

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Etablierung eines elektrophysiologischen Hirnstamm-Stimulationsprotokolls zur
Charakterisierung der deszendierenden adrenergen Hemmung der spinalen
Neuronenaktivität im Cornu posterior

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Alexandra Budig
aus Halle/Saale

Mainz 2023

Tag der Promotion:

22. November 2023

Abstract

The establishment of the electrophysiological brainstem stimulation protocol allowed the investigation of the adrenergic descending influence of the Locus coeruleus (LC) on wide dynamic range neurons (WDR neurons) in native adult mice. Using the electrophysiological method of extracellular recording in the deep laminae of the posterior cornu, the activity of the WDR neurons in the spinal cord was measured. In addition, the LC in the brainstem was stimulated at different frequency intensities and the influence of the spinally applied α adrenoceptor antagonist phentolamine and the 5HT₃ receptor antagonist ondansetron was examined. LC stimulation did not lead to any significant changes in receptive fields. A reduction in the activity of WDR neurons after brainstem stimulation with different stimulation frequencies could be demonstrated. In addition, a second phase with temporally delayed increase in spinal activity was observed. The cause of increase in activity of WDR neurons is unclear. The side-separated observation of the activity after LC stimulation showed a stronger reduction in activity of the spinothalamic neurons contralaterally. Neither the 5HT₃ receptor antagonist ondansetron nor the nonselective α adrenoceptor antagonist phentolamine caused a significant change in the activity of the WDR neurons after LC stimulation following local spinal application of the substrates.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	VIII
Abbildungsverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
2 Literaturdiskussion	3
2.1 Schmerz und Nozizeption	3
2.1.1 Periphere Nozizeptoren und Schmerzqualitäten	3
2.1.2 Afferente Bahnen	3
2.1.3 Laminae des Cornu posterior	4
2.1.4 WDR-Neurone	5
2.2 Supraspinale Zentren	6
2.2.1 Locus coeruleus (LC)	6
2.2.2 Der LC in der Modulation akuter Schmerzreize	8
2.2.3 PAG-RVM-System und descendierende serotonerge Bahnen	9
2.3 Spinale Rezeptoren und Rezeptor-Antagonisten	9
2.3.1 Spinale Adrenozeptoren und der α -Adrenozeptor-Antagonist Phen- tolamin	10
2.3.2 Spinale 5-HT ₃ -Rezeptoren und der 5-HT ₃ -Rezeptor-Antagonist Ondansetron	11
3 Fragestellungen und Hypothesen	13
4 Material und Methoden	15
4.1 Materialien	15
4.1.1 Die Tiere und ihre Haltungsverhältnisse	15
4.1.2 Geräte	16
4.1.3 Software	16
4.1.4 Chemikalien	16

4.1.5	Instrumente	16
4.1.6	Verbrauchs- und Hilfsmaterialien	18
4.2	Methoden	18
4.2.1	Allgemeiner Versuchsablauf	19
4.2.2	Messprotokolle	26
4.3	Statistik	29
5	Ergebnisse	31
5.1	Veränderung der Ausdehnung der rezeptiven Felder der Hinterpfoten . .	31
5.2	Vorübergehende Reduktion der neuronalen Aktivität nach Hirnstammstimulationen mit aufsteigenden Frequenzen	31
5.3	Unterschiede der ipsilateralen und kontralateralen spinalen neuronalen Aktivität nach Hirnstammstimulation	35
5.4	Die neuronale Aktivität unter Einfluss des α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin nach 20 Hz-Hirnstammstimulation	37
5.5	Die neuronale Aktivität unter Einfluss des 5HT ₃ -Rezeptor-Antagonisten Ondansetron nach 20 Hz-Hirnstammstimulation	38
6	Diskussion	41
6.1	Veränderung der Ausdehnung der rezeptiven Felder der Hinterpfoten . .	41
6.2	Vorübergehende Reduktion der neuronalen Aktivität nach Hirnstammstimulationen mit aufsteigenden Frequenzen	42
6.3	Unterschiede der ipsilateralen und kontralateralen spinalen neuronalen Aktivität nach Hirnstammstimulation	44
6.4	Die neuronale Aktivität unter Einfluss des α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin nach 20 Hz-Hirnstammstimulation	46
6.5	Die neuronale Aktivität unter Einfluss des 5HT ₃ -Rezeptor-Antagonisten Ondansetron nach 20 Hz-Hirnstammstimulation	47
6.6	Diskussion der Methode und Limitationen	48
6.7	Ausblick	51
7	Zusammenfassung	53
A	Tabellen	55
B	Abbildungen und Diagramme	57
C	Danksagung	61
D	Lebenslauf	63
	Literaturverzeichnis	65

Abkürzungsverzeichnis

G-Protein Guanosin triphosphat-hydrolysierendes Protein. 11

GABA γ -Aminobuttersäure. 7

LC Locus Coeruleus. III, IV, 1, 4, 6–10, 14, 20, 21, 25, 26, 28, 35, 42, 44–46, 48, 49, 53

MBU Mouse Behaviour Unit. 15, 19

Ncl. Nucleus. 4, 6, 25, 48

NRM Nucleus raphe magnus. 6, 9, 48

PAG Periaquäduktales Grau. 4, 6, 9

PBS Phosphatgepufferte Salzlösung. 17, 23, 24

RVM Rostrale ventromediale Medulla. 4, 6, 9

SC Locus subcoeruleus. 9

WDR Wide dynamic range. III, 1, 5, 6, 13, 26, 28, 31, 42, 43, 46, 48, 49, 53

ZNS Zentrales Nervensystem. 6, 49

Tabellenverzeichnis

4.1	Geräte	16
4.2	Software	17
4.3	Chemikalien	17
4.4	Einstellungen des Vibratoms	24
4.5	Durchführung der Nissl Färbung	24
A.1	Normierte Messwerte unmittelbar nach Hirnstamm-Stimulation ohne Substrat	55
A.2	Normierte Messwerte über 20 min nach Hirnstamm- Stimulation ohne Substrat	55
A.3	Normierte Messwerte unter Einfluss von Ondansetron	56
A.4	Normierte Messwerte unter Einfluss von Phentolamin	56
D.1	Aktueller tabellarischer Lebenslauf	63

Abbildungsverzeichnis

2.1	Aszendierende und deszendierende Bahnen im Rückenmark	4
2.2	An der Schmerzmodulation beteiligte supraspinale Zentren	7
2.3	Coronarschnitt Pons und Cerebellum der Maus	7
4.1	Elektrophysiologischer Arbeitsplatz	19
4.2	Testung des Zwischenzehenreflexes	20
4.3	Bipolare Stimulationselektrode	21
4.4	Messelektrode im Rückenmark	22
4.5	Taktile Stimulation mittels Von-Frey-Filament	22
4.6	Vibratom mit Hirnpräparat	23
4.7	Coronarschnitt der Pons (Nissl-Färbung)	25
4.8	Zeitlicher Ablauf des ersten Messprotokolls	26
4.9	Messprotokoll mit dem α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin	27
4.10	Messprotokoll mit dem 5HT ₃ -Rezeptor-Antagonisten Ondansetron	28
5.1	Rezeptive Felder der Hinterpfoten	32
5.2	Individuelle rezeptive Felder der Hinterpfoten	32
5.3	Frequenzveränderung nach Hirnstammstimulation über 20 min ohne Substrate	33
5.4	Histologischer Nachweis der LC-Läsion.	34
5.5	Vergleich der ipsilateralen und kontralateralen Frequenzveränderung 10 sek nach Hirnstammstimulation	35
5.6	Vergleich der ipsilateralen und kontralateralen Frequenzveränderung nach Hirnstammstimulation über 20 min	36
5.7	Frequenzänderung nach Hirnstammstimulation nach spinaler Phentolamingabe	37
5.8	Frequenzänderung nach Hirnstammstimulation unter spinaler Ondansetron- gabe	39
B.1	Gegenüberstellung der ipsi- und kontralateralen Frequenzverläufe mit Vor- werten	57
B.2	Frequenzänderung nach Hirnstammstimulation unter Phentolamingabe c=1000 μ M	58
B.3	Frequenzänderung nach Hirnstammstimulation unter Phentolamingabe c=1 M	58

B.4 Frequenzänderung nach Hirnstammstimulation unter Phentolamingabe $c=1 \mu\text{M}$,
 $c=10 \mu\text{M}$ und $c=100 \mu\text{M}$ im Vergleich 59

Kapitel 1

Einleitung

Die Weiterleitung und Verarbeitung nozizeptiver Reize wird auf spinaler Ebene durch segmentale Mechanismen [1, 2, 3] und durch Einfluss supraspinaler Zentren moduliert [4, 5]. In den tiefen WDR-Neuronen, die im Cornu posterior zu den spinothalamischen Neuronen zählen, werden unter anderem nozizeptive Informationen verarbeitet und integriert [6, 7, 8, 9]. In Abhängigkeit der vorhandenen Rezeptoren spinothalamischer Neurone und der einwirkenden Neurotransmitter erfolgt eine pronozizeptiv oder antinozizeptiv Modulation bereits auf spinaler Ebene [10, 11]. Der Locus coeruleus (LC) ist das größte adrenerge Kerngebiet im Hirnstamm [12] und gehört zu den supraspinalen Zentren mit deszendierenden Bahnen in das Cornu posterior [13, 14, 15]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Hirnstamms mit dem adrenergen LC auf die spinothalamischen Neurone mittels elektrischer Stimulation des LC untersucht. Die Zielstellung war die Etablierung eines Hirnstamm-Stimulationsprotokolls, das beispielsweise in zukünftigen Untersuchungen zum chronischen Schmerz in Mausmodellen angewendet werden kann. Hierfür wurde in nativen Mäusen die Aktivitätsveränderung der WDR-Neuronen nach LC- Stimulation gemessen und danach mit der neuronalen Aktivität unter Antagonisierung der spinalen 5HT₃-Rezeptoren mittels Ondansetron bzw. der spinalen α -Adrenozeptoren mittels Phentolamin verglichen.

Kapitel 2

Literaturdiskussion

2.1 Schmerz und Nozizeption

Laut der Terminologie der International Association for the Study of Pain wird Schmerz als eine unangenehme Sinneswahrnehmung und emotionale Erfahrung definiert, die mit potentieller oder manifester Gewebeschädigung einhergeht [16]. Dabei ist die Schmerzempfindung subjektiv und erfordert ein Bewusstsein [17]. In Abgrenzung dazu umfasst die Nozizeption die objektiven sensorischen Prozesse, bestehend aus Aufnahme, Weiterleitung und Verarbeitung von potentiellen oder manifesten gewebsschädigenden Reizen durch das nozizeptive System [17].

2.1.1 Periphere Nozizeptoren und Schmerzqualitäten

Nozizeptoren sind primäre sensorische Nervenendigungen und kommen in den meisten Körpergeweben vor. Abhängig von der Lokalisation kann zwischen somatischen Oberflächen- und Tiefenschmerzen sowie viszerale Schmerzen unterschieden werden. Die Schmerzempfindung wird durch potentiell gewebsschädigende Reize aktiviert. Zu diesen Reizen gehören starker mechanischer Druck oder Quetschung, Temperaturen, Chemikalien und Sauerstoffmangel. Nozizeptoren können histologisch nach Faserklasse und dazugehöriger Schmerzempfindung eingeteilt werden. Einerseits gibt es den stechenden und hellen Schmerz, der über die myelinisierten $A\delta$ -Fasern afferent vermittelt wird. Diese $A\delta$ -Fasern verursachen die früh einsetzende Schmerzempfindung. Andererseits gibt es den etwas später einsetzenden, dumpfen und schwer lokalisierbaren Schmerz, der über die langsameren und nicht myelinisierten C-Fasern geleitet wird. Die Somata dieser pseudounipolaren Nerven liegen jeweils in den Spinalganglien [18].

2.1.2 Afferente Bahnen

Die periphere Reizleitung verläuft über die pseudounipolaren Neurone, deren proximales Ende über die Radix dorsalis in das Cornu posterior zieht. Im Cornu posterior findet die Transmission auf das zweite sensorische Neuron statt. Hier findet bereits

die erste Verarbeitung und Integration der Reizwahrnehmung statt und der Begriff des sekundären rezeptiven Feldes entspricht dem Hautareal, dessen Nozizeptoren auf dasselbe nachgeschaltete sensorische Neuron im Rückenmark projizieren [19, 20, 21]. Bei der Schmerzweiterleitung gehören diese zweiten sensorischen Neuronen zu den gekreuzt aufsteigenden Fasern des Tractus spinothalamicus anterolateralis, welche zum Thalamus projizieren. Dort findet die Transmission auf das dritte sensorische Neuron statt, welches wiederum in den sensorischen Cortex projiziert [18]. Der aufsteigende Tractus spinothalamicus hat daneben Abzweigungen, die die Reizinformation in subkortikale Kerngebiete des Hirnstamms weiterleiten. Der Hirnstamm wird in Mesencephalon, Pons und Medulla eingeteilt, in denen sich jeweils auch schmerzmodulierende Kerngebiete wie das periaquäduktale Grau (PAG) im Mesencephalon, der Locus coeruleus (LC) im Pons und die rostrale ventromediale Medulla (RVM) befinden. Diese sind in Abb. 2.1 schematisch als aufsteigende Bahnen mit den kortikalen bzw. subkortikalen Projektionsgebieten dargestellt.

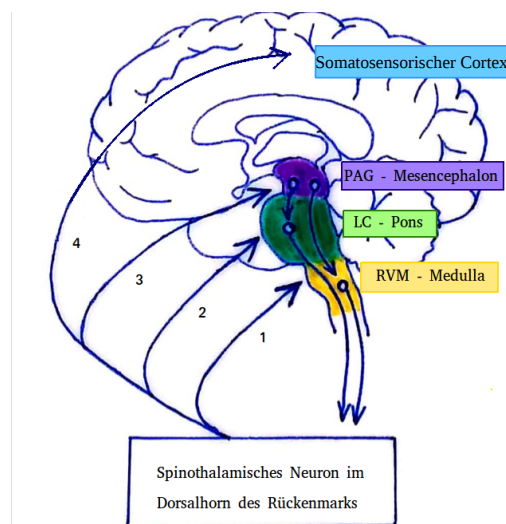


Abbildung 2.1: Aufsteigende und absteigende Bahnen im Rückenmark. Zu den aufsteigenden Bahnen gehören: (1) Verbindung zu den Kerngebieten der rostralen ventromedialen Medulla (RVM), (2) Verbindung zum Locus coeruleus (LC) und zum Ncl. parabrachialis, (3) Verbindung zum periaquäduktalen Grau und (4) Tractus spinothalamicus anterolateralis.

2.1.3 Laminae des Cornu posterior

Das Rückenmark lässt sich im Querschnitt makroskopisch in die äußere weiße Substanz mit den aufsteigenden und absteigenden Nervenbahnen und die innen liegende graue Substanz mit den spinalen Perikaryen unterteilen. Die graue Substanz wird wiederum entsprechend der mikroskopisch erkennbaren histologischen Schichtung in Laminae I bis X nach Rexed gegliedert. Das Cornu posterior umfasst die Laminae I bis VI [22]. In dieser Einteilung wird sich an der Lage der Somata und ohne Berücksichtigung der dendritischen Verschaltung der Neurone orientiert. Die Neurone des Tractus

spinothalamicus als sekundäre sensorische Neurone sind größtenteils in der Lamina I sowie in den tiefer liegenden Laminae III bis V zu finden [23]. In der Lamina I findet ein Teil der nozizeptiven Verschaltung statt und die spinalen Neurone erhalten afferenten Input durch die $A\delta$ - und polymodalen C- Fasern [23, 24]. Die dortigen sekundären Neurone, die auf nozizeptive thermische und nozizeptive mechanische Reize reagieren [25, 26], sind zur Ortsbestimmung und zur Feststellung der Intensität des ankommenden Schmerzreizes fähig [27, 28, 29]. Polymodale C-Fasern projizieren auch in die Lamina II, die auch als Substantia gelatinosa bezeichnet wird und in die tiefer liegende Lamina V [30, 31]. Die Substantia gelatinosa besteht aus inhibitorischen Interneuronen, auf welchen hauptsächlich aktivierende α_1 -Adrenozeptoren nachgewiesen wurden [32, 33, 3]. In Nagetieren waren in der Substantia gelatinosa keine Projektionsneurone nachweisbar [23]. Die oberflächlichen Laminae des Cornu posterior sind im Vergleich zu den tieferen Schichten durch deszendierende adrenerge Fasern dichter innerviert [34]. In den tieferen Laminae III bis VI werden vor allem mechanische und propriozeptive Reize durch $A\beta$ -Fasern und nozizeptive $A\delta$ -Fasern verschaltet [30, 31]. Neben den sekundären sensorischen Neuronen gibt es weiterhin Gliazellen, Mikroglia und viele Interneurone [35].

2.1.4 WDR-Neurone

Eine spinothalamische Neuronengruppe, die vorwiegend in den Laminae III-V des Cornu posterior anzutreffen ist, wird als Wide dynamic range-Neurone (WDR-Neurone) bezeichnet [6, 8]. Diese reagieren sowohl auf nicht-schmerzhafte mechanische als auch auf nozizeptive Reize. Nozizeptoren, kutane Mechanorezeptoren und Thermorezeptoren sowie propriozeptive Rezeptoren gehören zu den primären Afferenzen, die auf WDR-Neurone projizieren [6, 8]. Die WDR-Neurone können zwischen den schädlichen mechanischen oder thermischen Reizen und den harmlosen mechanischen Reizen differenzieren [7, 9]. Sie zeigen ein ansteigendes Aktivitätslevel auf Reize, die sich im Spektrum zwischen harmlosen und gewebsschädigenden Reizen bewegen. Daher können sie auch in elektrophysiologischen Untersuchungen sicher identifiziert werden, indem bei ansteigender Druckstärke eine höhere neuronale Aktivität abgeleitet werden kann [36]. Sie erhalten die Signale unterschiedlicher Primärafferenzen. $A\beta$ -Fasern, die zur Reizweiterleitung von Berührung, Druck und Vibration dienen, werden sowohl direkt auf die sensorischen Neurone als auch indirekt über Interneurone verschaltet. $A\delta$ - und auch C-Fasern leiten die nozizeptiven Reize über exzitatorische und inhibitorische Interneurone der Substantia gelatinosa auf die spinothalamischen Neurone [37]. Die WDR-Neurone besitzen ausgedehnte Dendritenbäume über die horizontal geschichteten Laminae des Cornu posterior [38]. Dadurch haben die WDR-Neurone in den tieferen Laminae große rezeptive Felder [39]. Die WDR-Neurone lassen sich nicht somatotop gliedern [40], sondern sind eher muskulotopisch organisiert [41, 40].

Eine weitere Besonderheit der WDR-Neurone ist neben der Integration nozizeptiver und nicht-nozizeptiver Informationen, dass sie die Eigenschaft der zeitlichen Summation besitzen [42, 43]. Als zeitliche Summation von elektrischen Signalen wird die progressive Zunahme der elektrischen Aktivität der Neuronen auf einen über einen längeren Zeitraum konstant dargebotenen Reiz beschrieben. Es kommt im Verlauf zur Zunahme der neuronalen Aktivität über das bisher gezeigte Maß hinaus [21].

2.2 Supraspinale Zentren

Die Top-down-Kontrolle, auch deszendierende Hemmung genannt, geht von supraspinalen Kerngebieten aus und wirkt auf spinaler Ebene im Cornu posterior. Zu den bekanntesten supraspinalen Zentren gehören das periaquäduktale Grau (PAG), die Raphekerne und der Locus coeruleus (LC). In Abb. 2.2 sind adrenerge und serotonerge Kerngebiete sowie weitere supraspinale Areale mit Einfluss auf diese dargestellt. Da keine Hirnregion alleine als Schmerzmodulator fungiert und besonders im Hirnstamm mehrere Kerngebiete in die nozizeptive Modulation eingebunden sind, gibt es den zusammenfassenden Begriff der „Schmerz modulierenden Systeme im Hirnstamm“ [44]. Dazu gehören das PAG mit der rostralen ventromedialen Medulla (RVM) inklusive Ncl. raphe magnus (NRM), die parabrachiale Kerngruppe im Pons, die kaudale ventrolaterale Medulla sowie der Ncl. reticularis dorsalis im Pons und der LC [4, 5]. Die supraspinalen Gebiete wie PAG, der LC und die RVM haben gemein, dass sie über die deszendierende Bahn des Funiculus dorsolateralis im Rückenmark ins Cornu posterior projizieren [45]. Ursprünglich wurden hier die ersten deszendierenden Bahnen ausgehend von den Raphekernen nachgewiesen [46, 47].

2.2.1 Locus coeruleus (LC)

Insgesamt sind sieben adrenerge Kerngebieten des ZNS in Nagetieren identifiziert, die als A1 bis A7 bezeichnet werden und sich alle im Hirnstamm befinden [48, 49]. Die Kerngebiete können nach drei Lokalisationen in kaudale, zentrale (medullo-pontine) und rostrale (pontine) Kerngebiete aufgeteilt werden [50]. Das Kerngebiet des LC, auch als A6 bezeichnet [48], gehört zu der letztgenannten Lokalisation und liegt im rostralen dorsalen Pons beiderseits des Bodens des vierten Ventrikels [51, 34]. Der LC ist das größte noradrenerge Kerngebiet des Gehirns [12] und enthält mindestens 50% der adrenergen Neurone im gesamten ZNS [52]. In der nachfolgenden Abb. 2.3 ist der LC in der Schemazeichnung beschriftet und in der Nissl-Färbung mit einem Kreis markiert. Erkennbar ist der LC als annähernd dreieckige, dichte Ansammlung von Zellkernen beiderseits des vierten Ventrikels.

Es sind zwei adrenerge Neuronenpopulationen im LC nachweisbar. Die größeren multipolaren Neurone liegen überwiegend ventral und die kleineren fusiformen Neurone sind

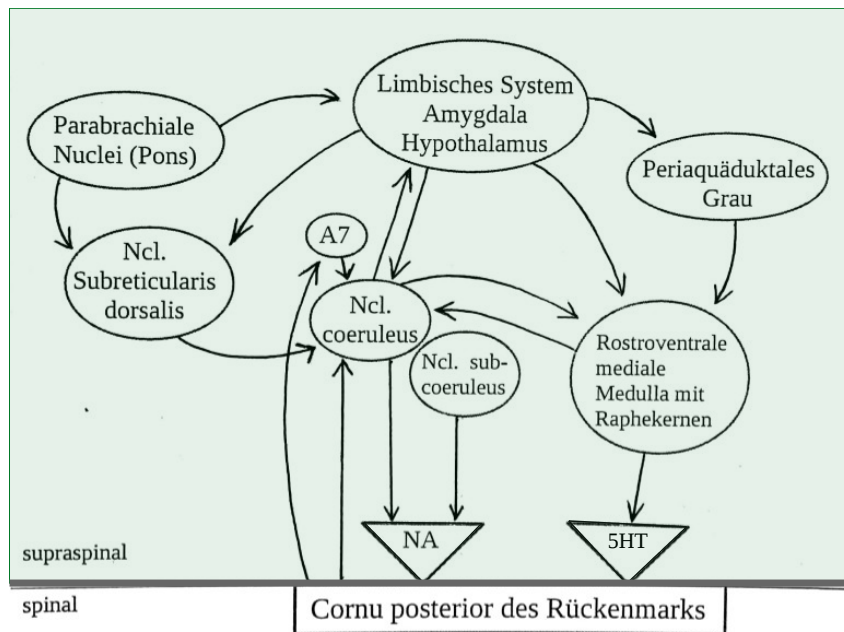


Abbildung 2.2: Wechelseitige Einflussnahme der supraspinalen an der Schmerzmodulation beteiligten Zentren mit Zusammenspiel serotonerger, noradrenerger Bahnen. Modifizierte Abbildung in Anlehnung an K. Bannister and A. H. Dickenson, 2017 [11].

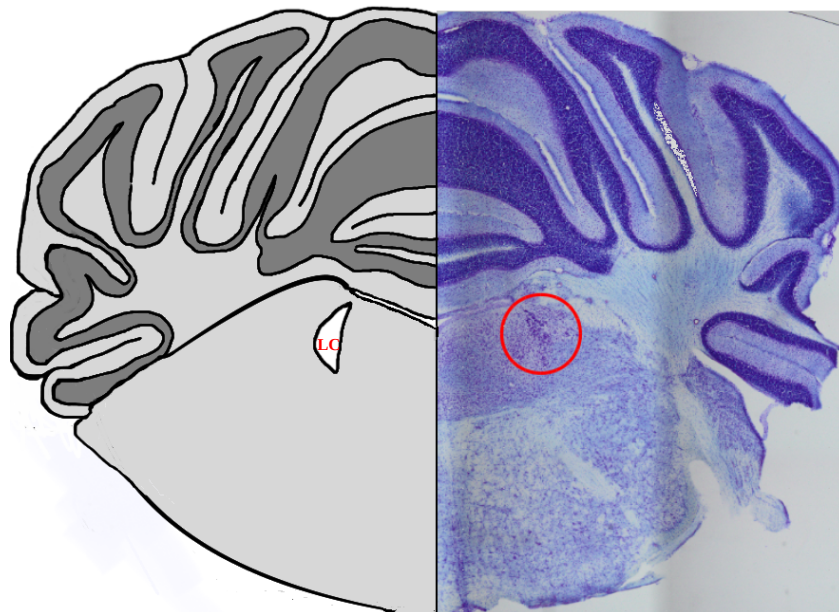


Abbildung 2.3: Coronarschnitt durch das murine Cerebellum und Pons. li.: am Foto der Nissl-Färbung orientierte eigene Schemazeichnung mit LC; re.: Foto des selbst angefertigten Hirnpräparats: Nissl-Färbung und mit rotem Kreis markierter Locus coeruleus.

im dorsalen LC angesiedelt [53, 54]. Die adrenergen LC-Zellen unterliegen dem Einfluss anderer Neurotransmittersysteme. Beispielsweise wurden $GABA_A$ - [55], nikotinsche Acetylcholin- [56] und Opioidrezeptoren [57] nachgewiesen. Das Kerngebiet ist stark mit anderen Hirnregionen verknüpft, dies zeigt sich in den eingehenden Projektionen sowie in den eigenen Projektionsgebieten des LC. Zu den Hirnregionen, die zum LC

projizieren, gehören das Telencephalon und das Diencephalon [58], die Amygdala [59], das Kleinhirn und der kontralaterale LC [60] sowie die Raphekerne [61]. Weiterhin projizieren Zellen der Lamina I des Cornu posterior des Rückenmarks direkt zu den adrenergen Zellen des LC sowie zu den anderen adrenergen Kerngebieten A1, A2, A5 und A7 [62, 14], sodass ein direkter spinaler Input besteht. Der Locus coeruleus seinerseits projiziert in den Neocortex, den Thalamus, das Kleinhirn, die Amygdala, den Hippocampus, den Hypothalamus und sowohl in das Vorderhorn als auch in das Hinterhorn des Rückenmarks [63, 13, 64]. Diese Projektionswege des LC untergliedern sich in aufsteigende Bahnen, absteigende Bahnen und eine Verbindung zum Kleinhirn [50]. Die Anordnung der adrenergen Neurone im LC lässt sich orientierend in zwei Output-Bereiche unterteilen. Im kaudalen LC-Bereich sind vorwiegend Projektionsneurone mit deszendierenden Bahnen u. a. zum Rückenmark vorherrschend. In den rostralen LC-Bereichen liegen Neurone mit ascendierenden Projektionsbahnen zu übergeordneten Zentren [65, 66, 4]. Der LC projiziert über den Funiculus dorsolateralis zu den Neuronen des Tractus spinothalamicus [15, 14]. Diese Verbindung zwischen dem LC und dem Cornu posterior wird auch coeruleospinale Bahn genannt [67, 68]. In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss der coeruleospinalen Bahn auf die spinalen WDR-Neurone untersucht.

