

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

**Der Effekt von oral appliziertem Bitopertin auf induzierten
chronischen neuropathischen Schmerz bei der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Valentin Kötter

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Herr Prof. Klöcker

Erstgutachterin: Frau Prof. Bauer

Zweitgutachter: Herr Prof. Aktas

„Es ist nicht genug zu wissen, man muß auch anwenden; es ist nicht genug zu wollen, man muß auch tun.“

Johann Wolfgang von Goethe (Goethe und Muschg 2006)

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Armbruster, Anja; Neumann, Elena; Kötter, Valentin; Hermanns, Henning; Werdehausen, Robert*; Eulenburg, Volker* **(2018)**: The GlyT1 Inhibitor Bitopertin Ameliorates Allodynia and Hyperalgesia in Animal Models of Neuropathic and Inflammatory Pain. In: *Front. Mol. Neurosci.* 10, S. 438. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00438. *equal contribution

Zusammenfassung

Chronischer Schmerz mit neuropathischer Komponente betrifft 7–10 % der globalen Bevölkerung. Die Lebensqualität der Betroffenen ist stark eingeschränkt und aktuelle Therapieoptionen sind mangelhaft. Die Entwicklung neuer Therapieoptionen, die ausreichende Schmerzlinderung bei tolerablen Nebenwirkungen vermitteln, ist daher von besonderer gesellschaftlicher und klinischer Relevanz.

Der Glycintransporter 1 (GlyT1) spielt eine bedeutende Rolle in der Regulation des extrazellulären Glycinspiegels. Die Inhibition des GlyT1 konnte in verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen antinozizeptive Effekte bewirken und stellt daher eine mögliche neue Zielstruktur zur Behandlung neuropathischer Schmerzen dar.

Bitopertin ist ein hochselektiver GlyT1-Inhibitor, welcher in klinischen Studien bei Menschen und in experimentellen Studien bei Tieren ein günstiges Sicherheitsprofil aufwies.

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, systematisch zu untersuchen, ob und in welchen Dosen Bitopertin im Tiermodell schmerzlindernd wirkt.

Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurde in männlichen Wistar-Ratten mittels einer *chronic constriction injury*-Operation eine chronische periphere Mononeuropathie des linken *N. ischiadicus* erzeugt. Zwei Gruppen wurden scheinoperiert. Nach Eintreten einer Allodynie als Zeichen einer Neuropathie (11–15 Tage nach der Operation) erfolgte die Applikation von Bitopertin in den Konzentrationen 0,3 mg, 1 mg und 3 mg/kg Körpergewicht als orale Einmalgabe (n = 6 bis 13). Zusätzlich gab es Vehikellkontrollgruppen (n = 6 bis 11). Die Ausprägung der Allodynie wurde mit einem *Dynamic Plantar Aesthesiometer* vor und 1 h, 2 h, 4 h, 8 h und 24 h nach der Applikation von Bitopertin gemessen. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Das Signifikanzniveau wurde nach der Bonferroni-Methode korrigiert. P-Werte kleiner als 0,05 wurden als statistisch signifikante Gruppenunterschiede angesehen.

Bitopertin verminderte die Allodynie als Qualität neuropathischer Schmerzen in den Dosierungen 0,3 und 1 mg/kg mit einem Wirkmaximum 2 bis 4 h nach Applikation, jedoch nicht nach 8 oder 24 h. Das Schmerzverhalten war bei 0,3 mg/kg nach 2 und 4 h und bei 1 mg/kg nach 2 h signifikant unterschiedlich. In der Dosierung 3 mg/kg gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen. Es wurden keine unerwünschten Nebenwirkungen beobachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass Bitopertin eine Linderung neuropathischer Schmerzen vermitteln kann. Weitere Studien sind notwendig, um Effektgröße und klinische Anwendbarkeit zu evaluieren

Summary

Chronic neuropathic pain affects 7–10 % of the global population. Quality of life of concerned persons is heavily impaired and current therapies are insufficient. The development of new therapeutic strategies which provide adequate pain relief with tolerable side effects is therefore of outstanding social and clinical importance.

Glycine transporter 1 (GlyT1) plays a crucial role in the regulation of extracellular glycine levels. The inhibition of GlyT1 could ameliorate neuropathic pain in multiple animal experiments, and is hence a possible new target for the treatment of neuropathic pain.

Bitopertin is a highly selective GlyT1-inhibitor that showed a favorable security profile in humans and animals.

Aim of the present study was to systematically elucidate whether bitopertin acts antineuropathically and which doses are necessary.

After approval through local authorities, male Wistar rats underwent chronic constriction injury operation to establish a chronic peripheral mononeuropathy of the left sciatic nerve. Two groups underwent sham operation. After an allodynia as a sign of neuropathy occurred (postoperative day 11–15), a single oral application of bitopertin was performed at concentrations of 0.3, 1 or 3 mg/kg body weight (n = 6 to 13). Additionally, vehicle control groups were established (n = 6 to 11). Pain behavior was measured by a Dynamic Plantar Aesthesiometer before and 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and 24 h after bitopertin application. Differences between groups were analyzed using a 2-way analysis of variance. Level of significance was corrected by use of Bonferroni method. P-values lower than 0.05 were considered as indicative for statistically significant differences between groups.

Bitopertin ameliorated allodynia as a quality of neuropathic pain in doses of 0.3 and 1 mg/kg with a maximum effect between 2 and 4 h after application, but not after 8 or 24 hours. Pain behavior differed significantly at 0.3 mg/kg after 2 and 4 hours and at 1 mg/kg after 2 hours. There was no significant difference between groups at 3 mg/kg. No adverse effects have been observed.

The results indicate an antineuropathic effect of bitopertin. Further studies are necessary to evaluate effect size and clinical applicability.

Abkürzungsverzeichnis

μR	μ-Opioidrezeptor
5HT	Serotonintransporter
Abb.	Abbildung
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
CaK	neuronaler Calcium-Kanal
CCI	<i>chronic constriction injury</i>
CCI-OP	<i>chronic constriction injury</i> -Operation
Cl ⁻	Chlorid-Ion
CRPS	<i>Complex regional pain syndrome</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOI	<i>digital object identifier</i>
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>
et al.	<i>et alii</i>
g	Gramm
GABA	<i>gamma-aminobutyric acid</i>
Gly	Glycin
GlyR	Strychnin-sensitiver Glycinrezeptor
GlyT	Glycintransporter
GlyT1	Glycintransporter 1
GlyT2	Glycintransporter 2
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
i. p.	intraperitoneal
i. t.	intrathecal
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
KG	Körpergewicht/Kommanditgesellschaft
LTP	<i>long-term potentiation</i>
mod.	modifiziert
n	Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe
N.	<i>Nervus</i>

Na ⁺	Natrium-Ion
NaK	neuronaler Natrium-Kanal
NAT	Noradrenalintransporter
Na _v	spannungsgesteuerter Natrium-Kanal
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
NNT	<i>number needed to treat</i>
NRS	Numerische Ratingskala
OP	Operation
p. o.	<i>per os</i>
PWL	<i>Paw withdrawal latency</i>
PWT	<i>Paw withdrawal threshold</i>
QST	<i>Quantitative sensory testing</i>
RG	Reagenz
s. c.	subkutan
SD	<i>standard deviation</i>
SNL	<i>spinal nerve ligation</i>
SSNRI	Selektiver Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitor
TCA	Trizyklische Antidepressiva
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>
ZETT	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	I
Summary.....	I
Abkürzungsverzeichnis	II
Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
1. Einleitung.....	1
1.1 Schmerz.....	1
1.2 Neuropathisches Schmerzsyndrom	1
1.2.1 Definition.....	1
1.2.2 Symptome	1
1.2.3 Prävalenz	3
1.2.4 Assoziierte Erkrankungen.....	3
1.2.5 Verminderte Lebensqualität	5
1.3 Pharmakologische Therapie.....	5
1.4 Pathophysiologie.....	7
1.4.1. Periphere Sensibilisierung.....	7
1.4.1.1 Sensibilisierung der Schmerzrezeptoren.....	7
1.4.1.2 Abnormale ektope Neuronenaktivität	8
1.4.1.3 Sympathisch aufrechterhaltener Schmerz	8
1.4.2 Zentrale Sensibilisierung	9
1.4.2.1 Steigerung der Erregbarkeit	9
1.4.2.2 Disinhibition.....	10
1.4.2.3 Zentrale Reorganisation	11

1.5 Glycinerge Neurotransmission.....	11
1.5.1 Glycintransporter	12
1.5.2 Glycintransporter 1-Inhibition	13
1.5.3 Bitopertin	14
1.6 Ziele der Arbeit	15
2. Material und Methoden.....	17
2.1 Versuchstiere	17
2.2 Operative Methoden	17
2.2.1 Perioperative Maßnahmen	17
2.2.2 <i>Chronic Constriction Injury</i>	18
2.2.3 <i>Sham-Operation</i>	19
2.3 Substanzen.....	19
2.3.1 Bitopertin (RG 1678)	19
2.3.2 Polysorbat 80.....	20
2.3.3 Dimethylsulfoxid	20
2.4 Applikationslösungen.....	20
2.5 Orale Applikation	21
2.6 Verhaltenstestung.....	21
2.6.1 Rahmenbedingungen und Allgemeines zur Testung	21
2.6.2 Mechanische Allodynie	22
2.7 Versuchsaufbau	23
2.8 Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse	25
3. Ergebnisse	26
3.1 Vorbemerkungen	26
3.2 Entstehung mechanischer Allodynie	26

3.3 Effekt der Applikation von Bitopertin auf die mechanische Reizantwort der linken Hinterpfote	26
3.3.1 Pfotenrückzugsschwellenwerte nach Applikation von 0,3 mg/kg Bitopertin.....	27
3.3.2 Pfotenrückzugsschwellenwerte nach Applikation von 1 mg/kg Bitopertin.....	28
3.3.3 Pfotenrückzugsschwellenwerte nach Applikation von 3 mg/kg Bitopertin.....	28
3.3.4 Pfotenrückzugsschwellenwerte nach <i>Sham</i> -OP und Applikation von 1 mg/kg Bitopertin	29
3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	30
4. Diskussion.....	31
4.1 Beantwortung der Fragestellung	31
4.2 Methodendiskussion.....	31
4.2.1 Tiermodell	31
4.2.2 <i>Chronic constriction injury</i> -Operation	32
4.2.3 Substanzen	32
4.2.4 Orale Applikation.....	33
4.2.5 Verhaltenstestung.....	34
4.2.6 Versuchsaufbau.....	35
4.3 Ergebnisdiskussion.....	36
4.3.1 Auswirkung von Bitopertin auf den Pfotenrückzugsschwellenwert.....	36
4.3.2 Klinische Anwendbarkeit.....	38
4.4 Schlussfolgerungen	40
5. Literaturverzeichnis.....	41
6. Danksagung	54

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema: Schmerzleitung im Hinterhorn des Rückenmarks	10
Abb. 2: Schematische Darstellung glycinерger Neurotransmission	13
Abb. 3: Strukturformel von Bitopertin	15
Abb. 4: Schema der Operationsmethode <i>Chronic Constriction Injury</i>	19
Abb. 5: Aufbau der Testboxen mit <i>Dynamic Plantar Aesthesiometer</i> ®	22
Abb. 6: Messung mit dem <i>Dynamic Plantar Aesthesiometer</i> ®	22
Abb. 7: Linke Hinterpfote einer Ratte	23
Abb. 8: Schema des Versuchsablaufs	24
Abb. 9: Reaktion der linken Pfote auf mechanischen Reiz, CCI-OP, 0,3 mg/kg Bitopertin .	27
Abb. 10: Reaktion der linken Pfote auf mechanischen Reiz, CCI-OP, 1 mg/kg Bitopertin ..	28
Abb. 11: Reaktion der linken Pfote auf mechanischen Reiz, CCI-OP, 3 mg/kg Bitopertin ..	29
Abb. 12: Reaktion der linken Pfote auf mechanischen Reiz, <i>Sham</i> -OP, 1 mg/kg Bitopertin	30

Abb. 1, 2, 3 und 7 werden mit den freundlichen Genehmigungen der Urheber gedruckt. Die vom Autor selbst erstellten Abb. 5, 6, 8 bis 12 dürfen unter CC BY 4.0 -Lizenz verwendet werden. Für weitere Informationen siehe: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Negativsymptome bei neuropathischem Schmerz.....	2
Tabelle 2: Positivsymptome bei neuropathischem Schmerz	2
Tabelle 3: Beispiele für Ursachen neuropathischer Schmerzen.....	4
Tabelle 4: Übersicht der bevorzugten Medikamente zur Therapie neuropathischer Schmerzen	6
Tabelle 5: Zusammensetzung der Applikationslösungen	21
Tabelle 6: Systematik der Versuchsgruppen mit Tierzahlen	25

1. Einleitung

1.1 Schmerz

Schmerzempfindung ist per Definition ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis mit einer akuten oder potentiellen Gewebsschädigung (IASP Task Force on Taxonomy 1994). Über hochschwellige Rezeptoren an den Nervenenden der Körperperipherie, sogenannte Nozizeptoren, werden schmerzhafte Stimuli erkannt. Deshalb wird dieser physiologische Schmerz auch als nozizeptiver Schmerz bezeichnet (Maag et al. 2006). Nach Gewebsschädigung führen reversible adaptive Veränderungen des sensiblen Nervensystems zu Schmerzüberempfindlichkeit. Diese Sensibilisierung ist ein Schutzmechanismus, der so lange aufrechterhalten bleibt, wie die Heilung des beschädigten Gewebes benötigt (Hehn et al. 2012). Wenn Schmerz die Gewebeheilungszeit überschreitet, wird er als chronisch bezeichnet und verliert diese Schutzfunktion (Bonica 1953).

1.2 Neuropathisches Schmerzsyndrom

1.2.1 Definition

Neuropathischer Schmerz ist definiert als Krankheit oder Läsion des somatosensorischen Nervensystems (IASP Task Force on Taxonomy 1994; Treede et al. 2008). Im Gegensatz zu nozizeptivem Schmerz sind hier neben den Nervenendigungen weitere Strukturen des somatosensorischen Nervensystems direkt betroffen (Campbell und Meyer 2006). Die beschriebene physiologische Sensibilisierung kann sich dann als pathologische Sensibilisierung dauerhaft manifestieren. So entsteht eine autonome Erkrankung des Nervensystems (Hehn et al. 2012).

1.2.2 Symptome

Spontane Schmerzattacken, Schmerz bei physiologischerweise nicht-schmerzhaften Stimuli und verstärkte Schmerzempfindung sind Symptome des neuropathischen Schmerzsyndroms. Individuelle Symptome können sehr heterogen sein und sind von den

Entstehungsmechanismen abhängig, weshalb eine sensorische Untersuchung des jeweiligen Patienten empfohlen wird (*Quantitative sensory testing*, QST; Rolke et al. 2006).

Es werden Positiv- und Negativsymptome unterschieden. Negativsymptome sind durch den Ausfall sensorischer Wahrnehmungen charakterisiert (s. Tabelle 1, Maag et al. 2006), wohingegen Positivsymptome durch das zusätzliche Auftreten von unangenehmen sensorischen Phänomenen charakterisiert werden (s. Tabelle 2, Maag et al. 2006).

Tabelle 1: Negativsymptome bei neuropathischem Schmerz

Negativsymptom	Herabgesetzte Empfindung von...
Hypästhesie	Berührungsreizen
Hypalgesie	Schmerzreizen
Thermhypästhesie	Temperaturreizen
Pallhypästhesie	Vibrationsreizen

Sinnesempfindungen, welche bei neuropathischem Schmerz herabgesetzt sein können, werden aufgezählt und definiert. Tabelle mod. nach Maag et al. 2006.

Tabelle 2: Positivsymptome bei neuropathischem Schmerz

Positivsymptom	Beschrieben als...
Parästhesie	Kribbeln, Ameisenlaufen
Dysästhesie	Unangenehme Parästhesien
Spontaner Schmerz	Spontane (brennende) Dauerschmerzen
Einschießender Schmerz	Elektrisierend, blitzartig
Evozierter Schmerz	
• Hyperalgesie	Leicht schmerzhafter Reiz löst intensive Schmerzen aus
• Allodynie	Nicht schmerzhafter Reiz löst Schmerzen aus

Sinnesempfindungen, die bei Patienten mit neuropathischem Schmerz auftreten, werden aufgezählt und definiert. Tabelle mod. nach Maag et al. 2006.

Allodynie wird als besonders belastend empfunden und tritt bei 47 bis 70 % der Patienten mit postherpetischer Neuralgie und bei 18 % der Patienten mit diabetischer Polyneuropathie auf (Jensen und Finnerup 2014). Es werden 3 Arten mechanischer Allodynie mit verschiedenen Auslösemechanismen unterschieden (Maag et al. 2006; Jensen und Finnerup 2014, S. 926):

1. Dynamische Allodynie wird durch leichte, sich bewegende Hautreize ausgelöst.
2. Punktuelle Allodynie wird durch punktuelle Hautstimulation ausgelöst (z. B. mit einem Monofilament, s. Material und Methoden)
3. Statische Allodynie wird von statischem Druck auf Haut oder tiefere Gewebe ausgelöst.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode zur Analyse der Ausprägung neuropathischer Schmerzen basiert auf der Messung punktueller mechanischer Allodynie.

1.2.3 Prävalenz

Das neuropathische Schmerzsyndrom ist weit verbreitet: 5,3 Millionen Menschen (6,5 %) leiden allein in Deutschland an chronischen Schmerzen mit neuropathischer Komponente (Ohayon und Stingl 2012). Weltweit wird die Prävalenz auf 6,9 bis 10 % geschätzt (van Hecke et al. 2014).

1.2.4 Assoziierte Erkrankungen

Eine Vielzahl an Erkrankungen und Noxen sind mit neuropathischem Schmerz assoziiert (s. Tabelle 3). Die Wahrscheinlichkeit, an neuropathischem Schmerz zu leiden, ist nicht geschlechts- oder altersspezifisch, scheint jedoch stark vom Genotyp abzuhängen (Campbell und Meyer 2006; Hehn et al. 2012).

