

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

**Effekte des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 auf die  
reizinduzierte Aktivität im Rückenmark der Ratte**

INAUGURAL DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät  
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Vorgelegt von  
Schwarz, Jan  
aus Herdecke  
2010

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. E. Pogatzki-Zahn

2. Berichterstatter: Prof. Dr. H. Straub

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2010

Meinen Eltern in Liebe gewidmet.

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. H. Van Aken

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. E. Pogatzki-Zahn

Korreferent: Prof. Dr. H. Straub

### **ZUSAMMENFASSUNG**

#### **Effekte des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 auf die reizinduzierte Aktivität im Rückenmark der Ratte**

**Jan Schwarz**

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war die Analyse der Wirkung des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 auf die reizinduzierte Aktivität im Rückenmarksgewebeschnitt der Ratte. Zur Untersuchung der neuronalen Aktivität der oberflächlichen Rückenmarksschichten wurde die Eintrittszone der Hinterhornwurzel durch elektrische Einzelreize stimuliert.

Zur Erfassung räumlich-zeitlicher Aktivitätsmuster dienten ein spannungsempfindlicher Farbstoff sowie ein schnelles optisches Registrierverfahren. Die Signalregistrierung beruhte auf der Messung der Fluoreszenzänderung des Farbstoffes in Abhängigkeit vom Membranpotential der Nervenzellen. Der Zustand einer Entzündung der Hinterpfote wurde durch die Injektion einer definierten Menge von CFA künstlich ausgelöst.

Die Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 führte in keinem der Versuche zu einer signifikanten Veränderung der Signalamplitude. Die räumlich-zeitliche Ausbreitung der neuronalen Erregung des Rückenmarks wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Zudem zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Untersuchungstieren mit künstlich ausgelöster Entzündung und solchen ohne Entzündung.

Die Ergebnisse legen nahe, dass Win55,212-2 seine Wirkung vermutlich durch eine Modulation deszendierender inhibitorischer Bahnen ausübt, welche diesem Untersuchungsmodell vorenthalten bleiben.

Die tierexperimentelle Arbeit wurde vom Regierungspräsidenten Münster mit dem Schreiben vom 19.12.2002 (Aktenzeichen 50.0835.1.0 (G 79/2002)) genehmigt.

Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2010

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Definition des Schmerzes .....	1
1.2 Physiologie der Nozizeption.....	2
1.3 Pathophysiologie der Nozizeption und neuronale Plastizität .....	4
1.4 Effekte von Cannabinoiden auf die Nozizeption .....	7
1.5 Zielsetzung.....	8
2. Material und Methoden .....	9
2.1 Versuchstier .....	9
2.2 Auslösung einer Entzündung.....	9
2.3 Präparation für Untersuchungen an Rückenmarksquerschnittspräparaten .....	10
2.4 Versuchskammer und Badlösungen .....	11
2.5 Optisches Ableitverfahren .....	13
2.6 Versuchsanordnung zur Ableitung der optischen und bioelektrischen Signale ...	15
2.7 Versuchsprotokoll.....	15
2.8 Auswertung.....	18
3. Ergebnisse.....	20
3.1 Wirkung von DMSO (0,1µmol) auf evozierte Aktivität der einzelnen Schichten des Rückenmarks nach Rexed bei Ratten mit künstlich erzeugter Entzündung und Ratten ohne künstlich erzeugter Entzündung .....	20
3.2 Wirkung von WIN55,212-2 (10µmol) auf evozierte Aktivität der einzelnen Schichten des Rückenmarks nach Rexed bei Ratten mit künstlich erzeugter Entzündung und Ratten ohne künstlich erzeugter Entzündung.....	33
3.3 Wirkung von APV(50µmol) und CNQX(10µmol) auf evozierte Aktivität der einzelnen Schichten des Rückenmarks nach Rexed bei Ratten mit künstlich erzeugter Entzündung .....	46
4. Diskussion .....	57
4.1 Methode der optischen Registrierung.....	57
4.2 Effekte von Cannabinoiden im Rückenmark.....	60
4.3 Entzündungsmodell .....	63
4.4 Schlussfolgerung .....	65
5. Zusammenfassung .....	68
6. Literaturverzeichnis .....	69
7. Danksagung .....	85
8. Lebenslauf .....	86
9. Anhang .....	I
9.1 Statistische Daten .....	I
9.2 Tierexperimentelle Genehmigung .....	IX

# 1. Einleitung

## 1.1 Definition des Schmerzes

Der Schmerz ist seit Menschengedenken immer wieder Gegenstand von philosophischen (z.B. Epikur) oder naturwissenschaftlichen Abhandlungen (z.B. Descartes) gewesen. Viele Versuche existieren um den Begriff Schmerz zu definieren [8, 97]. Die *International Association for the Study of Pain (IASP)* definiert den Begriff Schmerz wie folgt:

„Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“

Solange Bewusstsein vorhanden ist, hat der Schmerz die Aufgabe, den Körper vor einer akuten oder drohenden Verletzung zu warnen. So soll er verhindern, dass es zu einer Schädigung seiner Integrität kommt [30, 47]. Der Schmerz übt also eine Warnfunktion im Körper aus. Ist aber die Integrität des Körpers durch Verletzung, Entzündung oder Verbrennung geschädigt, kann es zu pathologischen Schmerzzuständen kommen, die über die akute Schädigung hinaus bestehen bleiben. Unter diesen Umständen verliert der Schmerz seine Aufgabe als Warninstrument und wird selbst zu einer Bedrohung [47].

Aus der Definition der *IASP* wird auch ersichtlich, dass es sich bei der Empfindung von Schmerzen um einen Vorgang handelt der Bewusstsein voraussetzt und eine subjektive Komponente besitzt [30]. Hiervon muss man den Begriff der Nozizeption abgrenzen. Nozizeption beschreibt die objektiven physiologischen und pathophysiologischen Prozesse, mit denen das Nervensystem schädigende Reize, die Noxen, aufnimmt und verarbeitet.

## 1.2 Physiologie der Nozizeption

Die Aufnahme und Umwandlung sowie Weiterleitung von Schmerzreizen wird von dem nozizeptiven System gewährleistet. Das nozizeptive System ist ein spezialisiertes System, welches die akut oder potentiell gewebeschädigenden Reize in der Peripherie aufnehmen und an zentrale Stellen weiterleiten kann. Es setzt sich aus den dünnen myelinisierten A $\delta$ -Fasern und den unmyelinisierten C-Fasern zusammen. Diese sind histologisch durch freie Nervenendigungen charakterisiert. Man bezeichnet diese sensorischen Nervenendigungen als Nozizeptoren [102, 30, 100]. In ihnen findet die Transduktion statt, welches als Umwandlung eines Reizes in ein elektrisches Potential bezeichnet wird. Zusätzlich zu dieser afferent sensorischen Funktion können Nozizeptoren aber auch Botenstoffe in der Peripherie freisetzen, wodurch es zu einer sog. neurogenen Entzündung kommt [52, 53, 98]. Das Spektrum an Reizen (thermische, mechanische oder chemische) auf die der Nozizeptor reagieren kann, wird durch die auf ihm exprimierten Rezeptoren festgelegt. Ein Rezeptor, der auf starke thermale Reize reagiert ( $>43^{\circ}\text{C}$ ), ist der TRPV1(transient receptor potential vanilloid 1)-Rezeptor [16, 13, 15]. Er gehört zur Familie der TRP-Rezeptoren (transient receptor potential), einer Reihe von temperatursensitiven Ionenkanälen.

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von weiteren Ionenkanälen entdeckt und kloniert, die für die Transduktion der weiteren Noxen verantwortlich sind (z.B. Acid-sensing Ion Channel(ASIC) [51, 118], Voltage-gated Calcium Channel (VGCC) [108, 33], Tetrodotoxin (TTX)-insensitiver Natriumkanal[1, 9]). Die Mechanismen für die Transduktion noxischer mechanischer Reize sind bis heute noch nicht identifiziert. Zudem wurden metabotrope Rezeptorproteine entdeckt, die auf Neuropeptide (Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) [84], Substanz P [26]), Entzündungsmediatoren (Bradykinin, Prostaglandin E2 (PGE2)) und Neurotrophine Nerve Growth Factor (NGF) [67] reagieren [97]. Die meisten der Nozizeptoren sind polymodal, das heißt, dass sie sowohl auf noxische chemische und thermale als auch auf noxische mechanische Reize antworten. Sie besitzen dann die Rezeptorproteine für diese Modalitäten. Es gibt aber auch Nozizeptoren, die nur auf eine Art Reiz antworten und solche, die unter Normalbedingungen stumm sind. Diese „stummen“ Nozizeptoren [69] werden nur unter pathologischen Konditionen aktiv [69, 126]. Hat die

Transduktion einer Noxe an einem Rezeptor stattgefunden, erfolgt die Umwandlung in ein Aktionspotential (Transformation). Dieses Aktionspotential (AP) wird entlang der Nervenfasern weitergeleitet und bei ausreichender Stärke an das nachgeschaltete Neuron im Hinterhorn des Rückenmarks übermittelt [30, 47]. Das Rückenmark wird nach Rexed [89] in zehn verschiedene Schichten (lat. Laminae) unterteilt. Die unmyelinisierten C-Faser-Afferenzen terminieren vor allem in den oberflächlichen Laminae I und II, welche auch als Substantia gelatinosa bezeichnet werden [106]. Die A $\delta$ -Afferenzen hingegen terminieren in der Lamina I und der tieferen Lamina V [40]. In diesen Laminae erfolgt die weitere Verschaltung der nozizeptiven Informationen auf Projektionsneurone. Bei dem Prozess der synaptischen Verschaltung nimmt vor allem die erregende Aminosäure Glutamat eine tragende Rolle als Überträgerstoff ein [30]. Glutamat und die NMDA(N-Methyl-D-Aspartat)- und Non-NMDA-Rezeptoren werden auch für die synaptische Plastizität verantwortlich gemacht [92]. Unter den Neuronen des Hinterhorns wird funktionell zwischen drei Arten von Neuronen differenziert [122, 110]. Die erste Art sind die als Low-Threshold-Neurons bezeichneten Neurone, welche von niederschwelligen Mechano-, Warm- und Kaltrezeptoren aktiviert werden können. Des Weiteren existieren die High-Threshold-Neurons, welche nur durch nozizeptiven Input aktiviert werden. Als dritte Art gibt es die Wide-dynamic-range-Neurons, welche sowohl auf Reize der niederschwelligen Neurone sowie der High-Threshold-Neurons antworten. Die meisten dieser Hinterhornneurone projizieren auf segmentaler Ebene auf andere Neurone und werden so in motorische und vegetative Reflexbögen eingebunden. So wird die Grundlage für die nozizeptiven Reflexe gebildet, die durch noxische Reize ausgelöst werden [123, 98]. Ein Teil des Inputs aus der Peripherie zieht nach der synaptischen Verschaltung aber auch zum kontralateralen Tractus spinothalamicus im Vorderseitenstrang. Von dem Tractus spinothalamicus werden die nozizeptiven Informationen zu dem lateralen ventrobasalen Thalamuskomplex weitergeleitet und von dort an den somatosensorischen Kortex (Areal S1 und S2) übermittelt [111, 117]. Die Aktivierung dieses Systems vermittelt die sensorisch diskriminative Komponente des Schmerzes. Ein Teil der Informationen wird auch zum medialen Thalamuskomplex verschaltet und von dort in die Insula, den anterioren cingulären und den frontalen Kortex projiziert. Von diesen Regionen bestehen Projektionen zum limbischen System. Dieser Verschaltungsweg wird mit der affektiven Komponente des Schmerzes in

Verbindung gebracht [99]. Zudem existieren noch andere ascendierende Pfadwege in übergeordnete Hirnzentren, auf die an dieser Stelle jedoch nicht eingegangen werden kann [5, 6, 40, 123]. Zusätzlich zu diesen ascendierenden Bahnen existieren jedoch auch descendierende Bahnen, die im dorsolateralen Funiculus verlaufen und die noxische Signalverarbeitung modulieren [3, 123]. Ausgangspunkte dieser modulierenden Bahnen ist der Kortex, der über das periaquäduktale Grau und die ihm nachgeschalteten Hirnstammkerne die Informationen im Sinne einer Hemmung aber auch einer Bahnung beeinflusst [111, 122].

### **1.3 Pathophysiologie der Nozizeption und neuronale Plastizität**

Im Rahmen einer Entzündung, einer Gewebeverletzung oder der Verletzung eines Nervs kann es zu einer Veränderung der Erregbarkeit des peripheren sowie des zentralen nozizeptiven Systems kommen [72, 100]. Die Empfindlichkeit des nozizeptiven Systems für bestimmte Reize wird dann erhöht, man bezeichnet diesen Vorgang als Sensibilisierung [30]. Im Kontext dieser Sensibilisierungsvorgänge kann an afferenten Nervenfasern eine erniedrigte Erregungsschwelle oder eine erhöhte Spontanaktivität nachgewiesen werden [49, 72]. Ebenso kann an den Hinterhornneuronen eine erhöhte Erregbarkeit bzw. eine erhöhte Entladungsfrequenz elektrophysiologisch gemessen werden [124, 96]. Zudem kommt es zu einer Vergrößerung des rezeptiven Feldes, dem sensorischen Einzugsgebiet, eines Nozizeptors [41, 125, 111].

Appliziert man thermische Stimuli auf dem entzündeten oder verletzten Gewebe, die vorher noch keine Schmerzempfindung hervorgerufen haben, können diese nun zu einer verstärkten noxischen Reizung führen [86, 110]. Dieses Phänomen wird als Hyperalgesie bezeichnet und ist klinisch durch eine reduzierte Schmerzschwelle bzw. durch einen verstärkten Schmerz auf unterschwellige Reize definiert [30]. Man unterscheidet zwei Arten der Hyperalgesie. Die primäre Hyperalgesie im Bereich des verletzten Gewebes, die sich auf das rezeptive Feld der sensorischen Nervenendigung bezieht und die sekundäre Hyperalgesie, die auch das von der Verletzung nicht betroffene Gewebe erfasst [31]. Anhand von Tierexperimenten konnte die

Hitzehyperalgesie durch Sensibilisierungsprozesse der A $\delta$ - und C-Fasern erklärt werden [12, 16]. Handwerker [30] beschreibt Selbiges nach Untersuchungen bei menschlichen Probanden, die eine erniedrigte Schwelle bei Hitzeeinwirkung auf polymodale C-Fasern ergaben. Nach Untersuchungen von Caterina [14, 17] konnte die zentrale Rolle des TRPV1-Rezeptors bei der Entstehung von Hitzehyperalgesie während Entzündungen herausgestellt werden. Primäre Hyperalgesie ist also durch eine Sensibilisierung der polymodalen Afferenzen des peripheren nozizeptiven Systems zu erklären [121] und Ausdruck seiner Plastizität [71]. Die Entstehungsmechanismen dieser plastischen Prozesse der peripheren Sensibilisierung sind bis heute noch nicht komplett aufgedeckt und immer noch Gegenstand von Untersuchungen. Eine wichtige Rolle neben dem TRPV1-Rezeptor bei der Entstehung der primären Hyperalgesie und der Sensibilisierung der Nozizeptoren spielt sicherlich die mit ihr einhergehende neurogene Entzündung [52, 53, 98]. Diese ist durch eine Rötung der Reizstelle, ein Erythem, welches sich weit in die Umgebung ausdehnt (sog. „flare response“) und einem Ödem, bedingt durch eine lokale Gefäßpermeabilität, gekennzeichnet. Für die Entstehung der neurogenen Entzündung wird vor allem die Ausschüttung von Substanz P und CGRP aus den peripheren sensorischen Nervenendigungen verantwortlich gemacht [39, 10, 32]. Sie führen zu einer Attraktion von Makrophagen und einer Degranulation von Mastzellen [24, 58], wodurch wiederum Entzündungsmediatoren ausgeschüttet werden, die auf die Nozizeptoren einwirken [50]. Diese Entzündungsmediatoren aktivieren wiederum intrazelluläre Kaskaden, die eine Hochregulation von Rezeptorproteinen oder eine Erniedrigung der Reizschwelle von Ionenkanälen bewirken [7]. Weder diese Prozesse noch die Aktivierung von stummen Nozizeptoren [69, 126], die erst im Status der Entzündung auf Reize antworten, können jedoch das Phänomen der sekundären Hyperalgesie erklären. Aus dieser Konsequenz erschließt sich, dass sekundärer Hyperalgesie ein Mechanismus zentraler Sensibilisierungsvorgänge zugrunde liegen muss [71].

Zentrale Sensibilisierung wird von der *IASP* als „verstärkte Reaktion nozizeptiver Neurone auf ihren normalen Reiz“ definiert. Werden kurze Hitzeimpulse oder mechanische Prellreize mit einer Frequenz von 1/s appliziert, kommt es zu dem Phänomen, dass der Schmerz von Reiz zu Reiz zunimmt bzw. als stärker wahrgenommen wird. Diesem Phänomen liegt ein pathophysiologisches Korrelat

zugrunde, welches Mendell [66] mit dem Begriff „wind up“ belegte. „Wind up“ ist auf eine kurzfristige Sensibilisierung der zentralen Rückenmarksneurone zurückzuführen. Es ähnelt der sog. Langzeitpotenzierung (LTP), welche als Grundlage für Gedächtnisprozesse angesehen wird [55, 56]. LTP wird im elektrophysiologischen Experiment durch eine kurzfristige hochfrequente Reizung von afferenten C-Fasern produziert und führt zu einer Potentierung der Erregung der Rückenmarksneurone. Im Gegensatz zu „wind up“ persistiert die Übererregbarkeit bei der LTP aber nach Wegfall des Reizes. Obwohl die zur Induktion von LTP benutzte Hochfrequenzstimulation nicht den in vivo beobachteten niederfrequenten asynchronen Entladungen entspricht, die bei Tieren mit Hyperalgesie durch induzierte Entzündung gemessen wurden [123], wird LTP weiterhin eine Schlüsselrolle in der Sensibilisierung zentraler Rückenmarksneurone zugeschrieben [45]. Beiden Prozessen, dem „wind up“ und der LTP, liegt eine Erregung postsynaptischer NMDA-Rezeptoren zugrunde [92, 77], welche zuvor durch die Effekte von Substanz P und CGRP gebahnt wurde [114, 21]. Substanz P und CGRP werden im Rückenmark bei einer Entzündung verstärkt aus Nozizeptoren freigesetzt [94, 95] und für die zentrale Sensibilisierung verantwortlich gemacht [78, 79, 43]. Durch die Erregung der NMDA-, Substanz P- und CGRP-Rezeptoren kommt es zu einem gesteigerten Influx von  $Ca^{2+}$ , der in einer Aktivierung sog. „immediate early genes“ resultiert [30]. Diese „immediate early genes“ könne wiederum Zielgene aktivieren, wodurch es letztendlich zu einer gesteigerten Expression von Rezeptormolekülen auf der Zellmembran kommt [40]. Im Rahmen der zentralen Sensibilisierung bei Entzündungsprozessen wurden aber auch andere Prozesse herausgestellt, die zu der gesteigerten Erregbarkeit führen. So gilt ein Augenmerk vor Allem den Entzündungsmediatoren [21] und der Rolle der Cyclooxygenase [115] bei der Induktion zentraler Sensibilisierungsprozesse [116].

Seit der „gate-control“-Hypothese von Melzack und Wall aus dem Jahr 1965 konnten eine Vielzahl weiterer Untersuchungen zu Sensibilisierungsprozessen und synaptischer Plastizität ein besseres Verständnis der Schmerzentstehung vermitteln. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen notwendig, um genaue Angriffspunkte für Medikamente zu finden, damit der Mensch ohne unerwünschte Nebeneffekte von akuten oder chronischen Schmerzen befreit werden kann.

## 1.4 Effekte von Cannbinoiden auf die Nozizeption

Seit der Charakterisierung der Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 [65, 74] und deren Verteilung im peripheren und zentralen Nervensystem [60, 74] wurden die verschiedenen Effekte des endogenen Cannabinoidsystems und von synthetischen Cannabinoiden [82] auf die Nozizeption [120] oder bei Erkrankungen intensiver untersucht [83]. Die Wirkung von Cannabisrauch auf die Schmerzreaktion wurde jedoch schon im Jahr 1899 beschrieben [18].

Cannabinoiden vermitteln ihre antinozizeptive Wirkung über spinale und supraspinale Mechanismen [113, 23]. Doch auch an peripheren Nozizeptoren konnte analgetische Effekte von Cannabinoiden nachgewiesen werden [93, 25, 2]. In den letzten Jahren konnte eine Interaktion des endogenen Cannabinoidsystems mit den Glutamatrezeptoren und somit eine Beeinflussung der Schmerzverarbeitung aufgedeckt werden [90, 111, 81]. An Tiermodellen mit induzierter Entzündung konnte eine Linderung der Hyperalgesie durch Endocannabinoiden herausgestellt werden [85]. Diese und andere Ergebnisse legen eine Interaktion zwischen dem TRPV1-Rezeptor [103] und eine Beeinflussung der Sensibilisierung peripherer Nozizeptoren nahe.

Obwohl in den letzten Jahren verstärkt Studien an menschlichen Probanden veranlasst wurden, um die analgetischen Eigenschaften von Cannabinoiden zu untersuchen, konnten bisher nur uneinheitliche Ergebnisse für die Behandlung mit Cannabinoiden bei akuten Schmerzen herausgestellt werden [11, 37]. Aufgrund der positiven Ergebnisse der Grundlagenforschung in Bezug auf die antinozizeptiven Effekte von Cannabinoiden ist es daher wichtig, die genauen Mechanismen der Cannabinoiden weiter aufzudecken.

## **1.5 Zielsetzung**

Mit der vorliegenden Untersuchung soll der Einfluss des synthetischen CB1- und CB2-Rezeptoragonisten WIN55,212-2 auf die reizinduzierte Aktivität des dorsalen Hinterhorns an Rückenmarksschnitten von Ratten untersucht werden. Ziel dieser Untersuchung ist es, die Effekte von WIN55,212-2 auf die Erregung nozizeptiver Neurone bei Ratten mit künstlich induzierter Entzündung und Ratten ohne Entzündung herauszustellen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstier**

Alle Untersuchungen wurden an 17 bis 26 Tage alten männlichen Sprague-Dawley Ratten (34 bis 65g) durchgeführt. Vor den terminalen Versuchen waren die Tiere ohne Unterbrechung (Ausnahme: Injektion von CFA) bei ihrer Amme. Wasser und Futter wurde den Ratten in ausreichender Menge zur Verfügung gestellt. Während der Haltung waren die Tiere einem 12-stündigen Tag/Nacht Rhythmus ausgesetzt. Prä- und postoperativ wurden die Tiere in einem klimatisierten Raum in Plexiglaskisten mit Tierstreu gehalten. Für die tierexperimentelle Untersuchung liegt eine Genehmigung der Bezirksregierung Münster vor (Schreiben vom 19.12.2002 (Aktenzeichen 50.0835.1.0 (G 79/2002))).

### **2.2 Auslösung einer Entzündung**

Bei einigen Ratten (n=35) wurde eine Entzündung durch CFA ausgelöst. Hierzu wurde an der rechten Hinterpfote eine künstliche Entzündung erzeugt. Dabei wurde den Ratten zwei Tage vor dem eigentlichen Versuch 0,5µl Complete Freund's Adjuvant (CFA, Mycobacterium tuberculosis, SIGMA) in das Subkutangewebe der Plantarseite der rechten Hinterpfote injiziert. An den zwei darauf folgenden Tagen wurden die gleichen Ratten wieder bei ihrer Amme untergebracht. Als Erfolgskontrolle einer sich entwickelnden Entzündung wurden ein in diesem Bereich entstehendes Erythem und Ödem sowie die Schonhaltung der Hinterpfote gewertet. Es wurde darauf geachtet, dass weder die Ratten selber noch ihre Artgenossen an der Injektionsstelle durch Nagen oder Putzen eine Manipulation herbeiführten. Zudem wurde durch fortlaufende Kontrollen sichergestellt, dass die operierten Individuen wieder von der Amme aufgenommen wurden.

### 2.3 Präparation für Untersuchungen an Rückenmarksquerschnittspräparaten

Nach einer Isofluran-Narkose wurden die Ratten dekapitiert. Anschließend wurde in einem Eisbad aus Yamamoto I Lösung unter ständiger Begasung das Rückenmark freipräpariert. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Hinterhornwurzeln erhalten blieben. Die für die Versuche relevanten Segmente L3-L6 des lumbosakralen Anteils des Rückenmarks wurden in eisgekühlte künstliche Cerebrospinalflüssigkeit nach Yamamoto I überführt, mit Carbogen (5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>) begast und die Rückenmarkshäute entfernt. Daraufhin wurde das Rückenmark in flüssigen Agar eingebettet, der zu diesem Zeitpunkt eine Temperatur von 21°-23° C hatte. Mittels eines Vibratoms wurden dann wiederum in einem gekühlten Wasserbad (Yamamoto I, Carbogen; 5% CO<sub>2</sub> in O<sub>2</sub>) 500µm dicke Transversalschnitte des Rückenmarks, wenn möglich mit anhängender Hinterhornwurzel, hergestellt. Diese wurden für 30 Minuten in der Ca<sup>2+</sup>-freien Yamamoto I-Lösung präinkubiert, um den Schnitten eine Erholung nach der Manipulation zu ermöglichen. Nach den 30 Minuten erfolgte eine Ca<sup>2+</sup>-Zugabe, wodurch die Präinkubationslösung in die künstliche Cerebrospinalflüssigkeit nach Yamamoto II (eigentliche Inkubationslösung) überführt wurde. Nach Ablauf der 60-minütigen Inkubationszeit wurden die Schnitte in die Färbekammer überführt. Dort wurden sie mittels eines spannungssensitiven Farbstoffs der Styrylgruppe (RH 795; Molecular Probes/Orgon/USA), der an der Außenseite der Zellmembran bindet, eine Stunde lang unter Lichtabschirmung gefärbt. Die Notwendigkeit der Lichtabschirmung ergibt sich aus dem Freiwerden toxischer Sauerstoffradikale, die eine Schädigung der Nervenzellen verursachen könnten. Zudem kann so auch dem vorzeitigen Ausbleichen des Farbstoffs entgegengewirkt werden. Um eine annähernd gleichmäßige Diffusion des Farbstoffs in die Rückenmarksschnitte zu ermöglichen, wurde die Färbekammer ständig maschinell gerüttelt. Während der gesamten Färbezeit wurden die Schnitte mit Carbogen begast. Nach der Färbung wurden die Schnitte in eine mit Inkubationslösung gefüllte und mit Carbogen begaste Auswaschkammer überführt, in der der nichtmembrangebundene Anteil des Farbstoffs durch ein einstündiges Bad entfernt wurde. Anschließend wurden die Schnitte in eine Versuchskammer vom Submerge-Typ gelegt und mit der Inkubationslösung unter ständiger Begasung perfundiert.

## 2.4 Versuchskammer und Badlösungen

Nr.	Name	NaCl (mmol/l)	KCl (mmol/l)	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (mmol/l)	MgSO <sub>2</sub> (mmol/l)	NaHCO <sub>3</sub> (mmol/l)	CaCl <sub>2</sub> (mmol/l)	Glukose (mmol/l)	Substanz
1	Präinkubations- lösung (Y I)	124	4	1,24	1,3	26	1	10	
2	Inkubations- lösung (Y II)	124	4	1,24	1,3	26	2	10	
3	Inkubations- lösung + Farbstoff	124	4	1,24	1,3	26	2	10	RH795 12,5µg/ml
4	Inkubations- lösung + DMSO	124	4	1,24	1,3	26	2	10	DMSO 0,1µmol
5	Inkubations- lösung + WIN	124	4	1,24	1,3	26	2	10	WIN 10µmol +DMSO 0,1µmol
6	Inkubations- lösung +APV	124	4	1,24	1,3	26	2	10	APV 50µmol + DMSO 0,1µmol
7	Inkubations- lösung +APV&CNQX	124	4	1,24	1,3	26	2	10	APV 50µmol +CNQX 10µmol +DMSO 0,1µmol

Tab.1: Zusammensetzungen der Badlösungen [YI und YII: Prä- und Inkubationslösung nach Yamamoto I und II (Yamamoto1972), RH795: spannungssensitiver Farbstoff der Styrylgruppe (Molecular Probes, Oregon, USA), DMSO: Dimethylsulfoxid, WIN: WIN55,212-2 Cannabinoidezeptoragonist, APV: 2-Amino-4-Phosphonovalerat NMDA-Rezeptorantagonist, CNQX: 6-Cyano-7-Nitrochinoxalin-2,3-Dion Non-NMDA-Rezeptorantagonist]

Die Experimente wurden in einer Kammer vom Submerge-Typ durchgeführt. Dabei lagen die Gewebeschnitte am Boden der Kammer, welche mit einer konstanten Perfusionsgeschwindigkeit von 75-80 Tropfen pro Minute gespült wurden. Bei dieser Fließgeschwindigkeit der Lösungen wurde der gesamte Inhalt der Versuchskammer innerhalb von 6 Minuten komplett ausgetauscht. Die Temperatur wurde mittels eines regelbaren Wärmeaustauschers zwischen den physiologischen Normalwerten von 37° und 41° C eingestellt. Über die Carbogenbegasung der Versuchslösungen konnte der pH-Wert zwischen 7,35 und 7,45 gehalten werden. Die Temperatur und der pH-Wert wurden während den Versuchen fortlaufend kontrolliert. Durch ein über der Versuchskammer angebrachtes Operationsmikroskop, welches mit einer Digitalkamera

verbunden war, erfolgte die visuelle Kontrolle der Schnitte. Hierdurch konnten auch Lage, Form und Zustand des Schnittes dokumentiert werden.

Als Standardlösung wurde die, in ihrer Zusammensetzung der Cerebrospinalflüssigkeit eines Warmblüters angepasste Lösung nach Yamamoto verwendet. Je nach Versuchsanordnung wurden dieser Standardlösung dann die einzelnen untersuchten Substanzen hinzugefügt. Als Lösungsvermittler wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, da sich der synthetische Cannabinoidrezeptoragonist (R)-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxazin-6-yl]-1-aphthalenyl-methanone (WIN55,212-2) nicht in Wasser lösen ließ. Die Wirkung dieses Cannabinoidrezeptoragonisten wurde in Konzentrationen von 5 und 10  $\mu\text{mol/l}$  getestet. Auch die anderen verwendeten Substanzen, das 2-Amino-4-Phosphonovalerat (APV), ein potenter N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonist, sowie das 6-Cyano-7-Nitrochinoxalin-2,3-Dion (CNQX), ein Non-NMDA-Rezeptorantagonist, wurden mittels DMSO in Lösung überführt. Dabei wurde das AP-V in einer Konzentration von 50  $\mu\text{mol/l}$  benutzt, während die Applikation des CNQX in einer Konzentration von 10  $\mu\text{mol/l}$  erfolgte. Um die Eigeneffekte des DMSO, von denen der anderen Substanzen, zu unterscheiden, wurde der Standardlösung DMSO in einer Konzentration von 0,1 mol hinzugefügt und die Versuche mit diesem Lösungsansatz als Referenz hinzugezogen. Alle genannten Substanzen wurden von der Firma SIGMA/Steinheim/Deutschland bezogen.

## 2.5 Optisches Ableitverfahren

Das Verfahren zur Ableitung der optischen Signale bedient sich der Messung der Fluoreszenzänderung des spannungssensitiven Farbstoffs RH 795 in Abhängigkeit von dem Membranpotential der untersuchten Nervenzellen. Während der einstündigen Färbung der Rückenmarksschnitte lagert sich der Farbstoff an die Außenseite der Phospholipiddoppelmembranen der Neuronen an. Die durch die elektrische Reizung ausgelöste Depolarisation der Rückenmarksneurone löst eine Verlagerung der Farbstoffmoleküle innerhalb der Doppelmembran aus, welche in einer Abnahme der Fluoreszenz resultiert. Die Abnahme der Fluoreszenz wird in der bildlichen Darstellung der Signale als Deflektion nach oben wiedergegeben. Um die Spontanaktivität der Zellen aus den erhaltenen Signalen herausrechnen zu können, wurde bei jedem Versuch die Restlichtintensität des einzelnen Schnittes gemessen und in Relation zur Abnahme der Fluoreszenz gesetzt. Ähnlich wie bei intrazellulären Ableitungen wird so, im Gegensatz zu Feldpotentialableitungen, theoretisch der Erregungszustand jeder einzelnen Zelle ersichtlich. Da im Verlauf des Versuches aber ein Teil des Farbstoffs durch die fortlaufende Perfundierung des Schnittes ausgewaschen wird, und jeder Schnitt aufgrund von unterschiedlicher Diffusion des Farbstoffs in den Schnitt verschieden gefärbt ist, muss die Fluoreszenzänderung als relativer Wert angegeben werden.