2.2.2 Der LC in der Modulation akuter Schmerzreize

Potenziell gewebsschädigende Reize führen zu einer erhöhten neuronalen Aktivität der LC-Neurone [69, 70, 71] und erhöhen die Freisetzung von Noradrenalin aus den Zellen des LC [72, 73]. Die LC-Aktivierung erfolgt sowohl direkt durch die ascendierenden spinalen Bahnen als auch durch weitere Hirnstammgebiete [14, 74]. Das Aktivitätsmuster des LC unterteilt sich in tonische und phasische Abschnitte. Die phasische Aktivität ist durch die plötzliche Entladung im LC charakterisiert, die zu einer Freisetzung von Noradrenalin aus den präsynaptischen Endigungen in den Projektionsgebieten führt [75]. Nach Exzitation konnte eine Autoinhibition der LC-Neurone über α_2 -Adrenozeptoren als Autorezeptoren nachgewiesen werden [76]. Beide LC sind miteinander verbunden und eine unilaterale elektrische Stimulation des einen LC führt zur bilateralen Aktivierung der LCs [76]. Sowohl eine lokale elektrische Stimulation sowie eine rezeptorvermittelte chemische Stimulation des LC reduziert messbar das Schmerzverhalten von Nagetieren [77, 78, 79, 51, 80]. In Studien wurden Stimulationsfrequenzen zwischen 0,5 Hz bis 50 Hz [81], zwischen 5 Hz bis 10 Hz [82] sowie Stimulationsfrequenzen mit 20 Hz und 50 Hz [76] und 100 Hz [83] erfolgreich im LC-Areal genutzt und dienten als Orientierung für die Planung der Stimulationsfrequenzen. Llorca-Torralba et al. veröffentlichten 2016 im Rahmen eines Reviews eine Gegenüberstellung von elektrophysiologischen und Verhaltensstudien zu dem antinozizeptiven Einfluss des LC. Die elektrische oder optogenetische LC-Stimulation wurde jeweils unilateral durchgeführt und führte zu einer

Abschwächung der Nozizeption [84, 85, 86, 87, 88, 89, 90]. Die Gegenüberstellung verschiedener Studien an Ratten, in denen der LC uni- oder bilateral elektrisch oder mit lokalen Neurotoxinen zerstört wurde, ergab in dem gleichen Review von Llorca-Torralba et al. ein uneinheitliches Ergebnis über die Rolle des LC in der Nozizeption. In diesen Studien wurde anschließend an die Elimination des LC das Schmerzverhalten auf akute thermische, chemische oder mechanische Schmerzreize mit verschiedenen Methoden beobachtet. Insgesamt zehn Studien ergaben keine Veränderung [80, 91, 92, 93, 94, 95, 96] und im Gegensatz dazu ergaben acht Studien eine Absenkung der Schmerzgrenze (eher pronozizeptive Wirkung) [80, 97, 92, 93, 94, 98, 99, 100] und nur drei Studien einen Anstieg der Schmerzgrenze (eher antinozizeptive Wirkung) [97, 101, 102] unter Eliminierung beider LC. Das Ergebnis wurde durch die Autoren so interpretiert, dass die deszendierende adrenerge Hemmung in gesunden Tieren bei akuten Schmerzreizen eine geringere Rolle in der spinalen Modulation von Schmerzreizen spielt [103]. Pertovaara et al. argumentierten 2013, dass der adrenerge Einfluss des LC im physiologischen Zustand auf die basale kurzzeitige Schmerzwahrnehmung eher gering ausfällt. Im Vergleich zu Studien mit Tiermodellen chronischer Schmerzerkrankungen wurde geschlussfolgert, dass der adrenerge Einfluss des LC erst bei länger andauernden Schmerzzuständen an Bedeutung gewinnt und eher schmerzhemmend wirkt [91, 104, 105, 106, 107].

2.2.3 PAG-RVM-System und deszendierende serotonerge Bahnen

Die bekannteste antinozizeptive deszendierende Bahn geht von dem PAG im Mittelhirn aus und projiziert deszendierend primär in die RVM, aber auch auf weitere adrenerge Kerngebiete wie den LC und Locus subcoeruleus (SC). Diese nachgeschalteten Kerngebiete des Hirnstamms projizieren wiederum in das Cornu posterior [108, 109, 110, 5]. Das PAG liegt als Zellgruppe zirkulär um den Aquaeductus mesencephali und verläuft an diesem zwischen dem dritten und vierten Ventrikel. Elektrische oder chemische Stimulation des PAG ruft eine erhöhte Freisetzung von Serotonin im Cornu posterior hervor [111]. Dennoch sind keine direkten spinalen Projektionen zwischen PAG und Cornu posterior bekannt, sondern erfolgen indirekt über die RVM. In der RVM sind die Raphekerne lokalisiert [47] und bilden eine Ansammlung von sieben serotonergen Kerngebieten, die sich paarig entlang der Medianlinie des Hirnstamms befinden. Sie werden der Formatio reticularis zugeordnet. Die serotonergen Neurone projizieren in die Substantia gelatinosa des Cornu posterior [112] und eine Stimulation des Nucleus raphe magnus (NRM) führt beispielsweise zu einer antinozizeptiven Wirkung [113, 114].

2.3 Spinale Rezeptoren und Rezeptor-Antagonisten

Zur Differenzierung der antinozizeptiven Wirkung durch die LC-Stimulation wurden antagonisierende Substanzen auf spinaler Ebene eingesetzt, welche serotonerge oder

adrenerge Rezeptoren selektiv blockierten. Entsprechend des eingesetzten Rezeptorantagonisten wurde eine Veränderung der neuronalen Aktivität der tiefen WDR-Neurone nach LC-Stimulation erwartet. Die Zielstellung, möglichst selektiv wirkende Antagonisten zu verwenden, galt der Abgrenzung des serotonergen und adrenergen Neurotransmittersystems.

2.3.1 Spinale Adrenozeptoren und der α -Adrenozeptor-Antagonist Phentolamin

Die zwei Hauptgruppen der adrenergen Rezeptoren unterteilen sich in α - und β -Adrenozeptoren. Die erste Gruppe unterteilt sich in aktivierend wirkende α_1 - und inhibierend wirkende α_2 -Rezeptoren. Ein Agonist am α_1 -Adrenozeptor führt zur Bindung eines stimulierenden G-Proteins mit nachfolgender intrazellulärer Kaskade, die zur Depolarisation und Aktivierung der Nervenzelle führt. Hingegen wirken Agonisten an α_2 -Adrenozeptoren auf das Neuron inhibierend. Innerhalb der α_1 -Adrenozeptoren lassen sich die Subgruppen α_1A -, α_1B - und α_1D -Adrenozeptoren innerhalb des Rückenmarks differenzieren [115]. Speziell im Cornu posterior wurden die beiden Subtypen α_1A -Adrenozeptoren und α_1B -Adrenozeptoren nachgewiesen [116, 117]. Die α_1 -Adrenozeptoren sind auf inhibitorischen GABAergen und glycinergen Interneuronen nachweisbar [3], welche hauptsächlich in den oberen Laminae I-III nachweisbar sind [118]. Die inhibitorischen Interneurone wirken über interlaminare Verschaltung auf die tiefer liegenden spinothalamischen Neurone hemmend [1, 32, 33, 4, 3]. Die α_2A -Adrenozeptoren wurden ubiquitär im ventralen Horn und im dorsalen Horn in hoher Rezeptordichte nachgewiesen [119]. Neben dieser Subgruppe kommen auch noch α_2B - und α_2C -Adrenozeptoren im Cornu posterior vor [115]. Spinal verabreichtes Noradrenalin führt über α_2 -adrenerge Rezeptoren zur Schmerzhemmung [120, 121, 122] und auch unter spinaler Applikation spezifischer α_2 -Adrenozeptor-Agonisten ließ sich ein antinozizeptiver Effekt nachweisen [123]. Die Antagonisierung der α_2 -Adrenozeptoren bewirkten einen Anstieg der spinalen NoradrenalinKonzentration in gesunden Tieren [124]. Eine besonders hohe Dichte an α_2 -Adrenozeptoren zeigte sich in den oberen beiden Laminae des Cornu posterior [125]. Dort befinden sich die Adrenozeptoren an den zentralen Enden der Primärafferenzen, den C-Fasern und A δ -Fasern [30, 4]. Eine präsynaptische Hemmung der Primärafferenzen konnte durch lokal verabreichtes Noradrenalin oder α_2 -Adrenozeptor-Agonisten ausgelöst werden [126, 127, 128, 129, 130]. Weiterhin wiesen Axonendungen exzitatorischer Interneurone, die auf tieferliegende spinothalamische Projektionsneurone projizieren, α_2C -Adrenozeptoren auf [2, 131, 132]. Eine postsynaptische Hemmung kann durch die α_2A -Adrenozeptoren, die direkt auf den spinothalamischen Projektionsneuronen lokalisiert sind, ausgelöst werden [133, 134, 4]. Die an den terminalen Axonenden der adrenergen LC-Neurone lokalisierten α_2 -Adrenozeptoren fungieren als Autorezeptoren und können durch Aktivierung zu einer Autoinhibition mit reduzierter Noradrenalinausschüttung führen [135]. Exogen verabreichtes Noradrenalin und

adrenerge Agonisten aktivieren gleichsam beide Untergruppen von α -Adrenozeptoren im Rückenmark [49]. Phentolamin gehört zu den Imidazolininen und ist ein kompetitiver, unselektiver Antagonist an den α -Adrenozeptoren [136]. Es gehört zu den direkten Sympatholytika und wurde bereits in den 1970er Jahren zur Charakterisierung von Adrenozeptoren genutzt. Mit Stoffmengenkonzentrationen ab $c= 10 \mu\text{M}$ wurde eine Blockade der Adrenozeptoren und in Folge eine 50%ige Reduktion der Noradrenalinwirkung an der postsynaptischen Membran beschrieben [137, 138]. Phentolamin wurde als adrenerger α -Antagonist im Rahmen elektrophysiologischer Untersuchungen spinaler Neurone genutzt [139, 94, 140]. In Abhängigkeit der vorliegenden blockierten Subtypen der α -Adrenozeptoren kann es zu gesteigerter oder verringerter Neuronenaktivität kommen [139]. Entsprechend der aktuellen Daten der „Drugbank“ und des „National Center for Biotechnology Information“ gibt es im Gegensatz zu anderen Adrenozeptoren-Antagonisten in der Literatur keinen Hinweis auf Interaktionen des Phentolamins mit anderen Rezeptoren als den α -Adrenozeptoren [141, 142].

2.3.2 Spinale 5-HT₃-Rezeptoren und der 5-HT₃-Rezeptor-Antagonist Ondansetron

Die Serotoninrezeptoren werden in sieben Rezeptorfamilien eingeteilt. Sechs der Rezeptorfamilien gehören zu den metabotropen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Ausnahme bildet der 5-HT₃-Rezeptor, der ein ligandengesteuerter Kationenkanal ist und zur Depolarisation und Aktivierung des Neurons führt. Im Cornu posterior lassen sich die eher antinozizeptiv wirkenden 5-HT₇- und die beiden eher pronozizeptiv wirkenden 5-HT₃- und 5-HT₂-Rezeptoren nachweisen [143, 144, 10]. Die pronozizeptive Wirkung der 5HT₃-Rezeptoren konnte in Tiermodellen mit neuropathischen Schmerzen und auch in gesunden Tieren dokumentiert werden [145, 146, 147, 148]. Die Rezeptoren sind sowohl auf Primärafferenzen, spinalen exzitatorischen und inhibitorischen Interneuronen als auch auf spinothalamischen Projektionsneuronen feststellbar [149, 4, 150]. Speziell der pronozizeptive Effekt der postsynaptischen 5HT₃- Rezeptoren an den WDR-Neuronen scheint stärker zu sein als die der präsynaptischen 5HT₃- Rezeptoren an den nozizeptiven Primärafferenzen [151]. Konträr zu der häufig beschriebenen pronozizeptiven Wirkung in Schmerzmodellen, kam es in einer Knockout-Mausreihe für Untereinheiten des 5HT₃-Rezeptors mit generalisierter Rezeptorinaktivität zu keiner Veränderung der Nozizeption bei akuten Schmerzen [152]. Ondansetron gehört zu den kurzwirksamen 5HT₃-Rezeptor-Antagonisten und wirkt selektiv an diesem serotonergen Rezeptor. Die Wirkung beruht auf einer kompetitiven Hemmung peripherer und zentraler 5HT₃-Rezeptoren [153]. Für die hier verwendete Konzentration wurden die Angaben zur Dosierung mit 100 μg Ondansetron in 50 μL Kochsalzlösung aus dem Artikel von Bannister et al. 2015 übernommen [154]. Gleichsam zu dem experimentellen Aufbau der vorliegenden Arbeit wurde eine Ondansetronlösung direkt lokal auf dem eröffneten Rückenmark während extrazellulärer Messungen verwendet. Die antinozizeptive

Wirkung des Ondansetrons fiel in neuropathischen Mausmodellen stärker aus als in gesunden Tieren [145, 146, 147].

Kapitel 3

Fragestellungen und Hypothesen

Die Zielstellung lautete ein Stimulationsprotokoll zur Untersuchung der adrenergen Inhibition spinaler neuronaler Aktivität nativer Mäuse zu etablieren. Es sollten Daten über das Verhalten spinaler WDR-Neurone im Cornu posterior unter Einfluss elektro-physiologischer Stimulation des adrenergen Locus coeruleus im Hirnstamm erhoben werden.

Dabei stellten sich die Fragen: Wirkt sich die steigende Frequenzstärke auf die Hemmung der spinalen Neurone aus? Gibt es einen Unterschied zwischen der ipsilateralen und der kontralateralen Wirkung adrenerger deszendierender Inhibition? Wie verändert sich die neuronale Aktivität nach adrenerger Inhibition durch eine unselektive Blockade der spinalen Adrenozeptoren? Wie wirkt sich die Blockade spinaler serotonerger Rezeptoren auf die Inhibition der spinalen Neurone aus? Gibt es eine Interaktion zwischen dem serotonergen und dem adrenergen System?

Daraus wurden folgende fünf Hypothesen entwickelt:

1. Die Hirnstammstimulation mit den Stimulationsfrequenzen 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 100 Hz und die akute repetitive mechanische nozizeptive Stimulation führt zu keiner Veränderung der rezeptiven Felder der spinalen Neurone im Cornu posterior in nativen, gesunden Mäusen.
2. Die Hirnstammstimulation mit den Stimulationsfrequenzen 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 100 Hz führt zur unmittelbaren temporären Reduktion der neuronalen Aktivität im Cornu posterior in nativen, gesunden Mäusen.
3. Es gibt keine Unterschiede in der neuronalen Aktivität nach Hirnstammstimulation mit den Stimulationsfrequenzen 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 100 Hz zwischen der ipsilateralen und kontralateralen Rückenmarksseite.

4. Die spinale Applikation des unselektiven α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin ($c= 10 \mu\text{M}$) führt nach der Hirnstammstimulation mit 20 Hz in dem LC-Areal zu einem Aktivitätsunterschied der spinalen Neurone im Vergleich zur Kontrollgruppe.

5. Die spinale Applikation des 5HT₃-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron ($c= 6,814 \mu\text{M}$) führt nach anschließender Hirnstammstimulation mit 20 Hz in dem LC-Areal zu keinem Aktivitätsunterschied der spinalen Neurone im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Kapitel 4

Material und Methoden

4.1 Materialien

4.1.1 Die Tiere und ihre Haltungsbedingungen

Die gesamten Versuchsreihen wurden mit 41 Mäusen des Mausstamms C57BL/6 durchgeführt. Bei den überwiegend weiblichen Mäusen handelte es sich sowohl um ältere Multipara als auch um jüngere Weibchen (8. Woche bis 15. Woche). Ebenfalls wurden einige männliche Tiere (10. Woche bis 20. Woche) für die elektrophysiologischen Versuche verwendet. Die Haltung erfolgte unter standardisierten und kontrollierten Laborbedingungen ($22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 55% Luftfeuchtigkeit; 12/12h Tag-Nacht-Rhythmus mit einer Beleuchtungsperiode von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr).

Die einzelnen Käfige waren in offenen Käfiggestellen angeordnet und befanden sich in separierten Haltungsräumen innerhalb der Mouse Behaviour Unit (MBU) der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Für die Versuchsreihen wurde das jeweilige Tier im Käfig über die Schleuse aus der MBU in den Laborraum mit dem elektrophysiologischen Arbeitsplatz transportiert. In den Einzel- wie auch in den Gemeinschaftskäfigen wurden die Tiere mit freiem Zugang zu Wasser und pelletiertem Futter gehalten. Da es sich bei den Experimenten nicht um Verhaltensexperimente handelte, wurden die Tiere weder speziell voneinander getrennt noch zusammengesetzt.

Die Böden der Isolationskäfige (Fläche $A = 360\text{cm}^2$, Höhe $h = 14\text{cm}$) wurden mit Holzgranulat als Einstreumaterial bedeckt. Die oberen Plastikabdeckungen der Käfige waren mit Grobfiltern bezogen. Darunter folgte jeweils ein innen liegender Gitterdeckel aus Edelstahl mit Futterraufe und Trennblech. Der Gitterdeckel diente zur Absperrung und als Halterung der Trinkflasche und der Futterpellets. Die standardisierten Käfige waren jeweils mit einer Plastikröhre und einem Zellstofftuch als Nistmaterial versehen. Diese wurden wöchentlich ausgewechselt. Die Durchführung und Kontrolle der Haltung erfolgte durch staatlich anerkannte Tierpfleger.

Die gesamten elektrophysiologischen Tierversuche wurden durch die Tierschutzkommission des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz genehmigt. Die zur Durchführung

der Versuchsreihen nötigen Tierkurse gemäß der Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) wurden absolviert. Stets wurde im Umgang mit den Tieren auf das Tierschutzgesetz geachtet und dessen Befolgung wurde durch den Tierschutzbeauftragten kontrolliert.

4.1.2 Geräte

Tabelle 4.1: Geräte

	Gerätebezeichnung	Hersteller
1	Isofluran Vaporisator Vapor	Drägerwerk AG & Co. KGaA, D-23560 Lübeck
2	CED 1401 Micro 04	Cambridge Electronic Design Limited, Cambridge CB24 6AZ England
3	DAM80 AC Differential Amplifier	World Precision Instruments Germany GmbH, D-61169 Friedberg
4	Digital-Analog-Umwandler	World Precision Instruments Germany GmbH, D-61169 Friedberg
5	Electronic von Frey Transducer	Somedic SenseLab AB, SE-28273 Sösdala
6	Microm HM 650V Thermo Scientific	Microm International GmbH, D-58239 Schwerte
7	Perfusionspumpe Masterflex Compact pompe L/S	Cole Parmer GmbH, D-97877 Wertheim
8	Multifunktionswerkzeug Dremel 7700	DREMEL Europe Bosch Power Tools B.V., NL-4825 BD Breda
9	Panasonic Haarschneidemaschine	Panasonic Deutschland, D-22525 Hamburg
10	Analysewaage ADB/ADJ	2018 KERN & SOHN GmbH, Balingen
11	Z-LITE Fiber Optic Illuminator	World Precision Instruments Germany GmbH, D-61169 Friedberg
12	Präzisions Stereo Zoom Binocular Mikroskop mit Flexarmstativ	World Precision Instruments Germany GmbH, D-61169 Friedberg
13	Stimulator ISO STIM 01D	npi electronic GmbH, D-71732 Tamm
14	Heizsystem Animal Temperature Controller-2000	World Precision Instruments Germany GmbH, D-61169 Friedberg
15	Manueller Mikromanipulator M33	Märzhäuser Wetzlar GmbH & Co. KG, D-35579 Wetzlar
16	Olympus BX51-P	OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG, D-20097 Hamburg

4.1.3 Software

4.1.4 Chemikalien

4.1.5 Instrumente

1. Instrumente für die Präparation vor der elektrophysiologischen Messung:
anatomische Pinzette, scharfe Pinzette, feine Präparierschere, Vannas Spring Präzisi-

Tabelle 4.2: Software

	Software	Anbieter
1	LibreOffice Calc 5.1.6.2.	The Document Foundation, Debian and Ubuntu
2	CED Spike2 Version 8	CED Cambridge Electronic design limited
3	Mathematica Version 10	©2020Wolfram Alpha LLC
4	Texmaker 4.4.1.	©2003-2014 by Pascal Brachet
5	The universal LaTeX editor cellSens Dimension	OLYMPUS EUROPA SE & CO. KG, D-20097 Hamburg

Tabelle 4.3: Chemikalien

	Chemikalien	Hersteller
1	Forene 100 % Isofluran 250 mL	AbbVie Deutschland GmbH & Co. KG, D-65189 Wiesbaden
2	Xylocain Gel 2 %	Aspen Germany GmbH, D-81679 München
3	Sterilium Händedesinfektionsmittel 500 mL	PAUL HARTMANN AG, 89522 Heidenheim Deutschland
4	Kochsalz Braun 0,9 % NaCl Infusionslösung	Chem Cruz, Santa Cruz Biotechnology, 69115 Heidelberg, Deutschland
5	Paraformaldehydlösung 4 % in PBS	Otto Fischar GmbH & Co. KG, D-66133 Saarbrücken
6	Cyanacrylatklebstoff 102	Permabond Engineering Adhesives Ltd., UK SO21 1WP, England
7	Histokitt Eindeckmittel	Glaswarenfabrik Karl Hecht, GmbH & Co KG, D-97647 Sondheim vor der Rhön
8	PBS-Tabletten	SIGMA-Alderich CHEMIE GmbH, D-82024 Taufkirchen
9	Ondansetronhydrochlorid CAS: 103639-04-9	SIGMA-Alderich CHEMIE GmbH, D-82024 Taufkirchen
10	Phentolaminhydrochlorid CAS: 73-05-2	SIGMA-Alderich CHEMIE GmbH, D-82024 Taufkirchen
11	Millipore Water	SIGMA-Alderich CHEMIE GmbH, D-82024 Taufkirchen
12	Xylol	SIGMA-Alderich CHEMIE GmbH, D-82024 Taufkirchen
13	Ethanol	SIGMA-Alderich CHEMIE GmbH, D-82024 Taufkirchen
14	Cresylviolett	SIGMA-Alderich CHEMIE GmbH, D-82024 Taufkirchen
15	Essigsäure	SIGMA-Alderich CHEMIE GmbH, D-82024 Taufkirchen

onsschere, Splitterpinzette, Uhrmacherpinzette, Gewebepinzette, Collegepinzette

2. Instrumente für die Präparation des formalinetränkten Gehirns:

Rundspatel, Präparierschere, flache Auffangschale, Splitterpinzette

3. Anfertigung der Phentolamin- und Ondansetronlösungen:

Eppendorf Mikropipetten, 50 mL Flacon-Tubes

4. Anfertigung der Gehirnschnitte:

6- und 24-Multiwell-Platten, feine Pinsel, Pinzette, Kreuzschlitzschraubendreher, Schrauben

5. Färbung der histologischen Präparate:

Glasstab, Stoppuhr

4.1.6 Verbrauchs- und Hilfsmaterialien

Tungsten Mikroelektroden (FHC, Bowdoin, ME 04287 USA), Tupfer, Feindosierungsspritzen, Papierhandtücher, Styroporunterlage, Kanülen, Butterflykanüle, Rasierklingen (Vibratom), Falcon Röhrchen, Pipettenspitzen, Mikroreaktionsgefäße, Einmalwaagschale, Objektträger und Deckgläser, Parafilm M Laboratory Film

4.2 Methoden

Der allgemeine Versuchsablauf war bei allen Mäusen gleich, sodass nur die Stimulationsprotokolle variierten. Vorbereitend wurden die Wirkstofflösungen hergestellt, die im zweiten und dritten Messprotokoll verwendet wurden. Das pulverförmige Phentolaminhydrochlorid und Ondansetronhydrochlorid wurden in isotoner Natriumchloridlösung aufgelöst. Die Stoffmengenkonzentration von Ondansetron betrug $6,814 \mu\text{M}$ ($100 \mu\text{g}$ in 50 mL Lösung). Die Verdünnungsreihe von Phentolamin wurde ausgehend von der 1 M Phentolaminlösung hergestellt. In jeweils 50 mL befanden sich Stoffmengenkonzentrationen von $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $1000 \mu\text{M}$ oder 1 M Phentolamin. Die Haltbarkeit der Wirkstoffe in Lösung bei Raumtemperatur betrug maximal sieben Tage, sodass 2 mL der Lösungen in Eppendorfgefäßen bei -20°C eingefroren wurden.

Der Versuchsablauf pro Tier untergliederte sich folgendermaßen:

1. Präparation des Rückenmarks
2. Trepanation des Schädels und Positionierung der Elektrode
3. Elektrophysiologische Messung spinaler Neuronenaktivität
4. Elektrische Läsion des Hirnstamms
5. Perfusion der Maus und Fixierung des Gehirns
6. Anfertigen der Objektträger mit den Gehirnschnitten
7. Nissl-Färbung
8. Mikroskopie und histologische Auswertung

Die einzelnen Arbeitsschritte sind im Folgenden ausführlich beschrieben.

4.2.1 Allgemeiner Versuchsablauf

1. Präparation des Rückenmarks

Initial wurde jede Maus am entsprechenden Versuchstag aus der MBU in einem Einzelkäfig ins Labor gebracht. Mittels 2% Isofluran erfolgte unter einem Sauerstofffluss von 2 L min^{-1} die Narkose in einer abgeschlossenen Plexiglasbox. Der Arbeitsplatz mit Vaporisator inklusive Sauerstoffzufluss sowie Heizplatte ist in der Abb. 4.1. abgebildet. Die kontinuierliche Narkose mit Isofluran konnte nach Fixierung der Vorderzähne in dem Narkoseschlauch auf der Heizplatte am elektrophysiologischen Arbeitsplatz fortgeführt werden. Zur Vorbeugung einer Hypothermie wurde die Maus auf einer beheizbaren Metallplatte gelagert. Vor Beginn der Präparation erfolgte eine Überprüfung der Narkosetiefe, indem mit der stumpfen Pinzette drei Mal der Zwischenzehenreflex überprüft wurde. Dies ist in Abb. 4.2. dargestellt. Bei fehlender reflexartiger Zuckung oder Zurückziehen der Hinterpfote war die Narkosetiefe ausreichend. Nach Rasur und Desinfektion des Präparationsbereichs wurde die Haut mit der Präparationsschere entlang der Wirbelsäule bis zum Schädel eröffnet. Zur lokalen Betäubung der autochthonen Rückenmuskulatur wurde Xylocain 2% Gel verwendet, wobei eine Einwirkzeit von mindestens 2 min eingehalten wurde. Unter Zuhilfenahme des binokularen Mikroskops wurden die autochthonen Rückenmuskeln im thorakolumbalen Bereich mit den Pinzetten und der Präparierschere stumpf entfernt. Die Eröffnung des Rückenmarks und Freilegung der mittig verlaufenden Arteria spinalis posterior erfolgte mittels Pinzetten und Präzisionsschere durch vorsichtige Laminektomie der Lendenwirbelkörper.

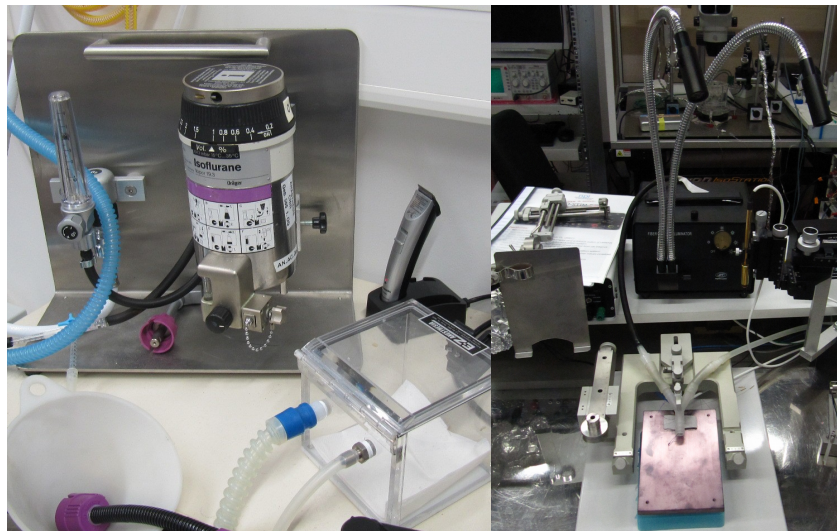


Abbildung 4.1: Elektrophysiologischer Arbeitsplatz. li.: Vaporisator (mit Isofluranbehälter) mit Sauerstoffzufuhr sowie Narkosekammer. re.:Präparationsplatz.

2. Trepanation des Schädels und Positionierung der Elektrode

Die Trepanation wurde vorsichtig unter Vermeidung von Gewebeschädigung des Gehirns mittels Handbohrer immer auf der linken Seite des fixierten Schädels durchgeführt.