Tabelle 3: Beispiele für Ursachen neuropathischer Schmerzen

Gruppe	Ursache der Neuropathie
Stoffwechselerkrankung	Diabetes Mellitus Hypothyreose Vitamin-B-Mangel (z. B. durch chron. Alkoholabusus)
Infektion	Herpes Zoster HIV Borreliose (Bannwarth-Syndrom)
Noxe	Chemotherapeutika Antiretrovirale Substanzen Phenytoin Thallium, Arsen, Gold
Trauma	CRPS (<i>complex regional pain syndrome</i>) Bandscheibenprolaps Amputation (Phantomschmerz)
Erblich	Dominant erbliche sensorische Neuropathie Primäre Erythromelalgie
Idiopathisch	Multiple Sklerose
Autoimmunerkrankung	Guillain-Barré-Syndrom <i>Polyarteriitis nodosa</i>
Gefäßerkrankungen	Apoplex Ischämie
Tumorerkrankungen	Multiples Myelom Paraneoplastisch

Dargestellt sind Beispiele für Erkrankungen, die neuropathische Schmerzen verursachen können. Mod. nach Maag et al. 2006; Baron et al. 2010.

Patienten mit Depressionen, Adipositas, Diabetes mellitus, Hypertension, zerebrovaskulären Erkrankungen, Erkrankungen des Nervensystems oder Erkrankungen des blutbildenden Systems haben ein höheres Risiko neuropathischen Schmerz zu entwickeln als Gesunde. In Anbetracht der steigenden Prävalenz von Adipositas und Diabetes Mellitus ist davon auszugehen, dass die Prävalenz von neuropathischem Schmerz

weltweit simultan mit diesen Erkrankungen zunehmen wird (Hall et al. 2008; Ohayon und Stingl 2012; Guariguata et al. 2014; Ng et al. 2014).

1.2.5 Verminderte Lebensqualität

Obwohl nicht letal, sind die durch das neuropathische Schmerzsyndrom entstehenden Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Betroffenen erheblich (Jensen et al. 2007; Relieving pain in America 2011). Chronischer neuropathischer Schmerz ist zudem von höherer Intensität und Dauer als andere Arten chronischen Schmerzes (Torrance et al. 2006).

Häufig mit neuropathischem Schmerz assoziierte Probleme sind schmerzbedingte Bewegungseinschränkungen, Depressionen, Ängstlichkeit, Schlafstörungen und Fatigue (Jensen et al. 2007; Relieving pain in America 2011).

1.3 Pharmakologische Therapie

Die Therapie neuropathischer Schmerzen ist aufwendig, teuer und hilft dennoch nur wenigen Patienten (Bouhassira et al. 2008; Ohayon und Stingl 2012; Moore et al. 2014). Dies liegt vor allem in der komplexen Entstehung des Schmerzes begründet (Moore et al. 2014).

Die pharmakologische Therapie ist bedeutend (Baron et al. 2010). Auf diese wird im Folgenden aufgrund der thematischen Ausrichtung der Arbeit näher eingegangen. Nichtsdestotrotz ist die multimodale Therapie unter Einbeziehung aller Therapieoptionen und der Berücksichtigung der Bedürfnisse und Wünsche des einzelnen Patienten der Goldstandard einer zeitgemäßen Schmerztherapie (Derry et al. 2014).

Aufgrund des nicht-nozizeptiven, im Nervensystem entstehenden Schmerzes wirken klassische Schmerzmedikamente oft nicht (Maag et al. 2006). Stattdessen werden, neben lang wirksamen Opioiden, eher unspezifisch wirkende Medikamente eingesetzt (s. Tabelle 4; Gilron et al. 2013).

Tabelle 4: Übersicht der bevorzugten Medikamente zur Therapie neuropathischer Schmerzen

Wirkstoffgruppe	Häufig benutzte Präparate	Haupt-Zielstruktur
Antikonvulsiva	Gabapentin	CaK
	Pregabalin	CaK
	Carbamazepin	NaK
Antidepressiva	Amitryptilin (TCA)	5HT, NAT
	Clomipramin (TCA)	NAT
	Duloxetin (SSNRI)	5HT, NAT
Langsam wirksame Opioide	Tramadol, Morphin retard,	µR
	Oxycodon retard	

Dargestellt ist eine Auswahl wichtiger Präparate der *First-Line*-Therapie neuropathischer Schmerzen. Neben der Wirkstoffgruppe werden Beispielpäparate und wichtige Zielstrukturen genannt. TCA = Trizyklische Antidepressiva, SSNRI = selektive Serotonin- und Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer, CaK = neuronale Calciumkanäle, NaK = neuronale Natriumkanäle, NAT = Noradrenalintransporter, 5HT = Serotonintransporter, µR = µ-Opioidrezeptoren. Mod. nach Baron 2012.

Problematisch ist neben den zahlreichen Nebenwirkungen vor allem die mangelnde Wirksamkeit der Medikamente (Mingorance-Le Meur et al. 2013). Als realistisches Therapieziel wird in der deutschen S1-Leitlinie „Pharmakologisch nicht interventionelle Therapie chronisch neuropathischer Schmerzen“ eine Schmerzreduktion auf einer NRS (Numerische Ratingskala) von 30-50% formuliert (Baron 2012). Die NNT (*number needed to treat*) wird für die verträglichsten Medikamente Pregabalin und Gabapentin laut einer Cochrane Metaanalyse auf 4 bis 10 geschätzt. (Wiffen et al. 2013). Die Nebenwirkungen dieser Antikonvulsiva sind Müdigkeit, Schwindel und Ödeme. Die anderen Präparate haben ein weitaus ungünstigeres Nebenwirkungsprofil (Baron 2012). Obwohl die Zielstrukturen der Medikamente größtenteils bekannt sind, ist es bisher im Einzelfall nicht möglich, festzustellen, welcher Mechanismus bei einem Patienten mit seinem Symptomkomplex und seiner Krankengeschichte derjenige ist, der die Schmerzreduktion vermittelt (Wiffen et al. 2013).

Generell ist es von großer Wichtigkeit, die Mechanismen der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen genauer zu verstehen, um bessere Therapien entwickeln zu können. Einen Überblick über die aktuelle Sichtweise gibt der folgende Abschnitt.

1.4 Pathophysiologie

Die Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen sind komplex, weil sie durch viele Mechanismen vermittelt werden. Bei unterschiedlicher Ätiologie werden gleiche Mechanismen beobachtet. Dasselbe Symptom kann wiederum durch verschiedene Mechanismen entstehen, sodass in der aktuellen Literatur der Wandel zu mechanismus- statt symptombasierter Behandlung propagiert wird (Baron et al. 2010; Nickel et al. 2012; Bouhassira und Attal 2016).

Im peripheren und zentralen Bereich des Nervensystems mancher Patienten kommt es bei Läsion oder Krankheit desselben zu pathologischer Sensibilisierung (Kehlet et al. 2006; Nickel et al. 2012).

1.4.1. Periphere Sensibilisierung

1.4.1.1 Sensibilisierung der Schmerzrezeptoren

Die Endigungen von C- und A δ -Fasern sind mit Schmerzrezeptoren ausgestattet, die je nach Typ durch Hitze, starke mechanische oder chemische Reize stimuliert werden. Diese depolarisieren die Membran und lösen nach Erreichen eines Schwellenwertes ein Aktionspotential aus, welches über das Spinalganglion der Hinterwurzel (*dorsal root ganglion*, DRG) in das Hinterhorn des Rückenmarks geleitet und dort verarbeitet wird (Julius und Basbaum 2001).

Ein prominentes Beispiel für einen Schmerzrezeptor ist der *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) aus der Familie der *transient receptor potential* Kationenkanäle. Dieser wird durch Capsaicin, Hitze und stark saure Stimuli aktiviert und in C- und A δ -Fasern exprimiert. Aktivierung, z. B. durch Capsaicin, führt zu brennendem Schmerz. Vermehrte Aktivität dieses Rezeptors erfolgt bei neuropathischen Schmerzen durch 2 Mechanismen: Die intrazellulären Signalwege werden verändert. Prostaglandin E2 aktiviert beispielsweise die Proteinkinasen A und C, was in einer Potenzierung der TRPV1-Funktion resultiert (Julius und Basbaum 2001). Außerdem werden vermehrt TRPV1 exprimiert (Hudson et al. 2001).

Nach Schädigung des Axons eines peripheren Hautnervs werden Axon und Myelinscheide abgebaut und Immunzellen, darunter Makrophagen, Neutrophile und T-Zellen, wandern ein. Proinflammatorische Zytokine, Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren (z. B.

nerve growth factor, NGF) werden freigesetzt. Die beschriebenen Veränderungen begünstigen die Entstehung von Allodynie und Hyperalgesie und können diese im Rahmen einer chronischen Entzündung aufrechterhalten (Cui et al. 2000; Sommer und Kress 2004; Moalem und Tracey 2006).

1.4.1.2 Abnormale ektope Neuronenaktivität

Abnormale ektope Aktivität afferenter Neurone produziert Positivsymptome. Spontane A β -Faseraktivität verursacht Parästhesien und Dysästhesien. Aktivität von A δ - und C-Fasern produziert hingegen brennende und stechende Schmerzempfindungen (Tal et al. 1999). Offenbar sind daran spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Na $_v$) beteiligt, die bei neuropathischem Schmerz anders ausgeprägt, verteilt und aktiv sind (Amir et al. 1999). Nach einer Nervenverletzung steigt die Zahl der Na $_v$ an der Läsionsstelle und im gesamten Axon (Woolf und Mannion 1999). Die Existenz zweier Krankheiten, die durch Mutationen dieser Na $_v$ ausgelöst werden, unterstützt diese Theorie: *Nonsense*-Mutationen des SCN9A-Gens, welches für die α -Untereinheit des Na $_v$ 1.7 kodiert, beeinträchtigen die Funktion des Kanals und führen zu angeborener vollständiger Schmerzunempfindlichkeit (Cox et al. 2006). Im Gegensatz dazu führt bei der primären autosomal-dominant vererbten Erythromelalgie eine aktivierende Punktmutation in diesem und weiteren Genen zu intermittierenden brennenden Schmerzen (Yang et al. 2004).

Auch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle sind beteiligt. So korreliert die Expression der $\alpha_2\delta$ -Untereinheit spannungsgesteuerter Kalziumkanäle im DRG mit der Entwicklung von Allodynie (Luo et al. 2001). Pregabalin und Gabapentin hemmen diese Untereinheit und vermindern so neuropathischen Schmerz (Gilron 2007; Taylor et al. 2007).

1.4.1.3 Sympathisch aufrechterhaltener Schmerz

Neuropathischer Schmerz kann auch durch das vegetative Nervensystem aufrechterhalten werden. Typischerweise wird dieser Mechanismus bei CRPS beschrieben. In Mensch und Tier sind sympathische efferente Fasern mit somatischen Afferenzen verknüpft (Nickel et al. 2012). Histologische Studien zeigten, dass diese Verknüpfungen bei neuropathischem Schmerz vermehrt stattfinden (Shinder et al. 1999). In klinischen Studien konnte eine Sympathikusblockade neuropathische Schmerzen lindern. Eine anschließende subkutane Noradrenalininjektion hob diesen schmerzlindernden Effekt wieder auf. Dies deutet auf eine direkte oder indirekte schmerz erzeugende Wirkung der sympathischen Efferenzen hin

(Torebjörk et al. 1995). Außerdem konnte die Expression von α -Adrenorezeptoren auf peripheren Nervenfasern nach Läsion nachgewiesen werden (Sato und Perl 1991). Folglich kann Exzitation der Nervenendigungen in diesem Fall durch Katecholamine erzeugt werden. Auch indirekte vasomotorische Effekte, die die Mikrozirkulation, Oxygenierung und Nährstoffversorgung beeinträchtigen, könnten den Schmerz beeinflussen (Kurvers et al. 1995).

1.4.2 Zentrale Sensibilisierung

1.4.2.1 Steigerung der Erregbarkeit

Schmerzleitende Bahnen enden im Hinterhorn des Rückenmarks an spinalen Projektionsneuronen oder Interneuronen. Die Projektionsneurone leiten die Informationen an übergeordnete Zentren weiter, z. B. den Thalamus, während in komplex verschalteten exzitatorischen und inhibitorischen Interneuronen eine präkorticale Verarbeitung erfolgt (Nickel et al. 2012).

Exzitation wird hauptsächlich über glutamaterge Synapsen vermittelt. Die erhöhte Erregbarkeit ist ein wichtiger Mechanismus der zentralen Sensibilisierung. Die Aktivierung des ionotropen α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptors (AMPA) auf Hinterhornneuronen stellt dabei die normale Antwort auf akute Schmerzreize dar (Nickel et al. 2012). Der ebenfalls ionotrope N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDAR) wird physiologischerweise von einem Magnesiumion blockiert. Nur wiederholte Depolarisation der Membran des Hinterhornneurons kann diese Blockade lösen und zu verlängerter und gesteigerter Depolarisation der Membran führen, einem Zustand, der auch als *wind-up* bezeichnet wird (Dickenson und Sullivan 1987). Der Kalziumioneneinstrom kann darüber hinaus durch Veränderungen der intrazellulären Signalkaskaden eine Langzeitpotenzierung (LTP) des Schmerzsignals bewirken (D'Mello und Dickenson 2008).

Das Milieu der Neurone spielt ebenfalls eine wichtige Rolle. Mikrogliazellen im Hinterhorn werden bei peripheren Nervenläsionen aktiviert und schütten Mediatoren aus. Darunter sind proinflammatorische Zyto- und Chemokine, welche die Erregbarkeit der Neurone steigern (Tsuda et al. 2005). Auch Astrozyten sind an der Aufrechterhaltung neuropathischen Schmerzes beteiligt (Kawasaki et al. 2008).

1.4.2.2 Disinhibition

Neben der verstärkten Erregbarkeit ist der Ausfall hemmender Strukturen ein wichtiger Mechanismus der zentralen Sensibilisierung, der als Disinhibition bezeichnet wird (Hehn et al. 2012). In das Hinterhorn des Rückenmarks führen auch A β -Fasern, welche in physiologischem Zustand die schnelle Empfindung leichter Berührungen vermitteln. Bei chronischen Schmerzzuständen kommt es zur Reduktion der Aktivität hemmender, Glycin- und GABA-vermittelter synaptischer Transmission (Zeilhofer 2008). Durch Reduktion dieser in den *Laminae* II und III des Hinterhorns werden auch nicht-schmerzhafte Reize über die Schmerzbahn weitergeleitet (Baba et al. 2003; Vandenberg et al. 2014). So entsteht das Symptom Allodynie (s. Abb. 1).

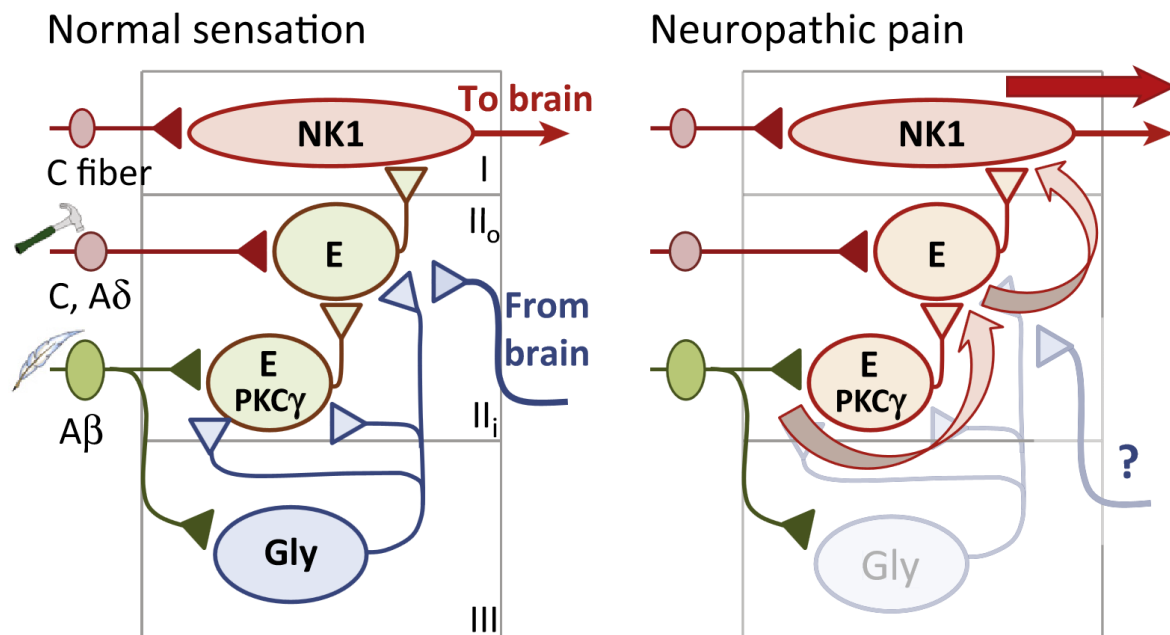


Abb. 1: Schema: Schmerzleitung im Hinterhorn des Rückenmarks

Schmerz- und nicht-schmerzleitende Bahnen im Hinterhorn des Rückenmarks werden dargestellt. Unter physiologischen Bedingungen laufen sensorische A β -Afferenzen (leichte Berührung) an exzitatorischen Interneuronen (E, grüne Zellen) in Lamina II und glycinergen Interneuronen (Gly, blaue Zellen) in *Lamina* III zusammen. Gleichzeitige Aktivierung der glycinergen Interneurone führt zu einer starken Vorwärtshemmung der exzitatorischen Interneurone in *Lamina* II. Dieser Mechanismus verhindert, dass nicht schmerzhafte sensorische Informationen die schmerzleitenden Neurone in *Lamina* I (rote Zelle) erreichen. Ausfall dieser Vorwärtshemmung durch periphere Nervenläsion oder pharmakologische Glycinrezeptor (GlyR)-Inhibition führt zu Aktivierung der Neurone in *Lamina* I durch nicht schmerzhafte sensorische Informationen. Leichte Berührungen werden dann als schmerzhaft empfunden (Allodynie). Mod. nach Vandenberg et al. 2014.

