Steigerung der peripher induzierten Antinozizeption durch Entzündung im Tiermodell führt.

Im Vergleich zu zentral applizierten Apraclonidin, dass keinerlei Veränderung der thermischen Antinozizeption unter Nichtentzündungs- versus Entzündungsbedingungen bewirkt, verursacht die periphere Apraclonidin-Gabe eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve. Damit unterscheidet sich dieser Effekt eindeutig von denen für Clonidin herausgefundenen Ergebnissen. Gray und Ferrel [41] konnten für systemisch

injiziertes und Buerkle und Kollegen [16] für peripher injiziertes Clonidin eine Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve für die thermische Antinozizeption unter Nichtentzündungs- versus Entzündungsbedingungen darlegen. Diese durch einen Entzündungsprozess verstärkte Analgesie wurde auch schon früher für periphere antinozizeptive Opioidrezeptoren demonstriert.

Sollten auch weitere Studien über Apraclonidin bestätigen, dass es bei den gleichen therapeutischen Anwendungsmöglichkeiten, wie denen des Clonidins, dessen therapielimitierenden Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Hypotonie und Bradykardie, nicht aufweist, dann sollte Apraclonidin eine wichtige Rolle als peripheres Analgetikum in der Schmerztherapie beschieden sein.

5. Zusammenfassung

Vergleich der thermischen Antinozizeption von spinal versus peripher appliziertem Apraclonidin im Arthritismodell der Ratte

Fragestellung: Für Apraclonidin, ein Clonidin-Derivat, das aufgrund seiner veränderten chemischen Struktur eine reduzierte Blut-Hirn-Schrankenpenetration haben soll, wurde die periphere und zentrale antinozizeptive Wirksamkeit untersucht. Dabei wurde im Tiermodell, mit und ohne Kniegelenkentzündung, die thermale antinozizeptive Potenz von intraartikulär (IA) und intrathekal (IT) appliziertem Apraclonidin evaluiert.

Methodik: Alle Untersuchungen waren von der Tierschutzkommission der Bezirksregierung Münster genehmigt (Genehmigungsnummer G 84/99). Der persistierende Entzündungsschmerz wurde durch Injektion von 100 µl einer 3 %igen Kaolin/Carrageenan (KC)- Lösung IA rechts bei männlichen, adulten *Sprague Dawley* Ratten (270-360 g) (n = 4-6) induziert. Kontrolltiere (n = 4-6) erhielten eine Injektion von 100 µl NaCl 0,9 %. Die Bestimmung der thermalen Nozizeption an den Hinterpfoten der Tiere wurde durch Applikation eines thermalen Stimuli mit einer modifizierten Hargreaves-Box vorgenommen. IA und IT Apraclonidin wurde 120 min nach IA KC oder NaCl injiziert. Zur Analyse des Wirkungsprofils der unterschiedlichen Applikationsformen wurden 100 µg des α_2 -selektiven Antagonist Yohimbin 20 min vor Apraclonidingabe entweder IA oder IT verabreicht. Um supraspinale Nebenwirkungen (NW) von Apraclonidin zu erfassen, wurde ein Index erstellt, der Ohrmuschelreflex, Cornealreflex, Aufrichtreflex, evozierte und spontane Bewegungen mit 0 = normal, 1 = abgeschwächt, 2 = fehlend, bewertete (Maximalwert 10).

Ergebnisse: IA und IT Apraclonidin verursachten eine dosisabhängige thermale Antinozizeption. Dabei wurden als Effektivdosierungen für eine 50 %ige Analgesie (ED₅₀) nach IA-Applikation mit Entzündung 26,3 µg (95 % Konfidenzintervall 12,8 – 54,0 µg) und für die Kontrollgruppe ohne Entzündung 7,7 µg (95 % Konfidenzintervall 5,4 – 11,0 µg) ermittelt. Die Effektivdosierung für eine 50 %ige Analgesie (ED₅₀) nach IT-Applikation mit Entzündung betrug 0,02 µg (95 % Konfidenzintervall $1,87^{-4}$ – 1,8 µg). Wurde der Antagonist nach Entzündungsinduktion intraartikulär gegeben, gefolgt von Apraclonidin 30 µg IA, so sank die thermische Antinozizeption signifikant

($p \leq 0,05$) um -83% im Vergleich zur nicht antagonisierten Gruppe. Wurde der Antagonist nach Entzündungsinduktion intrathekal gegeben, gefolgt von Apraclonidin $30\ \mu\text{g}$ IA, so sank die antinozizeptive Wirkung im Vergleich zu Apraclonidin $30\ \mu\text{g}$ IA nach Entzündung nicht signifikant um -5% . Der supraspinale Index umfasste 1 Punkt nach IA-Applikation und 3 Punkte nach IT-Applikation, neurologische Ausfälle wurden nicht beobachtet.