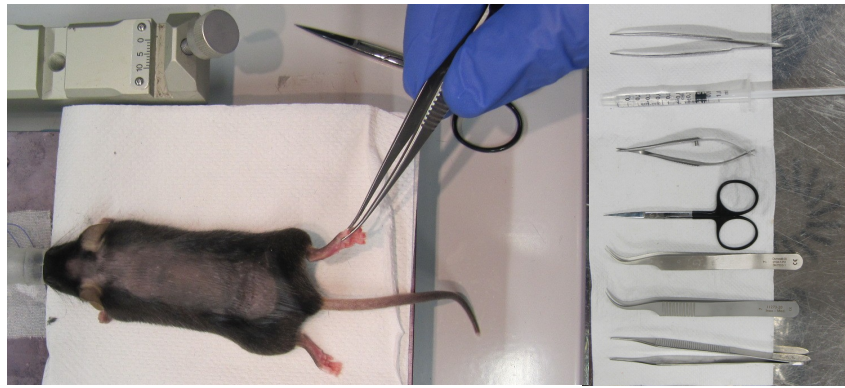


Abbildung 4.2: li.: Narkotisierte Maus auf der Heizplatte. Testung des Zwischenzehenreflexes zur Kontrolle der ausreichenden Narkosetiefe. re.: Präparationsbesteck zur Freilegung des lumbalen Rückenmarks mit diversen Pinzetten und Präzisionsschere sowie feiner Schere. Quelle: eigenes Foto

Das Trepanationsloch und die bipolare Stimulationselektrode sind in der Abb. 4.3. dargestellt. Aufgrund eines meningealen Gefäßgeflechts war ein senkrecht einführen der bipolaren Stimulationselektrode in den LC-Bereich nicht möglich, sodass ein schräger Einführungswinkel gewählt wurde. Zur genauen Bestimmung der Lokalisation des Bohrlochs diente der anatomische Punkt Bregma, an welchem die Pfeil- und die Kranznaht der Schädelknochen einander kreuzen. Ausgehend von Bregma wurden mit den horizontalen Messschiebern die Distanzen 1,0 mm nach lateral (links) und 4,5 mm nach rostral abgemessen und für die Trepanation markiert. Abhängig von dem Ausmaß der Krümmung des parietalen Schädelknochens ergab sich der jeweilige Eintrittswinkel der bipolaren Elektrode. Mittels des vertikalen Messschiebers wurde die Höhendifferenz zwischen der Suturenkreuzung auf dem Schädel (Bregma) sowie dem Trepanationsloch entlang der sagittalen Sutur bei 4,5 mm rostral von Bregma vermessen. In Abhängigkeit der Höhendifferenz wurde zwischen $\Delta = 0.5\text{mm}$ mit einem resultierenden Eintrittswinkel 19° und $\Delta = 1.0\text{mm}$ mit einem resultierenden Eintrittswinkel 9° unterschieden. Anschließend wurde die lumbale bis thorakolumbale Wirbelsäule im Bereich der verbliebenen anterioren Wirbelkörper in den stereotaktischen Rahmen mit den vier Befestigungsbügeln aufgespannt, um atembedingte Bewegungsartefakte während der elektrophysiologischen Messung zu verhindern. Nach dem endgültigen Fixieren der Maus im stereotaktischen Rahmen wurde die bipolare Stimulationselektrode durch das Bohrloch 3,8 mm in den Schädel eingeführt und wurde im weiteren Verlauf nicht mehr in der Position verändert. Der Abstand der beiden Elektroden der Stimulationselektrode betrug entsprechend der Abmessungen des LC- Arealis in Orientierung an den Koordinaten aus dem Mouse Brain Atlas stets 0,2 mm [155].

3. Elektrophysiologische Messung der spinalen Neuronenaktivität

Für die elektrophysiologische Messung war der Arbeitsplatz mit einem Verstärker, einem Frequenzfilter, einem Digital-Analog-Umwandler sowie der Analyse- und Aufzeichnungs-

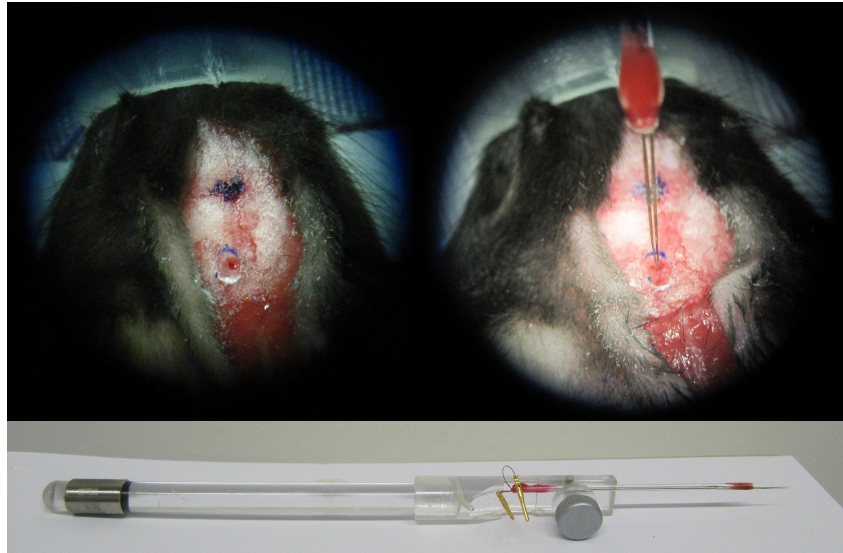


Abbildung 4.3: li: Trepanationsstelle 4,5 mm rostral zu Bregma und 1 mm lateral der sagittalen Suture. re.: Position der Stimulationselektrode für die Hirnstammstimulation im LC, unten: bipolare Stimulationselektrode.

Software Spike2 ausgestattet. Die Wolfram-Messelektrode wurden in das Rückenmark seitlich des Dorsalgefäßes in den Bereich der tiefen WDR-Neurone nach ventral vorgeschoben und die Referenzelektrode in der autochthonen Muskulatur fixiert. Die einliegende Stimulationselektrode ist in Abb. 4.4 abgebildet. Um Störsignale zu minimieren, wurde ein Faradayscher Käfig aus Alufolie und einer dünnen einschiebbaren Metallplatte vollständig um den Arbeitsplatz mit der Maus aufgestellt. Anschließend konnten extrazelluläre Signale der Neurone in den tiefen Laminae IV bis VI im Cornu posterior abgeleitet werden, wenn das entsprechende rezeptive Feld der Hinterpfote taktil stimuliert wurde. Nach Anpassung des Thresholds war die Charakterisierung der spinalen WDR-Neurone und deren rezeptive Felder möglich. Die elektrophysiologische Charakterisierung des Neurons erfolgte mit den standardisierten Von-Frey-Druckstäben mit den Massen: 6 g, 26 g, 80 g und 300 g sowie zusätzlichem Streichen. Die taktile Stimulation mit den verschiedenen Von-Frey-Druckstäben erfolgten fünfmalig über 5 min. Wenn die jeweilige abgeleitete Aktivität stabil war, wurde das Neuron für die Messprotokolle weiterverwendet, ansonsten verworfen. Während den Messreihen musste das Rückenmark regelmäßig mit Kochsalzlösung befeuchtet werden, weil Verdunstung zur Beeinträchtigung der spinalen Ableitung führte. Die Abb. 4.5. zeigt beispielhaft die taktile Stimulation mit einem Von-Frey-Druckstab sowie den 26 g Von-Frey-Druckstab. Die Messprotokolle beinhalteten die Stimulation des Hirnstamms im Bereich des LC mit verschiedenen Stimulationsreizen, die sich nur in der Frequenz unterschieden. Die Parameter der Stimulationsreize wurden mittels der Software Spike2 eingestellt und betragen für alle genutzten Stimulationsfrequenzen f : 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz und 100 Hz immer gleichermaßen:

Stromstärke jedes Einzelimpulses $I=200 \mu\text{A}$,

Spannung jedes Einzelimpulses $U=5\text{ V}$,

Wiederholung der Einzelimpulse $n=10$,

Zeitdauer der Gesamtstimulation $t=60\text{ s}$,

Für die einzelnen Messprotokolle sei auf Kapitel 4.2.2 verwiesen.

Alle Daten wurden mittels dem CED 1401 Mikro 04 und der Software Spike2 aufgezeichnet und analysiert.

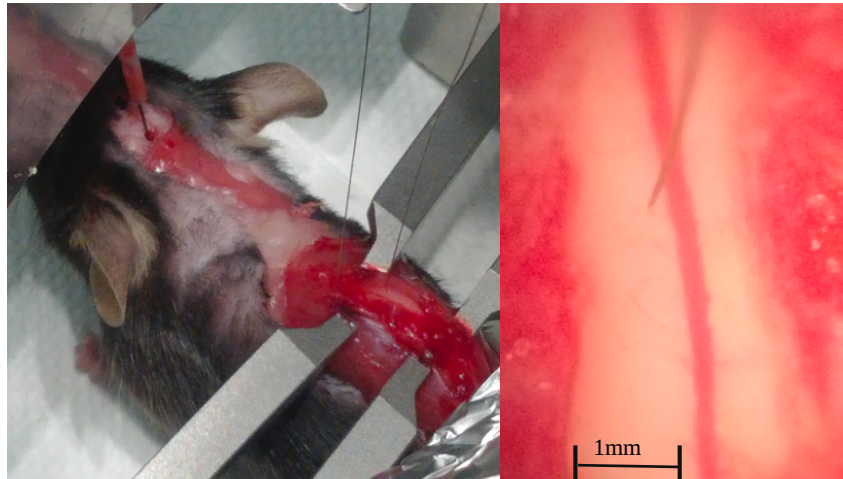


Abbildung 4.4: li.: Bipolare Stimulationselektrode im Hirnstamm im LC. Messelektrode im Rückenmark sowie Referenzelektrode in der autochthonen Rückenmuskulatur. re.: Messelektrode im Rückenmark im Bereich der tiefen WDR-Neuronen.

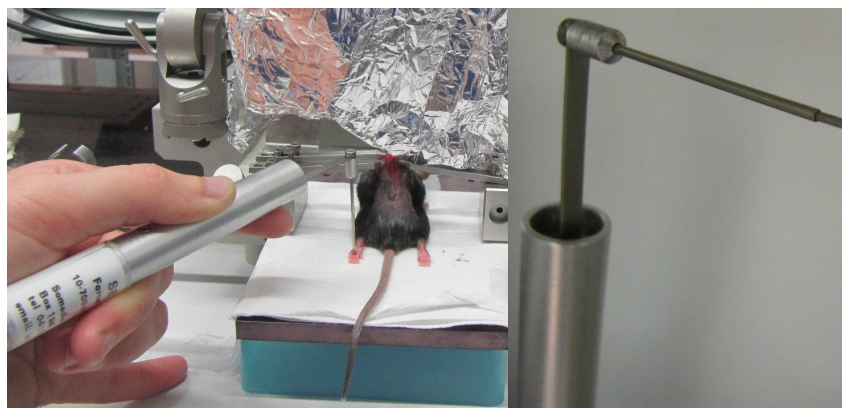


Abbildung 4.5: li.: Taktile Stimulation der Hinterpfote mittels Von-Frey-Filament. re.: elektronisches Von-Frey-Filament

4. Elektrische Läsion des Hirnstamms

Die lädierende Hirnstammstimulation am Ende jedes Stimulationsprotokolls erzeugte eine mikroskopisch sichtbare Läsion im Bereich der bipolaren Elektrode zur nachträglichen Lokalisation. Die gewählten Einstellungen in dem Analyseprogramm Spike2 betragen:

Stromstärke der Einzelimpulse $I=99\ \mu\text{A}$,

Spannung der Einzelimpulses $U=99\text{ V}$,

Wiederholung der Einzelimpulse $f=400$,
Zeitdauer der Gesamtstimulation $t=40$ s.

Nach der Läsion wurde die Maus für die Perfusion vorbereitet, über 2 min mit mindestens 2% Isofluran terminal narkotisiert und aus dem stereotaktischen Rahmen herausgenommen.

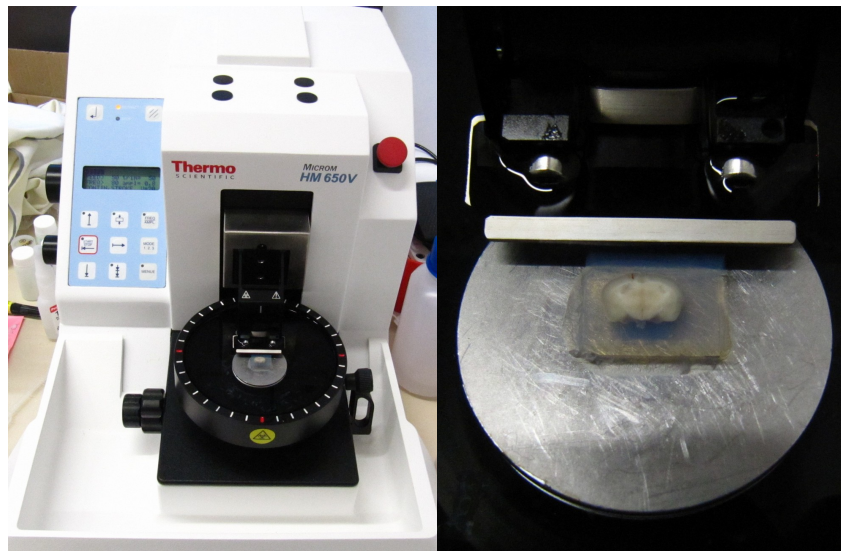


Abbildung 4.6: li.: Vibratom. re.: Hirnpräparat in Agarose auf Vibratom.

5. Perfusion der Maus und Fixierung des Gehirns

Die Perfusion ist eine Methode zur Gewebe- und Organfixierung mittels 4%iger Formalin-Lösung. Durch eine Pumpe wurde die Formalin-Lösung über die linke Herzkammer in das Gefäßsystem transportiert. Dem Arbeitsschutz entsprechend wurde die Perfusion aufgrund der leicht flüchtigen Formalinlösung unter einem Abzug durchgeführt. Auf einer Styroporplatte wurde die narkotisierte Maus an ihren Extremitäten fixiert. Nach Sternotomie wurde die Formalin-Lösung über die Pumpe durch eine Butterflykanüle in die linke Herzkammer gleichmäßig zugeführt und das rechte Atrium mittels Präparierschere eröffnet. Über die Perfusionsdauer von ungefähr 8 min bis 10 min bis zum Eintritt der Starre der Extremitäten, war die Perfusionspumpe mit gleichbleibender Geschwindigkeit auf Stufe 4 gestellt. Anschließend wurde das Groß- und Kleinhirn mittels Rundspatel aus dem Schädel herausgetrennt und die linke Hirnhälfte wurde markiert, indem mit einem Skalpell ein Keil aus dem Kleinhirn- und dem Großhirncortex ausgeschnitten wurde. Die so markierten Hirnpräparate wurden in einer Formalin-Lösung im Kühlschrank bei 4°C für 24 h aufbewahrt.

6. Anfertigen der Objektträger mit den Gehirnschnitten

Nach Spülung der formalinhaltigen Gehirnpräparate mit 4 mL PBS-Pufferlösung wurden die abgetrockneten Präparate einzeln mit 3%igem Agarosegel zu Blöcken ausgegossen. Die Agaroseblöcke härteten bei -8°C für mindestens 10 min aus. Die rechteckig zuge-

schnittenen Agaroseblöcke wurden mit Cyanacrylatklebstoff 102 auf der metallenen Präparathalterung des Vibratoms festgeklebt. Dies ist in der Abb. 4.6 dargestellt. Das Vibratom wurde auf die Einstellungen in Tab. 4.4 eingerichtet und die Präparatwanne mit PBS-Lösung aufgefüllt. Zur Orientierung der Schnittpräparate diente der Verlauf des vierten Ventrikels und es wurden die vier bis fünf Querschnitte des Hirnstamms im LC-Bereich mit einer Schichtdicke von 50 µm angefertigt. Die Präparate wurden auf gelatinierten Objektträger bei Raumtemperatur für mindestens 12 h getrocknet. Die PBS-Lösung sowie die Präparatüberreste wurden ordnungsgemäß entsorgt und das Vibratom mit Wasser und 70%iger Ethanollösung gesäubert.

Tabelle 4.4: Einstellungen des Vibratoms

Parameter	Einstellung
Feed	50
Trim	50
Frequenz	80
Amplitude	0,8
U	20
Modus	Continue Stroke

7. Nissl-Färbung

Die Nissl-Färbung der Hirnschnitte auf den gelatinierten Objektträgern wurde stets unter einem Abzug durchgeführt. Der Ablauf mit der Dauer der Einzelschritte ist in Tab. 4.5 aufgelistet. Dabei wurden die Objektträger für die jeweilige Dauer komplett in die Lösung gelegt und zwischen den einzelnen Lösungen der Überstand auf Zellstoff abgetropft.

Tabelle 4.5: Durchführung der Nissl Färbung

Schritt	Zeitdauer	Lösung
1	3 min	Objektträger auf einer Heizplatte bei 50°C erwärmen
2	3 min	70 % Ethanol
3	30 s	Millipore Wasser
4	2 min	Cresylviolet
5	1 min	Millipore Wasser
6	1 min	Millipore Wasser
7	30 s	70 % Ethanol mit 1 mL (3 Tropfen) Essigsäure
8	3 min	70 % Ethanol
9	3 min	80 % Ethanol
10	3 min	90 % Ethanol
11	3 min	100 % Ethanol
12	2 min	Xylol
13	2 min	Xylol
12	1 min	Versiegeln der Schnittpräparate mit Histokit und dem Deckglas

8. Mikroskopie und histologische Auswertung

Die Mikroskopie der 50 μm dicken Präparate erfolgte mit dem aufrechten Systemmikroskop Olympus BX51-P der Firma Olympus. Die Bilder wurden in Hellfeldmikroskopie mit der Objektivvergrößerung 20x aufgenommen. Diese Vergrößerung war ausreichend, um eine Aufnahme des Hirnstamms mit beidseitiger LC- Darstellung zu gewährleisten. Die Bildanalysesoftware "cellSens Dimension" von Olympus wurde für die Bildaufnahme verwendet. Der LC ist als ein in der Längsachse 200 μm ausgedehntes Kerngebiet lateral unterhalb der Seiten des vierten Ventrikels. In Mäusen schließt sich ventral das Gebiet des Ncl. subcoeruleus an. Der LC wird laut des Mouse-Brain-Atlas in den alpha-Bereich sowie in den dorsalen und ventralen Bereich unterteilt und dehnt sich zwischen dem standardisierten Schädelpunkten Bregma -5 mm bis $-5,3\text{ mm}$ in der Längsachse und interaural $-1,16\text{ mm}$ bis $-1,54\text{ mm}$ in der Querachse aus [155]. In Abb. 4.7 ist ein Querschnitt des vierten Ventrikels in Nissl-Färbung dargestellt und die Läsion ist mit einem roten Pfeil auf der linken Präparatseite markiert.

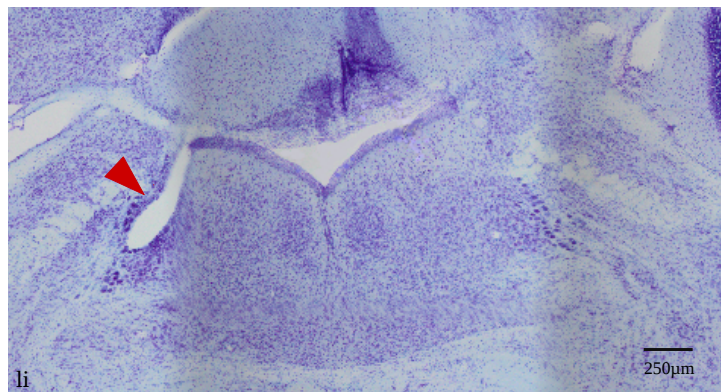


Abbildung 4.7: Coronarschnitt der Pons (Nissl-Färbung). Roter Pfeil: Läsion durch die bipolaren Stimulationselektroden im Hirnstamm im Bereich des LC.

4.2.2 Messprotokolle

Vergleich der Stimulationsfrequenzen

Ziel des ersten Messprotokolls war die Untersuchung des Einflusses verschiedener Hirnstammstimulationsfrequenzen im Bereich des LC auf die WDR-Neurone im Cornu posterior. Hierfür wurden an insgesamt 21 Tieren Messdaten erhoben. Dabei wurde der Hirnstamm mit den Frequenzen mit 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz und 100 Hz bei konstanten Stromstärken und Spannungen stimuliert und die Aktivität eines Dorsalhornsneurons gemessen.

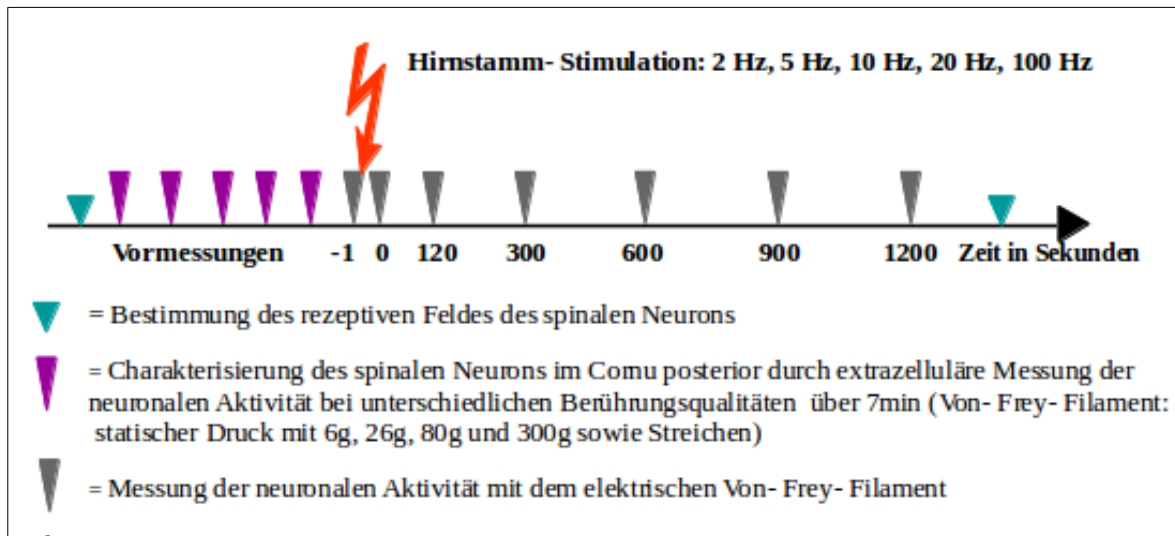


Abbildung 4.8: Bestimmung des rezeptiven Feldes (blaue Dreiecke), Charakterisierung des spinalen Neurons (lila Dreiecke), Messung der neuronalen Aktivität (graue Dreiecke) 1 sec vor bis 1200 sec nach LC- Stimulation (roter Pfeil) mit der jeweiligen Stimulationsfrequenz: 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz, 100 Hz.

Das Messprotokoll unterteilt sich nochmals in die erste Messreihe mit 2 Hz, 5 Hz, 10 Hz und 100 Hz, die an 9 Tieren gemessen wurde, sowie in die zweite Messreihe mit 5 Hz, 10 Hz, 20 Hz und 100 Hz, die an weiteren 11 Tieren gemessen wurde. Daraus resultiert die verschiedene Anzahl der gemessenen Tiere pro Stimulationsfrequenz: $n(2\text{ Hz}) = 9$ Tiere, $n(5\text{ Hz}) = 19$ Tiere, $n(10\text{ Hz}) = 19$ Tiere, $n(20\text{ Hz}) = 11$ Tiere, $n(100\text{ Hz}) = 19$ Tiere. Dabei wurde immer auf der linken Hirnseite der Bereich des LC im Hirnstamm stimuliert. Die abgeleiteten Neurone wurden sowohl auf der ipsilateralen Rückenmarksseite ($n=10$) als auch auf der kontralateralen Rückenmarksseite ($n=11$) betrachtet. Die neuronale Aktivität wurde jeweils direkt vor der Hirnstammstimulation gemessen sowie über einen Zeitraum bis 10 min danach bestimmt. Zu festgesetzten Zeitpunkten wurde jeweils drei Mal hintereinander die neuronale Aktivität gemessen, die durch einen Von-Frey-Druckstab mit 26 g standardisiert ausgelöst wurde. Die Messzeitpunkte waren 1 min vor der Hirnstammstimulation sowie unmittelbar danach. Der Zeitpunkt unmittelbar nach der LC-Stimulation wird in der Abb. 4.8 als 0 min dargestellt, ebenso der weitere zeitliche Ablauf der Messung mit den Messpunkten 2 min, 5 min, 10 min, 15 min und

20 min. Zusätzlich wird hier die Charakterisierung des Neurons durch die Vormessungen dargestellt. Hierbei wurde die Stabilität des Messsignals durch mehrmalige Messungen bei verschiedenen statischen und dynamischen Reizen geprüft. Erst wenn das Neuron ein stabiles Verhalten zeigte, konnte das Messprotokoll angewendet werden. Des Weiteren wurden das rezeptive Feld des jeweils abgeleiteten Neurons vor und nach den Frequenzmessungen ermittelt.

Der adrenerge Einfluss

Im zweiten Messprotokoll wurde der Einfluss der α -adrenergen Rezeptoren bei der Überleitung der deszendierenden Inhibition untersucht. Dafür wurde die neuronale Aktivität unter spinaler Einwirkung von unselektiven α -Adrenozeptor-Antagonisten betrachtet. Als Wirkstoff wurde Phentolamin verwendet. Die um das Rückenmark liegende Dura wurde lokal dorsal entfernt, sodass der Wirkstoff direkt auf das Rückenmark einwirken konnte. Die Frequenz der Hirnstammstimulation wurde auf $f=20$ Hz festgelegt und es wurde wieder nur die linke Hirnstammseite stimuliert. Dieses Messprotokoll wurde an insgesamt 10 Mäusen durchgeführt. Anhand einer Verdünnungsreihe wurde die Aktivität unter Applikation verschiedener Phentolaminkonzentrationen gemessen. Das Messprotokoll bestand aus mehreren hintereinander erfolgten Messreihen mit aufsteigenden Phentolaminkonzentrationen von $1 \mu\text{M}$, $10 \mu\text{M}$, $100 \mu\text{M}$, $1000 \mu\text{M}$ bis 1M . Ausgehend von zwei Veröffentlichungen wurde sich an niedrigeren Phentolaminkonzentrationen im μ -Bereich orientiert [140, 139].

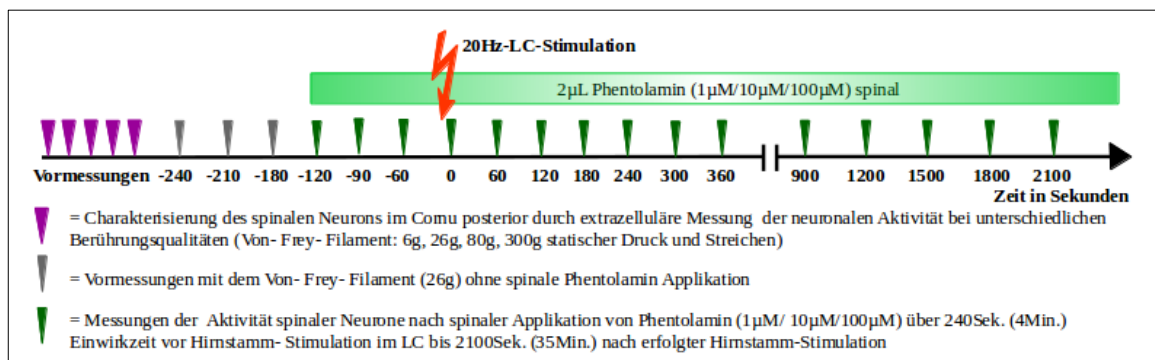


Abbildung 4.9: Messprotokoll mit Verwendung des α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin in den Konzentrationen $c=1 \mu\text{M}/10 \mu\text{M}/100 \mu\text{M}$: Charakterisierung der spinalen Neurone (lila Dreiecke) und Messung der spinalen neuronalen Aktivität vor Applikation des Phentolamins (graue Dreiecke). Messung der Aktivität spinaler Neurone während der Einwirkzeit von Phentolamin über 240 Sek. und Messung nach Hirnstammstimulation im LC über 2100 Sek. (grüne Dreiecke).