Die exzitatorischen Interneurone in *Lamina* II werden auch von absteigenden Bahnen gehemmt, deren Ursprünge unter anderem im periaquäduktalen Grau, den Raphe-Kernen, dem *Locus coeruleus* und dem *Nucleus ventromedialis* der *Medulla oblongata* liegen (Nickel

et al. 2012). Nach peripherer Nervenläsion sterben in Letzterem bis zu 25 % der Neurone des ipsilateralen Gebiets. Verhindert man diese Apoptose, reduziert dies die Überempfindlichkeit gegenüber Schmerz (Leong et al. 2011). Andere Studien konnten hingegen zeigen, dass Allodynie und Hyperalgesie auch ohne den Untergang glycinер Neurone entstehen können (Hermanns et al. 2009). Auf den Mechanismen der Disinhibition beruht auch die Wirksamkeit zentral wirksamer Substanzen, beispielsweise selektiver Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren (SSNRI), welche absteigende Bahnen aktivieren (Nickel et al. 2012).

1.4.2.3 Zentrale Reorganisation

Neuropathischer Schmerz führt auch zu kortikaler und subkortikaler Reorganisation der Schmerzverarbeitung. Durch funktionelle Magnetresonanztomographie konnte gezeigt werden, dass bei chronischem Schmerz die kortikalen und subkortikalen Aktivitätsmuster verändert werden. So zeigte sich über verschiedenste chronische Schmerztypen hinweg, dass vermehrt Regionen aktiv waren, die für emotionale und motivationale Impulse zuständig sind. Dies führt wiederum zu veränderter Bewertung des Schmerzes und kann Lernprozesse verursachen, die chronischen Schmerz aufrechterhalten. Außerdem kann jede tieferliegende Ebene, beispielsweise das Hinterhorn des Rückenmarks, durch diese Veränderungen beeinflusst werden (Apkarian et al. 2011).

1.5 Glycinerge Neurotransmission

Glycin ist einer der wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter in den kaudalen Regionen des zentralen Nervensystems von erwachsenen Säugetieren. Nach der Ausschüttung aus präsynaptischen Endigungen bindet Glycin an Strychnin-sensitive Glycinrezeptoren (GlyR), die sich zahlreich in der postsynaptischen Membran der Zielzelle befinden. Dies bewirkt die Öffnung des im GlyR integrierten Anionenkanals und führt zu einem Einstrom von Chloridionen in das postsynaptische Zytoplasma. Die daraus resultierende Hyperpolarisation der Zellmembran erhöht den Schwellenwert für Aktionspotentiale und inhibiert so das postsynaptische Neuron (Legendre 2001).

Glycin ist außerdem bedeutend für glutamaterge exzitatorische Neurotransmission. So ist es neben D-Serin ein essentieller Koagonist von Glutamat (Johnson und Ascher 1987; Eulenburg et al. 2005).

1.5.1 Glycintransporter

Eine schnelle Entfernung des Neurotransmitters aus dem synaptischen Spalt, sog. *Clearance*, und die Wiederaufnahme desselben in die präsynaptischen Vesikel ist Voraussetzung für effiziente hochfrequente Neurotransmission. Glycin wird durch Diffusion und zwei Glycin-Transporter (GlyT1, GlyT2) wiederaufgenommen, welche zur Klasse der Natrium-/Chlorid-abhängigen Transportproteine gehören. Ihre Aktivität ist energetisch an den transmembranären Natriumgradienten gekoppelt, der von der Natrium-Kalium-ATPase aufrechterhalten wird (Eulenburg et al. 2005).

GlyT1 und GlyT2 haben unterschiedliche Funktionen und Lokalisationen (s. Abb. 2).

Der GlyT1 ist auf Astrozyten und nicht-glycinergen Endigungen von Neuronen lokalisiert (Vandenberg et al. 2014; Romei und Raiteri 2016). Er ist ein $2 \text{ Na}^+/\text{Cl}^-/\text{Glycin}$ -Kotransporter und beteiligt an der Glycin-*Clearance* inhibitorischer Synapsen (Roux und Supplisson 2000). An exzitatorischen Synapsen kontrolliert GlyT1 den Glycinspiegel und somit indirekt die NMDAR-Aktivität (Supplisson und Bergman 1997; Roux und Supplisson 2000).

Der GlyT2 ist ein an der präsynaptischen Membran glycinерger Synapsen und deren Vesikelmembranen lokalisierter $3 \text{ Na}^+/\text{Cl}^-/\text{Glycin}$ -Kotransporter. So kann der GlyT2 unter physiologischen Bedingungen einen stärkeren Glycingradienten erzeugen als der GlyT1 (Roux und Supplisson 2000). Die Funktion des GlyT2 ist auf inhibitorische Synapsen beschränkt und bewirkt die präsynaptische Wiederaufnahme des ausgeschütteten Glycins und eine Befüllung der Vesikel (Eulenburg et al. 2005).

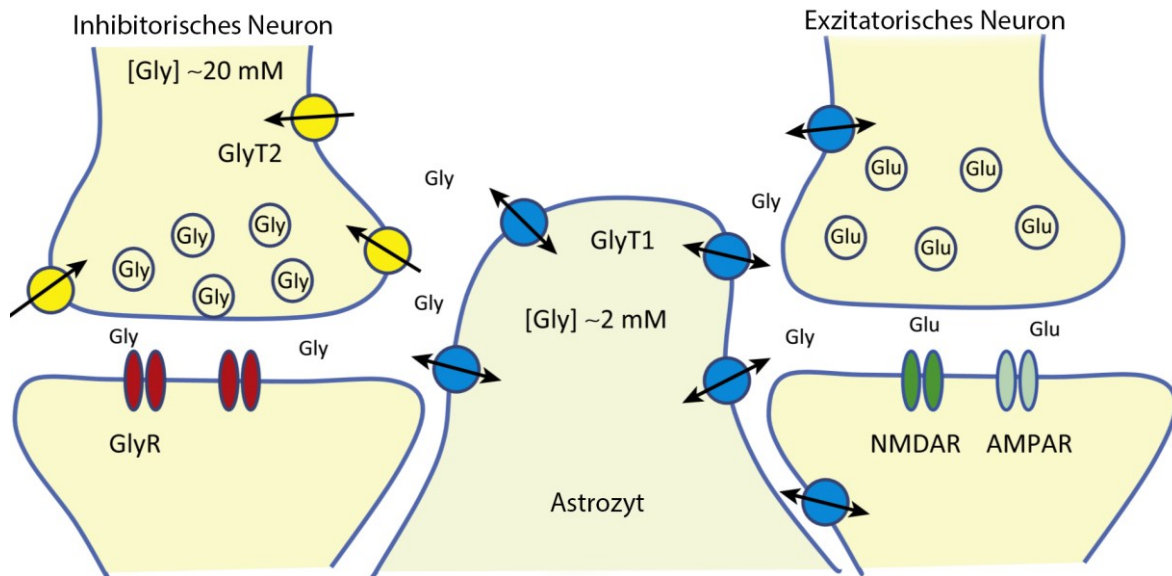


Abb. 2: Schematische Darstellung glycinergen Neurotransmission

Schematisch dargestellt sind eine ex- und eine inhibitorische Synapse mit den für die glycinerge Neurotransmission wichtigen Strukturen. An inhibitorischen Synapsen werden die hohen intrazellulären präsynaptischen Glycinkonzentrationen durch den GlyT2 aufrechterhalten. Nach Ausschüttung von Glycin und Aktivierung von postsynaptischen GlyR wird Glycin durch Diffusion und die beiden GlyT aus dem synaptischen Spalt entfernt. Der GlyT2 vermittelt die präsynaptische Wiederaufnahme sowie die Regeneration der Vesikel. Der GlyT1 ist an Astrozyten und an glutamatergen Neuronen lokalisiert. An exzitatorischen Synapsen werden die extrazellulären Glycinkonzentrationen durch den GlyT1 nahe der Gleichgewichtskonzentration gehalten. So wird die Aktivität des NMDAR moduliert. Glycin kann auch zwischen ex- und inhibitorischen Synapsen diffundieren. Mod. nach Vandenberg et al. 2014.

1.5.2 Glycintransporter 1-Inhibition

Inhibition des GlyT1 verringert folglich die *Glycinclearance*. Glycin verbleibt länger im synaptischen Spalt und verändert die Signale beider Synapsentypen: An inhibitorischen Synapsen verlängert dies über verlängerte GlyR-Aktivität die inhibitorische Wirkung auf die Postsynapse. Diese kann die bei neuropathischem Schmerz verringerte inhibitorische Aktivität wieder normalisieren und so Schmerzen lindern (Harvey und Yee 2013; Werdehausen et al. 2015). An exzitatorischen Synapsen verstärkt ein höherer Glycinspiegel hingegen die Aktivität von NMDAR. Dies kann zentrale Sensibilisierung fördern und zur Aufrechterhaltung von neuropathischem Schmerz beitragen (Hehn et al. 2012; Nickel et al. 2012).

Anwendung von ALX 5407, einem GlyT1-Inhibitor, deutet darauf hin, dass genau das geschieht. ALX 5407 zeigt ein untypisches pharmakologisches Profil: Geringe und hohe Dosierungen wirken schmerzlindernd, während mittlere Konzentrationen schmerzverstärkend wirken. Dies deutet auf ein Überwiegen der NMDAR-Aktivität in

mittleren Dosierungen hin (Vandenberg et al. 2014). Zudem wurde eine Verzögerung des Wirkeintritts von GlyT1-Inhibitoren von bis zu 4 Tagen beschrieben. Durch Blockade der Glycinbindungsstelle am NMDAR trat keine Verzögerung mehr auf und die Wirkung potenzierte sich (Morita et al. 2008). Die Wirkung von GlyT1-Inhibitoren ist folglich dosisabhängig, da die Dosis das Gleichgewicht zwischen in- und exzitatorischer Neurotransmission bestimmt (Hermanns et al. 2011; Vandenberg et al. 2014).

Dysfunktion des NMDAR spielt bei der Entstehung der Schizophrenie eine bedeutende Rolle (Moghaddam 2003). Da NMDAR-Aktivierung durch direkte Agonisten Übererregbarkeit und mögliche weitere schwere Nebenwirkungen wie Krampfanfälle zeigte, wurde die Entwicklung und Erforschung klinisch anwendbarer GlyT1-Inhibitoren maßgeblich vorangetrieben. Dies führte zu einer Vielzahl neuer GlyT1-Inhibitoren (Porter und Dawson 2015).

1.5.3 Bitopertin

Bitopertin ist der klinisch erprobteste GlyT1-Inhibitor seiner Generation (Porter und Dawson 2015) und könnte als solcher neuropathische Schmerzen lindern (Harvey und Yee 2013). Hauptgrund für die Entwicklung von Bitopertin war die Suche nach neuen pharmakologischen Therapien gegen Schizophreniesymptome, welche durch die Regulation der NMDAR-Aktivität vermindert werden können. Eine Phase II *Proof-of-concept*-Studie an 323 Patienten mit Schizophrenie zeigte neben einem moderaten Effekt auf Schizophreniesymptome die generell gute Verträglichkeit von Bitopertin. Als Nebenwirkungen wurden lediglich Schläfrigkeit, Schwindel, Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit und ein milder Abfall der Hämoglobinkonzentration im Blut festgestellt (Umbricht et al. 2014). Die durch diese Ergebnisse gesteigerte Wahrscheinlichkeit einer klinischen Anwendung machte Experimente zur möglichen Wirksamkeit von Bitopertin gegen neuropathischen Schmerz zusätzlich reizvoll.

Zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit existierten keine Studien, die den Effekt von Bitopertin auf neuropathischen Schmerz, oder Schmerz allgemein, untersuchten (Suchbegriff „Pain AND Bitopertin“ auf <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>, zuletzt überprüft am 17.11.2017).

Bitopertin ist ein von der Fa. Hoffmann-La Roche Ltd. (Basel, Schweiz) entwickelter, hoch selektiver GlyT1-Inhibitor. Der systemische Name der Substanz lautet: {4-[3-fluoro-5-(trifluoromethyl)pyridin-2-yl]piperazin-1-yl}{5-(methysulfonyl)-2-[(1S)-2,2,2-trifluoro-1-methylethoxy]phenyl}methanon.

Es handelt sich um ein Benzoylpiperazinderivat mit der Summenformel $C_{21}H_{20}F_7N_3O_4S$, und der daraus resultierenden molaren Masse 543,456 g/mol (Pinard et al. 2010; s. Abb. 3) Bitopertin ist ein reversibler, nicht-kompetitiver Inhibitor des GlyT1 (Alberati et al. 2012).

Durch die hohe Potenz und die reversible Bindungseigenschaft in Kombination mit der hohen Selektivität für den GlyT1 hat Bitopertin mutmaßlich Vorteile gegenüber GlyT1-inhibitoren der vorangegangenen Generationen. Das ältere Präparat ALX 5407, ein selektiver und potenter GlyT1-Inhibitor, hemmt GlyT1 beispielsweise irreversibel und löst bei Bolusgabe motorische Nebenwirkungen aus (Atkinson et al. 2001; Barthel et al. 2014).

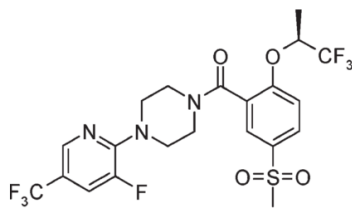


Abb. 3: Strukturformel von Bitopertin

Strukturdarstellung entnommen aus Pinard et al. 2010. Copyright © 2010, American Chemical Society.

1.6 Ziele der Arbeit

Diese Arbeit widmet sich erstmals der möglichen pharmakologischen Linderung neuropathischer Schmerzen durch den klinisch erprobten GlyT1-Inhibitor Bitopertin.

Vor dem Hintergrund des oben dargestellten Bedarfes an neuen wirksamen Therapien neuropathischer Schmerzen und aufbauend auf den bisherigen in der Arbeitsgruppe durchgeführten Untersuchungen (Werdehausen et al. 2012; Barthel et al. 2014; Werdehausen et al. 2015) entstand folgende Fragenstellung:

1. Kann Bitopertin bei experimentell induzierten, neuropathischen Schmerzen zu einer Reduktion der hiermit verbundenen mechanischen Allodynie führen?
2. Welche Dosierungen sind dafür erforderlich?

Der methodische Ansatz basiert auf einem randomisierten und kontrollierten Studiendesign. Die Untersuchungen erfolgten im etablierten Modell der *chronic constriction injury* an männlichen Wistar-Ratten. Es wurde die Intervention im Sinne der Bitopertingabe gegen die Vehikelkontrollgruppe getestet. Messgröße war der Grad der Allodynie.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW genehmigt (AZ 84-02.04.2015.A055). Die Durchführung erfolgte durch den Autor nach Erwerb eines Fachkundenachweises für Versuchstierkunde gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes und unter Supervision einer projektverantwortlichen Person. Für die Versuche wurden 102 adulte, männliche Auszucht-Wistar-Ratten der hiesigen Zucht (Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT), Universitätsklinikum Düsseldorf) und eines kommerziellen Anbieters (Janvier Labs, Saint-Berthevin, Frankreich) bezogen. Die Tiere wurden ausschließlich in Polykarbonat-Einzelkäfigen vom Typ III mit 810 cm² Grundfläche unter klimatisierten Bedingungen gehalten (Raumtemperatur 22 ± 2 °C, relative Luftfeuchtigkeit 50 ± 5 %, Luftumwälzrate 16–20-mal pro Stunde). Entkeimtes Weichholzgranulat (Fa. Rettenmaier & Söhne GmbH u. Co KG, Rosenberg) wurde als Einstreu verwendet und zweimal wöchentlich gewechselt. Futter (Futtermittel für Ratten und Mäuse, Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und entkeimtes Trinkwasser (ozonisiert und mit HCl angesäuert) wurden *ad libitum* angeboten. Die Beleuchtung im 12-Stunden Tag-Nacht-Zyklus erfolgte mit weißem Kunstlicht in einer Intensität von 300–320 Lux. Alle Verhaltenstests wurden in der Lichtphase durchgeführt.

Die verwendeten Tiere wogen zum Zeitpunkt der Operation im Mittel 247,1 g (SD 30,3 g). Für die Versuche wurden ausschließlich Tiere ohne Anzeichen von Erkrankungen oder Fehlbildungen ausgewählt.

2.2 Operative Methoden

2.2.1 Perioperative Maßnahmen

Vor jeder Operation wurden die Tiere einer allgemeinen Untersuchung unterzogen und gewogen. Die Narkose erfolgte durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg KG (Körpergewicht) Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland). Im Anschluss wurden der linke Oberschenkel sowie die Hüft- und Kniebereiche rasiert.

Unmittelbar vor der OP wurde der rasierte Bereich desinfiziert. Es erfolgte eine Versorgung mit Augengel (Vidisic Augengel, Dr. Mann Pharma, Berlin, Deutschland), um etwaige Hornhautschäden zu verhindern.

Nach der Operation erfolgte die Substitution von 5 ml 0,9%iger NaCl-Lösung durch subkutane Injektion. Die Tiere wurden bis zum Erwachen (ca. 30 bis 60 min) auf Wärmematten gelegt, um ein Auskühlen zu verhindern.

Eine genaue Untersuchung der Tiere fand 4 und 24 Stunden nach der OP statt. Wachheit, Spontanmotorik, Atmungsaktivität, Wundverhältnisse und Gliedmaßen wurden zu diesen Zeitpunkten genau untersucht und beurteilt. Dies diente dazu, Lähmungen, Atemdepressionen, Autotomien und andere Auffälligkeiten festzustellen.

2.2.2 Chronic Constriction Injury

Um die für die Versuche benötigte periphere chronische Mononeuropathie zu erzeugen, wurde die *chronic constiction injury*-Methode (CCI) verwendet. Es handelt sich dabei um ein etabliertes Modell zur Erforschung neuropathischer Schmerzen (Cui et al. 2000), welches erstmalig von Bennett und Xie beschrieben wurde (1988). Auch in unserer Klinik ist das Modell schon seit Jahren etabliert (Hermanns et al. 2008; Brandenburger et al. 2012; Barthel et al. 2014; Neumann et al. 2015; Schlosser et al. 2015; Werdehausen et al. 2015). Es wurde ausschließlich die linke Seite operiert.

Der Operateur platzierte das Tier auf die rechte Körperseite und legte durch Ertasten eine gedachte Linie zw. *Patella* und *Tuber ischiadicum* fest. Auf dieser nahezu parallel zum *Femur* verlaufenden Linie wurde die Haut auf einer Strecke von ca. 2 cm *craniocaudal* inzidiert. Danach erfolgte eine stumpfe Präparation durch den *M. biceps femoris* bis der *N. ischiadicus* dargestellt werden konnte.

