

Aus der Klinik für Neurochirurgie  
(Direktor: Prof. Dr. Michael Synowitz)  
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian - Albrechts - Universität zu Kiel

**IMMUNHISTOCHEMISCHE ANALYSEN ZUR CANNABINOID-REZEPTOR- UND  
CHEMOKINE-EXPRESSION IN SCHMERZ- UND LERNASSOZIIERTEN  
GEHIRNREGIONEN IN EINEM SPINALEN TRAUMAMODELL DER RATTE**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**Malte Noack**

aus **Henstedt-Ulzburg**

Kiel **2019**

1. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. Friederike Friedel  
Knerlich-Lukoschus, Klinik für Neurochirurgie
2. Berichterstatter/in: Priv.-Doz. Dr. Axel Fudickar, Klinik für  
Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin

Tag der mündlichen Prüfung: 25.09.2019

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 10.07.2019

gez.: Prof. Dr. Johann Roider

(Vorsitzender des Ausschusses für Promotion)

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	v
Tabellenverzeichnis .....	v
Abkürzungsverzeichnis .....	vi
1. Einleitung .....	1
1.1. Rückenmarkverletzungen und neuropathische Schmerzen .....	1
1.1.1. Rückenmarkverletzungen .....	1
1.1.2. Zentrale neuropathische Schmerzen nach Rückenmarkverletzungen .....	4
1.2. Endocannabinoid- Chemokin-Effektor-/Rezeptor-System .....	6
1.2.1. Chemokine und ihre Rezeptoren .....	6
1.2.2. Endocannabinoid-System .....	7
1.3. Das Kontusionsmodell .....	9
1.4. Zielsetzung und Fragestellung .....	11
2. Material und Methoden .....	12
2.1. Material .....	12
2.1.1. Versuchstiere und Gewebeentnahme .....	12
2.1.2. Antikörper .....	13
2.1.3. Biochemikalien .....	14
2.1.4. Gebrauchsfertige Kits .....	15
2.1.5. Lösungen, Puffer .....	15
2.1.6. Verbrauchsmaterialien .....	16
2.1.7. Geräte .....	16
2.1.8. EDV-Programme .....	16
2.2. Methoden .....	16
2.2.1. Immunhistochemie .....	16
2.2.2. Erstellung und Auswertung der Bilddateien .....	19
2.2.3. Statistische Analyse .....	20
3. Ergebnisse .....	20
3.1. Expression des CB <sub>1</sub> -R in den Kontrollgruppen .....	20
3.1.1. Telencephalon .....	21
3.1.2. Diencephalon .....	27
3.1.3. Mesencephalon .....	29
3.2. Expression des CB <sub>1</sub> -R in den Läsionstieren .....	32
3.2.1. Telencephalon .....	33

3.2.2. Diencephalon.....	40
3.2.3. Mesencephalon .....	42
3.3. Koexpression und Koloalisation des CB <sub>1</sub> -R mit Chemokinen und TRPV-1 .....	43
3.3.1. Telencephalon .....	43
3.3.2. Diencephalon.....	47
3.3.3. Mesencephalon .....	47
4. Diskussion .....	49
4.1. CB <sub>1</sub> -R Expression und Immunoreaktivitätsdichten im anterioren Kortexareal des Cingulum und Kerngebieten der Amygdala .....	50
4.2. CB <sub>1</sub> -R Expression und Immunoreaktivitätsdichten im Hippocampus .....	52
4.3. CB <sub>1</sub> -R Expression und Immunoreaktivitätsdichten in Kerngebieten des Thalamus .....	54
4.4. CB <sub>1</sub> -R Expression und Immunoreaktivitätsdichten im Periaquäduktale Grau (PAG).....	55
5. Zusammenfassung .....	58
6. Literaturverzeichnis .....	61

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: URSACHEN VON RÜCKENMARKVERLETZUNGEN .....	1
ABBILDUNG 2: SEKUNDÄRE SCHADENSKASKADE .....	3
ABBILDUNG 3: DER HUMANE CB <sub>1</sub> -REZEPTOR .....	7
ABBILDUNG 4: ÄNDERUNGEN EBENFALLS AUF SUPRASPINALER EBENE? .....	10
ABBILDUNG 5: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT IM TUBERCULUM OLFACTORIUM (TUB OLF) .....	21
ABBILDUNG 6: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DES PRIMÄR SENSORISCHEN KORTEX (B) .....	22
ABBILDUNG 7: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DER AMYGDALA .....	23
ABBILDUNG 8: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DES CORPUS STRIATUM (CPU) UND DES GLOBUS PALLIDUS .....	24
ABBILDUNG 9: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DES HIPPOCAMPUS .....	25
ABBILDUNG 10: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DES CINGULUM (CG), DES ANTERIOREN CINGULÄREN KORTEX (CCG), DES INDUSIUM GRISEUM (IG), DES FORNIX (DF). .....	26
ABBILDUNG 11: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DES CORPUS MAMILLARE .....	27
ABBILDUNG 12: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DER THALAMISCHEN KERNGEBIETE .....	28
ABBILDUNG 13: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DES PERIAQUÄDUKTALEN GRAU (PAG).....	29
ABBILDUNG 14: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DES NCL. INTERPEDUNCULARIS (IPC).....	30
ABBILDUNG 15: CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DER SUBSTANTIA NIGRA PARS RETICULARIS.....	31
ABBILDUNG 16: VERGLEICH DER CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DES BASOLATERALEN KERNKOMPLEXES (BLA) DER AMYGDALA .....	34
ABBILDUNG 17: VERGLEICH DER CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DER HIPPOCAMPUS-AMYGDALA ÜBERGANGSZONE.....	35
ABBILDUNG 18: VERGLEICH DER CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT IM HIPPOCAMPUS.....	37
ABBILDUNG 19: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT IN DEN REGIONEN DES HIPPOCAMPUS .....	38
ABBILDUNG 20: VERGLEICH DER CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DER KERNGEBIETE DES CINGULUM (CG) UND DES ANTERIOREN CINGULÄREN KORTEX (CCG) .....	39
ABBILDUNG 21: STATISTISCHE AUSWERTUNG DER CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT IN DEN KERNGEBIETEN DES THALAMUS .....	40
ABBILDUNG 22: VERGLEICH DER CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT IN DEN KERNGEBIETEN DES THALAMUS. ....	41
ABBILDUNG 23: VERGLEICH DER CB <sub>1</sub> -R IMMUNOREAKTIVITÄT DES PERIAQUÄDUKTALEN GRAU (PAG) .....	42
ABBILDUNG 24: DARSTELLUNG DER KOEXPRESSION DES TRPV1/TRPV1-P UND DES CB <sub>1</sub> -R IM HIPPOCAMPUS IN DER SUBREGION CA1 DES CORNU AMMONIS.....	45
ABBILDUNG 25: DARSTELLUNG DER NEURONALEN, FÄRBUNG MIT NEUN, EXPRESSION DES CB <sub>1</sub> -R IM HIPPOCAMPUS IN DER SUBREGION CA1 DES CORNU AMMONIS .....	45
ABBILDUNG 26: DARSTELLUNG DER KOEXPRESSION DER CHEMOKINE CCL-2 UND CCL-3 SOWIE DER ZUGEHÖRIGEN REZEPTOREN CCR-2 UND CCR-1 UND DEM CB <sub>1</sub> -R.....	46
ABBILDUNG 27: DARGESTELLT IST DIE EXPRESSION DER CHEMOKIN LIGANDEN CCL-2 UND CCL-3, SOWIE DES TRANSIENT REZEPTOR POTENZIAL VANILLOID 1 REZEPTORS (TRPV1) IN DOPPELIMMUNOFLUORESCENZ MIT CB <sub>1</sub> -R BZW. ALS IMMUNOREAKTIVITÄTSFÄRBUNG .....	48
ABBILDUNG 28: SCHEMATISCHE ZUSAMMENFASSUNG DER IN DER ARBEIT DARGELEGTE ERGEBNISSE DER SUPRASPINALEN VERÄNDERUNGEN .....	60

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: SCHEMA DER EINTEILUNG DER RATTEN IN FALL- UND KONTROLLGRUPPEN.....	12
TABELLE 2: AUFLISTUNG DER FÜR DIE IMMUNHISTOCHEMIE VERWENDETE ANTİKÖRPER:.....	13
TABELLE 3: AUFLISTUNG DER FÜR DIE FÄRBUNGEN VERWENDETE BIOCHEMIKALIEN.....	14
TABELLE 4: VERGLEICH DER GEMESSENEN EXPRESSION DES CB <sub>1</sub> -R.....	33
TABELLE 5: VERGLEICH DER GEMESSENEN KOEXPRESSION DES CANNABINOID- REZEPTOR 1 (CB <sub>1</sub> -R), DES CHEMOKIN LIGAND 2 (CCL- 2) UND CHEMOKIN-REZEPTORS 2 (CCR-2) DES CHEMOKIN-LIGANDEN 1 (CCL-1) UND CHEMOKIN-REZEPTORS 1 (CCR-1) UND TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL VANILLOID RECEPTOR 1 (TRPV1) UND DER PHOSPHORYLIERTEN FORM DES TRPV1 (TRPV1- P) SORTIERT NACH REGION.....	44

## Abkürzungsverzeichnis

2-AG	2-Arachidonoylglycerol
ABC-Kit	Avidin-Biotin-Complex-Kit
AHip	Amygdalohippocampale Übergangsregion
APir	Amygdalopiriforme Transitionszone
BLA	Basolateraler Kernkomplex der Amygdala bestehend aus den Nuclei Lateralis, Basalis und Basalis Accessorius
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
CA1/CA2/CA3	Subregion des Cornu Ammonis des Hippocampus
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB <sub>1</sub> -R	Cannabinoid-1-Rezeptor
CB <sub>2</sub> -R	Cannabinoid-2-Rezeptor
CCI	Chronic Constrictive Injury
CCL2 (MCP-1)	Monocyte Chemotactic Protein-1
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$
CCL21	C-C Chemokin – Ligand 21
CCR1	C-C Chemokin – Rezeptor Typ 1
CCR2	C-C Chemokin – Rezeptor Typ 2
CeA	Nucleus Centralis der Amygdala
Ccg	anteriorer cingulärer Kortex
Cg	Cingulum
CPu	Striatum (Nucleus Caudatus und Putamen)
CX3CL1	C-X3-C Chemokin – Ligand 1, Fraktalkin
CX3CR1	C-X3-C Chemokin – Rezeptor Typ 1
DAB	3,3',-Diaminobezidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEn	Nucleus Endopiriformis Dorsalis
df	Dorsales Fornix
DG	Gyrus Dentatus
DPO	Days post-operation / Tage post operationem
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GP	Globus Pallidus
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GPR55	G-Protein gekoppelter Rezeptor 55
GrDG	Stratum Granulare des Gyrus Dentatus des Hippocampus
Hil	Hilusregion des Gyrus Dentatus
ic	Capsula interna
IG	Indusium Griseum
IgG	Immunglobulin G
IL1 $\beta$	
IPC	Nucleus Interpeduncularis
IR	Immunoreaktivität

kDa	Kilo Dalton
kdyn	kilodyn, Maßeinheit von Kraft
LSO	Nucleus Olivaris Superior Lateralis
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MeA	Nucleus Medialis der Amygdala
MEntR	Medialer Entorhinaler Kortex
ml	Lemniscus medialis
MoDG	Stratum Moleculare des Gyrus Dentatus des Hippocampus
NeuN	Neuron specific nuclear protein
NK-1	Neurokinin-1
NSCISC	National Spinal Cord Injury Statistical Center
PAG	Periaquäduktales Grau
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Poly-chain-reaction
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Pir	Regio praepiriformis
PLC	Phospholipase C
RGB-Wert	Rot-Grün-Blau Wert eines Pixels
ROS	Reactive oxygen species
RSG b/c	Retrosplenialer granulärer Kortex b/c
Rt	Nucleus Reticularis des Thalamus
SCI	Spinal Cord Injuries; Rückenmarkverletzungen
SNR	Substantia Nigra Pars Reticularis
St	Stria terminalis
Sth	Subthalamus
StLV	Stria Terminalis Division Lateralis Pars Ventralis
TBS	TRIS gepufferte Kochsalzlösung
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRPV1	transient receptor potential vanilloid receptor 1
TRPV1-P	transient receptor potential vanilloid receptor 1 phosphorylierte Form
Tub olf	Tuberculum olfactorium
VCI	Clastrum Ventralis
Vhc	ventrale hippocampale Kommissur
VPL	Nucleus Ventralis Posterolateralis des Thalamus
VPM	Nucleus Ventralis Posteromedialis des Thalamus
VPPC	Nucleus Ventralis Posteromedialis Parvicellularis des Thalamus
ZNS	Zentrales Nervensystem