Schlussfolgerung: Die antinozizeptive Wirkung von peripher verabreichtem Apraclonidin kommt fast ausschließlich über periphere und nur geringfügig über spinale α_2 -adrenerge Rezeptoren zustande. Im Vergleich zu zentral appliziertem Apraclonidin, das keinerlei Veränderung der thermischen Antinozizeption unter Nichtentzündungs- versus Entzündungsbedingungen bewirkt, verursacht die periphere Apraclonidin-Gabe eine Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve. Gemessen an früheren Untersuchungen mit Clonidin bringt die periphere Applikation von Apraclonidin Vorteile hinsichtlich der Reduktion von supraspinalen Nebenwirkungen.

6. Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Herrn Dipl. biol. Karl-Heinz Konopka und Herrn PD Dr. Hartmut Bürkle, die diese Dissertation unterstützten und im Rahmen der Studie immer wieder mit Hilfestellungen und Ratschlägen geholfen haben. Des Weiteren danke ich Herrn Univ.-Prof. Dr. H. Van Aken, Direktor der Klinik für Anästhesie und Operative Intensivmedizin der WWU Münster. Dank sagen möchte ich auch Herrn Goder vom Biomathematischen Institut der WWU Münster, der an der statistischen Auswertung mitbeteiligt war und Frau Stefanie Köhne für Ihre Korrekturlesung.

7. Literaturverzeichnis

1. Aantaa R, Scheinin M. Alpha₂-adrenergic agents in anaesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1993; 37:433-448
2. Abram SE, Winne RP. Intrathecal acetyl cholinesterase inhibitors produce analgesia that is synergistic with morphine and clonidine in rats. *Anesth Analg* 1995; 81(3):501-507
3. Anderson RJ, Hart GR, Crumpler CP, Lerman MJ. Clonidine overdoses: report of six cases and review of the literature. *Ann Emerg Med* 1989; 10:107-112
4. Angel I, Langer SZ. Adrenergic-induced hyperglycemia in anesthetized rats. Involvement of peripheral α_2 adrenoceptors. *Eur J Pharmacol* 1988; 154:191-196
5. Araujo SV, Bond JB, Wilson RP, Moster MR, Schmidt CM, Spaeth GL. Long term effect of apraclonidine. *Br J Ophthalmol* 1995 Dec; 79(12):1098-1101
6. Ashton H. Benzodiazepine withdrawal: outcome in 50 patients. *Br J Addict* 1987; 82:665-671
7. Bailey PL, Sperry RJ, Johnson GK, et al. Respiratory effects of clonidine alone and combined with morphine in humans. *Anesthesiology* 1991; 74:43-48
8. Barnett AJ, Cantor S. Observations on the hypertensive action Catapres (ST 155) in man. *Med J Aust* 1968; 1: 87-91
9. Blandiaai C, Bernardini MC, Vizi ES, Del Tacca M. Modulation of gastric acid secretion by peripheral presynaptic α_2 adrenoceptors at both sympathetic and parasympathetic pathways. *J Auton Pharmacol* 1990; 10:305-312
10. Bloor BC; Flacke WE. Reduction in halothane anesthetic requirement by clonidine, an α_2 adrenergic agonist. *Anesth Analg* 1982, 61:741-745
11. Bond WS. Psychiatric indications for clonidine: the neuropharmacologic and clinical basis. *J Clin Psychopharmacol* 1986; 6:81-87
12. Bousquet P, Feldman J, Schwartz J. Central cardiovascular effects on adrenergic drugs: differences between catecholamines and imidazolines. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 230:232-236
13. Bousquet P, Feldman J, Tibirica E, et al. New concepts on the central regulation of blood pressure. *Am J Med* 1989; 87(3C):10s-13s