Nach berührungsfreier Präparation des *N. ischiadicus* aus dem umgebenden Bindegewebe wurde dieser mit einer feinen, gebogenen, Pinzette angehoben. Vier einfache Ligaturen wurden proximal der Trifurkation des Nerven mit Catgut®-Fäden (Gottfried Vömel, Kronberg, Deutschland) angelegt (s. Abb. 4). Die Ligaturen wurden jeweils soweit festgezogen, dass eine locker anliegende Ligatur entstand, wobei es in der Regel zu einer sichtbaren motorischen Reizantwort kam. Die Muskelbäuche wurden mit 2 bis 3 Vicrylfaden-

Einzelnähten (3-0) verbunden. Die Haut wurde mit 3 bis 4 Hautklammern (MikRon® AutoClip® 9 mm, Becton Dickinson Sparks, MD, USA) verschlossen. Abschließend erfolgte eine Lokalanästhesie mit 3 mg/kg KG Ropivacain 0,2 % (Naropin®, AstraZeneca, Wedel, Deutschland).

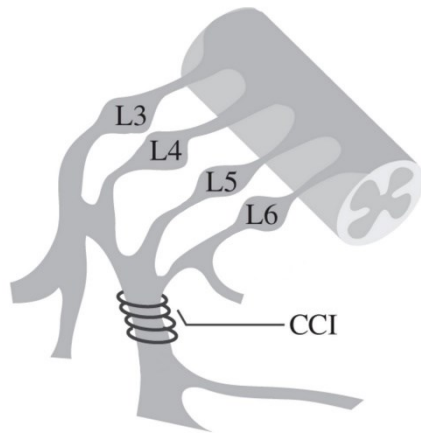


Abb. 4: Schema der Operationsmethode *Chronic Constriction Injury*

Die schwarzen mit CCI bezeichneten Kreise stellen die 4 losen Ligaturen um den *N. ischiadicus* der Ratte dar. Die Spinalganglien der linken Seite sind mit L3 bis L6 bezeichnet. Abb. mod. nach Starowicz und Przewlocka 2012.

2.2.3 Sham-Operation

Im Unterschied zur CCI-OP wurden im Falle einer *Sham*-OP keine Ligaturen angelegt. Alle anderen Schritte waren identisch zu den im Abschnitt 2.2.2 dargestellten.

2.3 Substanzen

2.3.1 Bitopertin (RG 1678)

Das für die im folgenden beschriebenen Versuche verwendete Bitopertin (Kat. Nr.: HY-10809) wurde von der Firma Hycultec GmbH (Beutelsbach, Deutschland) bezogen. Für die Stammlösung wurden 50 mg Bitopertin in 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei -18 °C gelagert. Die getesteten Dosen 0,3; 1 und 3 mg/kg KG wurden aufgrund vorangehender Studien von Alberati et al. ausgewählt, welche im Rahmen der pharmakologischen Charakterisierung für die Verwendung als Antipsychotikum durchgeführt wurden (Alberati et al. 2012).

2.3.2 Polysorbat 80

Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monooleat wurde als Emulgator verwendet. Benutzt wurde ausschließlich 0,3%iges Polysorbat 80 in H₂O, welches mit NaOH auf einen pH von 6,4 eingestellt wurde.

2.3.3 Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (Sigma, 99,9 % pur, D8418) wurde aufgrund der Herstellerempfehlung als Lösungsmittel von Bitopertin benutzt. Es wirkt, topisch angewandt, in hohen Konzentrationen (70–90 %) analgetisch und antiphlogistisch (Evans et al. 1993; Amslinger 2017). Der analgetische Effekt ist unter anderem durch eine C-Faserblockade zu erklären (Evans et al. 1993). Um mögliche störende Einflüsse auf die Experimente zu vermeiden, wurden die Konzentrationen kritisch überprüft. Diese lagen mit maximal 2 % des Gesamtapplikationsvolumens deutlich unter den als wirksam beschriebenen Konzentrationen (Evans et al. 1993). Ebenfalls führte die orale Applikationsform mutmaßlich zu weit geringeren Konzentrationen im Interstitium, sodass eine dadurch hervorgerufene Beeinflussung der Messergebnisse hochgradig unwahrscheinlich erschien.

2.4 Applikationslösungen

Die Zubereitung der Applikationslösungen erfolgte 30 Minuten vor Versuchsbeginn in 15 ml *BD Falcon™ Conical Tubes* (Bedford, CA, USA). Nach der Herstellung und unmittelbar vor der Applikation wurden die Lösungen mit einem Vortexmischer gründlich durchmischt. Die Lösung wurde so zusammengesetzt, dass jedes Tier, unabhängig von der Bitopertin- bzw. Placebokonzentration, 3 ml Lösung/kg KG erhielt (s. Tabelle 5). So konnte die Einhaltung der empfohlenen Maximalvolumina der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) sichergestellt werden (Hack et al. 2010).

Tabelle 5: Zusammensetzung der Applikationslösungen

Bitopertindosis [mg/kg KG]	Stammlösung [μl/kg KG]	Polysorbat 80 [μl/kg KG]
0,3	6	2994
1	20	2980
3	60	2940

Benötigte Volumina der Bitopertinstamm- und 0,3%igen Polysorbat 80-Lösung, um Applikationslösungen mit den in der linken Spalte aufgeführten Bitopertindosen herzustellen. KG = Körpergewicht.

Die Kontrollgruppe erhielt statt der Bitopertin-Stammlösung reines DMSO in gleicher Menge. Die Gesamtvolumina der applizierten Bitopertin- bzw. Vehikellösungen waren folglich identisch.

2.5 Orale Applikation

Die orale Applikation erfolgte mit einer handelsüblichen 1- oder 3 ml-Spritze und einer gebogenen, stumpfen, Knopfkanüle. Nach dem Wiegen des Versuchstieres wurden 3 ml/kg KG der Bitopertin- bzw. Vehikellösung in die Spritze aufgezogen und oral appliziert. Dafür wurde das Tier mit einer Hand fixiert und die Applikationslösung mit der anderen Hand appliziert. Während des gesamten Testvorgangs war der Untersucher bezüglich der randomisierten Zuordnung zu den Gruppen verblindet.

2.6 Verhaltenstestung

2.6.1 Rahmenbedingungen und Allgemeines zur Testung

Die Verhaltenstestung der Tiere erforderte kontrollierte und gleichbleibende Rahmenbedingungen, um eine mögliche Verhaltensbeeinflussung der Tiere zu minimieren. Dazu gehörten ein ruhiges Umfeld und immer gleiche Lichtbedingungen. In speziellen Testboxen (Ugo Basile, Varese, Italien, Kat. Nr. 37000) konnten 6 Tiere parallel getestet werden (s. Abb. 5). Es erfolgte außerdem ein Sichtschutz in Richtung der Testperson und der benachbarten Tiere. Pro Tier und Zeitpunkt wurden mindestens 3 Messungen vorgenommen. Vor Beginn der Messungen erhielten die Tiere 30 Minuten Eingewöhnungszeit in den Testboxen, da agitierte Tiere keine verwertbaren Messungen

ermöglichten. Zwischen den Messungen wurde für mindestens 5 Minuten keine Simulation der gleichen Pfote vorgenommen. Dies sollte Gewöhnungseffekte vermeiden. Während der Testung wurden die Tiere genau beobachtet, um ungewöhnliches Verhalten, beispielsweise Atemdepressionen, als mögliche Nebenwirkung protokollieren zu können.



Abb. 5: Aufbau der Testboxen mit *Dynamic Plantar Aesthesiometer*®

Die 6 Plexiglasboxen (je 20 x 20 x 14 (Höhe) cm) waren so angeordnet, dass konsekutiv 6 Tiere getestet werden konnten.

2.6.2 Mechanische Allodynie

Die Messung der mechanischen Allodynie erfolgte mittels eines *Dynamic Plantar Aesthesiometers*® (Ugo Basile, Varese, Italien, Kat. Nr. 37400) (s. Abb. 6). Eine einzelne

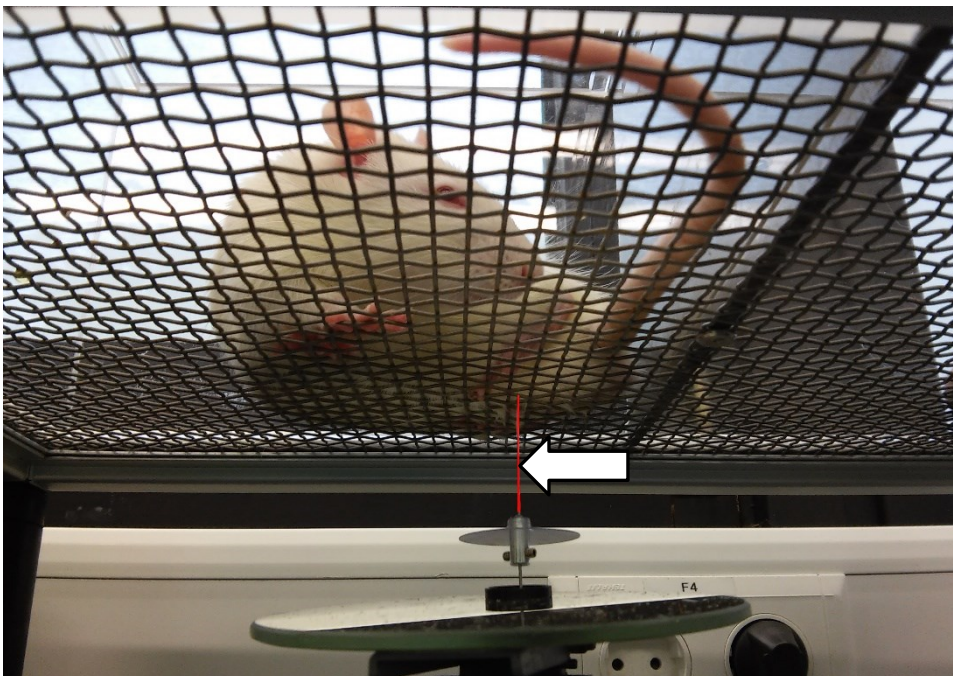


Abb. 6: Messung mit dem *Dynamic Plantar Aesthesiometer*®

Das zu testende Tier befindet sich in einer Plexiglasbox auf Drahtgitterboden. Unter dem Boden befindet sich das *Dynamic Plantar Aesthesiometer*®. Per Spiegel kann das von-Frey-Filament (rot hervorgehoben, s. Pfeil) genau unter der standardisierten Teststelle an der linken Pfote der Ratte platziert werden.

Messung bestand dabei aus der Stimulation der linken Hinterpfote des Tieres mit einem stumpfen von Frey-Filament (Frey 1896) mit einem Durchmesser von 0,5 mm.

Der Beginn der Messung wurde vom Untersucher per Knopfdruck ausgelöst. Das von Frey-Filament wurde dann mit ansteigender Kraft senkrecht auf die Teststelle gedrückt. Die Kraft stieg zunächst in Rampenform über 20 s auf den Maximalwert von 50 g an und verblieb dann auf diesem Plateau. Sobald das Tier die Pfote zurückzog, stoppte die Zeitmessung. Der ermittelte Wert in Sekunden entspricht der Pfotenrückzugslatenz (*Paw withdrawal latency*, PWL). Der ermittelte Wert in Gramm entspricht dem Pfotenrückzugsschwellenwert (*Paw withdrawal threshold*, PWT). Die Messung wurde außerdem beendet, wenn das Tier seine Pfote nach 40 Sekunden nicht zurückzog oder abgebrochen, wenn das Tier offensichtlich auf einen anderen Umweltreiz reagierte. Während der Untersuchung war dem Tier das Anheben der Pfote uneingeschränkt möglich. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde die Teststelle standardisiert (s. Abb. 7). Ein erniedrigter PWT wurde als Symptom einer mechanischen Allodynie interpretiert, wohingegen eine Steigerung im zeitlichen Verlauf als Linderung der Allodynie interpretiert wurde.



Abb. 7: Linke Hinterpfote einer Ratte

Rote Markierung: Bereich zur Durchführung der Stimulation auf der Plantarseite der Hinterpfote. Abb. mod. nach Pogatzki et al. 2002.

2.7 Versuchsaufbau

Alle Operationen und Testungen erfolgten in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Jedes Tier wurde vor der CCI- oder *Sham*-Operation einer Testung mit einem *Dynamic Plantar Aesthesiometer*® unterzogen. Nach der Operation wurde ein Zeitraum von 11–15

Tagen zur Ausbildung einer Mononeuropathie gewährt. Die nächste Testung erfolgte einen Tag vor der Applikation der Testsubstanzen. Tiere, die keinen messbaren neuropathischen Schmerz zeigten, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen. Es folgte die Applikation der Bitopertin- oder Vehikellösung am 12.–16. Tag nach CCI. Die Tiere wurden danach in die Testboxen gesetzt und 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden *post-applicationem* Verhaltensuntersuchungen unterzogen. Anschließend wurden die Tiere getötet (600 mg/kg KG Pentobarbital-Natrium i. p.). Der Versuchsablauf ist in Abb. 8 dargestellt.

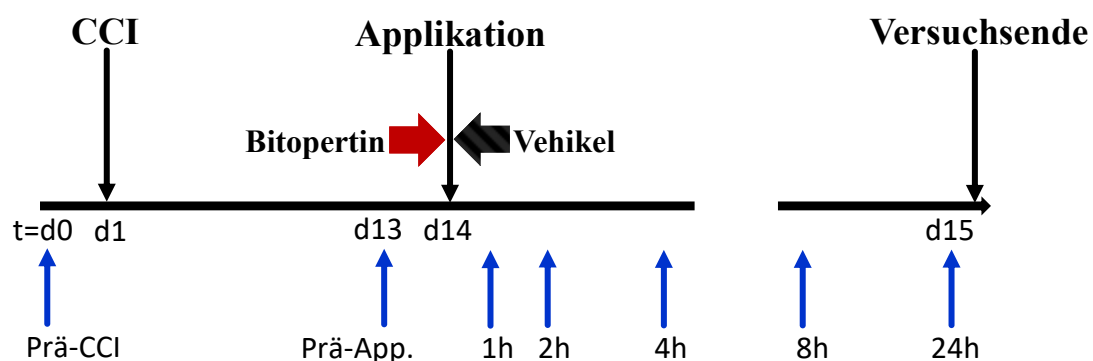


Abb. 8: Schema des Versuchsablaufs

Es wird der zeitliche Verlauf der Versuche dargestellt. Die blauen Pfeile markieren die Zeitpunkte der Verhaltenstestung mit dem *Dynamic Plantar Aesthesiometer*®. Der horizontal verlaufende, nicht maßstabgetreue, Zeitstrahl wurde mit der Anzahl der Tage nach der *chronic-constriction-injury*-Operation (CCI) beschriftet, wobei t=d0 (Prä-CCI) den Tag vor der Operation bezeichnet. „Prä-App.“ bezeichnet den Zeitpunkt vor der Applikation der Testlösungen. Die Zeiten bis zur Applikation variierten zwischen 11 und 15 Tagen. Hier ist exemplarisch der 14. Tag dargestellt.

Die Tiere wurden einer von insgesamt 8 Gruppen zugeteilt. Die Randomisierung erfolgte auf Grund des Pilotversuchscharakters dabei für jede Dosierung einzeln. Zuerst wurde die Dosis 1 mg/kg KG, dann 3 mg/kg KG, dann 0,3 mg/kg KG getestet. Es erfolgte keine erneute Randomisierung nach der Prä-Applikationstestung, was die unterschiedlichen Gruppengrößen erklärt. Insgesamt wurden 6 Gruppen der CCI-Operation unterzogen, zwei weitere der *Sham*-OP (s. Tabelle 6).

Tabelle 6: Systematik der Versuchsgruppen mit Tierzahlen

Gruppe	OP-Art	Applikationslösung [/kg KG]	Anzahl in der Statistik
1	<i>Sham</i>	Bitopertin [1 mg]	4
2	<i>Sham</i>	Placebo [20 µl DMSO]	4
3	CCI	Bitopertin [1 mg]	13
4	CCI	Placebo [20 µl DMSO]	6
5	CCI	Bitopertin [3 mg]	12
6	CCI	Placebo [60 µl DMSO]	9
7	CCI	Bitopertin [0,3 mg]	9
8	CCI	Placebo [6 µl DMSO]	11
Gesamt			68

8 Versuchsgruppen wurden unterschieden. Dargestellt ist eine Versuchsgruppe pro Zeile, mit Angabe der durchgeführten OP (CCI = *chronic constriction injury*, Sham = Schein-OP, keine Ligaturen des Nerven), der Dosierung der Applikationslösung und der Anzahl der Tiere, welche in die Statistik aufgenommen wurden. KG = Körpergewicht; DMSO = Dimethylsulfoxid.

2.8 Statistische Auswertung und grafische Darstellung der Ergebnisse

Die statistischen Analysen erfolgten mit dem Statistikprogramm *Prism 6.01 for Windows* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

Alle Daten der Verhaltensuntersuchungen sind, falls nicht anders angegeben, als Mittelwert $\pm$ Standardfehler (SE) abgebildet. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Das Signifikanzniveau wurde nach der Bonferroni-Methode korrigiert.

Für den Vergleich der mittleren PWT vor und nach der CCI-OP wurde ein gepaarter Zweistichproben-t-Test durchgeführt.

P-Werte kleiner als 0,05 wurden als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1 Vorbemerkungen

Für die Verhaltensuntersuchungen wurden 102 Tiere operiert. 8 Tiere wurden der *Sham*-OP und 94 Tiere der CCI-OP unterzogen.

In die Statistik konnten 68 Tiere aufgenommen werden. Von den exkludierten 34 Tieren schieden 9 Tiere aufgrund von Autotomie, OP-Komplikationen oder Applikationskomplikationen aus. 18 Tiere entwickelten keine Neuropathie und wurden somit ebenfalls nicht in die Auswertung aufgenommen. 7 weitere Tiere wurden aufgrund übermäßiger Agitation und der daraus resultierenden eingeschränkten Aussagekraft der Verhaltenstestungen exkludiert (Am Tag der Applikation je 1 Tier aus der 3 mg/kg und 1 mg/kg Bitopertingruppe, nach den Verhaltenstestungen 5 Tiere, davon 3 Tiere aus der Vehikelgruppe und 2 Tiere aus der 0,3 mg/kg Bitopertingruppe).