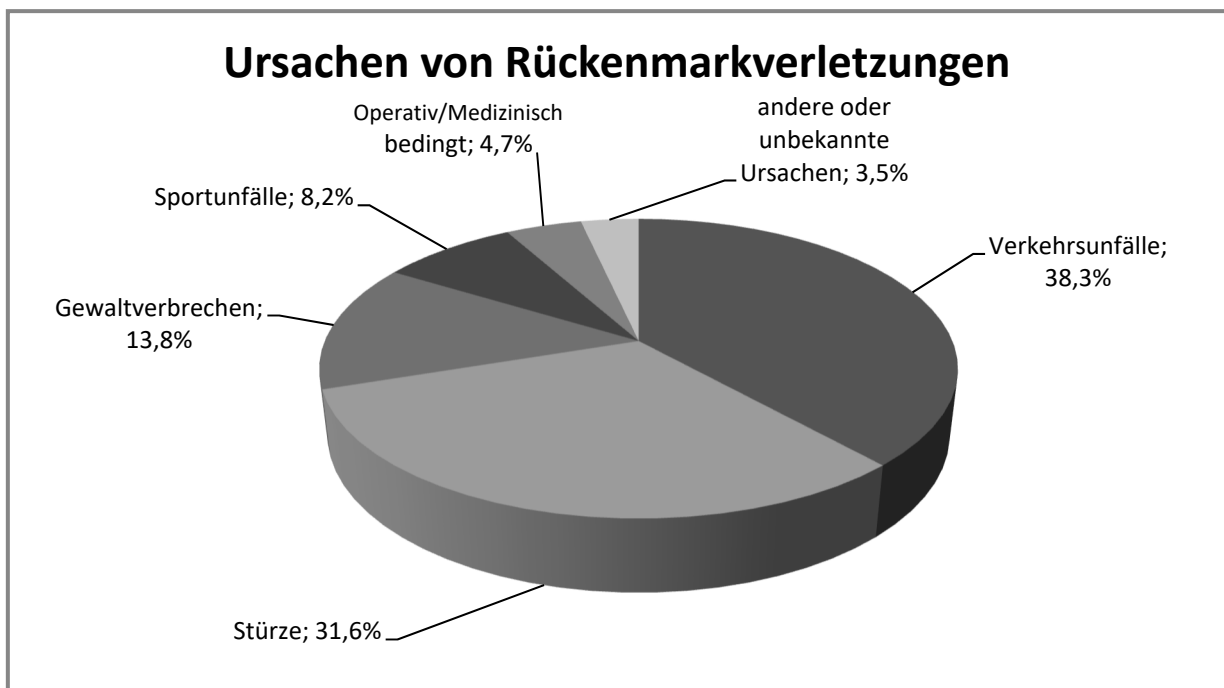
# 1. Einleitung

## 1.1. Rückenmarkverletzungen und neuropathische Schmerzen

### 1.1.1. Rückenmarkverletzungen

In Deutschland erleiden nach Schätzungen der Deutschen Stiftung Querschnittlähmung rund 1900 Menschen pro Jahr eine traumatische Rückenmarkverletzung (DSQ, 2018). In Europa wird die Inzidenz auf 16 Fälle pro Million Einwohner pro Jahr geschätzt (Lee, et al., 2014). In den USA erleiden nach dem National Spinal Cord Injury Statistical Center (NSCISC) circa 17 700 Menschen pro Jahr eine Rückenmarkverletzung. Es liegt eine Verteilung von aktuell 78% Männern zu 22% Frauen bzw. m:w 2-3:1 vor, bei einem Alter von 33-43 Jahren bei Verletzungseintritt (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2018; Wyndaele, et al., 2006).

Die Hauptursache der Rückenmarkverletzungen sind Verkehrsunfälle (38,3 %), gefolgt von Stürzen (31,6 %) und Gewaltverbrechen (13,8 %) (siehe Abbildung 1) (National Spinal Cord Injury Statistical Center, 2018).



**Abbildung 1: Ursachen von Rückenmarkverletzungen.** Dargestellt sind die Ursachen von Rückenmarkverletzungen anhand ihres prozentualen Anteils, umgezeichnet nach den Daten des **National Spinal Cord Injury Statistical Centers, USA 2018**. NSCISC "Spinal Cord Injury Facts and Figures at a Glance", 2018; Download vom 23.11.2018 von: <https://www.nscisc.uab.edu/https://www.nscisc.uab.edu/Public/Facts%20and%20Figures%20-%202018.pdf>



Bei ca. 40 % der Patienten resultiert ein Rückenmarkstrauma in eine Tetra- und 60 % eine Paraplegie (Schwab, et al., 2004). Durch das meist junge Durchschnittsalter von 31 Jahren, der zumeist voll erwerbstätigen Patienten, entstehen neben der hohen psychosozialen Belastung der Verletzten und ihrer Familien enorme volkswirtschaftliche Kosten (Schwab, et al., 2004). Rückenmarkverletzungen können nach Art des Traumas in vier verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Hulsebosch, 2002): 1) Rückenmarkmazerationen, bei denen die Morphologie des Rückenmarks stark deformiert wird; 2) Rückenmarkzerreißen bei Schuss- oder Stichwaffenverletzungen; 3) Rückenmarkkontusionsverletzungen, die über eine zentrale Hämatomyelie in eine Syringomyelie übergehen können; 4) Rückenmarkverletzungen mit reinen axonalen Verletzungen und Demyelinisierungen. Bei den Gruppen 1 und 2 wird die Oberfläche des Rückenmarks verletzt, bei 3 und 4 bleibt die Oberfläche intakt (Hulsebosch, 2002). Die Kontusionsverletzungen machen 25 - 40 Prozent aller Rückenmarkverletzungen aus (Hulsebosch, 2002).

Eine Verletzung des Rückenmarks (= primäre Läsion) induziert dabei sekundäre Schädigungsprozesse, die zu einem weiteren Gewebeverlust in primär nicht betroffenen Rückenmarkabschnitten führen können (Schwab, et al., 2004; Hulsebosch, 2002). Die zugrunde liegenden pathologischen und biochemischen Prozesse dieses sogenannten Sekundärschadens sind komplex und stehen unverändert im Mittelpunkt der spinalen Traumaforschung. Abbildung 2, nach Rabchevsky und Smith von 2001, fasst einige wesentliche Mechanismen vereinfacht schematisch zusammen: Unter anderem führen Gewebeischämie und Elektrolytverschiebungen in der frühen Phase nach dem Trauma zu einer ausgeprägten Ödembildung unterschiedlicher Genese (vasogen, zytotoxisch); durch neuronalen Zelluntergang freigesetzte exzitatorische Aminosäuren, wie z.B. das Glutamat, führen über Lipidperoxidation zur Bildung freier Radikale (z.B. reactive oxygen species - ROS), welche wiederum den Zelluntergang weiterer neuronaler Zellen zur Folge haben (Hulsebosch, 2002). Ein wichtiges Element der sekundären Läsionskaskaden sind auch Entzündungsprozesse, die in der akuten, subakuten und chronischen posttraumatischen Phase eine wichtige Rolle spielen (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008; Knerlich-Lukoschus, et al., 2011). Dabei können anhaltende Entzündungsreaktionen mit reaktiver astrozytärer Gliose und morphologischen Zeichen erhöhter zellulärer Aktivität, sowie nachweisbaren perivaskulären und intraparenchymatösen Infiltraten von Entzündungszellen (u.a. Granulozyten und Lymphozyten) bis in den Spätverlauf nach dem initialen Trauma entlang der gesamten spinalen Achse nachgewiesen werden (Knerlich-Lukoschus, et al., 2010). Damit einher geht die Sekretion von Entzündungsbotenstoffen wie z.B. den Zytokinen ("zyto"="Zelle" und

"kine"="kleine Proteine"), Chemokinen (chemotaktische Zytokine) und Wachstumsfaktoren (Knerlich-Lukoschus, et al., 2010; PhD Rabchevsky, et al., 2001).

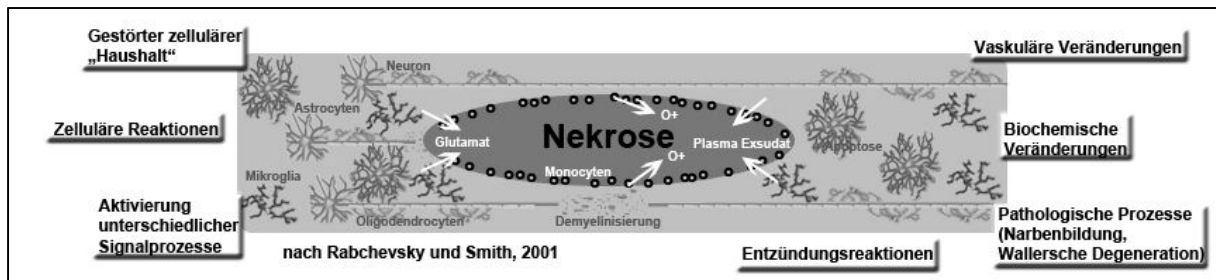


Abbildung 2: Sekundäre Schadenskaskade. Darstellung der ablaufenden Prozesse nach spinalem Trauma im Rückenmark, umgezeichnet nach (PhD Rabchevsky, et al., 2001).

Sofort (<2h)	Frühe Akutphase (<48h)	Subakute Phase (<14d)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hämorrhagie</li> <li>• Ödem</li> <li>• Thrombose</li> <li>• Vasospasmus</li> <li>• Ischämie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ionenkonzentrationsverschiebungen</li> <li>• Glutamatvermittelte Exotoxizität</li> <li>• Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke</li> <li>• Neutrophilen Infiltration</li> <li>• Aktivierung von Entzündungsmediatoren</li> <li>• Aktivierung von Mikroglia</li> <li>• Bildung von freien Radikalen</li> <li>• Metabolische Veränderungen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phagozytose</li> <li>• Infiltration von Makrophagen</li> <li>• Apoptose</li> <li>• Demyelinisierung</li> <li>• Initiierung einer Glianarbe</li> </ul>

Tabelle 1: Zeitliche Abfolge der posttraumatischen Veränderungen nach einem Rückenmarkkontusions-trauma (Nagoshi, et al., 2015).

In der chronischen Phase kommt es zur Demyelinisierung und Wallerschen Degeneration von Axonen (siehe Abbildung 2) mit darauffolgenden Weiterleitungsdefiziten und Umorganisation der initialen Läsion in eine Syrinx, eine flüssigkeitsgefüllte Höhle im Rückenmark, deren Ausmaß abhängig von der Schwere des initialen Traumas ist (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008). Insgesamt bedingen die sekundären Schadenskaskaden klinische Komplikationen, die das Vegetativum, die Motorik und die Sensorik betreffen und den Langzeitverlauf nach Rückenmarkverletzungen erheblich negativ beeinflussen (Ahuja, et al., 2016). Dabei sind die Betroffenen dann zusätzlich zu ihren motorischen Ausfällen konfrontiert mit zum Beispiel der Entwicklung von neuropathischen Schmerzen, schneller Ermüdbarkeit und kognitiven Einschränkungen (Jensen MP, 2007). Die Genese dieser Problematiken ist komplex und spielt sich auf verschiedenen spinalen und supraspinalen Ebenen ab (Siddall, et al., 2001).

### **1.1.2. Zentrale neuropathische Schmerzen nach Rückenmarkverletzungen**

Die Entwicklung von neuropathischen Schmerzen (z.B. charakterisiert durch spontane Schmerzempfindungen ohne äußeren Schmerzreiz, Allodynie oder Hyperalgesie) ist dabei eine der häufigsten Komplikationen nach Rückenmarkverletzungen (Siddall, et al., 2001; MD PhD Fitch, et al., 2008). Sie treten auf dem Läsionsniveau, darüber oder, was am häufigsten ist, unterhalb der geschädigten spinalen Höhe auf (Siddall, et al., 2001; MD PhD Fitch, et al., 2008). Diese Schmerzsyndrome sind permanent und werden, da es sich um eine Läsion des zentralen Nervensystems (ZNS) handelt, als zentrale neuropathische Schmerzen bezeichnet (Hulsebosch, et al., 2009).

Nach der International Association of the Study of Pain (IASP) ist Schmerz eine unangenehme Sinnesempfindung, die mit körperlicher Schädigung verbunden ist oder die so beschrieben wird, als wäre sie damit verbunden (IASP Task Force on Taxonomy, 1994). Die Empfindung Schmerz entsteht durch noxische (schmerzhafte) Reize, die den Organismus schädigen oder schädigen können (Klinke, et al., 2005). Die Schmerzaufnahme erfolgt für mechanische, thermische und chemische Reize über die in allen Körperorganen mit Ausnahme des ZNS vorkommenden Schmerzrezeptoren (Nozizeptoren) (Rohkamm, 2009). Diese sind freie Nervenendigungen von A $\delta$  - oder C-Nervenfasern (Rohkamm, 2009). A $\delta$ -Nervenfasern sind dünn myelinisierte Nervenfasern und leiten Erregungen mit einer Geschwindigkeit von circa 10-30 m/s in das ZNS weiter (Klinke, et al., 2005). C-Nervenfasern sind nicht myelinisierte Nervenfasern und leiten Erregungen mit einer Geschwindigkeit von circa 0,5-2 m/s in das ZNS weiter (Klinke, et al., 2005). Diese nozizeptiven Neurone leiten die Erregungen in das Hinterhorn des Rückenmarks auf spinale Neurone weiter (Rohkamm, 2009). Die Fortsätze der meisten nozizeptiven spinalen Neurone bilden den Tractus spinothalamicus und enden im kontralateralen Thalamus (Rohkamm, 2009). Von hier nehmen zahlreiche thalamo-kortikale Projektionen ihren Ausgang, so zum primären somatosensorischen Kortex (Gyrus postcentralis), zum Gyrus cinguli, zur Inselregion und zum Frontallappen (siehe Abbildung 3) (Rohkamm, 2009). Die Zuordnung nach Ort, Intensität und Qualität erfolgt am ehesten im Gyrus postcentralis (Rohkamm, 2009). Die emotional-affektive Schmerzkomponente (z.B. Angst, Leiden) entsteht im limbischen System, und zwar im vorderen Gyrus cinguli und Corpus amygdaloideum (Rohkamm, 2009).

Nach einer Schädigung zentraler oder peripherer nozizeptiver Systeme können neuropathische Schmerzen bei den Betroffenen auftreten (Schwab, et al., 2004; Hulsebosch,

2002). Eine spezielle Form dieser Schmerzformen ist der sogenannte „Zentrale Schmerz“ oder auch zentraler neuropathischer Schmerz, der aus einer Läsion des ZNS resultiert (Hulsebosch, 2002). Zentrale Schmerzen können daher bei Verletzungen im Bereich der gesamten Neuraxis entstehen (Hulsebosch, 2002). Sie treten bei ca. 65-85 % aller Rückenmarkverletzungen auf (Finnerup, et al., 2001; Siddall, 2008). Die sekundären Schadenskaskaden nach einem Rückenmarkstrauma können dabei zu einer Übererregbarkeit der spinalen Neurone in der Umgebung der primären Läsion und darüber hinaus auf weiter entfernten spinalen oder supra-spinalen Ebenen führen (s. Abbildung 2) (Schwab, et al., 2004; Hulsebosch, 2002). Ursache dafür ist, dass sich die afferenten Neurone biochemisch, physiologisch und morphologisch verändern (Hulsebosch, et al., 2009; Siddall, 2008). Über die Zeit kommt es so zu irreversiblen plastischen Veränderungen im ZNS und damit die Gewebeheilung überdauernden zentralen neuropathischen Schmerzen (Hulsebosch, et al., 2009; Siddall, 2008).