Zu Beginn jeder Messung erfolgte die Charakterisierung des Neurons. Bei stabilen Messwerten wurde $2 \mu\text{L}$ Phentolamin auf den lumbalen Rückenmarksanteil gegeben. Nach der Einwirkzeit von 3 min erfolgte die Hirnstammstimulation mit der Frequenz $f=20$ Hz. Die Abb. 4.9 stellt den zeitlichen Ablauf der Messung unter Phentolamin mit

der Konzentration $c=1\ \mu\text{M}$ dar und ist übertragbar auf jede der anderen Phentolaminkonzentrationen. Nach der elektrophysiologischen Charakterisierung des Neurons im Sinne von Vormessungen (lila Pfeile) erfolgte die Messung der Basiswerte. Danach wurde die Phentolaminlösung auf das Rückenmark pipettiert. Die Einwirkzeit betrug 3 min. Die dunkelgrünen Pfeile markieren den Beginn und die Dauer der Messungen unter Phentolamin. Die hellgrünen Pfeile stellen nur einen Messwert zum jeweiligen Messzeitpunkt dar. Um die Abbildung übersichtlich zu halten, stellen die dunkelgrünen Pfeile keine Einzelmesswerte, sondern Messreihen von sechs Werten innerhalb der jeweiligen Minute dar.

Der serotonerge Einfluss

Zielsetzung des dritten Messprotokolls war die Überprüfung des durch 5HT_3 -Rezeptoren vermittelten serotonergen Einflusses auf die durch den LC vermittelte Inhibition der WDR-Neurone im Cornu posterior. Der serotonerge Einfluss wurde durch den spinal aufgetragenen 5HT_3 -Rezeptor-Antagonisten Ondansetron überprüft. Die Präparation der Maus und die Bohrung wurde wie im ersten Messprotokoll durchgeführt. Zusätzlich wurde die Dura auf der linken Rückenmarksseite mittels feiner Pinzetten, einer Kanüle und der Vannas Spring Schere eröffnet und entfernt. Damit wurde ein direkter Kontakt zwischen Wirkstoff und Rückenmark hergestellt.

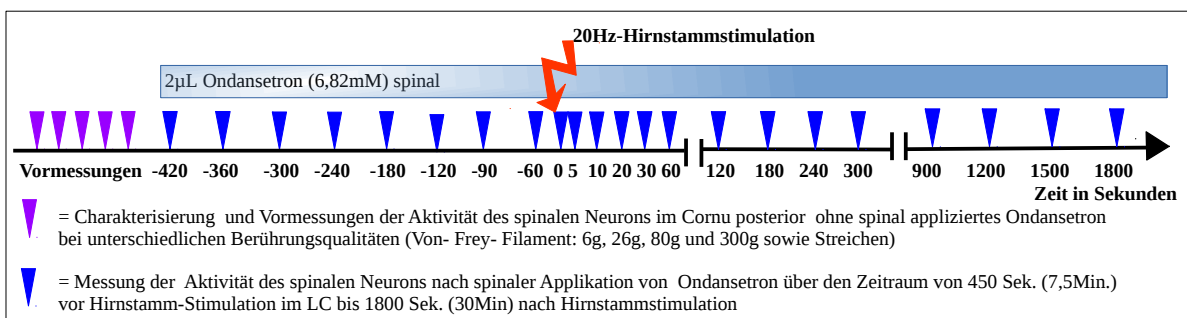


Abbildung 4.10: Charakterisierung und Messung der spinalen neuronalen Aktivität vor Applikation des 5HT_3 -Rezeptor-Antagonisten Ondansetron ($c=6,82\ \text{mM}$; lila Dreiecke). Messung der Aktivität spinaler Neurone während der Einwirkzeit von Ondansetron über 450 sec und Messung der Aktivität nach Hirnstammstimulation im LC über 1800 sec (blaue Dreiecke).

Die Frequenz der Hirnstammstimulation wurde auf $f=20\ \text{Hz}$ festgelegt. Es wurde wieder nur die linke Hirnstammseite stimuliert. Das Messprotokoll wurde insgesamt an 11 Mäusen durchgeführt. Nach Charakterisierung und Erfassung der Vorwerte erfolgte die spinale Applikation von $2\ \mu\text{L}$ Ondansetron in einer Stoffmengenkonzentration von $c=6,82\ \text{mM}$ ($100\ \mu\text{g}$ Ondansetron in $50\ \mu\text{L}$ Kochsalzlösung) [154]. Bevor die Hirnstammstimulation mit 20 Hz erfolgen konnte, wurde die Ondansetronlösung nach Entfernung der Dura direkt auf das Rückenmark pipettiert. Die Einwirkzeit betrug 7,5 min. Die Abb. 4.10 stellt den zeitlichen Ablauf der Messung unter Ondansetron dar und die Messzeitpunkte

entsprechen denen der vorangegangenen Messreihe. Die abgeleiteten Neurone wurden sowohl auf der ipsilateralen Rückenmarksseite (n=5) als auch auf der kontralateralen Rückenmarksseite (n=6) gemessen. Das 26 g Von-Frey-Filament wurde als statischer Reiz auf die Hinterpfote verwendet.

4.3 Statistik

Die statistische Datenanalyse wurde unter Verwendung des Programms Wolfram Mathematica mit den normierten Datensätzen auf Grundlage der Rohdaten durchgeführt. Bei der Normierung wurde der Mittelwert vor der Hirnstammstimulation als 100 % festgelegt. Daher ist auf der Y-Achse die neuronale Aktivität als f/f_0 in % angegeben. Als statistisches Testverfahren wurde bei Normalverteilung der Messdaten die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA ggf. mit dem Post-Hoc-Test nach Bonferroni gewählt. Das Signifikanzniveau aller statistischen Testverfahren liegt bei 5 %. Die Darstellung der Daten erfolgte als normierte Mittelwerte \pm Standardfehler. Der Wilcoxon-Rangsummentest wurde bei nicht normalverteilten Datensätzen verwendet und die Darstellung erfolgte als Median und Quantilenabstand. Die Messwerte des zweiten und dritten Messprotokolls wurden gepoolt. Für die Statistik des Messprotokolls mit den Phentolaminmessreihen wurden ebenfalls Messwerte gepoolt. Die Messwerte zu den Zeitpunkten 0 sec, 4 sec und 8 sec wurden zum Messzeitpunkt 10 sec gepoolt. Jeweils die ersten 5 Messzeitpunkte nach einer vollen Minute wurden gepoolt (z.B. 60 sec, 64 sec, 68 sec, 72 sec und 76 sec wurden gepoolt als 60 sec-Wert verwendet) und wurden entsprechend als Messzeitpunkte zu 60 sec, zu 120 sec und zu 180 sec in der Statistik verwendet. In der Ondansetronmessreihe wurden die Messzeitpunkte 0 sec, 5 sec und 10 sec gepoolt und entsprechen dem in der Statistik verwendeten 10 sec-Wert. Ebenfalls wurden die Messwerte 20 sec und 30 sec gepoolt und entsprechen zusammen dem verwendeten 30 sec-Wert.

Kapitel 5

Ergebnisse

5.1 Veränderung der Ausdehnung der rezeptiven Felder der Hinterpfoten

Die erste Hypothese geht davon aus, dass die Hirnstammstimulation und die akute repetitive mechanische nozizeptive Stimulation zu keiner signifikanten Vergrößerung des rezeptiven Feldes der spinothalamischen Neuronen führen. Betrachtet wurden die rezeptiven Felder der Hinterpfoten, dessen Ausdehnung vor Beginn der Messungen sowie nach Beendigung des Stimulationsprotokolls bei 18 Tieren gemessen wurde. Die zweiten Messwerte nach Beendigung des Stimulationsprotokolls werden im Folgenden als Nachwerte bezeichnet. Bei nicht normalverteilten Messwerten zeigte sich im Signed Rank Test keine signifikante Abweichung der Vor- und Nachwerte ($p= 0,0591$). In der Abb. 5.1 sind die normierten Vor- und Nachwerte gegenübergestellt.

Der Median der Vorwerte beträgt 14 mm^2 mit einer 25 %-Quantile von 9 mm^2 und einer 75 %-Quantile von 60 mm^2 . Im Vergleich dazu lag der Median der Nachwerte bei 18 mm^2 mit einer 25 %-Quantile von 10 mm^2 und einer 75 %-Quantile von 128 mm^2 . Die Mehrheit der rezeptiven Felder blieb unverändert und nur bei 5 Tieren konnte eine Vergrößerung der rezeptiven Felder gemessen werden. Der Vergleich der absoluten Messwerte ist in der Abb. 5.2 dargestellt und die veränderten rezeptiven Felder sind mit einem roten Kreis markiert.

5.2 Vorübergehende Reduktion der neuronalen Aktivität nach Hirnstammstimulationen mit aufsteigenden Frequenzen

Im ersten Messprotokoll wurde die unmittelbare neuronale Aktivität nach der Hirnstammstimulation betrachtet. Unterschiedliche Stimulationsfrequenzen wurden in ihrer Wirkung auf die neuronale Aktivität der WDR-Neurone untersucht. Die Messreihen wurden an

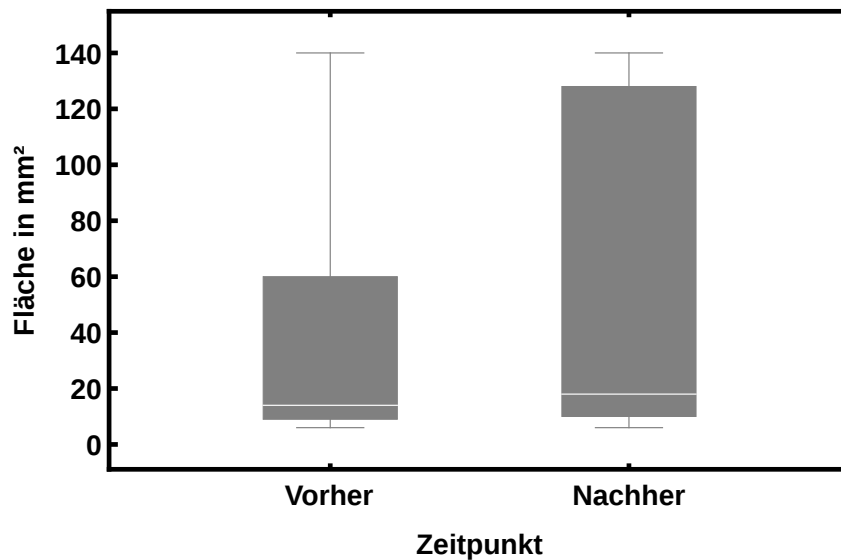


Abbildung 5.1: Rezeptive Feldgrößen der Hinterpfoten vor und nach der Hirnstammstimulation mit maximaler Stimulationsfrequenz von 100 Hz. Es gibt keinen signifikanten Unterschied (Median vorher: 14mm²/nachher: 18mm², Signed Rank Test p=0,0591; n=18).

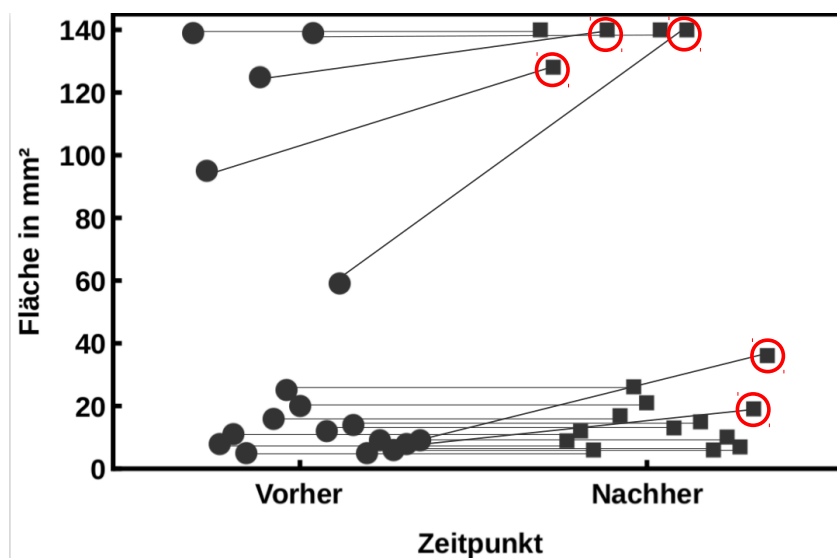


Abbildung 5.2: Individuelle rezeptive Felder vor und nach Hirnstammstimulation. Größer werdende Felder sind mit roten Kreisen gekennzeichnet (5/18).

21 Tieren durchgeführt. Die Messergebnisse wurden zunächst unabhängig von der abgeleiteten Rückenmarksseite betrachtet. Über den zeitlichen Verlauf von 20 min wurden zwei Phasen der spinalen Neuronenaktivität beobachtet.

Zunächst kam es nach der Hirnstammstimulation mit jeweils 2 Hz, 10 Hz, 20 Hz und 100 Hz zu einem unmittelbaren, kurzen Aktivitätsabfall unter den Ausgangswert. Dies soll im Folgenden als erste Phase bezeichnet werden. Anschließend war eine längere Aktivitätssteigerung des gleichen spinalen Neurons messbar, die im Weiteren als zweite Phase bezeichnet wird. Die Aktivitätsverläufe über die Zeit sind in der Abb. 5.3 dargestellt. Der Zeitpunkt 0 min entspricht den Messwerten innerhalb der ersten 10 Sekunden

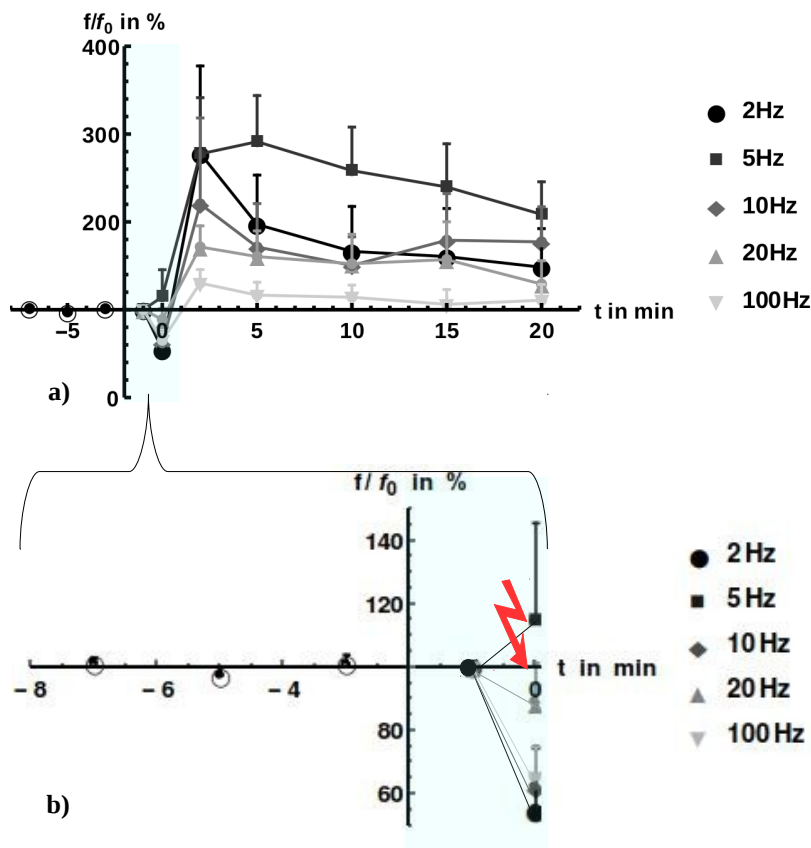


Abbildung 5.3: Relative Frequenzveränderung spinaler Neurone nach Hirnstammstimulation mit unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen. Die Hirnstammstimulation erfolgte unmittelbar vor dem Messzeitpunkt $t = 0$ min und ist mit dem roten Pfeil dargestellt. a): Gesamtverlauf mit vier Vorwerten vor Hirnstammstimulation und den Messwerten nach Stimulation ab Minute 0. b): Erste Phase mit Vorwerten und Aktivität unmittelbar nach Stimulation. Die Frequenzmessreihen unterscheiden sich signifikant voneinander (ANOVA, F-Ratio= 4.504, $p=0.002$). Im Bonferroni-Post-hoc-Test unterscheiden sich die Frequenzreihen 2 Hz/ 100 Hz sowie 5 Hz/ 100 Hz. Die Zeitpunkte 0 min/5 min, 2 min/5 min, -1 min/10 min, 5 min/10 min, 5 min/15 min und 5 min/20 min zeigten sich im Bonferroni-Post-hoc-Test unterschiedlich. Die Werte repräsentieren normierte Mittelwerte + SEM. Frequenzgruppen: $n(2\text{ Hz})= 9$, $n(5\text{ Hz})= 19$, $n(10\text{ Hz})=19$, $n(20\text{ Hz})= 11$, $n(100\text{ Hz})=19$).

nach LC-Stimulation und wurde nur vereinfacht als 0 min bezeichnet. Zum Zeitpunkt 0 min kam es überwiegend zu einem Frequenzabfall, außer bei der Stimulationsfrequenz $f=5\text{ Hz}$ ($n=19$) mit einem Anstieg auf 109.858 % ($\pm 29.571\%$). Die niedrigste Stimulationsfrequenz $f=2\text{ Hz}$ ($n=9$) führte unmittelbar zu einer Verringerung der neuronalen Aktivität auf 49.27 % ($\pm 16.27\%$). Die Stimulationsfrequenz $f=10\text{ Hz}$ ($n=19$) führte zu einem Aktivitätsabfall auf 62.188 % ($\pm 12.06\%$), die 20 Hz Stimulationsfrequenz ($n=11$) zu einem Aktivitätsabfall auf 91.711 % ($\pm 13.394\%$) und die 100 Hz Stimulationsfrequenz ($n=19$) führte zu einem Aktivitätsabfall auf 65.76 % ($\pm 9.12\%$). In der zweiten Phase nach der Hirnstammstimulation zeigten alle Messreihen ab der zweiten Minute einen Anstieg der neuronalen Aktivität über das Ausgangsniveau. In der ANOVA-Analyse zeigten sich die Messwerte zu den Zeitpunkten signifikant unterschiedlich (ANOVA,

F-Ratio=7,717, $p=0.14 \times 10^{-7}$). Allerdings bestanden im Bonferroni-Post-hoc-Test nur Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten 0 min zu 5 min, 2 min zu 5 min, Minute -1 min zu 10 min sowie 5 min zu den folgenden 10 min/15 min/20 min. Ein signifikanter Unterschied speziell der Messzeitpunkte des Ausgangswerts vor der LC-Stimulation (Minute -1 min) und dem unmittelbaren Folgewert nach der LC-Stimulation (Minute 0 min) war im Bonferroni-Post-hoc-Test nicht nachweisbar. Dennoch steht der kurzfristige Frequenzabfall der ersten Phase zum Zeitpunkt 0 min dem Aktivitätsanstieg zwischen der zweiten und fünften Minute mit anschließendem langsamen Frequenzabfall über die Zeit bis 20 min gegenüber. Über den Frequenzverlauf zeigten die niedrigeren Stimulationsfrequenzen (2 Hz, 5 Hz und 10 Hz) ab der zweiten Minute nach Stimulation eine stärkere neuronale Aktivität als die beiden höheren Stimulationsfrequenzen. Zwanzig Minuten nach der Stimulation war die neuronale Aktivität bei den niedrigen Stimulationsfrequenzen immer noch mit 148-204 % deutlich höher als der Ausgangswert (100 %). Die Messwerte der höheren Stimulationsfrequenzen (20 Hz, 100 Hz) hatten sich nach zwanzig Minuten wieder dem Ausgangswert (100 %) angenähert. In der ANOVA-Analyse konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den fünf unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen nachgewiesen werden (ANOVA, F-Ratio=4.504, $p=0.002$). Die Messreihen der Hirnstammstimulationen mit 2 Hz und 5 Hz waren jeweils im Bonferroni-Post-hoc-Test gegenüber 100 Hz signifikant unterschiedlich. Beispielhaft wird in Abb. 5.4 der histologische Nachweis der Läsion mit entsprechendem Frequenzverlauf nach 20 Hz-Stimulation dargestellt. In der ersten Phase kommt es zu einem deutlichen Frequenzabfall nach LC-Stimulation sowie anschließend zu einer Erholung mit Frequenzanstieg.

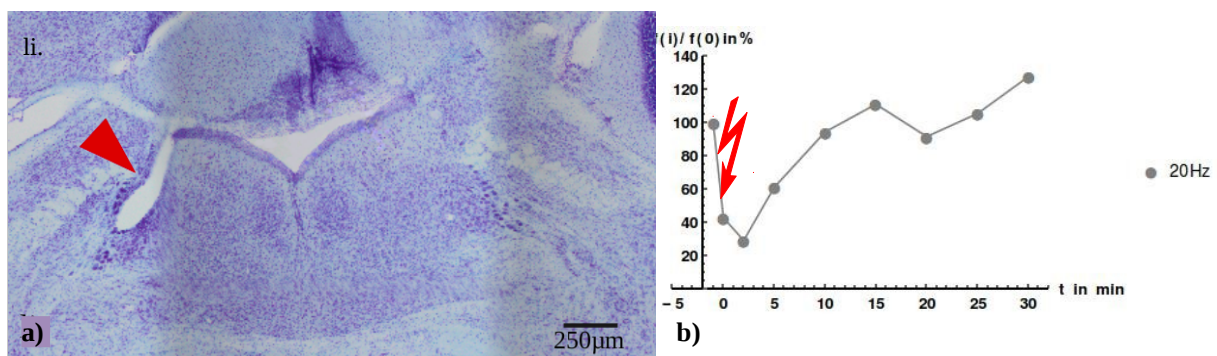


Abbildung 5.4: Histologischer Nachweis der LC-Läsion mit entsprechendem Frequenzverlauf nach 20 Hz-Stimulation. a) Nissl-Färbung. b) normierte Messwerte einer Einzelzelle.

5.3 Unterschiede der ipsilateralen und kontralateralen spinalen neuronalen Aktivität nach Hirnstammstimulation

Die dritte Hypothese besagt, dass es keinen messbaren Seitenunterschied bezüglich der deszendierenden adrenergen Inhibition auf spinaler Ebene gibt. Betrachtet wurde wieder die spinale Aktivität unmittelbar nach LC-Stimulation. Hierzu wurden die Daten des ersten Messprotokolls genutzt. Die Hirnstammstimulation fand immer auf der linken Hirnhälfte statt. Die spinalen Signalableitungen wurden sowohl auf der linken (ipsilateralen) als auch auf der rechten (kontralateralen) Rückenmarksseite erhoben und die Messwerte seitengetrennt ausgewertet. Die Aktivitätsänderung im Seitenvergleich ist nach den Stimulationsfrequenzen geordnet in der Abb. 5.5 dargestellt. Hierbei ist auffällig, dass die kontralateralen Werte bei den Stimulationsfrequenzen 2 Hz, 5 Hz, 20 Hz und 100 Hz durchschnittlich niedriger sind als die ipsilateralen Werte.

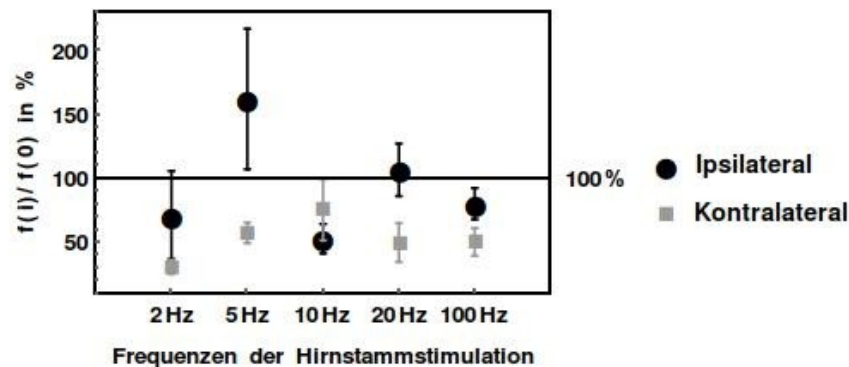


Abbildung 5.5: Spinale Aktivität bis 10 sec nach Hirnstammstimulation bei Stimulationsfrequenzen von 2 bis 10 Hz. Normiert auf den Wert vor Stimulation (100 %) fällt die Aktivität innerhalb der ersten 10 sec nach Stimulation bei allen Stimulationsfrequenzen ab, wenn auf der kontralateralen Seite abgeleitet wurde. Die Frequenzänderung ipsilateral abgeleiteter Neurone ist kleiner. Ipsilateral spinal gemessene Frequenzveränderungen und kontralateral spinal gemessene Frequenzveränderungen sind signifikant unterschiedlich. Die Werte repräsentieren normierte Mittelwerte + SEM. (ANOVA, $F=6.171$, $p=0.015$; Frequenzgruppen: $n(2\text{ Hz, ipsilateral})=4$; $n(2\text{ Hz, kontralateral})=5$; $n(5\text{ Hz, ipsilateral})=10$; $n(5\text{ Hz, kontralateral})=9$; $n(10\text{ Hz, ipsilateral})=10$; $n(10\text{ Hz, kontralateral})=9$; $n(20\text{ Hz, ipsilateral})=6$; $n(20\text{ Hz, kontralateral})=5$; $n(100\text{ Hz, ipsilateral})=10$; $n(100\text{ Hz, kontralateral})=9$).

Kontralateral betragen die Werte nach Hirnstammstimulation mit 2 Hz $\tilde{x}=30.78\%$, mit 5 Hz $\tilde{x}=57.56\%$, mit 10 Hz $\tilde{x}=75.53\%$, mit 20 Hz $\tilde{x}=49.96\%$ und mit 100 Hz $\tilde{x}=50.36\%$. Bei der ipsilateralen Messreihe hingegen kam es unter der 5 Hz-Stimulation zu einer Aktivitätssteigerung auf $\tilde{x}=162.16\%$ und bei der 20 Hz Stimulation erhöhte sich der Wert auf $\tilde{x}=106.82\%$. Die weiteren ipsilateralen Mittelwerte betragen bei 2 Hz $\tilde{x}=71.45\%$, bei 10 Hz $\tilde{x}=52.93\%$ und bei 100 Hz $\tilde{x}=80.33\%$. Die ipsilateralen und kontralateralen Mittelwerte sind signifikant unterschiedlich (ANOVA, $F=6.171$, $p=0.015$), allerdings zeigen sich die einzelnen Frequenzen nicht signifikant verschieden (ANOVA, $F=1.51$, $p=0.21$).