Als statistische, ungerichtete Hypothesen wurden formuliert:

- Nullhypothese: Der Pfotenrückzugsschwellenwert bleibt nach Applikation von 0,3; 1; 3 mg/kg KG Bitopertin 1, 2, 4, 8 und 24 h nach Applikation gleich.
- Alternativhypothese: Der Pfotenrückzugsschwellenwert verändert sich nach Applikation von 0,3; 1; 3 mg/kg KG Bitopertin 1, 2, 4, 8 und 24 h nach Applikation.

3.2 Entstehung mechanischer Allodynie

11 bis 15 Tage nach der CCI-OP war der PWT der linken Pfote im Vergleich zur präoperativen Kontrolle signifikant verringert ($46,4 \pm 0,4$ g vs. $25,2 \pm 0,8$ g, $p < 0,0001$). Somit führte die CCI-OP zu einer deutlichen Ausprägung der mechanischen Allodynie.

3.3 Effekt der Applikation von Bitopertin auf die mechanische Reizantwort der linken Hinterpfote

Es wurden 3 verschiedene Dosierungen (0,3; 1; 3 mg/kg KG) von Bitopertin appliziert. Messungen der mechanischen Allodynie erfolgten vor der OP, vor und 1, 2, 4, 8 und 24 h nach der Applikation. Verglichen wurden die PWT der Behandlungsgruppen jeweils mit jenen, die das Vehikel DMSO/Polysorbat erhielten. Es konnten durch die

Verhaltensbeobachtungen keine unerwünschten Arzneimittelwirkungen festgestellt werden.

3.3.1 Pfotenrückzugsschwellenwerte nach Applikation von 0,3 mg/kg Bitopertin

Bei der Dosis 0,3 mg/kg KG Bitopertin konnten nach Applikation bei der Behandlungsgruppe höhere PWT als bei der Vehikelgruppe festgestellt werden (s. Abb. 9).

In der 2. und 4. Stunde *post-applicationem* unterschieden sich die Gruppen signifikant (2 h: $23,8 \pm 1,3$ g vs. $30,5 \pm 2,5$ g, $p < 0,05$; 4 h: $24,1 \pm 1,5$ g vs. $31,9 \pm 2,1$ g, $p < 0,01$). Nach 1, 8 und 24 h war kein Unterschied zwischen den Gruppen messbar.

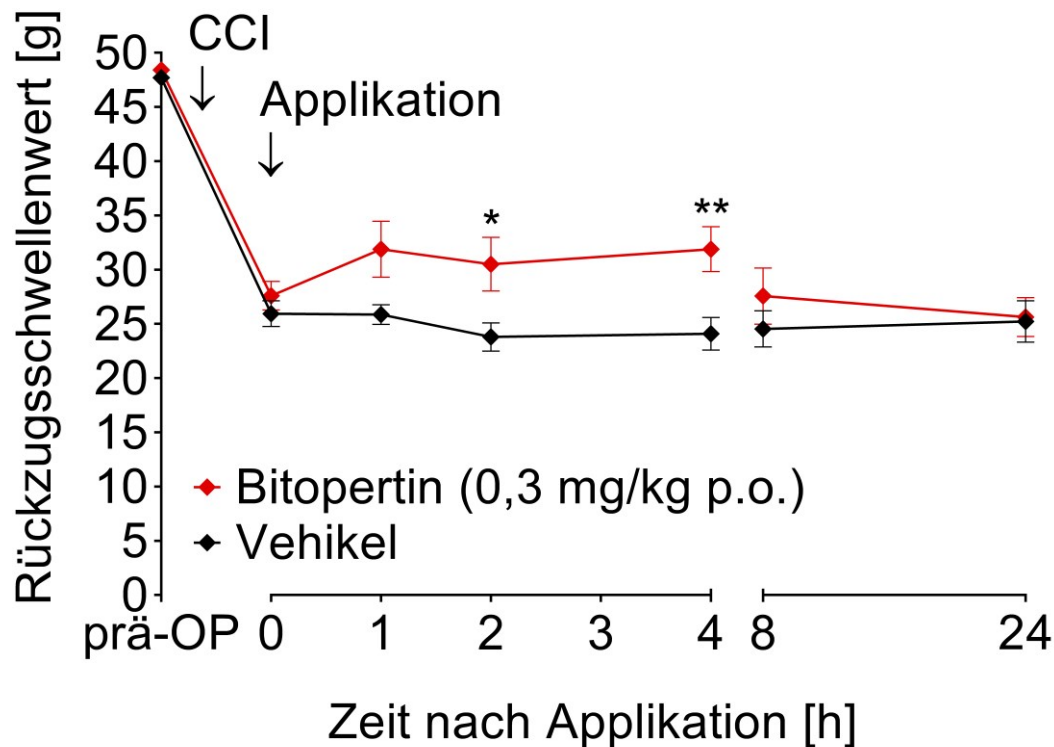


Abb. 9: Reaktion der linken Pfote auf mechanischen Reiz, CCI-OP, 0,3 mg/kg Bitopertin

Der Graph zeigt die Rückzugsschwellenwerte der linken Hinterpfoten der Versuchstiere (Mittelwert $\pm$ Standardfehler). Messungen erfolgten vor der CCI-OP (prä-OP), vor (0) und 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden nach der Applikation. Appliziert wurden 0,3 mg/kg KG Bitopertin-Applikationslösung (roter Graph, $n = 9$) bzw. Vehikel-Applikationslösung (schwarzer Graph, $n = 11$). KG = Körpergewicht, CCI = *chronic-constriction-injury*, p. o. = *per os*, *p-Wert $< 0,05$, **p-Wert $< 0,01$ vs. Vehikel.

3.3.2 Pfotenrückzugsschwellenwerte nach Applikation von 1 mg/kg Bitopertin

Bei der Dosis 1 mg/kg KG Bitopertin konnten, wie bereits bei der geringeren Dosis, nach Applikation bei der Behandlungsgruppe höhere PWT als bei der Vehikelgruppe festgestellt werden (Abb. 10).

In der 2. Stunde *post-applicationem* war der Unterschied zwischen den Gruppen signifikant ($20,9 \pm 3,3$ g vs. $33,1 \pm 2,8$ g, $p < 0,05$). 1, 4, 8 und 24 h *post-applicationem* war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen messbar.

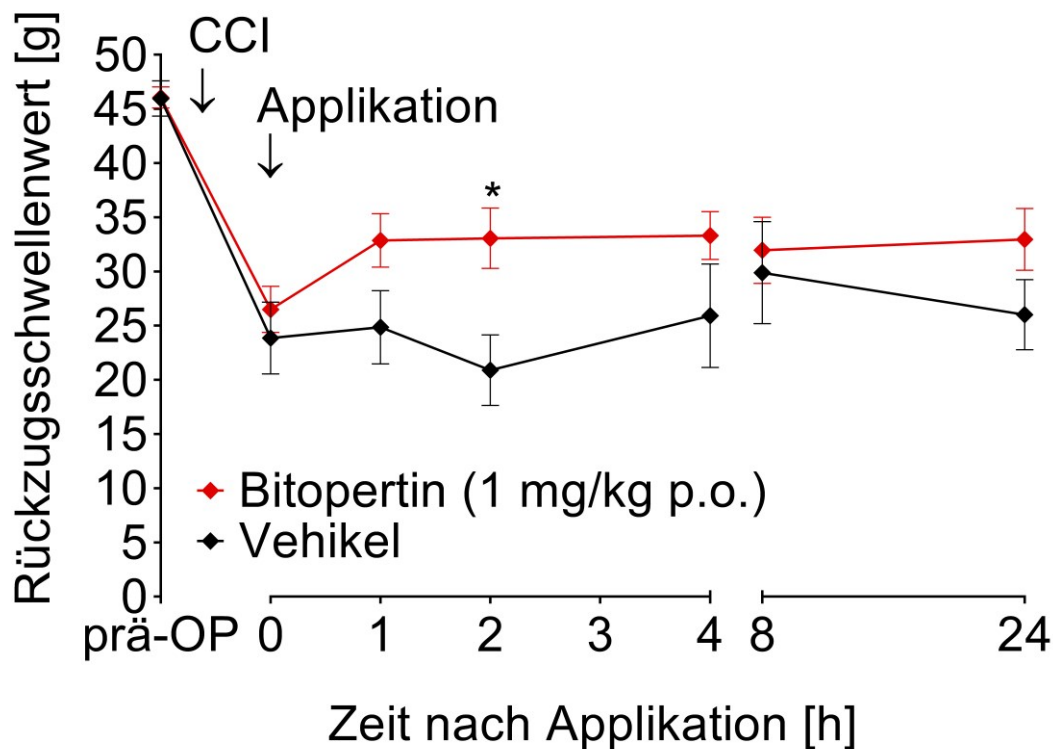


Abb. 10: Reaktion der linken Pfote auf mechanischen Reiz, CCI-OP, 1 mg/kg Bitopertin

Der Graph zeigt die Rückzugsschwellenwerte der linken Hinterpfoten der Versuchstiere (Mittelwert $\pm$ Standardfehler). Messungen erfolgten vor der CCI-OP (prä-OP), vor (0) und 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden nach der Applikation. Appliziert wurden 1 mg/kg KG Bitopertin-Applikationslösung (roter Graph, $n = 13$) bzw. Vehikel-Applikationslösung (schwarzer Graph, $n = 6$). KG = Körpergewicht, CCI = *chronic-constriction-injury*, p. o. = *per os*, * = p -Wert $< 0,05$ vs. Vehikel.

3.3.3 Pfotenrückzugsschwellenwerte nach Applikation von 3 mg/kg Bitopertin

Bei der Dosis 3 mg/kg KG Bitopertin konnte kein statistisch relevanter Unterschied zwischen Behandlungs- und Vehikelgruppe festgestellt werden (s. Abb. 11). Die PWT-Werte beider Gruppen lagen zwischen ca. 20 und 30 g.

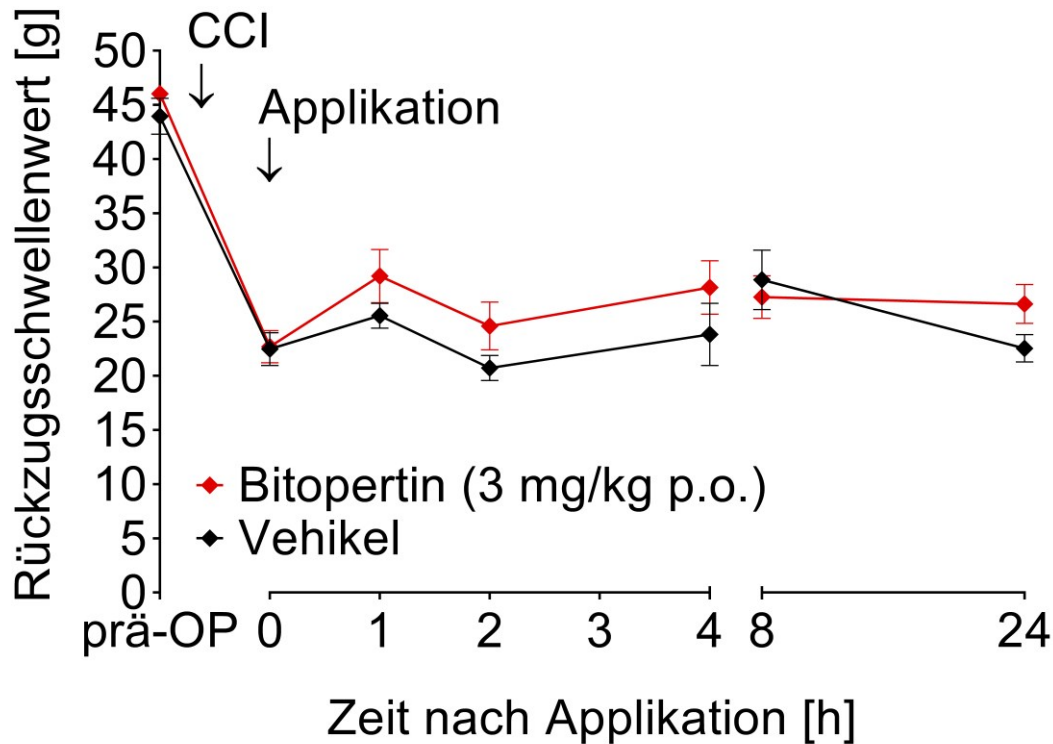


Abb. 11: Reaktion der linken Pfote auf mechanischen Reiz, CCI-OP, 3 mg/kg Bitopertin

Der Graph zeigt die Rückzugsschwellenwerte der linken Hinterpfoten der Versuchstiere (Mittelwert $\pm$ Standardfehler). Messungen erfolgten vor der CCI-OP (prä-OP), vor (0) und 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden nach der Applikation. Appliziert wurden 3 mg/kg KG Bitopertin-Applikationslösung (roter Graph, $n = 12$) bzw. Vehikel-Applikationslösung (schwarzer Graph, $n = 9$). KG = Körpergewicht, CCI = *chronic-constriction-injury*, p. o. = *per os*.

3.3.4 Pfotenrückzugsschwellenwerte nach *Sham*-OP und Applikation von 1 mg/kg Bitopertin

Tiere, die nur der *Sham*-, aber nicht der CCI-OP unterzogen wurden, zeigten zu den Zeitpunkten 1, 2, 4 und 24 h nach Applikation von 1 mg/kg KG Bitopertin keine Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Abb. 12). Beide Kurven verliefen angenähert, mit einem prä-OP-Wert von ca. 37 g, der danach über alle Zeitpunkte bei ca. 42 g verblieb. Die *Sham*-OP verursachte folglich keine Allodynie.

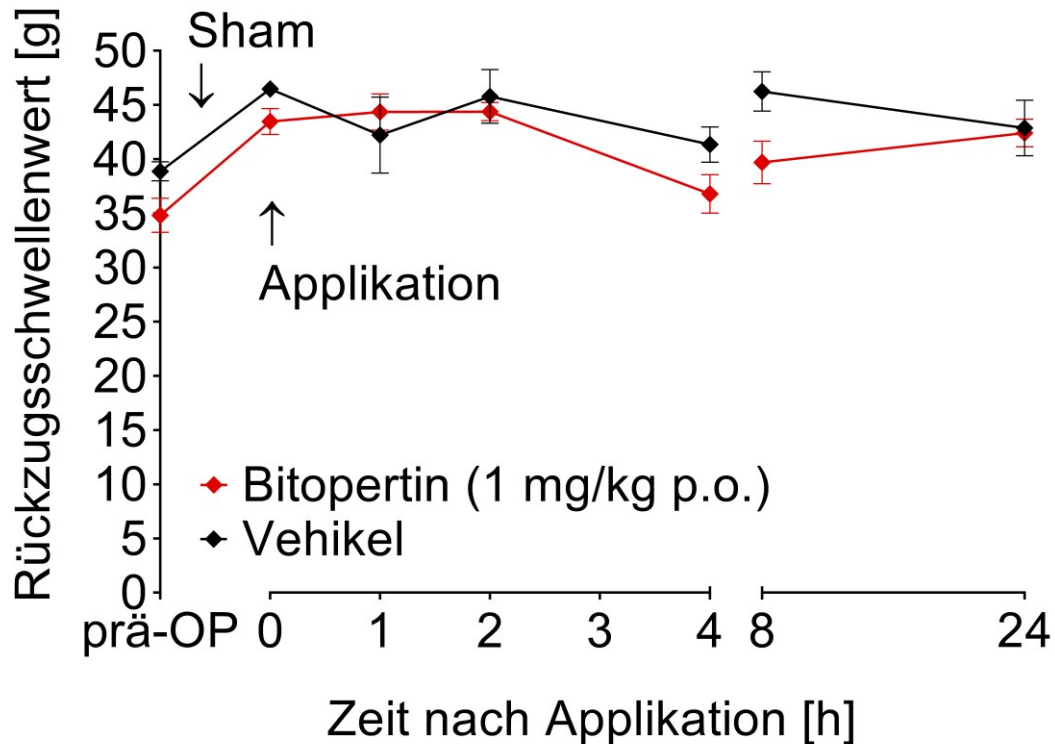


Abb. 12: Reaktion der linken Pfote auf mechanischen Reiz, Sham-OP, 1 mg/kg Bitopertin

Der Graph zeigt die Rückzugsschwellenwerte der linken Hinterpfoten der Versuchstiere (Mittelwert $\pm$ Standardfehler). Messungen erfolgten vor der Sham-OP (prä-OP), vor (0) und 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden nach der Applikation. Appliziert wurden 1 mg/kg KG Bitopertin-Applikationslösung (roter Graph, $n = 4$) bzw. Vehikel-Applikationslösung (schwarzer Graph, $n = 4$). KG = Körpergewicht, p. o. = *per os*.

3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bitopertin hatte keinen Effekt auf die mechanische Reizantwort in der nicht-neuropathischen Shamgruppe. Alle Versuchstiere entwickelten nach CCI eine deutliche, mechanische Allodynie. Bitopertin verringerte die Reaktion auf einen mechanischen Reiz bei Konzentrationen von 0,3 und 1 mg/kg KG vor allem 2 bis 4 h nach Applikation. Die höchste Konzentration dieser Versuchsreihe, 3 mg/kg KG, hatte dagegen keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Schmerzantwort der Versuchstiere.

4. Diskussion

4.1 Beantwortung der Fragestellung

In Bezugnahme auf die Fragestellung lässt sich feststellen:

Bitopertin wirkt in der Ratte antinozizeptiv in den Dosierungen 0,3 und 1 mg/kg KG.

4.2 Methodendiskussion

4.2.1 Tiermodell

Für die durchgeführten Experimente wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten verwendet. *In vivo*-Versuche waren für die vorliegende Fragestellung notwendig, da kein *in vitro*-Modell für die Messung von Schmerzwahrnehmung verfügbar ist (Mogil et al. 2010). Die Wahl des Versuchstiers Ratte gegenüber Mäusen erfolgte aufgrund folgender Überlegungen: Die Durchführung der CCI-OP und der oralen Applikation war wegen der größeren anatomischen Strukturen leichter durchzuführen und somit auch für die Tiere sicherer in Hinblick auf mögliche Komplikationen. Auch die Verhaltenstestung konnte aufgrund der Größe und des allgemein ruhigeren Verhaltens genauer durchgeführt werden. Das Tiermodell Ratte ist zudem seit langem etabliert und ermöglicht so bessere Vergleichbarkeit mit anderen Studien (Bennett und Xie 1988; Mogil 2009; Hermanns et al. 2011; Barthel et al. 2014). In der publizierten Gesamtstudie wurden auch Mäuse verwendet (Armbruster et al. 2018). Das ist vor allem auf die ökonomisch günstigere Haltung und die unterschiedlichen Applikationsarten (i. p. und s. c.) zurückzuführen.