Zentrale neuropathische Schmerzen äußern sich u.a. als pathologische Überempfindlichkeit (Hypersensibilität und Allodynie = schmerzhaftes Empfinden bei primär nicht schmerzinduzierenden Reizen) (Hulsebosch, et al., 2009). Diese Symptomatik ist bis heute häufig therapieresistent und entsprechend quälend für die Betroffenen (Siddall, 2008). Damit beeinflussen sie den Rehabilitationsprozess der Betroffenen negativ und bedingen die insgesamt schlechte Langzeitprognose von Rückenmarkverletzungen (Hulsebosch, et al., 2009).

Dabei führen periphere Nervenläsionen oder Schädigungen des Rückenmarks auch zu unterschiedlichen neuroplastischen Veränderungen auf supraspinaler Ebene, die in der Entstehung neuropathischer Schmerzen eine wesentliche Rolle spielen (Boadas-Vaello, et al., 2017): Die betroffenen Gehirnareale sind dabei u.a. das Periaquäduktale Grau (PAG), Thalamus, Amygdala, Cingulum, Hippocampus, Hypothalamus, rostrale ventromediale Medulla, der präfrontale Cortex und der Locus coeruleus (Boadas-Vaello, et al., 2017). Dabei wurden unterschiedliche funktionelle, strukturelle und molekulare Mechanismen beobachtet, die z.B. über eine Modifizierung post-synaptischer Rezeptoren zu einer Übererregbarkeit in den entsprechenden Kerngebieten führen (Boadas-Vaello, et al., 2017). Dabei könnten auch entzündlichen Mediatoren, die nach einem spinalen Trauma induziert werden, eine wichtige Funktion zukommen.

## **1.2. Endocannabinoid- Chemokin-Effektor-/Rezeptor-System**

### **1.2.1. Chemokine und ihre Rezeptoren**

In vorhergehenden Studien zu dem in der vorgelegten Arbeit verwendeten Rückenmarkkontusionsmodell wurde gezeigt, dass die Expression spezifischer Entzündungsbotenstoffe, die sogenannten Chemokine und deren Rezeptoren, in den für die Entstehung neuropathischer Schmerzen relevanten anatomischen Strukturen der gesamten spinalen Achse signifikant erhöht nachweisbar wurden und mit dem Auftreten chronischer neuropathischer Schmerzen korrelierten (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008; Knerlich-Lukoschus, et al., 2010). Hinweise auf eine mögliche supraspinale Involvierung entzündungsrelevanter Moleküle in Schmerzprozesse erbrachten die Arbeiten von Zhao et al. (2007), in denen CCL21 nach Rückenmarkverletzungen im Thalamus auf erhöhtem Niveau induziert nachgewiesen wurde (Zhao, et al., 2007).

Chemokine sind dabei chemotaktische Zytokine (8 kDa bis 12 kDa), die v.a. bei Entzündungsprozessen, aber darüber hinaus auch diversen anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine Rolle spielen (Asensio, et al., 1999; Tran, et al., 2003). Bisher wurden über 50 Chemokine identifiziert, wobei diese entsprechend ihrer biochemischen Struktur in vier Subgruppen eingeteilt werden können (Zlotnik, et al., 2000). Es gibt verschiedene Gruppen von Chemokin-Liganden und -Rezeptoren (Zlotnik, et al., 2000). Alle haben gemeinsam, dass die Rezeptoren G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) mit 7 Transmembranhelices sind. Diese können dann die Mitogen-aktivierte-Protein-Kinase (MAPK), den Phospholipase C (PLC) Signalweg oder die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktivieren (Gao, et al., 2010).

Die Klassifikation von Chemokinen basiert auf dem Vorkommen und der Position von zwei Cystein-Resten (Abbadie, et al., 2009). Die CC-Gruppe hat zwei benachbarte Cysteine, die CXC-Gruppe hat eine Aminosäure zwischen den Cysteinresten und die CX3C-Gruppe hat drei Aminosäuren zwischen den Cysteinresten und besteht bisher aus lediglich einem Chemokin, CX3CL1 (Fraktalkin) (Abbadie, et al., 2009).

Bezüglich der Involvierung in schmerzrelevante Prozesse, dem Fokus der vorgelegten Arbeit, wurde bisher gezeigt, dass z.B. das CCL2/CCR2-Paar Mikroglia aktivieren und eine Schmerzsensitivierung im ZNS auslösen kann (Gao, et al., 2010). Dies geschieht über von den Mikroglia freigesetzte Zytokine (Abbadie, et al., 2009; Van Steenwinckel, et al., 2011). CCL2

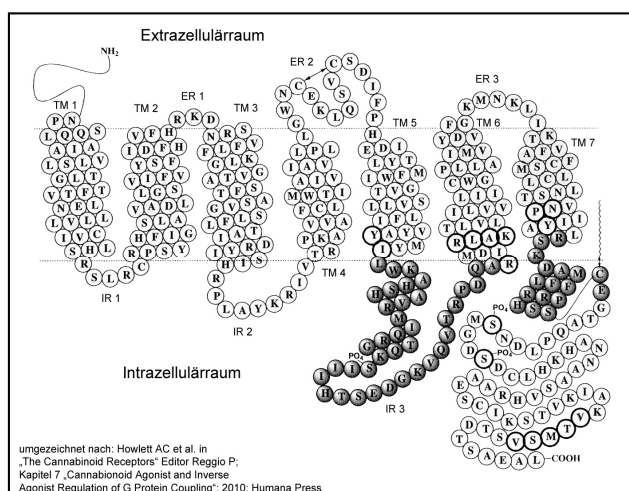
selbst kann nozizeptive Neuronen stimulieren und somit die Schmerzwahrnehmung modulieren und aufrechterhalten (Abbadie, et al., 2009; Van Steenwinckel, et al., 2011). Interessant ist, dass Chemokine und deren Rezeptoren auch unter physiologischen Bedingungen im Gehirn nachweisbar sind (Banisadr, et al., 2005). So sind die Chemokine CCL2 und CCL3 und deren Rezeptoren auch unter physiologischen Bedingungen in Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen und Neuronen distinkter Gehirnregionen nachweisbar (Banisadr, et al., 2005). Dabei liefert die jeweilige anatomische Verteilung dieser Entzündungsmediatoren wie bei den Neurotransmitter- oder Neuropeptid-Systemen entscheidende Hinweise auf deren potentielle Funktionen, so dass mittlerweile ein unabhängiges Chemokine-Effektor-/Rezeptor-System des zentralen Nervensystems (ZNS) postuliert wurde (Adler, et al., 2005).

### 1.2.2. Endocannabinoid-System

Relevant für die Schmerzentstehung ist daneben auch das endogene Cannabinoid-/Chemokin-Effektor/Rezeptor-System, welches aufgrund seiner Multifunktionalität und Involvierung in neuromodulatorische Prozesse potentiell vielversprechende therapeutische Ansätze bieten könnte (Guindon, et al., 2009; Knerlich-Lukoschus, et al., 2010).

Die Endocannabinoide und die Rezeptoren CB<sub>1</sub>-R und CB<sub>2</sub>-R bilden zusammen das bisher bekannte Endocannabinoid-System (Pertwee, et al., 2010). Devane et al. entdeckten 1988 den ersten Cannabinoid-Rezeptor im Gehirn der Ratte (Huffman, 2010). Sein Genlocus wurde 1990 von Matsuda et al. identifiziert und liegt auf Chromosom 5 q21 (NCBI Entrez Gene 25248) (Huffman, 2010). Gérard et al. identifizierten 1991 einen humanen Cannabinoid-Rezeptor im zentralen Nervensystem (ZNS) (Gérard, et al., 1991). Dieser stimmt zu 97% mit dem Rezeptor

der Ratte überein und liegt auf Chromosom 6 q14-q15 (NCBI Entrez Gene 1268) (Gérard, et al., 1991).



**Abbildung 3: Der humane CB<sub>1</sub>-Rezeptor.** Dargestellt ist der zweidimensionale Aufbau des humanen CB<sub>1</sub>-R. TM 1 - 7: Transmembranhelix 1 - 7; ER 1 - 3: Extrazelluläre Regionen 1 - 3; IR 1 - 3: Intrazelluläre Regionen 1 - 3. Umgezeichnet nach Howlett AC et al. in "The Cannabinoid Receptors" Editor Reggio P; Kapitel 7 "Cannabinoid Agonist and Inverse Agonist Regulation of G Protein Coupling"; 2010; Humana Press.

1993 wurde von Munro et al. ein zweiter Cannabinoid-Rezeptor auf Immunzellen nachgewiesen, woraufhin der Rezeptor des Gehirns CB<sub>1</sub>-R und der auf den Immunzellen CB<sub>2</sub>-R genannt wurde (Elphick, et al., 2010). Zuletzt wurde der G-Protein Rezeptor 55 (GPR55) als ein weiterer Rezeptor identifiziert, der auf eine ganze Reihe von Cannabinoiden reagiert (Abood, 2010).

Die Cannabinoid-Rezeptoren CB<sub>1</sub>-R und CB<sub>2</sub>-R gehören zu der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die ihre Funktion durch Aktivierung von GTP-bindenden Proteinen ausüben (Hurst, et al., 2010).

Als Rezeptor-Liganden fungieren die Endocannabinoide Arachidonylethanolamid (Anandamid), 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) und 2-Arachidonoylglycerylether (Noladin Ether) (Howlett, et al., 2002). Neben den klassischen Cannabinoiden wird der CB<sub>1</sub>-Rezeptor von nicht-klassischen Cannabinoiden stimuliert, so wie Δ<sup>9</sup>-THC, HU210, Desacetyllevonantradol, CP55,940, WIN55212-2, 2-AG, Anandamid und Analoge wie Methanandamid; als Antagonisten wirken am CB<sub>1</sub>-Rezeptor Arylpyrazole wie z.B. SR141716 (Rimonabant) (Howlett, et al., 2002).

Über Interaktionen mit den Cannabinoid-Rezeptoren sind die Endocannabinoide in der Lage, die zellulären Level von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch eine Wirkung von G-Proteinen auf die Adenylatcyclase zu regulieren (Howlett, et al., 2002). Außerdem werden durch Endocannabinoide und die Interaktion mit dem CB<sub>1</sub>-Rezeptor die funktionellen Eigenschaften von spannungsabhängigen Ca<sup>2+</sup>-Kanälen, verschiedenen Typen von K<sup>+</sup>-Kanälen und Liganden-gesteuerte Ionen-Kanäle moduliert (Howlett, et al., 2002). Durch den CB<sub>1</sub>-Rezeptor werden die Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK) oder die Phosphatidylinositol-3-Kinase sowie weitere sogenannte Second-messenger vermittelte Signalwege aktiviert (Howlett, et al., 2002). Die Endocannabinoide werden nach Bedarf synthetisiert und nach Gebrauch in die Zelle aufgenommen (Pertwee, 2005). Danach werden sie durch verschiedene Enzyme abgebaut, dazu zählen die Fatty Acid Amide Hydrolase, Monoacyl-Glycerol Lipase, Cyclooxygenase-2, Lipooxygenasen und CYP-450-Enzyme (Pertwee, 2005).

Der CB<sub>1</sub>-Rezeptor ist vor allem an Axonen lokalisiert, die Glutamat oder GABA freisetzen (Patel, et al., 2010). Es wurde gezeigt, dass die Aktivierung des CB<sub>1</sub>-Rezeptors in einer Inhibition der Ausschüttung von GABA resultiert, folglich einer Inhibition der GABAergen Neurotransmission (Patel, et al., 2010).

Von Egertová und Elphick wurde bei der Ratte der CB<sub>1</sub>-Rezeptor im Bulbus Olfactorius sowie in der Amygdala, der Hippocampus Formation, in den Basalganglien, in der Substantia Nigra Pars Reticulata und in Schichten des Kortex immunhistochemisch nachgewiesen (Egertová, et al., 2000). Andere Studien haben ebenfalls gezeigt, dass der CB<sub>1</sub>-Rezeptor in diesen Regionen bei der Ratte und anderen Säugetieren vorhanden ist (Herkenham, et al., 1990; Moldrich, et al., 2000; Pettit, et al., 1998; Cristino, et al., 2006).

Analysen der Physiologie und des Verhaltens von CB<sub>1</sub>-R-knockout Mäusen haben wichtige Informationen über die Funktion des CB<sub>1</sub>-Rezeptors für das Lern- und Erinnerungsvermögen, Analgesie, Appetit-Regulation, Neuroprotektion und Endocannabinoid-induzierte retrograde Verbreitung von Signalen an Synapsen gezeigt (Elphick, et al., 2010).

Es wurde gezeigt, dass Cannabinoid-Rezeptoren in peripheren und zentralen Schmerzbahnen vorkommen (Guindon, et al., 2009). Klinisch relevant dabei ist, dass im Tierversuchsmodell gezeigt werden konnte, dass eine systemische oder zentrale Applikation von Cannabinoiden bzw. Endocannabinoiden das Endocannabinoid-System so moduliert werden kann, dass es zu einer Reduktion von akuten, chronisch entzündlichen und neuropathischen Schmerzen führen kann (Guindon, et al., 2009).