Zur Registrierung der optischen Signale dient ein Versuchsaufbau aus mehreren hintereinander geschalteten Filtersystemen und einer Lichtquelle. Der in den Gewebeschnitt eingelagerte spannungssensitive Farbstoff wird mittels Licht aus einer Xenon-Kurzbogenlampe zur Fluoreszenz angeregt. Das Licht der Xenonlampe wird durch einen Bandpassfilter gelenkt, wodurch die den Farbstoff nicht optimal anregenden Wellenlängen des Xenonspektrums herausgefiltert werden. Der verwendete Farbstoff hat sein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 536 – 556 nm. Durch einen dichromatischen Teilerspiegel, der in einem Winkel von 45° zu der darüber liegenden Submerge-Kammer liegt, wird das durch den Bandpassfilter projizierte Licht dieser Wellenlänge auf den Rückenmarksschnitt reflektiert. Dieses auf den Rückenmarksschnitt eintreffende Licht regt den Farbstoff optimal zur Emission an. Der dichromatische Teilerspiegel reflektiert das vom Bandpassfilter kommende Licht

fast vollständig. Das vom Gewebeschnitt emittierte Licht hingegen, mit seiner Wellenlänge von über 580nm, kann die Reflektionsfläche in entgegengesetzter Richtung ungehindert passieren. Ein unter dem Teilerspiegel gelegenes Photodiodenfeld nimmt das vom Gewebe emittierte Licht auf. Da eine feste Beziehung zwischen Fluoreszenz und Membranpotential besteht, kann man auf diese Weise die Verteilung von hyperpolarisierten und depolarisierten Neuronen im Zellverband feststellen. Zur Messung der reizausgelösten Erregungsausbreitung wurden die Einzelreizungen jeweils in einem zeitlich zugeordneten Belichtungsintervall, von 1304ms, durchgeführt. Zwischen den einzelnen Reizungen wurde ein zeitlicher Abstand von 3 Minuten eingehalten, so dass die, durch die Belichtung entstandenen, toxischen Radikale aus dem Rückenmarksschnitt ausgeschwemmt werden konnten und so einer Kumulation dieser Substanzen entgegengewirkt wurde.

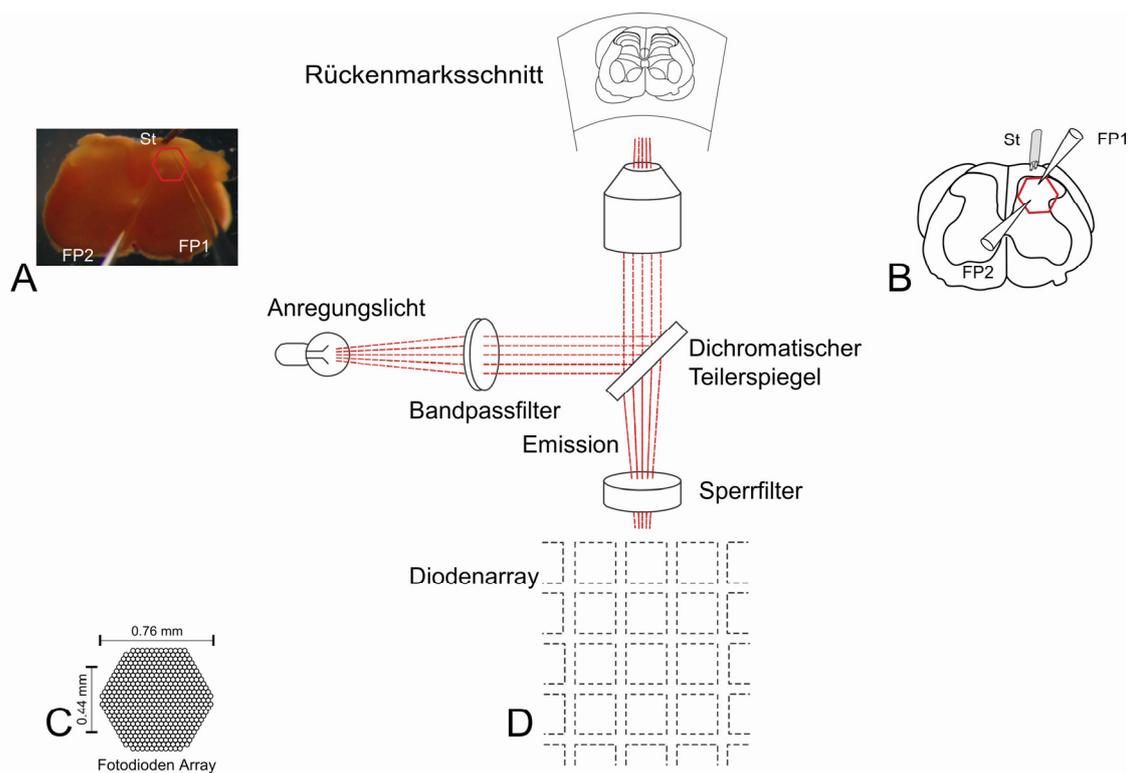


Abb. 2.1: 2.1A Foto eines Rückenmarksschnittes in der Ableitkammer, 2.1B Schematische Darstellung eines Rückenmarksschnittes, 2.1C Schematische Darstellung des Fotodiodenarrays mit Größenangabe in Millimetern, 2.1D Schematische Darstellung des optischen Ableitverfahrens, ST: Reizelektrode, FP1 und FP2 Elektroden zur Ableitung von Feldpotentialen, rotes Hexagon in A und B repräsentiert die Ausrichtung des Fotodiodenarrays im Gewebeschnitt

## **2.6 Versuchsanordnung zur Ableitung der optischen und bioelektrischen Signale**

Um die afferenten A $\delta$ - und C-Faserstränge elektrisch zu stimulieren, wurde eine bipolare Wolframelektrode im Eingangsbereich der Hinterhornwurzel platziert. Die Ableitung der bioelektrischen Signale erfolgte in den Laminae I-III nach Rexed, durch Positionierung der mit Inkubationslösung gefüllten Ableitelektroden in diesem Bereich. Das unter der Submerge-Kammer gelegene hexagonale Photodiodenfeld detektierte das, vom Gewebeschnitt ausgehende, optische Signal. Dieses hexagonale Photodiodenfeld wurde durch 464 einzelne Dioden gebildet. Dabei hängt die Größe des detektierten Gewebeareals von dem verwendeten Mikroskopobjektiv ab. In den vorliegenden Versuchen wurde ein Objektiv mit 20facher Vergrößerung verwendet, woraus sich eine erfassbare Gewebefläche von 0,483mm<sup>2</sup> ergibt. Die räumliche Messauflösung einer einzelnen Diode repräsentiert dabei eine runde Fläche mit einem Durchmesser von 0,0364 mm und greift die neuronale Aktivität über genau diesem Areal ab. Zur Auswertung der Versuchsdaten wurden zu jedem Versuch sechs Dioden, die den einzelnen Laminae nach Rexed zugeteilt worden waren, ausgewählt. Das von diesen Dioden abgeleitete Signal wurde dann mit Hilfe der Auswertungssoftware Neuroplex (Red Shirt Imaging, LLC, Fairfield, Connecticut, USA) gemittelt und zur Auswertung verwendet.

## **2.7 Versuchsprotokoll**

Die Versuche zur Wirkung der verwendeten Substanzen auf durch einen Einzelreiz ausgelöste bioelektrische Aktivität wurden gemäß den in den Tabellen 2-5 gezeigten drei- bzw. vierphasigen Versuchsprotokollen durchgeführt. Es wurden vier separate Versuchsreihen einander gegenübergestellt, wobei jede der Versuchsreihen sowohl an Tieren mit einer künstlich erzeugten Entzündung als auch an gesunden Tieren untersucht worden ist.

### Versuchsreihe 1

In der ersten Versuchsreihe (n=8) wurden die Gewebeschnitte nur mit der künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit perfundiert. Dabei wurde das eigentliche Versuchsprotokoll zur Applikation der zu testenden Substanzen verwendet. Es gliedert sich in drei Phasen. Die erste Phase, der Vorlauf, diente der Regeneration des Gewebeschnittes nach der Umbettung in die Submergekammer und hatte eine Länge von 30 Minuten. In einer zweiten Phase, die in den weiteren Versuchsreihen zur Applikation der verwendeten Substanzen diente, wurde der Schnitt weiterhin mit der künstlichen Cerebrospinalflüssigkeit perfundiert. Auch diese Versuchsphase hatte eine Länge von 30 Minuten. Die dritte Versuchsphase, in der die verwendeten Substanzen durch die künstliche Cerebrospinalflüssigkeit wieder aus dem Gewebeschnitt ausgewaschen werden sollten, hatte ebenfalls eine Länge von 30 Minuten. Die Auswaschphase sollte zeigen, ob die Wirkung der verwendeten Substanzen reversibel war.

Durch diese Versuchsreihe sollte der physiologische Rundown, dem der Gewebeschnitt ausgesetzt ist bestimmt werden, um als Referenz für die anderen Versuchsreihen zu gelten.

### Versuchsreihe 2

Die zweite Versuchsreihe (n=13) diente zur Beobachtung der Wirkung des Lösungsvermittlers DMSO. Dabei wurde nach der ersten oben beschriebenen Versuchsphase von 30 Minuten der Lösungsvermittler DMSO in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{mol}$  zur Standardlösung beigefügt und für 30 Minuten appliziert.

### Versuchsreihe 3

In der dritten Versuchsreihe (n=19) wurde die Wirkung des synthetischen Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 untersucht. Nach der ersten Versuchsphase wurde er ebenfalls für eine Dauer von 30 Minuten mit einer Konzentration von 5 und 10  $\mu\text{mol}$  appliziert. Als Lösungsvermittler diente DMSO in einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{mol}$ .

## Versuchreihe 4

In der vierten Versuchsreihe (n=20) wurde die Wirkung des NMDA-Rezeptorantagonisten APV und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX untersucht. Diese beiden Substanzen wurden in einer vierphasigen Versuchsanordnung getestet. Dabei wurde nach der 30-minütigen Vorlaufphase zuerst das APV in einer Konzentration von 50µmol für 20 Minuten appliziert. Danach wurde das APV(50µmolar) zusammen mit dem CNQX(10µmolar) abermals für 20 Minuten appliziert. Auch hier wurde wieder das DMSO in einer Konzentration von 0,1µmol als Lösungsvermittler eingesetzt. An die Applikationsphase gliederte sich die Auswaschphase an, die in diesem Versuchprotokoll eine Dauer von 60 Minuten einnahm.

Versuchsprotokoll	Phase 1 Vorlauf	Phase 2 Applikation	Phase 3 Auswaschen
Durchschnittliche Dauer in Minuten	30	30	30
Lösungen und Substanzen	Inkubationslösung Lsg. 2 in Tab.1	Inkubationslösung Lsg. 2 in Tab.1	Inkubationslösung Lsg. 2 in Tab.1

Tab.2 Versuchsreihe 1

Versuchsprotokoll	Phase 1 Vorlauf	Phase 2 Applikation
Durchschnittliche Dauer in Minuten	30	30
Lösungen und Substanzen	Inkubationslösung Lsg. 2 in Tab.1	Inkubationslösung +DMSO Lsg. 3 in Tab.1

Tab.3 Versuchsreihe 2

Versuchsprotokoll	Phase 1 Vorlauf	Phase 2 Applikation
Durchschnittliche Dauer in Minuten	30	30
Lösungen und Substanzen	Inkubationslösung Lsg. 2 in Tab.1	Inkubationslösung +WIN Lsg. 4 in Tab. 1

Tab.4 Versuchsreihe 3

Versuchsprotokoll	Phase 1 Vorlauf	Phase 2 Applikation	Phase 3 Applikation	Phase 4 Auswaschen
Durchschnittliche Dauer in Minuten	30	20	20	60
Lösungen und Substanzen	Inkubationslösung Lsg. 2 in Tab.1	Inkubationslösung + APV Lsg. 5 in Tab. 1	Inkubationslösung + APV&CNQX Lsg. 6 in Tab. 1	Inkubationslösung Lsg. 2 in Tab.1

Tab.5 Versuchsreihe 4

## 2.8 Auswertung

Zur Quantifizierung der optischen Signale wurde das Programm Neuroplex, Red Shirt Imaging, USA benutzt. Zur Messung der Amplituden wurden zunächst sechs Dioden zu jeder der nach Rexed eingeteilten Laminae I-IV ausgewählt und deren Werte gemittelt. Dann wurde ein definierter Zeitraum (50 Punkte=65ms) vor der Reizung gemittelt und als Nulllinie gesetzt. Ausgehend von dieser Nulllinie wurden die maximalen Amplituden des Peaks, dem Punkt der größten Deflektion nach der Reizung, der ersten 25ms nach der Reizung sowie die Amplitude des 500ms-Zeitpunktes nach der Reizung gemessen. Wie bereits erläutert, müssen diese Amplituden als relative Größen (relative Veränderung der Fluoreszenz) angesehen werden, da diese Werte als die Abnahme der Fluoreszenz in Relation zur Restlichtintensität definiert sind. Diese Amplituden wurden als normierte Werte in den Diagrammen zur Darstellung der reizkorrelierten Signale wiedergegeben. Zur Normierung der Werte wurde jeweils der Quotient aus dem Wert des  $t=0$ min Zeitpunktes und den darauf folgenden Zeitpunkten gebildet. Dabei stellen

die in den Diagrammen wiedergegebenen Werte jeweils den Mittelwert jeder Versuchsreihe zu dem definierten Zeitpunkt und den dazugehörigen SEM (Standardfehler des Mittelwertes) als Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert dar. Zur Testung der Signifikanz wurde bei einem Vergleich von zwei Werten der t-Test verwendet. Wurden vier Werte eines Zeitpunktes miteinander verglichen, wurde der One-Way-ANOVA benutzt. Als Signifikanzniveau für einen statistisch signifikanten Unterschied wurde  $p < 0,05$  festgelegt.

Zur Darstellung der Signale in der räumlichen und zeitlichen Ausdehnung im Zellverband wurde die Falschfarbencodierung des Diodenfeldes herangezogen. Die Farbcodierung wurde dabei an der die Laminae I-IV nach Rexed erfassenden zentralen Diode des Diodenfeldes vorgenommen und für die unterschiedlichen Reizintensitäten (2mA und 1mA) individuell durchgeführt. Hierbei geben die drei Diodenfelder den Zustand vor der Reizung sowie 25ms und 500ms nach der Reizung wieder. Mittels dieses Verfahrens kann die Erregungsausbreitung erstens über einem definierten Rückenmarksareal und zweitens zu einem definierten Zeitpunkt ermittelt und analysiert werden.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Wirkung von DMSO (0,1 $\mu$ mol) auf evozierte Aktivität der einzelnen Schichten des Rückenmarks nach Rexed bei Ratten mit künstlich erzeugter Entzündung und Ratten ohne künstlich erzeugter Entzündung

In einer ersten Reihe von Experimenten wurden die Effekte des Lösungsvermittlers DMSO (0,1 $\mu$ mol) auf die evozierte Aktivität der oberflächlichen Schichten des Rückenmarks untersucht. Das Diodenfeld wurde zur Detektion der bioelektrischen Signale über den Schichten I-V nach Rexed ausgerichtet. Die Signale wurden durch eine Reizung der Eintrittszone Hinterhornwurzel mit 50% Reizintensität (1mA) und 100% Reizintensität (2mA) erzeugt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

Bei Reizung der Eintrittszone der Hinterhornwurzel ergaben sich dabei die größten Amplituden der Fluoreszenzsignale in den oberflächlichen Schichten der Lamina I/II nach Rexed. In den tieferen Schichten des Rückenmarks konnte eine stetige Abnahme der Amplituden beobachtet werden. Diese korrelierte mit den Ergebnissen der Kontrollversuche. Im zeitlichen Verlauf der Versuche zeigte sich zudem eine stetige Abnahme der Amplituden der Fluoreszenzsignale, die auch bei den Kontrollversuchen vorgefunden wurde und dem physiologischen „rundown“ des Gewebeschnittes entspricht.

Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina I nach Rexed mit einer Reizintensität von 50% (1mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Lösungsvermittlers DMSO herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina III nach Rexed mit einer Reizintensität von 50% (1mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude

der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Lösungsvermittlers DMSO herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina IV nach Rexed mit einer Reizintensität von 50% (1mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Lösungsvermittlers DMSO herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Auch bei der Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung nach durch Einzelreiz ausgelöster bioelektrischer Aktivität mit einer Reizintensität von 50% (1mA) wurde kein Unterschied, wie eine Intensitätsverminderung des Reizeffektes zwischen den behandelten Gruppen sichtbar. Die Reduktion in der räumlich-zeitlichen Ausdehnung der Erregung nach Applikation des Lösungsvermittlers DMSO zeigte keinen Unterschied zu der Kontrolllösung. Es ließ sich zudem kein Unterschied in den Erregungsmustern der Tiere mit künstlich erzeugter Entzündung und den Tieren ohne Entzündung erkennen. Auch bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina I nach Rexed mit einer Reizintensität von 100% (2mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Lösungsvermittlers DMSO herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina III nach

Rexed mit einer Reizintensität von 100% (2mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Lösungsvermittlers DMSO herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina IV nach Rexed mit einer Reizintensität von 100% (2mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Lösungsvermittlers DMSO herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Auch bei der Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung nach durch Einzelreiz ausgelöster bioelektrischer Aktivität mit einer Reizintensität von 100% (2mA) wurde kein Unterschied, wie eine Intensitätsverminderung des Reizeffektes zwischen den behandelten Gruppen sichtbar. Die Reduktion in der räumlich-zeitlichen Ausdehnung der Erregung nach Applikation des Lösungsvermittlers DMSO zeigte keinen Unterschied zu der Kontrolllösung. Es ließ sich zudem kein Unterschied in den Erregungsmustern der Tiere mit künstlich erzeugter Entzündung und den Tieren ohne Entzündung erkennen.

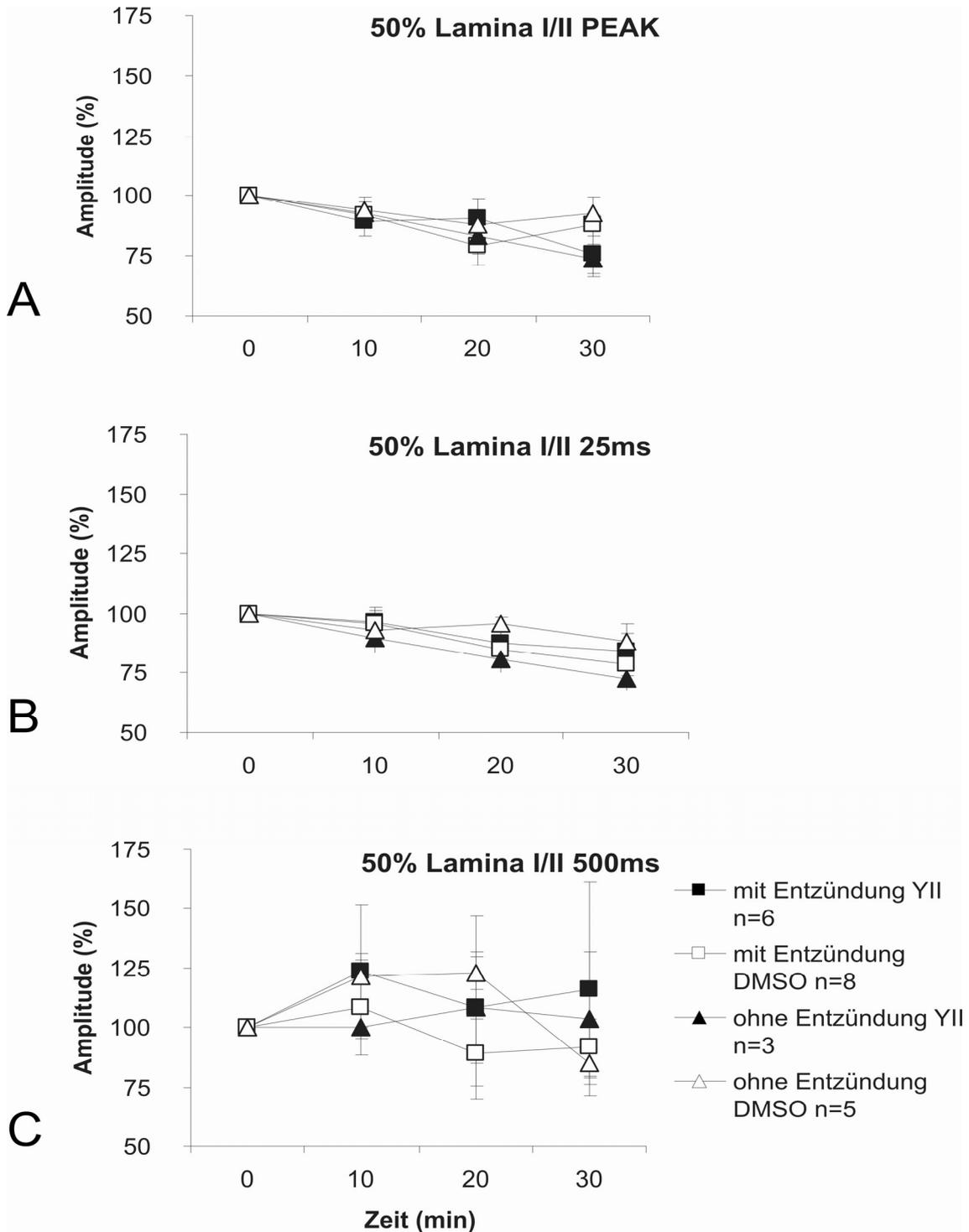


Abb. 3.1: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 50% (1mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Ausgangszeitpunkt der Vorlaufphase (siehe Versuchsprotokoll), sowie  $t=10\text{min}$ ,  $t=20\text{min}$  und  $t=30\text{min}$  als Zeitpunkte während der Applikation von DMSO (Lsg.Nr.4 in Tab.1) in die Badlösung,  $n$ =Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

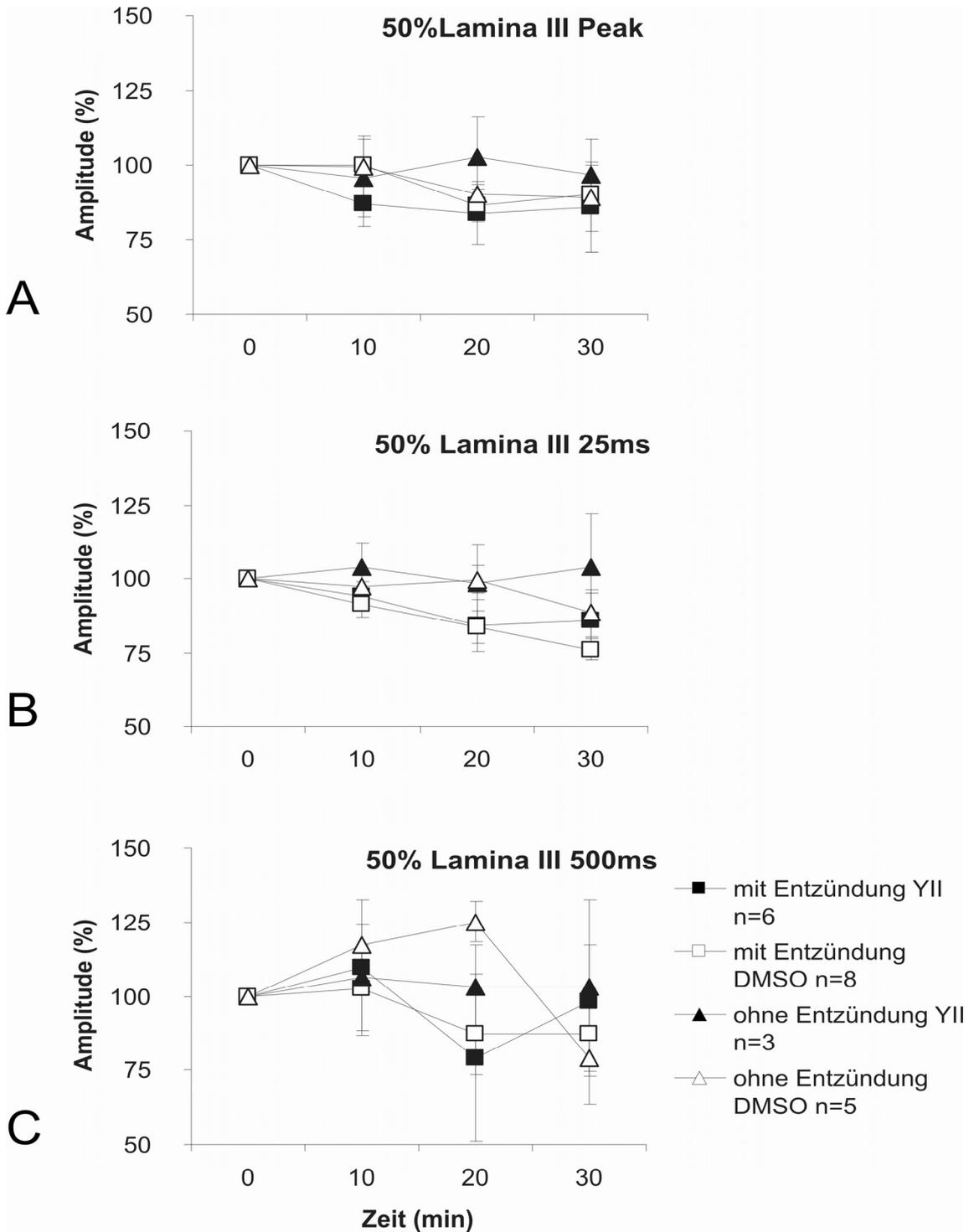


Abb. 3.2: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 50% (1mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Ausgangszeitpunkt der Vorlaufphase (siehe Versuchsprotokoll), sowie  $t=10\text{min}$ ,  $t=20\text{min}$  und  $t=30\text{min}$  als Zeitpunkte während der Applikation von DMSO (Lsg.Nr.4 in Tab.1) in die Badlösung,  $n$ =Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

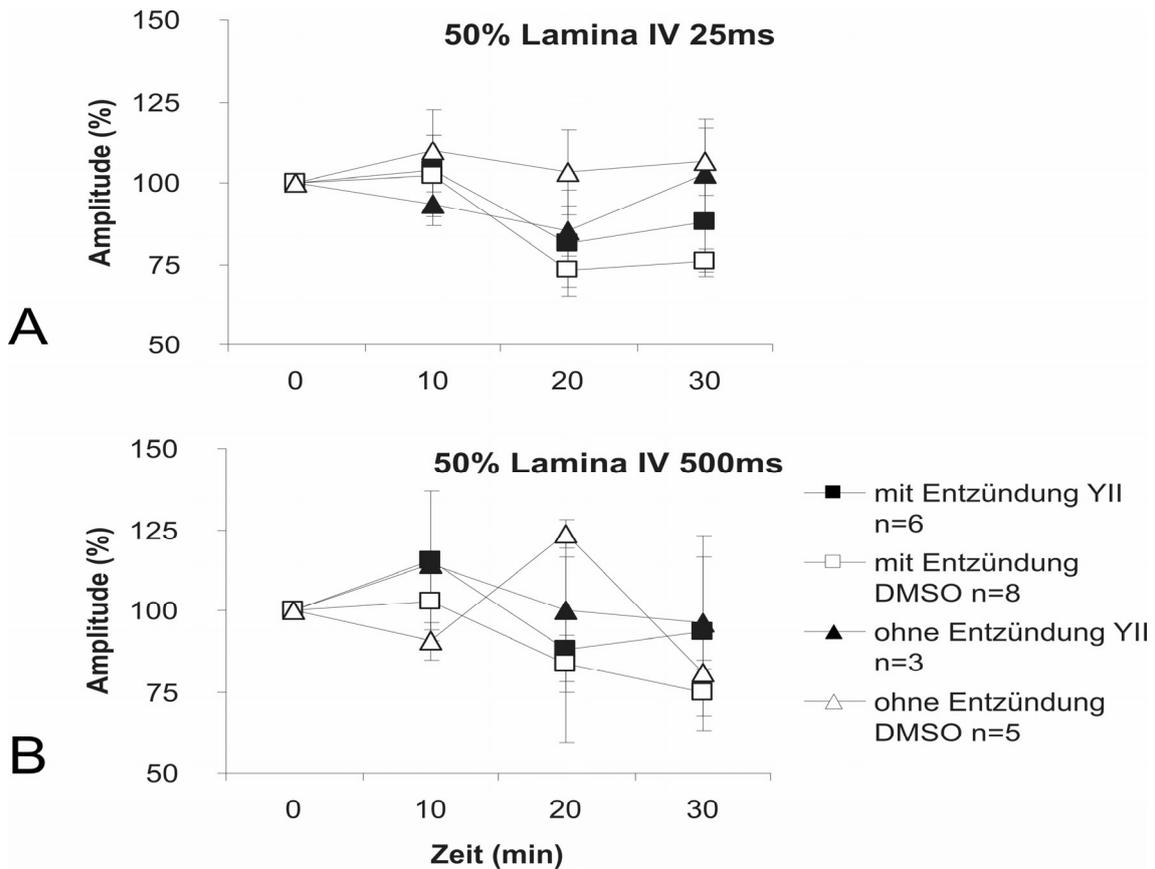


Abb. 3.3: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 50% (1mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Ausgangszeitpunkt der Vorlaufphase (siehe Versuchsprotokoll), sowie  $t=10\text{min}$ ,  $t=20\text{min}$  und  $t=30\text{min}$  als Zeitpunkte während der Applikation von DMSO (Lsg.Nr.4 in Tab.1) in die Badlösung,  $n$ =Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

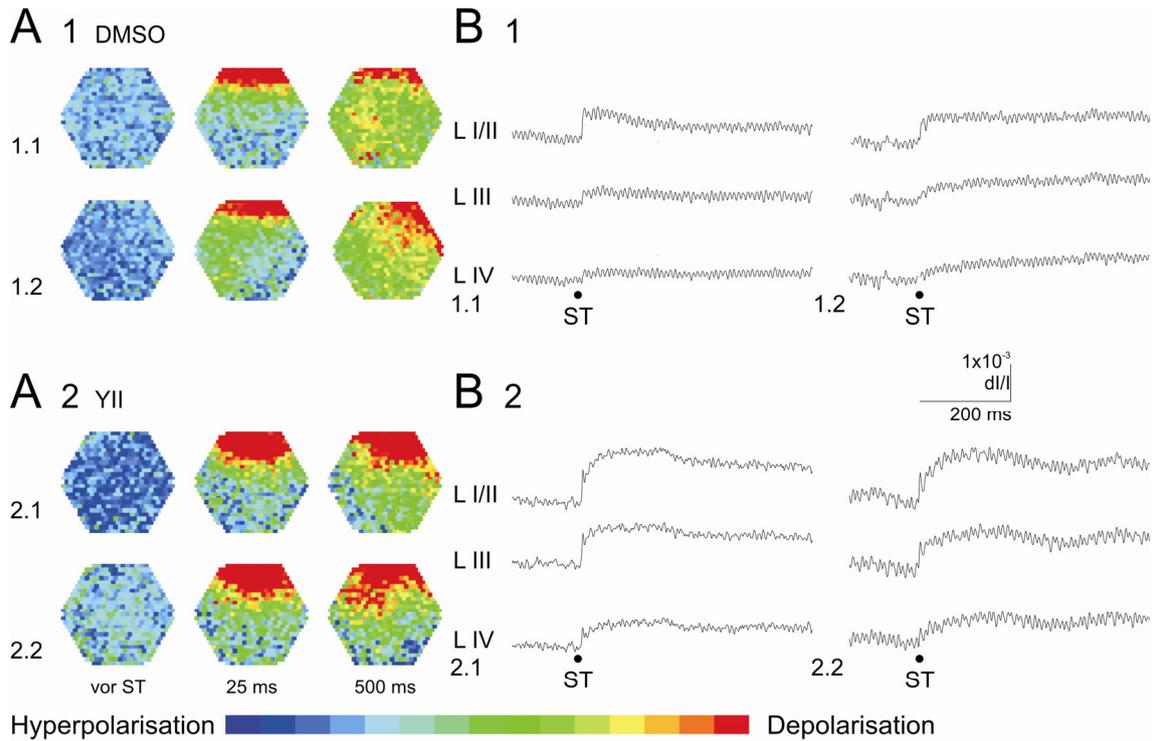


Abb. 3.4: Wirkung von DMSO (Lsg. Nr. 4 in Tab. 2.1) auf durch einen Einzelreiz (Reizintensität 50%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer nicht entzündeten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit nach Yamamoto (Lsg. Nr. 2 in Tab. 2.1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungsensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-2 und A2.1-2 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarkareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von DMSO, A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten.
- B: B1.1-2 und B2.1-2 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von DMSO, B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten.