Nachteilig ist die Wahl ausschließlich männlicher Tiere, deren Messergebnisse weniger repräsentativ für die Grundgesamtheit aller Ratten sind, als Messergebnisse beider Geschlechter. So konnte zwar der Einfluss des weiblichen Zyklus auf die Schmerzwahrnehmung und somit die Messergebnisse ausgeschaltet werden (Martínez-Gómez et al. 1994; Fillingim und Ness 2000). Eine zukünftige Erweiterung der Versuchsgruppe auf weibliche und ältere Tiere wäre jedoch interessant, da neuropathischer Schmerz bei Patienten mit diesen Attributen häufig auftritt (Mogil 2009).

4.2.2 Chronic constriction injury-Operation

Die Operation zur Induktion von neuropathischem Schmerz erfolgte auf Basis der *chronic-constriction-injury*-Methode. Bei dieser wird der linke *N. ischiadicus* freigelegt und mit 4 Ligaturen versehen. So entstehen Allodynie und Hyperalgesie bei den operierten Tieren (Bennett und Xie 1988).

Neben dieser existieren weitere Methoden zur Induktion von neuropathischen Schmerz, welche zu ähnlichen Ergebnissen führen (Seltzer et al. 1990; Ho Kim und Mo Chung 1992). Bei der *spinal nerve ligation* werden beispielsweise die Spinalnerven L5 und L6 fest ligiert. Die Ligaturen erzeugen so Allodynie, Hyperalgesie und spontanen Schmerz in der ipsilateralen Hinterpfote (Ho Kim und Mo Chung 1992). Im Falle des *partial-sciatic-nerve-ligation*-Modells wird nur ein Drittel oder die Hälfte des *N. ischiadicus* auf ähnlicher Höhe wie bei der CCI-OP ligiert (Seltzer et al. 1990).

Die Wahl der CCI-Methode erfolgte in diesem Fall aufgrund des gering invasiven Vorgehens, der Erfahrung der Arbeitsgruppe mit dieser Methode und der daraus resultierenden hohen möglichen Erfolgsrate (Brandenburger et al. 2012; Barthel et al. 2014; Neumann et al. 2015; Schlosser et al. 2015). Diese Aspekte wogen schwerer als die leicht geringere Ausprägung mechanischer Allodynie im Vergleich zum *spinal nerve ligation*-Modell (Kim und Chung 1997). Dennoch erfolgten vor allem bei den ersten Operationen 18 Ausfälle durch Tiere, die keinen neuropathischen Schmerz entwickelten. Diese basierten möglicherweise auf dem Lernprozess des Operateurs. Die richtige Straffheit der Ligaturen stellte den schwierigsten Aspekt der CCI-OP dar. Eine zu lockere Ligatur führte so mutmaßlich zu den beschriebenen Ausfällen, wohingegen die 9 Ausfälle durch Autotomie durch zu feste Ligaturen zu erklären sind, wie schon an anderer Stelle beschrieben (Bennett und Xie 1988).

4.2.3 Substanzen

Der GlyT1-Inhibitor Bitopertin wurde in dieser Studie in den Dosierungen 0,3; 1 und 3 mg/kg KG appliziert. Die Auswahl dieser Dosierungen geschah in Anlehnung an die Arbeiten von Alberati et al. (2012) und Pinard et al. (2010) und unter der Annahme, dass die Konzentrationen am unteren Rand des wirksamen Spektrums wenig NMDAR-Aktivität, also Exzitation, bewirken. Mutmaßlich könnten diese Dosierungen besonders wirksam gegen

neuropathischen Schmerz und gleichzeitig besonders nebenwirkungsarm und damit klinisch am ehesten anwendbar sein.

Aufgrund guter oraler Bioverfügbarkeit ($78 \pm 20 \%$) wurde die orale Applikation als praxisnahe Applikationsform gewählt (Pinard et al. 2010).

Die oben beschriebene Herstellung der Applikationslösungen sicherte dabei ähnlich große absolute Applikationsvolumina. Obwohl Bitopertin entsprechend der Herstellerempfehlung in DMSO gelöst wurde, flockte es in den Applikationslösungen mit 0,3%igem Polysorbat 80 nach etwa 10 Minuten aus. Aus diesem Grund mussten die Lösungen vor jeder Applikation mit einem Vortexer durchmischt werden, um mögliche Schwankungen des Bitopertingehalts gering zu halten. Ähnlich wurde auch bei anderer Trägerlösung (*10 % methylcellulose, 15 % vitamin E TPGS, 0.18 % methyl 4-hydroxybenzoate, propyl 4-0.025 % hydroxybenzoate in demineralized water*) verfahren (Pinard et al. 2010). Die Behältnisse wurden abgedeckt, damit die Verblindung des Untersuchers nicht gefährdet wurde.

DMSO wirkt lokal analgetisch und antiphlogistisch bei Konzentrationen die mehr als 10 % betragen (Evans et al. 1993; Amslinger 2017). Da die hier eingesetzten Konzentrationen der Applikationslösungen maximal 2 % erreichten, die Tiere aller Gruppen DMSO erhielten und zudem die Anwendung oral und nicht lokal erfolgte, ist durch die Verwendung von DMSO nur eine vernachlässigbare Beeinflussung der Testergebnisse zu erwarten.

4.2.4 Orale Applikation

Die etablierte orale Applikation erfolgte mit einer Schlundsonde (Pinard et al. 2010). Aufgrund der guten oralen Bioverfügbarkeit von Bitopertin konnte so ein praxisnahes Szenario entworfen werden. Die Applikationsprozedur war sehr stressarm für die Tiere, weil sie schnell und ohne Narkose durchgeführt werden konnte. Bei vereinzelten Tieren war nach der oralen Applikation eines der folgenden Symptome aufgetreten:

Einige Tropfen der Applikationslösung liefen aus dem Mund. Von einer vollständig applizierten Dosis konnte nicht ausgegangen werden.

Für wenige Minuten veränderte sich das Atemgeräusch, was auf die pulmonale Applikation kleiner Mengen der Applikationslösung hindeutete. In keinem Fall wurden Anzeichen von Atemnot festgestellt.

Tiere, bei denen eines der vorbeschriebenen Symptome auftrat, wurden nicht in die Statistik aufgenommen.

4.2.5 Verhaltenstestung

Die Verhaltenstestungen erfolgten mit einem *Dynamic Plantar Aesthesiometer*[®]. Der Pfotenrückzugsschwellenwert (PWT) der Tiere wurde dabei mit einem dünnen Filament gemessen. Zuverlässige Daten wurden durch ein möglichst ähnliches Gewicht der Versuchstiere ($330,3 \pm 34,9$ g am Tag der Applikation) und die Beschränkung auf ausschließlich männliche Tiere sichergestellt. Anwendung dieser etablierten Methode ermöglichte eine gute Vergleichbarkeit mit anderen Studien (Bspw. Hermanns et al. 2008; Barthel et al. 2014).

Die Verhaltenstestungen wurden standardisiert, um Störfaktoren zu minimieren. Aufgrund ihrer Untersucherabhängigkeit wurde die Testung immer von einer Person verblindet und auf die gleiche Weise durchgeführt (Chesler et al. 2002). Dazu gehörte die standardisierte Teststelle an der Pfote (s. Abb. 7), Eingewöhnungszeit von mindestens 30 Minuten und die Stimulationspause von 5 Minuten zwischen den einzelnen Messungen eines Tieres. Andere Parameter, darunter die Stärke des Lichteinfalls und die Geräuschkulisse im Raum, konnten nicht immer konstant gehalten werden. Ein Anteil dieser Parameter an der Varianz der Messwerte kann nicht vollständig ausgeschlossen werden (Chesler et al. 2002). Auch konnte das Filament in seltenen Fällen bei zu starker Eversion der Pfote nicht platziert werden.

Dass Bitopertin in der Ratte länger als 3 h nach Applikation den extrazellulären Glycinspiegel erhöht, war vorbeschrieben (Alberati et al. 2012). Auch die Ergebnisse unserer Gesamtstudie zeigten in Mäusen einen signifikanten Anstieg der Glycinkonzentration im Liquor 2 h nach Bitopertinapplikation (Armbruster et al. 2018). Der Beobachtungszeitraum wurde absichtlich darüber hinaus verlängert, um das Ende einer potentiellen Wirkung genauer beschreiben zu können.

Die ausschließliche Messung punktueller Allodynie ist der Tatsache geschuldet, dass für die klinisch häufigere und bedeutsamere dynamische Allodynie keine etablierte Testmethode existiert (Mogil 2009). Eine Messung der Hyperalgesie wurde aufgrund der engen zeitlichen Taktung der Verhaltensuntersuchungen unterlassen. In Mäusen konnte jedoch gezeigt werden, dass Bitopertin auch einen Effekt auf Hyperalgesie zeigt, der sich jedoch etwas milder als jener auf die Allodynie darstellte (Armbruster et al. 2018).

Vermeintlich reflexive Verhaltensuntersuchungen werden kritisiert, da bei dieser Art der Testung nicht obligatorisch höherer schmerzverarbeitende Zentren involviert sind (Vierck et al. 2008; Mogil 2009).

In Zukunft könnten neuere, sicher nicht-reflexive Methoden angewandt werden, um den Untersucher-Bias zu reduzieren. Beispielhaft sei die Anwendung eines *CatWalks* genannt. Bei dieser Methode läuft das Versuchstier über eine mit fortschrittlicher Sensorik ausgestattete Fläche. Die damit erhobenen Gangartdaten korrelieren sehr gut mit denen der von Frey-Methode, bieten zugleich aber neben weiteren Bewegungsdaten eine objektivere Testung und schnellere Durchführbarkeit. Nachteilig sind hingegen eine geringere Sensitivität sowie wenig Vergleichsdaten (Hamers et al. 2001; Vrinten und Hamers 2003). Es wurde folglich die beste zur Verfügung stehende Methode ausgewählt.

4.2.6 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau (s. Abb. 8) beinhaltete eine randomisierte, doppelblinde Durchführung der Experimente um qualitativ bestmögliche Daten zu gewährleisten. Die Randomisierung erfolgte auf Grund des Pilotversuchscharakters dabei für jede Dosierung einzeln. Zuerst wurde die Dosis 1 mg/kg KG, dann 3 mg/kg KG, dann 0,3 mg/kg KG getestet. In zukünftigen Untersuchungen sollte eine Randomisierung durch alle Dosierungsgruppen hindurch erfolgen. Außerdem zu kommentieren ist die organisatorisch bedingte Schwankung der Zeit zwischen CCI-OP und Applikation von 12 bis 16 Tagen. Diese wurde toleriert, weil der Grad der Neuropathie in diesem Zeitraum als konstant beschrieben wurde (Bennett und Xie 1988, 1988; Barthel et al. 2014).

4.3 Ergebnisdiskussion

4.3.1 Auswirkung von Bitopertin auf den Pfotenrückzugsschwellenwert

In dieser Arbeit wurde erstmals die Auswirkung von Bitopertin auf chronischen neuropathischen Schmerz untersucht. Bei den Dosierungen 0,3 und 1 mg/kg KG zeigte sich eine statistisch signifikante Schmerzlinderung gegenüber der Vehikelgruppe.

Mit Ausnahme der *Sham*-OP-Gruppen enthielten die Behandlungsgruppen 6 bis 13 Tiere. Die Standardabweichungen der PWT betrugen im Mittel 5,6 g. Dies ist im Einklang mit anderen Untersuchungen, welche hohe intra- und interindividuelle Unterschiede bei neuropathischen Schmerzmessungen beschreiben (Bennett und Xie 1988; Barthel et al. 2014).

Die Ergebnisse der *Sham*-OP Gruppe zeigen erwartungsgemäß, dass ohne Ligaturen keine Allodynie entsteht (Bennett und Xie 1988). Bitopertin und Vehikelgruppe sind bei allen Messzeitpunkten nicht zu unterscheiden. Bitopertin scheint folglich die normale Verarbeitung mechanischer Stimuli nicht messbar zu verändern (Armbruster et al. 2018).

Eine leicht geringere Effektgröße bei höherer Dosierung wurde beobachtet. Aufgrund des ähnlichen Wirkmechanismus ließe sich für Bitopertin möglicherweise eine U-förmige Dosis-Wirkungskurve ähnlich der des GlyT1-Inhibitors ALX 5407 vermuten. Bei Anwendung von ALX 5407 führte ein Überwiegen der exzitatorischen NMDAR-Aktivität gegenüber der Inhibition bei mittleren Dosierungen (50 µg i. t.) zu Schmerzexazerbation, während niedrige (10 µg) und hohe Dosierungen (100 µg) schmerzlindernd wirkten (Hermanns et al. 2008). Verifiziert werden konnte dies für den GlyT1-Inhibitor ORG 25935 (MK-8435), indem zusätzlich Antagonisten der Glycinbindungsstelle des NMDAR appliziert wurden. Die antinozizeptive Wirkung setzte 1–2 h früher ein als bei ausschließlicher Gabe von ORG 25935. Dies zeigt die Beteiligung des NMDAR an der Schmerzaufrechterhaltung (Morita et al. 2008).

Genau gegensätzlich dazu verhielt es sich mit den Dosierungen von Bitopertin im Hinblick auf die Behandlung von Negativsymptomen der Schizophrenie. Hier ist die verstärkte NMDAR-Aktivierung erwünscht. Die Ermittlung der optimalen Dosierung für diesen Einsatzzweck führte interessanterweise zur Beschreibung einer umgekehrten U-förmigen

Dosis-Wirkungskurve (Goff 2014; Umbricht et al. 2014). Eine alternative Erklärung für die Schwankungen der Effektgrößen bei unterschiedlichen Dosen könnten Löslichkeitsprobleme sein (s. 4.2.3).

GlyT1-Bindung von ca. 50 % wurde mit dem stärksten klinischen Effekt gegen Schizophreniesymptome, mutmaßlich stärkster NMDAR-Aktivierung, assoziiert. Dies wurde beim Menschen mit täglicher oraler Einmalgabe von 10 mg Bitopertin erreicht (Hirayasu et al. 2016)(Umbricht et al. 2014). Folglich könnte hohe und niedrige prozentuale GlyT1-Bindung ein Überwiegen der glycinergen Hemmung vermitteln. Geringere Dosierungen wären im Hinblick auf Nebenwirkungen und Verträglichkeit zu bevorzugen. Beim Menschen entspräche das Dosierungen von weniger als 0,1 mg/kg KG.

Daten von Untersuchungen einer kooperierenden Arbeitsgruppe zeigten dennoch bei 0,2; 2 und 10 mg/kg KG Bitopertin in Mäusen nahezu gleich große schmerzlindernde Effekte (Daten teilweise dargestellt in: Armbruster et al. 2018). Die Bewertung, ob die mittlere, exzitationsbetonende Konzentration bei der Ratte eventuell zwischen 2 und 10 mg/kg KG liegt, erfordert weitere Untersuchungen. Kompensationsmechanismen durch andere Systeme, beispielsweise das GABAerge System oder Veränderungen der Expression beteiligter Rezeptoren, müssen auch weiterhin bedacht und untersucht werden (Nong et al. 2003; Dohi et al. 2009).

Die Erhöhung des PWT in der Ratte dauerte max. 4 Stunden an. Das deckte sich mit den Erwartungen, so war doch eine erhöhte extrazelluläre Konzentration von Glycin in der Ratte bis mindestens 3 h nach Applikation von Bitopertin vorbeschrieben (Alberati et al. 2012). Um die Fragestellung dieser Arbeit zu beantworten, waren keine weiteren Applikationen nötig. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Applikation von 2 mg/kg KG pro Tag Bitopertin in Mäusen Allodynie über den gesamten Applikationszeitraum lindert (Armbruster et al. 2018). Welche Plasmaspiegel bei Gabe welcher Dosierungen erreicht werden, ist inzwischen für potentiell weitere Studien im Menschen ausführlich vorbeschrieben (Hofmann et al. 2016).

4.3.2 Klinische Anwendbarkeit

In Anbetracht einer möglichen klinischen Studie am Menschen, welche die Wirkung von Bitopertin auf neuropathischen Schmerz untersucht, soll an dieser Stelle auch auf die Nebenwirkungen eingegangen werden. Das Auftreten dieser wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet. In Kooperation mit einer Arbeitsgruppe aus Erlangen wurde ein Open Field Test (OFT) bei Mäusen durchgeführt. Das zu testende Tier wird in eine umwandete Box gesetzt und per Kamera werden Bewegungsdaten aufgezeichnet. Dieser Test dient der Bewertung von Explorationsverhalten und genereller Aktivität, die durch viele Faktoren, z. B. Schmerzen oder Medikamentengabe verändert werden können (Gould et al. 2009). Bitopertinapplikation (2 mg/kg KG) änderte das Verhalten der Tiere nicht (Armbruster et al. 2018).

In klinischen Studien beim Menschen traten Nebenwirkungen auf. Häufig (Inzidenz > 5 %) traten Schläfrigkeit, Schwindel, Kopfschmerzen und Schlaflosigkeit bei Dosierungen von 10 bis 60 mg pro Tag auf (Umbricht et al. 2014; Hirayasu et al. 2016). Zusätzlich ist eine dosisabhängige Verringerung des Bluthämoglobingehaltes (Hb-Wert) beschrieben worden. In der 10 mg/d Bitopertingruppe reduzierte sich der Hb-Wert für die Dauer der Anwendung um ca. 1 g/dl (Hirayasu et al. 2016). Eine Studie in der Ratte zeigte die Induktion einer reversiblen hypochromen und mikrozytären Anämie durch Bitopertingabe (1 bis 15 mg/kg KG). Dabei entsprach die mittlere Reduktion des Hb-Wertes in allen Dosierungen ca. 20 %. Als ursächlich wurde unter anderem eine verringerte Expression des Transferrin Rezeptors 1 auf Retikulozyten beschrieben, welche auch durch den GlyT1 reguliert wird (Winter et al. 2016).