14. Buerkle H, Dunbar SA. Cholinergic, adenosinergic and α_2 adrenergic mechanisms in chronic neuropathic pain. In: Malmberg AB, Chaplan SR, ed. *Mechanisms and Mediators of Neuropathic Pain*. Birkhäuser Verlag Basel/Switzerland 2002; 245-253
15. Buerkle H, Hüge V, Wolfgart M, Steinbeck J, Mertes N, Van Aken H, Prien T. Intra-articular clonidine analgesia after knee arthroscopy. *Eur J Anaesthesiol* 2000; 17:295-299
16. Buerkle H, Schäpsmeier M, Bantel C, Marcus MAE, Wüsten R, Van Aken H. Thermal and mechanical antinociceptive action of spinal vs peripherally administered clonidine in the rat inflamed knee joint model. *Br J Anaesth* 1999; 83:436-441
17. Buerkle H, Yaksh TL. Comparison of the spinal actions of the mu-opioid remifentanil with alfentanil and morphine in the rat. *Anesthesiology* 1996; 84:94-102
18. Buerkle H, Yaksh TL. Pharmacological evidence for different α_2 -adrenergic receptor sites mediating analgesia and sedation in the rat. *Br J Anaesth* 1998; 81:208-215
19. Bylund DB. Subtypes of α_2 -adrenoceptors: pharmacological and molecular biological evidence converge. *Trends Pharmacol Sci* 1988; 9:356-361
20. Bylund DB, U'Pritchard DC. Characterization of alpha-1 and alpha-2 adrenergic receptors. *Int Rev Neurobiol* 1983; 24:343-431
21. Carabine UA, Milligan KR, Moore JA. Adrenergic modulation of preoperative anxiety: a comparison of temazepam, clonidine and timolol. *Anesth Analg* 1991; 73:633-637
22. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 1994; 53(1):55-63
23. Chen M, Lee J, Huang BS, et al. Clonidine and morphine increase atrial natriuretic peptide secretion in anesthetized rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1989; 191:299-303

24. Chen TC, Ang RT, Grosskreutz CL, Pasquale LR, Fan JT. Brimonidine 0.2 % versus apraclonidine 0.5 % for prevention of intraocular pressure elevations after anterior segment laser surgery. *Ophthalmology* 2001 Jun; 108(6):1033-1038
25. Coderre TJ, Melzack R. The contribution of excitatory amino acids to central sensitization and persistent nociception after formalin-induced tissue injury. *J Neurosci* 1992; 12:3665-3670
26. Coleman AL, Robin AL, Pollak IP, et al. Cardiovascular and intraocular pressure effects and plasma concentrations of apraclonidine. *Arch Ophthalmol* 1990; 108:1264-1267
27. Cui JG, O'Connor WT, Ungerstedt U, Linderoth B, Meyerson BA. Spinal cord stimulation attenuates augmented dorsal horn release of excitatory amino acids in mononeuropathy via a GABAergic mechanism. *Pain* 1997; 73(1):85-97
28. Cushman P Jr, Sowers JR. Alcohol withdrawal syndrome: clinical and hormonal responses to α_2 adrenergic treatment. *Alcoholism* 1989; 13:361-364
29. Davis K, Treede R, Raja S, Meyer R, Campbell J. Topical application of clonidine relieves hyperalgesia in patients with sympathetically maintained pain. *Pain* 1991; 47:309-317
30. De Jonge A, Timmermans PBMW, Van Zweiten PA. Participation of cardiac presynaptic α_2 adrenoceptors in the bradycardic effects of clonidine and analogues. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1981; 317:8-12
31. Diehl B, Hoheisel U, Mense S. Histological and neurophysiological changes induced by carrageenan in skeletal muscle of cat and rat. *Agents Actions* 1988 Dec; 25(3-4):210-213
32. Dirig DM, Salami A, Rathbun ML, Ozaki GT, Yaksh, TL. Characterization of variables defining hindpaw withdrawal latency evoked by radiant thermal stimuli. *J Neurosci Methods* 1997; 76(2):183-191
33. Doze VA, Chen BX, Maze M. Dexmedetomidine produces a hypnotic-anesthetic action in rats via activation of central α_2 adrenoceptors. *Anesthesiology* 1989; 71:75-79
34. Eisenach JC, De Kock M, Klimscha W. α_2 -Adrenergic agonists for regional anesthesia: a clinical review of clonidine (1984-1995). *Anesthesiology* 1996; 85:655-674