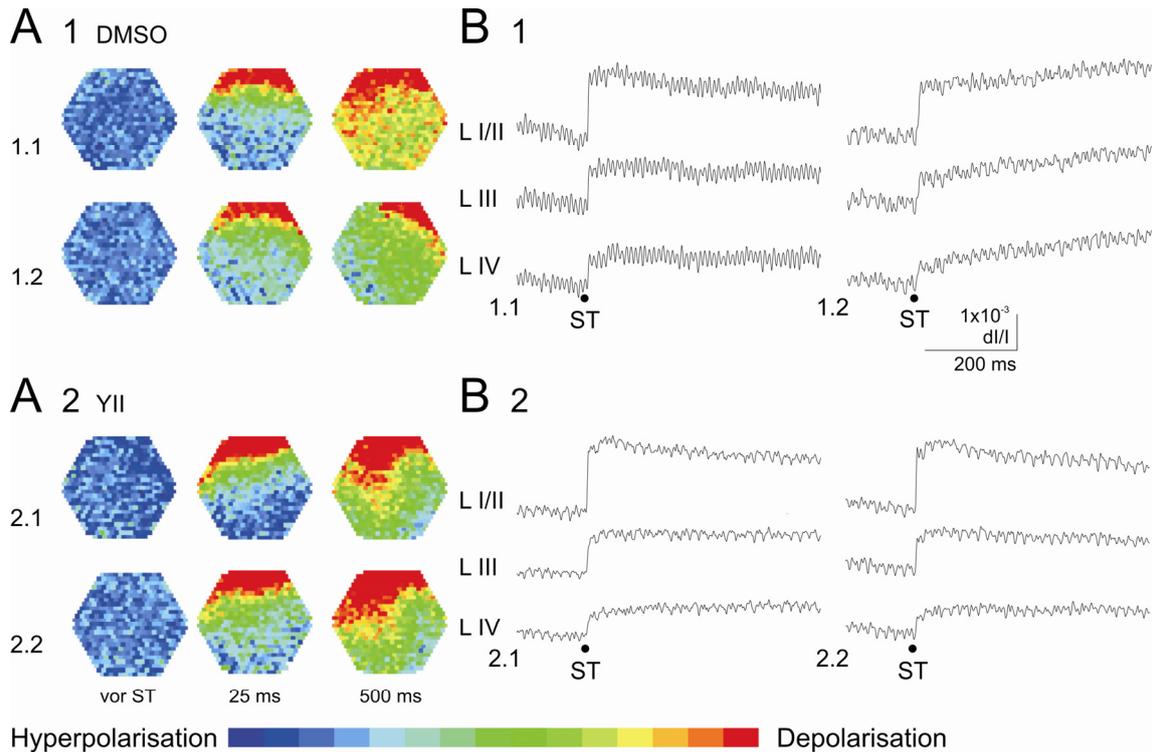


Abb. 3.5: Wirkung von DMSO ( $0,1 \mu\text{mol}$ , Lsg. Nr. 4 in Tab. 2.1) auf durch einen Einzelreiz (Reizintensität 50%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer entzündeten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit artifizierlicher Cerebrospinalflüssigkeit nach Yamamoto (Lsg. Nr. 2 in Tab. 2.1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungssensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-2 und A2.1-2 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarkareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von DMSO, A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten.
- B: B1.1-2 und B2.1-2 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von DMSO, B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten.

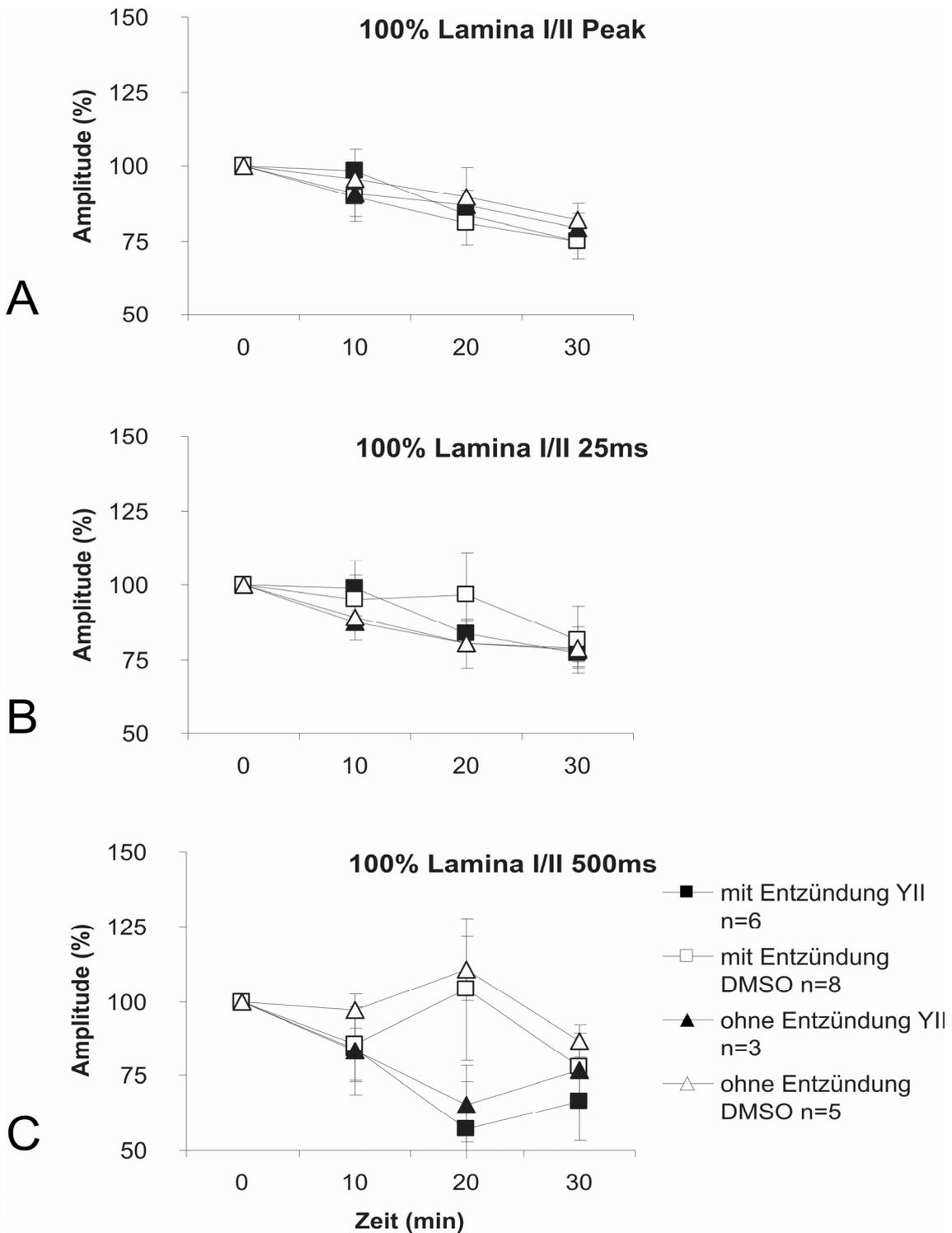


Abb. 3.6: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 100% (2mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Ausgangszeitpunkt der Vorlaufphase, sowie  $t=10\text{min}$ ,  $t=20\text{min}$  und  $t=30\text{min}$  als Zeitpunkte während der Applikation von DMSO (Lsg. Nr. 4 in Tab.1) in die Badlösung,  $n$ =Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

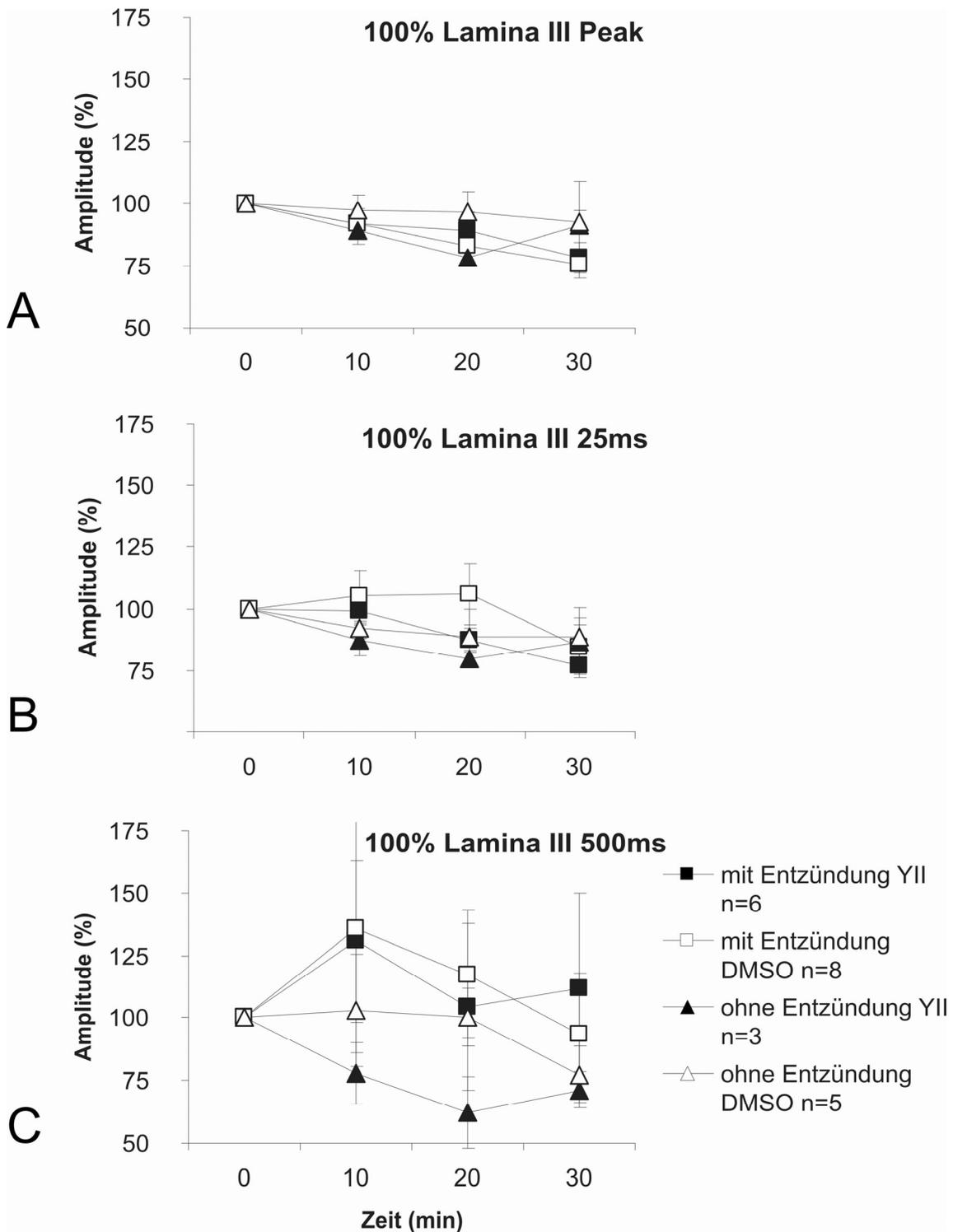


Abb. 3.7: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 100% (2mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert +/- SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind t=0, als Ausgangszeitpunkt der Vorlaufphase, sowie t=10min, t=20min und t=30min als Zeitpunkte während der Applikation von DMSO (Lsg. Nr. 4 in Tab. 1) in die Badlösung, n=Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 25 ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 500 ms nach Reizung darstellen.

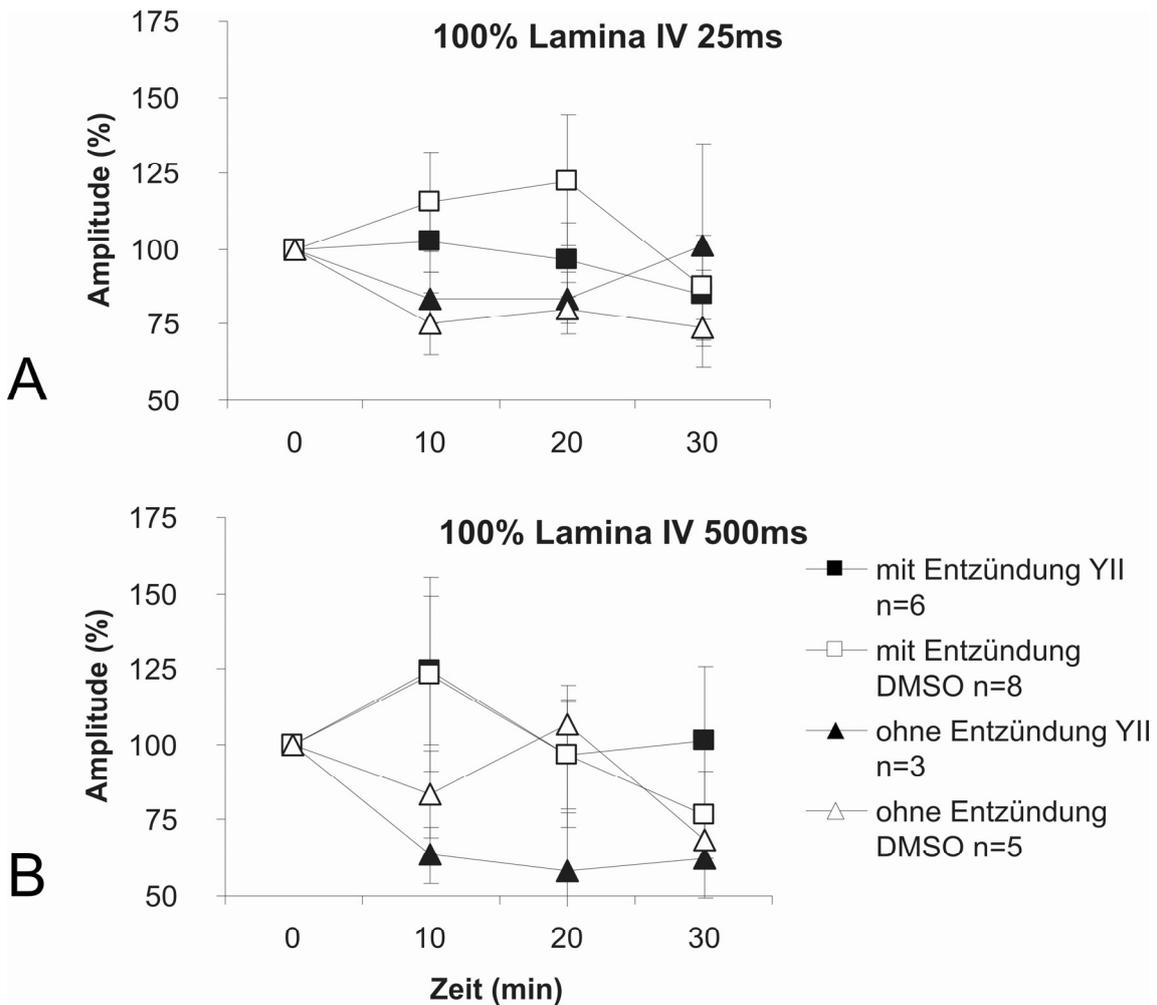


Abb. 3.8 Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 100% (2mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind t=0, als Ausgangszeitpunkt der Vorlaufphase, sowie t=10min, t=20min und t=30min als Zeitpunkte während der Applikation von DMSO (Lsg. Nr. 4 in Tab. 1) in die Badlösung, n=Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

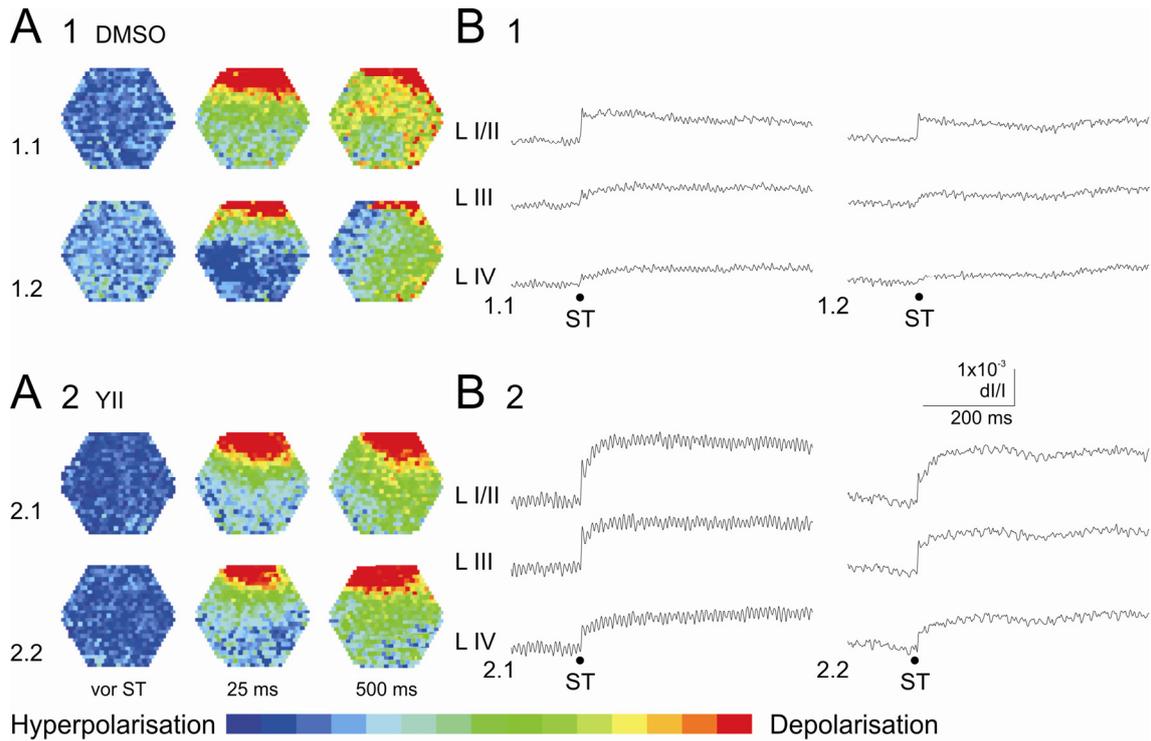


Abb. 3.9: Wirkung von DMSO (0,1 $\mu$ mol, Lsg. Nr. 4 in Tab. 2.1) auf durch einen Einzelreiz (Reizintensität 100%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer nicht entzündeten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit artifizierter Cerebrospinalflüssigkeit nach Yamamoto (Lsg. Nr. 2 in Tab. 2.1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungssensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-2 und A2.1-2 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarksareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von DMSO, A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten.
- B: B1.1-2 und B2.1-2 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von DMSO, B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten.

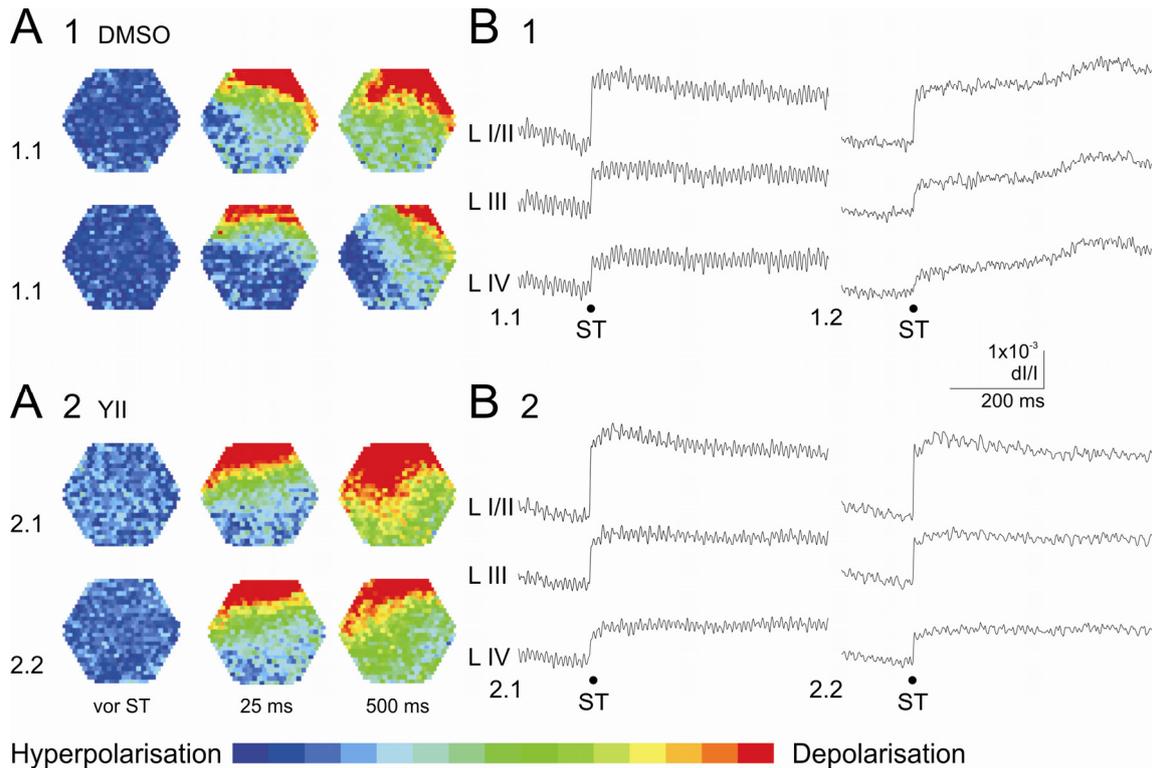


Abb. 3.10: Wirkung von DMSO (0,1 $\mu$ mol, Lsg. Nr. 4 in Tab. 2.1) auf durch einen Einzelreiz(Reizintensität 100%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer entzündeten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit artifizieller Cerebrospinalflüssigkeit nach Yamamoto (Lsg. Nr. 2 in Tab. 2.1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungssensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-2 und A2.1-2 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarksareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von DMSO, A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten.
- B: B1.1-2 und B2.1-2 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von DMSO, B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten.

### **3.2 Wirkung von WIN55,212-2 (10µmol) auf evozierte Aktivität der einzelnen Schichten des Rückenmarks nach Rexed bei Ratten mit künstlich erzeugter Entzündung und Ratten ohne künstlich erzeugter Entzündung**

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurden die Effekte des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 auf die evozierte Aktivität der oberflächlichen Schichten des Rückenmarks untersucht. Das Diodenfeld wurde zur Detektion der bioelektrischen Signale über den Schichten I-V nach Rexed ausgerichtet. Die Signale wurden durch eine Reizung der Hinterhornwurzel mit 50% Reizintensität (1mA) und 100% Reizintensität (2mA) erzeugt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

Bei einer Reizung der Eintrittszone der Hinterhornwurzel ergaben sich dabei die größten Amplituden der Fluoreszenzsignale in den oberflächlichen Schichten der Lamina I/II nach Rexed. In den tieferen Schichten des Rückenmarks konnte eine stetige Abnahme der Amplituden beobachtet werden. Diese korrelierte mit den Ergebnissen der Kontrollversuche. Im zeitlichen Verlauf der Versuche zeigte sich zudem eine stetige Abnahme der Amplituden der Fluoreszenzsignale, die auch bei den Kontrollversuchen vorgefunden wurde und dem physiologischen „rundown“ des Gewebeschnittes entspricht.

Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina I nach Rexed mit einer Reizintensität von 50% (1mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina III nach Rexed mit einer Reizintensität von 50% (1mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 herausstellen lassen.

Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina IV nach Rexed mit einer Reizintensität von 50% (1mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Auch bei der Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung nach durch Einzelreiz ausgelöster bioelektrischer Aktivität mit einer Reizintensität von 50% (1mA) wurde kein Unterschied, wie eine Intensitätsverminderung des Reizeffektes zwischen den behandelten Gruppen sichtbar. Die Reduktion in der räumlich-zeitlichen Ausdehnung der Erregung nach Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 zeigte keinen Unterschied zu der Kontrolllösung. Es ließ sich zudem kein Unterschied in den Erregungsmustern der Tiere mit künstlich erzeugter Entzündung und den Tieren ohne Entzündung erkennen. Auch bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina I nach Rexed mit einer Reizintensität von 100% (2mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina III nach Rexed mit einer Reizintensität von 100% (2mA) konnte sich kein

signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina IV nach Rexed mit einer Reizintensität von 100% (2mA) konnte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 herausstellen lassen. Weder in der Anfangsphase des Experiments noch zu einem der abgebildeten Zeitpunkte konnte eine Signifikanz bei dem Vergleich der Amplituden der einzelnen Versuchreihen gemessen werden. Zudem konnte kein Unterschied zwischen den Amplituden der Fluoreszenzsignale der Tiere mit einer künstlich erzeugten Entzündung und den Tieren ohne künstlich erzeugter Entzündung gezeigt werden. Auch bei der Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung nach durch Einzelreiz ausgelöster bioelektrischer Aktivität mit einer Reizintensität von 100% (2mA) wurde kein Unterschied, wie eine Intensitätsverminderung des Reizeffektes zwischen den behandelten Gruppen sichtbar. Die Reduktion in der räumlich-zeitlichen Ausdehnung der Erregung nach Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 zeigte keinen Unterschied zu der Kontrolllösung. Es ließ sich zudem kein Unterschied in den Erregungsmustern der Tiere mit künstlich erzeugter Entzündung und den Tieren ohne Entzündung erkennen.

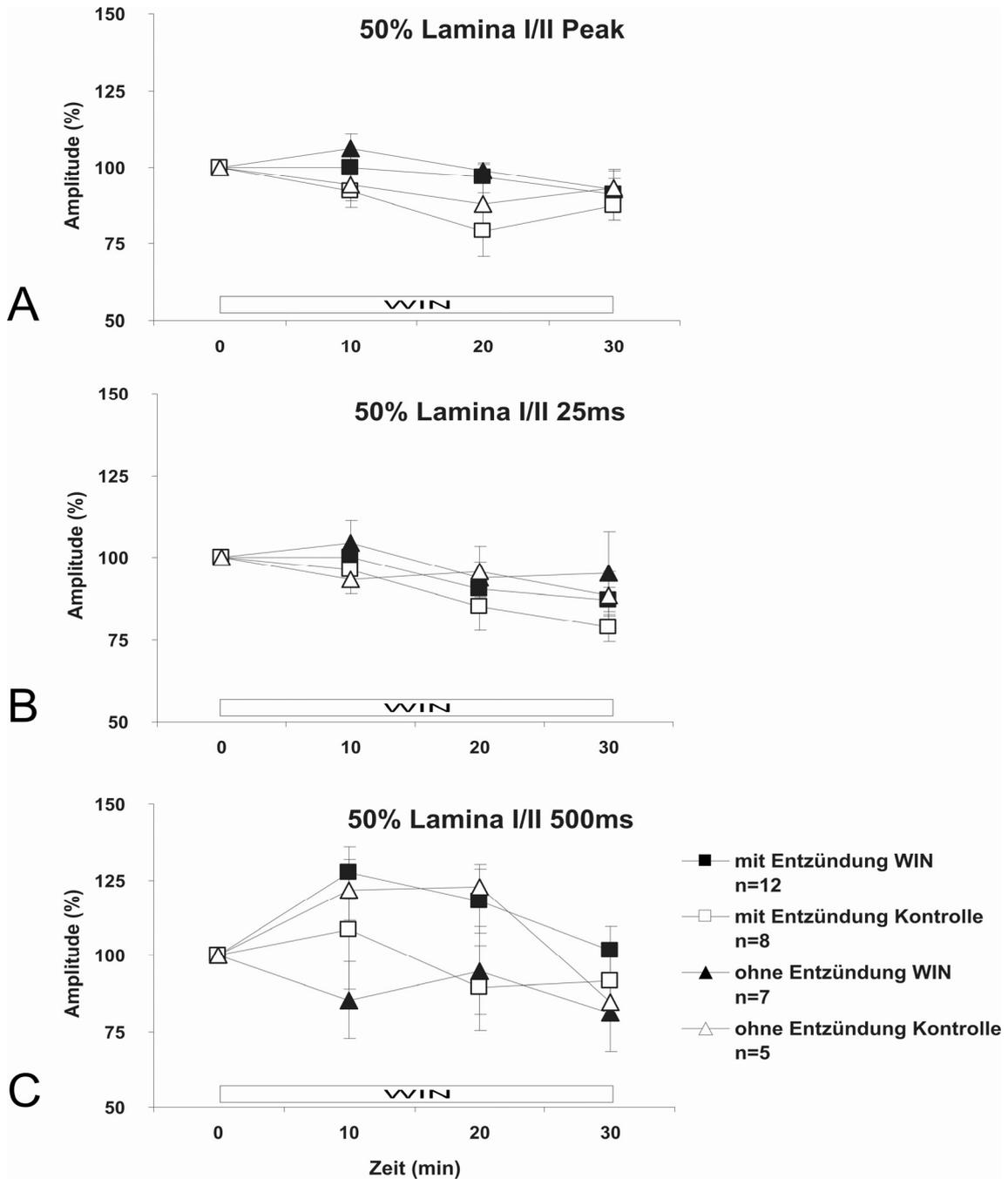


Abb. 3.11: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 50% (1mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert +/- SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind t=0, als Zeitpunkt vor der Applikation von WIN55,212-2, sowie t=10min, t=20min und t=30min als Zeitpunkte während der Applikation von WIN55,212-2 in die Badlösung, n=Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 500 ms nach Reizung darstellen.