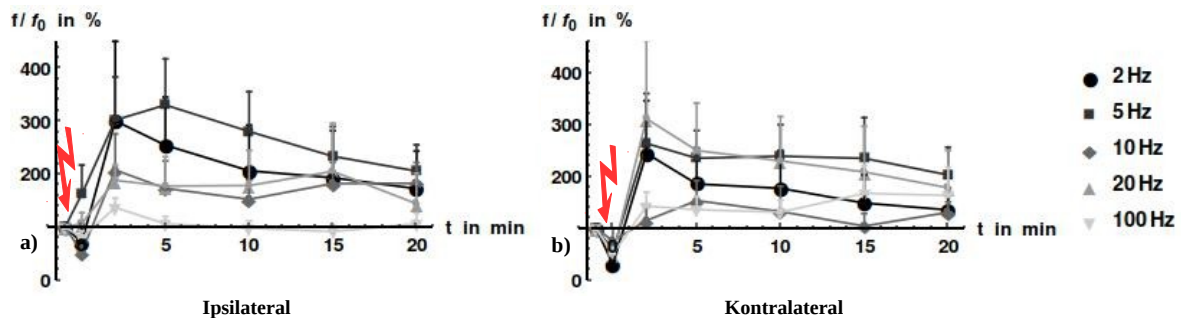


Abbildung 5.6: Relative Frequenzveränderung ipsilateraler und kontralateraler spinaler Neuronen nach bipolarer Hirnstammstimulation. a) Ipsilateral: Frequenzabfall nach LC-Stimulation bei allen Frequenzen außer bei 5-Hz-Stimulation. Die ipsilateralen Messreihen sind signifikant unterschiedlich (ANOVA, F-Ratio=7.53, $p < 0.0001$). Im Bonferroni-Post-hoc-Test waren die Messreihen 100 Hz zu 5 Hz sowie 10 Hz zu 5 Hz signifikant unterschiedlich. b) Kontralateral: Frequenzabfall nach allen Stimulationsfrequenzen. Die kontralateralen Messreihen sind signifikant unterschiedlich (ANOVA, F-Ratio=3.34, $p < 0.0001$). In dem Bonferroni-Post-hoc-Test waren nur die Messreihen 10 Hz zu 5 Hz signifikant unterscheidbar. Die roten Pfeile markieren die Stimulationszeitpunkte. Frequenzgruppen: $n(2 \text{ Hz, ipsilateral}) = 4$; $n(2 \text{ Hz, kontralateral}) = 5$; $n(5 \text{ Hz, ipsilateral}) = 10$; $n(5 \text{ Hz, kontralateral}) = 9$; $n(10 \text{ Hz, ipsilateral}) = 10$; $n(10 \text{ Hz, kontralateral}) = 9$; $n(20 \text{ Hz, ipsilateral}) = 6$; $n(20 \text{ Hz, kontralateral}) = 5$; $n(100 \text{ Hz, ipsilateral}) = 10$; $n(100 \text{ Hz, kontralateral}) = 9$. Quelle: eigene Darstellung mit Mathematica erstellt

Bei der Betrachtung des zeitlichen Frequenzverlaufs der ipsilateralen und kontralateralen Messwerte ist ebenfalls eine erste Phase mit einer Aktivitätsminderung festzustellen, gefolgt von einer zweiten Phase eines vorübergehenden Aktivitätsanstiegs. Die Kurven sind in Abb. 5.6 dargestellt. Sowohl die ipsilateralen als auch die kontralateralen Frequenzverläufe sind entsprechend den Stimulationsfrequenzen signifikant unterschiedlich (ipsilateral: ANOVA, F-Ratio=7.53, $p < 0.0001$, kontralateral: ANOVA, F-Ratio=3.34, $p < 0.0001$). In dem Bonferroni-Post-hoc-Test zeigten sich ipsilateral die Messreihen 100 Hz zu 5 Hz sowie 10 Hz zu 5 Hz signifikant verschieden. Innerhalb der kontralateralen Messreihen waren nur die Messreihen 10 Hz zu 5 Hz signifikant unterschiedlich zueinander. Bezüglich der Messzeitpunkte ergab sich ipsilateral ein signifikanter Unterschied (ANOVA, F-Ratio=5,69, $p < 0,0001$) mit im Bonferroni-Post-hoc-Test unterscheidbaren Zeitpunkten: -1 min zu 2 min, 0 min zu 2 min, 0 min zu 5 min, 0 min zu 10 min, 0 min zu 15 min und 0 min zu 20 min. Die kontralateralen Messzeitpunkte stellten sich ebenfalls signifikant unterschiedlich dar (ANOVA, F-Ratio=4,68, $p < 0,001$) und es ergaben sich im Bonferroni-Post-hoc-Test die folgenden Messzeitpunkte unterscheidbar voneinander: -1 min zu 2 min, 0 min zu 2 min, -1 min zu 5 min und 0 min zu 5 min.

5.4 Die neuronale Aktivität unter Einfluss des α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin nach 20 Hz-Hirnstammstimulation

Verschiedene Phentolaminkonzentrationen wurden spinal aufgetragen und unter ihrer Wirkung wurde die neuronale Aktivitätsänderung nach Hirnstammstimulation an 10 Tieren gemessen.

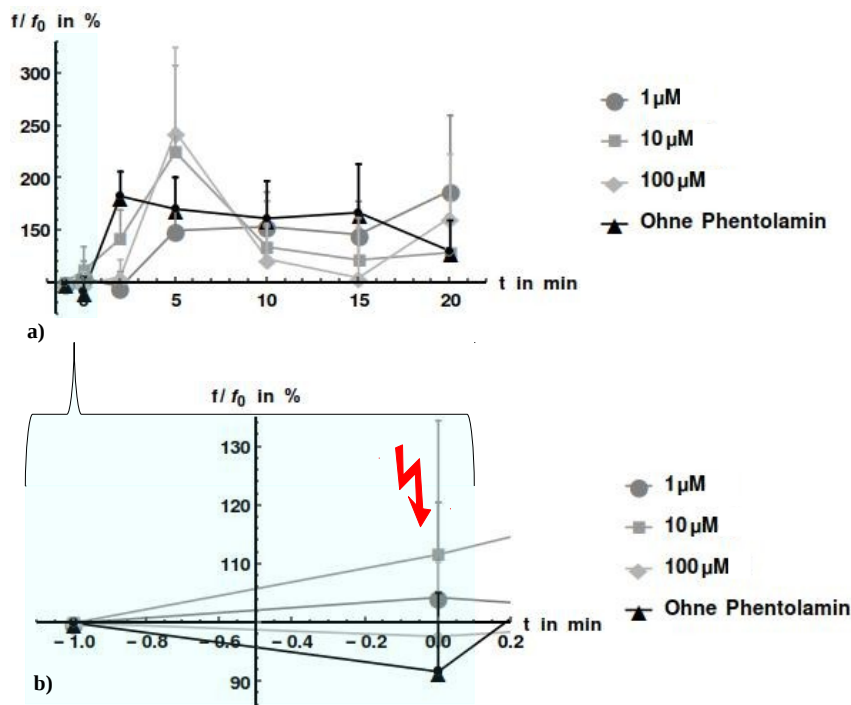


Abbildung 5.7: Relative Frequenzänderung zum Ausgangswert (100 %) mit und ohne spinal applizierte Phentolaminlösung in den Konzentrationen 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M. a) Frequenzen innerhalb von 20 min nach 20 Hz- Hirnstammstimulation. b) Frequenzveränderung innerhalb von 10 sec nach Hirnstammstimulation (roter Pfeil). Die Frequenzen spinaler Neurone unter Einfluss von Phentolamin sind zu dem Frequenzverlauf ohne Phentolamin nicht signifikant unterschiedlich (1 μ M:ANOVA, F-Ratio=3.389, $p=0.07$; 10 μ M:ANOVA, F-Ratio=3.593, $p=0.063$; 100 μ M:ANOVA, F-Ratio=2.963, $p=0.09$). Die Werte repräsentieren normierte Mittelwerte + SEM. n (Nativ)= 10, n (1 μ M Phentolamin)=10). Quelle: eigene Darstellung mit Mathematica erstellt

Die Einwirkzeit der verschiedenen konzentrierten Phentolaminlösungen betrug immer 3 min. Währenddessen wurde jede Minute die neuronale Aktivität abgeleitet. Unter spinaler Phentolamingabe kam es zur Erhöhung der gemessenen neuronalen Aktivität um bis zu 50 % des Ausgangswertes. Daher wurden alle weiteren Messwerte der jeweiligen Messreihen durch das veränderte Aktivitätsniveau nach Phentolamingabe normiert. Als Kontrollmessreihe wurde die Messreihe mit der 20 Hz-Stimulation aus dem ersten Messprotokoll genutzt. Die drei Messreihen und die Kontrollmessreihe sind in der Abb. 5.7 dargestellt. Unter Einwirkung von 1 μ M und c=100 μ M Phentolamin kam es inner-

halb der ersten 10 s nach Hirnstammstimulation zu keiner wesentlichen Veränderung und der Mittelwert lag fast unverändert zum Ausgangswert bei 104.34 % (± 16.2 %) (ANOVA, $F=3.389, p=0.07$) bzw. 97.7 % (± 12.7 %) (ANOVA, $F=2.963, p=0.09$). Bei Verwendung von 10 μM Phentolaminlösung stieg die Aktivität nach Hirnstammstimulation auf 111.65 % (± 22.8 %) (ANOVA, $F=3.59, p=0.063$) an. Im Vergleich zur Kontrollreihe waren alle Messwerte unter Phentolamin nicht signifikant verändert, sodass sich die Hypothese nicht bestätigte.

5.5 Die neuronale Aktivität unter Einfluss des 5HT₃-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron nach 20 Hz-Hirnstammstimulation

Untersucht wurde das Frequenzverhalten der spinalen Neurone vor und nach Hirnstammstimulation unter Einfluss des spinal applizierten 5HT₃-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron. Aufbauend auf der ersten Messreihe wurde die Stimulation mit der Frequenz $f=20$ Hz durchgeführt. Als Kontrollgruppe wurden die 20 Hz-Stimulationen aus dem ersten Messprotokoll verwendet. Die gemessenen Werte einerseits ohne den Wirkstoff und andererseits mit Ondansetron wurden in Abb. 5.8 gegenübergestellt. Nach Applikation von Ondansetron kam es während der Einwirkzeit von 7 min zu einer geringen Reduktion der neuronalen Ausgangsaktivität, sodass der Ausgangswert zur Normierung der weiteren Messwertreihe dem Messwert nach Ondansetrongabe und Einwirkzeit entspricht. Der Messwert der Kontrollgruppe innerhalb von 10 s nach der Stimulation betrug nur noch 91.72 % (± 13.4 %). Unter Ondansetron kam es in der ersten Phase zu keinem Frequenzabfall innerhalb der ersten 10 s und der gemessene Wert lag bei 103.5 % (± 23.53 %). Anschließend kam es in der zweiten Phase (> 2 min) zu einem verzögerten Anstieg der neuronalen Aktivität.

Trotz des fehlenden Frequenzabfalls unter Ondansetron unterscheiden sich die Messwert- und Kontrollreihe nicht signifikant voneinander (ANOVA, $F=1.42, p=0.237$). Ebenfalls zeigen sich die Messzeitpunkte der beiden Messreihen nicht signifikant verschieden (ANOVA, $F\text{-Ratio}=1.678, p=0.134$). Zusammenfassend kommt es nach Hirnstammstimulation unter Applikation von Ondansetron nicht zu einem Aktivitätsabfall der spinalen Neurone. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen der Ondansetron-Messreihe und der Kontrollgruppe, sodass kein messbarer Effekt von Ondansetron feststellbar war und sich die Hypothese bestätigte.

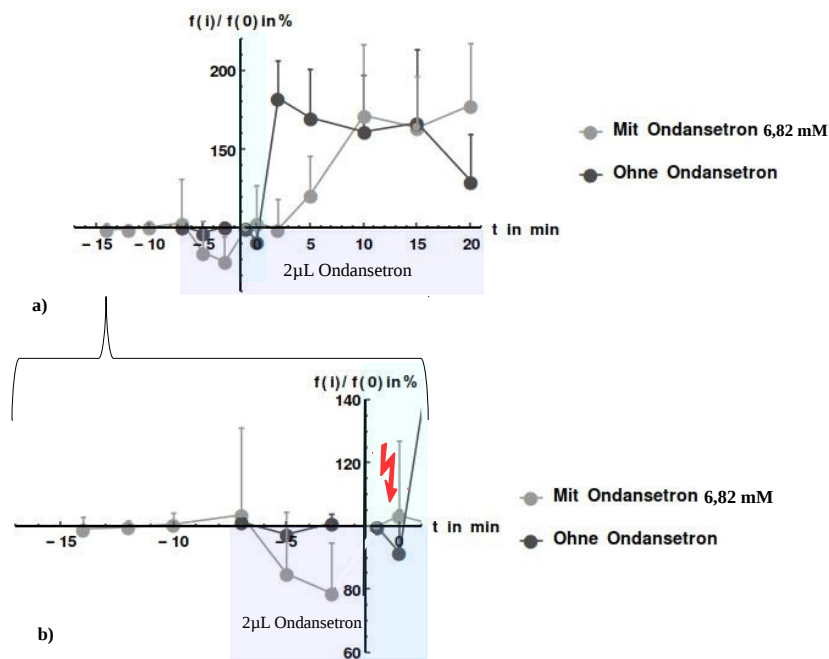


Abbildung 5.8: Relative Frequenzveränderung zum Ausgangswert (100 %) mit und ohne spinal applizierter Ondansetron-Lösung ($c = 6.82 \text{ mM}$). a) Gesamtverlauf. b) Neuroonale Aktivität vor und nach Hirnstammstimulation mit 20 Hz. Die Frequenzwerte der Ondansetron- und Kontrollmessreihe spinaler Neurone unterscheiden sich nicht signifikant (ANOVA, $F = 1.42$, $p = 0.237$). Ondansetron führt zu keinem signifikanten Effekt. Die Werte repräsentieren normierte Mittelwerte + SEM. $n(\text{Nativ}) = 10$, $n(\text{Ondansetron}) = 9$.

Diskussion

6.1 Veränderung der Ausdehnung der rezeptiven Felder der Hinterpfoten

Die erzielten Ergebnisse zeigen, dass sich die rezeptiven Felder im Verlauf des ersten Messprotokolls weder durch akute repetitive nozizeptive Reizapplikation auf der Hinterpfote noch durch die elektrische Stimulation im Hirnstamm signifikant veränderten. In Übereinstimmung mit der Literatur führen mehrere hintereinander applizierte akute Schmerzreize ohne anhaltende Schädigung des Nozizeptors zu keiner eindeutigen Vergrößerung des rezeptiven Feldes [156]. Eine Vergrößerung der rezeptiven Felder wurde nur in Tiermodellen mit neuropathischen oder entzündlichen Läsionen beschrieben [49, 105]. In der Einzelbetrachtung der Messwerte fiel auf, dass sich fünf von dreizehn rezeptiven Feldern dennoch vergrößerten. In früheren elektrophysiologischen Studien wurden weitere Einflüsse auf die Ausdehnung der rezeptiven Felder durch elektrophysiologische Stimulation bzw. durch spinale Verabreichung exogener exzitatorischer Aminosäuren beschrieben [157, 158]. Bereits die elektrische Stimulation des Funiculus dorsolateralis (der den vom Hirnstamm deszendierenden Bahnen entspricht) mit 10 Hz bis 50 Hz führte bei einigen sekundären sensorischen Neuronen zu einer Vergrößerung der dazugehörigen rezeptiven Felder und zur verstärkten neuronalen Aktivität [157]. Letztendlich waren diese möglichen Einflüsse so gering, dass die vereinzelt messbaren vergrößerten rezeptiven Felder nicht zu einem signifikanten Gruppenunterschied führten.

6.2 Vorübergehende Reduktion der neuronalen Aktivität nach Hirnstammstimulationen mit aufsteigenden Frequenzen

Ausgehend von der Charakterisierung der Neuronenaktivität zu Beginn der Messreihen wurden WDR-Neurone in den tieferen Laminae IV bis VI gemessen. Sie zeigten ein stabiles Aktivitätsmuster und eine gestaffelt ansteigende Aktivität entsprechend der Druckstärke. Nach LC-Stimulation waren zwei Aktivitätsphasen differenzierbar. In der ersten Phase war eine unmittelbar bis 10 Sekunden nach der Stimulation einsetzende neuronale Aktivitätsminderung feststellbar. Dagegen kam es in der zweiten Phase nach 2 min zu einem Aktivitätsanstieg. Da der LC das größte adrenerge Kerngebiet im Hirnstamm darstellt [12], ist bei Stimulation von einer Noradrenalinfreisetzung auszugehen. Elektrophysiologische Studien zeigen generell, dass es zu einer durch die Stimulation gesteigerten Noradrenalinausschüttung der adrenergen LC-Neurone [82, 81] bzw. zu einer Aktivitätsminderung der spinalen WDR-Neurone kommt [83, 159]. Das freigesetzte Noradrenalin der LC-Neurone wirkt zunächst innerhalb der ersten Phase überwiegend inhibierend. Die Hemmung wird durch die α_2 -Adrenozeptoren als präsynaptische Hemmung an den Primärafferenzen [160, 30] sowie entsprechend der postsynaptischen segmentalen Hemmung an Projektionsneuronen vermittelt [133, 134, 4]. Die aktivierten α_1 -Adrenozeptoren auf inhibierenden Interneuronen hemmen zusätzlich die neuronale Aktivität des Tractus spinothalamicus [3]. Bei der ANOVA-Analyse fällt auf, dass die Messergebnisse zu den Zeitpunkten bis 20 min nach der LC-Stimulation signifikant unterschiedlich ausfiel, aber im Bonferroni-Post-hoc-Test kein signifikanter Unterschied zwischen dem Messwertepaar unmittelbar vor und nach der LC-Stimulation mit Aktivitätsabfall bestand. Passend dazu wurde die adrenerge Inhibition von Schmerzreizen durch die LC-Stimulation auch in gesunden Tieren nachgewiesen. Diese fiel aber in der Abgrenzung zu Tiermodellen mit chronischen Schmerzen weniger deutlich aus [49, 104, 91, 106].

In der Literatur wurde eine Abhängigkeit zwischen der Stärke der LC-Stimulation und der reduzierten spinalen Neuronenaktivität beschrieben. Dabei entsprach eine höhere supraspinale Stimulationsfrequenz [82, 83] bzw. höhere Stimulationsstromstärken [159] einer stärkeren Inhibition der gemessenen Neuronenaktivität. Die hier vorliegenden Ergebnisse konnten diese vorangegangenen Studienergebnisse nicht reproduzieren. Beispielsweise wurde die stärkste Hemmung mit der Stimulationsfrequenz 2 Hz erreicht und die Stimulationsfrequenzen $f=10$ Hz und $f=100$ Hz führten ebenfalls zur deutlichen Inhibition. Ein erkennbarer Zusammenhang zwischen der Höhe der Stimulationsfrequenz und des Ausmaßes der Aktivitätsreduktion konnte in den hier durchgeführten Messreihen nicht nachgewiesen werden. Ursächlich hierfür kann der Versuchsaufbau mit der viermaligen jeweils 30 min andauernden Messung mit aufsteigender Frequenzreihenfolge von 2 Hz bis 100 Hz an einem Tier sein. Einerseits wurde vor jeder erneuten

Stimulation das tiefe WDR-Neuron auf die Qualität und Stabilität der Aktivität geprüft. Andererseits kann vorherige Aktivität der zentralen Neurone das Aktivitätslevel und die nachfolgende neuronale Reaktion auf einen Folgereiz beeinflussen [161, 162]. Dies wird als Prästimulus-Stimulus-Wechselwirkung bezeichnet und beschreibt die Variabilität der neuronalen Aktivität einzelner zentraler Neurone oder Neuronencluster [163, 164]. In diesem Zusammenhang kann in der vorliegenden Arbeit die Prästimulus-Stimulus-Wechselwirkung im Kontext der mehrmaligen LC-Stimulation und mehrstündiger Messprotokolle pro Versuchstier nicht ausgeschlossen werden und stellt gleichermaßen eine Limitation der Arbeit dar.

Anschließend zeigt sich in der zweiten Phase überwiegend eine Aktivitätssteigerung der WDR-Neurone. Die neuronale Aktivitätszunahme der WDR-Neurone tritt ab der zweiten Minute bei allen Stimulationsfrequenzen unterschiedlich ausgeprägt auf. In bisherigen elektrophysiologischen Untersuchungen wurde die neuronale Aktivität der WDR-Neurone nicht über einen längeren Zeitraum von mehreren Minuten nach einer LC-Stimulation beschrieben. Eine verzögerte noradrenerge Wirkung an den aktivierenden α_1 -Adrenozeptoren als Erklärung der Aktivitätszunahme wäre nur unter Voraussetzung unterschiedlicher Affinitäten des endogenen Noradrenalins an den α -Adrenozeptoren und deren Lokalisation an exzitatorischen Zellen erklärbar. Unterschiedliche Affinitäten von Noradrenalin zu den β -Adrenozeptoren und α -Adrenozeptoren sind bekannt [165]. Es zeigte sich allerdings kein Unterschied zwischen der Aktivierung der α_1 -Adrenozeptoren und α_2 -Adrenozeptoren durch Adrenozeptoragonisten [49]. In Experimenten wurden als bevorzugte Zielstruktur nach provozierter Ausschüttung endogenen Noradrenalins die spinalen α_2 -Adrenozeptoren beschrieben [121, 166]. Grundsätzlich wäre daher eine Aktivierung exzitatorischer Interneurone durch α_1 -Adrenozeptoren während der zweiten Phase und ein damit einhergehender spinaler Aktivitätsanstieg vorstellbar. Allerdings sei an dieser Stelle vorgehend auf die Ergebnisse der fünften Hypothese verwiesen. Im Untersuchungsaufbau wurden dafür mittels des unselektiven α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin die spinalen α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren blockiert. Die Messergebnisse unter Phentolaminwirkung ergaben ebenfalls eine Aktivitätssteigerung der zweiten Phase. Daher ist der Aktivitätsanstieg aufgrund aktivierter spinaler α_1 -Adrenozeptoren eher unwahrscheinlich. Hingegen kann eine generelle Aktivitätsreduktion der coerulespinalen Bahnen ursächlich sein. Die Refraktärzeit der LC-Neurone bietet keine ausreichende Begründung, da die Dauer der absoluten und relativen Refraktärzeit von zentralen Neuronen im Bereich von Millisekunden liegt [167]. Jedoch kann die Autoinhibition der adrenergen Neurone durch α_2 -Adrenozeptoren ein Einflussfaktor darstellen, der die spinale Aktivitätssteigerung in der zweiten Phase begünstigt [81]. Diese Autoinhibition findet sowohl durch die Freisetzung von somatodendritisch lokalisierten Noradrenalin supraspinal [81] als auch durch präsynaptischer Autorezeptoren auf spinaler Ebene [135] statt. Je höher die Stimulationsfrequenz, desto länger war die Zeitdauer der Autoinhibition adrenerger LC-Neurone [76]. Allerdings

konnte die spinale Aktivitätszunahme über das Ausgangsniveau über Zeitraum von bis zu 20 min gemessen werden, sodass es unwahrscheinlich erscheint, dass dies alleinig über eine kurzzeitige Autoinhibition vermittelt wird. Denkbar ist eine die elektrische LC-Stimulation verursachte Erschöpfung der endogenen Noradrenalins in der Präsynapsen der coeruleospinalen Bahn. In Folge der LC-Stimulationen kommt es nach übermäßiger Noradrenalinfreisetzung in den synaptischen Spalt vermutlich zur verminderten Regeneration der präsynaptischen Vesikel und zum reduzierten Noradrenalinfreisetzung im synaptischen Spalt. In der Pharmakologie wird dieser Effekt als Tachyphylaxie bezeichnet und kennzeichnet sich aus durch eine sehr rasche Toleranzentwicklung innerhalb von Minuten nach repetitiver Wirkstoffverabreichung [168]. In der Literatur ist eine Tachyphylaxie bisher nur bei Verabreichung von indirekten Sympathomimetika und nicht bei Ausschüttung endogener Katecholamine oder direkten Sympathomimetika beschrieben [168]. Bei dem vorliegenden Experiment führt die artifizielle elektrische Stimulation zur Noradrenalinfreisetzung und ist sicher nur begrenzt mit einer physiologischen spinalen Noradrenalinfreisetzung vergleichbar, sodass eine ähnliche Wirkung wie bei einer Tachyphylaxie anzunehmen wäre. Weitere Einflussmöglichkeiten bieten die verschiedenen supraspinalen Projektionsgebiete des LC, welche durch eine unspezifische elektrische Stimulation des LC adrenerg aktiviert oder inhibiert werden können. Speziell bestehen wechselseitige supraspinale Verbindungen zwischen den serotonergen und noradrenergen Kerngebieten [169, 170, 171, 146, 172]. Damit wäre ein veränderter serotonerger Einfluss über den Funiculus dorsolateralis auf spinaler Ebene denkbar. Letztlich kann die Ursache des spinalen Aktivitätsanstiegs nicht genau erklärt werden. Sowohl eine Autoinhibition zu Beginn nach LC-Stimulation und eine verminderte Regeneration und konsekutiv verminderte präsynaptische Freisetzung des Noradrenalins im Verlauf sind als mögliche Einflussfaktoren der Aktivitätssteigerung der Neurone des spinothalamischen Traktes möglich. Interessanterweise resultierten aus niedrigeren Stimulationsfrequenzen stärkere spinale Aktivitätszunahmen während der zweiten Phase im Gegensatz zu den beiden höheren Frequenzen $f=20$ Hz, 100 Hz. In der Literatur wurde bisher hierzu nichts beschrieben. Mutmaßlich ist auch hier der Versuchsaufbau mit vier LC-Stimulation pro Versuchstier nicht als ursächlich auszuschließen.

6.3 Unterschiede der ipsilateralen und kontralateralen spinalen neuronalen Aktivität nach Hirnstammstimulation

Die Stimulation im Hirnstamm erfolgte immer auf der linken Seite und ein Seitenwechsel erfolgte nur bei der spinalen Messelektrode, sodass ein Seitenvergleich möglich war. In der seitengetrennten Auswertung der LC-Stimulation war die kontralaterale Inhibition

signifikant stärker ausgeprägt. Die Hypothese, dass die adrenerge Inhibition durch den LC seitengleich wirkt, konnte nicht bestätigt werden. Basierend auf den Ergebnissen kann von beidseitigen Projektionen des LC sowohl in kontra- als auch ipsilateralen Rückenmarkssegmenten ausgegangen werden. In einer elektrophysiologischen Studie an Ratten wurde bereits 1991 gezeigt, dass adrenerge Axone sowohl das ipsi- als auch das kontralaterale Cornu posterior innervieren [173]. Weiterhin existieren wechselseitige Projektionen der LC untereinander [60]. Die unabhängig voneinander bestehenden LC-Projektionen in die ipsi- und kontralateralen Dorsalhörner des Rückenmarks wurden in Verhaltensstudien sowie elektrophysiologisch mittels einseitiger LC-Depletion in Ratten nachgewiesen [80, 83]. Konträr dazu konnte in einem einzelnen Verhaltensexperiment mit nativen und neuropathischen Ratten kein antinozizeptiver Effekt durch kontralaterale LC-Stimulation nachgewiesen werden [89]. Allerdings liefert die bestehende Literatur keinen Hinweis zur Erklärung weshalb der inhibierende Einfluss des LC in vorliegenden Messreihen auf der kontralateralen Seite ausgeprägter ist. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf anatomischen Differenzen zwischen Ratten und Mäusen beruhen. Hauptsächlich beziehen sich die Ergebnisse in der Literatur auf Ratten und sind daher nur bedingt auf die hier vorliegenden Experimente mit Mäusen anwendbar. Bereits in Betrachtung verschiedener Subgruppen des Stamms der Sprague-Dawley-Ratten stellten sich Unterschiede in der Ausprägung der spinalen Innervation durch den LC heraus [173, 15]. Eine ausgeprägtere kontralaterale Projektion des LC bei Mäusen ist aus den vorliegenden Ergebnissen ableitbar. Neuroanatomische Unterschiede des zentralen Nervensystems zwischen Ratten und Mäusen sind nur begrenzt betrachtet worden. Beispielsweise wurde zwischen Mäusen und Ratten der strukturelle Unterschied festgestellt, dass bei Mäusen im Gegensatz zu den Ratten der adrenerge Nucleus subcoeruleus im Hirnstamm auch das Rückenmark innerviert [34, 174]. Zur genauen Klärung der Ausbreitung der Projektionsfasern in Mäusen wäre eine elektrophysiologische Untersuchung mit einseitiger LC-Depletion und eine ergänzende immunohistologische Färbung der spinalen LC-Projektionsgebiete auf das Mausmodell zu übertragen.