Somit könnte das Endocannabinoid-Effektor-Rezeptor-System auch relevant in schmerzassoziierten Prozessen nach einer spinalen Rückenmarkverletzung sein und sollte entsprechend der vorgelegten Arbeit untersucht werden.

### **1.3. Das Kontusionsmodell**

Die in der vorgelegten Arbeit untersuchten Gewebe wurden bei Experimenten an Ratten gewonnen, bei denen in hoch standardisierter Form Rückenmarkverletzungen unterschiedlicher Stärke appliziert wurden (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008). Bei diesem Kontusionsmodell wurde der Infinite Horizon Impactor (von Precision Systems and Instrumentations (PSI)) verwendet, bei dem durch einen Stempel Kontusionen genau definierter Stärken auf das Rückenmark Computer gestützt appliziert werden können (Scheff, et al., 2003). Dieses Modell ermöglicht durch eine elektromechanisch und Software basierte Manipulation, hoch standardisierte Kontusionsverletzungen unterschiedlichen Schweregrads am Rückenmark einer Ratte oder Maus nach vorangegangener Laminektomie zum Beispiel auf der Höhe Th9 durchzuführen (Scheff, et al., 2003). Dabei wird durch einen über dem frei präparierten Rückenmark positionierten Kupferstempel mittels Aktivierung des

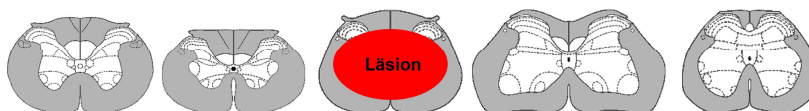
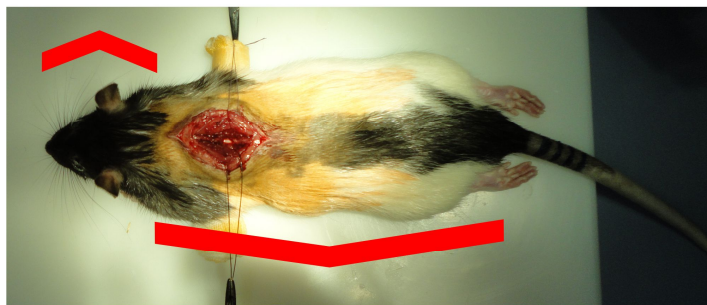


entsprechenden Computerprogramms die jeweilige Läsion appliziert (Scheff, et al., 2003). Durch interaktive Messungen können hierbei eine hohe Standardisierbarkeit und Wiederholbarkeit des Experiments bei vorher festgelegter Kraft erreicht werden (Scheff, et al., 2003).

Mit diesem Modell können Rückenmarkkontusionen induziert werden, die denen von Patienten nach Rückenmarkverletzung sehr ähnlich sind: Der Großteil der Verletzungen von Patienten entspricht der Kontusion und damit inkompletten Verletzung des Rückenmarks (Hulsebosch, 2002). Bei dieser Form der Verletzung werden im Rückenmark noch Informationen partiell oder inadäquat über erhaltene Gewebebrücken weitergeleitet (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008). Es kann zu Fehlfunktionen wie zum Beispiel Spastik oder zentralen neuropathischen Schmerzen kommen (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008). Als Korrelat für letzteres waren in dem Modell in standardisierten Verhaltenstests, bei denen die Berührungs- und Wärmeempfindlichkeitsschwellen für die einzelnen Tiere erhoben wurde, langanhaltende Überempfindlichkeit und Allodynie nachweisbar (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008).

Als spinale Traumamodell und Modell der Entstehung posttraumatischer neuropathischer Schmerzen war es daher gut geeignet, um den im Folgenden zusammengefassten

### Änderungen ebenfalls auf supraspinaler Ebene?



#### spinale Ebene

- Läsion und Läsionsrand
  - ventrolaterale weiße Substanz
  - Hinterhörner
  - Hinterstränge
- posttraumatische Inflammation
  - Einfluss auf regenerative Prozesse
  - akute post-operative Schmerzen
  - chronische (zentrale neuropathische) Schmerzen

Knerlich-Lukoschus, Friederike, et al.  
Force-dependent development of neuropathic central pain  
and time-related CCL2/CCR2 expression after graded spinal  
cord contusion injuries of the rat. Journal of Neurotrauma. 2008  
25(5), pp. 427-448

Fragestellungen unter standardisierten Bedingungen nachzugehen.

**Abbildung 4: Änderungen ebenfalls auf supraspinaler Ebene?** Bild von der standardisierten operativen Rückenmarkkontusion. Spinale Schädigung auf Höhe Th9. Schematische Rückenmarksdarstellung aus (Paxinos, et al., 2007), Text und Darstellung mit freundlicher Genehmigung von PD Dr.med. F. Knerlich-Lukoschus aus Ihrer Habilitationsschrift „Chemokine und Chemokine-Rezeptoren in der sekundären Schadenskaskade nach experimentellem spinalen Trauma in der Ratte“ von 2011.

## 1.4. Zielsetzung und Fragestellung

Aufgrund der Involvierung in neuromodulatorische Prozesse ist das Cannabinoid- und Chemokine-Netzwerk potentiell in sekundäre Schadenskaskaden involviert, die über die spinale Ebene hinaus an der Entstehung neuropathischer Schmerzen bzw. kognitiver und emotionaler Probleme beteiligt sind, die den Spätverlauf nach einem spinalen Trauma wesentlich beeinflussen können. In der vorgelegten Arbeit sollte daher die Expression des Cannabinoid-Rezeptors 1 (CB<sub>1</sub>-R) auf Gehirnebene in einem spinalen Läsionsmodell der Ratte (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008) detailliert untersucht und in Relation zur Expression pro-inflammatorischer Chemokine dargestellt werden.

In der vorgelegten Arbeit sollten im Einzelnen:

1. Das anatomische Expressionsmuster des Cannabinoid-Rezeptors 1 (CB<sub>1</sub>-R) auf Gehirnebene mittels immunhistochemischer Analysen ermittelt werden;
2. die Immunreaktivitätsdichten in den identifizierten anatomischen Regionen semiquantitativ an unterschiedlichen Zeitpunkten (Tag 7 und 42 nach Läsion) nach verschieden starken Rückenmarksläsionen (Kontrolle, 100 kdyn, 200 kdyn) ermittelt und ausgewertet werden;
3. die zellulären Expressionsmuster mittels Immun-Fluoreszenz-Mehrfachmarkierungen mit den entsprechenden zellulären Markerantikörpern ermittelt werden;
4. die mögliche Involvierung der CB<sub>1</sub>-R-Expression in die Schmerzverarbeitung bzw. -regulation mittels Immun-Mehrfachmarkierungen mit schmerzassoziierten Markerantikörpern (NeuN, TRPV1/TRPV1-P) untersucht werden;
5. und schließlich ein möglicher Zusammenhang mit der Expression der Chemokine (CCL2, CCL3) bzw. ihrer Rezeptoren (CCR2, CCR1) auf Gehirnebene mittels entsprechender Mehrfachfluoreszenzfärbungen untersucht werden.

Diese Ergebnisse sollten schließlich im Zusammenhang mit den zuvor ermittelten Verhaltensdaten (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008) interpretiert werden.

Diese Untersuchungen sollten damit zu einem tieferen Verständnis posttraumatischer neuropathischer Schmerzen beitragen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Versuchstiere und Gewebeentnahme

Für die Studie wurden männliche Long-Evans Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 200 g bis 225 g zu Versuchsbeginn verwendet. Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen mit einem 12 Stunden Tag und 12 Stunden Nacht Rhythmus gehalten. Vor Beginn der Versuche wurden die Tiere sieben Tage an die Versuchsanordnungen und die durchführende Person gewöhnt.

Alle Versuche wurden von dem Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein genehmigt (V312–72241.121–35(34–4/05), V 312–72241.121–35(77–6/09)).

Die Ratten wurden in verschiedene Läsions- und Überlebenszeitgruppen eingeteilt (s. Tab. 2).

Überlebenszeit	Kontrollgruppe	Gruppe mit leichter Läsion	Gruppe mit schwerer Läsion
7 Tage nach Operation (7-DPO)	Nur Laminektomie	100 kdyn	200 kdyn
42 Tage nach Operation (42-DPO)	Nur Laminektomie	100 kdyn	200 kdyn

**Tabelle 1: Schema der Einteilung der Ratten in Fall- und Kontrollgruppen**

1 dyn entspricht  $1 \text{ g} \times \text{cm/s}^2$  und ist zu  $10^{-5} \text{ N}$  äquivalent, so dass sich daraus ergibt, dass die Läsionen mit 1 N in der leichten Läsionsgruppe und 2 N in der schweren Läsionsgruppe beigebracht wurden.

In diesem spinalen Traumamodell, das bereits als Modell des post-traumatischen zentralen Schmerzes etabliert wurde (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008), wurden Kontusionen der unterschiedlichen Schweregrade standardisiert appliziert. Diese Kontusionen wurden mit dem „Infinite-Horizon-(IH)-Impactor“ (Precision System and Instrumentation (PSI), Lexington, KY, USA) appliziert (siehe Einleitung 1.4).

An den Endpunkten der jeweiligen Überlebenszeitphasen wurden die Tiere mit einer Überdosis Narkotika getötet. Danach wurden die Tiere mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) und 4% Paraformaldehyd (PFA) kardial perfundiert und die Gehirne und die Rückenmäcker für die spätere histologische Untersuchung frei präpariert und entnommen. Die Gewebe wurden in 30% Zuckerlösung cryoprotectiert und bei  $-80^\circ \text{C}$  eingefroren. Zur weiteren histologischen Untersuchung der Gewebe wurden  $10 \mu\text{m}$  dicke transversale Serienschnitte auf Objektträgern fixiert.

## 2.1.2. Antikörper

Tabelle 2: Auflistung der für die Immunhistochemie verwendeten Antikörper:

Name	Spezifität	Epitope und Verdünnungen	Firma/ Hersteller
CB <sub>1</sub> -R	Cannabinoid-1-Rezeptor	Aminosäure 1-13 des C-Terminus des Ratten CB <sub>1</sub> -R, Rabbit-anti-Rat CB <sub>1</sub> -R,	Egertová & Elphick, University of London, UK, (Egertová, et al., 2000)
CB <sub>1</sub> -R	Cannabinoid-1-Rezeptor	Aminosäure 1-99 des N-Terminus des CB <sub>1</sub> -R, Rabbit-anti-Rat CB <sub>1</sub> -R	AffinityBioReagents, Golden, CO, USA; Cat. #PA1-743
<b>Chemokin-Liganden/-Rezeptor Antikörper</b>			
CCL2 (MCP-1)	Monocyte Chemotactic Protein 1	Ratten MCP-1, Rabbit-anti-Rat polyklonales IgG; 1:250 (IHC, IF)	Peprotech, Hamburg, Deutschland; Cat. #500P76
CCR2	Chemokin Rezeptor Typ 2 CCL2 spezifisch	CCR2-Peptid, Rabbit-anti-Rat polyklonales IgG; 1:100 (IHC), 1:50 (IF)	Sigma, MO, USA; Cat. #2991; Epitomics, CA, USA; Cat. #2069-1
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	Macrophage Inflammatory Protein 1 $\alpha$	Ratten MIP-1 $\alpha$ , Rabbit-anti-Rat polyklonales IgG; 1:250 (IHC, IF)	Acris, Hiddenhausen, Deutschland; Cat. #PP038P1/P2
CCR1	Chemokin Rezeptor Typ 1, CCL3 spezifisch	CCR-1 Peptid (2 <sup>nd</sup> extracellular domain), Rabbit-anti-Rat polyklonales IgG; 1:100 (IHC, IF)	Acris, Hiddenhausen, Deutschland; Cat. #SP4001P
<b>Phenotypische Zellmarker-Antikörper</b>			
GFAP	Glial fibrillary acidic protein: Astrozyten	Maus GFAP, Maus monoklonales IgG; 1:500	Millipore/ Chemicon, Schwalbach, Deutschland; Cat. #MAB3402
NeuN	Neuron specific nuclear protein: Neurone	Zellkerne von Mausgehirn, Maus monoklonales IgG; 1:1000	Millipore/ Chemicon, Schwalbach, Deutschland; Cat. #MAB377

Sekundärantikörper			
Biotin-SP-conjugated AffiniPure F(ab') <sub>2</sub> -Fragment Donkey-anti-Rabbit IgG	Hasen-Antikörper	H+L-Ketten von F(ab') <sub>2</sub> -Fragments von Hasen-Antikörpern, Donkey-anti-Rabbit;	Jackson ImmunoResearch Lab. Inc. Baltimore, PA, USA; Cat. #711-065-152
Alexa Fluor 555, Fluorophore labelled Goat-anti-Rabbit antibodies	Hasen-Antikörper	H+L-Ketten von Hasen-Antikörpern, Goat-anti-Rabbit; 1:1000	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland; Cat. #A-31572
Alexa Fluor 488, Fluorophore labelled Donkey-anti-Rabbit antibodies	Hasen-Antikörper	H+L-Ketten von Hasen-Antikörpern, Donkey-anti-Rabbit; 1:500	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland; Cat. #A-21206

### 2.1.3. Biochemikalien

Tabelle 3: Auflistung der für die Färbungen verwendeten Biochemikalien

Bovine Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
3,3',-Diaminobezidin (DAB)	Roche, Mannheim, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dinatriumphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendinitrilotetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland
Eukitt®	O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
Immumount®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Mayers' Hämalaun	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Normalserum – Esel	Jackson ImmunoResearch Lab. Inc. Baltimore, PA, USA

Normalserum – Pferd	Jackson ImmunoResearch Lab. Inc. Baltimore, PA, USA
Normalserum – Ziege	Jackson ImmunoResearch Lab. Inc. Baltimore, PA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Roti-Mount®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Roticlear®	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Merck, Darmstadt, Deutschland
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Xylol	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland

#### 2.1.4. Gebrauchsfertige Kits

Vectastain® Avidin-Biotin-Complex Kit

Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

#### 2.1.5. Lösungen, Puffer

DAB-Lösung

6 mg DAB  
10 ml 0,1M TRIS  
10 µl 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
pH 7,6

PBS-Puffer

(Phosphate buffered saline)

0,6 mg KCl  
24 g NaCl  
4,32 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> \* 2H<sub>2</sub>O  
0,72 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
pH 7,4

TBS-Puffer

(TRIS buffered saline)

20 mM TRIS  
0,14 M NaCl  
1 mM EDTA  
0,1 % Tween-20  
pH 7,5

### **2.1.6. Verbrauchsmaterialien**

Deckgläser	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Objektträger	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR Gefäß (0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Standard Reaktionsgefäß 3810X (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

### **2.1.7. Geräte**

AxioCam MRc5	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Eppendorf Reference® Pipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Infinite-Horizon-(IH)-Impactor	Precision System and Instrumentation (PSI), Lexington, KY, USA
Mikroskop Axiovert 200	Carl Zeiss Lichtmikroskopie, Göttingen, Deutschland
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach, Deutschland

### **2.1.8. EDV-Programme**

Adobe Photoshop Elements 8	Adobe Systems Incorporated, San Jose, CA, USA
AxioVision Zeiss	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen, Deutschland
IBM SPSS Statistics (v. 15.0)	IBM Company, Somers, NY, USA
ImageJ 1.41o	National Institute of Health, USA
Microsoft® Office Excel® 2007 und 2016	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Microsoft® Office Word® 2007 und 2016	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Immunhistochemie**

#### ***2.2.1.1. Einfachmarkierungen***

Zu Beginn wurden die kryofixierten Schnitte mit einer Schichtdicke von ungefähr 10 µm in einer Lösung aus 4 % Paraformaldehyd in PBS mit pH 7,4 für 30 Minuten nachfixiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS wurden die Schnitte in PBS gelöstem 0,3 % Triton X-100 und 0,3

% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 Minuten inkubiert. Darauf folgte ein zweimaliges Waschen für je 10 Minuten in PBS. Um unspezifische Bindungen des Zweitantikörpers zu verhindern erfolgte dann die Blockierung mittels 10 % Normalserum-Pferd gelöst in PBS für 60 Minuten. Anschließend wurden die Schnitte mit dem primären CB<sub>1</sub>-Rezeptor-Antikörper, (Professor M.R. Elphick, School of Biological Sciences, Queen Mary University of London, UK), mit 0,3 % Triton X-100 und 2 % Normalserum-Pferd gelöst in PBS über Nacht bei 4° C inkubiert.

Darauf folgte ein dreimaliges Waschen der Schnitte für je 10 Minuten in PBS. Nach dem Waschen wurden die Schnitte mit dem biotynilierten Zweitantikörper in einer 1:200 Lösung in PBS und 1,5 % Normalserum-Pferd für 60 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden weitere zwei Male in PBS für je 10 Minuten gewaschen und dann mit dem Avidin-Biotin-Complex (ABC) für 60 Minuten inkubiert. Dazu wurden aus dem kommerziellen ABC-Kit je zwei Tropfen der Lösung A und B in 5ml PBS gelöst. Nach zwei weiteren Waschschritten in PBS für je 10 Minuten wurden die Schnitte in der DAB-Lösung für 5 Minuten gefärbt. Die Färbungsreaktion wurde durch Zugabe von destilliertem Wasser unterbrochen und die Schnitte mit Mayers' Hämalan für 30-60 Sekunden gegengefärbt. Anschließend wurden die Schnitte für 10 Minuten mit Leitungswasser gespült. Darauf folgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe von 70 %, 80 %, 95 % und 100 % Ethanol für je fünf Minuten. Abschließend wurden die Schnitte drei Mal in Xylol für je 10 Minuten gereinigt und schließlich mit Eukitt eingedeckelt.

Entsprechende Kontrollen wurden zum einen ohne Verwendung des primären Antikörpers und zum anderen mit Färbungen gegen den Primärantikörper mit 10-fachem Überschuss des Kontrollpeptids von CB<sub>1</sub>-Rezeptor, dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von Professor Elphick, durchgeführt. Zudem wurden Hasen IgG-Antikörper in gleicher Art und Weise zur Kontrolle der Hintergrundfärbung verwendet.

Die Spezifität des C-terminalen CB<sub>1</sub>-Antikörpers wurde im Vorfeld von Egertová und Elphick (Egertová, et al., 2000) eingehend getestet.

Kontrollen des N-terminalen CB<sub>1</sub>-Antikörpers beinhalteten Western-Blot Untersuchungen von Hirngewebe der Ratten.

### ***2.2.1.2. Mehrfachmarkierung mittels Immunofluoreszenz***

Zur Darstellung der Koloalisationen des CB<sub>1</sub>-Rezeptors und der Chemokine CCL2 und CCL3 sowie deren Rezeptoren CCR2 und CCR1 wurden Immunofluoreszenz-Doppelfärbungen durchgeführt.



Zu Beginn wurden die kryofixierten Schnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm in einer 1:1 Lösung aus Aceton und Methanol für 10 Minuten nachfixiert. Nach dreimaligem Waschen in TBS/ Tween-20 für je 10 Minuten wurden die Schnitte für je 2 Minuten erst in 20 % danach in 70 % Ethanol dehydriert. Darauf folgte eine 10-minütige Inkubation in Sudanschwarz 1:100 gelöst in 70 % Ethanol. Die folgende Hydratation der Schnitte erfolgte erst in 70 % Ethanol für 2 Minuten und danach in 20 % Ethanol für 2 Minuten. Danach wurden die Schnitte dreimal für 10 Minuten in TBS/ Tween-20 gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 60-80 Minuten in 0,1 % BSA und 0,2 % Glycin gelöst in TBS bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte die Inkubation mit dem ersten Primärantikörper, gegen den CB<sub>1</sub>-R gerichtet, in TBS/ Tween-20 für 24 Stunden bei 4° C.

Am zweiten Tag der Färbung wurden die Schnitte wiederum dreimal für 10 Minuten in TBS/ Tween-20 gewaschen. Darauf folgte die Inkubation mit dem ersten Sekundärantikörper für eine Stunde bei 37° C, wobei die Schnitte ab hier nur noch in Aluminium verpackt gehalten wurden um sie möglichst vor Licht zu schützen. Nach weiteren drei Waschungen á 10 Minuten in TBS/ Tween-20 erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Primärantikörper, gerichtet gegen die Chemokine CCL2 oder CCL3 bzw. deren Rezeptoren CCR2 oder CCR1, wiederum für 24 Stunden bei 4° C.

Am dritten Tag wurden die Schnitte dreimal in TBS/ Tween-20 für je 10 Minuten gewaschen und mit dem zweiten Sekundärantikörper für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte einmal 10 Minuten in TBS/ Tween-20 und zweimal für 10 Minuten in TBS gewaschen. Danach für 45 Minuten mit DAPI inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen für je 10 Minuten in TBS und ein abschließendes Ausspülen in destilliertem Wasser. Danach wurden die Schnitte mit Immumount eingedeckelt.

Es erfolgten hier ebenfalls Kontrollfärbungen ohne den Primärantikörper sowie mit rekombinanten CCL-2 und CCL-3 IgG-Antikörpern. Auch eine Kontrolle der Hintergrundfärbung mit Hasen IgG-Antikörpern wurde in gleicher Art und Weise durchgeführt. Eine Western-Blot Analyse der Chemokin- und Chemokin-Rezeptor-Antikörper wurde durchgeführt.

### 2.2.2. Erstellung und Auswertung der Bilddateien

Die angefertigten Schnitte wurden unter dem Mikroskop Axiovert 200 beurteilt und mit dem Programm AxioVision abfotografiert und gespeichert. Es wurden Bilder in 20-facher, 100-facher, 200-facher und 400-facher Vergrößerung der unterschiedlichen Regionen erstellt. Diese wurden als .zvi (Zeiss AxioVision) und .tiff (Tagged Image File Format) Dateien zur weiteren Verarbeitung gespeichert.

Die histologischen Nachweise der Rezeptoren wurden mit Hilfe des Atlas „The Rat Brain – in stereotaxic coordinates“ (Paxinos, et al., 2007) anatomischen Kerngebieten und Regionen zugeordnet (s. Tabelle 4).

Mit dem Programm ImageJ wurden dann die einzelnen Bilder semiquantitativ densitometrisch ausgewertet. Dazu wurde die RGB-Skala von 0 bis 255 verwendet, wobei der Wert 0 der Farbe Schwarz und der Wert 255 der Farbe Weiß entsprach.

Mit der „Freehand-Selection“ wurde die zu messende Region ausgewählt. Mit der Funktion „Measure“ konnte danach die Fläche sowie der minimale und maximale RGB-Wert sowie der mittlere Durchschnitts-RGB-Wert der betrachteten Fläche gemessen werden (Mean Density). Diese wurden dann in eine Microsoft Excel-Tabelle den Regionen zugeordnet eingetragen. Nachdem alle Schnitte eines Tieres ausgewertet waren, wurde der durchschnittliche RGB-Wert der jeweiligen Region eines Tieres berechnet.

Parallel dazu erfolgte die Berechnung der durchschnittlichen RGB-Werte des nicht gefärbten Hintergrundes, also der Region des Schnittes, in der keine spezifische Färbung nachweisbar war.

Da der RGB-Wert der nicht gefärbten Regionen größer als jener der gefärbten Regionen war, wurde der RGB-Wert der gefärbten Region von dem RGB-Wert der nicht gefärbten Region abgezogen. Das ergab den Betrag des RGB-Wertes, um den die gefärbte Region dunkler war als der Hintergrund. Also den Betrag um den die Färbung der DAB-Reaktion stärker war als an nicht gefärbten Regionen.

Anschließend wurden die Mittelwerte der Kontrollgruppe, der Tiere mit einer leichten Kontusion und der Tiere mit einer schweren Kontusion für jeweils 7 Tage und 42 Tage für die jeweiligen Regionen gebildet. Diese Mittelwerte und dazugehörigen Standardabweichungen waren dann die Grundlage für die weitere statistische Analyse.

### **2.2.3. Statistische Analyse**

Die statistische Analyse erfolgte mit dem Programm SPSS. Es wurden die mit dem Programm ImageJ erhobenen Daten in Excel verwaltet und ausgewertet. In SPSS wurden einfaktorielle Varianzanalysen bzw. mehrfaktorielle Varianzanalysen mit dem ANOVA-Test, einer post-hoc Analyse mit dem Bonferroni-Test bzw. dem Tukey-Kramer Test und mit dem zweiseitigen Student-t-Test durchgeführt. Das untersuchte Signifikanz-Niveau wurde auf  $p < 0,05$  festgesetzt.

## **3. Ergebnisse**

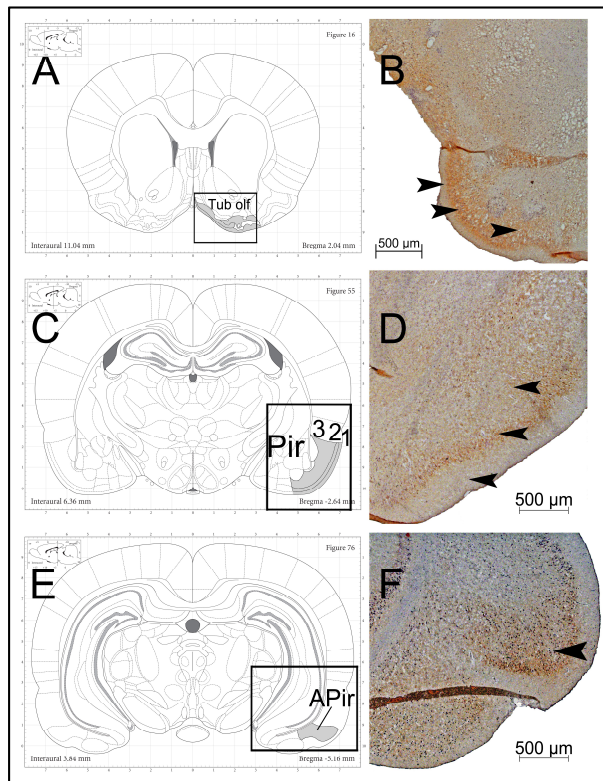
### **3.1. Expression des CB<sub>1</sub>-R in den Kontrollgruppen**

Der Cannabinoid-1-Rezeptor (CB<sub>1</sub>-R) wurde in den Kontrollgruppen in verschiedenen Arealen des Gehirns nachgewiesen. Eine immunhistochemische Färbung konnte im Telencephalon, in den Regionen und Kerngebieten der Regio praepiriformis, des Tuberculum olfactorium, des sensorischen Kortex, der Amygdala, des Hippocampus, der Mammillarkörper, des Cingulum, des Globus Pallidus und des Striatum nachgewiesen werden. Im Diencephalon erfolgte der Nachweis in verschiedenen Regionen der Thalamuskerngebiete. Im Mesencephalon erfolgte der Nachweis im periaquäduktalen Grau und in der Substantia nigra.

Die verschiedenen Regionen werden im Folgenden näher beschrieben.