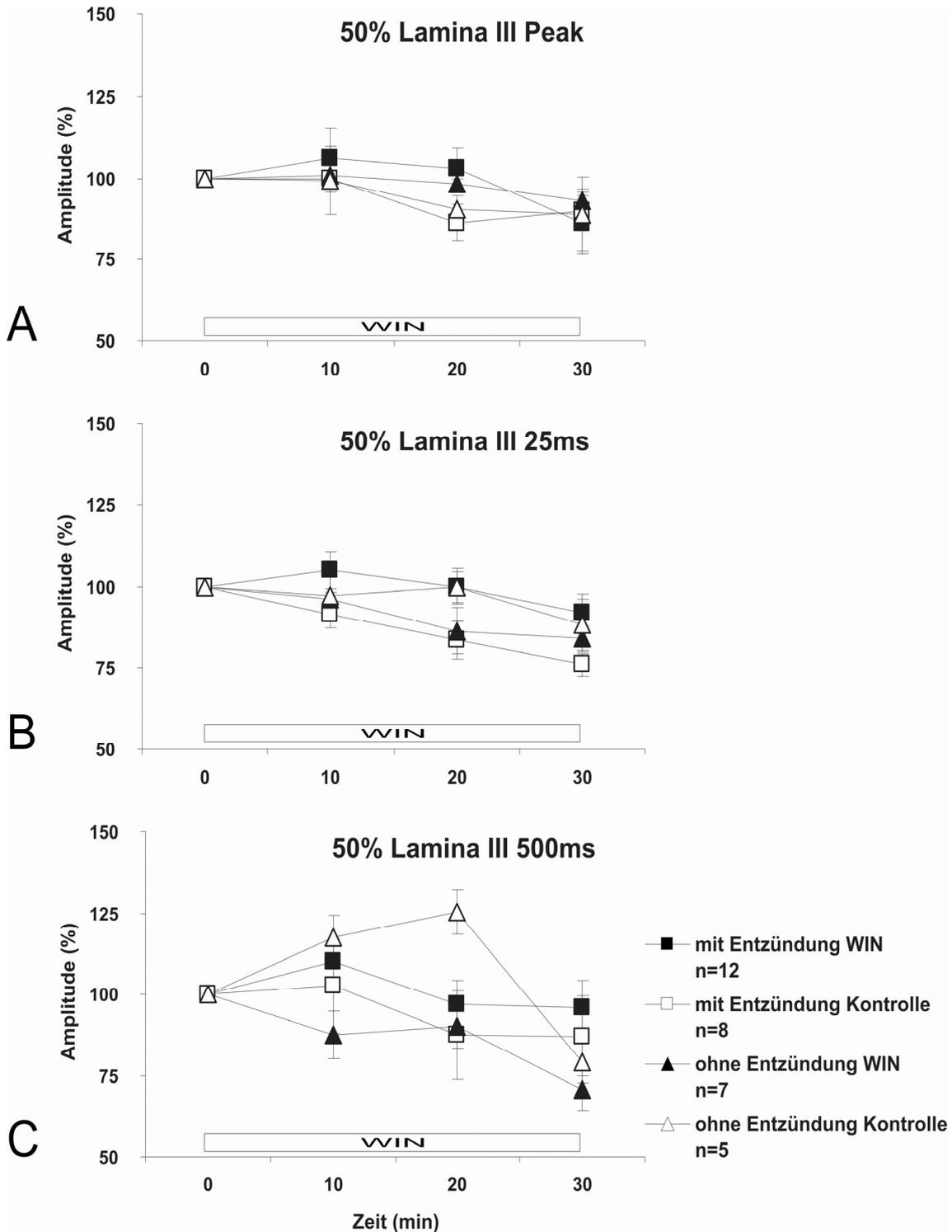


Abb. 3.12: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 50% (1mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert +/- SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind t=0, als Zeitpunkt vor der Applikation von WIN55,212-2, sowie t=10min, t=20min und t=30min als Zeitpunkte während der Applikation von WIN55,212-2 in die Badlösung, n=Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

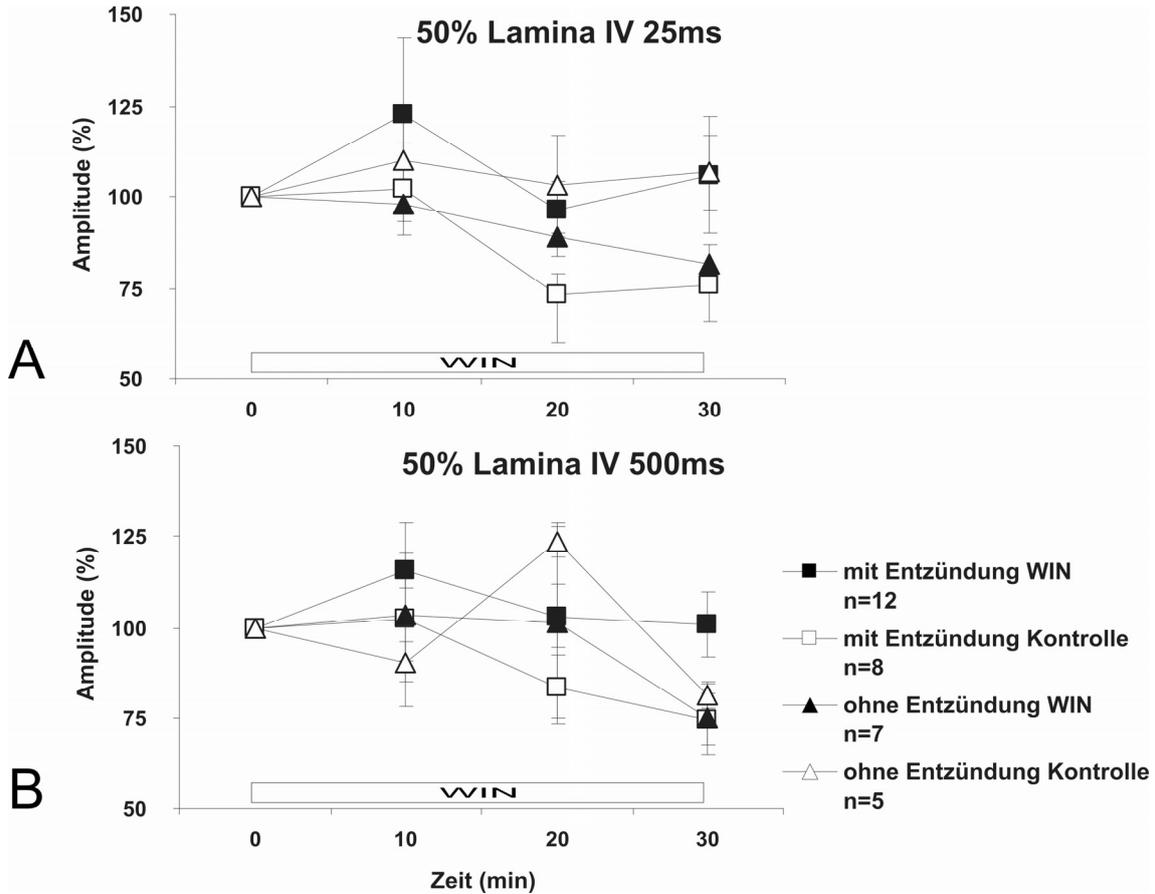


Abb. 3.13: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 50% (1mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind t=0, als Zeitpunkt vor der Applikation von WIN55,212-2, sowie t=10min, t=20min und t=30min als Zeitpunkte während der Applikation von WIN55,212-2 in die Badlösung, n=Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

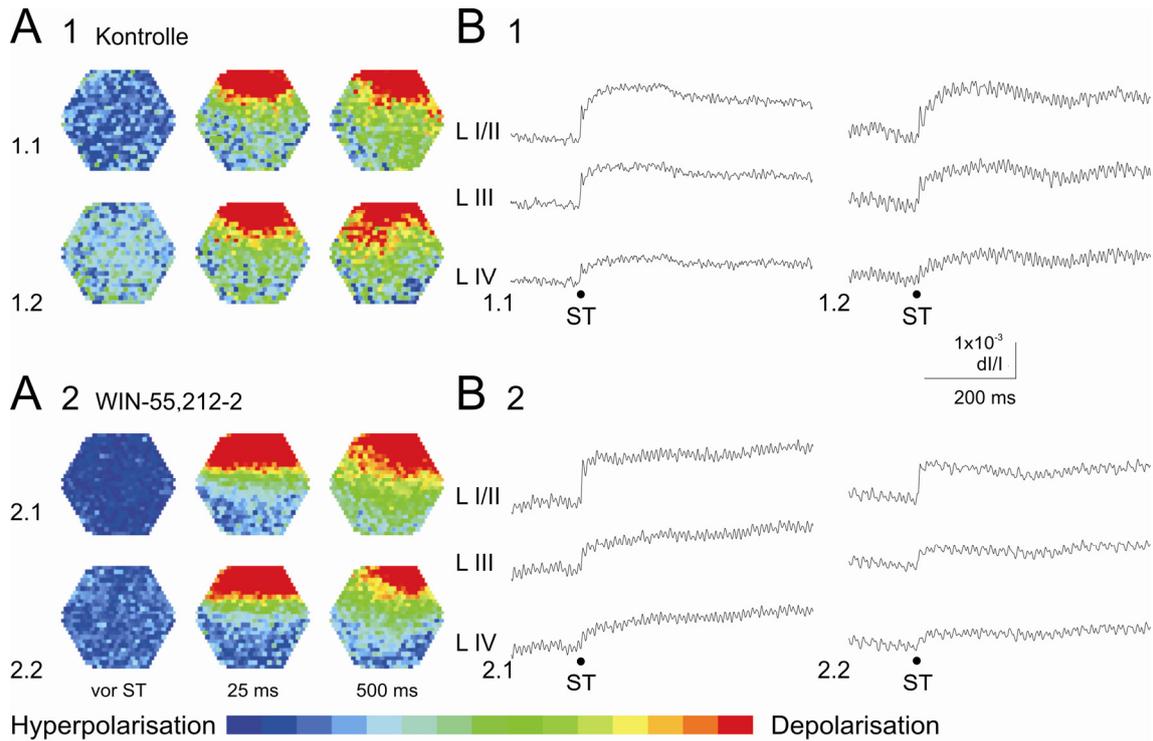
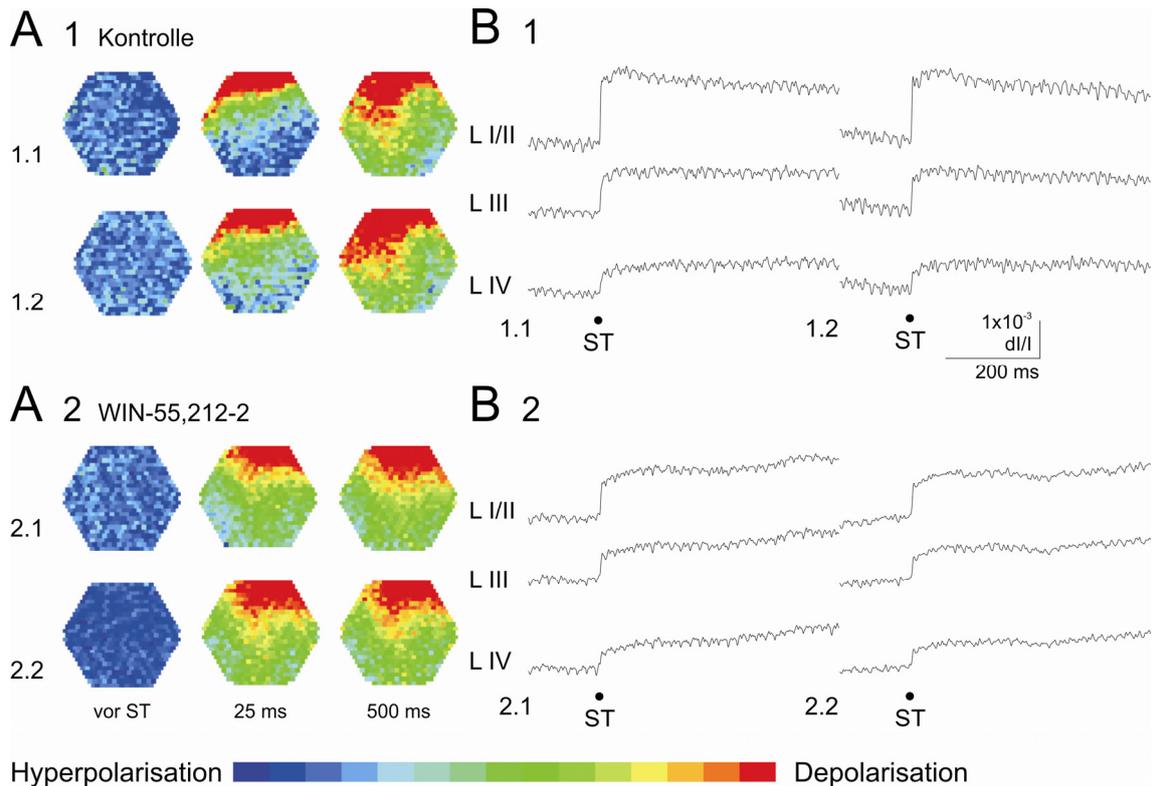


Abb. 3.14: Wirkung von WIN55,212-2 ( $10 \mu\text{mol}$ , Lsg. Nr. 5 in Tab. 2.1) auf durch einen Einzelreiz (Reizintensität 50%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer nicht inflammierten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit Kontrolllösung (Lsg. Nr. 2 in Tab. 2.1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungssensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-2 und A2.1-2 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarksareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von WIN55,212-2.
- B: B1.1-2 und B2.1-2 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von WIN55,212-2.



Hyperpolarisation  Depolarisation

Abb. 3.15: Wirkung von WIN55,212-2 (10  $\mu\text{mol}$ , Lsg. Nr. 5 in Tab. 2.1) auf durch einen Einzelreiz (Reizintensität 50%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer inflammierten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit Kontrolllösung (Lsg. Nr. 2 in Tab. 2.1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungssensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-2 und B2.1-2 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarksareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von WIN55,212-2.
- B: B1.1-2 und B2.1-2 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von WIN55,212-2.

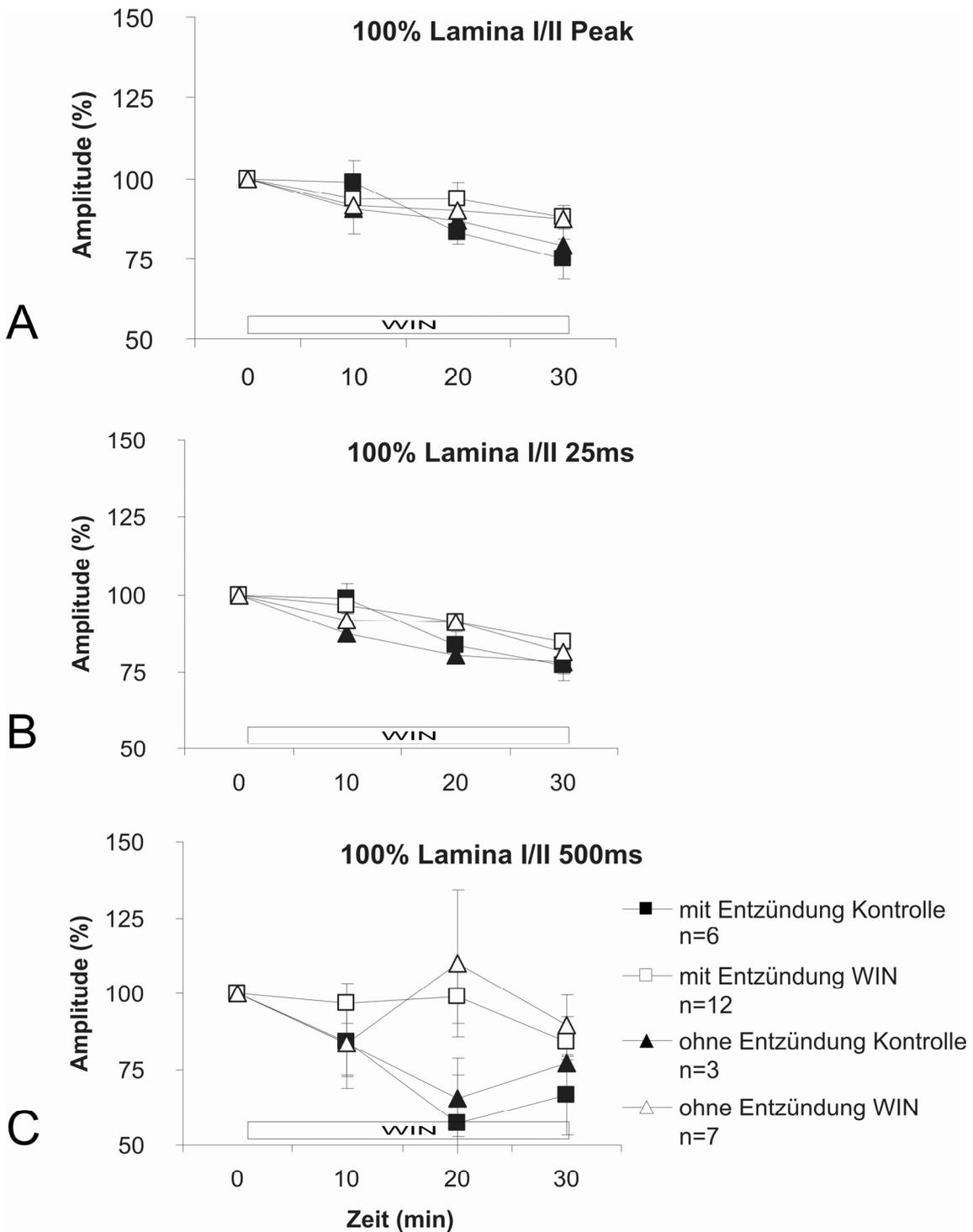


Abb.3.16: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 100% (2mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert +/- SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind t=0, als Zeitpunkt vor der Applikation von WIN55,212-2, sowie t=10min, t=20min und t=30min als Zeitpunkte während der Applikation von WIN55,212-2 in die Badlösung, n=Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed die jeweils den Punkt 25 ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed die jeweils den Punkt 500 ms nach Reizung darstellen.

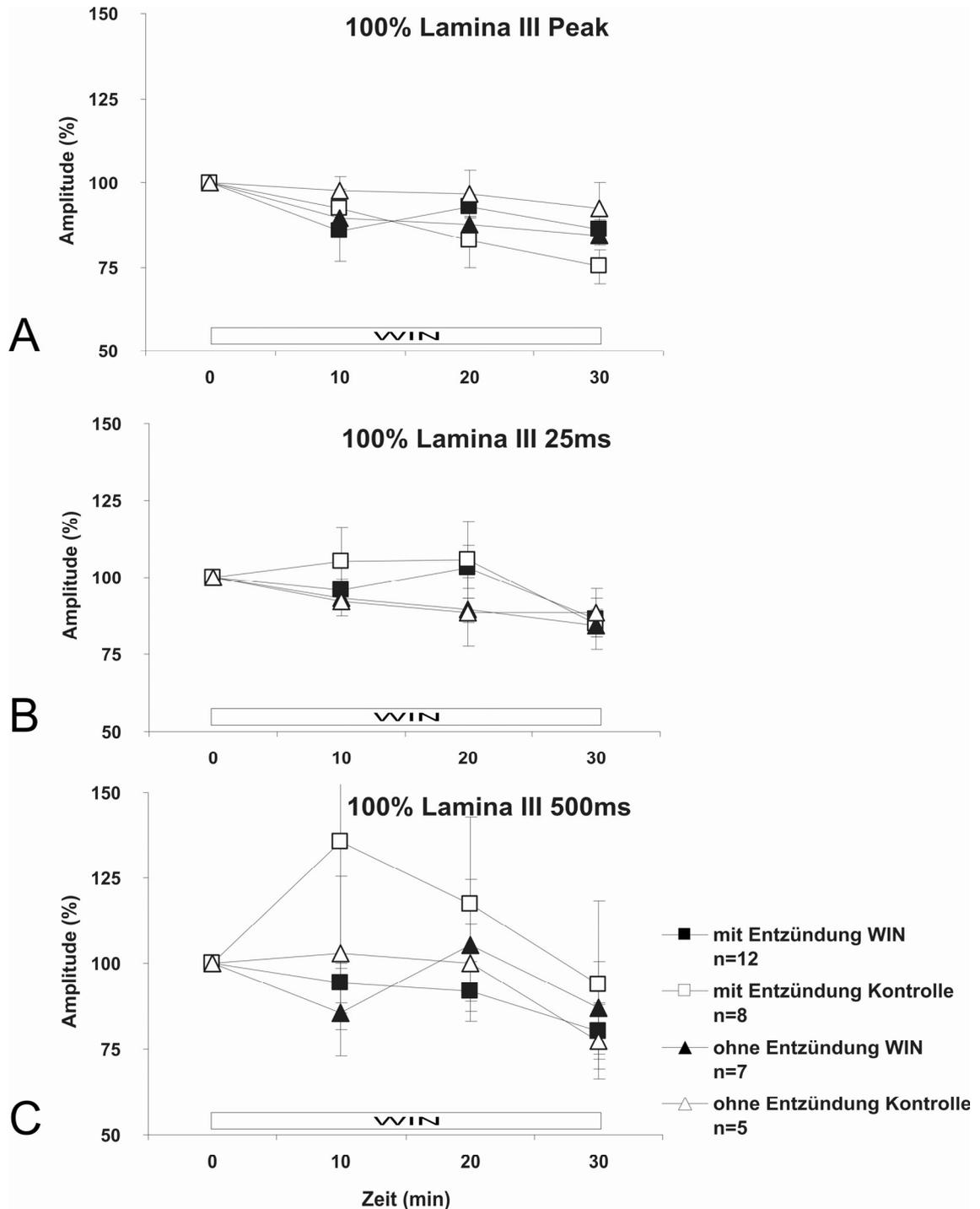


Abb. 3.17: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 100% (2mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Zeitpunkt vor der Applikation von WIN55,212-2, sowie  $t=10$ min,  $t=20$ min und  $t=30$ min als Zeitpunkte während der Applikation von WIN55,212-2 in die Badlösung,  $n$ =Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

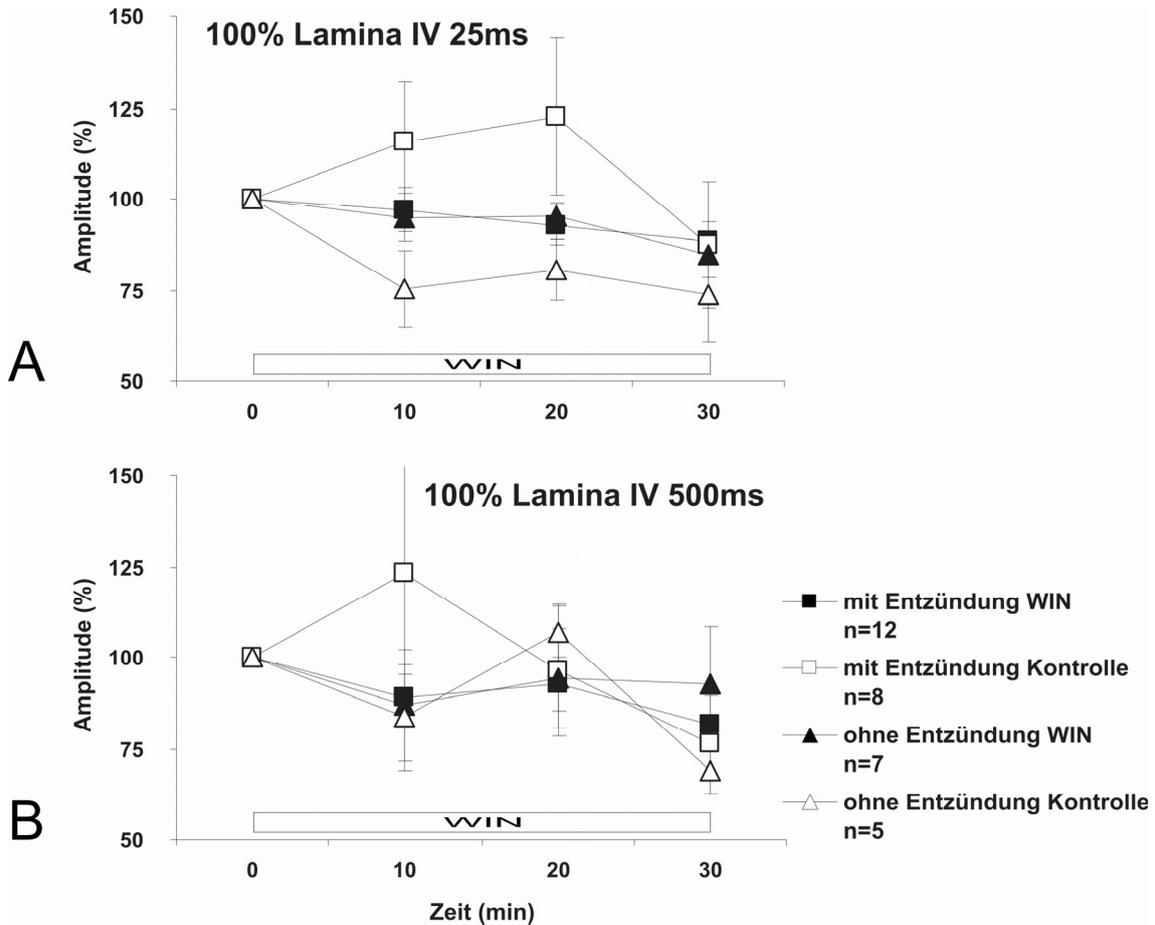


Abb. 3.18: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 100% (2mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Zeitpunkt vor der Applikation von WIN55,212-2, sowie  $t=10$ min,  $t=20$ min und  $t=30$ min als Zeitpunkte während der Applikation von WIN55,212-2 in die Badlösung,  $n$ =Versuchszahl.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

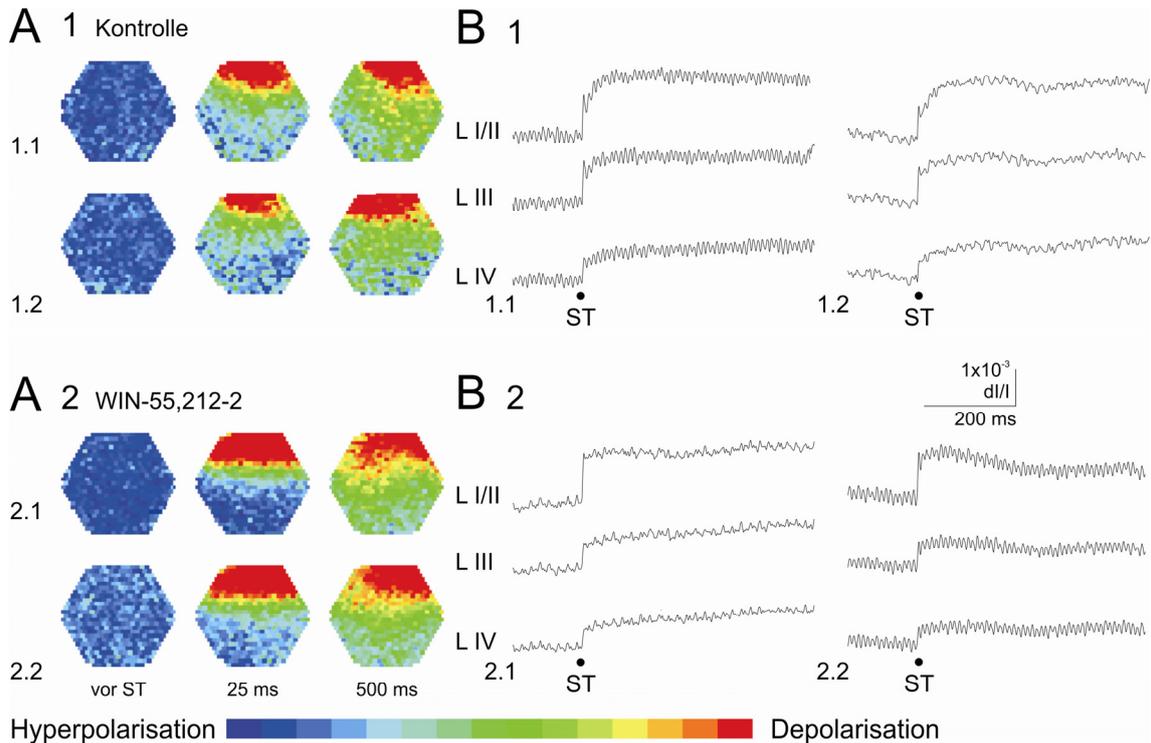
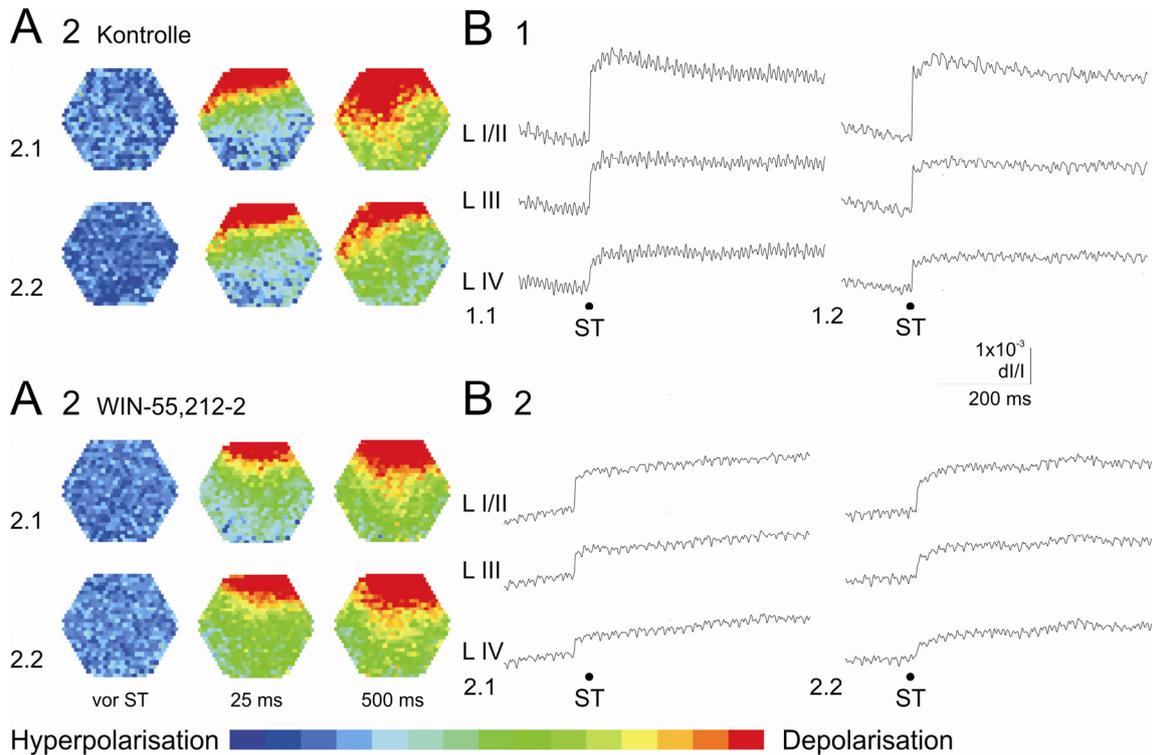


Abb. 3.19: Wirkung von WIN55,212-2 ( $10 \mu\text{mol}$ , Lsg. Nr.5 in Tab. 2.1) auf durch einen Einzelreiz (Reizintensität 100%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer nicht entzündeten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit Kontrolllösung (Lsg. Nr. 2 in Tab. 2.1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungssensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-2 und A2.1-2 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarksareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von WIN55,212-2.
- B: B1.1-2 und B2.1-2 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von WIN55,212-2.



Hyperpolarisation  Depolarisation

Abb. 3.20: Wirkung von WIN55,212-2 (10µmol, Lsg. Nr.5 in Tab. 2.1 )auf durch einen Einzelreiz (Reizintensität 100%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer inflammierten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit Kontrolllösung (Lsg. Nr. 2 in Tab.2.1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungssensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-2 und A2.1-2 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarksareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von WIN55,212-2.
- B: B1.1-2 und B2.1-2 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von WIN55,212-2.

### **3.3 Wirkung von APV(50µmol) und CNQX(10µmol) auf evozierte Aktivität der einzelnen Schichten des Rückenmarks nach Rexed bei Ratten mit künstlich erzeugter Entzündung**

In einer dritten Reihe von Experimenten wurden die Effekte des NMDA-Rezeptorantagonisten und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX auf die evozierte Aktivität der oberflächlichen Schichten des Rückenmarks untersucht. Das Diodenfeld wurde zur Detektion der bioelektrischen Signale über den Schichten I-V nach Rexed ausgerichtet. Die Signale wurden durch eine Reizung der Hinterhornwurzel mit 50% Reizintensität (1mA) und 100% Reizintensität (2mA) erzeugt. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  festgelegt.

Bei Reizung der Eintrittszone der Hinterhornwurzel ergaben sich dabei die größten Amplituden der Fluoreszenzsignale in den oberflächlichen Schichten der Lamina I/II nach Rexed. In den tieferen Schichten des Rückenmarks konnte eine stetige Abnahme der Amplituden beobachtet werden. Diese korrelierte mit den Ergebnissen der Kontrollversuche. Im zeitlichen Verlauf der Versuche zeigte sich nach Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten APV und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX eine starke Abnahme der Amplituden der Fluoreszenzsignale bis zu einer kompletten Auslöschung der Fluoreszenzsignale, die sich von dem physiologischen „rundown“ unterschied. In der Auswaschphase der Versuche stiegen die Amplituden wieder an und erreichten Werte, die mit den Amplituden der Kontrollgruppe übereinstimmten.

Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina I nach Rexed mit einer Reizintensität von 50% (1mA) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten APV und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX. Bei den Zeitpunkten  $t=40$  und  $t=50$  zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen, sowohl bei den Amplituden des Peaks (jeweils  $p < 0,001$ ) als auch bei den Amplituden zu den Zeitpunkten 25ms (jeweils  $p < 0,001$ ) und 500ms ( $p=0,049$  und  $p=0,001$ ) nach Reizung. Bei der Amplitude des Peaks zu dem Zeitpunkt  $t=100$  zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen ( $p=0,014$ ). Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina III nach Rexed mit einer Reizintensität von 50% (1mA) zeigten sich signifikante Unterschiede

zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten APV und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX. Bei den Zeitpunkten  $t=40$  und  $t=50$  zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen, sowohl bei den Amplituden des Peaks ( $p=0,001$  und  $p<0,001$ ) als auch bei der Amplituden zu dem Zeitpunkt 25ms (jeweils  $p<0,001$ ) nach Reizung. Bei der Amplitude des Zeitpunktes 500ms nach Reizung zeigte sich nur ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen zu dem Zeitpunkt  $t=50$  ( $p=0,002$ ). Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina IV nach Rexed mit einer Reizintensität von 50% (1mA) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten APV und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX. Bei dem Zeitpunkt  $t=50$  zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen bei den Amplituden zu den Zeitpunkten 25ms ( $p<0,001$ ) und 500ms ( $p=0,026$ ) nach Reizung. Bei der Amplitude des Zeitpunktes 500ms nach Reizung zeigte sich zudem zu dem Zeitpunkt  $t=40$  ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen ( $p=0,001$ ). Bei der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung nach durch Einzelreiz ausgelöster bioelektrischer Aktivität zeigt sich eine deutliche Intensitätsminderung des Reizeffektes nach Applikation der NMDA- und Non-NMDA-Rezeptorantagonisten zu dem Zeitpunkt  $t=50$  in allen Versuchen. Die Effekte der Rezeptorantagonisten waren in der Auswaschphase in allen Versuchen partiell reversibel.

Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina I nach Rexed mit einer Reizintensität von 100% (2mA) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten APV und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX. Bei dem Zeitpunkt  $t=40$  zeigt sich sowohl in der Amplitude des Peaks ( $p<0,001$ ) als auch bei den Amplituden zu den Zeitpunkten 25ms ( $p<0,001$ ) und 500ms ( $p=0,007$ ) nach Reizung ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen. Bei den Amplituden des Zeitpunktes 25ms nach Reizung zeigten sich zudem signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen zu den Zeitpunkten  $t=10$  ( $p=0,004$ ),  $t=30$  ( $p<0,001$ ) und  $t=50$  ( $p=0,01$ ). Bei der

statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina III nach Rexed mit einer Reizintensität von 100% (2mA) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten APV und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX. Bei den Zeitpunkten  $t=30$ ,  $t=40$  und  $t=50$  zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen sowohl bei den Amplituden des Peaks ( $p=0,014$ ,  $p<0,001$  und  $p=0,002$ ) als auch bei den Amplituden zu den Zeitpunkten 25ms (jeweils  $p<0,001$ ) und 500ms ( $p=0,046$ ,  $p=0,017$  und  $p=0,049$ ) nach Reizung. Zu den Zeitpunkten  $t=10$  und  $t=20$  zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen bei der Amplitude des Zeitpunktes 25ms ( $p=0,001$  und  $p=0,029$ ) nach Reizung. Bei der statistischen Überprüfung der bioelektrischen Signale aus der Lamina IV nach Rexed mit einer Reizintensität von 100% (2mA) zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Signalamplitude der Kontrolllösung und der Signalamplitude nach der Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten APV und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX. Bei den Amplituden des Zeitpunktes 25ms nach Reizung zeigte sich zu den Zeitpunkten  $t=10$  ( $p=0,032$ ) und  $t=50$  ( $p=0,023$ ) ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen. Zu den Zeitpunkten  $t=30$  ( $p=0,038$ ) und  $t=40$  ( $p=0,026$ ) zeigte sich bei den Amplituden des Zeitpunktes 500ms nach Reizung ein signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Gruppen. Bei der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung nach durch Einzelreiz ausgelöster bioelektrischer Aktivität zeigt sich eine deutliche Intensitätsminderung des Reizeffektes nach Applikation der NMDA- und Non-NMDA-Rezeptorantagonisten zu dem Zeitpunkt  $t=50$  in allen Versuchen. Die Effekte der Rezeptorantagonisten waren in der Auswaschphase in allen Versuchen partiell reversibel.

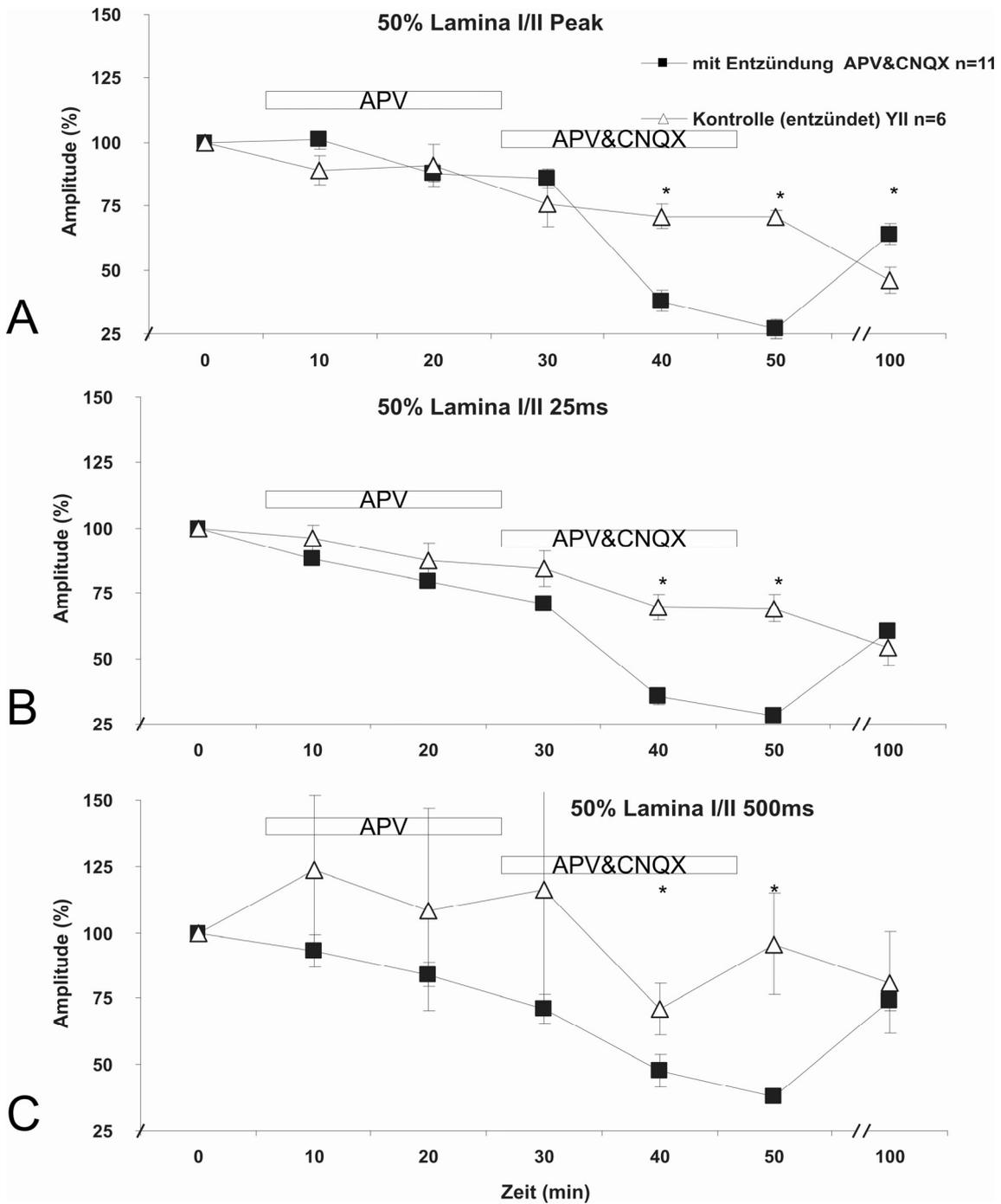


Abb. 3.21: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 50% (1mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert +/- SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind t=0, als Zeitpunkt vor der Applikation von APV, sowie t=10min und t=20min als Zeitpunkte während der Applikation von APV in die Badlösung, Zeitpunkte t=30min und t=40 als Zeitpunkte während der Applikation von APV und CNQX, Zeitpunkte t=50 bis t=100 als Zeitpunkte einer 60-minütigen Auswaschphase, n=Versuchszahl, \* zur Markierung eines signifikanten Unterschieds.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

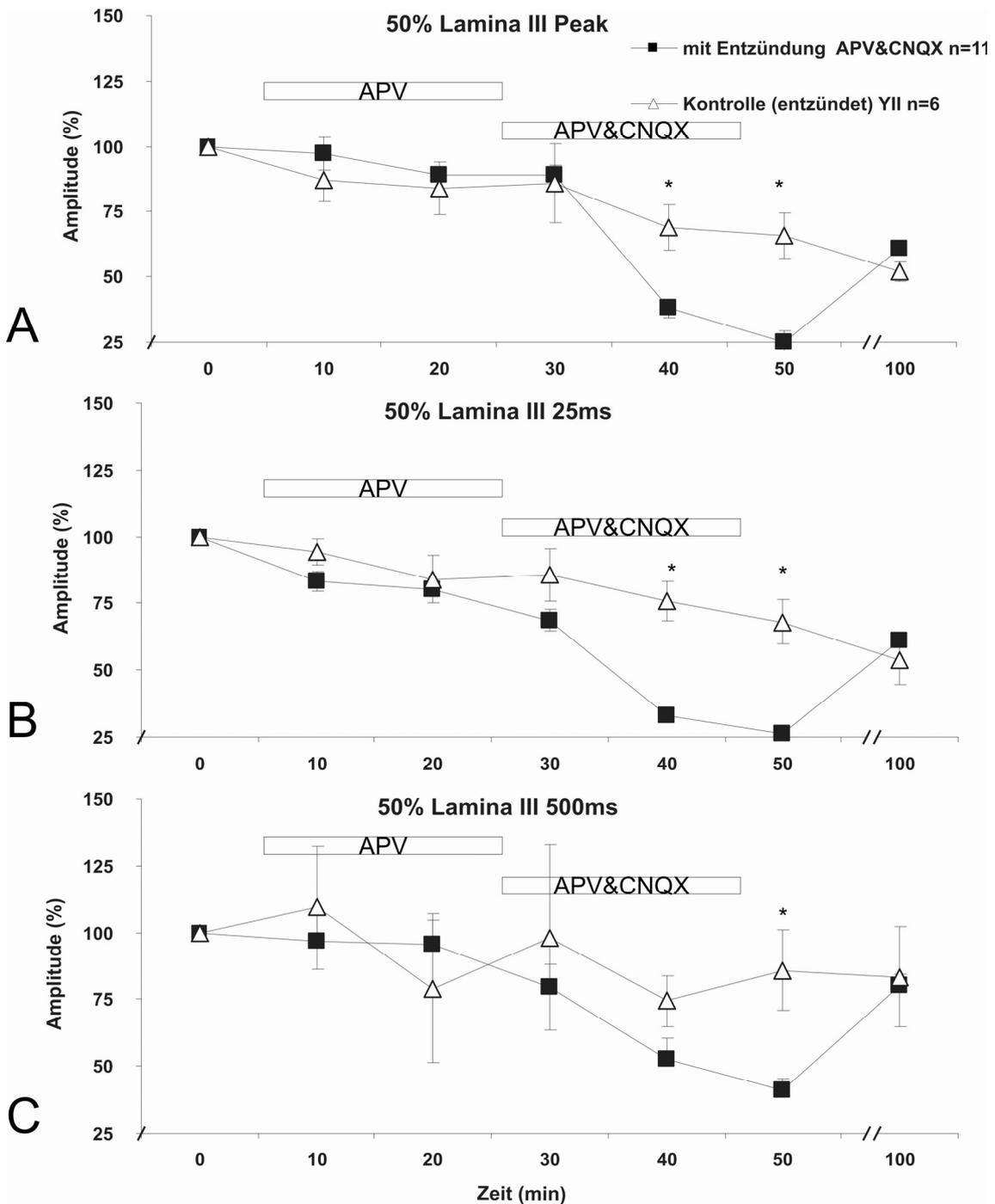


Abb. 3.22: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 50% (1mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert +/- SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Zeitpunkt vor der Applikation von APV, sowie  $t=10\text{min}$  und  $t=20\text{min}$  als Zeitpunkte während der Applikation von APV in die Badlösung, Zeitpunkte  $t=30\text{min}$  und  $t=40$  als Zeitpunkte während der Applikation von APV und CNQX, Zeitpunkte  $t=50$  bis  $t=100$  als Zeitpunkte einer 60-minütigen Auswaschphase,  $n$ =Versuchszahl, \* zur Markierung eines signifikanten Unterschieds.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

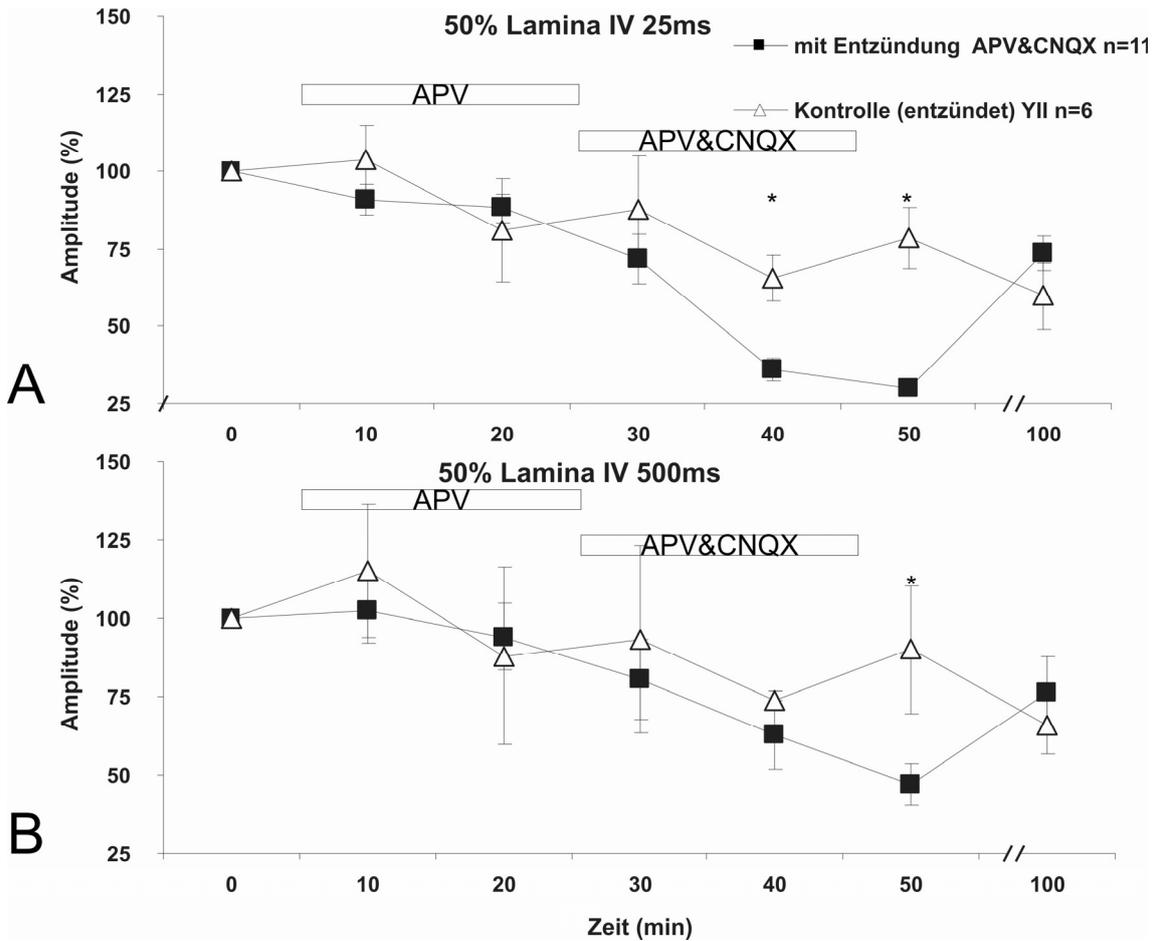


Abb. 3.23: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 50% (1mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert +/- SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Zeitpunkt vor der Applikation von APV, sowie  $t=10\text{min}$  und  $t=20\text{min}$  als Zeitpunkte während der Applikation von APV in die Badlösung, Zeitpunkte  $t=30\text{min}$  und  $t=40$  als Zeitpunkte während der Applikation von APV und CNQX, Zeitpunkte  $t=50$  bis  $t=100$  als Zeitpunkte einer 60-minütigen Auswaschphase,  $n$ =Versuchszahl, \* zur Markierung eines signifikanten Unterschieds.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

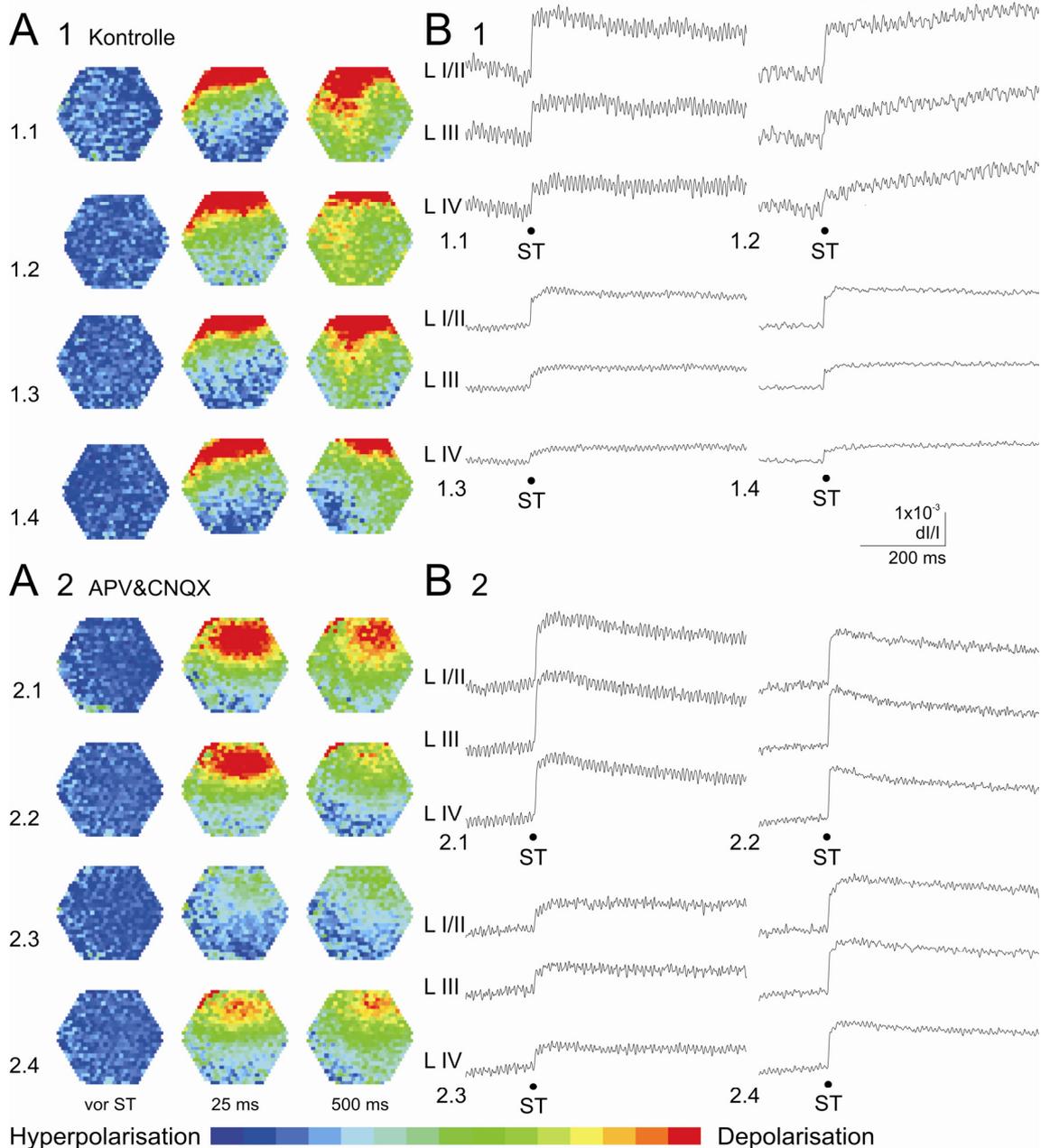


Abb. 3.24: Wirkung von APV (50 $\mu$ mol, Lsg. Nr. 6 in Tab. 1) und CNQX (10 $\mu$ mol, Lsg. Nr. 7 in Tab. 1) auf durch einen Einzelreiz (Reizintensität 50%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer inflammierten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit artifizierter Cerebrospinalflüssigkeit nach Yamamoto (Lsg. Nr. 2 in Tab. 1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungssensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-3 und A2.1-4 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarksareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, A1.3 Zeitpunkt t+50Minuten, A1.4 Auswaschen; Zeitpunkt t+100minuten A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von APV, A2.3 Zeitpunkt t+50Minuten nach Applikation von CNQX, A2.4 Auswaschen; Zeitpunkt t+100Minuten.
- B: B1.1-3 und B2.1-4 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, B1.3 Zeitpunkt t+50Minuten, B1.4 Auswaschen; Zeitpunkt t+100Minuten B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von APV, B2.3 Zeitpunkt t+50Minuten nach Applikation von CNQX, B2.4 Auswaschen; Zeitpunkt t+100Minuten.

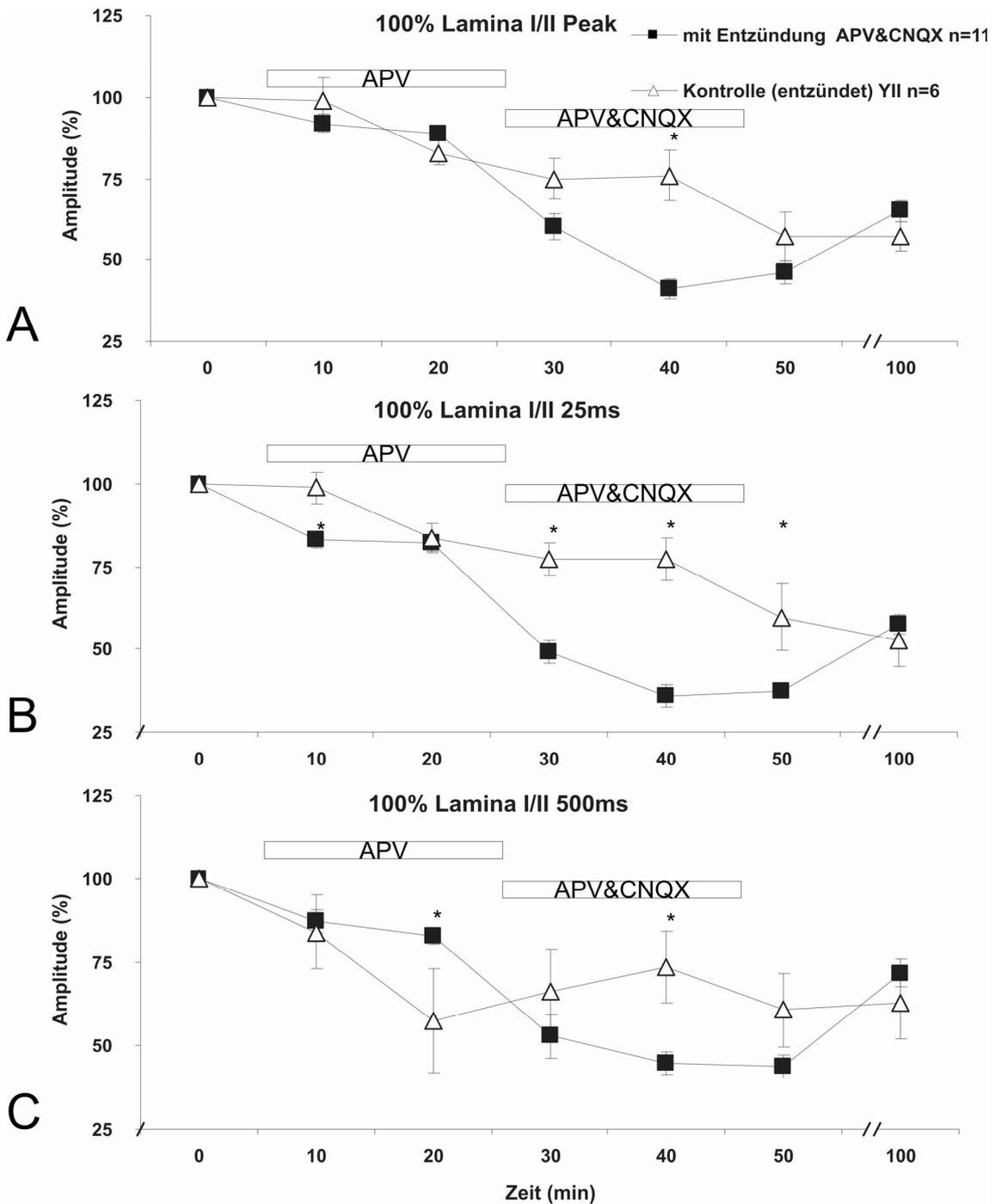


Abb. 3.25: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 100% (2mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert +/- SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind t=0, als Zeitpunkt vor der Applikation von APV, sowie t=10min und t=20min als Zeitpunkte während der Applikation von APV in die Badlösung, Zeitpunkte t=30min und t=40 als Zeitpunkte während der Applikation von APV und CNQX, Zeitpunkte t=50 bis t=100 als Zeitpunkte einer 60-minütigen Auswaschphase, n=Versuchszahl, \* zur Markierung eines signifikanten Unterschieds.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina I/II nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

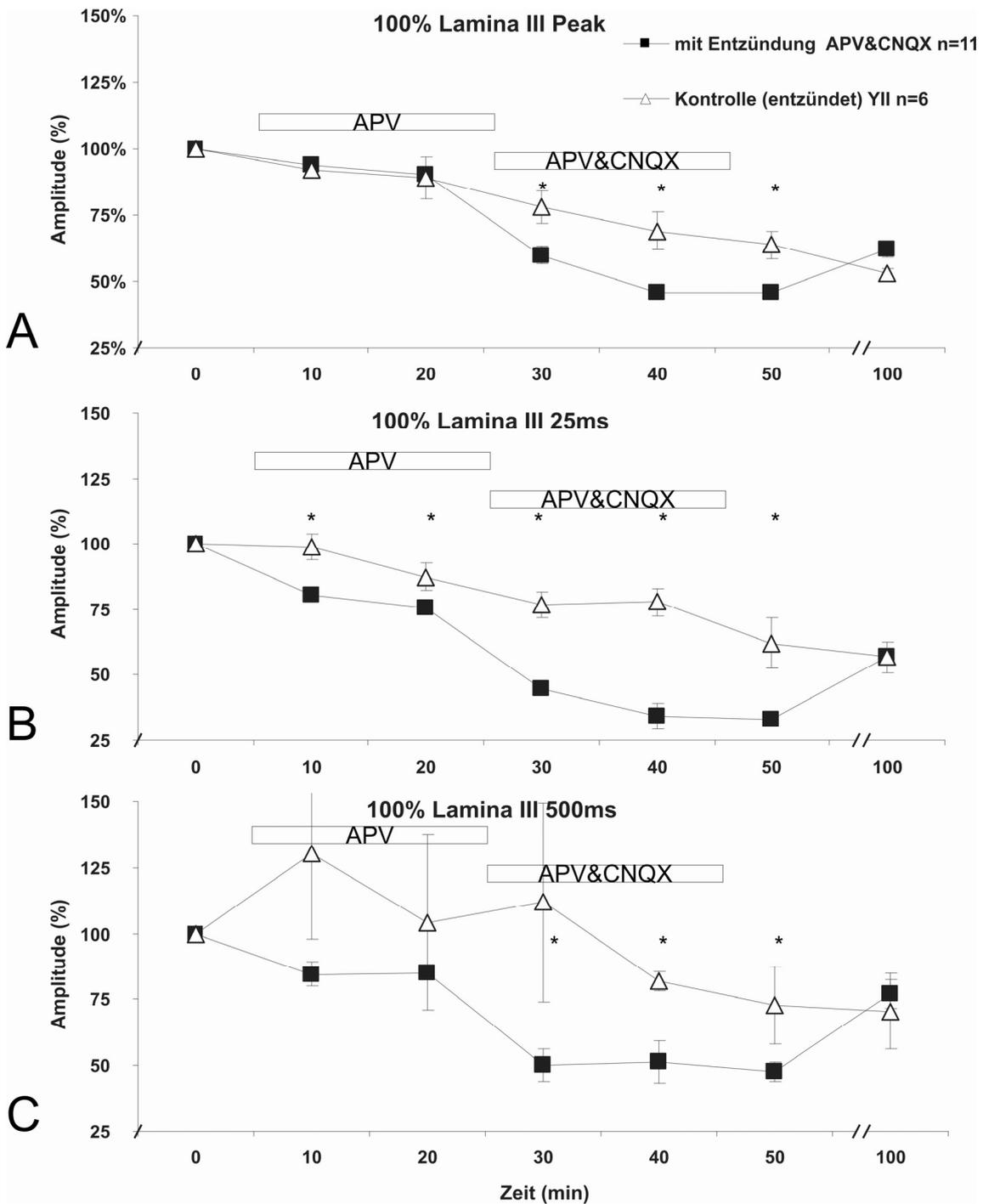


Abb. 3.26: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 100% (2mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Zeitpunkt vor der Applikation von APV, sowie  $t=10\text{min}$  und  $t=20\text{min}$  als Zeitpunkte während der Applikation von APV in die Badlösung, Zeitpunkte  $t=30\text{min}$  und  $t=40$  als Zeitpunkte während der Applikation von APV und CNQX, Zeitpunkte  $t=50$  bis  $t=100$  als Zeitpunkte einer 60-minütigen Auswaschphase,  $n$ =Versuchszahl, \* zur Markierung eines signifikanten Unterschieds.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Peak, d.h. den Punkt der maximalen Deflektion nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- C: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina III nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

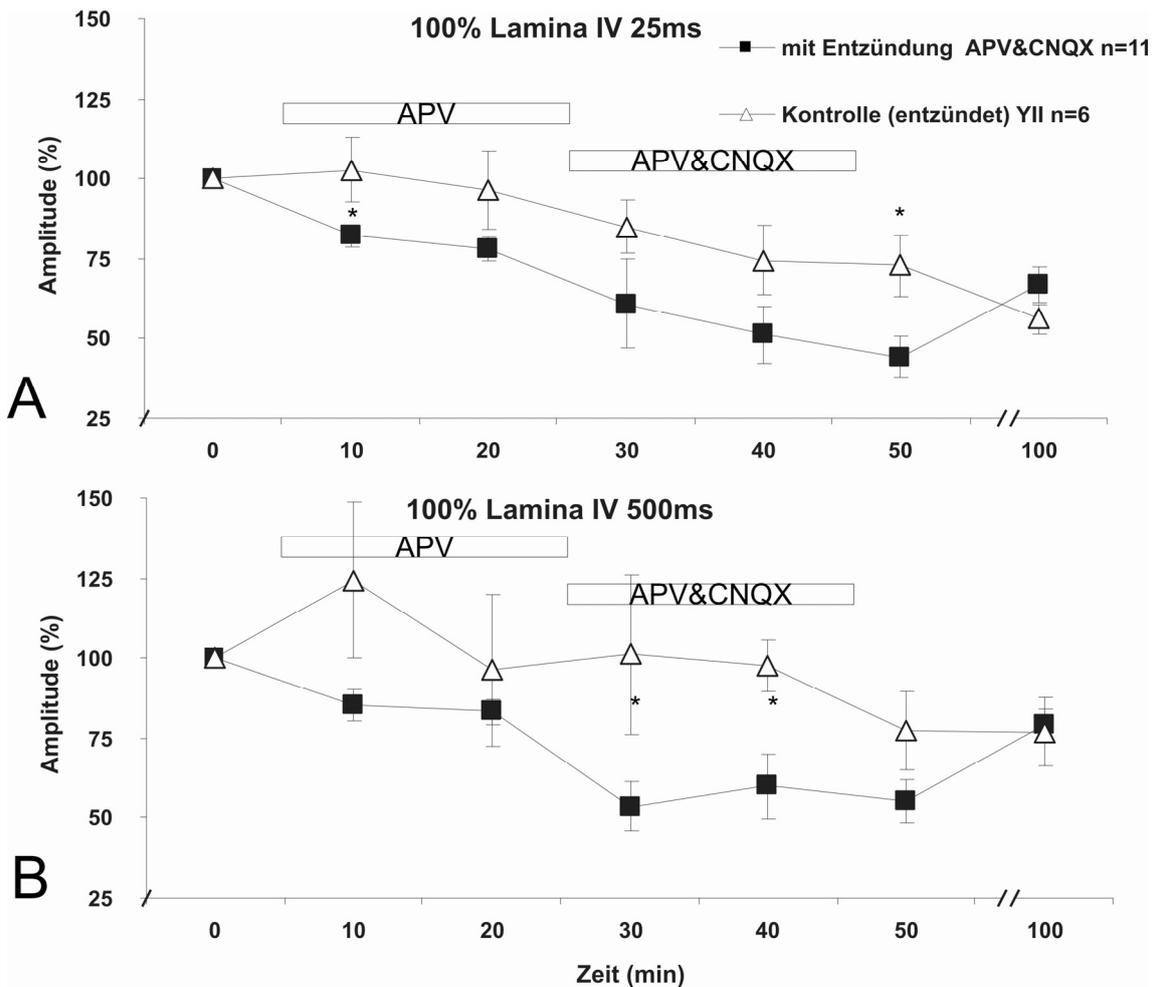


Abb. 3.27: Graphische Darstellung der Amplituden der Fluoreszenz optischer Signale bei Einzelreizung der Hinterhornwurzel mit einer Reizintensität von 100% (2mA), Gegenüberstellung von Ratten mit einer künstlich erzeugten Entzündung der Hinterpfote und Ratten ohne Entzündung der Hinterpfote (Kontrolltiere), die dargestellten Werte ergeben sich aus dem Mittelwert  $\pm$  SEM, die angegebenen Zeitpunkte sind  $t=0$ , als Zeitpunkt vor der Applikation von APV, sowie  $t=10\text{min}$  und  $t=20\text{min}$  als Zeitpunkte während der Applikation von APV in die Badlösung, Zeitpunkte  $t=30\text{min}$  und  $t=40$  als Zeitpunkte während der Applikation von APV und CNQX, Zeitpunkte  $t=50$  bis  $t=100$  als Zeitpunkte einer 60-minütigen Auswaschphase,  $n$ =Versuchszahl, \* zur Markierung eines signifikanten Unterschieds.