Vor diesem Hintergrund erstellten unsere Kooperationspartner aus Erlangen eine Studie mit Mäusen. Der Effekt der kontinuierlichen Gabe von 2 mg Bitopertin/kg KG/d auf den Hb-Wert von Mäusen wurde 28 Tage lang untersucht. Hier konnte kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Bitopertingruppe festgestellt werden (Armbruster et al. 2018). Das im Vergleich zu den zitierten Studien gegensätzliche Ergebnis ist möglicherweise durch Speziesdifferenzen oder die veränderte Applikationsform (kontinuierlich vs. intermittierend) zu erklären, sodass die Frage zur Bedeutung dieser Nebenwirkung nicht abschließend geklärt werden kann.

Der Effekt des Bitopertins auf den Hb-Spiegel ist in Anbetracht der vorgeschlagenen noch geringeren Dosen eventuell tolerierbar, könnte aber bei multimorbiden Patienten ein Ausschlusskriterium für die Bitopertingabe darstellen.

Zusätzlich wurde die plazentare Übertragung von Bitopertin und eine Schädigung von Ratten- und Kaninchenfeten im 3. Trimester beschrieben (Barrow et al. 2016). Das könnte auch den Menschen betreffen. Eine Anwendung bei Schwangeren scheint vor diesem Hintergrund vorerst kontraindiziert zu sein.

Potentielle Sehstörungen, welche bei anderen GlyT1-Inhibitoren auftraten, wurden bei Bitopertin nicht festgestellt (Liem-Moolenaar et al. 2013; Porter und Dawson 2015).

Bitopertin ist trotz dieser Einschränkungen ein sicheres Medikament. Gerade niedrige Dosierungen, wie sie für die Anwendung in der Schmerztherapie mutmaßlich benötigt werden, sind in klinischen Studien anwendbar. So gab es in der größten Phase 3-Studie mit insgesamt 1136 Personen, welche die Wirkung von Bitopertin gegen Negativsymptome der Schizophrenie untersuchte, in den Placebogruppen mehr ernste unerwünschte Ereignisse als in den Bitopertingruppen (Bugarski-Kirola et al. 2016; Bugarski-Kirola et al. 2017).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine einmal tägliche orale Einnahme von Bitopertin im Menschen ausreicht, um konstante Plasmaspiegel zu erreichen (Hofmann et al. 2016). Dies ist der Adhärenz der Patienten zuträglich und somit ein weiterer Hinweis für die klinische Anwendbarkeit von Bitopertin.

4.4 Schlussfolgerungen

Die Enttäuschung in der Schizophrenieforschung war groß, als Bitopertin die Erwartungen in beinahe allen Studien nicht erfüllen konnte (Bugarski-Kirola et al. 2016; Hirayasu et al. 2016; Javitt 2016; Bugarski-Kirola et al. 2017). Dennoch könnte die Weiterentwicklung von Bitopertin bis in klinische Phase-3-Studien in anderen Anwendungsfeldern nützlich sein. Die Behandlung neuropathischer Schmerzen ist eines dieser Felder.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Bitopertin Allodynie, ein häufiges Symptom neuropathischer Schmerzen, lindern kann.

Eine genauere Evaluation der Effektgröße und des Dosis-Wirkungsprofils vorausgesetzt, steht klinischen Studien am Menschen aufgrund der ausführlichen Vorarbeit wenig im Wege. So kann Bitopertin in Zukunft möglicherweise einen Platz in der multimodalen Therapie neuropathischer Schmerzen einnehmen.

5. Literaturverzeichnis

Alberati, Daniela; Moreau, Jean-Luc; Lengyel, Judith; Hauser, Nicole; Mory, Roland; Borroni, Edilio et al. **(2012)**: Glycine reuptake inhibitor RG1678. A pharmacologic characterization of an investigational agent for the treatment of schizophrenia. In: *Neuropharmacology* 62 (2), S. 1152–1161. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.11.008.

Amir, R.; Michaelis, M.; Devor, M. **(1999)**: Membrane potential oscillations in dorsal root ganglion neurons: role in normal electrogenesis and neuropathic pain. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19 (19), S. 8589–8596.

Amslinger, Sabine **(2017)**: Eintrag zu Dimethylsulfoxid. In: RÖMPP Online. Georg Thieme Verlag Stuttgart. Hg. v. Bernd Dill, Fred Robert Heiker und Andreas Kirschning. Online verfügbar unter <https://roempp.thieme.de/roempp4.0/do/data/RD-04-01767>, zuletzt aktualisiert am 01.12.2009, zuletzt geprüft am 30.10.2017.

Apkarian, A. Vania; Hashmi, Javeria A.; Baliki, Marwan N. **(2011)**: Pain and the brain: specificity and plasticity of the brain in clinical chronic pain. In: *Pain* 152 (3 Suppl), S49-64. DOI: 10.1016/j.pain.2010.11.010.

Armbruster, Anja; Neumann, Elena; Kötter, Valentin; Hermanns, Henning; Werdehausen, Robert; Eulenburg, Volker **(2018)**: The GlyT1 Inhibitor Bitopertin Ameliorates Allodynia and Hyperalgesia in Animal Models of Neuropathic and Inflammatory Pain. In: *Front. Mol. Neurosci.* 10, S. 438. DOI: 10.3389/fnmol.2017.00438.

Atkinson, B. N.; Bell, S. C.; Vivo, M. de; Kowalski, L. R.; Lechner, S. M.; Ognyanov, V. I. et al. **(2001)**: ALX 5407. A potent, selective inhibitor of the hGlyT1 glycine transporter. In: *Molecular pharmacology* 60 (6), S. 1414–1420.

Baba, Hiroshi; Ji, Ru-Rong; Kohno, Tatsuro; Moore, Kimberly A.; Ataka, Toyofumi; Wakai, Ayako et al. **(2003)**: Removal of GABAergic inhibition facilitates polysynaptic A fiber-mediated excitatory transmission to the superficial spinal dorsal horn. In: *Molecular and Cellular Neuroscience* 24 (3), S. 818–830. DOI: 10.1016/S1044-7431(03)00236-7.

Baron, Ralf **(2012)**: S1-Leitlinie: Pharmakologisch nicht interventionelle Therapie chronisch neuropathischer Schmerzen. Hg. v. Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. Kiel. Online verfügbar unter http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-

114l_S1_Neuropathischer_Schmerzen_Therapie_2014-verlaengert.pdf, zuletzt aktualisiert am 07.01.2014, zuletzt geprüft am 30.10.2017.

Baron, Ralf; Binder, Andreas; Wasner, Gunnar **(2010)**: Neuropathic pain. Diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. In: *The Lancet Neurology* 9 (8), S. 807–819. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70143-5.

Barrow, Paul; Parrott, Neil; Alberati, Daniela; Paehler, Axel; Koerner, Annette **(2016)**: Preclinical Reproductive and Developmental Toxicity Profile of a Glycine Transporter Type 1 (Glyt1) Inhibitor. In: *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology* 107 (3), S. 148–156. DOI: 10.1002/bdrb.21179.

Barthel, Franziska; Urban, Andrea; Schlösser, Lukas; Eulenburg, Volker; Werdehausen, Robert; Brandenburger, Timo et al. **(2014)**: Long-term Application of Glycine Transporter Inhibitors Acts Antineuropathic and Modulates Spinal N-methyl-D-aspartate Receptor Subunit NR-1 Expression in Rats. In: *Anesthesiology* 121 (1), S. 160–169. DOI: 10.1097/ALN.0000000000000203.

Bennett, Gary J.; Xie, Y.-K. **(1988)**: A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. In: *Pain* 33 (1), S. 87–107. DOI: 10.1016/0304-3959(88)90209-6.

Bonica, J. J. **(1953)**: The management of pain of cancer. In: *Journal - Michigan State Medical Society* 52 (3), S. 284–290.

Bouhassira, D.; Attal, N. **(2016)**: Translational neuropathic pain research: A clinical perspective. In: *Neuroscience* 338, S. 27–35. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.03.029.

Bouhassira, Didier; Lantéri-Minet, Michel; Attal, Nadine; Laurent, Bernard; Touboul, Chantal **(2008)**: Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. In: *Pain* 136 (3), S. 380–387. DOI: 10.1016/j.pain.2007.08.013.

Brandenburger, Timo; Castoldi, Mirco; Brendel, Maike; Grievink, Hilbert; Schlösser, Lukas; Werdehausen, Robert et al. **(2012)**: Expression of spinal cord microRNAs in a rat model of chronic neuropathic pain. In: *Neuroscience Letters* 506 (2), S. 281–286. DOI: 10.1016/j.neulet.2011.11.023.

Bugarski-Kirola, Dragana; Blaettler, Thomas; Arango, Celso; Fleischhacker, Wolfgang W.; Garibaldi, George; Wang, Alice et al. **(2017)**: Bitopertin in Negative Symptoms of

Schizophrenia-Results From the Phase III FlashLyte and DayLyte Studies. In: *Biological psychiatry* 82 (1), S. 8–16. DOI: 10.1016/j.biopsych.2016.11.014.

Bugarski-Kirola, Dragana; Iwata, Nakao; Sameljak, Snjezana; Reid, Carol; Blaettler, Thomas; Millar, Laurie et al. **(2016)**: Efficacy and safety of adjunctive bitopertin versus placebo in patients with suboptimally controlled symptoms of schizophrenia treated with antipsychotics. Results from three phase 3, randomised, double-blind, parallel-group, placebo-controlled, multicentre studies in the SearchLyte clinical trial programme. In: *The Lancet Psychiatry* 3 (12), S. 1115–1128. DOI: 10.1016/S2215-0366(16)30344-3.

Campbell, James N.; Meyer, Richard A. **(2006)**: Mechanisms of neuropathic pain. In: *Neuron* 52 (1), S. 77–92. DOI: 10.1016/j.neuron.2006.09.021.

Chesler, Elissa J.; Wilson, Sonya G.; Lariviere, William R.; Rodriguez-Zas, Sandra L.; Mogil, Jeffrey S. **(2002)**: Influences of laboratory environment on behavior. In: *Nature neuroscience* 5 (11), S. 1101–1102. DOI: 10.1038/nn1102-1101.

Cox, James J.; Reimann, Frank; Nicholas, Adeline K.; Thornton, Gemma; Roberts, Emma; Springell, Kelly et al. **(2006)**: An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. In: *Nature* 444 (7121), S. 894–898. DOI: 10.1038/nature05413.

Cui, Jian-Guo; Holmin, Staffan; Mathiesen, Tiit; Meyerson, Björn A.; Linderöth, Bengt **(2000)**: Possible role of inflammatory mediators in tactile hypersensitivity in rat models of mononeuropathy. In: *Pain* 88 (3), S. 239–248. DOI: 10.1016/S0304-3959(00)00331-6.

Derry, Sheena; Wiffen, Philip J.; Moore, R. Andrew; Quinlan, Jane **(2014)**: Topical lidocaine for neuropathic pain in adults. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 7, S. CD010958. DOI: 10.1002/14651858.CD010958.pub2.

Dickenson, A. H.; Sullivan, Ann F. **(1987)**: Evidence for a role of the NMDA receptor in the frequency dependent potentiation of deep rat dorsal horn nociceptive neurones following c fibre stimulation. In: *Neuropharmacology* 26 (8), S. 1235–1238. DOI: 10.1016/0028-3908(87)90275-9.

D'Mello, R.; Dickenson, A. H. **(2008)**: Spinal cord mechanisms of pain. In: *British Journal of Anaesthesia* 101 (1), S. 8–16. DOI: 10.1093/bja/aen088.

Dohi, Toshihiro; Morita, Katsuya; Kitayama, Tomoya; Motoyama, Naoyo; Morioka, Norimitsu **(2009)**: Glycine transporter inhibitors as a novel drug discovery strategy for

neuropathic pain. In: *Pharmacology & therapeutics* 123 (1), S. 54–79. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2009.03.018.

Eulenburg, Volker; Armsen, Wencke; Betz, Heinrich; Gomeza, Jesus (2005): Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. In: *Trends in biochemical sciences* 30 (6), S. 325–333. DOI: 10.1016/j.tibs.2005.04.004.

Evans, M.Steven; Reid, Kenneth H.; Sharp, James B. (1993): Dimethylsulfoxide (DMSO) blocks conduction in peripheral nerve C fibers. A possible mechanism of analgesia. In: *Neuroscience Letters* 150 (2), S. 145–148. DOI: 10.1016/0304-3940(93)90522-M.

Fillingim, R. B.; Ness, T. J. (2000): Sex-related hormonal influences on pain and analgesic responses. In: *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 24 (4), S. 485–501. DOI: 10.1016/S0149-7634(00)00017-8.

Frey, M. von (1896): Untersuchung über die Sinnesfunktion der menschlichen Haut. Erste Abhandlung: Druckempfindung und Schmerz. In: *Abhandlungen der mathematisch-physischen Klasse der Königlichen Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften* 23.

Gilron, Ian (2007): Gabapentin and pregabalin for chronic neuropathic and early postsurgical pain: current evidence and future directions. In: *Current opinion in anaesthesiology* 20 (5), S. 456–472. DOI: 10.1097/ACO.0b013e3282effaa7.

Gilron, Ian; Jensen, Troels S.; Dickenson, Anthony H. (2013): Combination pharmacotherapy for management of chronic pain. From bench to bedside. In: *The Lancet Neurology* 12 (11), S. 1084–1095. DOI: 10.1016/S1474-4422(13)70193-5.

Goethe, Johann Wolfgang von; Muschg, Adolf (2006): Wilhelm Meisters Wanderjahre oder die Entsagenden. [10. Aufl.]. Frankfurt am Main: Insel-Verl. (Insel-Taschenbuch, 575).

Goff, Donald C. (2014): Bitopertin. The Good News and Bad News. In: *JAMA Psychiatry* 71 (6), S. 621–622. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2014.257.

Gould, Todd D.; Dao, David T.; Kovacsics, Colleen E. (2009): The Open Field Test 42, S. 1–20. DOI: 10.1007/978-1-60761-303-9_1.

Guariguata, L.; Whiting, D. R.; Hambleton, I.; Beagley, J.; Linnenkamp, U.; Shaw, J. E. (2014): Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. In: *Diabetes research and clinical practice* 103 (2), S. 137–149. DOI: 10.1016/j.diabres.2013.11.002.

Hack, Rüdiger; Krüger, Christine; Ruprecht, Lutz; Scheuber, Heinz-Peter; Thiel, Renate; Weinert, Heike et al. **(2010)**: Empfehlung zur Substanzapplikation bei Versuchstieren. In: *Ausschuss für Tierschutzbeauftragte in der GV-SOLAS und Arbeitskreis 4 in der TVT*. Online verfügbar unter http://www.gv-solas.de/fileadmin/user_upload/pdf_publikation/Tierschutzbeauftragte/Injektionsvol_August_2010.pdf, zuletzt geprüft am 30.10.2017.

Hall, Gillian C.; Carroll, Dawn; McQuay, Henry J. **(2008)**: Primary care incidence and treatment of four neuropathic pain conditions: a descriptive study, 2002-2005. In: *BMC family practice* 9, S. 26. DOI: 10.1186/1471-2296-9-26.

Hamers, F. P.; Lankhorst, A. J.; van Laar, T. J.; Veldhuis, W. B.; Gispen, W. H. **(2001)**: Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries. In: *Journal of neurotrauma* 18 (2), S. 187–201. DOI: 10.1089/08977150150502613.

Harvey, Robert J.; Yee, Benjamin K. **(2013)**: Glycine transporters as novel therapeutic targets in schizophrenia, alcohol dependence and pain. In: *Nature reviews. Drug discovery* 12 (11), S. 866–885. DOI: 10.1038/nrd3893.

Hehn, Christian A. von; Baron, Ralf; Woolf, Clifford J. **(2012)**: Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. In: *Neuron* 73 (4), S. 638–652. DOI: 10.1016/j.neuron.2012.02.008.

Hermanns, H.; Barthel, F.; Urban, A.; Schlösser, L.; Werdehausen, R.; Bauer, I. **(2011)**: Systemic long-term glycine transporter inhibition acts antineuropathic in experimental neuropathic pain in rats. 14AP1-6. In: *European Journal of Anaesthesiology (EJA)* 28. Online verfügbar unter http://journals.lww.com/ejanaesthesiology/Fulltext/2011/06001/Systemic_long_term_glycine_transporter_inhibition.621.aspx.

Hermanns, H.; Muth-Selbach, U.; Lipfert, P.; Braun, S.; Werdehausen, R.; Bauer, I. **(2009)**: Loss of spinal glycinergic neurons is not necessary for development of neuropathic pain in transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein in glycinergic neurons. In: *Neuroscience* 159 (3), S. 1148–1153. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.01.037.

Hermanns, Henning; Muth-Selbach, Uta; Williams, Ruth; Krug, Sabrina; Lipfert, Peter; Werdehausen, Robert et al. **(2008)**: Differential effects of spinally applied glycine transporter inhibitors on nociception in a rat model of neuropathic pain. In: *Neuroscience Letters* 445 (3), S. 214–219. DOI: 10.1016/j.neulet.2008.09.012.

Hirayasu, Yoshio; Sato, Shin-Ichi; Takahashi, Hideaki; Iida, Sayaka; Shuto, Norifumi; Yoshida, Seitaro et al. **(2016)**: A double-blind randomized study assessing safety and efficacy following one-year adjunctive treatment with bitopertin, a glycine reuptake inhibitor, in Japanese patients with schizophrenia. In: *BMC psychiatry* 16, S. 66. DOI: 10.1186/s12888-016-0778-9.

Ho Kim, Sun; Mo Chung, Jin **(1992)**: An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. In: *Pain* 50 (3), S. 355–363. DOI: 10.1016/0304-3959(92)90041-9.

Hofmann, C.; Pizzagalli, F.; Boetsch, C.; Alberati, D.; Ereshefsky, L.; Jhee, S. et al. **(2016)**: Effects of the glycine reuptake inhibitors bitopertin and RG7118 on glycine in cerebrospinal fluid: results of two proofs of mechanism studies in healthy volunteers. In: *Psychopharmacology*. DOI: 10.1007/s00213-016-4317-7.

Hudson, L. J.; Bevan, S.; Wotherspoon, G.; Gentry, C.; Fox, A.; Winter, J. **(2001)**: VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. In: *European Journal of Neuroscience* 13 (11), S. 2105–2114. DOI: 10.1046/j.0953-816x.2001.01591.x.