### 3.1.1. Telencephalon

#### 3.1.1.1. Regio praepiriformis und Tuberculum olfactorium



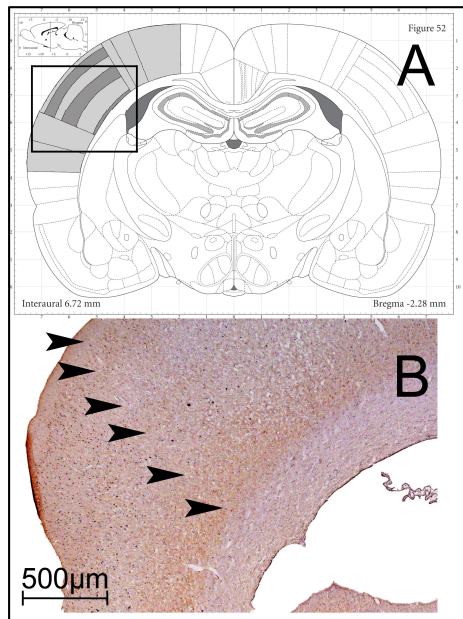
**Abbildung 5: CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität im Tuberculum olfactorium (Tub olf) (A, B), im Piriformen Kortex (Pir) (C, D) und in der amygdalopiriformen Übergangsregion (APir) (E, F) in den Kontrolltieren; A, C, E zeigt die untersuchten Areale in grau markiert aus Paxinos und Watson (2007); B, D, E, zeigen die jeweiligen Schnitte in 20-facher Vergrößerung. Bräunlich gefärbt sind die Regionen mit positivem Rezeptornachweis.**

Im Frontalhirn konnte der CB<sub>1</sub>-R in der Regio praepiriformis (Pir) und im Tuberculum olfactorium (Tub olf) nachgewiesen werden. Dargestellt in Abbildung 5 ist der Nachweis der Immunoreaktivität (IR) des CB<sub>1</sub>-R im Tub olf (B), in der Pir (D) und in der amygdalopiriformen Übergangszone (APir) (F).

In den Regionen des Tub olf, der Pir und der APir erfolgte der Nachweis des CB<sub>1</sub>-R in den Schichten 2 und 3. Schicht 1 war jeweils immunoreaktivitätsnegativ.

In Abbildung 5 Ausschnitte A, C und E sind die jeweiligen Schichten dargestellt und die Bildausschnitte aus B, D und F markiert.

### 3.1.1.2. Sensorischer Kortex

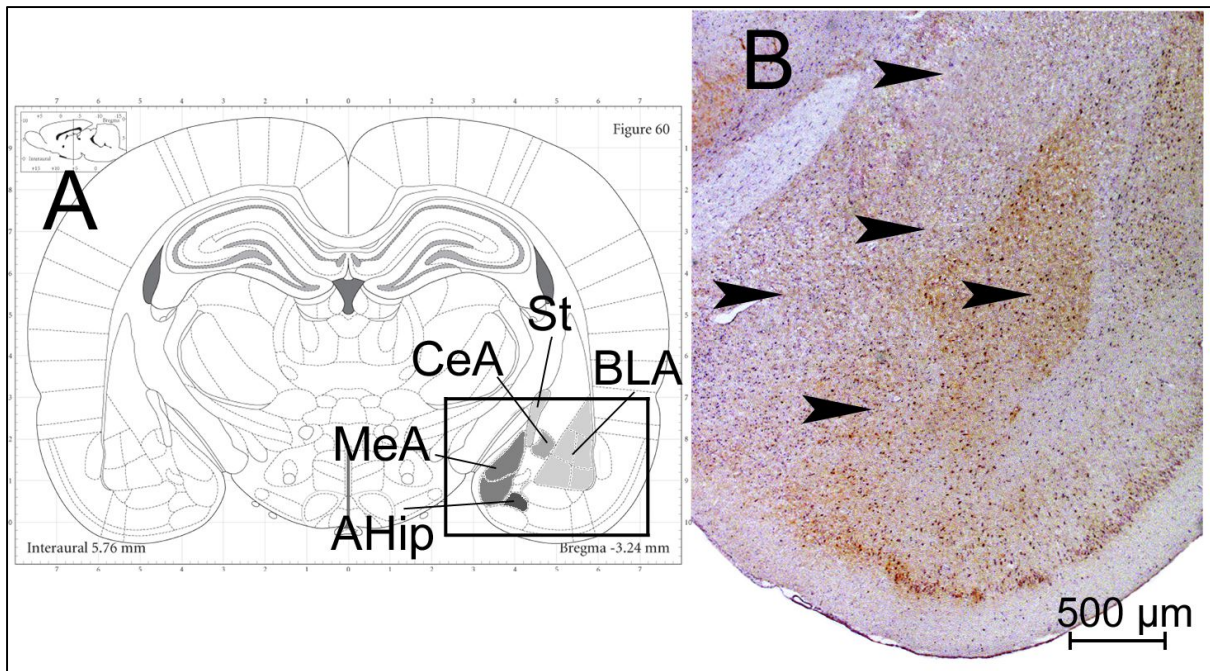


In Abbildung 6 ist der Nachweis des CB<sub>1</sub>-R im primär sensorischen Kortex dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass der CB<sub>1</sub>-R in den Schichten II, IV des primär sensorischen Kortex nachweisbar war (B). In den Schichten I, III und V konnte diese Immunoreaktivität nicht nachgewiesen werden. Die zentral davon liegende Capsula externa war ebenfalls immunonegativ.

**Abbildung 6: CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität des primär sensorischen Kortex (B); in A dargestellt und markiert ist der primär sensorische Kortex abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); In B mit Pfeilen markiert sind die Schichten I-VI des primär sensorischen Kortex (20-fache Vergrößerung).**

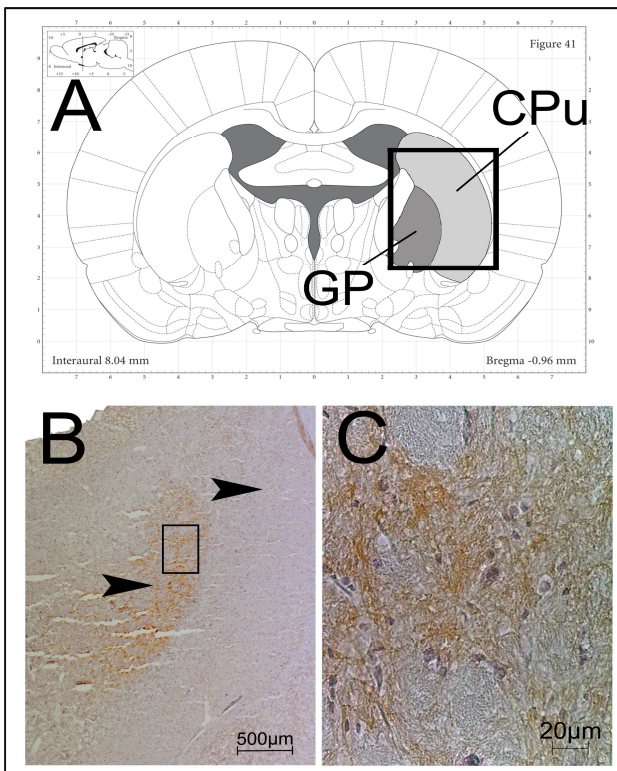
### 3.1.1.3. Amygdala

In der Amygdala konnte in mehreren Kerngebieten eine positive Immunreaktion des CB<sub>1</sub>-R nachgewiesen werden (s. Abb. 7). Homogen gefärbt waren die Ncl. amygdalae lateralis und basalis lateralis, im Folgenden als basolateraler Kernkomplex (BLA) zusammengefasst. Zudem konnte der CB<sub>1</sub>-R in der Hippocampus-Amygdala-Übergangszone (AHip) nachgewiesen werden. In der zentromedialen Kerngruppe, bestehend aus Ncl. amygdalae centralis (CeA) und Ncl. amygdalae medialis (MeA), sowie in der oberflächlichen Kerngruppe, bestehend aus den Ncl. amygdalae corticales und der Area amygdaloidea anterior, konnte keine Immunoreaktivität des CB<sub>1</sub>-R nachgewiesen werden. Die Stria terminalis (St) zeigte ebenfalls keine Immunopositivität. (s. Abb. 7).



**Abbildung 7: CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität der Amygdala (B);** in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus B abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); In B mit Pfeilen markiert sind von oben nach unten: 1. Stria terminalis; 2. Ncl. amygdalae centralis (CeA), 3. Ncl. amygdalae medialis (MeA, links im Bild); 4. basolateraler Kernkomplex (BLA, rechts im Bild); 5. Hippocampus-Amygdala Übergangszone (AHip); (20-fache Vergrößerung).

### 3.1.1.4. Globus Pallidus / Corpus Striatum



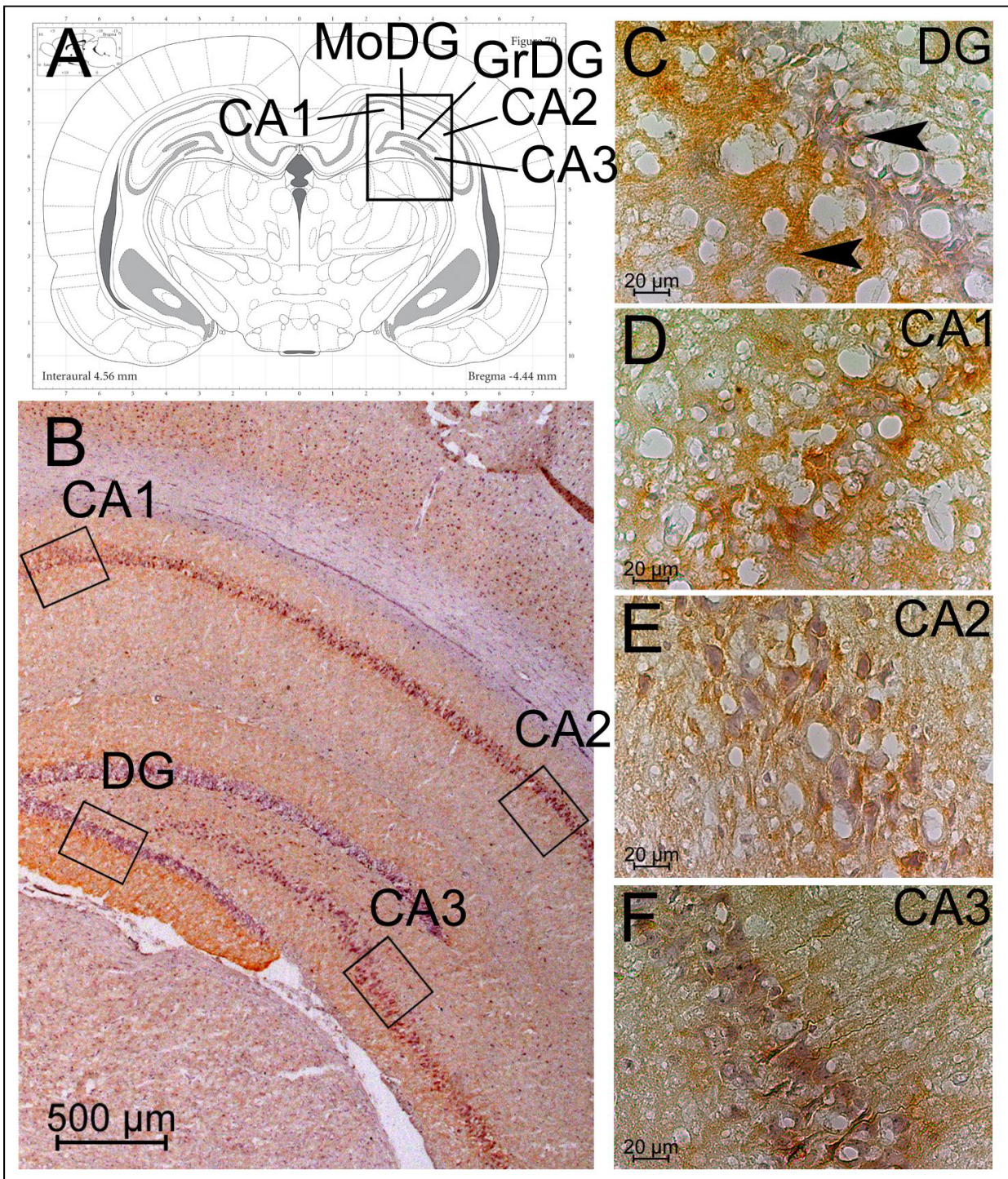
In Abbildung 8 ist die CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität des Corpus Striatum (CPu), bestehend aus Ncl. caudatus und Putamen, sowie des Globus Pallidus (GP) dargestellt. Es konnte eine schwache Färbung des CPu und eine starke Färbung des GP gezeigt werden. Hier zeigten sich inselförmige CB<sub>1</sub>-R immunonegative Areale (s. Abb. 8 C).

**Abbildung 8:** CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität des Corpus Striatum (CPu) und des Globus Pallidus (B); in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus B abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); In B mit Pfeilen markiert rechts das CPu und links der GP (20-fache Vergrößerung); In C dargestellt bei 400-facher Vergrößerung ist der markierte Ausschnitt aus B des GP.

### 3.1.1.5. Hippocampus

Im Hippocampus konnte eine Immunoreaktivität in mehreren Regionen nachgewiesen werden.