35. Eisenach JC, Dupen S, Dubois M, et al. Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain. *Pain* 1995; 61:391-399
36. Faber E, Chambers J, Evans R. Depression of NMDA receptor-mediated synaptic transmission by four alpha₂ adrenoceptor agonists on the *in vitro* rat spinal cord preparation. *Br J Pharmacol* 1998; 124:507-512
37. Frisk-Holmberg M, Paalzow L, Wibell L. Relationship between the cardiovascular effects and steady-state kinetics of clonidine in hypertension: demonstration of a therapeutic window in man. *Eur J Clin Pharmacol* 1984; 26:309-313
38. Gentili M, Juhel A, Bonnet F. Peripheral analgesic effect of intra-articular clonidine. *Pain* 1996; 64:593-596
39. Ghingone MC, Calvillo O, Quintin L. Anesthesia for ophthalmic surgery in the elderly: the effects of clonidine on intraocular pressure, perioperative hemodynamics, and anesthesia requirement. *Anesthesiology* 1988; 68:707-716
40. Gold MS, Pottsash A, Sweeney DR, et al. Opiate withdrawal using clonidine. A safe, effective, and rapid nonopiate treatment. *JAMA* 1980; 243:343-346
41. Gray E, Ferrel WR. Acute joint inflammation alters the adrenoceptor profile of synovial blood vessels in the knee joints of rabbits. *Ann Rheum Dis* 1992; 51(10):1129-1133
42. Grossman A, Weerasuriya K, Al-Damluji S, et al. Alpha₂ adrenoceptor agonists stimulate growth hormone secretion but have no acute effects on plasma cortisol under basal conditions. *Horm Res* 1987; 25:65-71
43. Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32:77-88
44. Harrison R, Kaufmann CS. Clonidine effects of a topically administered solution on intraocular pressure and blood pressure in open-angle glaucoma. *Arch Ophthalmol* 1977; 95:1368-1373
45. Hayashi Y, Kamibayashi T, Maze M, et al. Role of imidazoline preferring receptors in the genesis of epinephrine-induced arrhythmias in halothane-anesthetized dogs. *Anesthesiology* 1993; 78:524-530

46. Hayashi Y, Sumikawa K, Maze M, et al. Dexmedetomidine prevents epinephrine-induced arrhythmias through stimulation of central α_2 adrenoceptors in halothane-anesthetized dogs. *Anesthesiology* 1991; 75:113-117
47. Jaakola ML, Ali-Melkkila T, Kanto J, et al. Dexmedetomidine reduces intraocular pressure, intubation responses and anaesthetic requirements in patients undergoing ophthalmic surgery. *Br J Anaesth* 1992; 68:570-575
48. Jarvis DA, Duncan SR, Segal IS, Maze M. Ventilatory effects of clonidine alone and in the presence of alfentanil in human volunteers. *Anesthesiology* 1992; 76:899-905
49. Joris J, Banache M, Bonnet F, et al. Clonidine and ketanserin both are effective treatment for postanesthetic shivering. *Anesthesiology* 1993; 79:532-539
50. Kamibayashi T, Hayashi Y, Sumikawa K, et al. A role of vagus nerve in antiarrhythmic effects of doxazosin and dexmedetomidine on halothane-epinephrine arrhythmias. *Anesthesiology* 1995; 83(5):992-999
51. Karhuvaara S, Kallio AM, Salonen M, et al. Rapid reversal of α_2 -adrenoceptor agonist effects by atipamezole in human volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1991; 31:160-165
52. Kaukinen S, Pyykko K. The potentiation of halothane anesthesia by clonidine. *Acta Anaesthesiol Scand* 1979; 23:107-111
53. Krieglstein GK, Langan ME, Lydhecker W. The principal and central neural actions of clonidine in normal and glaucomatous eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1978; 17: 149-158
54. Kumar A, Bose S, Phattacharya A, et al. Oral clonidine premedication for elderly patients undergoing intraocular surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 1992; 36:159-164
55. Langer SZ. Presynaptic regulation of catecholamine release. *Biochem Pharmacol* 1974; 23:1793-1800
56. Lin CR, Wang CH, Wu PC, Wen ZH, Buerkle H, Yang LC. Apraclonidine attenuates the increase in spinal excitatory amino acid release in rats with adjuvant-induced inflammation. *Anesth Analg* 2002; 94:701-705
57. Lindgren BR, Ekstrom T, Anderson RG. The effect of inhaled clonidine in patients with asthma. *Am Rev Resp Dis* 1986; 134:266-269