6.4 Die neuronale Aktivität unter Einfluss des α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin nach 20 Hz-Hirnstammstimulation

Die vorliegenden Ergebnisse zeigten bei den Phentolaminkonzentrationen 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M nicht signifikant ansteigende Neuronenaktivität nach LC-Stimulation in der ersten Phase. Wie in den Kontrollmessreihen des ersten Messprotokolls dargestellt, führt eine LC-Stimulation zu einem vorübergehenden Abfall der elektrischen Aktivität der spinalen WDR-Neurone. Der unselektiver α -Adrenozeptor-Antagonist Phentolamin hemmt die noradrenerge Wirkung der spinalen α -Adrenozeptoren des Cornu posterior [175]. Die Aufhebung des vorübergehenden Aktivitätsabfalls kann auf die Unterdrückung der adrenerg vermittelten Hemmung der α -Adrenozeptoren zurückgeführt werden. Die α_2 -Adrenozeptoren sind sowohl präsynaptisch auf Primärafferenzen [4, 30] sowie postsynaptisch auf spinothalamischen Neuronen lokalisiert und wirken inhibierend [133, 134, 4]. Zusätzlich sind α_1 -Adrenozeptoren auf inhibierenden Interneuronen nachweisbar [3]. In pharmakologischen Studien wurde gezeigt, dass es in nicht neuropathischen Tieren nach intrathekaler Verabreichung von spezifischen α_2 -Adrenozeptor-Antagonisten zu einem Anstieg der spontanen neuronalen Aktivität der Dorsalhornneurone kommt [176, 177]. Die Disinhibition zeigt den adrenerg vermittelten Einfluss des LC, der bei elektrischer Stimulation eine Noradrenalinausschüttung im Cornu posterior auslöst. Eine Disinhibition der coerulespinalen Bahn wurde unter Verwendung verschiedener Phentolamin-Konzentrationen mit 10 μ M [140, 139], 40 nMol [178, 179] sowie im einstelligen μ M-Bereich [180, 181, 182, 183] beschrieben. Diese Ergebnisse konnten sich in der vorliegenden Arbeit mit Phentolaminkonzentrationen von 1 μ M, 10 μ M und 100 μ M nicht bestätigen. Die Phentolaminlösung wurde stets nach Entfernung der Dura mater spinalis lokal verabreicht und hatte eine Einwirkdauer von 3 min. Ausgehend von der histologischen Schichtung kann davon ausgegangen werden, dass Phentolamin mindestens an den α_2 -Adrenozeptoren der Primärafferenzen der Lamina I wirkte. Unklar ist in welchem Maß das Substrat in tieferen Schichten des Cornu posterior an den postsynaptischen α_2 -Adrenozeptoren der inhibitorischen und exzitatorischen Interneurone und tiefen WDR-Neurone wirken konnte. Die lokale spinale Verabreichung orientierte sich an den Literaturangaben [139, 94, 140]. Alternative systemische Verabreichungsformen (oral oder intravenös) des Phentolamins wurden bisher in elektrophysiologischen Untersuchungen der Nozizeption nicht verwendet. Der noradrenerge Einfluss auf Primärafferenzen in unversehrten Tieren wurde als gering beschrieben [184, 185]. Unter der Annahme einer nur oberflächlichen Wirkung der Phentolaminlösung wäre die deszendierende adrenerge Hemmung nur unvollständig blockiert. Die noradrenerge inhibierende Wirkung durch die α_2 -Adrenozeptoren speziell auf den Primärafferenzen gewinnt erst bei chronischen Schmerzen an Einfluss auf die Schmerzmodulation [186, 187, 188]. Beispielsweise ergab eine Studie an Knockout-

Tieren komplett ohne α -Adrenozeptoren, dass es in Tieren ohne chronische Schmerzen zu keiner veränderten Reizantwort auf mechanische Schmerzreize kam [189]. In der Gesamtbetrachtung scheint der adrenerge Einfluss auf die spinale Schmerzmodulation in gesunden Tieren mit akuten Schmerzreizen gering zu sein. Das zeigte sich hier bereits in der Reduktion der neuronalen Aktivität nach LC-Stimulation in der Kontrollgruppe mit ca. 9% des Ausgangswertes. Die adrenerge deszendierende Inhibition durch die LC-Stimulation war bei Vergleichsstudien in Krankheitsmodellen mit chronischen Schmerzen deutlich stärker [49, 104, 91, 106]. Bei Betrachtung der zweiten Phase (ab der zweiten Minute nach LC-Stimulation) findet sich kein Unterschied mit und ohne spinaler Phentolaminwirkung und es kam in beiden Gruppen zu einem Aktivitätsanstieg. Daher kann diese Aktivitätssteigerung nicht auf eine verzögerte aktivierende Wirkung an den α_1 -Adrenozeptoren zurückgeführt werden, da diese gleichsam durch das Phentolamin blockiert werden. Anknüpfend an die zweite Hypothese ist der Aktivitätsanstieg unabhängig von den spinalen α -Adrenozeptoren zu erklären. In mehreren elektrophysiologischen Studien wurde eine Autoinhibition des elektrisch stimulierten LC selbst beschrieben [81, 76]. Die gesteigerte neuronale Aktivität kann durch supraspinale Autoinhibition oder auch Erschöpfung der endogenen Noradrenalinreserven der coeruleospinalen Bahnen mit reduzierter adrenerger Hemmung auf spinaler Ebene erklärt werden.

6.5 Die neuronale Aktivität unter Einfluss des 5HT₃-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron nach 20 Hz-Hirnstammstimulation

Die Ergebnisse der Messreihe nach spinaler Applikation des 5HT₃-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron waren im Vergleich zu den nativen Kontrollmessreihen mit alleiniger LC-Stimulation nicht unterschiedlich. Die Annahme, dass der inhibierende Einfluss des aktivierten LC spinal nicht serotonerg über die 5HT₃-Rezeptor vermittelt wird, hat sich bestätigt. Die spinalen 5-HT₃-Rezeptoren unterliegen dem Einfluss der deszendierenden Bahnen [190, 146, 147, 191] und sind sowohl auf den tiefen WDR-Neuronen als auch präsynaptisch an den nozizeptiven Primärafferenzen lokalisiert [151]. Jedoch führt ihre Aktivierung durch spinale Serotoninfreisetzung über eine Depolarisation zu einer neuronalen Aktivitätszunahme. Sie werden in der Literatur überwiegend als pronozizeptiv beschrieben. [190, 146, 147, 191, 154]. Unter selektiver Rezeptorblockade durch Ondansetron wäre bei spinaler Serotoninfreisetzung daher generell eine verringerte neuronale Aktivität, aber keine Veränderung der WDR-Neuronen-Aktivität nach Stimulation des adrenergen LC zu erwarten. Betrachtet man die supraspinalen serotonergen Kerngebiete, gibt es Beschreibungen wechselseitiger Projektionen zwischen den adrenergen und den serotonergen Kerngebieten, die an der deszendierenden Hemmung

beteiligt sind. Grundsätzlich wird die Aktivierung serotonerger Neurone der Raphekerne auch durch akute und durch chronische Schmerzreize ausgelöst und führt zur erhöhten Serotoninfreisetzung im Cornu posterior [192]. Speziell die serotonergen Raphekerne Ncl. raphe magnus (NRM) und Ncl. raphe dorsalis, welche zu den oberflächlichen Laminae des Cornu posterior projizieren [193, 4, 194], zeigen wechselseitige Projektionen mit den adrenergen LC-Neuronen [169, 170, 171, 146, 172]. Beispielsweise können die adrenergen LC-Projektionen über die serotonergen NRM-Neuronen Einfluss auf die spinale Antinozizeption nehmen [195] und unter LC-Stimulation konnte eine Aktivitätsminderung des Ncl. raphe dorsalis nachgewiesen werden [171]. Durch die LC-Stimulation ist eine generelle unselektive Noradrenalinfreisetzung auch in den supraspinalen Projektionsgebieten des LC wie z.B. den Raphekerne vorstellbar. Damit einhergehend kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Raphekerne mit ihren spinal deszendierende Bahnen wiederum keinen indirekten Einfluss im Cornu posterior haben. Gleichwohl serotonerge und noradrenerge Kerngebiete in Verbindung stehen, ergab sich in den hier vorliegenden Ergebnissen kein Hinweis auf eine Beteiligung der spinalen 5HT₃-Rezeptoren an der adrenergen deszendierenden Hemmung durch den LC.

6.6 Diskussion der Methode und Limitationen

Zur Messmethode und Auswahl der Neurone

In der neurophysiologischen Forschung haben sich die elektrophysiologischen Messmethoden seit Jahrzehnten erfolgreich etabliert. Die Signalübertragung zwischen zwei Arealen innerhalb des peripheren und zentralen Nervensystems kann mit diesen Methoden gut untersucht werden. Durch die Messung der elektrischen Signale ist die Untersuchung und die Beschreibung von Eigenschaften einzelner Nervenzellen und von Zellverbänden möglich. Die Messungen können intra- und extrazellulär stattfinden. Die hier gewählte extrazelluläre Ableitung eines einzelnen WDR-Neurons ermöglicht eine gezielte Betrachtung der neuronalen Aktivität und elektrophysiologischer Eigenschaften *in vivo*. Hierbei kann gezielt der Einfluss anderer Areale, die durch chemische oder elektrophysiologische Reize manipuliert werden, auf die Zielstruktur betrachtet werden. Dennoch lässt die elektrophysiologische Ableitung nur die Beobachtung eines einzelnen Abschnitts, beispielsweise der spinalen Schmerzverarbeitung, zu. Entsprechend der Messprotokolle konnte die deszendierende coeruleospinale Bahn in das Cornu posterior untersucht werden. Eine Beeinflussung anderer Projektionsgebiete des LC durch die artifizielle elektrische Stimulation des LC kann nicht ausgeschlossen und auch nicht dargestellt werden. Weitere an der spinalen Modulation der Nozizeption beteiligten supraspinalen Hirnareale außer des LC waren mit der gewählten elektrophysiologischen Methode nicht messbar. Ein weiterer Einflussfaktor auf die elektrophysiologischen Messungen ist die Inhomogenität der spinalen Neurone. Es wurden die tiefen WDR-Neurone, die sich durch druckabhängige Aktivität charakterisieren lassen konnten, gemessen.

Innerhalb dieser Neuronengruppe konnten phasische (dynamische) als auch tonische (kontinuierliche) Aktivitätsmuster auf nozizeptive und mechanische Reize nachgewiesen werden [35]. In der Literatur ist bisher keine Differenzierung der phasisch aktiven und tonisch aktiven WDR-Neuronen bezüglich deren Aktivität nach LC-Stimulation beschrieben worden und wurde auch nicht in der vorliegenden Arbeit betrachtet. In einer fortführenden Untersuchung wäre eine selektive Betrachtung der spinalen WDR-Neurone nach phasischen oder tonischen Aktivitätsmustern nach LC-Stimulation denkbar.

Zur Auswahl und Anzahl der Versuchstiere

Die Untersuchung von interregionalen Verknüpfungen im ZNS macht die Verwendung von Versuchstieren zwingend erforderlich. In der jahrzehntelangen neurophysiologischen Forschung haben sich Nagetiere als geeignet erwiesen. Bei Tierversuchen muss die Tierethik stets berücksichtigt werden. Durch die Bewertung der Ethikkommission werden ausgewählte und geprüfte Tierversuche legitimiert. Mein Studiendesign berücksichtigte das 3-R-Prinzip, das 1959 durch W.M. Russel veröffentlicht wurde. Dieses fordert Folgendes ein:

1. „Replace“ bedeutet Vermeiden von Tierversuchen
2. „Reduce“ bedeutet Verringerung der Anzahl der eingesetzten Tiere
3. „Refine“ bedeutet Verbesserung der Lebens- und Untersuchungsbedingungen [196].

Die Reduktion der Tieranzahl konnte dadurch erreicht werden, dass innerhalb eines Messprotokolls pro Tier alle dazugehörigen Messreihen durchgeführt wurden. Während insgesamt 147 Messreihen an Neuronen im Cornu posterior aufgezeichnet und untersucht wurden, belief sich die Gesamtanzahl der eingesetzten Tiere auf 41 Mäuse. Das Zeitintervall zwischen den einzelnen LC-Stimulationen lag zwischen 45 und 60 min, bevor eine neue Messreihe begonnen wurde. Trotz der Regenerationszeit der Neurone wurden teilweise höhere spinale Aktivitäten im Vergleich zum Ausgangsniveau (vor jeglicher Stimulation) verzeichnet. Bei konstantem Aktivitätsanstieg wurde der Schwellenwert für die nachfolgende Messreihe entsprechend korrigiert. Entsprechend konnte die minimal mögliche Tieranzahl zum Erreichen eines statistisch abgesicherten Ergebnisses verwendet werden.

Zur Auswahl der Wirkstoffe und Applikation

Phentolamin wurde in der bisherigen elektrophysiologischen Forschung erfolgreich zur Charakterisierung von Neurone genutzt. Es ist ein Imidazolin, das unselektiv auf α -Adrenozeptoren blockierend wirkt. In den vorliegenden Experimenten wurde nur der generelle adrenerge Einfluss auf spinale Neuronen betrachtet und eine Differenzierung der α -Adrenozeptoren war nicht erforderlich. Ondansetron ist ein Serotonin- Antagonist am 5HT₃-Rezeptor und wurde aufgrund der hohen Spezifität ausgewählt. In vielen elektrophysiologischen Studien wurde er bereits zur Charakterisierung der deszendierenden Hemmung eingesetzt, wobei der 5HT₃-Rezeptor eher pronozizeptiv wirkt. Fr die

weitere Untersuchung der serotonerg vermittelten spinalen Antinozizeption kann ein Antagonist des 5HT₇-Rezeptors verwendet werden, da dieser Rezeptor in der spinalen Antinozizeption beteiligt scheint. Zudem gibt es noch weitere Transmittersysteme, die in der vorliegenden Arbeit unberücksichtigt bleiben, obwohl sie Einfluss auf die deszendierende Hemmung nehmen könnten. Neben der Betrachtung der ausgewählten Wirkstoffe kann auch die Applikationsform zu Limitationen führen. Beide hier verwendeten Substrate wurden als Lösungen direkt auf die Dorsalseite des Rückenmarks aufgebracht, nachdem die Dura entfernt wurde. Dies entsprach den Literaturangaben im Rahmen elektrophysiologischer Messmethoden spinaler Neurone, bei denen die Applikation unmittelbar lokal auf das Rückenmark erfolgte [145, 154, 146, 147]. Hier wurde oft eine Menge von 50µL genutzt, die sich allerdings in den hier vorliegenden Experimenten über die Gesamtheit des eröffneten Rückenmarks ausbreitete. Hier kann eine lokale Wirkung innerhalb des Rückenmarks, aber über die abgeleiteten Rückenmarkssegmente hinaus angenommen werden. Im Zusammenhang mit elektrophysiologischen Messungen der spinalen Neurone ist in der Literatur zu beiden Substraten keine Angabe zu alternative Applikationen (wie oral oder intravenös) zu finden. Sowohl Phentolamin als auch Ondansetron werden teilweise intrathekal über subarachnoidal einliegende Kathetersysteme bei Verhaltensexperimenten bzw. bei immunhistologischen Untersuchungen bei denen eine längere Einwirkdauer gegeben sein muss verwendet [197, 122, 198, 199]. Die Verwendung eines subduralen Kathetersystems bei anästhesierten Mäusen mit bereits eröffnetem Rückenmark würde keinen weiteren Vorteil bringen. Hingegen wäre eine intravenöse Applikation denkbar. Beispielsweise wurden in der verhaltensexperimentellen Untersuchung der mechanischer Allodynie bei Ratten nach Rückenmarksverletzung die intrathekale bzw. intravenöse Verabreichung von Ondansetron in der Studie von Chen et al. 2009 verglichen. Über venöse bzw. intrathekal eingelegte Kathetersysteme wurde die Ondansetronlösung entweder i.v. über sieben Tage bzw. intrathekal über 3 Tage bei nachweislicher Allodynie verabreicht. Es zeigte sich während des Verabreichungsintervalls sowohl intravenöse als auch intrathekal weniger Vermeidungsverhalten und ein Rückgang der Allodynie im Verhaltensexperiment mit Von-Frey-Filamenten [200]. Eine Adaptation dieser intravenösen Gabe vor der elektrophysiologischen Messung als Alternative zur lokalen Verabreichung wäre bei Folgeexperimenten zu diskutieren. In Tierexperimenten mit Ratten zur Untersuchung der Pharmakokinetik des Ondansetrons erfolgte eine orale und intravenöse Verabreichung [201, 202].

6.7 Ausblick

Ausgehend von der elektrophysiologischen Mess- und Stimulationsmethode kann das Stimulationsprotokoll mit einem selektiven α_2 -Adrenozeptor-Antagonisten variiert werden, um den Einfluss der α_2 -Adrenozeptoren in der adrenerg vermittelten deszendierenden Hemmung weiter zu untersuchen. Dies ist umso mehr von Interesse, da die Ergebnisse mit dem unselektiven Antagonisten Phentolamin nicht signifikant waren. In der Literatur wird vor allem die Rolle der α_2 -Adrenozeptoren als führende Vermittler der Antinozizeption allerdings in Tiermodellen mit neuropathischen oder entzündlichen Schmerzen diskutiert. Zur Differenzierung des Einflusses der α_2 -Adrenozeptoren kann ein selektiver Antagonist, z.B. Yohimbin, eingesetzt werden. Unter Verwendung von Yohimbin müssten die möglichen Interaktionen mit dem anderen Neurotransmittersystemen beachtet werden. Mit dem aktuellen Stimulationsprotokoll wurden nur gesunde Tiere unter akuten Schmerzreizen untersucht. Das Mess- und Stimulationsprotokoll kann in Kombination mit Mausmodellen mit chronischen Schmerzen, beispielsweise einer Tibiafraktur, zur Charakterisierung der adrenergen Hemmung im Kontext chronischer Schmerzerkrankungen verwendet werden.

Kapitel 7

Zusammenfassung

Die Etablierung des elektrophysiologischen Hirnstamm-Stimulationsprotokolls erlaubte die Untersuchung des adrenergen deszendierenden Einflusses des LC auf die Wide-dynamic-range-Neurone (WDR-Neurone) in nativen erwachsenen Mäusen. Mit der elektrophysiologischen Methode der extrazellulären Ableitung in den tiefen Laminae des Cornu posterior wurde die Aktivität der WDR-Neurone im thorakolumbalen Rückenmarksbereich gemessen. Zusätzlich wurde der LC im Hirnstamm in verschiedenen Frequenzstärken stimuliert und der Einfluss des spinal applizierten unselektiven α -Adrenozeptor-Antagonisten Phentolamin und dem 5HT₃-Rezeptor-Antagonisten Ondansetron untersucht. Die LC-Stimulation führte zu keiner signifikanten Veränderung der rezeptiven Felder. Eine Reduktion der Aktivität der spinothalamischen Neurone nach Hirnstammstimulation mit verschiedenen Stimulationsfrequenzen konnte nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich zeitlich versetzt eine zweite Phase mit spinaler Aktivitätszunahme, deren Ursache nicht klar ist. Die seitengetrennte Betrachtung der Aktivität nach LC-Stimulation zeigte eine kontralateral stärkere Aktivitätsreduktion der spinothalamischen Neurone. Weder der 5HT₃-Rezeptor-Antagonist Ondansetron noch der unselektive α -Adrenozeptor-Antagonist Phentolamin bewirkten nach lokaler spinaler Applikation eine signifikante Veränderung der Aktivität der WDR-Neurone nach LC-Stimulation.

Anhang A

Tabellen

Tabelle A.1: Normierte Messwerte unmittelbar nach Hirnstamm-Stimulation ohne Substrat

Stimulations-Frequenz	f(Gesamt)/f(0) in % (\pm SEM in%)	f(Ipsilateral)/f(0) in % (\pm SEM in%)	f(Kontralateral)/f(0) in% (\pm SEM in%)
2 Hz	49.27 (\pm 16.27)	71.45 (\pm 34.45)	30.8 (\pm 5.35)
5 Hz	109.86 (\pm 29.57)	162.16(\pm 54.95)	57.56 (\pm 8.01)
10 Hz	62.188 (\pm 12.06)	52.93 (\pm 11.54)	75.53 (\pm 23.97)
20 Hz	91.72 (\pm 13.4)	106.82 (\pm 20.5)	49.96 (\pm 15.1)
100 Hz	65.76 (\pm 9.12)	80.33 (\pm 12.26)	50.36 (\pm 10.79)

Tabelle A.2: Normierte Messwerte über 20 min nach Hirnstamm- Stimulation ohne Substrat

Frequenz	2 Hz	5 Hz	10 Hz	20 Hz	100 Hz
f(0min)/f(0)in % (\pm SEM in%)	49.27 (\pm 16.27)	109.86 (\pm 29.57)	62.19 (\pm 12.06)	91.72 (\pm 13.4)	65.76 (\pm 9.12)
f(2 min)/f(0)in % (\pm SEM in%)	207.06 (\pm 83.45)	282.9 (\pm 61.4)	252.9 (\pm 96.1)	182.58 (\pm 23.53)	140.86 (\pm 16.44)
f(5 min)/f(0)in % (\pm SEM in%)	216.98 (\pm 53.91)	282.89 (\pm 50.85)	204.94 (\pm 50.96))	170.31 (\pm 30.49))	123.03 (\pm 15.02)
f(10 min)/f(0)in % (\pm SEM in%)	190.48 (\pm 53.03)	259.86 (\pm 47.27)	161.49 (\pm 32.86)	161.37 (\pm 35.67)	115.99 (\pm 14.35)
f(15 min)/f(0)in % (\pm SEM in%)	168.95 (\pm 47.82)	234.39 (\pm 47.01)	191.36 (\pm 51.62)	166.94 (\pm 46.3)	132.8 (\pm 29.3)
f(20 min)/f(0)in % (\pm SEM in%)	152.42 (\pm 37.88)	204.39 (\pm 35.53)	191.08 (\pm 39.35)	130.14 (\pm 29.32)	137.97 (\pm 30.52)

Tabelle A.3: Messwerttabelle der normierten Messwerte ohne Wirkstoff und mit Ondan-
setron.

Zeit in Minuten	Ondan- setron f(0) in % (\pm SEM)
-14	99.27 (\pm 3.64)
-12	99.8 (\pm 1.91)
-10	100.77 (\pm 3.44)
-7	103.67 (\pm 27.48)
-5	85.63 (\pm 19.43)
-3	78.9 (\pm 15.85)
-1	100 (\pm 0)
0	103.49 (\pm 23.53)
2	99.62 (\pm 18.67)
5	121.57 (\pm 24.11)
10	171.7 (\pm 44.8)
15	164.0 (\pm 32.34)
20	178.2 (\pm 38.9)

Tabelle A.4: Messwerttabelle der gepoolten, normierten Mittelwerte (\pm SEM) der Mess-
reihen mit den verschiedenen Phentolamin Konzentrationen über die Zeit (in sek).

Zeit in Minuten	1 μ M f(i)/f(0) in % (\pm SEM)	10 μ M f(i)/f(0) in % (\pm SEM)	100 μ M f(i)/f(0) in % (\pm SEM)	1 MM f(i)/f(0) in % (\pm SEM)	1 M f(i)/f(0) in % (\pm SEM)
-6	88.036 (\pm 22.469)	107.965 (\pm 22.947)	90.535 (\pm 15.755)	115.187 (\pm 37.701)	68.375 (\pm 16.991)
-5	93.838 (\pm 15.038)	141.920 (\pm 9.374)	105.515 (\pm 16.249)	123.601 (\pm 27.546)	82.854 (\pm 13.346)
-4	79.360 (\pm 23.772)	127.824 (\pm 15.722)	103.901 (\pm 30.846)	116.039 (\pm 36.177)	73.383 (\pm 14.198)
-3	100.303 (\pm 25.448)	168.606 (\pm 17.814)	134.476 (\pm 29.318)	108.899 (\pm 55.438)	94.105 (\pm 22.390)
-2	76.829 (\pm 33.607)	183.275 (\pm 29.931)	94.581 (\pm 28.208)	117.514 (\pm 103.922)	88.248 (\pm 16.590)
-1	100 (\pm 21.123)	100 (\pm 26.776)	100 (\pm 35.167)	100 (\pm 24.744)	100 (\pm 29.483)
0	104.34 (\pm 0)	111.65 (\pm 0)	97.7 (\pm 0)	102.35 (\pm 0)	91.58 (\pm 0)
2	95.66 (\pm 14.78)	141.92 (\pm 27.55)	105.52 (\pm 16.25)	123.6 (\pm 9.37)	82.85 (\pm 15.04)
5	149.85 (\pm 50.1)	224.78 (\pm 83.01)	244.33 (\pm 80.55)	120.3 (\pm 19.59)	113.42 (\pm 45.4)
10	153.4 (\pm 33.3)	133.99 (\pm 44.1)	122.48 (\pm 55,27)	141.5 (\pm 47.13)	102.12 (\pm 27.5)
15	145.9 (\pm 31.6)	121.71 (\pm 40.1)	104.55 (\pm 48.6)	85.13 (\pm 19)	98.00 (\pm 27.74)
20	187.7 (\pm 72.16)	126.71 (\pm 50.48)	162.34 (\pm 60.7)	145.3 (\pm 20.41)	94.16 (\pm 60.4)

Anhang B

Abbildungen und Diagramme

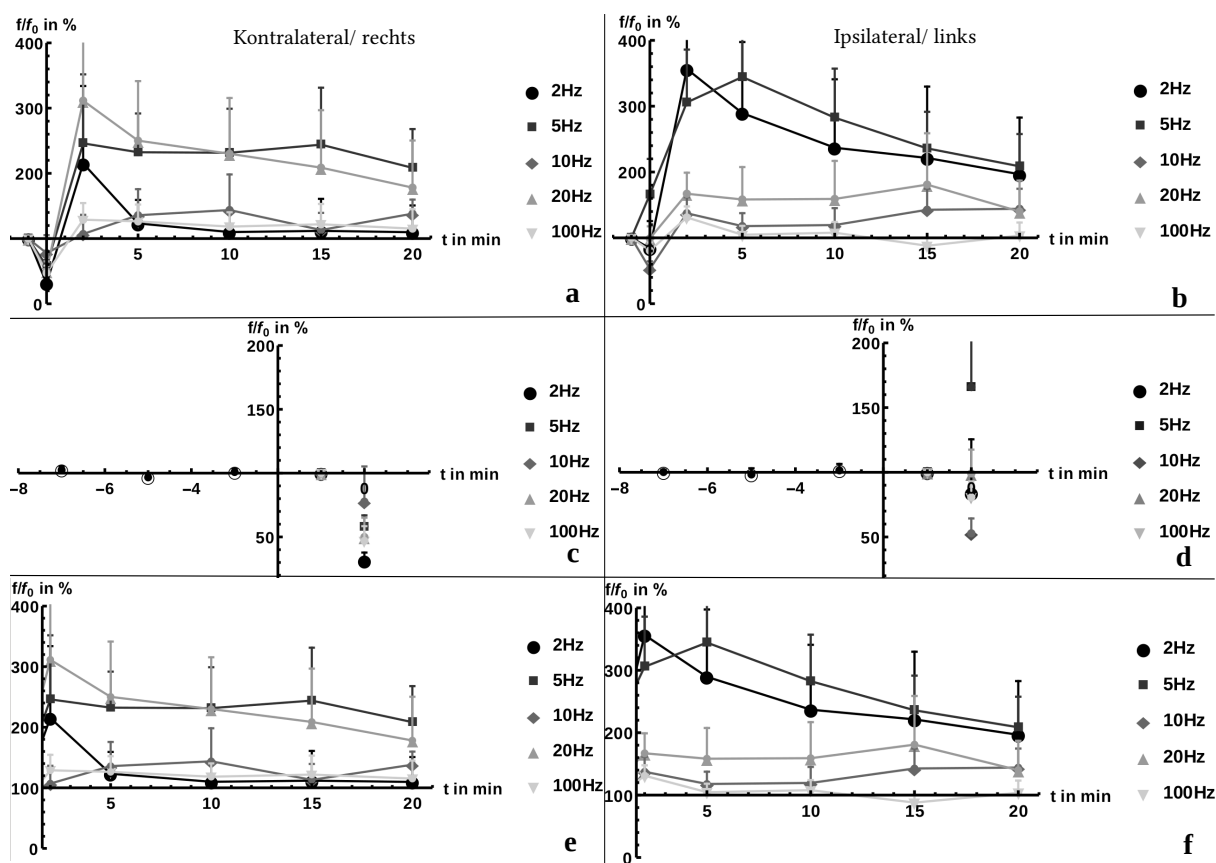


Abbildung B.1: Gegenüberstellung der ipsi- und kontralateralen Frequenzverläufe nach verschiedenen Stimulationsfrequenzen. Abb. a Gesamtverlauf kontralateral, Abb. b Gesamtverlauf ipsilateral, Abb. c Vorwerte kontralateral, Abb. d Vorwerte ipsilateral, Abb. e 2.Phase kontralateral, Abb. f 2.Phase ipsilateral Quelle: eigene Darstellung mit Mathematica erstellt