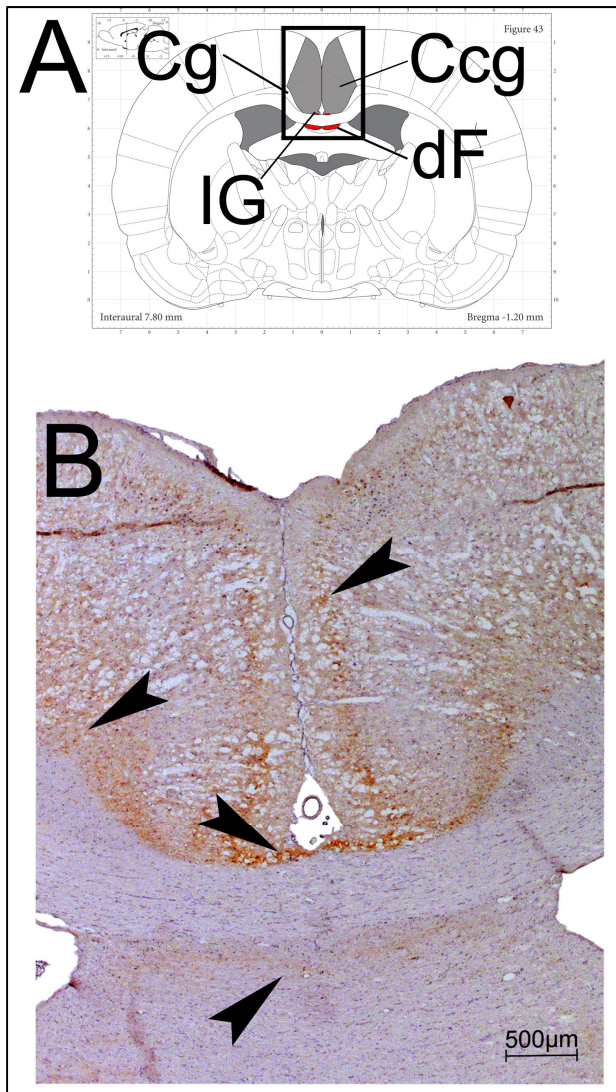
Dargestellt in Abbildung 9 sind die unterschiedlichen Regionen des Hippocampus in unterschiedlichen Vergrößerungen. Es konnte eine immunopositive Färbung des CB<sub>1</sub>-R im Stratum moleculare des Gyrus dentatus (MoDG) nachgewiesen werden (s. Abb. 9 C). Im Stratum granulare des Gyrus dentatus (GrDG) zeigten sich vereinzelte Färbungen von Zellkörpern (s. Abb. 9 C). Im Cornu Ammonis zeigte sich in den Subregionen CA1-CA3 im jeweiligen Stratum pyramidale eine starke Färbung in unmittelbarer Nähe zu den Nervenzellkörpern (s. Abb. 9 D-E).



**Abbildung 9: CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität des Hippocampus (B);** in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus B abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); In B sind die in C-F dargestellten Ausschnitte markiert (20-fache Vergrößerung); C: oberer Pfeil markiert das Stratum granulare (GrDG) des Gyrus dentatus (DG); unterer Pfeil markiert das Stratum moleculare (MoDG) des Gyrus dentatus (400-fache Vergrößerung); D-F zeigt das Stratum pyramidale der Subregionen CA1-CA3 des Cornu Ammonis (400-fache Vergrößerung).



### 3.1.1.6. Cingulum / Indusium Griseum / Fornix



In den Subregionen 1 und 2 des anterioren cingulären Kortex (Ccg) sowie im Cingulum (Cg) konnte der CB<sub>1</sub>-R nachgewiesen werden (s. Abb. 10). Im Ccg zeigte sich die immunopositive Färbung vor allem in den Schichten II, IV und VI (s. Abb. 10 B).

Im Indusium Griseum (IG) konnte eine CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität über den gesamten Verlauf nachgewiesen werden.

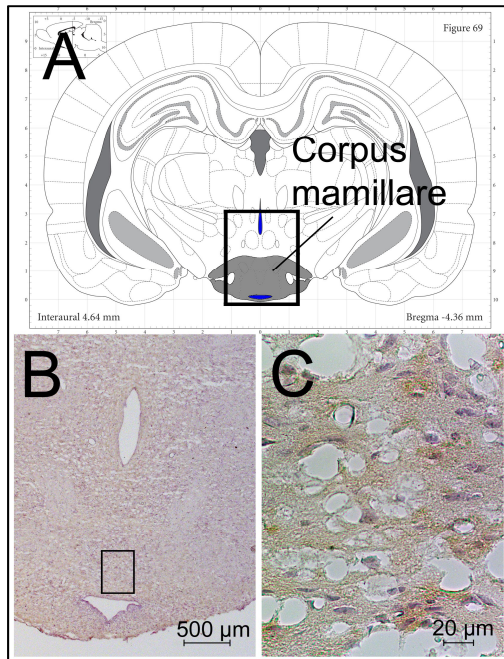
Der Fornix (dF) zeigte keine Immunoreaktivität. Das

dazwischenliegende Corpus callosum war ebenfalls immunonegativ.

**Abbildung 10:** CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität des Cingulum (Cg), des anterioren cingulären Kortex (Ccg), des Indusium griseum (IG), des Fornix (dF) (B); in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus B abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); In B sind von oben nach unten der Ccg, das Cg, der IG und der dF mit Pfeilen markiert (20-fache Vergrößerung).

### 3.1.1.7. Mamillarkörper

Im Corpus mamillare konnte eine schwache fleckförmige Immunreaktivität des CB<sub>1</sub>-R nachgewiesen werden. In Abbildung 11 ist dies in B und C dargestellt.



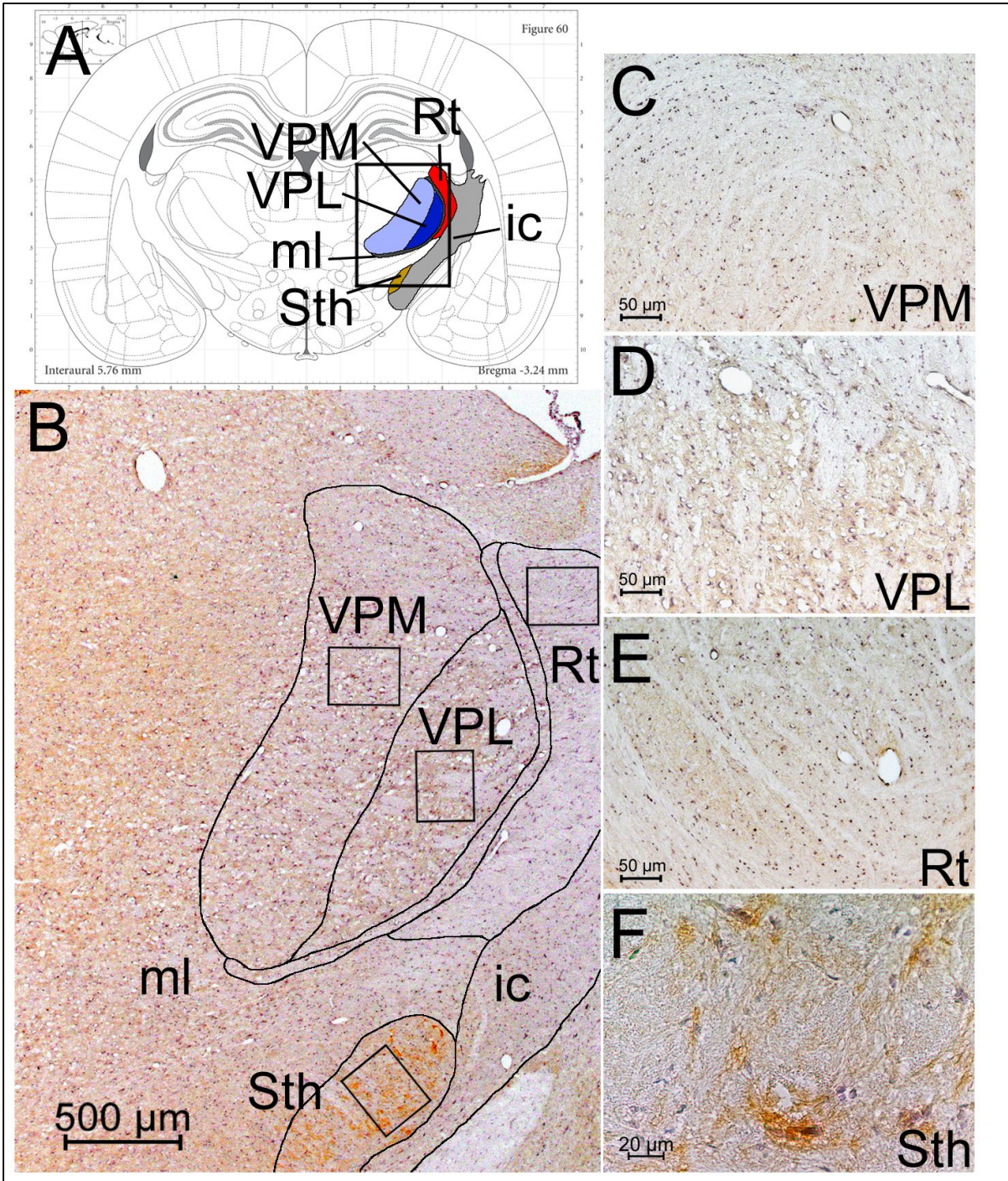
**Abbildung 11: CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität des Corpus mamillare (B);** in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus B abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); In B ist der in C dargestellte Ausschnitt markiert (20-fache Vergrößerung); C: dargestellte fleckförmige Verteilung des CB<sub>1</sub>-R (400-fache Vergrößerung).

## 3.1.2. Diencephalon

### 3.1.2.1. Thalamische Kerngebiete

In den spezifischen und unspezifischen Kerngebieten des Thalamus wurde der CB<sub>1</sub>-R im Ncl. ventralis posterolateralis (VPL) und im Ncl. ventralis posteromedialis (VPM) der ventralen Gruppe der Thalamuskerngebiete nachgewiesen. Der Ncl. reticularis (Rt) zeigte eine schwache Immunreaktivität des CB<sub>1</sub>-R. Der zum Thalamus ziehende Lemniscus medialis (ml), zwischen Rt und VPL gelegen, war immunonegativ in den Gehirnen der Kontrolltiere (s. Abb. 12). Ebenfalls schwach gefärbt waren die Ncll. posteriores thalami.

Im Hypothalamus konnte keine Immunreaktivität des CB<sub>1</sub>-R nachgewiesen werden. Der Subthalamus zeigte eine deutliche fleckförmige, streifige immunopositive Färbung (s. Abb. 12 F).

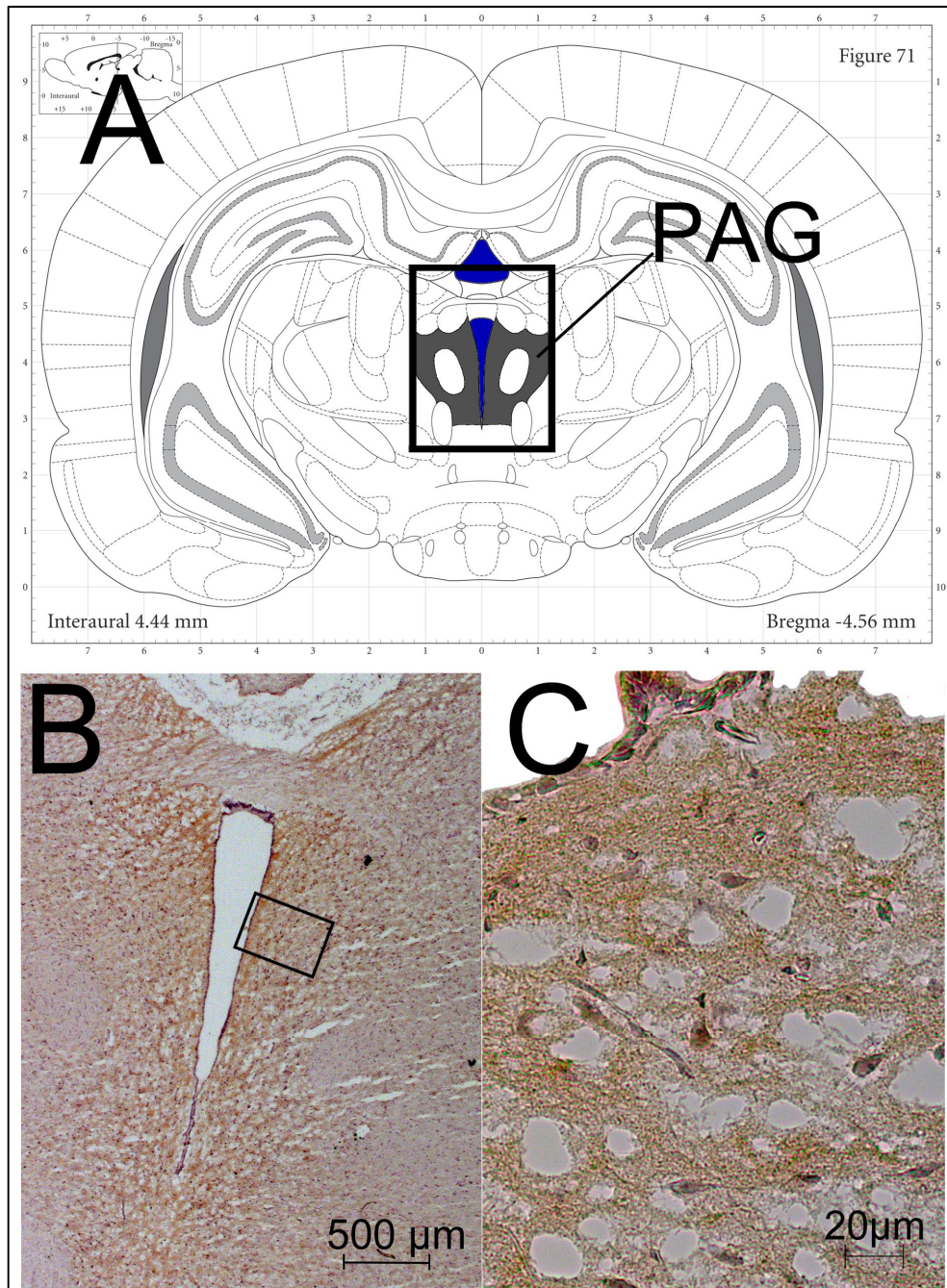


**Abbildung 12:** CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität der thalamischen Kerngebiete (B); in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus B abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); In B sind die in C-F dargestellten Ausschnitte markiert; Ncl. ventralis posteromedialis (VPM); Ncl. ventralis posterolateralis (VPL); Ncl. reticularis (Rt), Lemniscus medialis (ml); Capsula interna (ic); Subthalamus (Sth) (20-fache Vergrößerung); C: Ncl. ventralis posteromedialis (VPM); D: Ncl. ventralis posterolateralis (VPL); E: Ncl. reticularis (Rt); F: Subthalamus (Sth) (C-F in 400-facher Vergrößerung).