- A: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 25ms nach Reizung darstellen.
- B: Amplituden der optischen Signale abgeleitet aus der Lamina IV nach Rexed, die jeweils den Punkt 500ms nach Reizung darstellen.

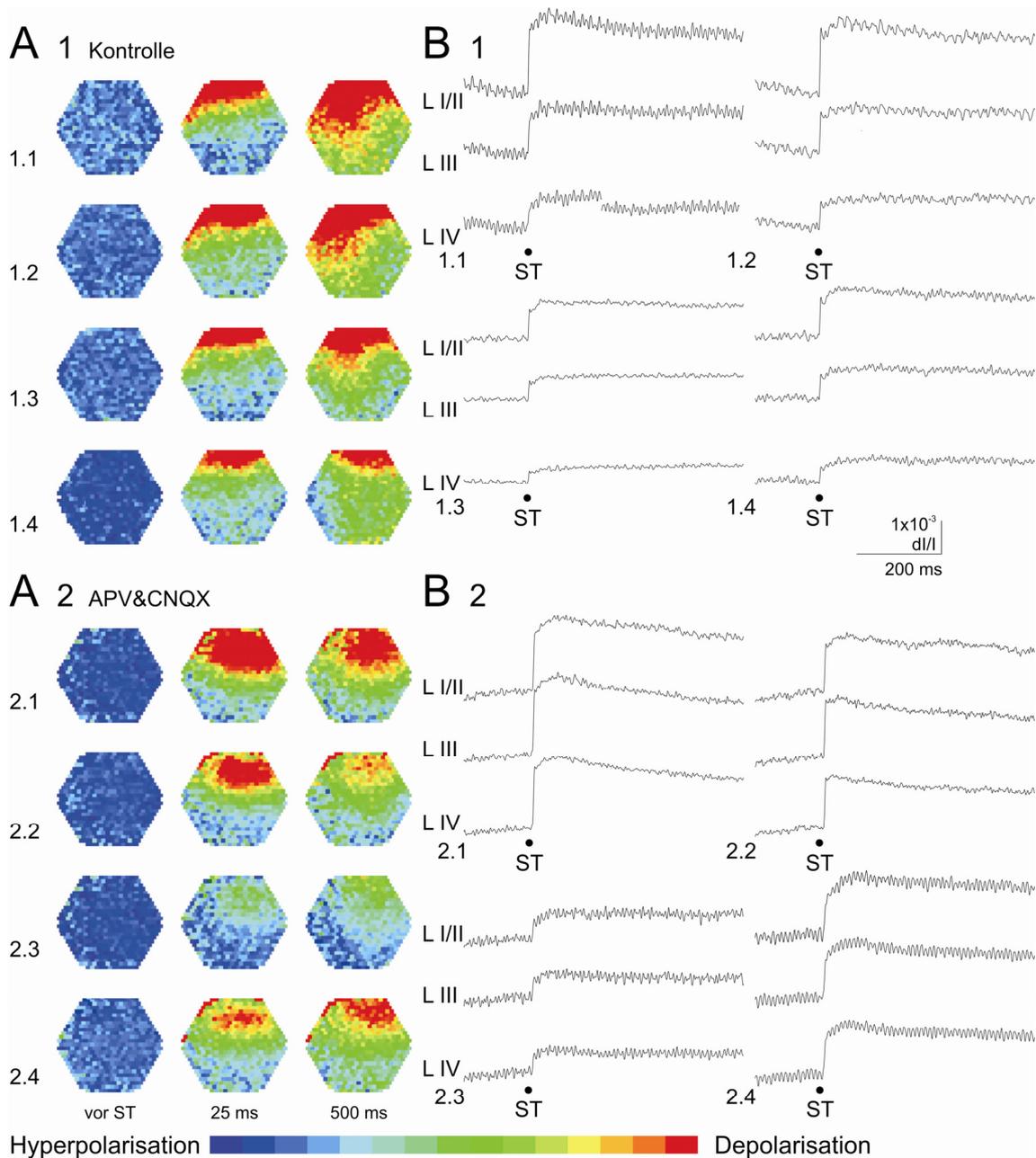


Abb. 3.28: Wirkung von APV (50 $\mu$ mol, Lsg. Nr. 6 in Tab. 1) und CNQX (10 $\mu$ mol, Lsg. Nr.7 in Tab. 1) auf durch einen Einzelreiz(Reizintensität 100%) ausgelöste bioelektrische Aktivität am Rückenmark einer inflammierten Ratte im Vergleich zu einer kontinuierlichen Perfusion mit artifizierter Cerebrospinalflüssigkeit nach Yamamoto (Lsg. Nr. 2 in Tab. 1). Messung der räumlich-zeitlichen Erregungsmuster mit Hilfe eines spannungsensitiven Farbstoffs.

- A: A1.1-3 und A2.1-4 Darstellung der räumlich-zeitlichen Erregungsausbreitung aus den verschiedenen Versuchsperioden. Die drei ausgewählten Diodenarrays visualisieren die Erregungsverteilung innerhalb des durch das Diodenarray markierten Rückenmarksareals zu einem definierten Zeitpunkt vor dem Stimulus, zum Zeitpunkt 25ms und 500ms nach Reizung. A1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, A1.3 Zeitpunkt t+50Minuten, A1.4 Auswaschen, Zeitpunkt t+100minuten A2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, A2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von APV, A2.3 Zeitpunkt t+50Minuten nach Applikation von CNQX, A2.4 Auswaschen; Zeitpunkt t+100Minuten.
- B: B1.1-3 und B2.1-4 Originalregistrierungen der optischen Signale aus den verschiedenen Versuchsperioden. B1.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B1.2 Zeitpunkt t+20Minuten, B1.3 Zeitpunkt t+50Minuten, B1.4 Auswaschen, Zeitpunkt t+100Minuten B2.1 Vorlauf; Zeitpunkt t+0Minuten, B2.2 Zeitpunkt t+20Minuten nach Applikation von APV, B2.3 Zeitpunkt t+50Minuten nach Applikation von CNQX, B2.4 Auswaschen; Zeitpunkt t+100Minuten.

## 4. Diskussion

Mit der vorliegenden Untersuchung wurde der Effekt des synthetischen Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 auf die Ausbreitung reizinduzierter Aktivität im Hinterhorn des Rückenmarks von Ratten untersucht.

Durch die badapplizierte Lösung des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 in einer Konzentration von 10 $\mu$ M ergaben sich in dieser Untersuchung keine signifikanten Unterschiede in der Erregung der Rückenmarksneurone zu einer Perfusion des Gewebeschnittes mit der Kontrolllösung. Ebenfalls konnten keine Unterschiede in den neuronalen Erregungsmustern bei Tieren mit künstlich erzeugter Entzündung und denen ohne Entzündung (Kontrolle) nachgewiesen werden.

### 4.1 Methode der optischen Registrierung

Die Nozizeption und die mit ihr verbundenen Mechanismen der zentralen Sensibilisierung und synaptischen Plastizität sind seit geraumer Zeit Thema grundlagenwissenschaftlicher Untersuchungen. Das durch elektrophysiologische Untersuchungen gewonnene Wissen über die neuronalen Erregung im Hinterhorn des Rückenmarks wird jedoch durch die bisher angewandten Verfahren begrenzt. Bisherige elektrophysiologische Untersuchungen benutzen das „patch-clamp“-Verfahren, um die Membraneigenschaften der Neuronenverbände zu untersuchen. In anderen Untersuchungen wurden Feldpotentiale registriert oder Einzelelektrodenableitungen der WDR-Neurone benutzt, um weitere Informationen über die Erregung nozizeptiver Strukturen im Rückenmark zu gewinnen. Während mit den erwähnten elektrophysiologischen Untersuchungsmethoden nur einzelne Zellen oder kleine Neuronenverbände beobachtet werden können, ist es mit dem in dieser Arbeit verwendeten optischen Verfahren möglich, die räumlich-zeitliche Erregungsausbreitung der Neuronen des gesamten Rückenmarksschnittes zu betrachten. Durch Untersuchungen von Ikeda [42] konnten mit dem optischen Ableitverfahren erstmals räumlich-zeitliche Abläufe der neuronalen Erregung im lumbalen Rückenmark aufgedeckt werden. Um die Authentizität der optischen Signale zu verifizieren, wurden diese mit den mittels Glaselektroden registrierten Feldpotentialen verglichen. Dabei

zeigten sich gute Übereinstimmungen der Signale des optischen Verfahrens mit den registrierten Feldpotentialen. Zudem wurde die Latenz der optischen Signale nach Reizung der Hinterhornwurzel gemessen, um die Komponenten der C-Fasern und der A-Fasern während der neuronalen Erregung zu differenzieren. Zusätzlich zu den verschiedenen verwendeten Reizintensitäten konnte somit eine Abgrenzung zwischen C- bzw. A-Faser vermittelter Erregung der Neuronenverbände des Rückenmarks vorgenommen werden.

Durch die Applikation des NMDA-Rezeptorantagonisten APV und des Non-NMDA-Rezeptorantagonisten CNQX konnte in diesen Versuchen die, durch postsynaptische ionotrope Glutamatrezeptoren vermittelte, synaptische Übertragung in dem Gewebeschnitt inhibiert werden. Glutamat gilt als wesentlicher Bestandteil der exzitatorischen Erregungsübertragung [30] im Hinterhorn des Rückenmarks. Während der NMDA-Rezeptorantagonist APV sowohl in die Erregung nozizeptiver Neurone als auch nicht schmerzspezifischer Strukturen eingebunden ist, wirkt der Non-NMDA-Rezeptorantagonist CNQX nur auf die Erregung nozizeptiver Neurone. Mit dem Nachweis einer inhibitorischen Wirkung von NMDA-Rezeptorantagonisten konnten wir in unserem Untersuchungs-set-up nachweisen, dass das von uns verwendete Verfahren zur Registrierung optischer Signale für die Untersuchung von an der Nozizeption und den Mechanismen der zentralen Sensibilisierung beteiligten Strukturen geeignet ist. Aus diesem Grunde kann dieses Verfahren wertvolle Informationen über die Mechanismen der Nozizeption auf Rückenmarksebene [44] liefern und über die Erregungsausbreitung in der nozizeptiven Informationsverarbeitung eine Aussage machen.

Zur Färbung des Gewebeschnittes wurde von uns der spannungssensitive Farbstoff RH 795 verwendet. Die Färbemethode richtete sich dabei nach Untersuchungen von Straub et al. [105] an Schnitten von Rattenhirnstrukturen, die eine optimale Reproduzierbarkeit der optischen Signale einhergehend mit einer minimalen „Ausbleichung“ des Schnittes in Langzeituntersuchungen sowie einer geringen Phototoxizität bei Verwendung dieses Farbstoffs zeigten. Bei Untersuchungen der Effekte von Glutamat auf die synaptische Übertragung nozizeptiver Informationen durch Ikeda [46] und Ziskind-Conham [129]

wurden ähnliche spannungssensitive Farbstoffe aus der Styryl- bzw. der Oxonolgruppe verwendet, mit denen gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

Als Ort der Reizung wurde von uns die Eintrittszone der Hinterhornwurzel gewählt. Dadurch erhielten wir im Unterschied zu den Untersuchungen von Ikeda, in denen eine Reizung der, an dem Gewebeschnitt anhängenden, Hinterhornwurzel mittels „glass suction“-Elektrode vorgenommen wurde, stärkere Signale. Die von uns benutzte Reizstärke von 2mA (100% Reizintensität) bzw. 1mA (50% Reizintensität) entspricht dabei den Reizstärken, die von Ikeda bei der high-intensity-stimulation beschrieben wurden. Bei diesen Reizintensitäten kann zudem davon ausgegangen werden, dass die nozizeptiven C-Fasern von der Reizung erfasst werden und die nachgeschalteten Neurone im Hinterhorn erregen. Für die Versuche wurden von uns übereinstimmend mit anderen Untersuchungen Sprague-Dawley-Ratten verwendet, die ein Alter von 2-4 Wochen hatten.

Obwohl das optische Verfahren in seiner Relevanz für die Untersuchung der Mechanismen der Nozizeption auf spinaler Ebene durch die vorliegende Arbeit bestätigt worden ist, muss angeführt werden, dass durch horizontale Gewebeschnitte des Rückenmarks höher geordnete Strukturen von der Untersuchung ausgeschlossen bleiben. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass ein Wegfall des deszendierenden hemmenden Systems [40] bei dieser Untersuchungsmethode die Ergebnisse beeinflusst. Zudem ist zu erwähnen, dass es durch die Präparation des Rückenmarksschnittes zu einer gewissen Manipulation des Gewebes kommt, welche Auswirkungen das auf Untersuchung hat, ist aber bisher unbekannt. Diese methodischen Probleme gelten allerdings auch für alle anderen Verfahren, bei denen transversale Rückenmarksschnitte eingesetzt werden [27, 46, 129].

Der von uns verwendete Farbstoff hat sich in einer Vielzahl von Untersuchungen als zuverlässiges Werkzeug zur Untersuchung der neuronalen Erregung sowohl auf spinaler als auch auf der Ebene höher geordneter Zentren erwiesen. Trotzdem besteht die Möglichkeit, dass es Farbstoffe mit einer höheren Sensitivität für die von uns untersuchten Vorgänge gibt, welche zu besseren Ergebnissen führen könnten.

## 4.2 Effekte von Cannabinoiden im Rückenmark

Die Bedeutung des Endocannabinoidsystems in der nozizeptiven Schmerzverarbeitung und die Effekte von Cannabinoiden bei der Behandlung sowohl chronischer als auch akuter Schmerzzustände wurden seit der Entdeckung der Cannabinoidrezeptoren [65, 74] und deren Verteilung im peripheren und zentralen Nervensystem [60, 74] immer wieder untersucht. Die Cannabinoidrezeptoren CB1 und CB2 sind G-Protein-gekoppelte Membranproteine [64], deren Aktivierung in einer Inhibition der Adenylatzyklase resultiert. Durch die Verminderung des cAMP-Gehaltes in der Zelle wird der Öffnungszustand der Ionenkanäle moduliert. So kommt es zu einer verminderten Erregbarkeit und Depolarisationsgeschwindigkeit der Neurone [28].

Der von uns gewählte unselektive CB1- und CB2-Rezeptoragonist WIN55,212-2 hat sich in vergangenen Experimenten als zuverlässiges Werkzeug zur Untersuchung der Bedeutung von Cannabinoidrezeptoren und Endocannabinoiden herausgestellt.

Hohmann [34] konnte bei Untersuchungen des Hinterhorns eine potente reversible Inhibition der durch noxische mechanische Stimuli ausgelösten, Erregung nozizeptiver WDR-Neurone durch systemisch verabreichtes WIN55,212-2 nachweisen. Dabei wurde gezeigt, dass sich die Inhibition nur auf die Erregung nozizeptiver Neurone durch noxische Stimuli ausprägt, während die durch nicht-noxische Stimuli ausgelöste Erregung mechanosensitiver Neurone nicht beeinflusst wurde. Weitere Untersuchungen ergaben sowohl eine Inhibition der durch noxische thermische Stimuli [35, 36] ausgelösten Erregung nozizeptiver Neurone, als auch durch noxische chemische Reize [112] ausgelöste Erregung durch WIN55,212-2. Durch diese Untersuchungen ließ sich der Effekt von Cannabinoiden auf die Verarbeitung akuter noxischer Informationen belegen. In diesen Arbeiten nachgewiesene Effekte wurden durch systemische [112] Gabe des Cannabinoidrezeptoragonisten, aber auch durch topische [35] Applikation auf der Oberfläche des lumbalen dorsalen Rückenmarks erreicht. Diese topische Applikation zeigt, dass die Cannabinoidrezeptoren direkt in die Verarbeitung nozizeptiver Informationen in Neuronen des Hinterhorns involviert sind. Zudem konnten Tsou et al. [112] eine verminderte Fos-Expression, welche als Marker für zentrale Sensibilisierungsprozesse angesehen wird, nach Gabe von WIN55,212-2 in Neuronen des lumbalen Rückenmarks nachweisen. Morriset [73] und Urban zeigten in

ihrer Untersuchung den Einfluss des von uns verwendeten Cannabinoidrezeptoragonisten auf die Unterdrückung spontaner und evozierter EPSC nozizeptiver Neurone der Substantia gelatinosa und die Beteiligung der Cannabinoidrezeptoren an der glutamatergen Transmission nozizeptiver Informationen im Hinterhorn des Rückenmarks. Dabei wurde der präsynaptische Wirkungsort der Cannabinoide bzw. der Cannabinoidrezeptoren herausgestellt. In einer Untersuchung von Strangman [104] konnte auch der Effekt des synthetischen Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 auf ein Korrelat der zentralen Sensibilisierung nachgewiesen werden. So wurde in der Untersuchung von WDR-Neuronen des Hinterhorns gezeigt, dass „wind-up“, welches als Phänomen einer kurzfristigen zentralen Sensibilisierung angesehen wird, durch die Gabe des Cannabinoidrezeptoragonisten unterbunden wird.

Um die Effekte von Cannabinoiden auf die Verarbeitung von chronischen Schmerzen und der damit verbundenen zentralen Sensibilisierung, also der gesteigerten Erregungsfähigkeit zentraler Neurone, zu untersuchen, wurden die Cannabinoide bei verschiedenen Tiermodellen angewandt, bei denen die Ausbildung von zentralen Sensibilisierungsprozessen eine große Bedeutung für Schmerz und Schmerzentwicklungsmechanismen hat. Durch Versuche von Martin [63] konnten anti-allodynische Effekte und eine verminderte Fos-Expression im Rückenmark von Ratten nach CFA Injektion durch intrathekale Injektion des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 herausgestellt werden. Bei Untersuchungen an dem Carageenan-Entzündungsmodell konnte durch ein systemisch verabreichtes Cannabinoid eine Reduktion des durch repetitive C-Faser-Reizung hervorgerufenen „wind-up“ erreicht werden [76]. Dabei zeigte sich übereinstimmend mit vorhergehenden Untersuchungen, dass sich das Cannabinoid, trotz gesteigerter Erregungszustände im Rahmen der ausgelösten Entzündung, nur auf die C-Faser vermittelte neuronale Erregung auswirkte, während die Aktivität nichtnozizeptiver Neurone nicht affektiert wurde. In darauf folgenden Untersuchungen, bei denen WIN55,212-2 systemisch oder intrathekal [29] appliziert wurde, konnten Wechselwirkungen zwischen metabotropen Glutamatrezeptoren und den Cannabinoidrezeptoren bei der Modulation der synaptischen Transmission nozizeptiver Informationen in Neuronen des Hinterhorns in

einem Tiermodell chronisch neuropathischen Schmerzes nachgewiesen werden. In diesen und weiteren Versuchen wurde als Lösungsvermittler, das auch von uns verwendete, DMSO benutzt [62]. Übereinstimmend mit unseren Ergebnissen konnte auch in den erwähnten Arbeiten kein Einfluss des Lösungsvermittlers DMSO auf die Erregungsausbreitung festgestellt werden [73]. Allerdings variiert die verwendete Applikationsform und Dosis von WIN55,212-2 in den hier betrachteten Untersuchungen. Eine systemisch applizierte Dosis von 125µg/kg WIN55,212-2 führte zu einer signifikanten Suppression der neuronalen Aktivität in wide-dynamic-range-Neuronen des lumbalen Hinterhorns [36]. Martin [62] konnte antinozizeptive Effekte durch 5-20µg intracerebral administriertes WIN55,212-2 nachweisen. Topisch spinal appliziert wurde eine Menge von 100µg benötigt, um nozizeptive Antworten von wide-dynamic-range-Neuronen des lumbalen Hinterhorns zu unterdrücken [35]. Die von uns verwendete badapplizierte Stocklösung mit einer Konzentration von 10µM zeigte in Untersuchungen von Morriset [73] eine signifikante Unterdrückung der Frequenz als auch der Amplitude evozierter Potentiale von wide-dynamic-range-Neuronen des lumbalen Hinterhorns. Die Dauer der Applikation bis zu dem Zeitpunkt, an dem Effekte von WIN55,212-22 registriert werden konnten, korreliert mit der von uns verwendeten Applikationszeit und entspricht vorherigen Untersuchungen [109, 107].

Obwohl in den erwähnten Arbeiten eindeutige inhibitorische Effekte von Cannabinoiden bei der Übertragung und Verarbeitung noxischer mechanischer Stimuli während bestehender Entzündung beschrieben wurden, konnte in einer Untersuchung von Kelly [48] gezeigt werden, dass während bestehender Entzündung keine Abschwächung der nozizeptiven Erregung von WDR-Neuronen des Rückenmarks durch Cannabinoide auslösbar war. In dieser Untersuchung wurde der Cannabinoidrezeptoragonist lokal auf die Oberfläche des lumbalen dorsalen Rückenmarks aufgetragen und führte im Gegensatz zu den angeführten Untersuchungen [34, 35, 112] auch zu einer Reduktion der durch nicht noxische mechanische Stimuli ausgelösten Erregung von Neuronen des lumbalen Rückenmarks. Zudem ist zu erwähnen, dass die applizierten Cannabinoide sowohl in Verhaltensuntersuchungen als auch in den elektrophysiologischen in vivo Untersuchungen unerwünschte Nebenwirkungen aufwiesen. Zu diesen Nebenwirkungen gehören Hypothermie, Katalapsie und eine ausgeprägte Bewegungsarmut (Hypolocomotion) [61], die sowohl

die erhaltenen Ergebnisse dieser Untersuchungen verfälschen könnten und zudem den therapeutischen Nutzen begrenzen. Die Verhaltensuntersuchungen von Martin [63] zeigten dabei, dass sich die erhöhte Dosierung des Cannabinoidrezeptoragonisten auch auf nicht noxische mechanische Stimuli ausprägt. Die in dieser Untersuchung applizierte Dosis von 100µg WIN55,212-2 führte zu einer kompletten Blockade der Antworten auf mechanische Stimuli sowohl an der entzündeten als auch an der nicht entzündeten Hinterpfote. Weiterhin muss also herausgefunden werden, in welcher Konzentration die Cannabinoide verabreicht werden müssen, um diese unerwünschten Nebeneffekte zu umgehen und nur die antinozizeptiven Eigenschaften auszunutzen. Ein zusätzlicher Untersuchungsschwerpunkt sollte dabei auf den Wirkort der Cannabinoide gelegt werden, da in den erwähnten Untersuchungen sowohl periphere (CB2-Rezeptor) als auch zentrale (CB1-Rezeptor) Angriffspunkte identifiziert wurden, welche wiederum mit der Ausprägung der Nebenwirkungen korrelieren.

### **4.3 Entzündungsmodell**

Um eine, für unsere Experimente notwendige, robuste Hyperalgesie und die damit verbundenen Veränderungen der Erregbarkeit von Hinterhornneuronen des Rückenmarks durch die Vorgänge der zentralen Sensibilisierung bei den Versuchstieren zu erzeugen, bedienen wir uns eines etablierten Tiermodells, welches schon einer Vielzahl von Untersuchungen zu Grunde gelegt worden ist. Die Auslösung einer unilateralen Entzündung durch die Injektion von CFA in die Hinterpfote der Ratte führte, wie von Millan [71] beschrieben, innerhalb von 24 Stunden bei allen Versuchstieren zu einer Schwellung und Rötung der Injektionsstelle, sowie zu einer Schonhaltung der betroffenen Hinterpfote, die charakteristisch für die verstärkte Sensitivität auf Berührung und noxische Druck- oder Hitzestimuli bei Hyperalgesie ist. Diese Charakteristika der Hyperalgesie wurden in der vorliegenden Arbeit nicht ausgetestet, gelten aber durch die Auslösung der Entzündung und die vorhergehenden Arbeiten als existent. Die von uns gewählte Zeitspanne von 48 Stunden zwischen Auslösung der Entzündung und Präparation des Rückenmarks korreliert mit den Versuchsprotokollen anderer Untersuchungen [59] und entspricht dem Zeitpunkt, an dem maximale Effekte sowohl in Verhaltensuntersuchungen (mechanische und thermale

Hyperalgesie) als auch in elektrophysiologischen Untersuchungen nachgewiesen wurden. Allerdings zeigten Untersuchungen von Zhang [127], dass das Alter der Versuchstiere entscheidende Auswirkungen auf die Ausprägung der morphologischen Veränderung im Hinterhorn nach CFA-induzierter Entzündung hat. In diesen Untersuchungen konnte eine verstärkte Hyperalgesie und erhöhte Expression von Dynorphin im Rückenmark von älteren Versuchstieren im Vergleich zu Jüngeren festgestellt werden.

In elektrophysiologischen Experimenten bei anästhesierten Ratten konnte eine verstärkte Spontanaktivität [88] der dorsalen Rückenmarkszellen sowie eine Vergrößerung der rezeptiven Felder [41] durch die Injektion von CFA in die Hinterpfote der Versuchstiere gezeigt werden. Auch neurochemische Veränderungen [91] im Hinterhorn von Ratten nach CFA Injektion waren zu diesem Zeitpunkt ausgeprägt. Durch zahlreiche weitere Untersuchungen konnten verschiedene Mechanismen herausgearbeitet werden, die zu spinaler Sensibilisierung nach CFA Injektion beitragen. Hierzu gehört z.B. die Hochregulation von Rezeptorproteinen [27, 101, 57, 19, 20, 128, 80] oder die Induktion von intermediate-early-genes [4].

Diese morphologischen Veränderungen in den Präparaten des lumbalen Rückenmarks wurden vorwiegend durch immunhistochemische Verfahren nachgewiesen [57, 19, 20, 128].

Elektrophysiologische Untersuchungen bei diesem Entzündungsmodell wurden mittels der „patch-clamp“-Technik [27] oder der Registrierung von Feldpotentialen durch Glaselektroden [88] sowie Mikroelektroden [36] durchgeführt. Veränderungen in den räumlich-zeitlichen Abläufen der neuronalen Erregung nozizeptiver Neurone der oberflächlichen Schichten des lumbalen Rückenmarks nach Auslösung einer Entzündung durch die Injektion von CFA waren bisher noch nicht Gegenstand von Untersuchungen.

## 4.4 Schlussfolgerung

Trotz der eindeutigen Effekte von Cannabinoiden auf die Übertragung nozizeptiver Informationen in vielen Modellen von neuropathischem und inflammatorischem Schmerz, gibt es bisher noch wenige Arbeiten, die diese Effekte bei dem langandauernden inflammatorischen Schmerz der CFA-induzierten Entzündung untersucht haben. Bei Untersuchungen von Martin [63] an diesem Modell konnten zwar die analgetischen Eigenschaften des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 in Verhaltensuntersuchungen und eine verminderte Fos-Expression in den aufgearbeiteten Gewebeschnitten festgestellt werden, doch blieb eine elektrophysiologische Abklärung der beobachteten Effekte bislang aus. Mit der vorliegenden Arbeit wurde nun zum ersten Mal der Einfluss des Cannabinoidrezeptoragonisten auf die reizinduzierte Aktivität nozizeptiver Neurone des Rückenmarks während des Zustandes einer andauernden Entzündung mit dem optischen Verfahren zur Ableitung bioelektrischer Signale untersucht.

Obwohl in den im einzelnen beschriebenen Versuchsanordnungen sowohl die Effekte der von uns untersuchten Substanz WIN55,212-22 als auch Unterschiede zwischen Tieren mit künstlich erzeugter Entzündung und solchen ohne Entzündung aufgezeigt werden konnten, konnte dieser Nachweis in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden. Eine mögliche Ursache kann in der mangelnden Sensitivität des optischen Verfahrens zur Detektion der gesteigerten Spontanaktivität [88, 73] der Hinterhornneurone im Zustand der Entzündung liegen. Der Grund für den mangelnden Effekt des Cannabinoidrezeptorantagonisten WIN55,212-2 in unserem Versuchsaufbau kann aber nicht in dem optischen Verfahren gesucht werden, da durch die Inhibition der glutamatergen Erregung ein eindeutiger Nachweis für die Relevanz dieses Verfahrens zur Untersuchung der Mechanismen der nozizeptiven Erregungsübertragung vorliegt. Vielmehr muss hier das Endocannabinoidsystem selbst als Ursache in Betracht gezogen werden. Eine fehlende Interaktion der von uns verwendeten Substanz WIN55,212-2 mit einem der Cannabinoidrezeptoren kann in unserem Fall ebenfalls ausgeschlossen werden, da sich WIN55,212-2 in vorhergehenden Untersuchungen als unselektiver Agonist an beiden bisher bekannten Cannabinoidrezeptoren gezeigt hat [82, 63, 35, 76].

Auch eine unzureichende Konzentration bzw. eine fehlerhafte Dosierung des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 kann in diesem Fall nicht als Ursache für einen mangelnden Effekt herangezogen werden, da dieselbe badapplizierte Konzentrierung in den Untersuchungen von Martin zu einem Effekt führte [63]. Demnach muss die Ursache für die ausgebliebenen cannabinoidegen Effekte eher in dem Wirkungsort oder der Wirkungsweise der Cannabinoide liegen. Denn obwohl in den bisherigen Untersuchungen durch systemische [34] oder intrathekale [63] Verabreichung der Cannabinoide eindeutige Effekte erzielt wurden, bleibt der Nachweis eines definitiven Wirkungsortes bislang aus. Homann [34] und Martin [63] weisen in ihren Untersuchungen auf eine mögliche Penetration des Cannabinoids in nicht untersuchte Hirnstrukturen hin. Durch diese Verschleppung des Wirkstoffs könnten die beschriebenen Effekte der Cannabinoide auch ausgelöst worden sein. In diesem Fall würde eine alleinige Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 auf dem Rückenmarkspräparat nicht den gewünschten Effekt erbringen. Diese Möglichkeit wird durch neuere Untersuchungen gestützt, in denen sich Hinweise auf ein tonisch aktives Endocannabinoidsystem mehrten [37, 87]. Diesen Untersuchungen zufolge greift das Endocannabinoidsystem bzw. exogene Cannabinoide durch eine deszendierende Modulation der nozizeptiven Erregungsübertragung über die Freisetzung glutamaterger und glycinerner Neurotransmitter im Rückenmark und höher geordneten Zentren in die Nozizeption ein [37, 87]. Demnach erscheint es plausibel, dass Hohmann [36] bei Untersuchungen an Ratten mit durchtrenntem Rückenmark im Gegensatz zu Ratten mit intaktem Rückenmark keine Inhibition der Erregung von WDR-Neurone durch noxische thermische Stimuli nachweisen konnte. Bei einer Untersuchung am Rückenmark in vivo bleibt dabei dieser Einfluss im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau erhalten, solche Verfahren sind aber ausgesprochen aufwendig und risikoreich. Die Abkopplung des Gewebeschnittes von deszendierenden inhibitorischen Rückenmarksbahnen [40, 37, 87] könnte also in unserer Untersuchung zu einer verminderten Wirkung der Cannabinoide auf die Erregung beigetragen haben.

Die Tatsache, dass in unserem Versuchsaufbau mit der Inhibition der glutamatergen Transmission nozizeptiver Signale die Ergebnisse von Ziskind-Conhaim [129] oder Ikeda [42] reproduziert werden konnten, bestätigt die Relevanz dieses Modells für die

Untersuchung neuronaler Erregung im Rahmen der Nozizeption. Daher ist es notwendig weitere Untersuchungen mit diesem Versuchsaufbau zu betreiben, um einen tieferen Einblick in die Mechanismen der Nozizeption zu erlangen.

Augenscheinlich können die analgetische Eigenschaften der Cannabinoide bzw. des Endocannabinoidsystems aber nicht mit diesem Verfahren untersucht werden. Weiterhin ist es daher unumgänglich zusätzliche Untersuchungen über die Effekte exogener wie auch endogener Cannabinoide anzustreben, um Patienten möglichst früh einen Zugang zu einer effektiven Schmerztherapie mit Cannabinoiden gewähren zu können. Dabei sollte vor allem die topische Applikation der Cannabinoide im Vordergrund stehen, um die unerwünschten psychotropischen Nebenwirkungen dieser Substanzen zu begrenzen, da diese der limitierende Faktor bei einer Anwendung am Patienten sind.