58. Massara F, Limone P, Cagliero E, et al. Effects of naloxone on the insulin and growth hormone responses to alpha-adrenergic stimulation with clonidine. *Acta Endocrinol* 1983; 103:371-375
59. Maze M, Vickery RG, Merlone SC, Gaba DM. Anesthetic and hemodynamic effects of the alpha₂ adrenergic agonists, azeperole, in isoflurane-anesthetized dogs. *Anesthesiology* 1988; 68:689-694
60. McArthur KE, Anderson DS, Durbin TE, et al. Clonidine and lidamidine to inhibit watery diarrhea in a patient with lung cancer. *Ann Intern Med* 1982; 96: 323-325
61. Millar J, O'Brien FE, Williams GV, Wood J. The effects of iontophoretic clonidine on neurones in the rat superficial dorsal horn. *Pain* 1993; 53:137-145
62. Miller PE, Rhaesa SL. Effects of topical administration of 0.5 % apraclonidine on intraocular pressure, pupil size, and heart rate in clinically normal cats. *Am J Vet Res* 1996; 57:83-86
63. Mizobe T; Maze M. α_2 -Adrenoceptor Agonists and Anesthesia. *Int Anesthesiol Clin* 1995 Winter; 33(1):81-102
64. Nguyen D, Abdul-Rasool I, Ward D, et al. Ventilatory effects of dexmedetomidine, atipamezole, and isoflurane in dogs. *Anesthesiology* 1992; 76:573-579
65. Olsson JM, Pruitt AW. Management of clonidine ingestion in children. *J Pediatr* 1983; 103:646-650
66. Pertovaara A, Kauppila T, Jyasjarvi E, Kalso E. Involvement of supraspinal and spinal segmental alpha-2-adrenergic mechanisms in the medetomidine-induced antinociception. *Neuroscience* 1991; 44:705-714
67. Peskind ER, Raskind MA, Leake RD, et al. Clonidine decreases plasma and cerebrospinal fluid arginine vasopressin but not oxytocin in humans. *Neuroendocrinology* 1987; 46:395-400
68. Pintor C, Cella SG, Loche S, et al. Clonidine treatment for short stature. *Lancet* 1987; 1:1226-1230
69. Robin AL, Ritch R, Shin DH, Smythe B, Mundorf T; Lehmann RP. Short-term efficacy of apraclonidine hydrochloride added to maximum-tolerated medical

- therapy for glaucoma. Apraclonidine Maximum-Tolerated Medical Therapy Study Group. *Am J Ophthalmol* 1995 Oct; 120(4):423-432
70. Ruffolo RR Jr. Distribution and function of peripheral alpha-adrenoceptors on the cardiovascular system. *Pharmacol Biochem Behav* 1985; 22:827-833
 71. Ruffolo RR, Nichols AJ, Hieble JP. Functions mediated by alpha₂ adrenergic receptors. In: Limbird LE, ed. *The alpha₂ adrenergic receptors*. Clifton, NJ: Humana Press, 1988:187-280
 72. Schäpsmeier M. Zentrale und periphere neuronale Pharmakologie des α₂-Adrenorezeptoragonisten Clonidin am Arthritismodell der Ratte. Medizinische Dissertation, Westfälische Wilhelms-Universität Münster; 1999
 73. Segal IS, Vickery RG, Walton JK, et al. Dexmedetomidine diminishes halothane anesthetic requirements in rats through a postsynaptic alpha₂ adrenergic receptor. *Anesthesiology* 1988; 69:818-823
 74. Sluka KA, Milton MA, Willis WD, et al. Differential roles of neurokinin 1 and neurokinin 2 receptors in the development and maintenance of heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *Br J Pharmacol* 1997; 120(7):1263-1273
 75. Sluka KA, Westlund KN. Behavioral and immunohistochemical changes in an experimental arthritis model in rats. *Pain* 1993; 55(3):367-377
 76. Smith TW, Follenfant RL, Ferreira SH. Antinociceptive models displaying peripheral opioid activity. *Int J Tissue React* 1985; 7(1):61-67
 77. Stanton B, Puglisi E, Gellai M. Localization of alpha₂-adrenoceptor-mediated increase in renal Na⁺, K⁺, and watery excretion. *Am J Physiol* 1987; 252:F1016-1021
 78. Strandhoy JW. Role alpha₂ receptors in the regulation of renal function. *J Cardiovasc Pharmacol* 1985; 7(Suppl 8):S28-S33
 79. Tabo E, Eisele JH, Carstens E. Force of limb withdrawals elicited by graded noxious heat compared with other behavioral measures of carrageenan-induced hyperalgesia and allodynia. *J Neurosci Methods* 1998 Jun 1; 81(1-2):139-149
 80. Takano Y, Yaksh TL. Characterization of the pharmacology of intrathecally administered alpha-2 agonists and antagonists in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261:764-772