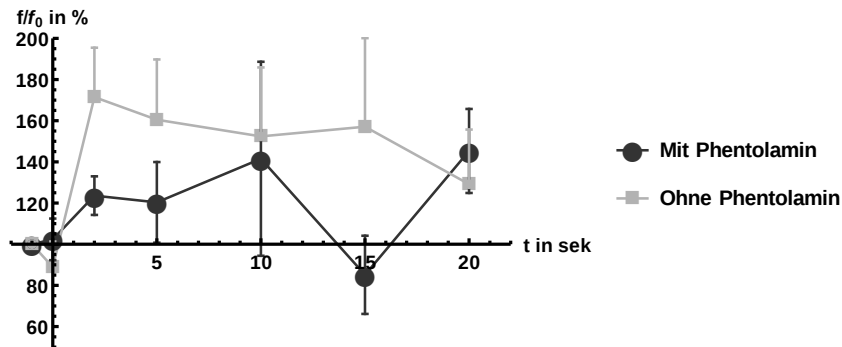


Abbildung B.2: Relative Frequenzänderung zum Ausgangswert (100 %) mit und ohne spinal applizierter 1000 μ M Phentolamin- Lösung innerhalb von 20 min nach 20 Hz-Hirnstammstimulation. Es gibt keinen Frequenzabfall spinaler Neuronen unter Einfluss von 1000 μ M Phentolamin. Es gibt einen signifikanten Unterschied zwischen beiden Messreihen(ANOVA, $F=4.59$, $p=0.037$). Die Werte repräsentieren normierte Mittelwerte + SEM. $n(\text{Nativ})=10$, $n(1000 \mu\text{M Phentolamin})=6$. Quelle: eigene Darstellung mit Mathematica erstellt

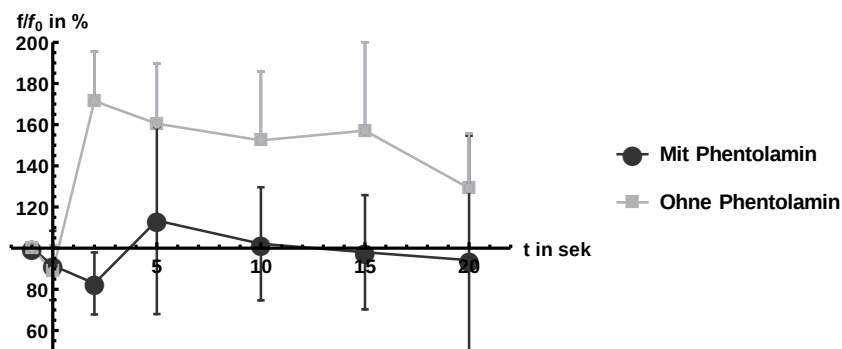


Abbildung B.3: Relative Frequenzänderung zum Ausgangswert (100 %) mit und ohne spinal applizierter 1 M Phentolamin-Lösung innerhalb von 20 min nach 20 Hz-Hirnstammstimulation. Die Frequenz spinaler Neuronen unter Einfluss von 1 M Phentolamin ist nicht signifikant verändert zu dem Frequenzabfall ohne Phentolamin (ANOVA, $F=1.095$, $p=0.137$). Die Werte repräsentieren normierte Mittelwerte + SEM. $n(\text{Nativ})=10$, $n(1 \text{ M Phentolamin})=3$. Quelle: eigene Darstellung mit Mathematica erstellt

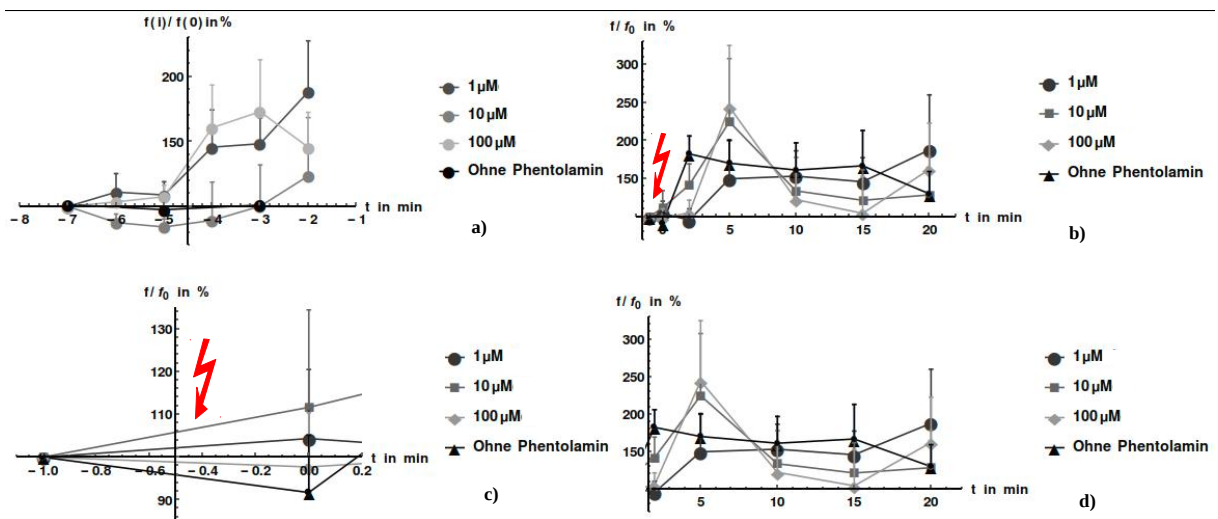


Abbildung B.4: Relative Frequenzänderung zum Ausgangswert (100 %) mit und ohne spinal applizierter 1 μ M, c=10 μ M und c=100 μ M Phentolamin-Lösung innerhalb von 20 min nach 20 Hz-Hirnstammstimulation. Abb. a) Vorwert und Messwerte unter Phentolamin vor der Hirnstammstimulation. Abb. b) Gesamtverlauf der Messwerte. Abb. c) Aktivitätsänderung nach Hirnstammstimulation. Abb. d) Frequenzverlauf mit Aktivitätserhöhung ab $t = 2$ min. Die Werte repräsentieren normierte Mittelwerte + SEM. Quelle: eigene Darstellung mit Mathematica erstellt

Anhang C

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt allen Menschen, die mich auf verschiedene Weisen ob fachlich oder emotional beim Anfertigen meiner Doktorarbeit begleitet und unterstützt haben.

Anhang D

Lebenslauf

Tabelle D.1: Aktueller tabellarischer Lebenslauf

Name	Alexandra Budig
Geburtsdatum/-Ort	15.03.1991/ Halle (Saale)
seit 06/2020	Assistenzärztin der Inneren Medizin GPR Klinikum Rüsselsheim
02/2020	Approbation
19.11.2019	Abschluss der Ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote - gut -
04/2013 - 03/2019	Studium der Humanmedizin an der Johannes- Gutenberg- Universität Mainz
10/2012 - 03/2013	Erstes Fachsemesters „Molecular Life Science“ an der Universität zu Lübeck abgeschlossen
08/2009 – 07/2012	Berufsausbildung zur Ergotherapeutin an den Berufsbildenden Schulen Köthen
09/2001 – 06/2009	Besuch des Elisabeth- Gymnasiums in Halle (Abiturnote 1,8)
07/2019 - 10/2019	PJ Tertian Innere im BwZKrhs Koblenz
03/2019 - 06/2019	PJ Tertian Chirurgie im GPR Klinikum Rüsselsheim
11/2018 - 03/2019	PJ Tertian Neurologie Universitätsklinik Mainz
03/2018 - 03/2018	Auslandsfamulatur Neurologie im Regionalkrankenhaus in Wolgograd
02/2017 - 03/2017	Auslandsfamulatur Orthopädie in der Klinik der Fujian in Fuzhou (China)
09/2016 - 09/2016	Famulatur in der Internistischen Notaufnahme der Universitätsklinik Mainz
03/2016 - 03/2016	Famulatur Kardiologische Station 4B Universitätsklinik Mainz
09/2015 - 09/2015	Famulatur Allgemeinmedizinische Praxis bei Dr. Björn Tilse in Lübeck

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die dargestellten Ergebnisse selbstständig erhoben und die Dissertation selbstständig erstellt habe. Alle verwendeten Veröffentlichungen und Materialien sind eindeutig gekennzeichnet und in der Bibliographie ordnungsgemäß und vollständig angegeben. Hiermit versichere ich, dass es keine kommerziellen Anreize bei der Vergabe des Promotionsvorhabens gab. Während der gesamten Arbeitsschritte der Dissertation wurde die „Satzung der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ beachtet. Nach Einreichung des Tierversuchsantrages wurden die Tierexperimente durch die Ethik-Kommission legitimiert. Während meiner Arbeit mit den Tieren hielt ich die Tierschutzgesetze ein. Ich habe keine Dissertationsschrift in einem anderen Fachbereich oder in einer anderen Fakultät eingereicht. Außerdem besitze ich keinen anderen Dokortitel und es wurde weder ein Dokortitel aberkannt noch ein Promotionsverfahren erfolglos beendet.

Literaturverzeichnis

- [1] M. J. Millan. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: Focus on receptor multiplicity. In *Handbook of Experimental Pharmacology*, pages 385–446. Springer Berlin Heidelberg, 1997.
- [2] M.J Olave and D.J Maxwell. An investigation of neurones that possess the alpha-2c-adrenergic receptor in the rat dorsal horn. *Neuroscience*, 115(1):31–40, November 2002.
- [3] Matthias Gassner, Ruth Ruscheweyh, and Jürgen Sandkühler. Direct excitation of spinal GABAergic interneurons by noradrenaline. *Pain*, 145(1):204–210, September 2009.
- [4] Mark J. Millan. Descending control of pain. *Progress in Neurobiology*, 66(6):355–474, April 2002.
- [5] M.M. Heinricher, I. Tavares, J.L. Leith, and B.M. Lumb. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Research Reviews*, 60(1):214–225, April 2009.
- [6] J. M. Chung, D. R. Kenshalo, K. D. Gerhart, and W. D. Willis. Excitation of primate spinothalamic neurons by cutaneous c-fiber volleys. *Journal of Neurophysiology*, 42(5):1354–1369, September 1979.
- [7] R. Dubner, D. R. Kenshalo, W. Maixner, M. C. Bushnell, and J. L. Oliveras. The correlation of monkey medullary dorsal horn neuronal activity and the perceived intensity of noxious heat stimuli. *Journal of Neurophysiology*, 62(2):450–457, August 1989.
- [8] C. M. Owens, D. Zhang, and W. D. Willis. Changes in the response states of primate spinothalamic tract cells caused by mechanical damage of the skin or activation of descending controls. *Journal of Neurophysiology*, 67(6):1509–1527, June 1992.

- [9] William D. Willis. Mechanical allodynia: A role for sensitized nociceptive tract cells with convergent input from mechanoreceptors and nociceptors? *APS Journal*, 2(1):23–30, March 1993.
- [10] K. Bannister, S. Lockwood, L. Goncalves, R. Patel, and A.H. Dickenson. An investigation into the inhibitory function of serotonin in diffuse noxious inhibitory controls in the neuropathic rat. *European Journal of Pain*, 21(4):750–760, November 2016.
- [11] Kirsty Bannister and A. H. Dickenson. The plasticity of descending controls in pain: translational probing. *The Journal of Physiology*, 595(13):4159–4166, May 2017.
- [12] S. L. Foote, F. E. Bloom, and G. Aston-Jones. Nucleus locus ceruleus: new evidence of anatomical and physiological specificity. *Physiological Reviews*, 63(3):844–914, July 1983.
- [13] Karin N. Westlund and Joe Dan Coulter. Descending projections of the locus coeruleus and subcoeruleus/medial parabrachial nuclei in monkey: Axonal transport studies and dopamine-beta-hydroxylase immunocytochemistry. *Brain Research Reviews*, 2(1-3):235–264, May 1980.
- [14] K.N. Westlund and A.D. Craig. Association of spinal lamina I projections with brainstem catecholamine neurons in the monkey. *Experimental Brain Research*, 110(2), July 1996.
- [15] K.A. Sluka and K.N. Westlund. Spinal projections of the locus coeruleus and the nucleus subcoeruleus in the harlan and the sasco sprague-dawley rat. *Brain Research*, 579(1):67–73, May 1992.
- [16] Bradley K. Taylor and Karin N. Westlund. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. recommended by the IASP subcommittee on taxonomy. *Pain*, 6(3), June 1979.
- [17] H. O. Handwerker and H.-G. Schaible. *Nozizeption und Schmerz*. Springer-Verlag, 2006.
- [18] Robert F Schmidt, Florian Lang, and Manfred Heckmann, editors. *Physiologie des Menschen*. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [19] Jos J. Eggermont. Receptive fields. pages 39–56, 1990.
- [20] Stephen W. Kuffler. DISCHARGE PATTERNS AND FUNCTIONAL ORGANIZATION OF MAMMALIAN RETINA. *Journal of Neurophysiology*, 16(1):37–68, January 1953.

- [21] H. O. Handwerker and M. Schmelz. Allgemeine sinnesphysiologie. In *Physiologie des Menschen*, pages 629–643. Springer Berlin Heidelberg, 2019.
- [22] B. Rexed. The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J. Comp. Neurol.*, (96):414–495, 1952.
- [23] Andrew J. Todd. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nature Reviews Neuroscience*, 11(12):823–836, November 2010.
- [24] João Braz, Carlos Solorzano, Xidao Wang, and Allan I. Basbaum. Transmitting pain and itch messages: A contemporary view of the spinal cord circuits that generate gate control. *Neuron*, 82(3):522–536, May 2014.
- [25] B N Christensen and E R Perl. Spinal neurons specifically excited by noxious or thermal stimuli: marginal zone of the dorsal horn. *Journal of Neurophysiology*, 33(2):293–307, March 1970.
- [26] Fernando Cervero, Jennifer M.A. Laird, and Miguel A. Pozo. Selective changes of receptive field properties of spinal nociceptive neurones induced by noxious visceral stimulation in the cat. *Pain*, 51(3):335–342, December 1992.
- [27] D. Andrew and A. D. Craig. Spinothalamic lamina I neurones selectively responsive to cutaneous warming in cats. *The Journal of Physiology*, 537(2):489–495, December 2001.
- [28] A. D. Craig, E. T. Zhang, and A. Blomqvist. Association of spinothalamic lamina I neurons and their ascending axons with calbindin-immunoreactivity in monkey and human. *Pain*, 97(1):105–115, May 2002.
- [29] Loïc S. Miraucourt, Radhouane Dallel, and Daniel L. Voisin. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC γ interneurons. *PLoS ONE*, 2(11):e11116, November 2007.
- [30] J.M. Bráz and A.I. Basbaum. Triggering genetically-expressed transneuronal tracers by peripheral axotomy reveals convergent and segregated sensory neuron-spinal cord connectivity. *Neuroscience*, 163(4):1220–1232, November 2009.
- [31] Mark J. Millan. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1):1–164, January 1999.
- [32] Hiroshi Baba, Koki Shimoji, and Megumu Yoshimura. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1). *Anesthesiology*, 92(2):473, February 2000.
- [33] Hiroshi Baba, Peter A. Goldstein, Manabu Okamoto, Tatsuro Kohno, Toyofumi Ataka, Megumu Yoshimura, and Koki Shimoji. Norepinephrine facilitates inhibitory

- transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 2). *Anesthesiology*, 92(2):485, February 2000.
- [34] P. W. Howorth, S. R. Thornton, V. O. Brien, W. D. Smith, N. Nikiforova, A. G. Teschemacher, and A. E. Pickering. Retrograde viral vector-mediated inhibition of pontospinal noradrenergic neurons causes hyperalgesia in rats. *Journal of Neuroscience*, 29(41):12855–12864, October 2009.
- [35] Patrick M. Dougherty and Jinghong Chen. Relationship of membrane properties, spike burst responses, laminar location, and functional class of dorsal horn neurons recorded in vitro. *Journal of Neurophysiology*, 116(3):1137–1151, September 2016.
- [36] J M Besson and A Chaouch. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. *Physiological Reviews*, 67(1):67–186, January 1987.
- [37] Victoria E. Abraira, Emily D. Kuehn, Anda M. Chirila, Mark W. Springel, Alexis A. Toliver, Amanda L. Zimmerman, Lauren L. Orefice, Kieran A. Boyle, Ling Bai, Bryan J. Song, Karleena A. Bashista, Thomas G. O. Neill, Justin Zhuo, Connie Tsan, Jessica Hoynoski, Michael Rutlin, Laura Kus, Vera Niederkofler, Masahiko Watanabe, Susan M. Dymecki, Sacha B. Nelson, Nathaniel Heintz, David I. Hughes, and David D. Ginty. The cellular and synaptic architecture of the mechanosensory dorsal horn. *Cell*, 168(1-2):295–310.e19, January 2017.
- [38] Louis A. Ritz and Joel D. Greenspan. Morphological features of lamina v neurons receiving nociceptive input in cat sacrocaudal spinal cord. *The Journal of Comparative Neurology*, 238(4):440–452, August 1985.
- [39] A. D. Craig (Bud). Pain mechanisms: Labeled lines versus convergence in central processing. *Annual Review of Neuroscience*, 26(1):1–30, 2003.
- [40] Anders Levinsson, Hans Holmberg, Jonas Broman, Mengliang Zhang, and Jens Schouenborg. Spinal sensorimotor transformation: Relation between cutaneous somatotopy and a reflex network. *The Journal of Neuroscience*, 22(18):8170–8182, September 2002.
- [41] J. Schouenborg, H.-R. Weng, J. Kalliomki, and H. Holmberg. A survey of spinal dorsal horn neurones encoding the spatial organization of withdrawal reflexes in the rat. *Experimental Brain Research*, 106(1), September 1995.
- [42] G. M. Pitcher and J. L. Henry. Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated. *European Journal of Neuroscience*, 12(6):2006–2020, June 2000.

- [43] Feng Xu and Tianjian Lu. Skin thermal pain mechanism. In *Introduction to Skin Biothermomechanics and Thermal Pain*, pages 327–342. Springer Berlin Heidelberg, 2011.
- [44] M. M. Heinricher and S. L. Ingram. *The Brainstem and Nociceptive Modulation*, volume 5, pages 593–626. Elsevier Inc., January 2008.
- [45] Todd W Vandra, Tinna Laughlin, Jason M. Lashbrook, Michael L. Nichols, George L. Wilcox, Michael H. Ossipov, Philip T. Malan, and Frank Porreca. Single intrathecal injections of dynorphin a or des-tyr-dynorphins produce long-lasting allodynia in rats: blockade by MK-801 but not naloxone. *Pain*, 68(2):275–281, December 1996.
- [46] Allan I. Basbaum and Howard L. Fields. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: Further studies on the anatomy of pain modulation. *The Journal of Comparative Neurology*, 187(3):513–531, October 1979.
- [47] A. I. Basbaum, C. H. Clanton, and H. L. Fields. Three bulbospinal pathways from the rostral medulla of the cat: an autoradiographic study of pain modulating systems. *Pain*, 6(3):384–385, June 1979.
- [48] Annica Dahlstroem and K. Fuxe. Localization of monoamines in the lower brain stem. *Experientia*, 20(7):398–399, July 1964.
- [49] Antti Pertovaara. Noradrenergic pain modulation. *Progress in Neurobiology*, 80(2):53–83, October 2006.
- [50] Elemer Szabadi. Functional neuroanatomy of the central noradrenergic system. *Journal of Psychopharmacology*, 27(8):659–693, June 2013.
- [51] H.K. Proudfit and F.M. Clark. The projections of locus coeruleus neurons to the spinal cord. In *Progress in Brain Research*, pages 123–141. Elsevier, 1991.
- [52] N Singewald. Release of neurotransmitters in the locus coeruleus. *Progress in Neurobiology*, 56(2):237–267, October 1998.
- [53] L.W. Swanson. The locus coeruleus: A cytoarchitectonic, golgi and immunohistochemical study in the albino rat. *Brain Research*, 110(1):39–56, June 1976.
- [54] R. Grzanna and M.E. Molliver. The locus coeruleus in the rat: An immunohistochemical delineation. *Neuroscience*, 5(1):21–40, January 1980.
- [55] J.M. Luque, P. Malherbe, and J.G. Richards. Localization of GABAA receptor subunit mRNAs in the rat locus coeruleus. *Molecular Brain Research*, 24(1-4):219–226, July 1994.

- [56] T.M. Egan and R.A. North. Actions of acetylcholine and nicotine on rat locus coeruleus neurons in vitro. *Neuroscience*, 19(2):565–571, October 1986.
- [57] Alfred Mansour, Charles A. Fox, Sharon Burke, Fan Meng, Robert C. Thompson, Huda Akil, and Stanley J. Watson. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: An in situ hybridization study. *The Journal of Comparative Neurology*, 350(3):412–438, December 1994.
- [58] A.F.T. Arnsten and P.S. Goldman-Rakic. Selective prefrontal cortical projections to the region of the locus coeruleus and raphe nuclei in the rhesus monkey. *Brain Research*, 306(1-2):9–18, July 1984.
- [59] Csilla Pammer, Tamas Gorcs, and Miklos Palkovits. Peptidergic innervation of the locus coeruleus cells in the human brain. *Brain Research*, 515(1-2):247–255, May 1990.
- [60] Peter J. Morgane and M.S. Jacobs. Raphe projections to the locus coeruleus in the rat. *Brain Research Bulletin*, 4(4):519–534, July 1979.
- [61] Myung-A Kim, Hyun S. Lee, Beob Y. Lee, and Barry D. Waterhouse. Reciprocal connections between subdivisions of the dorsal raphe and the nuclear core of the locus coeruleus in the rat. *Brain Research*, 1026(1):56–67, November 2004.
- [62] A Sato and R F Schmidt. Somatosympathetic reflexes: afferent fibers, central pathways, discharge characteristics. *Physiological Reviews*, 53(4):916–947, October 1973.
- [63] O. Lindvall and A. Bjorklund. The organization of the ascending catecholamine neuron system in the rat brain as revealed by the glyoxylic acid fluorescence method. 1974.
- [64] Lindsay A. Schwarz and Liqun Luo. Organization of the locus coeruleus-norepinephrine system. *Current Biology*, 25(21):R1051–R1056, November 2015.
- [65] L. W. Swanson and B. K. Hartman. The central adrenergic system. an immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connections in the rat utilizing dopamine-b-hydroxylase as a marker. *The Journal of Comparative Neurology*, 163(4):467–505, October 1975.
- [66] B. E. Jones and R. Y. Moore. Ascending projections of the locus coeruleus in the rat. ii. autoradiographic study. *Brain Research*, 127(1):25–53, May 1977.
- [67] Patrice G. Guyenet. The coeruleospinal noradrenergic neurons: Anatomical and electrophysiological studies in the rat. *Brain Research*, 189(1):121–133, May 1980.

- [68] Limin Liu, Masayoshi Tsuruoka, Masako Maeda, Bunsho Hayashi, and Tomio Inoue. Coeruleospinal inhibition of visceral nociceptive processing in the rat spinal cord. *Neuroscience Letters*, 426(3):139–144, October 2007.
- [69] H. Hirata and G. Aston-Jones. A novel long-latency response of locus coeruleus neurons to noxious stimuli: mediation by peripheral c-fibers. *Journal of Neurophysiology*, 71(5):1752–1761, May 1994.
- [70] Daisuke Sugiyama, Sung Won Hur, Anthony E. Pickering, Daisuke Kase, Sang Jeong Kim, Mikito Kawamata, Keiji Imoto, and Hidemasa Furue. In vivopatch-clamp recording from locus coeruleus neurones in the rat brainstem. *The Journal of Physiology*, 590(10):2225–2231, April 2012.
- [71] Isabel Martins, Paulina Carvalho, Martin G. de Vries, Armando Teixeira-Pinto, Steven P. Wilson, Ben H. C. Westerink, and Isaura Tavares. Increased noradrenergic neurotransmission to a pain facilitatory area of the brain is implicated in facilitation of chronic pain. *Anesthesiology*, 123(3):642–653, September 2015.
- [72] S.T. Kaehler, C. Sinner, and A. Philippu. Release of catecholamines in the locus coeruleus of freely moving and anaesthetized normotensive and spontaneously hypertensive rats: effects of cardiovascular changes and tail pinch. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 361(4):433–439, March 2000.
- [73] Javad Sajedianfard, Shohreh Khatami, Saeed Semnanian, Naser Naghdi, and Masomeh Jorjani. In vivo measurement of noradrenaline in the locus coeruleus of rats during the formalin test: A microdialysis study. *European Journal of Pharmacology*, 512(2-3):153–156, April 2005.
- [74] W. Michael Panneton, Qi Gan, and Robert S. Livergood. A trigeminoreticular pathway: Implications in pain. *PLoS ONE*, 6(9):e24499, September 2011.
- [75] Paola Devoto, Giovanna Flore, Pierluigi Saba, Mauro Fa, and Gian Luigi Gessa. Stimulation of the locus coeruleus elicits noradrenaline and dopamine release in the medial prefrontal and parietal cortex. *Journal of Neurochemistry*, 92(2):368–374, January 2005.
- [76] Aude Marzo, Nelson K. Totah, Ricardo M. Neves, Nikos K. Logothetis, and Oxana Eschenko. Unilateral electrical stimulation of rat locus coeruleus elicits bilateral response of norepinephrine neurons and sustained activation of medial prefrontal cortex. *Journal of Neurophysiology*, 111(12):2570–2588, June 2014.
- [77] D. Margalit and M. Segal. A pharmacologic study of analgesia produced by stimulation of the nucleus locus coeruleus. *Psychopharmacology*, 62(2):169–173, 1979.

- [78] Wanda L. West, David C. Yeomans, and Herbert K. Proudfit. The function of noradrenergic neurons in mediating antinociception induced by electrical stimulation of the locus coeruleus in two different sources of sprague-dawley rats. *Brain Research*, 626(1-2):127–135, October 1993.
- [79] S.L. Jones. Descending noradrenergic influences on pain. In *Progress in Brain Research*, pages 381–394. Elsevier, 1991.
- [80] Masako Maeda, Masayoshi Tsuruoka, Bunsho Hayashi, Ikuko Nagasawa, and Tomio Inoue. Descending pathways from activated locus coeruleus/subcoeruleus following unilateral hindpaw inflammation in the rat. *Brain Research Bulletin*, 78(4-5):170–174, March 2009.
- [81] H.-P. Huang, S.-R. Wang, W. Yao, C. Zhang, Y. Zhou, X.-W. Chen, B. Zhang, W. Xiong, L.-Y. Wang, L.-H. Zheng, M. Landry, T. Hokfelt, Z.-Q. D. Xu, and Z. Zhou. Long latency of evoked quantal transmitter release from somata of locus coeruleus neurons in rat pontine slices. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(4):1401–1406, January 2007.
- [82] Sandra M Florin-Lechner, Jonathan P Druhan, Gary Aston-Jones, and Rita J Valentino. Enhanced norepinephrine release in prefrontal cortex with burst stimulation of the locus coeruleus. *Brain Research*, 742(1-2):89–97, December 1996.
- [83] Limin Liu, Masayoshi Tsuruoka, Masako Maeda, Bunsho Hayashi, Xiaomin Wang, and Tomio Inoue. Descending modulation of visceral nociceptive transmission from the locus coeruleus/subcoeruleus in the rat. *Brain Research Bulletin*, 76(6):616–625, August 2008.
- [84] C.J. Hodge, A.V. Apkarian, M.P. OWEN, and B.S. Hanson. Changes in the effects of simulation of locus coeruleus and nucleus raphe magnus following dorsal rhizotomy. *Brain Research*, 288(2):325–329, December 1983.
- [85] A.J. Janss and G.F. Gebhart. Brainstem and spinal pathways mediating descending inhibition from the medullary lateral reticular nucleus in the rat. *Brain Research*, 440(2):109–122, February 1988.
- [86] S.L. Jones and G.F. Gebhart. Inhibition of spinal nociceptive transmission from the midbrain, pons and medulla in the rat: activation of descending inhibition by morphine, glutamate and electrical stimulation. *Brain Research*, 460(2):281–296, September 1988.
- [87] S.L. Jones and G.F. Gebhart. Characterization of coeruleospinal inhibition of the nociceptive tail-flick reflex in the rat: mediation by spinal alpha 2-adrenoceptors. *Brain Research*, 364(5):315–330, February 1986.