## 5. Zusammenfassung

### **Effekte des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 auf die reizinduzierte Aktivität im Rückenmark der Ratte**

Gegenstand der vorliegenden Untersuchung war die Analyse der Wirkung des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 auf die reizinduzierte Aktivität im Rückenmarksgewebeschnitt der Ratte. Zur Untersuchung der neuronalen Aktivität der oberflächlichen Rückenmarksschichten wurde die Eintrittszone der Hinterhornwurzel durch elektrische Einzelreize stimuliert.

Zur Erfassung räumlich-zeitlicher Aktivitätsmuster dienten ein spannungsempfindlicher Farbstoff sowie ein schnelles optisches Registrierverfahren. Die Signalregistrierung beruhte auf der Messung der Fluoreszenzänderung des Farbstoffes in Abhängigkeit vom Membranpotential der Nervenzellen. Der Zustand einer Entzündung der Hinterpfote wurde durch die Injektion einer definierten Menge von CFA künstlich ausgelöst.

Die Applikation des Cannabinoidrezeptoragonisten WIN55,212-2 führte in keinem der Versuche zu einer signifikanten Veränderung der Signalamplitude. Die räumlich-zeitliche Ausbreitung der neuronalen Erregung des Rückenmarks wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Zudem zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Untersuchungstieren mit künstlich ausgelöster Entzündung und solchen ohne Entzündung.

Die Ergebnisse legen nahe, dass WIN55,212-2 seine Wirkung vermutlich durch eine Modulation deszendierender inhibitorischer Bahnen ausübt, welche diesem Untersuchungsmodell vorenthalten bleiben.

Die tierexperimentelle Arbeit wurde vom Regierungspräsidenten Münster mit dem Schreiben vom 19.12.2002 (Aktenzeichen 50.0835.1.0 G 79/2002) genehmigt.

Tag der mündlichen Prüfung:30.04.2010

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Akopian, A. N., Sivilotti, L. and Wood, J. N. (1996) A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature* 379, 257-262.
- [2] Amaya F, Shimosato G, Kawasaki Y, Hashimoto S, Tanaka Y, Ji RR, Tanaka M. Induction of CB1 cannabinoid receptor by inflammation in primary afferent neurons facilitates antihyperalgesic effect of peripheral CB1 agonist. *Pain*. 2006 Sep;124(1-2):175-83. Epub 2006 May 18.
- [3] Basbaum AI, Jessell TM (1999) The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (eds) *Principles of neural science*, 4th edn. McGraw-Hill, New York, pp 472–491.
- [4] Bellavance LL, Beitz AJ. (1996) Altered c-fos expression in the parabrachial nucleus in a rodent model of CFA-induced peripheral inflammation *J Comp Neurol*. Mar 11;366(3):431-47
- [5] Bernard JF, Besson JM, (1990) The spino(trigemino)-pontoamygdaloid pathway: electrophysiological evidence for an involvement in pain processes, *J. Neurophysiol.* 63, pp. 473-490.
- [6] Bernard JF , Bester H, Besson JM (1996) Involvement of the spino-parabrachio-amygdaloid and hypothalamic pathways in the autonomic and affective emotional aspects of pain. *Prog. Brain Res.* 107, 243-255.
- [7] Bevan S. (1996) Signal transduction in nociceptive afferent neurons in inflammatory conditions. *Prog Brain Res* 113:201-213.
- [8] Bishop B. (1980) Pain: its physiology and rationale for management. Part I. Neuroanatomical substrate of pain. *Phys Ther.* Jan; 60 (1):13-20.

- [9] Black, J. A., Dib-Hajj, S., McNabola, K., Jeste, S., Rizzo, M. A., et al. (1996) Spinal sensory neurons express multiple sodium channel alpha-subunit mRNAs. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 43, 117-131.
- [10] Brain SM. (1996) Sensory neuropeptides in the skin. Geppetti P, Holzer P (eds), Eds.; Neurogenic inflammation. CRC Press, Boca Raton New York London Tokyo p.229-244.
- [11] Buggy DJ, Toogood L, Maric S et al. (2003) Lack of analgesic efficacy of oral delta9-tetrahydrocannabinol in postoperative pain. *Pain* 106: 169-172.
- [12] Campbell JN, Meyer RA, LaMotte RH. (1979) Sensitization of myelinated nociceptive afferents that innervate monkey hand. *J Neurophysiol.* Nov;42(6):1669-1679.
- [13] Caterina, M. J., Schumacher, M. A., Tominaga, M., Rosen, T. A., Levine, J. D., et al. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.
- [14] Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D (2000) Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288:306-313.
- [15] Caterina, M. J. and Julius, D. (2001) The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu. Rev. Neurosci.* 24, 487-517.
- [16] Davis, K. D., Meyer, R. A., and Campbell, J. N. (1993) Chemosensitivity and sensitization of nociceptive afferents that innervate the hairy skin of monkey. *J. Neurophysiol.* 69,1071-1081.
- [17] Davis JB, Gray J, Gunthorpe MJ, Hatcher JP, Davey PT, Overend P, Harries MH, Latcham J, Clapham C, Atkinson K, Hughes SA, Rance K, Grau E, Harper AJ,

Pugh PL, Rogers DC, Bingham S, Randall A, Sheardown SA (2000) Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405:183-187

[18] Dixon WE. (1899) The pharmacology of *Cannabis indica*. *BMJ*; 2: 1354-1357

[19] Duan B, Wu LJ, Yu YQ, Ding Y, Jing L, Xu L, Chen J, Xu TL. (2007) Upregulation of acid-sensing ion channel ASIC1a in spinal dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity *J Neurosci*. Oct 10;27 (41):11139-48.

[20] Duric V, McCarson KE. (2007) Neurokinin-1 (NK-1) receptor and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is differentially modulated in the rat spinal dorsal horn and hippocampus during inflammatory pain. *Mol Pain*. Oct 31;3:32.

[21] Ebersberger A, Charbel Issa P, Vanegas H, Schaible H-G (2000) Differential effects of CGRP and CGRP 8-37 upon responses to NMDA and AMPA in spinal nociceptive neurons with knee input in the rat. *Neuroscience* 99:171-178.

[22] Ebersberger A, Grubb BD, Willingale HL, Gardiner NJ, Nebe J, Schaible H-G (2000) The intraspinal release of prostaglandin E2 in a model of acute arthritis is accompanied by an upregulation of cyclooxygenase-2 in the rat spinal cord. *Neuroscience* 93:775-781.

[23] Farquhar-Smith WP, Egertova M, Bradbury EJ, McMahon SB, Rice AS, Elphick MR. (2000) Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Mol Cell Neurosci*; 15:510-21.

[24] Foreman JC (1987) Peptides and neurogenic inflammation. *Br Med Bull* 43:386-400.

[25] Fox A, Kesingland A, Gentry C, McNair K, Patel S, Urban L, et al. (2001) The role of central and peripheral Cannabinoid1 receptors in the antihyperalgesic activity of cannabinoids in a model of neuropathic pain. *Pain*;92:91-100.

- [26] Gerard NP, et al. (1991) Human Substance P receptor (NK-1): Organization of the gene, chromosome localization, and functional expression of cDNA clones. *Biochemistry* 30:10640-10646.
- [27] Guo H, Huang LY. (2001) Alteration in the voltage dependence of NMDA receptor channels in rat dorsal horn neurones following peripheral inflammation. *J Physiol.* Nov 15;537(Pt 1):115-23.
- [28] Guo J, Ikeda SR (2004) Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons. *Mol Pharmacol* 65:665-674.
- [29] Hama AT, Urban MO. (2004) Antihyperalgesic effect of the cannabinoid agonist WIN55,212-2 is mediated through an interaction with spinal metabotropic glutamate-5 receptors in rats. *Neurosci Lett.* Mar 18;358(1):21-4.
- [30] Handwerker HO (1999) Einführung in die Pathophysiologie des Schmerzes. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo.
- [31] Hardy JD, Wolff HG, Goodell H. (1950) Experimental evidence on the nature of cutaneous hyperalgesia. *J Clin Invest.* Jan; 29(1):115-40.
- [32] Herbert MK, Holzer P. (2002) Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* Jun;37(6):314-25.
- [33] Hofmann, F., Lacinova, L., and Klugbauer, N. (1999) Voltagedependent calcium channels: from structure to function. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 139, 33-7.

- [34] Hohmann AG, Martin WJ, Tsou K, Walker JM. (1995) Inhibition of noxious stimulus-evoked activity of spinal cord dorsal horn neurons by the cannabinoid WIN 55,212-2. *Life Sci.* 56 (23-24):2111-8.
- [35] Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. (1998) Cannabinoid modulation of wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat by spinally administered WIN55,212-2. *Neurosci Lett.* Dec 4;257(3):119-22.
- [36] Hohmann AG, Tsou K, Walker JM. (1999) Cannabinoid suppression of noxious heat-evoked activity in wide dynamic range neurons in the lumbar dorsal horn of the rat. *J Neurophysiol.* Feb;81(2):575-83.
- [37] Hohmann AG, Suplita RL 2nd. (2006) Endocannabinoid mechanisms of pain modulation. *AAPS J.* Nov 17;8(4) 693-708.
- [38] Holdcroft A, Maze M, Doré C et al. (2006) A multicenter dose-escalation study of the analgesic and adverse effects of an oral cannabis extract (Cannador) for postoperative pain management. *Anesthesiology*; 104: 1040-1046.
- [39] Holzer P. (1992) Peptidergic sensory neurons in the control of vascular functions: mechanisms and significance in the cutaneous and splanchnic vascular beds. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*; 121: 49-146.
- [40] Hunt SP, Mantyh PW. (2001) The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci.* Feb;2(2):83-91.
- [41] Hylden JL, Nahin RL, Traub RJ, Dubner R. (1989) Expansion of receptive fields of spinal lamina I projection neurons in rats with unilateral adjuvant-induced inflammation: the contribution of dorsal horn mechanisms. *Pain.* May;37 (2):229-243.

- [42] Ikeda H, Ryu PD, Park JB, Tanifuji M, Asai T, Murase K. (1998) Optical responses evoked by single-pulse stimulation to the dorsal root in the rat spinal dorsal horn in slice. *Brain Res. Nov 23; 812(1-2):81-90.*
- [43] Ikeda, H., Heinke, B., Ruscheweyh, R. and Sandkühler, J., (2003). Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science 299 5610, pp. 1237-1240.*
- [44] Ikeda H, Murase K. (2004) Glial nitric oxide-mediated long-term presynaptic facilitation revealed by optical imaging in rat spinal dorsal horn. *J Neurosci. Nov 3; 24(44):9888-96.*
- [45] Ikeda H, Stark J, Fischer H, Wagner M, Drdla R, Jäger T, Sandkühler J. (2006) Synaptic amplifier of inflammatory pain in the spinal dorsal horn. *Science. Jun 16;312(5780):1659-62.*
- [46] Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K. (2008) Effect of excitatory and inhibitory agents and a glial inhibitor on optically-recorded primary-afferent excitation. *Mol Pain. Sep 26;4:39.*
- [47] Julius D, Basbaum AI (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature. Sep 13; 413(6852):203-10.*
- [48] Kelly S, Chapman V. (2003) Cannabinoid CB1 receptor inhibition of mechanically evoked responses of spinal neurones in control rats, but not in rats with hindpaw inflammation. *Eur J Pharmacol. Aug 8;474(2-3):209-16.*
- [49] Koltzenburg M, Lundberg LE, Torebjörk HE. (1993) Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin. *Pain Jun;53(3):363.*
- [50] Kress M, Reeh PW (1996) Chemical excitation and sensitization in nociceptors.

- [51] Krishtal O. (2003) The ASICs: signaling molecules? Modulators? Trends Neurosci. Sep;26(9): 477-83.
- [52] Lewis T. (1927) The blood vessels of the human skin and their responses. Shaw and sons, London.
- [53] Lewis T. (1936) Experiments relating to cutaneous hyperalgesia and its spread through somatic nerves. Clin Sci 2; 373-423.
- [54] Lin CR, Wang CH, Wu P, Wen ZH, Buerkle H, Yang LC. (2002) Apraclonidine attenuates the increases in spinal excitatory amino acid release in rats with adjuvant-induced inflammation. Anesth Analg. Mar; 94(3):701-5.
- [55] Liu XG, Sandkühler J. (1995) Long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in the rat spinal dorsal horn is prevented by spinal N-methyl-D-aspartic acid receptor blockage. Neurosci Lett. May 19;191(1-2):43-6.
- [56] Liu X, Sandkühler J. (1997) Characterization of long-term potentiation of C-fiber-evoked potentials in spinal dorsal horn of adult rat: essential role of NK1 and NK2 receptors. J Neurophysiol. Oct;78(4):1973-82.
- [57] Luo H, Cheng J, Han JS, Wan Y. (2004) Change of vanilloid receptor 1 expression in dorsal root ganglion and spinal dorsal horn during inflammatory nociception induced by complete Freund's adjuvant in rats. Neuroreport. Mar 22;15(4):655-8.
- [58] Lynn B (1996) Neurogenic inflammation caused by cutaneous polymodal receptors. Prog Brain Res 113:361-368.
- [59] Ma QP, Woolf CJ. (1996) Progressive tactile hypersensitivity: an inflammation-induced incremental increase in the excitability of the spinal cord. Pain. Sep;67(1):97-106.

- [60] Mailleux P, Vanderhaeghen JJ. (1992) Distribution of neuronal cannabinoid receptor in the adult rat brain: a comparative receptor binding radioautography and in situ hybridization histochemistry. *Neuroscience* 48:655-68.
- [61] Martin BR, Compton DR, Thomas BF, et al. (1991) Behavioral, biochemical, and molecular modeling evaluations of cannabinoid analogs. *Pharmacol Biochem Behav.* 40:471-478.
- [62] Martin WJ, Tsou K, Walker JM. (1998) Cannabinoid receptor-mediated inhibition of the rat tail-flick reflex after microinjection into the rostral ventromedial medulla. *Neurosci Lett.* Feb 6;242(1):33-6.
- [63] Martin WJ, Loo CM, Basbaum AI. (1999) Spinal cannabinoids are anti-allodynic in rats with persistent inflammation. *Pain.* Aug;82(2):199-205.
- [64] Martin BR (1999) Cellular effects of cannabinoids. *Pharmacol Rev* 38:45-74.
- [65] Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*;346:561-4.
- [66] Mendell LM, Wall PD (1965) Responses of single dorsal cord cells to peripheral cutaneous unmyelinated fibres *Nature.* Apr 3;206:97-9.
- [67] Mendell LM (1996) Neurotrophins and sensory neurons: role in development, maintenance and injury. A thematic summary. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Mar 29;351(1338):463-7.
- [68] Melzack R, Wall PD. (1965) Pain mechanisms: a new theory. *Science.* Nov 19; 150(699):971-9.

[69] Michaelis M, Häbler HJ, Jäenig W. (1996) Silent afferents: a separate class of primary afferents? *Clin Exp Pharmacol Physiol.* Feb; 23(2):99-105.

[70] Millan MJ, Członkowski A, Morris B, Stein C, Arendt R, Huber A, Höllt V, Herz A. (1988) Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain: influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat. *Pain.* Dec;35(3):299-312.

[71] Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Progr Neurobiol* 57: 1-164.

[72] Moore KA, Baba H, Woolf CJ. (2000) Synaptic transmission and plasticity in the superficial dorsal horn. *Prog Brain Res.*;129:63-80.

[73] Morisset V, Urban L. (2001) Cannabinoid-induced presynaptic inhibition of glutamatergic EPSCs in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. *J Neurophysiol.* Jul; 86(1):40-8.

[74] Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M. (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*; 365:61-5.

[75] Nackley AG, Suplita RL, Hohmann AG. (2003) A peripheral cannabinoid mechanism suppresses spinal fos protein expression and pain behavior in a rat model of inflammation. *Neuroscience* ;117(3):659-70.

[76] Nackley AG, Zvonok AM, Makriyannis A, Hohmann AG. (2004) Activation of cannabinoid CB2 receptors suppresses C-fiber responses and windup in spinal wide dynamic range neurons in the absence and presence of inflammation. *J Neurophysiol.* Dec; 92(6):3562-74.

[77] Neugebauer V, Lücke T, Schaible H-G (1993) N-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptor antagonists block the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *J Neurophysiol* 70:1365-1377.

[78] Neugebauer V, Weiretter F, Schaible H-G (1995) The involvement of substance P and Neurokinin-1 receptors in the hyperexcitability of dorsal horn neurons during development of acute arthritis in rat's knee joint. *J Neurophysiol* 73:1574-1583.

[79] Neugebauer V, Rügenapp P, Schaible H-G (1996) Calcitonin gene-related peptide is involved in the generation and maintenance of hyperexcitability of dorsal horn neurons observed during development of acute inflammation in rat's knee joint. *Neuroscience* 71:1095-1109.

[80] Ohtori S, Takahashi K, Ino H, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H. (2002) Up-regulation of substance P and NMDA receptor mRNA in dorsal horn and preganglionic sympathetic neurons during adjuvant-induced noxious stimulation in rats. *Ann Anat. Jan*;184(1):71-6.

[81] Palazzo E, Marabese I, de Novellis V, Oliva P, Rossi F, Berrino L, Rossi F, Maione S (2001) Metabotropic and NMDA glutamate receptors participate in the cannabinoid-induced antinociception. *Neuropharmacology* 40:319-326.

[82] Pertwee RG. (2005) Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol.*; (168):1-51.

[83] Pertwee RG. (2007) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Mol Neurobiol. Aug*; 36(1):45-59.

[84] Poyner DR. (1992) Calcitonin gene-related peptide: multiple actions, multiple receptors. *Pharmacol Ther.*;56(1):23-51.

- [85] Quartilho A, Mata HP, Ibrahim MM, Vanderah TW, Porreca F, Makriyannis A, Malan TP jr (2003) Inhibition of Inflammatory hyperalgesia by activation of peripheral CB2 cannabinoid receptors. *Anesthesiology* 99:955-960.
- [86] Raja SN, Campbell JN, Meyer RA. (1984) Evidence for different mechanisms of primary and secondary hyperalgesia following heat injury to the glabrous skin. *Brain*. Dec;107 ( Pt 4):1179-88.
- [87] Rea K, Roche M, Finn DP. (2007) Supraspinal modulation of pain by cannabinoids: the role of GABA and glutamate. *Br J Pharmacol*. Nov;152(5):633-48.
- [88] Ren K, Hylden JL, Williams GM, Ruda MA, Dubner R. (1992) The effects of a non-competitive NMDA receptor antagonist, MK-801, on behavioral hyperalgesia and dorsal horn neuronal activity in rats with unilateral inflammation. *Pain*. Sep;50(3):331-44.
- [89] Rexed B (1952) The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp Neurol*. 96, 415-495
- [90] Richardson J. D., Aanonsen L., Hargreaves K. M. (1998) Hypoactivity of the spinal cannabinoid system results in NMDA-dependent hyperalgesia. *J Neurosci*; 18: 451-457.
- [91] Ruda MA, Iadarola MJ, Cohen LV, Young WS (1988) In situ hybridization histochemistry and immunocytochemistry reveal an increase in spinal dynorphin biosynthesis in a rat model of peripheral inflammation and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Jan;85(2):622-6.
- [92] Sandkühler J, (2000) Learning and memory in pain pathways *Pain*. Nov; 88(2):113-8.

- [93] Sanudo-Pena MC, Strangman NM, Mackie K, Walker JM, Tsou K (1999) CB1 receptor localization in rat spinal cord and roots, dorsal root ganglion, and peripheral nerve. *Zhongguo Yao Li Xue Bao*;20:1115-20.
- [94] Schaible H-G, Jarrott B, Hope PJ, Duggan AW (1990) Release of immunoreactive substance P in the cat spinal cord during development of acute arthritis in cat's knee: a study with antibody bearing microprobes. *Brain Res* 529:214-223.
- [95] Schaible H-G, Freudenberger U, Neugebauer V, Stiller U (1994) Intraspinale release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide during development of inflammation in the joint in vivo—a study with antibody microprobes in cat and rat. *Neuroscience* 62:1293-1305.
- [96] Schaible HG, Schmidt RF. (1996) Neurophysiology of chronic inflammatory pain: electrophysiological recordings from spinal cord neurons in rats with prolonged acute and chronic unilateral inflammation at the ankle. *Prog Brain Res.*;110:167-76.
- [97] Schaible H-G, Schmidt RF (2007) Nozizeption und Schmerz. In: Schmidt RF, Lang F, Thews G (eds) *Physiologie des Menschen*, 29. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg New York, S. 318-333
- [98] Schaible H-G (2006) Basic mechanisms of deep somatic tissue. In: McMahon SB, Koltzenburg M (eds) *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Elsevier, London, S. 621-633
- [99] Schaible HG (2007) Pathophysiology of pain. *Orthopäde*. Jan;36(1):8, 10-2, 14-6.
- [100] Scholz J, Woolf CJ. (2002) Can we conquer pain? *Nat Neurosci*. Nov;5 Suppl:1062-7.

- [101] Seybold VS, Galeazza MT, Garry MG, Hargreaves KM. (1995) Plasticity of calcitonin gene related peptide neurotransmission in the spinal cord during peripheral inflammation. *Can J Physiol Pharmacol.* Jul;73(7):1007-14.
- [102] Sherrington C.S., (1906) *The Integrative Action of the Nervous System* (2nd ed.), Yale Univ. Press, New Haven (1906) 1947.
- [103] Smart D, Gunthorpe MJ, Jerman JC, Nasir S, Gray J, Muir AI, Chambers JK, Randall AD, Davis JB (2000) The endogenous lipid anandamide is a full agonist at the human vanilloid receptor (hVR1). *Br J Pharmacol* 129:227-230.
- [104] Strangman NM, Walker JM (1999) Cannabinoid WIN 55,212-2 inhibits the activity-dependent facilitation of spinal nociceptive responses. *J Neurophysiol.* Jul;82(1):472-7.
- [105] Straub H, Kuhnt U, Höhling JM, Köhling R, Gorji A, Kuhlmann D, Tuxhorn I, Ebner A, Wolf P, Pannek HW, Lahl R, Speckmann EJ. (2003) Stimulus-induced patterns of bioelectric activity in human neocortical tissue recorded by a voltage sensitive dye. *Neuroscience.*;121(3):587-604.
- [106] Swett JE, Woolf CJ (1985) The somatotopic organization of primary afferent terminals in the superficial laminae of the dorsal horn of the rat spinal cord. *J Comp Neurol.* Jan 1;231(1):66-77.
- [107] Szabo B, Wallmichrath I, Manthonia P, Pfreundtner C. (2000) Cannabinoids inhibit excitatory neurotransmission in the substantia nigra pars reticulata. *Neuroscience* 97: 89-97.
- [108] Takahashi, T. and Momiyama, A. (1993) Different types of calcium channels mediate central synaptic transmission. *Nature* 366, 156-158.

- [109] Takahashi KA, and Linden DJ. (2000) Cannabinoid receptor modulation of synapses received by cerebellar Purkinje cells. *J Neurophysiol* 83: 1167-1180.
- [110] Treede RD, Meyer RA, Raja SN, Campbell JN (1992) Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. *Prog Neurobiol.*;38(4):397-421.
- [111] Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH et al. (1999) The cortical representation of pain. *Pain* 79: 105-111.
- [112] Tsou K, Lowitz KA, Hohmann AG, Martin WJ, Hathaway CB, Bereiter DA, Walker JM. (1996) Suppression of noxious stimulus-evoked expression of Fos protein-like immunoreactivity in rat spinal cord by a selective cannabinoid agonist. *Neuroscience*. Feb;70(3):791-8.
- [113] Tsou K, Brown S, Sanudo-Pena MC, Mackie K, Walker JM. (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience*;83:393-411.
- [114] Urban L, Thompson SWN, Dray A (1994) Modulation of spinal excitability: cooperation between neurokinin and excitatory amino acid transmitters. *Trends Neurosci* 17:432-438.
- [115] Vanegas H, Schaible H-G (2001) Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. *Prog Neurobiol* 64:327-363.
- [116] Vasquez E, Bär KJ, Ebersberger A, Klein B, Vanegas H, Schaible H-G (2001) Spinal prostaglandins are involved in the development but not the maintenance of inflammation-induced spinal hyperexcitability. *J Neurosci* 21:9001-9008.
- [117] Vogt BA (2005) Pain and emotion. Interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nature Rev Neurosci* 6: 533-544.

- [118] Waldmann R, Champigny G, Bassilana F, Heurteaux C, Lazdunski M. (1997) A proton-gated cation channel involved in acid-sensing. *Nature*. Mar 13;386(6621):173-7.
- [119] Walker JM, Huang SM, Strangman NM, Tsou K, Sanudo-Pena MC (1999) Pain modulation by release of the endogenous cannabinoid anandamide. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:12198-12203.
- [120] Walker JM, Hohmann AG. (2005) Cannabinoid mechanisms of pain suppression. *Handb Exp Pharmacol.*;(168):509-54.
- [121] Wall PD, Melzack R, (1999) *Textbook of pain*, Churchill Livingstone, London.
- [122] Willis WD, Westlund KN. (1997) Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol*. Jan;14(1):2-31.
- [123] Willis WD, Coggeshall RE (2004) *Sensory mechanisms of the spinal cord*, 3rd edn. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- [124] Woolf CJ (1983) Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306:686-688.
- [125] Woolf CJ, King AE. (1990) Dynamic alterations in the cutaneous mechanoreceptive fields of dorsal horn neurons in the rat spinal cord. *J Neurosci*. Aug;10(8):2717-26.
- [126] Xu GY, Huang LY, Zhao ZQ (2000) Activation of silent mechanoreceptive cat C and Adelta sensory neurons and their substance P expression following peripheral inflammation. *J Physiol*. Oct 15;528 Pt 2:339-48.
- [127] Zhang RX, Lao L, Qiao JT, Ruda MA. (2004) Effects of aging on hyperalgesia and spinal dynorphin expression in rats with peripheral inflammation *Brain Res*. Feb 27;999(1):135-41.

[128] Zhang W, Liu LY, Xu TL. (2008) Reduced potassium-chloride co-transporter expression in spinal cord dorsal horn neurons contributes to inflammatory pain hypersensitivity in rats. *Neuroscience*. Mar 18;152(2):502-10. Epub 2008 Jan 8.

[129] Ziskind-Conhaim L, Redman S. (2005 ) Spatiotemporal patterns of dorsal root-evoked network activity in the neonatal rat spinal cord: optical and intracellular recordings. *J Neurophysiol*. Sep;94(3):1952-61

## 7. Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Freundin Ninja M. Lehnert bedanken, die mich während der gesamten Promotionszeit konstruktiv unterstützt und angetrieben hat. Sie spendet mir Licht, wenn es zu dunkel wird und erhellt mein Leben in jeder erdenklichen Art.

Frau Prof. Dr. med. E. Pogatzki-Zahn möchte ich für die freundliche Überlassung des interessanten Themas danken.

Ebenfalls möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. H. Straub bedanken, die mich sowohl in der experimentellen Phase als auch in der darauf folgenden Zeit hervorragend betreut hat. Sie war immer zu einer konstruktiven Diskussion bereit und hat die Promotionszeit auch durch die unterhaltsamen Gespräche zu einem freudigen Unterfangen gemacht.

Mein Dank gilt auch sämtlichen nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern des physiologischen Instituts, die mir immer in den entscheidenden Momenten hilfreich beiseite standen.

Recht herzlich bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. N. Mertes, dessen unermüdliches Engagement mir erst die Vollendung dieser Arbeit ermöglicht hat.

Ein weiterer Dank gebührt meinen Geschwistern und meinem guten Freund Stefan Born, durch deren zeitweise eingesprühte Zerstreuung und Ermunterung ich immer wieder einen neuen Ansatz in der Arbeit gefunden habe.

Zuletzt möchte ich mich insbesondere bei meinen lieben Eltern bedanken, denen diese Arbeit gewidmet ist. Sie haben mir mein medizinisches Studium ermöglicht und mich in jeder erdenklichen Phase meines Lebens durch ihre fürsorgliche Art unterstützt und wegweisend beraten.