IASP Task Force on Taxonomy **(1994)**: Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage. Unter Mitarbeit von H. Merskey und N. Bogduk. Hg. v. IASP Press. International Association for the Study of Pain. Seattle. Online verfügbar unter <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698&navItemNumber=576>, zuletzt aktualisiert am 22.05.2012, zuletzt geprüft am 30.10.2017.

Javitt, Daniel C. **(2016)**: Bitopertin in schizophrenia. Glass half full? In: *The Lancet Psychiatry* 3 (12), S. 1092–1093. DOI: 10.1016/S2215-0366(16)30354-6.

Jensen, Mark P.; Chodroff, Marci J.; Dworkin, Robert H. **(2007)**: The impact of neuropathic pain on health-related quality of life: review and implications. In: *Neurology* 68 (15), S. 1178–1182. DOI: 10.1212/01.wnl.0000259085.61898.9e.

Jensen, Troels S.; Finnerup, Nanna B. **(2014)**: Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain. Clinical manifestations and mechanisms. In: *The Lancet Neurology* 13 (9), S. 924–935. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70102-4.

Johnson, J. W.; Ascher, P. **(1987)**: Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. In: *Nature* 325 (6104), S. 529–531. DOI: 10.1038/325529a0.

Julius, D.; Basbaum, A. I. **(2001)**: Molecular mechanisms of nociception. In: *Nature* 413 (6852), S. 203–210. DOI: 10.1038/35093019.

Kawasaki, Yasuhiko; Xu, Zhen-Zhong; Wang, Xiaoying; Park, Jong Yeon; Zhuang, Zhi-Ye; Tan, Ping-Heng et al. **(2008)**: Distinct roles of matrix metalloproteases in the early- and late-phase development of neuropathic pain. In: *Nature medicine* 14 (3), S. 331–336. DOI: 10.1038/nm1723.

Kehlet, Henrik; Jensen, Troels S.; Woolf, Clifford J. **(2006)**: Persistent postsurgical pain. Risk factors and prevention. In: *The Lancet* 367 (9522), S. 1618–1625. DOI: 10.1016/S0140-6736(06)68700-X.

Kim, Kwang Jin; Chung, Jin Mo **(1997)**: Comparison of three rodent neuropathic pain models. In: *Exp Brain Res* 113 (2), S. 200–206. DOI: 10.1007/BF02450318.

Kurvers, H. A.J.M.; Jacobs, M. J.H.M.; Beuk, R. J.; van den Wildenberg, F. A.J.M.; Kitslaar, P. J.E.H.M.; Slaaf, D. W.; Reneman, R. S. **(1995)**: Reflex sympathetic dystrophy. Evolution of microcirculatory disturbances in time. In: *Pain* 60 (3), S. 333–337. DOI: 10.1016/0304-3959(94)00133-Y.

Legendre, P. **(2001)**: The glycinergic inhibitory synapse. In: *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 58 (5), S. 760–793. DOI: 10.1007/PL00000899.

Leong, Mai Lan; Gu, Ming; Speltz-Paiz, Rebecca; Stahura, Eleanor I.; Mottey, Neli; Steer, Clifford J.; Wessendorf, Martin **(2011)**: Neuronal loss in the rostral ventromedial medulla in a rat model of neuropathic pain. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31 (47), S. 17028–17039. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1268-11.2011.

Liem-Moolenaar, Marieke; Peeters, Pierre; Kamerling, Ingrid M. C.; Hogg, Chris; Holder, Graham; Kleijn, Huub Jan et al. **(2013)**: Early stage development of the glycine-1 re-uptake inhibitor SCH 900435: central nervous system effects compared with placebo in healthy

men. In: *British journal of clinical pharmacology* 75 (6), S. 1455–1467. DOI: 10.1111/bcp.12015.

Luo, Z. D.; Chaplan, S. R.; Higuera, E. S.; Sorkin, L. S.; Stauderman, K. A.; Williams, M. E.; Yaksh, T. L. **(2001)**: Upregulation of dorsal root ganglion (alpha)2(delta) calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21 (6), S. 1868–1875.

Maag, R.; Stengel, M.; Baron, R. **(2006)**: Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen. In: *Diabetologie* 2 (2), S. 104–113. DOI: 10.1007/s11428-006-0041-y.

Martínez-Gómez, Margarita; Cruz, Yolanda; Salas, Manuel; Hudson, Robyn; Pacheco, Pablo **(1994)**: Assessing pain threshold in the rat. Changes with estrus and time of day. In: *Physiology & Behavior* 55 (4), S. 651–657. DOI: 10.1016/0031-9384(94)90040-X.

Mingorance-Le Meur, A.; Ghisdal, P.; Mullier, B.; Ron, P. de; Downey, P.; van der Perren, C. et al. **(2013)**: Reversible inhibition of the glycine transporter GlyT2 circumvents acute toxicity while preserving efficacy in the treatment of pain. In: *Br J Pharmacol* 170 (5), S. 1053–1063. DOI: 10.1111/bph.12343.

Moalem, Gila; Tracey, David J. **(2006)**: Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. In: *Brain research reviews* 51 (2), S. 240–264. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2005.11.004.

Moghaddam, Bitá **(2003)**: Bringing Order to the Glutamate Chaos in Schizophrenia. In: *Neuron* 40 (5), S. 881–884. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00757-8.

Mogil, Jeffrey S. **(2009)**: Animal models of pain: progress and challenges. In: *Nature reviews. Neuroscience* 10 (4), S. 283–294. DOI: 10.1038/nrn2606.

Mogil, Jeffrey S.; Davis, Karen D.; Derbyshire, Stuart W. **(2010)**: The necessity of animal models in pain research. In: *Pain* 151 (1), S. 12–17. DOI: 10.1016/j.pain.2010.07.015.

Moore, Robert A.; Derry, Sheena; Taylor, Rod S.; Straube, Sebastian; Phillips, Ceri J. **(2014)**: The costs and consequences of adequately managed chronic non-cancer pain and chronic neuropathic pain. In: *Pain practice : the official journal of World Institute of Pain* 14 (1), S. 79–94. DOI: 10.1111/papr.12050.

Morita, Katsuya; Motoyama, Naoyo; Kitayama, Tomoya; Morioka, Norimitsu; Kifune, Koki; Dohi, Toshihiro **(2008)**: Spinal antiallodynia action of glycine transporter inhibitors in neuropathic pain models in mice. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 326 (2), S. 633–645. DOI: 10.1124/jpet.108.136267.

Neumann, Elena; Hermanns, Henning; Barthel, Franziska; Werdehausen, Robert; Brandenburger, Timo **(2015)**: Expression changes of microRNA-1 and its targets Connexin 43 and brain-derived neurotrophic factor in the peripheral nervous system of chronic neuropathic rats. In: *Molecular pain* 11, S. 39. DOI: 10.1186/s12990-015-0045-y.

Ng, Marie; Fleming, Tom; Robinson, Margaret; Thomson, Blake; Graetz, Nicholas; Margono, Christopher et al. **(2014)**: Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980–2013. A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. In: *The Lancet* 384 (9945), S. 766–781. DOI: 10.1016/S0140-6736(14)60460-8.

Nickel, Florian T.; Seifert, Frank; Lanz, Stefan; Maihofner, Christian **(2012)**: Mechanisms of neuropathic pain. In: *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology* 22 (2), S. 81–91. DOI: 10.1016/j.euroneuro.2011.05.005.

Nong, Yi; Huang, Yue-Qiao; Ju, William; Kalia, Lorraine V.; Ahmadian, Gholamreza; Wang, Yu Tian; Salter, Michael W. **(2003)**: Glycine binding primes NMDA receptor internalization. In: *Nature* 422 (6929), S. 302–307. DOI: 10.1038/nature01497.

Ohayon, Maurice M.; Stingl, Julia C. **(2012)**: Prevalence and comorbidity of chronic pain in the German general population. In: *Journal of Psychiatric Research* 46 (4), S. 444–450. DOI: 10.1016/j.jpsychires.2012.01.001.

Pinard, Emmanuel; Alanine, Alexander; Alberati, Daniela; Bender, Markus; Borroni, Edilio; Bourdeaux, Patrick et al. **(2010)**: Selective GlyT1 Inhibitors. Discovery of [4-(3-Fluoro-5-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazin-1-yl][5-methanesulfonyl-2-((S)-2,2,2-trifluoro-1-methylethoxy)phenyl]methanone (RG1678), a Promising Novel Medicine To Treat Schizophrenia. In: *J. Med. Chem.* 53 (12), S. 4603–4614. DOI: 10.1021/jm100210p.

Pogatzki, Esther M.; Gebhart, G. F.; Brennan, Timothy J. **(2002)**: Characterization of Adelta- and C-fibers innervating the plantar rat hindpaw one day after an incision. In: *Journal of neurophysiology* 87 (2), S. 721–731.

Porter, Roderick A.; Dawson, Lee A. **(2015)**: GlyT-1 Inhibitors: From Hits to Clinical Candidates. In: Sylvain Celanire und Sonia Poli (Hg.): *Small Molecule Therapeutics for Schizophrenia*, Bd. 13. Cham: Springer International Publishing (Topics in Medicinal Chemistry), S. 51–99.

Relieving pain in America. A blueprint for transforming prevention, care, education, and research **(2011)**. Washington, D.C.: National Academies Press.

Rolke, R.; Magerl, W.; Campbell, K. Andrews; Schalber, C.; Caspari, S.; Birklein, F.; Treede, R-D **(2006)**: Quantitative sensory testing: a comprehensive protocol for clinical trials. In: *European journal of pain (London, England)* 10 (1), S. 77–88. DOI: 10.1016/j.ejpain.2005.02.003.

Romei, Cristina; Raiteri, Luca **(2016)**: Advances in understanding the functions of native GlyT1 and GlyT2 neuronal glycine transporters. In: *Neurochemistry international* 99, S. 169–177. DOI: 10.1016/j.neuint.2016.07.001.

Roux, Michel J.; Supplisson, Stéphane **(2000)**: Neuronal and Glial Glycine Transporters Have Different Stoichiometries. In: *Neuron* 25 (2), S. 373–383. DOI: 10.1016/S0896-6273(00)80901-0.

Sato, J.; Perl, E. **(1991)**: Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. In: *Science* 251 (5001), S. 1608–1610. DOI: 10.1126/science.2011742.

Schlosser, Lukas; Barthel, Franziska; Brandenburger, Timo; Neumann, Elena; Bauer, Inge; Eulenburg, Volker et al. **(2015)**: Glycine transporter GlyT1, but not GlyT2, is expressed in rat dorsal root ganglion--Possible implications for neuropathic pain. In: *Neuroscience Letters* 600, S. 213–219. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.06.026.

Seltzer, Ze'ev; Dubner, Ronald; Shir, Yoram **(1990)**: A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. In: *Pain* 43 (2), S. 205–218. DOI: 10.1016/0304-3959(90)91074-S.

Shinder, Vera; Govrin-Lippmann, Ruth; Cohen, Shulamith; Belenky, Michael; Ilin, Polina; Fried, Kaj et al. **(1999)**: Structural basis of sympathetic-sensory coupling in rat and human dorsal root ganglia following peripheral nerve injury. In: *Journal of Neurocytology* 28 (9), S. 743–761. DOI: 10.1023/A:1007090105840.

Sommer, Claudia; Kress, Michaela **(2004)**: Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. In: *Neuroscience Letters* 361 (1-3), S. 184–187. DOI: 10.1016/j.neulet.2003.12.007.

Starowicz, K.; Przewlocka, B. **(2012)**: Modulation of neuropathic-pain-related behaviour by the spinal endocannabinoid/endovanilloid system. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367 (1607), S. 3286–3299. DOI: 10.1098/rstb.2011.0392.

Supplisson, S.; Bergman, C. **(1997)**: Control of NMDA receptor activation by a glycine transporter co-expressed in *Xenopus* oocytes. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17 (12), S. 4580–4590.

Tal, Michael; Wall, Patrick D.; Devor, Marshall **(1999)**: Myelinated afferent fiber types that become spontaneously active and mechanosensitive following nerve transection in the rat. In: *Brain Research* 824 (2), S. 218–223. DOI: 10.1016/S0006-8993(99)01190-7.

Taylor, Charles P.; Angelotti, Timothy; Fauman, Eric **(2007)**: Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha2-delta (alpha2-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. In: *Epilepsy research* 73 (2), S. 137–150. DOI: 10.1016/j.eplepsyres.2006.09.008.

Torebjörk, Erik; Wahren, LisKarin; Wallin, Gunnar; Hallin, Rolf; Koltzenburg, Martin **(1995)**: Noradrenaline-evoked pain in neuralgia. In: *Pain* 63 (1), S. 11–20. DOI: 10.1016/0304-3959(95)00140-N.

Torrance, Nicola; Smith, Blair H.; Bennett, Michael I.; Lee, Amanda J. **(2006)**: The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey. In: *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 7 (4), S. 281–289. DOI: 10.1016/j.jpain.2005.11.008.

Treede, R-D; Jensen, T. S.; Campbell, J. N.; Cruccu, G.; Dostrovsky, J. O.; Griffin, J. W. et al. **(2008)**: Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. In: *Neurology* 70 (18), S. 1630–1635. DOI: 10.1212/01.wnl.0000282763.29778.59.

Tsuda, Makoto; Inoue, Kazuhide; Salter, Michael W. **(2005)**: Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. In: *Trends in neurosciences* 28 (2), S. 101–107. DOI: 10.1016/j.tins.2004.12.002.

Umbricht, Daniel; Alberati, Daniela; Martin-Facklam, Meret; Borroni, Edilio; Youssef, Eriene A.; Ostland, Michael et al. **(2014)**: Effect of Bitopertin, a Glycine Reuptake Inhibitor, on Negative Symptoms of Schizophrenia. A Randomized, Double-Blind, Proof-of-Concept Study. In: *JAMA Psychiatry* 71 (6), S. 637–646. DOI: 10.1001/jamapsychiatry.2014.163.

van Hecke, O.; Austin, Sophie K.; Khan, Rafi A.; Smith, B. H.; Torrance, N. **(2014)**: Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. In: *Pain* 155 (4), S. 654–662. DOI: 10.1016/j.pain.2013.11.013.

Vandenberg, Robert J.; Ryan, Renae M.; Carland, Jane E.; Imlach, Wendy L.; Christie, Macdonald J. **(2014)**: Glycine transport inhibitors for the treatment of pain. In: *Trends in Pharmacological Sciences* 35 (8), S. 423–430. DOI: 10.1016/j.tips.2014.05.006.

Vierck, C. J.; Hansson, P. T.; Yeziarski, R. P. **(2008)**: Clinical and pre-clinical pain assessment: are we measuring the same thing? In: *Pain* 135 (1-2), S. 7–10. DOI: 10.1016/j.pain.2007.12.008.

Vrinten, Dorien H.; Hamers, Frank F.T **(2003)**: ‘CatWalk’ automated quantitative gait analysis as a novel method to assess mechanical allodynia in the rat; a comparison with von Frey testing. In: *Pain* 102 (1), S. 203–209. DOI: 10.1016/s0304-3959(02)00382-2.

Werdehausen, R.; Kremer, D.; Brandenburger, T.; Schlosser, L.; Jadasz, J.; Kury, P. et al. **(2012)**: Lidocaine metabolites inhibit glycine transporter 1: a novel mechanism for the analgesic action of systemic lidocaine? In: *Anesthesiology* 116 (1), S. 147–158. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31823cf233.

Werdehausen, R.; Mittnacht, S.; La Bee; Minett, M. S.; Armbruster, A.; Bauer, I. et al. **(2015)**: The lidocaine metabolite N-ethylglycine has antinociceptive effects in experimental

inflammatory and neuropathic pain. In: *Pain* 156 (9), S. 1647–1659. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000206.

Wiffen, Philip J.; Derry, Sheena; Moore, R. Andrew; Aldington, Dominic; Cole, Peter; Rice, Andrew S. C. et al. **(2013)**: Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia - an overview of Cochrane reviews. In: *The Cochrane database of systematic reviews* (11), CD010567. DOI: 10.1002/14651858.CD010567.pub2.

Winter, Michael; Funk, Jurgen; Korner, Annette; Alberati, Daniela; Christen, Francois; Schmitt, Georg et al. **(2016)**: Effects of GlyT1 inhibition on erythropoiesis and iron homeostasis in rats. In: *Experimental hematology* 44 (10), 964-974.e4. DOI: 10.1016/j.exphem.2016.07.003.

Woolf, Clifford J.; Mannion, Richard J. **(1999)**: Neuropathic pain. Aetiology, symptoms, mechanisms, and management. In: *The Lancet* 353 (9168), S. 1959–1964. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)01307-0.

Yang, Y.; Wang, Y.; Li, S.; Xu, Z.; Li, H.; Ma, L. et al. **(2004)**: Mutations in SCN9A, encoding a sodium channel alpha subunit, in patients with primary erythralgia. In: *Journal of Medical Genetics* 41 (3), S. 171–174. DOI: 10.1136/jmg.2003.012153.

Zeilhofer, Hanns Ulrich **(2008)**: Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain - contributions of inflammation and microglia. In: *International immunopharmacology* 8 (2), S. 182–187. DOI: 10.1016/j.intimp.2007.07.009.

6. Danksagung

Herrn PD Dr. Werdehausen danke ich für die ausgezeichnete Betreuung bei der Durchführung der Arbeit. Besonderen Dank möchte ich für die Planung der Gesamtstudie, die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei der Ausarbeitung des Manuskripts und die praktische Einarbeitung aussprechen.

Frau Prof. Dr. Bauer danke ich für die ausdauernde, wertvolle Betreuung und Unterstützung in jeder Phase der Arbeit, insbesondere bei der Ausarbeitung des Manuskriptes.

Frau Dr. Neumann danke ich für die Unterstützung, insbesondere beim Erlernen der praktischen Arbeit.

Herrn PD Dr. Eulenburg danke ich für wichtige Denkanstöße in Bezug auf die theoretischen Grundlagen der Glycintransporterphysiologie.

Auch möchte ich allen Mitarbeitern des Labors für experimentelle Anästhesiologie sowie allen Mitarbeitern der ZETT herzlich danken.

Meiner Familie und Miriam Bernard danke ich sehr für den unerschütterlichen, geduldigen Beistand, welcher weit über die Erstellung dieser Dissertation hinausreicht.