- [88] R.H. Liu and Z.Q. Zhao. Selective blockade by yohimbine of descending spinal inhibition from lateral reticular nucleus but not from locus coeruleus in rats. *Neuroscience Letters*, 442(3):142(1):65–8, August 1992.
- [89] H. Viisanen and A. Pertovaara. Influence of peripheral nerve injury on response properties of locus coeruleus neurons and coeruleospinal antinociception in the rat. *Neuroscience*, 146(4):1785–1794, June 2007.
- [90] L. Hickey, Y. Li and S.J. Fysom, T.C. Waon and R. Perrins, J. Hewinson, A.G. Teschemacher, H. Furue, and B.M. Lumb and A.E. Pickering. Optoactivation of locus ceruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats. *J Neurosci*, 71(12):4148–60, March 2014.
- [91] Luc Jasmin, Abdennacer Boudah, and Peter T. Ohara. Long-term effects of decreased noradrenergic central nervous system innervation on pain behavior and opioid antinociception. *The Journal of Comparative Neurology*, 460(1):38–55, May 2003.
- [92] M. Tsuruoka, J. Tamaki, T. Inoue, M. Maeda, and B. Hayashi. The nucleus locus coeruleus/subcoeruleus contributes to antinociception during freezing behavior following the air-puff startle in rats. *Brain Research*, 1(1393):52–61, June 2011.
- [93] T. Kudo, T. Kushikata, M. Kudo, T. Kudo, and K. Hirota. A central neuropathic pain model by dsp-4 induced lesion of noradrenergic neurons: preliminary report. *Neuroscience Letters*, 481(4):102–4, September 2010.
- [94] M. Fukui, A. Takishita, N. Zhang, T. Nakagawa, M. Minami, and M. Satoh. Involvement of locus coeruleus noradrenergic neurons in supraspinal antinociception by alpha,beta-methylene-atp in rats. *Pharmacol Sci*, 94(2):153–160, February 2004.
- [95] J. Sawynok and A. Reid. Role of ascending and descending noradrenergic pathways in the antinociceptive effect of baclofen and clonidine. *Brain Research Bulletin*, 386(1-2):341–50, October 1986.
- [96] M. H. Ossipov, T. K. Chatterjee, and G. F. Gebhart. Locus coeruleus lesions in the rat enhance the antinociceptive potency of centrally administered clonidine but not morphine. *Brain Research*, 341(2):320–330, August 1985.
- [97] M. Sasa, K. Munekiyo, Y. Osumi, and S. Takaori. Attenuation of morphine analgesia in rats with lesions of the locus coeruleus and dorsal raphe nucleus. *Eur J Pharmacol*, 42(1):53–62, March 1977.
- [98] Masayoshi Tsuruoka and William D Willis. Descending modulation from the region of the locus coeruleus on nociceptive sensitivity in a rat model of inflammatory hyperalgesia. *Brain Research*, 743(1-2):86–92, December 1996.

- [99] M. Tsuruoka, M. Maeda, and T. Inoue. Persistent hindpaw inflammation produces coeruleospinal antinociception in the non-inflamed forepaw of rats. *Neuroscience Letters*, 367(1):66–70, September 2004.
- [100] T. Kudo, T. Kushikata, M. Kudo, T. Kudo, and K. Hirota. Antinociceptive effects of neurotropin in a rat model of central neuropathic pain: Dsp-4 induced noradrenergic lesion. *Neuroscience Letters*, 503(1):20–2, September 2011.
- [101] W. J. Martin, N. K. Gupta, C. M. Loo, D. S. Rohde, and A. I. Basbaum. Differential effects of neurotoxic destruction of descending noradrenergic pathways on acute and persistent nociceptive processing. *Psychopharmacology*, 80(1-2):57–65, 1999.
- [102] R. J. Bodnar, R. F. Ackermann, D. D. Kelly, and M. Glusman. Elevations in nociceptive thresholds following locus coeruleus lesions. *Brain Research*, 3(2):125–130, March 1978.
- [103] Meritxell Llorca-Torrallba, Gisela Borges, Fani Neto, Juan Antonio Mico, and Esther Berrocoso. Noradrenergic locus coeruleus pathways in pain modulation. *Neuroscience*, 338:93–113, December 2016.
- [104] Hong Wei and Antti Pertovaara. Spinal and pontine alpha-2-adrenoceptors have opposite effects on pain-related behavior in the neuropathic rat. *European Journal of Pharmacology*, 551(1-3):41–49, December 2006.
- [105] Antti Pertovaara. The noradrenergic pain regulation system: A potential target for pain therapy. *European Journal of Pharmacology*, 716(1-3):2–7, September 2013.
- [106] Ken ichiro Hayashida, Christopher M. Peters, Silvia Gutierrez, and James C. Eisenach. Depletion of endogenous noradrenaline does not prevent spinal cord plasticity following peripheral nerve injury. *The Journal of Pain*, 13(1):49–57, January 2012.
- [107] Hong Wei and Antti Pertovaara. Regulation of neuropathic hypersensitivity by alpha-2-adrenoceptors in the pontine a7 cell group. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 112(2):90–95, September 2012.
- [108] D. V. Reynolds. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. *Science*, 164(3878):444–445, April 1969.
- [109] M. Cui, Y. Feng, JD McAdoo, and WD Willis. Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. *J Pharmacol Exp Ther.*, 289:868–876, May 1999.

- [110] Dusica Bajic and Herbert K. Proudfit. Projections of neurons in the periaqueductal gray to pontine and medullary catecholamine cell groups involved in the modulation of nociception. *The Journal of Comparative Neurology*, 405(3):359–379, March 1999.
- [111] T.L. Yaksh and G.M. Tyce. Resting and k+-evoked release of serotonin and norepinephrine in vivo from the rat and cat spinal cord. *Brain Research*, 192(1):133–146, June 1980.
- [112] J.L. Oliveras, S. Bourgoin, F. Hery, J.M. Besson, and M. Hamon. The topographical distribution of serotonergic terminals in the spinal cord of the cat: biochemical mapping by the combined use of microdissection and microassay procedures. *Brain Research*, 138(3):393–406, December 1977.
- [113] Howard L. Fields, Allan I. Basbaum, Charles H. Clanton, and Stuart D. Anderson. Nucleus raphe magnus inhibition of spinal cord dorsal horn neurons. *Brain Research*, 126(3):441–453, May 1977.
- [114] A. Iggo, J. A. McMillian, and S. S. Mokha. Spinal pathways for inhibition of multi-receptive dorsal horn neurones by locus coeruleus and nucleus raphe magnus. *J. Physiol.*, 32, 1981.
- [115] David B. Bylund, D. C. Eikenberg, J. P. Hieble, S. Z. Langer, R. J. Lefkowitz, K. P. Minneman, P. B. Molinoff, R. R. Ruffolo, and U. Trendelenburg. International union of pharmacology nomenclature of adrenoceptors. *Pharmacological reviews*, 46(2):121–36, 1994.
- [116] Teiji Wada, Takuma Otsu, Yutaka Hasegawa, Akira Mizuchi, and Hideki Ono. Characterization of alpha-1-adrenoceptor subtypes in rat spinal cord. *European Journal of Pharmacology*, 312(2):263–266, September 1996.
- [117] I. Nalepa, J. Vetulani, V. Borghi, M. Kowalska, B. Przewłocka, and F. Pavone. Formalin hindpaw injection induces changes in the [3h]prazosin binding to alpha1-adrenoceptors in specific regions of the mouse brain and spinal cord. *Journal of Neural Transmission*, 112(10):1309–1319, February 2005.
- [118] Sheena YX Tiong, Erika Polgár, Josie C van Kralingen, Masahiko Watanabe, and Andrew J Todd. Galanin-immunoreactivity identifies a distinct population of inhibitory interneurons in laminae I-III of the rat spinal cord. *Molecular Pain*, 7:1744–8069–7–36, January 2011.
- [119] Tie-Jun Sten Shi, Ursula Winzer-Serhan, Frances Leslie, and T Hökfelt. Distribution of alpha2-adrenoceptor mRNAs in the rat lumbar spinal cord in normal and axotomized rats. *NeuroReport*, 10(13):2835–2839, September 1999.

- [120] Yasushi Kuraishi, Yoshio Harada, and Hiroshi Takagi. Noradrenaline regulation of pain-transmission in the spinal cord mediated by alpha-adrenoceptors. *Brain Research*, 174(2):333–336, October 1979.
- [121] Dénes Budai, Ichiro Harasawa, and Howard L. Fields. Midbrain periaqueductal gray (PAG) inhibits nociceptive inputs to sacral dorsal horn nociceptive neurons through alpha-2-adrenergic receptors. *Journal of Neurophysiology*, 80(5):2244–2254, November 1998.
- [122] R. M. Danzebrink and G. F. Gebhart. Antinociceptive effects of intrathecal adrenoceptor agonists in a rat model of visceral nociception. *J Pharmacol Exp Ther.*, 253(2):698–705, May 1990.
- [123] M. J. Millan, K. Bervoets, J. M. Rivet, P. Widdowson, A. Renouard, S. Le Marouille-Girardon, and A. Gobert. Multiple alpha-2 adrenergic receptor subtypes: II. Evidence for the role of rat alpha-2a adrenergic receptors in the control of nociception, motor behavior and hippocampal synthesis of noradrenaline. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 270(3):958–972, 1994.
- [124] W. Klimscha, C. Tong, and J. C. Eisenach. Intrathecal alpha-2-adrenergic agonists stimulate acetylcholine and norepinephrine release from the spinal cord dorsal horn in sheep. *Anesthesiology*, 87(1):110–116, July 1997.
- [125] C. Roudet, P. Mouchet, C. Feuerstein, and M. Savasta. Normal distribution of alpha 2-adrenoceptors in the rat spinal cord and its modification after noradrenergic denervation: A quantitative autoradiographic study. *Journal of Neuroscience Research*, 39(3):319–329, October 1994.
- [126] Yasushi Kuraishi, Naoyoshi Hirota, Yoichi Sato, Shuji Kaneko, Masamichi Satoh, and Hiroshi Takagi. Noradrenergic inhibition of the release of substance p from the primary afferents in the rabbit spinal dorsal horn. *Brain Research*, 359(1-2):177–182, December 1985.
- [127] Yoshinori Kamisaki, Toshihiro Hamada, Kazuhisa Maeda, Masahiko Ishimura, and Tadao Itoh. Presynaptic alpha-2 adrenoceptors inhibit glutamate release from rat spinal cord synaptosomes. *Journal of Neurochemistry*, 60(2):522–526, February 1993.
- [128] Xinhui Li and James C. Eisenach. alpha-2a-adrenoceptor stimulation reduces capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 299(3):939–944, 2001.
- [129] Yu-Zhen Pan, De-Pei Li, and Hui-Lin Pan. Inhibition of glutamatergic synaptic input to spinal lamina II neurons by presynaptic alpha-2-adrenergic receptors. *Journal of Neurophysiology*, 87(4):1938–1947, April 2002.

- [130] Yasuhiko Kawasaki, Eiichi Kumamoto, Hidemasa Furue, and Megumu Yoshimura. alpha-2 adrenoceptor mediated presynaptic inhibition of primary afferent glutamatergic transmission in rat substantia gelatinosa neurons. *Anesthesiology*, 98(3):682–689, March 2003.
- [131] M. Josune Olave and David J. Maxwell. Neurokinin-1 projection cells in the rat dorsal horn receive synaptic contacts from axons that possess alpha-2c-adrenergic receptors. *The Journal of Neuroscience*, 23(17):6837–6846, July 2003.
- [132] M.J. Olave and D.J. Maxwell. Axon terminals possessing alpha-2c-adrenergic receptors densely innervate neurons in the rat lateral spinal nucleus which respond to noxious stimulation. *Neuroscience*, 126(2):391–403, January 2004.
- [133] S. Hagihira, E. Senba, S. Yoshida, M. Tohyama, and I. Yoshiya. Fine structure of noradrenergic terminals and their synapses in the rat spinal dorsal horn: an immunohistochemical study. *Brain Research*, 526(1):73–80, August 1990.
- [134] C.A. Doyle and D.J. Maxwell. Catecholaminergic innervation of the spinal dorsal horn: A correlated light and electron microscopic analysis of tyrosine hydroxylase-immunoreactive fibres in the cat. *Neuroscience*, 45(1):161–176, January 1991.
- [135] Xinhui Li, Zhihong Zhao, Hui-Lin Pan, James C. Eisenach, and Xavier Paqueron. Norepinephrine release from spinal synaptosomes. *Anesthesiology*, 93(1):164–172, July 2000.
- [136] Dr. med. Thomas Karow and Dr. med. Ruth Lang-Roth. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2013, Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden für Studium und Praxis*, volume 21. Dr. med. Thomas Karow, 2013.
- [137] K. Starke, H. Montel, and J. Wagner. Effect of phentolamine on noradrenaline uptake and release. *Naunyn-Schmiedeberg's Archiv fuer Pharmakologie*, 271(2):181–192, 1971.
- [138] Andreas F. Henschen, Menek Goldstein, and Michael R. Palmer. Evidence for functional contact between cografated locus coeruleus and spinal cord in oculo: electrophysiological studies. *Brain Research*, 474(1):66–74, November 1988.
- [139] Frederik Seibt and Rémy Schlichter. Noradrenaline-mediated facilitation of inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord involves interlaminar communications. *European Journal of Neuroscience*, 42(9):2654–2665, October 2015.
- [140] Seung Whan Ahn, Sang Hun Kim, Jin Ho Kim, Seok Choi, Cheol Ho Yeum, Hee Wook Wie, Jae Myeong Sun, Insuk So, and Jae Yeoul Jun. Phentolamine

- inhibits the pacemaker activity of mouse interstitial cells of cajal by activating ATP-sensitive k⁺ channels. *Archives of Pharmacal Research*, 33(3):479–489, March 2010.
- [141] David S Wishart, Yannick D Feunang, An C Guo, Elvis J Lo, Ana Marcu, Jason R Grant, Tanvir Sajed, Daniel Johnson, Carin Li, Zinat Sayeeda, Nazanin Assempour, Ithayavani lynkkaran, Yifeng Liu, Adam Maciejewski, Nicola Gale, Alex Wilson, Lucy Chin, Ryan Cummings, Diana Le, Allison Pon, Craig Knox, and Michael Wilson. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1):D1074–D1082, November 2017.
- [142] National Center for Biotechnology Information. Pubchem compound summary for cid 5775, phentolamine.
- [143] Laurent Bardin, Jeannine Lavarenne, and Alain Eschalier. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain*, 86(1):11–18, May 2000.
- [144] Alex Brenchat, Luz Romero, Mónica García, Marta Pujol, Javier Burgueño, Antoni Torrens, Michel Hamon, José Manuel Baeyens, Helmut Buschmann, Daniel Zamanillo, and José Miguel Vela. 5-HT₇ receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. *Pain*, 141(3):239–247, February 2009.
- [145] Mark G. Green, Julia Scarth, and Anthony Dickenson. An excitatory role for 5-HT in spinal inflammatory nociceptive transmission state-dependent actions via dorsal horn 5-HT₃ receptors in the anaesthetized rat. *Pain*, 89(1):81–88, December 2000.
- [146] Rie Suzuki, Sara Morcuende, Mark Webber, Stephen P. Hunt, and Anthony H. Dickenson. Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nature Neuroscience*, 5(12):1319–1326, October 2002.
- [147] Rie Suzuki, Wahida Rahman, Stephen P Hunt, and Anthony H Dickenson. Descending facilitatory control of mechanically evoked responses is enhanced in deep dorsal horn neurones following peripheral nerve injury. *Brain Research*, 1019(1-2):68–76, September 2004.
- [148] Curtis O. Asante and Anthony H. Dickenson. Descending serotonergic facilitation mediated by spinal 5-HT₃ receptors engages spinal rapamycin-sensitive pathways in the rat. *Neuroscience Letters*, 484(2):108–112, October 2010.
- [149] D. Conte, E.D. Legg, A.C. McCourt, E. Silajdzic, G.G. Nagy, and D.J. Maxwell. Transmitter content, origins and connections of axons in the spinal cord that pos-

- sess the serotonin (5-hydroxytryptamine) 3 receptor. *Neuroscience*, 134(1):165–173, January 2005.
- [150] Masaru Tsuchiya, Hajime Yamazaki, and Yuuichi Hori. Enkephalinergic neurons express 5-HT₃ receptors in the spinal cord dorsal horn. *NeuroReport*, 10(13):2749–2753, September 1999.
- [151] Wahida Rahman, Rie Suzuki, Lars J Rygh, and Anthony H Dickenson. Descending serotonergic facilitation mediated through rat spinal 5ht₃ receptors is unaltered following carrageenan inflammation. *Neuroscience Letters*, 361(1-3):229–231, May 2004.
- [152] Karla P. Zeitz, Nicolas Guy, Annika B. Malmberg, Sahera Dirajlal, William J. Martin, Linda Sun, Douglas W. Bonhaus, Cheryl L. Stucky, David Julius, and Allan I. Basbaum. The 5-HT₃ subtype of serotonin receptor contributes to nociceptive processing via a novel subset of myelinated and unmyelinated nociceptors. *The Journal of Neuroscience*, 22(3):1010–1019, February 2002.
- [153] K.C. Mohan and K. Ravikumar. Ondansetron hydrochloride: a competitive serotonin 5-HT₃ receptor blocker. *Acta Crystallog C*, 15(51):2627–2629, December 1995.
- [154] Kirsty Bannister, Ryan Patel, Leonor Goncalves, Louisa Townson, and Anthony H. Dickenson. Diffuse noxious inhibitory controls and nerve injury. *PAIN*, 156(9):1803–1811, September 2015.
- [155] K. B. J. Franklin and G. Paxinos. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates Third Edition*, volume 3. Elsevier New York, 2007.
- [156] Hermann Locher, Hans-Raimund Casser, Martin Strohmeier, and Joachim Grifka, editors. *Spezielle Schmerztherapie der Halte- und Bewegungsorgane*. Georg Thieme Verlag, 2011.
- [157] David Dubuisson and Patrick D. Wall. Descending influences on receptive fields and activity of single units recorded in laminae 1, 2 and 3 of cat spinal cord. *Brain Research*, 199(2):283–298, October 1980.
- [158] P.M. Dougherty and W.D. Willis. Modification of the responses of primate spinothalamic neurons to mechanical stimulation by excitatory amino acids and an n-methyl-d-aspartate antagonist. *Brain Research*, 542(1):15–22, February 1991.
- [159] Gerardo Rojas-Piloni, Javier Rodríguez-Jiménez, Guadalupe Martínez-Lorenzana, and Miguel Condés-Lara. Dorsal horn antinociception mediated by the paraventricular hypothalamic nucleus and locus coeruleus: A comparative study. *Brain Research*, 1461:41–50, June 2012.

- [160] Antti Pertovaara. Antinociception in bulboreticular neurons of the rat produced by spinally administered medetomidine, an alpha-2-adrenoceptor agonist. *European Journal of Pharmacology*, 204(1):9–14, October 1991.
- [161] A. Arieli, A. Sterkin, A. Grinvald, and A. Aertsen. Dynamics of ongoing activity: Explanation of the large variability in evoked cortical responses. *Science*, 273(5283):1868–1871, September 1996.
- [162] William D. Willis and K. N. Westlund. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *Journal of Clinical Neurophysiology*, 14(1):2–31, January 1997.
- [163] S. M. Smith, P. T. Fox, K. L. Miller, D. C. Glahn, P. M. Fox, C. E. Mackay, N. Filippini, K. E. Watkins, R. Toro, A. R. Laird, and C. F. Beckmann. Correspondence of the brain's functional architecture during activation and rest. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(31):13040–13045, July 2009.
- [164] Aaron Kucyi and Karen D. Davis. The neural code for pain: From single-cell electrophysiology to the dynamic pain connectome. *The Neuroscientist*, 23(4):397–414, September 2016.
- [165] Robert R. Ruffolo, William Bondinell, and J. Paul Hieble. .alpha.- and .beta.-adrenoceptors: From the gene to the clinic. 2. structure-activity relationships and therapeutic applications. *Journal of Medicinal Chemistry*, 38(19):3681–3716, September 1995.
- [166] Tony L. Yaksh. Pharmacology of spinal adrenergic systems which modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 22(5):845–858, May 1985.
- [167] John S. Yeomans. The absolute refractory periods of self-stimulation neurons. *Physiology & Behavior*, 22(5):911–919, May 1979.
- [168] E. Mutschler, G. Geisslinger, H. Kroemer, P. Ruth, and M. Schäfer-Korting. *Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, volume 9. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, August 2008.
- [169] Anna V. Domyancic and David A. Morilak. Distribution of 1a adrenergic receptor mRNA in the rat brain visualized by in situ hybridization. *The Journal of Comparative Neurology*, 386(3):358–378, September 1997.
- [170] Patrice G. Guyenet, Ruth L. Stornetta, Tina Riley, Frederick R. Norton, Diane L. Rosin, and Kevin R. Lynch. Alpha2a-adrenergic receptors are present in lower brainstem catecholaminergic and serotonergic neurons innervating spinal cord. *Brain Research*, 638(1-2):285–294, February 1994.

- [171] M Segal. Serotonergic innervation of the locus coeruleus from the dorsal raphe and its action on responses to noxious stimuli. *The Journal of Physiology*, 286(1):401–415, January 1979.
- [172] Begoña Fernández-Pastor, Jorge E. Ortega, and J. Javier Meana. Involvement of serotonin 5-HT₃ receptors in the modulation of noradrenergic transmission by serotonin reuptake inhibitors: a microdialysis study in rat brain. *Psychopharmacology*, 229(2):331–344, May 2013.
- [173] Frank M. Clark and Herbert K. Proudfit. The projection of locus coeruleus neurons to the spinal cord in the rat determined by anterograde tracing combined with immunocytochemistry. *Brain Research*, 538(2):231–245, January 1991.
- [174] Eveline Bruinstroop, Georgina Cano, Veronique G.J.M. Vanderhorst, Judney C. Cavalcante, Jena Wirth, Miguel Sena-Esteves, and Clifford B. Saper. Spinal projections of the α_5 , α_6 (locus coeruleus), and α_7 noradrenergic cell groups in rats. *The Journal of Comparative Neurology*, 520(9):1985–2001, April 2012.
- [175] B. B. Hoffmann and R. J. Lefkowitz. The pharmacological basis of therapeutics. page 10, 1991.
- [176] Victoria Chapman, Rie Suzuki, and Anthony H. Dickenson. Electrophysiological characterization of spinal neuronal response properties in anaesthetized rats after ligation of spinal nerves l5-l6. *The Journal of Physiology*, 507(3):881–894, March 1998.
- [177] Wahida Rahman, Richard D’Mello, and Anthony H. Dickenson. Peripheral nerve injury-induced changes in spinal alpha-2-adrenoceptor-mediated modulation of mechanically evoked dorsal horn neuronal responses. *The Journal of Pain*, 9(4):350–359, April 2008.
- [178] Ce Zhang, Shou-Wei Yang, Yong-Giang Guo, Jian-Tian Qiao, and Nachum Dafny. Locus coeruleus stimulation modulates the nociceptive response in parafascicular neurons: An analysis of descending and ascending pathways. *Brain Research Bulletin*, 42(4):273–278, January 1997.
- [179] Yan Zhao, Ce Zhang, Yu-Ming Kang, Jian-Tian Qiao, and Nachum Dafny. Endogenous adenosine involved in the mediation of spinal antinociception produced by stimulating locus coeruleus. *Life Sciences*, 65(5):PL67–PL74, June 1999.
- [180] GF Gebhart and MH Ossipov. Characterization of inhibition of the spinal nociceptive tail-flick reflex in the rat from the medullary lateral reticular nucleus. *The Journal of Neuroscience*, 6(3):701–713, March 1986.
- [181] Mark S. Brodie and Herbert K. Proudfit. Antinociception induced by local injections of carbachol into the nucleus raphe magnus in rats: Alteration by intrathecal

- injection of monoaminergic antagonists. *Brain Research*, 371(1):70–79, April 1986.
- [182] Joseph Rochford, Benoit Dubé, and Patricia Dawes. Spinal cord alpha-2 noradrenergic receptors mediate conditioned analgesia. *Psychopharmacology*, 106(2):235–238, June 1992.
- [183] Desiré Carlos Callegari, João Antônio Correa, Oscar César Pires, Renan Batista Corrêa Braga, Ana Flávia Marques Gimbo, Adriana Aparecida de Souza, Marta Helena Rovani Pires, Elton Constantino, and Irimar de Paula Posso. Efeito hiperálgico da fentolamina, por via subaracnoidea, em ratos. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 65(2):111–116, March 2015.
- [184] J Sato and E. Perl. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science*, 251(5001):1608–1610, March 1991.
- [185] Minna M. Hämäläinen and Antti Pertovaara. The antinociceptive action of an alpha2-adrenoceptor agonist in the spinal dorsal horn is due to a direct spinal action and not to activation of descending inhibition. *Brain Research Bulletin*, 37(6):581–587, January 1995.
- [186] Marshall Devor and Wilfrid Jänig. Activation of myelinated afferents ending in a neuroma by stimulation of the sympathetic supply in the rat. *Neuroscience Letters*, 24(1):43–47, June 1981.
- [187] M. Devor, W. Janig, and M. Michaelis. Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *Journal of Neurophysiology*, 71(1):38–47, January 1994.
- [188] Mikel Lopez de Armentia, Andrea H. Leeson, Martin J. Stebbing, Laszlo Urban, and Elspeth M. McLachlan. Responses to sympathomimetics in rat sensory neurones after nerve transection. *NeuroReport*, 14(1):9–13, January 2003.
- [189] Annika B Malmberg, Linda R Hedley, Jeffrey R Jasper, John C Hunter, and Allan I Basbaum. Contribution of alpha-2receptor subtypes to nerve injury-induced pain and its regulation by dexmedetomidine. *British Journal of Pharmacology*, 132(8):1827–1836, April 2001.
- [190] Zahid Ali, Gang Wu, Alexei Kozlov, and Stephen Barasi. The role of 5ht3 in nociceptive processing in the rat spinal cord: results from behavioural and electrophysiological studies. *Neuroscience Letters*, 208(3):203–207, April 1996.
- [191] Wei Guo, Kan Miyoshi, Ronald Dubner, Ming Gu, Man Li, Jian Liu, Jiale Yang, Shiping Zou, Ke Ren, Koichi Noguchi, and Feng Wei. Spinal 5-HT3 receptors mediate descending facilitation and contribute to behavioral hypersensitivity via a

- reciprocal neuron-glia signaling cascade. *Molecular Pain*, 10:1744–8069–10–35, January 2014.
- [192] João Manuel Braz and Allan I. Basbaum. Genetically expressed transneuronal tracer reveals direct and indirect serotonergic descending control circuits. *The Journal of Comparative Neurology*, 507(6):1990–2003, April 2008.
- [193] Geoffrey C. Kwiat and Allan I. Basbaum. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. *Somatosensory & Motor Research*, 9(2):157–173, January 1992.
- [194] Didier Bouhassira, Luis Villanueva, Zhu Bing, and Daniel le Bars. Involvement of the subnucleus reticularis dorsalis in diffuse noxious inhibitory controls in the rat. *Brain Research*, 595(2):353–357, November 1992.
- [195] B. Bie, H. L. Fields, J. T. Williams, and Z. Z. Pan. Roles of alpha1- and alpha2-adrenoceptors in the nucleus raphe magnus in opioid analgesia and opioid abstinence-induced hyperalgesia. *The Journal of Neuroscience*, 23(21):7950–7957, August 2003.
- [196] W. M. S. Russell and R. L. Bruch. The principles of humane experimental technique. *Journal of Neuroscience Research*, pages 69–154, 1959.
- [197] Rong-Jian Liu, Rui-Xing Zhang, Jian-Tian Qiao, and Nachum Dafny. Interrelations of opioids with monoamines in descending inhibition of nociceptive transmission at the spinal level: an immunocytochemical study. *Brain Research*, 830(1):183–190, May 1999.
- [198] R.M. Danzebrink and G.F. Gebhart. Evidence that spinal 5-HT₁, 5-HT₂ and 5-HT₃ receptor subtypes modulate responses to noxious colorectal distension in the rat. *Brain Research*, 538(1):64–75, January 1991.
- [199] Oscar César Pires, Hazem Adel Ashmawi, Elton Constantino, Naira Correa Cusma Pelogia, and Irimar de Paula Posso. Subarachnoid serotonergic and noradrenergic antagonists increase the pain response in rats. *Brazilian Journal of Anesthesiology*, 61(2):202–210, March 2011.
- [200] Yuhua Chen, Mark A. Oatway, and Lynne C. Weaver. Blockade of the 5-HT₃-receptor for days causes sustained relief from mechanical allodynia following spinal cord injury. *Journal of Neuroscience Research*, 87(2):418–424, February 2009.
- [201] Fausto Roila and Albano Del Favero. Ondansetron clinical pharmacokinetics. *Clinical Pharmacokinetics*, 29(2):95–109, August 1995.

[202] Si H. Yang and Myung G. Lee. Dose-independent pharmacokinetics of ondansetron in rats: contribution of hepatic and intestinal first-pass effects to low bioavailability. *Biopharmaceutics Drug Disposition*, 29(7):414–426, October 2008.