## **8. Lebenslauf**

## 9. Anhang

### 9.1 Statistische Daten

Lamina I/II	50% Reizintensität		
Peak zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	89,06+/-5,57%	90,58+/-8,22%	75,67+/-9,32%
mit Entzündung DMSO n=8	92,31+/-0,42%	78,91+/-7,15%	87,73+/-6,17%
ohne Entzündung YII n=3	92,97+/-5,09%	83,19+/-8,06%	73,78+/-4,70%
ohne Entzündung DMSO n=5	94,23+/-5,16%	87,95+/-10,76%	93,10+/-6,48%
One Way ANOVA (p)	0,919	0,763	0,24

Tab.1

Lamina I/II	50% Reizintensität		
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	96,15+/-4,79%	87,70+/-6,75%	84,33+/-7,03%
mit Entzündung DMSO n=8	95,91+/-6,21%	84,96+/-5,60%	78,41+/-4,50%
ohne Entzündung YII n=3	89,82+/-6,91%	80,98+/-7,21%	72,40+/-4,27%
ohne Entzündung DMSO n=5	93,23+/-1,84%	95,79+/-2,73%	88,33+/-7,19%
One Way ANOVA (p)	0,913	0,576	0,418

Tab.2

Lamina I/II	50% Reizintensität		
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	123,39+/-28,36%	108,44+/-38,40%	116,24+/-45,16%
mit Entzündung DMSO n=8	108,63+/-0,00%	89,30+/-23,40%	91,57+/-27,76%
ohne Entzündung YII n=3	100,00+/-19,85%	108,22+/-13,97%	103,89+/-12,04%
ohne Entzündung DMSO n=5	121,42+/-9,52%	122,85+/-6,99%	84,95+/-6,02%
One Way ANOVA (p)	0,894	0,775	0,851

Tab.3

Lamina III	50% Reizintensität		
Peak zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	86,904+/-7,73%	83,58+/-9,96%	85,88+/-15,52%
mit Entzündung DMSO n=8	100+/-13,14%	86,22+/-13,92%	90+/-11,59%
ohne Entzündung YII n=3	95,55+/-0,0%	102,50+/-5,46%	96,94+/-4,44%
ohne Entzündung DMSO n=5	99,27+/-10,47%	90,41+/-4,10%	88,95+/-11,20%
One Way ANOVA (p)	0,506	0,524	0,941

Tab.4

Lamina III	50% Reizintensität		
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	94,22+/-4,63%	84,05+/-8,85%	85,57+/-9,74%
mit Entzündung DMSO n=8	91,42+/-8,41%	83,49+/-13,02%	75,97+/-18,32%
ohne Entzündung YII n=3	103,88+/-4,44%	98,33+/-5,73%	103,61+/-3,44%
ohne Entzündung DMSO n=5	97,22+/-5,62%	99,66+/-4,73%	88,22+/-7,81%
One Way ANOVA (p)	0,518	0,308	0,235

Tab. 5

Lamina III	50% Reizintensität		
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	109,49+/-22,96%	79,20+/-28,11%	98,09+/-34,63%
mit Entzündung DMSO n=8	102,57+/-3,34%	87,38+/-14,25%	86,93+/-14,25%
ohne Entzündung YII n=3	106,48+/-14,49%	102,77+/-13,62%	102,77+/-12,42%
ohne Entzündung DMSO n=5	117,12+/-7,25%	125,07+/-6,81%	78,93+/-6,21%
One Way ANOVA (p)	0,935	0,374	0,894

Tab. 6

Lamina I/IV	50% Reizintensität		
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	103,61+/-11,14%	81,11+/-16,48%	88,05+/-17,27%
mit Entzündung DMSO n=8	102,08+/-6,67%	73,21+/-7,64%	76,04+/-16,90%
ohne Entzündung YII n=3	93,33+/-12,67%	85,00+/-5,63%	102,77+/-3,67%
ohne Entzündung DMSO n=5	110,00+/-12,75%	103,33+/-13,33%	106,66+/-10,34%
One Way ANOVA (p)	0,897	0,325	0,241

Tab.7

Lamina I/IV	50% Reizintensität		
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	115,32+/-21,32%	88,05+/-28,59%	93,28+/-29,94%
mit Entzündung DMSO n=8	102,50+/-2,76%	83,59+/-22,36%	74,54+/-20,35%
ohne Entzündung YII n=3	114,53+/-11,60%	100,18+/-8,62%	96,01+/-7,15%
ohne Entzündung DMSO n=5	90,47+/-5,80%	123,72+/-4,31%	80,98+/-3,57%
One Way ANOVA (p)	0,653	0,403	0,814

Tab.8

Lamina I/II	100% Reizintensität		
Peak zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	98,58+/-6,82%	83,35+/-3,64%	74,95+/-6,12%
mit Entzündung DMSO n=8	89,35+/-7,58%	80,76+/-4,82%	74,98+/-5,00%
ohne Entzündung YII n=3	90,41+/-8,01%	86,92+/-6,93%	79,19+/-4,67%
ohne Entzündung DMSO n=5	95,82+/-2,59%	89,35+/-9,90%	81,95+/-5,38%
One Way ANOVA (p)	0,767	0,829	0,769

Tab..9

Lamina I/II	100% Reizintensität		
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	98,78+/-4,75%	83,63+/-4,27%	77,15+/-4,83%
mit Entzündung DMSO n=8	94,97+/-2,68%	96,69+/-2,16%	81,54+/-3,95%
ohne Entzündung YII n=3	87,11+/-13,50%	80,32+/-14,37%	78,28+/-11,14%
ohne Entzündung DMSO n=5	89,00+/-4,64%	80,16+/-8,12%	78,83+/-7,08%
One Way ANOVA (p)	0,884	0,668	0,985

Tab.10

Lamina I/II	100% Reizintensität		
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	84,05+/-10,86%	57,22+/-15,67%	66,24+/-12,82%
mit Entzündung DMSO n=8	85,77+/-14,79%	104,04+/-12,85%	77,68+/-1,03%
ohne Entzündung YII n=3	83,36+/-12,52%	65,53+/-23,79%	76,83+/-11,80%
ohne Entzündung DMSO n=5	96,77+/-5,60%	110,87+/-10,64%	86,55+/-5,28%
One Way ANOVA (p)	0,866	0,206	0,675

Tab.11

Lamina III	100% Reizintensität		
Peak zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	91,77+/-2,96%	88,94+/-8,08%	78,10+/-6,06%
mit Entzündung DMSO n=8	92,20+/-5,53%	82,92+/-1,97%	75,09+/-17,94%
ohne Entzündung YII n=3	89,17+/-5,84%	78,46+/-8,18%	91,45+/-4,93%
ohne Entzündung DMSO n=5	97,68+/-4,00%	96,75+/-7,19%	92,52+/-7,45%
One Way ANOVA (p)	0,771	0,535	0,272

Tab.3.12

Lamina III	100% Reizintensität		
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	99,04+/-5,02%	87,27+/-5,16%	76,81+/-4,78%
mit Entzündung DMSO n=8	105,37+/-6,50%	105,98+/-3,15%	84,87+/-13,73%
ohne Entzündung YII n=3	87,30+/-10,51%	79,76+/-12,49%	86,90+/-8,31%
ohne Entzündung DMSO n=5	92,32+/-4,56%	88,74+/-11,22%	88,56+/-7,90%
One Way ANOVA (p)	0,539	0,387	0,765

Tab.3.13

Lamina III	100% Reizintensität		
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	130,52+/-32,43%	104,26+/-33,30%	111,80+/-37,79%
mit Entzündung DMSO n=8	135,79+/-12,39%	117,46+/-14,30%	93,64+/-7,19%
ohne Entzündung YII n=3	77,87+/-50,02%	62,26+/-25,45%	71,35+/-24,53%
ohne Entzündung DMSO n=5	103,12+/-22,37%	100,16+/-11,38%	77,50+/-10,97%
One Way ANOVA (p)	0,819	0,656	0,785

Tab.14

Lamina I/IV	100% Reizintensität		
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	102,77+/-10,13%	96,66+/-12,29%	85,00+/-8,06%
mit Entzündung DMSO n=8	115,68+/-8,46%	122,67+/-8,46%	87,26+/-33,36%
ohne Entzündung YII n=3	83,80+/-16,17%	83,80+/-21,53%	101,26+/-17,33%
ohne Entzündung DMSO n=5	75,33+/-10,41%	80,33+/-8,37%	73,66+/-13,00%
One Way ANOVA (p)	0,200	0,311	0,820

Tab.15

Lamina I/IV 500ms zum Zeitpunkt	100% Reizintensität		
	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung YII n=6	124,30+/-24,46%	96,34+/-23,65%	101,15+/-24,83%
mit Entzündung DMSO n=8	122,94+/-9,28%	96,26+/-19,79%	76,56+/-12,89%
ohne Entzündung YII n=3	63,33+/-32,23%	57,85+/-17,73%	62,44+/-14,16%
ohne Entzündung DMSO n=5	83,50+/-14,41%	106,83+/-7,93%	68,75+/-6,33%
One Way ANOVA (p)	0,454	0,531	0,497

Tab.16

Tab.1-16: Statistische Daten der bioelektrischen Signale der Lamina I-IV nach Rexed. Die nach Schicht und Versuchsphase geordneten Daten geben den Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) wieder. Die Signifikanz p wurde mit dem One Way ANOVA-Test untersucht. Die Zeitpunkte t=10 bis t=30 sind Zeitpunkte aus der Versuchsphase in denen der Lösungsvermittler DMSO (0,1 µmol) appliziert wurde. Die einzelnen Tabellen geben jeweils den Peak, als Zeitpunkt der stärksten Deflektion, den 25ms Zeitpunkt, sowie den 500ms Zeitpunkt nach Reizung an. 50% Reizintensität entspricht 5 µA, 100% Reizintensität entspricht 10 µA

Lamina I/II Peak zum Zeitpunkt	Reizintensität 50%		
	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	99,89+/-5,32%	96,62+/-5,15%	91,07+/-8,06%
mit Entzündung Kontrolle n=8	92,31+/-5,09%	78,91+/-8,06%	87,73+/-4,70%
ohne Entzündung WIN n=7	106,02+/-4,81%	98,74+/-2,30%	92,86+/-3,74%
ohne Entzündung Kontrolle n=5	94,23+/-5,16%	87,95+/-10,76%	93,10+/-6,48%
One Way ANOVA (p)	0,351	0,146	0,954

Tab.17

Lamina I/II 25ms zum Zeitpunkt	Reizintensität 50%		
	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	100,23+/-2,96%	90,11+/-2,33%	86,97+/-3,70%
mit Entzündung Kontrolle n=8	95,91+/-6,91%	84,96+/-7,21%	78,41+/-4,27%
ohne Entzündung WIN n=7	104,55+/-6,78%	93,88+/-9,59%	95,05+/-12,90%
ohne Entzündung Kontrolle n=5	93,23+/-1,84%	95,79+/-2,73%	88,33+/-7,19%
One Way ANOVA (p)	0,524	0,639	0,451

Tab.18

Lamina I/II 500ms zum Zeitpunkt	Reizintensität 50%		
	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	127,27+/-8,60%	117,84+/-10,70%	101,82+/-7,53%
mit Entzündung Kontrolle n=8	108,63+/-19,85%	89,30+/-13,97%	91,57+/-12,04%
ohne Entzündung WIN n=7	85,19+/-12,72%	94,83+/-14,49%	80,96+/-12,75%
ohne Entzündung Kontrolle n=5	121,42+/-9,92%	122,85+/-6,99%	84,95+/-6,02%
One Way ANOVA (p)	0,149	0,208	0,448

Tab.19

Lamina III Peak zum Zeitpunkt	Reizintensität 50%		
	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	105,80+/-9,43%	102,92+/-6,45%	86,06+/-9,24%
mit Entzündung DMSO n=8	100,00+/-0,00%	86,22+/-5,46%	90,00+/-4,44%
ohne Entzündung WIN n=7	100,76+/-5,16%	98,00+/-1,83%	92,95+/-3,59%
ohne Entzündung DMSO n=5	99,27+/-10,47%	90,41+/-4,10%	88,95+/-11,20%
One Way ANOVA (p)	0,925	0,159	0,939

Tab.20

Lamina III 25ms zum Zeitpunkt	Reizintensität 50%		
	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	105,02+/-5,72%	99,91+/-5,56%	91,833+/-5,70%
mit Entzündung DMSO n=8	91,42+/-4,44%	83,49+/-5,73%	75,97+/-3,44%
ohne Entzündung WIN n=7	96,28+/-2,09%	86,34+/-7,00%	83,89+/-3,98%
ohne Entzündung DMSO n=5	97,22+/-5,62%	99,66+/-4,73%	88,22+/-7,81%
One Way ANOVA (p)	0,255	0,133	0,185

Tab.21

Lamina III 500ms zum Zeitpunkt	Reizintensität 50%		
	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	110,04+/-5,09%	96,90+/-7,44%	95,60+/-8,55%
mit Entzündung DMSO n=8	102,57+/-14,49%	87,38+/-13,62%	86,93+/-12,42%
ohne Entzündung WIN n=7	87,38+/-11,97%	89,89+/-12,71%	70,35+/-8,48%
ohne Entzündung DMSO n=5	117,12+/-7,25%	125,07+/-6,81%	78,93+/-6,21%
One Way ANOVA (p)	0,275	0,162	0,296

Tab.22

Lamina I/IV	Reizintensität 50%		
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	122,40+/-21,44%	96,55+/-7,64%	105,91+/-15,97%
mit Entzündung DMSO n=8	102,08+/-12,67%	73,21+/-5,63%	76,04+/-3,67%
ohne Entzündung WIN n=7	98,09+/-4,71%	89,04+/-5,62%	81,74+/-5,25%
ohne Entzündung DMSO n=5	110,00+/-12,75%	103,33+/-13,33%	106,66+/-10,34%
One Way ANOVA (p)	0,739	0,091	0,232

Tab.23

Lamina I/IV	Reizintensität 50%		
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	115,64+/-4,68%	102,94+/-8,74%	100,72+/-9,04%
mit Entzündung DMSO n=8	102,50+/-11,60%	83,59+/-8,62%	74,54+/-7,15%
ohne Entzündung WIN n=7	103,42+/-25,27%	101,10+/-27,57%	75,09+/-10,04%
ohne Entzündung DMSO n=5	90,47+/-5,80%	123,72+/-4,31%	80,98+/-3,57%
One Way ANOVA (p)	0,616	0,402	0,092

Tab.24

Lamina I/II	Reizintensität 100%		
Peak zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	93,26+/-3,53%	93,61+/-4,84%	87,88+/-3,77%
mit Entzündung DMSO n=8	89,35+/-8,01%	80,76+/-6,93%	74,98+/-4,67%
ohne Entzündung WIN n=7	91,49+/-3,54%	89,78+/-2,04%	87,52+/-1,75%
ohne Entzündung DMSO n=5	95,82+/-2,59%	89,35+/-9,90%	81,95+/-5,38%
One Way ANOVA (p)	0,872	0,431	0,100

Tab.25

Lamina I/II	Reizintensität 100%		
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	96,53+/-2,64%	91,33+/-2,22%	84,63+/-1,73%
mit Entzündung DMSO n=8	94,97+/-13,50%	96,69+/-14,37%	81,54+/-11,14%
ohne Entzündung WIN n=7	91,53+/-2,01%	91,18+/-2,51%	81,13+/-5,00%
ohne Entzündung DMSO n=5	89,00+/-4,64%	80,16+/-8,12%	78,83+/-7,08%
One Way ANOVA (p)	0,895	0,637	0,936

Tab.26

Lamina I/II	Reizintensität 100%		
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	96,71+/-6,83%	99,08+/-8,77%	84,10+/-8,39%
mit Entzündung DMSO n=8	85,77+/-12,52%	104,04+/-23,79%	77,68+/-11,80%
ohne Entzündung WIN n=7	83,41+/-11,04%	109,96+/-24,13%	89,81+/-9,91%
ohne Entzündung DMSO n=5	96,77+/-5,60%	110,87+/-10,64%	86,55+/-5,28%
One Way ANOVA (p)	0,664	0,957	0,859

Tab.27

Lamina III	Reizintensität 100%		
Peak zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	85,78+/-8,88%	93,03+/-3,25%	86,30+/-2,74%
mit Entzündung DMSO n=8	92,20+/-5,84%	82,92+/-8,18%	75,09+/-4,93%
ohne Entzündung WIN n=7	89,53+/-3,57%	87,54+/-2,67%	84,25+/-2,73%
ohne Entzündung DMSO n=5	97,68+/-4,00%	96,75+/-7,19%	92,52+/-7,45%
One Way ANOVA (p)	0,762	0,355	0,070

Tab.28

Lamina III	Reizintensität 100%		
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	95,80+/-3,49%	103,33+/-7,15%	86,55+/-2,96%
mit Entzündung DMSO n=8	105,37+/-10,51%	105,98+/-12,49%	84,87+/-8,31%
ohne Entzündung WIN n=7	93,30+/-3,41%	89,40+/-3,89%	84,24+/-3,69%
ohne Entzündung DMSO n=5	92,32+/-4,56%	88,74+/-11,22%	88,56+/-7,90%
One Way ANOVA (p)	0,483	0,457	0,963

Tab.29

Lamina III	Reizintensität 100%		
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	94,12+/-5,82%	91,81+/-8,56%	80,21+/-8,00%
mit Entzündung DMSO n=8	135,79+/-50,02%	117,46+/-25,45%	93,64+/-24,35%
ohne Entzündung WIN n=7	85,62+/-12,70%	105,13+/-19,15%	87,03+/-13,67%
ohne Entzündung DMSO n=5	103,12+/-22,37%	100,16+/-11,38%	77,50+/-10,97%
One Way ANOVA (p)	0,576	0,704	0,889

Tab.30

Lamina I/IV 25ms zum Zeitpunkt	Reizintensität 100%		
	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	97,02+/-6,15%	92,79+/-5,59%	88,61+/-4,94%
mit Entzündung DMSO n=8	115,68+/-16,17%	122,67+/-21,53%	87,26+/-17,33%
ohne Entzündung WIN n=7	94,98+/-6,35%	95,22+/-3,71%	84,63+/-6,28%
ohne Entzündung DMSO n=5	75,33+/-10,41%	80,33+/-8,37%	73,66+/-13,00%
One Way ANOVA (p)	0,130	0,140	0,816

Tab.31

Lamina I/IV 500ms zum Zeitpunkt	Reizintensität 100%		
	t=10	t=20	t=30
mit Entzündung WIN n=12	88,80+/-6,66%	92,68+/-7,40%	81,77+/-7,45%
mit Entzündung DMSO n=8	122,94+/-32,33%	96,26+/-17,73%	76,56+/-14,16%
ohne Entzündung WIN n=7	86,92+/-%	94,34+/-13,78%	92,84+/-15,36%
ohne Entzündung DMSO n=5	83,50+/-14,41%	106,83+/-7,93%	68,75+/-6,33%
One Way ANOVA (p)	0,437	0,894	0,618

Tab.32

Tab.17-32: Statistische Daten der bioelektrischen Signale der Lamina I-IV nach Rexed. Die nach Schicht und Versuchsphase geordneten Daten geben den Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) wieder. Die Signifikanz p wurde mit dem One Way ANOVA-Test untersucht. Die Zeitpunkte t=10 bis t=30 sind Zeitpunkte aus der Versuchsphase in denen WIN55,212-22 (10 µmol) + DMSO (0,1 µmol) appliziert wurde. Die einzelnen Tabellen geben jeweils den Peak, als Zeitpunkt der stärksten Deflektion, den 25ms Zeitpunkt, sowie den 500ms Zeitpunkt nach Reizung an. 50% Reizintensität entspricht 5 µA, 100% Reizintensität entspricht 10 µA

		50% Reizintensität					
		t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100
Lamina I/II	Peak zum Zeitpunkt						
mit Entzündung APV&CNQX n=11		100,89+/-3,51%	88,32+/-3,61%	85,68+/-3,86%	37,98+/-3,97%	27,48+/-3,78%	64,46+/-4,04%
Kontrolle (entzündet) YII n=6		89,06+/-5,57%	90,58+/-8,22%	75,67+/-9,32%	70,95+/-4,82%	70,63+/-2,18%	46,06+/-5,11%
t-Test (p)		0,078	0,774	0,259	<0,001	<0,001	0,014

Tab.33

		50% Reizintensität					
		t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100
Lamina I/II	25ms zum Zeitpunkt						
mit Entzündung APV&CNQX n=11		87,99+/-2,18%	79,72+/-1,24%	70,49+/-2,26%	35,53+/-3,09%	28,38+/-1,04%	60,25+/-2,54%
Kontrolle (entzündet) YII n=6		96,15+/-4,79%	87,70+/-6,75%	84,33+/-7,03%	69,65+/-4,84%	69,12+/-5,23%	53,80+/-6,52%
t-Test (p)		0,094	0,141	0,034	<0,001	<0,001	0,287

Tab.34

		50% Reizintensität					
		t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100
Lamina I/II	500ms zum Zeitpunkt						
mit Entzündung APV&CNQX n=11		92,92+/-6,27%	83,98+/-4,49%	70,83+/-5,34%	47,42+/-6,16%	38,01+/-2,88%	73,9+/-3,90%
Kontrolle (entzündet) YII n=6		123,39+/-28,36%	108,44+/-38,40%	116,24+/-45,16%	71,08+/-9,92%	95,59+/-19,34%	80,93+/-19,9%
t-Test (p)		0,188	0,4	0,192	0,049	0,001	0,646

Tab.35

		50% Reizintensität					
		t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100
Lamina III	25ms zum Zeitpunkt						
mit Entzündung APV&CNQX n=11		83,28+/-3,75%	80,08+/-1,89%	68,63+/-4,09%	32,90+/-2,32%	25,92+/-2,28%	61,20+/-2,67%
Kontrolle (entzündet) YII n=6		94,23+/-4,63%	84,06+/-8,85%	85,57+/-9,74%	75,88+/-7,30%	68,16+/-8,21%	53,74+/-9,37%
t-Test (p)		0,095	0,571	0,079	<0,001	<0,001	0,345

Tab.36

		50% Reizintensität					
		t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100
Lamina III	500ms zum Zeitpunkt						
mit Entzündung APV&CNQX n=11		96,75+/-9,44%	95,25+/-9,29%	79,25+/-8,90%	52,50+/-7,98%	40,80+/-4,36%	79,86+/-4,70%
Kontrolle (entzündet) YII n=6		109,49+/-22,96%	79,20+/-28,11%	98,09+/-34,63%	74,45+/-9,66%	85,71+/-15,01%	83,48+/-18,50%
t-Test (p)		0,552	0,512	0,507	0,112	0,002	0,81

Tab.37

		50% Reizintensität					
		t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100
Lamina III	Peak zum Zeitpunkt						
mit Entzündung APV&CNQX n=11		96,90+/-6,29%	89,28+/-2,01%	89,07+/-3,97%	38,41+/-3,50%	24,91+/-4,48%	61,14+/-2,88%
Kontrolle (entzündet) YII n=6		86,90+/-7,73%	83,58+/-9,96%	85,88+/-15,25%	69,20+/-8,78%	66,31+/-8,91%	51,90+/-3,94%
t-Test (p)		0,346	0,469	0,798	0,001	<0,001	0,077

Tab.38

Tab.39							
Lamina I/V	50% Reizintensität						
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100	
mit Entzündung APV&CNQX n=11	90,90+/-4,64%	88,26+/-4,76%	71,75+/-7,94%	36,21+/-3,69%	30,19+/-2,77%	73,64+/-5,80%	
Kontrolle (entzündet) YII n=6	103,61+/-11,14%	81,11+/-16,48%	88,06+/-17,27%	65,56+/-7,54%	78,61+/-10,00%	59,84+/-10,91%	
t-Test (p)	0,233	0,605	0,339	0,001	<0,001	0,236	
Tab.40							
Lamina I/V	50% Reizintensität						
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100	
mit Entzündung APV&CNQX n=11	102,55+/-10,19%	93,97+/-10,64%	80,60+/-12,78%	62,83+/-11,06%	46,96+/-6,84%	76,08+/-11,75%	
Kontrolle (entzündet) YII n=6	115,32+/-21,32%	88,05+/-28,59%	93,28+/-29,94%	73,88+/-2,75%	90,04+/-20,40%	65,88+/-9,11%	
t-Test (p)	0,547	0,818	0,654	0,482	0,026	0,567	
Tab.41							
Lamina I/II	100% Reizintensität						
Peak zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100	
mit Entzündung APV&CNQX n=11	91,75+/-2,70%	88,94+/-1,89%	60,04+/-4,09%	41,48+/-2,93%	45,71+/-3,38%	64,52+/-3,28%	
Kontrolle (entzündet) YII n=6	98,58+/-6,82%	83,35+/-3,64%	74,95+/-6,12%	76,22+/-7,67%	57,47+/-7,46%	56,57+/-4,46%	
t-Test (p)	0,284	0,149	0,054	<0,001	0,118	0,171	
Tab.42							
Lamina I/II	100% Reizintensität						
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100	
mit Entzündung APV&CNQX n=11	83,10+/-2,29%	82,05+/-2,20%	49,05+/-3,31%	35,98+/-3,37%	37,20+/-1,89%	57,58+/-3,06%	
Kontrolle (entzündet) YII n=6	98,78+/-4,75%	83,63+/-4,27%	77,16+/-4,83%	77,2+/-6,26%	59,62+/-10,03%	52,44+/-7,52%	
t-Test (p)	0,004	0,718	<0,001	<0,001	0,01	0,464	
Tab.43							
Lamina I/II	100% Reizintensität						
500ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100	
mit Entzündung APV&CNQX n=11	87,18+/-3,42%	82,72+/-2,29%	52,82+/-6,70%	44,73+/-3,52%	43,73+/-3,44%	71,77+/-4,09%	
Kontrolle (entzündet) YII n=6	84,05+/-10,86%	57,22+/-15,67%	66,24+/-12,82%	73,39+/-10,78%	60,76+/-11,02%	62,71+/-10,78%	
t-Test (p)	0,735	0,045	0,319	0,007	0,084	0,359	
Tab.44							
Lamina III	100% Reizintensität						
Peak zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100	
mit Entzündung APV&CNQX n=11	93,54+/-1,28%	90,13+/-3,38%	60,30+/-3,39%	45,64+/-1,93%	46,11+/-1,91%	61,53+/-2,62%	
Kontrolle (entzündet) YII n=6	91,77+/-2,96%	88,94+/-8,08%	78,10+/-6,06%	69,14+/-6,93%	63,69+/-5,17%	53,33+/-2,01%	
t-Test (p)	0,529	0,875	0,014	<0,001	0,002	0,052	
Tab.45							
Lamina III	100% Reizintensität						
25ms zum Zeitpunkt	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100	
mit Entzündung APV&CNQX n=11	80,27+/-2,19%	75,57+/-2,27%	44,91+/-2,80%	34,00+/-4,99%	33,10+/-0,96%	57,14+/-3,22%	
Kontrolle (entzündet) YII n=6	99,04+/-5,02%	87,28+/-5,16%	76,81+/-4,78%	77,71+/-5,27%	62,22+/-9,58%	56,78+/-6,00%	
t-Test (p)	0,001	0,029	<0,001	<0,001	<0,001	0,954	

Lamina III 500ms zum Zeitpunkt mit Entzündung APV&CNQX n=11	100% Reizintensität					
	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100
Kontrolle (entzündet) YII n=6	84,66+/-4,49%	85,23+/-2,91%	49,92+/-6,22%	51,31+/-8,10%	47,51+/-3,74%	77,26+/-5,49%
t-Test (p)	130,52+/-32,43%	104,26+/-33,30%	111,80+/-37,79%	82,07+/-3,87%	72,69+/-14,69%	70,58+/-14,54%
	0,076	0,445	0,046	0,017	0,049	0,611

Tab.46

Lamina I/V 25ms zum Zeitpunkt mit Entzündung APV&CNQX n=11	100% Reizintensität					
	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100
Kontrolle (entzündet) YII n=6	82,08+/-3,55%	77,97+/-3,54%	60,92+/-13,81%	51,25+/-8,79%	44,32+/-6,55%	66,98/-5,66%
t-Test (p)	102,78+/-10,13%	96,67+/-12,29%	85,00+/-8,06%	74,44+/-10,63%	72,78+/-9,44%	56,11+/-4,67%
	0,032	0,083	0,244	0,125	0,023	0,219

Tab.47

Lamina I/V 500ms zum Zeitpunkt mit Entzündung APV&CNQX n=11	100% Reizintensität					
	t=10	t=20	t=30	t=40	t=50	t=100
Kontrolle (entzündet) YII n=6	85,45+/-5,12%	83,19+/-4,10%	53,58+/-7,91%	59,80+/-10,40%	55,28+/-6,74%	78,92+/-4,97%
t-Test (p)	124,30+/-24,46%	96,34+/-23,65%	101,15+/-24,83%	97,77+/-7,98%	77,12+/-12,36%	76,99+/-10,58%
	0,058	0,474	0,038	0,026	0,109	0,852

Tab.48

Tab.33-48: Statistische Daten der bioelektrischen Signale der Lamina I-IV nach Rexed. Die nach Schicht und Versuchsphase geordneten Daten geben den Mittelwert +/- SEM (Standardfehler des Mittelwertes) wieder. Die Signifikanz p wurde mit dem One Way ANOVA-Test untersucht. Die Zeitpunkte t=10 bis t=30 sind Zeitpunkte aus der Versuchsphase in denen APV(50µmol)+DMSO(0,1µmol) appliziert wurde. Die Zeitpunkte t=40 und t=50 repräsentieren die Applikation von APV(50µmol)+CNQX(10µmol)+DMSO(0,1µmol). Die einzelnen Tabellen geben jeweils den Peak, als Zeitpunkt der stärksten Deflektion, den 25ms Zeitpunkt, sowie den 500ms Zeitpunkt nach Reizung an. 50% Reizintensität entspricht 5µA, 100% Reizintensität entspricht 10µA

## 9.2 Tierexperimentelle Genehmigung



### Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Gegen Empfangsbekanntnis

Herrn

Prof. Dr. med. Erwin-Josef Speckmann

Institut für Physiologie

-Institut für Experimentelle Epilepsie-  
forschung-

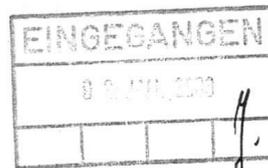
des Universitätsklinikums Münster

Robert-Koch-Str. 27 a

48149 Münster

Dienstgebäude:  
Domplatz 1-3  
Telefon: (0251) 411-0  
Durchwahl: 2110  
Telefax: 2115  
Raum: 431  
Auskunft erteilt:  
Frau Möllers  
E-Mail:  
irmgard.moellers@bezreg-muenster.nrw.de  
Aktenzeichen:  
50.0835.1.0 (G 79/2002)

19. Dez. 2002



**Tierschutz;**

**Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren**

Ihr Antrag vom 10.10.2002, hier eingegangen am 06.11.2002

**Genehmigungsbescheid:**

Sehr geehrter Herr Professor Speckmann,

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

**„Experimentelle Epilepsieforschung“. (10 Teilprojekte gem. Antrag)**

Leiter des Versuchsvorhabens und seine Stellvertreter sind:

Herr  
Prof. Dr. med. E.-J. Speckmann  
Institut für Physiologie  
-Institut für Experimentelle  
Epilepsieforschung-  
des Universitätsklinikums Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a  
48149 Münster

Frau  
Prof. Dr. rer. nat. Heidrun Straub  
Institut für Physiologie  
des Universitätsklinikums Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a  
48149 Münster

**Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411-3300**

E-Mail: [poststelle@bezreg-muenster.nrw.de](mailto:poststelle@bezreg-muenster.nrw.de) • Internet: [www.bezreg-muenster.nrw.de](http://www.bezreg-muenster.nrw.de)  
zentrale Telefaxnummer: (0251) 411-2525

Konten der Landeskasse Münster:

Deutsche Bundesbank - Filiale Münster - BLZ: 400 000 00 Konto: 40001 520

Westdeutsche Landesbank Girozentrale Münster BLZ: 400 500 00 Konto: 61820

ÖPNV ab Hbf Linien 14 • 20 bis Haltestelle Domplatz, Linien 2 • 10 • 11 • 12 bis

1/3



Herr  
Prof. Dr. med. Ulrich Altrup  
Institut für Experimentelle  
Epilepsieforschung  
des Universitätsklinikums Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a  
48149 Münster

Herr  
Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Mußhoff  
Institut für Physiologie  
des Universitätsklinikums Münster  
Robert-Koch-Str. 27 a  
48149 Münster

Diese Genehmigung gilt bis zum **31. 12. 2005**.

Zur Durchführung des Versuchsvorhabens dürfen folgende Tiere verwendet werden:

**100 Mäuse,  
500 Ratten,  
30 Frösche,  
500 Landschnecken.**

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

Sofern der Leiter des Versuchsvorhabens oder seine Stellvertreter wechseln, 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.

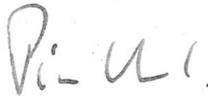
**Rechtsbehelfsbelehrung:**

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



Dr. Piontkowski



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Frau  
 Prof. Dr. Heidrun Straub  
 Institut für Physiologie  
 -Neurophysiologie-  
 Universitätsklinikum Münster  
 Robert-Koch-Str. 27a

48149 Münster

Dienstgebäude:  
 Domplatz 6-7  
 48143 Münster  
 Telefon: 0251 411-0  
 Durchwahl: 411-2104  
 Telefax: 411-2115  
 Raum: C 211  
 Auskunft erteilt:  
 Dirk Skoff  
 E-Mail:  
 Dez50@brms.nrw.de  
 Aktenzeichen:  
 50.0835.1.0 (G 79/2002)

25. Oktober 2005

**Tierschutz**

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Verlängerung des Tierversuchs:

**„Experimentelle Epilepsieforschung.“**

Antrag vom 11.10.2005

Mein Genehmigungsbescheid vom 19.12.2002 – Az.: 50.0835.1.0 (G 79/2002) –

Sehr geehrte Frau Prof. Straub,

gem. § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum **31.12.2006**.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag

Dr. Piontkowski

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de  
 Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de

Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411 - 3300

**ÖPNV - Haltestellen:**

Domplatz, Linien 2, 10, 11, 12, 14, 20

Raphaelsklinik, Linien 2, 10, 11, 12 (Haus K)

Albrecht-Thaer-Straße, Linie 17 (Haus N)

Hauptbahnhof, ca. 100 m zu Fuß (Haus S)

Konten der  
LandeskasseDeutsche Bundesbank  
- Filiale MünsterWestLB AG  
Münster

BLZ: 400 000 00

400 500 00

Konto: 40 001 520

61 820

IBAN: DE34 4000 0000 0040  
0015 20DE65 4005 0000  
0000 0618 20

BIC: MARKDEF1400

WELADE3M

**NRW.**



## Bezirksregierung Münster

Bezirksregierung Münster • 48128 Münster

Frau  
Prof. Dr. Heidrun Straub  
Institut für Physiologie  
-Neurophysiologie-  
Universitätsklinikum Münster  
Robert-Koch-Str. 27a

48149 Münster

Dienstgebäude:  
Domplatz 6-7  
48143 Münster  
Telefon: 0251 411-0  
Durchwahl: 411-2104  
Telefax: 411-2115  
Raum: C 211  
Auskunft erteilt:  
Dirk Skoff  
E-Mail:  
Dez50@brms.nrw.de  
Aktenzeichen:  
50.0835.1.0 (G 79/2002)

 Dezember 2006
**Tierschutz**

Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

Verlängerung des Tierversuchs:

„**Experimentelle Epilepsieforschung.**“

Antrag vom 04.12.2006

Mein Genehmigungsbescheid vom 19.12.2002 – Az.: 50.0835.1.0 (G 79/2002) –

Sehr geehrte Frau Prof. Straub,

gem. § 8 Tierschutzgesetz (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBl. I S. 1105) verlängere ich auf Ihren Antrag hin die Genehmigungsdauer für die Durchführung des o.a. Versuchsvorhabens bis zum **31.12.2007**.

Die Genehmigungsdauer für o.g. Versuchsvorhaben ist nunmehr zweimal um ein Jahr verlängert worden. Eine weitere Verlängerung ist daher nicht mehr möglich, so dass die Genehmigungsdauer am 31.12.2007 ausläuft.

Mit freundlichen Grüßen

Im Auftrag



Dr. Piontkowski

E-Mail: poststelle@bezreg-muenster.nrw.de	Konten der Landeskasse	Deutsche Bundesbank - Filiale Münster	WestLB AG Münster	<b>NRW.</b>
Internet: www.bezreg-muenster.nrw.de	BLZ:	400 000 00	400 500 00	
Grünes Umweltschutztelefon: (0251) 411 - 3300	Konto:	40 001 520	61 820	
<b>ÖPNV - Haltestellen:</b>	IBAN:	DE34 4000 0000 0040 0015 20	DE65 4005 0000 0000 0618 20	
Domplatz, Linien 2, 10, 11, 12, 14, 20 Bezirksregierung II, Linie 17 (Haus N)	BIC:	MARKDEF1400	WELADE3M	