81. Tibirica E, Feldman J, Mermet C, et al. A midazoline-specific mechanism for the hypotensive effect of clonidine. A study with yohimbine and idazoxan. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 256:606-613
82. Uhde TW, Stein MB, Vittone BJ, et al. Behavioral and physiologic effects of short-term and long-term administration of clonidine in panic disorder. *Arch Gen Psychiatry* 1989; 46:170-177
83. Vickery RG, Sheridan BS, Segal IS, Maze M. Anesthetic and hemodynamic effects of the stereoisomers of medetomidine, an α_2 -adrenergic agonist, in halothane-anesthetized dogs. *Anesth Analg* 1988; 67:611-615
84. Wang YC, Su CR, Lin MT. The site and mode of analgesic actions exerted by clonidine in monkeys. *Environ Neurol* 1985; 90:479-488
85. Wilkins AJ, Jenkins WJ, Steiner JA. Efficacy of clonidine in treatment of alcohol withdrawal state. *Psychopharmacology (Berlin)* 1983; 81:78-80
86. Wright RMC, Carabine UA, Orr DA, et al. Preanesthetic medication with clonidine. *Br J Anaesth* 1990; 65:628-635
87. Yaksh TL, Reddy SVR. Studies in primates on the analgesic effects associated with intrathecal actions of opiates, α_2 adrenergic agonists, and baclofen. *Anesthesiology* 1981; 54:451-467
88. Yaksh TL, Rudy T. Chronic Catheterization of the Spinal Subarachnoid Space. *Physiology & Behaviour*, 1976; 17:1031-1036
89. Yam PC, Forbes A, Knox WJ. Clonidine in the treatment of alcohol withdrawal in the intensive care unit. *Br J Anaesth* 1992; 68:106-108
90. Yang LC, Marsala M, Yaksh TL. Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE₂ release after carrageenan/kaolin-induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study. *Pain* 1996; 86(5):1066-1077

8. Lebenslauf

PERSÖNLICHES

Name	Oliver Post
Geburtsdatum	14.09.1974
Geburtsort	Bielefeld
Wohnort	Münsterstrasse 249 a, 59075 Hamm
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

SCHULAUSBILDUNG & BERUFLICHER WERDEGANG

1981 – 1982	Von-Vincke- Grundschule, Hamm/Bockum-Hövel
1982 – 1985	Kappenbusch Grundschule, Hamm/Heessen
1985 – 1994	Galilei- Gymnasium, Hamm/Mitte
Abschluss:	Abitur (Juni 1994)
1994 – 1995	Zivildienst im St. Marien-Hospital Hamm
1995 – 1996	Ausbildung zum staatl. examinierten Krankenpflegehelfer im St. Marien-Hospital Hamm
1997	Ausbildung zum Rettungssanitäter an der E.M.T. Rettungsschule, Hamm
1998	Ausbildung zum Erste-Hilfe-Ausbilder an der E.M.T. Rettungsschule, Hamm

STUDIUM

1996 - 2002	Studium der Humanmedizin an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
März 1998	Erwerb der Ärztlichen Vorprüfung, WWU Münster
März 1999	Erwerb des Ersten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung, WWU Münster

März 2001	Erwerb des Zweiten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung, WWU Münster
2001 - 2002	Praktisches Jahr <ul style="list-style-type: none"> • Universitätsklinikum Münster, Chirurgie • Bezirksspital Aarberg, Schweiz, Anästhesie • Universitätsklinikum Münster, Innere Medizin
Juni 2002	Erwerb des Dritten Abschnitts der Ärztlichen Prüfung, WWU Münster
August 2002 - Januar 2004	AiP in der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im St. Marien-Hospital Hamm
Seit Februar 2004	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im St. Marien-Hospital Hamm

BESONDERE TÄTIGKEITEN

1996 – 2002	Studentische Mitarbeit in der Abteilung für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin im St. Marien-Hospital Hamm
Seit 1998	Freie Dozententätigkeit an der E.M.T. Rettungsschule, Hamm
Seit 2002	Dozententätigkeit an der Krankenpflegeschule des St. Marien-Hospitals Hamm

Hamm, den 05. Februar 2004



Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster . 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn Prof. Dr. med. Hugo Van Aken
Herrn Dr. med. Hartmut Bürkle
Klinik und Poliklinik f. Anästhesiologie
und operative Intensivmedizin der
Westf. Wilhelms-Universität Münster
Albert-Schweitzer-Straße 33

48149 Münster

Dienstgebäude
Domplatz 1-3
Telefon: (0251) 411-0
Durchwahl: 2110
Zimmer: 431
Frau Möllers

Aktenzeichen
23.0835.1.0 (G 84/99)

15. Februar 2000

Betr.: Tierschutz;
hier: Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Bezug: Ihr Antrag vom 09.10.1999, hier eingegangen am
17.11.1999, und Ergänzungen vom 19.01.2000

G e n e h m i g u n g s b e s c h e i d :

Sehr geehrter Herr Prof. Dr. Van Aken,
sehr geehrter Herr Dr. Bürkle,

gemäß § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I. S. 1105) wird Ihnen die Genehmigung zur Durchführung nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

Periphere und zentrale Rolle von Apraclonidin in der Behandlung von Entzündungszeichen und Schmerzen bei entzündlicher Kniegelenkerkrankung.

Leiter des Versuchsvorhabens und sein Stellvertreter sind:

Herr
Prof. Dr. med. Hugo Van Aken
Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und operative
Intensivmedizin der
Westf. Wilhelms-Universität
Albert-Schweitzer-Straße 33

48149 Münster

Herr
Dr. med. Hartmut Bürkle
Klinik und Poliklinik für
Anästhesiologie und operative
Intensivmedizin der
Westf. Wilhelms-Universität
Albert-Schweitzer-Straße 33

48149 Münster

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300

e-mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de ● X-400: C=de, A=dbp, P=dvs-nrw, O=bezreg-muenster, S=poststelle ● Telefax (0251) 411-2525

Konten der Regierungshauptkasse Münster:

Landeszentralbank Niederlassung Münster BLZ: 400 000 00 Konto: 40 001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61 820

Öffentliche Verkehrsmittel - Buslinien 1 . 5 . 6 . 17 bis Haltestelle Prinzipalmarkt und 2 . 10 . 11 . 14 . 21 . 64 bis Domplatz

Diese Genehmigung gilt bis zum 28.02. 2001.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

148 Ratten.

Auflagen:

Mit dem Versuchsvorhaben darf erst nach Vorliegen dieser Genehmigung begonnen werden.

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder sein Stellvertreter wechselt, ist mir dieser Wechsel unverzüglich anzuzeigen.

Diese Genehmigung wird zurückgenommen, wenn bei der Erteilung die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht gegeben waren.

Sie wird widerrufen, wenn die Voraussetzungen nach § 8 Abs. 3 TierSchG nicht mehr gegeben sind und dem Mangel nicht innerhalb einer von mir zu bestimmenden Frist abgeholfen wird; sie kann widerrufen werden, wenn ihre Bedingungen und Auflagen nicht erfüllt werden oder den Vorschriften des § 9 Abs. 2 TierSchG wiederholt oder grob zuwidergehandelt worden ist.

Ein Antrag auf Verlängerung der Genehmigung ist rechtzeitig vor Ablauf der Frist bei mir zu stellen.

Da das Versuchsvorhaben überwiegend im öffentlichen Interesse erfolgt, wird von der Erhebung einer Verwaltungsgebühr Abstand genommen.

Rechtsbehelfsbelehrung:

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei mir unter der oben genannten Anschrift schriftlich oder zur Niederschrift einzureichen.

Sollte die Frist durch das Verschulden eines von Ihnen Bevollmächtigten versäumt werden, so würde dessen Verschulden Ihnen zugerechnet werden.

Ich bitte um umgehende Rückgabe des beiliegenden Empfangsbekanntnisses.

Mit freundlichen Grüßen
Im Auftrag

P. U. l.

Dr. Piontkowski

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und
operative Intensivmedizin
z.H. Herrn Prof. Dr. Hugo Van Aken
Albert-Schweitzer-Str. 33
48 149 Münster

VETERINÄR- UND
LEBENSMITTEL-
ÜBERWACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1
Auskunft erteilt:
Frau Heumann
Zimmer: 106
Telefon: 02534/971 - 301
Telefax: 02534/971 - 399
E-Mail:
Amt_39@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:
08.10.1999 an die Bezirksregierung
hier eingegangen am 24.11.1999

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39/401 a)

Münster,
26.11.1999

**Tierschutzgesetz;
Tierversuch G 84/99**

Versuchsleiter und Antragsteller: Prof. Dr. Hugo Van Aken

Stellvertreter: Dr. Hartmut Bürkle

Sehr geehrter Herr Professor Van Aken,

aufgrund § 11 Tierschutzgesetz erteile ich Ihnen die Erlaubnis zur Haltung von

148 Ratten.

Folgende Auflagen sind einzuhalten:

1. Für die Pflege und Betreuung sind die Pfleger der ZTE zuständig.
2. Die medizinische Versorgung hat durch Herrn Prof. Dr. Richter zu erfolgen.
3. Die Käfige sind mit der Nummer der Versuchsgenehmigung zu kennzeichnen.
4. Über die bezogenen Tiere und ihren Verbleib sind Aufzeichnungen zu machen.
5. Änderungen und Erweiterungen im Personalbereich, bei Tierart und -zahl sowie der Unterbringung sind umgehend dem Veterinäramt der Stadt Münster mitzuteilen.

Bitte beachten Sie, dass mit dem Versuch erst begonnen werden darf, wenn die erforderlichen Genehmigungen vorliegen:

- a) Tierversuchsgenehmigung der Bezirksregierung Münster, Ansprechpartner Dr. Piontkowski;
- b) bei Arbeiten mit transgenen Tieren die Bestätigung des Staatl. Umweltamtes Münster, Ansprechpartner bei der WWU: Prof. Richter und Dr. Lücke.

Diese Erlaubnis gilt für die Laufzeit des genehmigten Versuches.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Otto

Städt. Veterinärdirektor

Konten der Stadtkasse

Sparkasse Münster Kto.-Nr. 752
Landeszentralbank Münster Kto.-Nr. 40 001 700
Postbank Dortmund Kto.-Nr. 21 1 36-461
Bank für Gemeinwirtschaft Kto.-Nr. 1 010 305 100
Bankhaus Lampe Münster Kto.-Nr. 306 002

(BLZ 400 501 50) Commerzbank Münster
(BLZ 400 000 00) Deutsche Bank Münster
(BLZ 440 100 46) Dresdner Bank Münster
(BLZ 400 101 11) Volksbank Münster eG
(BLZ 480 201 51) Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 0/00 (BLZ 400 400 28)
Kto.-Nr. 0470 005 (BLZ 400 700 80)
Kto.-Nr. 606 465 600 (BLZ 400 800 40)
Kto.-Nr. 4 200 800 (BLZ 401 600 50)
Kto.-Nr. 61 226 (BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

Hauptvermittlung (0251) 492-0
Telefax (0251) 492-7700
Datex-J *0251492#
E-Mail
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de

Postanschrift: Stadt Münster • 48127 Münster

Herrn
Oliver Post
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
und operative Intensivmedizin
Albert-Schweitzer-Str. 33

48149 Münster

VETERINÄR- UND
LEBENSMITTEL-
ÜBERWACHUNGSAMT

Schelmenstiege 1

Auskunft erteilt:
Unterzeichner
Zimmer: 106
Telefon: 02534/971 - 301
Telefax: 02534/971 - 399
E-Mail:
Amt_39@stadt-muenster.de
Sprechzeiten:
nach Vereinbarung

Datum und Zeichen Ihres Schreibens:

Mein Zeichen (Bitte angeben):
39/401

Münster,
16.12.1999

Tierschutzgesetz;

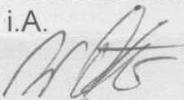
hier: Versuche an Wirbeltieren - Sachkundenachweis

Sehr geehrter Herr Post,

aufgrund des mir vorgelegten Zertifikates über einen erfolgreich abgeschlossenen dreiteiligen Kursus „Versuchstierkunde“ im November und Dezember dieses Jahres kann ich die für Ihre Tätigkeit mit Versuchstieren im obigen Institut erforderliche Sachkunde für nicht-operative Eingriffe bei Ratten, Mäusen, Kaninchen und Primaten anerkennen.

Für operative Eingriffe benötigen Sie nach wie vor eine Ausnahmegenehmigung.

Mit freundlichen Grüßen
i.A.



Dr. Otto
Städt. Veterinärdirektor

Konten der Stadtkasse

Stadtparkasse Münster Kto.-Nr. 752
Landeszentralbank Münster Kto.-Nr. 40 001 700
Postbank Dortmund Kto.-Nr. 21 1 36-461
Bank für Gemeinwirtschaft Kto.-Nr. 1 010 305 100
Bankhaus Lampe Münster Kto.-Nr. 306 002

(BLZ 400 501 50) Commerzbank Münster
(BLZ 400 000 00) Deutsche Bank Münster
(BLZ 440 100 46) Dresdner Bank Münster
(BLZ 400 101 11) Volksbank Münster eG
(BLZ 480 201 51) Westdeutsche Landesbank Münster

Kto.-Nr. 393 210 0/00 (BLZ 400 400 28)
Kto.-Nr. 0470 005 (BLZ 400 700 80)
Kto.-Nr. 606 465 800 (BLZ 400 800 40)
Kto.-Nr. 4 200 800 (BLZ 401 600 50)
Kto.-Nr. 61 226 (BLZ 400 500 00)

Zentrale Verbindungen

Hauptvermittlung (0251) 492-0
Telefax (0251) 492-7700
Datex-J *0251492#
E-Mail
Stadtverwaltung@stadt-muenster.de