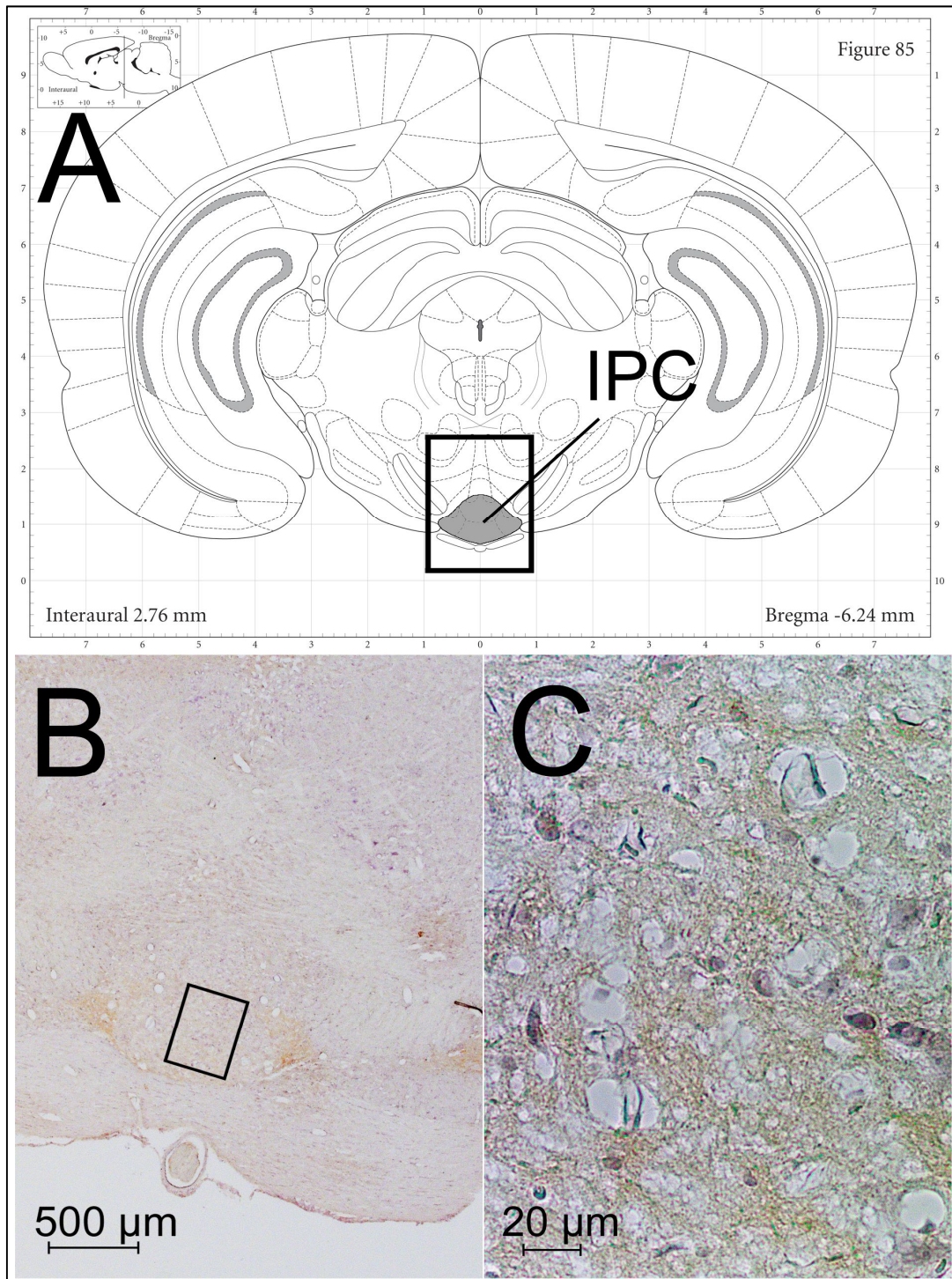
### 3.1.3. Mesencephalon

#### 3.1.3.1. Periaquäduktales Grau

Das periaquäduktale Grau (PAG) war bei den Kontrolltieren deutlich gefärbt. In Abbildung 13 dargestellt ist der Nachweis des CB<sub>1</sub>-R im PAG. Im Nucleus Interpeduncularis (IPC) zeigte sich eine schwache, immunopositive Färbung (s. Abb. 14).



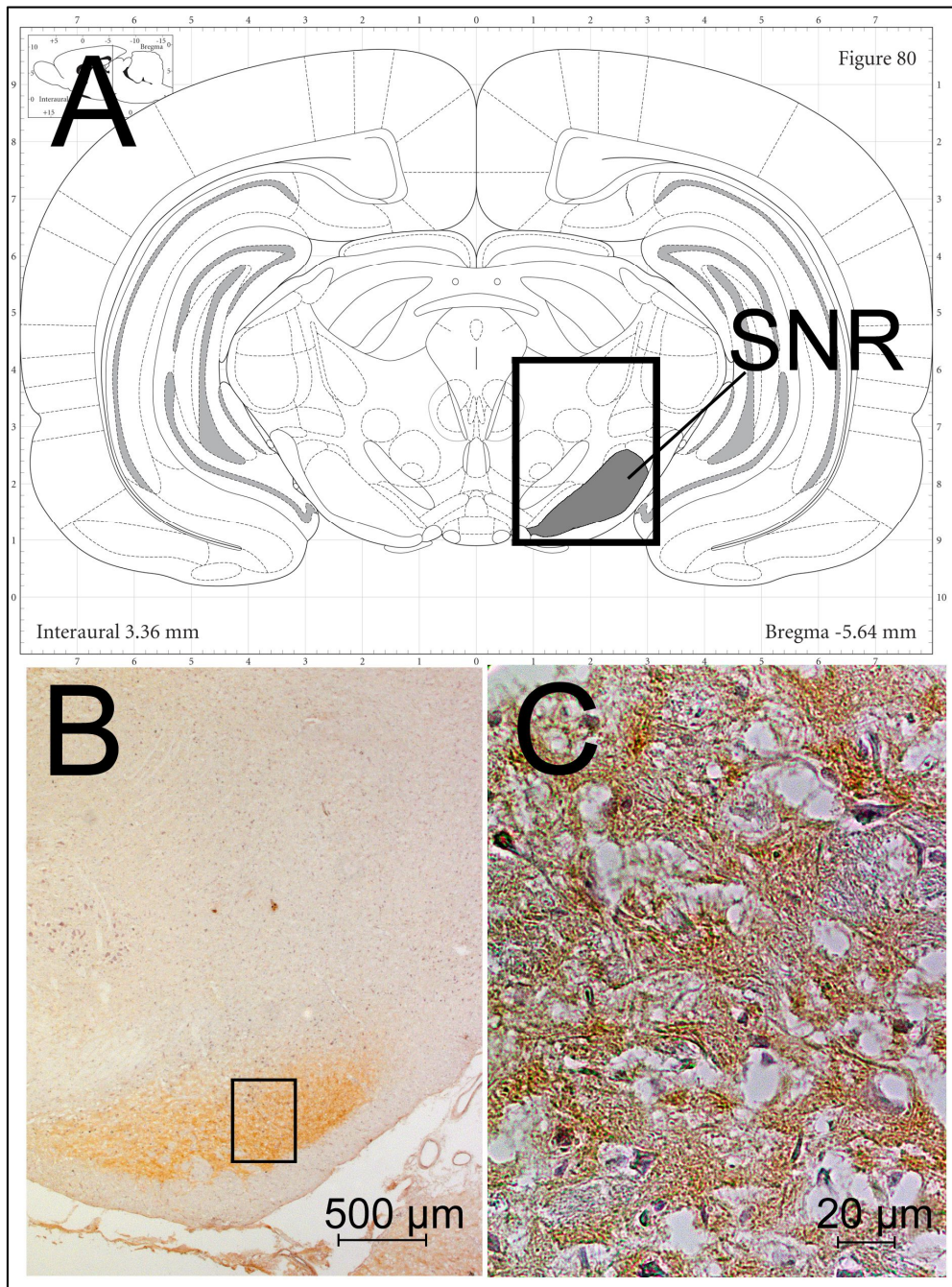
**Abbildung 13:** CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität des periaquäduktalen Grau (PAG) (B); in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus B abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); In B ist der in C dargestellte Ausschnitt markiert (20-fache Vergrößerung); C: PAG (400-fache Vergrößerung).



**Abbildung 14:** CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität des Ncl. interpeduncularis (IPC) (B); in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus B abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); in B ist der in C dargestellte Ausschnitt markiert (20-fache Vergrößerung); C: IPC (400-fache Vergrößerung).

### 3.1.3.2. Substantia nigra

In Abbildung 15 dargestellt ist die auffällig starke Färbung der Substantia nigra Pars reticularis. Hier konnte eine starke Färbung des Fasernetzwerkes nachgewiesen werden.



**Abbildung 15:** CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität der Substantia nigra Pars reticularis (B); in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus B abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); In B ist der in C dargestellte Ausschnitt markiert (20-fache Vergrößerung); C: SNR (400-fache Vergrößerung).

### 3.2. Expression des CB<sub>1</sub>-R in den Läsionstieren

Im Vergleich der Kontrolltiere mit den Läsionstieren konnten in einigen der oben dargelegten anatomischen Gehirnareale deutliche Unterschiede bzgl. der Expressionsmuster und Expressionsdichte des CB<sub>1</sub>-R nachgewiesen werden. Einen Überblick zeigt Tabelle 4.

Dazu zählten u.a. der primär sensorische Kortex, die Substantia nigra Pars reticularis, das Indusium griseum, der Hypothalamus, der Subthalamus, das Claustrum, das Striatum und der Globus Pallidus (siehe Tabelle 4). Verglichen wurden die unterschiedlichen Kerngebiete der Kontrollgruppe mit den Kerngebieten der leichten Läsionsgruppe (100 kdyn) und schweren Läsionsgruppe (200 kdyn) zu einem frühen Zeitpunkt, 7 Tage nach der Operation (DPO 7) und zu einem späten Zeitpunkt 42 Tage nach der Operation (DPO 42). Im Folgenden werden die nachgewiesenen signifikanten Änderungen des Expressionsmusters des CB<sub>1</sub>-R eingehend beschrieben.

Anatomische Region	DPO 7			DPO 42		
	Sham	100kdyn	200kdyn	Sham	100kdyn	200kdyn
Tub olf	+	+	+	+	+	+
Pir	+	+	+(+)	+	+	++
APir	(+)	-	-	(+)	-	-
<i>Sensorischer Kortex</i>						
Schicht I	-	-	-	-	-	-
Schicht II	+	+	+	+	+	+
Schicht III	-	-	-	-	-	-
Schicht IV	+	+	+	+	+	+
Schicht V	-	-	-	-	-	-
Schicht VI	+	+	+	+	+	+
<i>Amygdala</i>						
BLA	+++	+	+	+++	+	+
AHip	+++	+	+	+++	+++	+
MeA	-	-	-	-	-	-
CeA	-	-	-	-	-	-
St	-	-	-	-	-	-
dF	-	-	-	-	-	-
Corpus mamillare	+	+	+	+	+	+
Cg/ Ccg	++	+	+	++	+++	+
RSG b/c	+	+	+	+	+	+
SNR	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GP	++	++	++	++	++	++
CPu	+	+	+	+	+	+
Claustrum	-	-	-	-	-	-
VCl/Den	-	-	-	-	-	-

<i>Hippocampus</i>						
MoDG	+++	+	+++	+++	+	+++
GrDG	+++	+	+++	+++	+	+++
CA1	++	+	+	++	++	+++
CA2	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)	+(+)
CA3	++	+++	+++	++	+++	+++
IG	++	++	++	++	++	++
<i>Thalamus</i>						
VPM	-	+	+	+	+++	++
VPL	-	+	+	+	+++	++
Rt	(+)	++	+	(+)	++	+
Hypothalamus	-	(+)	-	-	(+)	-
Sth	++	++	++	++	++	++
Colliculus superior	-	-	-	-	-	-
IPC	+	+	+	+	+	+
PAG	++	+	+	++	++	+
LSO	+	+	+	+	+	+

**Tabelle 4: Vergleich der gemessenen Expression des CB<sub>1</sub>-R, sortiert nach Region.** Tage post operationem (DPO); Kontrolltiere (Sham); Läsionstiere der Gruppen 100 kilodyn (kdyn) bzw. 200 kilodyn (kdyn); Tuberculum olfactorium (Tub olf), Regio praepiriformis (Pir), Amygdalopiriforme Übergangszone (APir), primär sensorischer Kortex, Amygdala: Ncl. amygdalae lateralis und basalis lateralis (BLA), Hippocampus-Amygdala-Übergangszone (AHip), Ncl. amygdalae medialis (MeA), Ncl. amygdalae centralis (CeA), Stria terminalis (St), Fornix (dF), Corpus mamillare, Cingulum (Cg) und anteriorer cingulärer Kortex (Ccg), Retrosplenialer granulärer Kortex Region b und c (RSG b/c), Substantia nigra Pars reticularis (SNR), Globus Pallidus (GP), Striatum (CPu), Claustrum, ventrales Claustrum (VCI) und dorsaler endopiriformer Nucleus (DEn), Hippocampus: Stratum moleculare des Gyrus dentatus (MoDG), Stratum granulare des Gyrus Dentatus (GrDG), Cornu ammonis Subregionen CA1-CA3, Indusium griseum (IG), Thalamus: Ncl. ventralis posteromedialis (VPM), Ncl. ventralis posterolateralis (VPL), Ncl. reticularis (Rt), Hypothalamus, Subthalamus (Sth), Colliculus superior, Ncl. Interpeduncularis (IPC), Periaquäduktales Grau (PAG), Ncl. olivaris lateralis superior (LSO).

### 3.2.1. Telencephalon

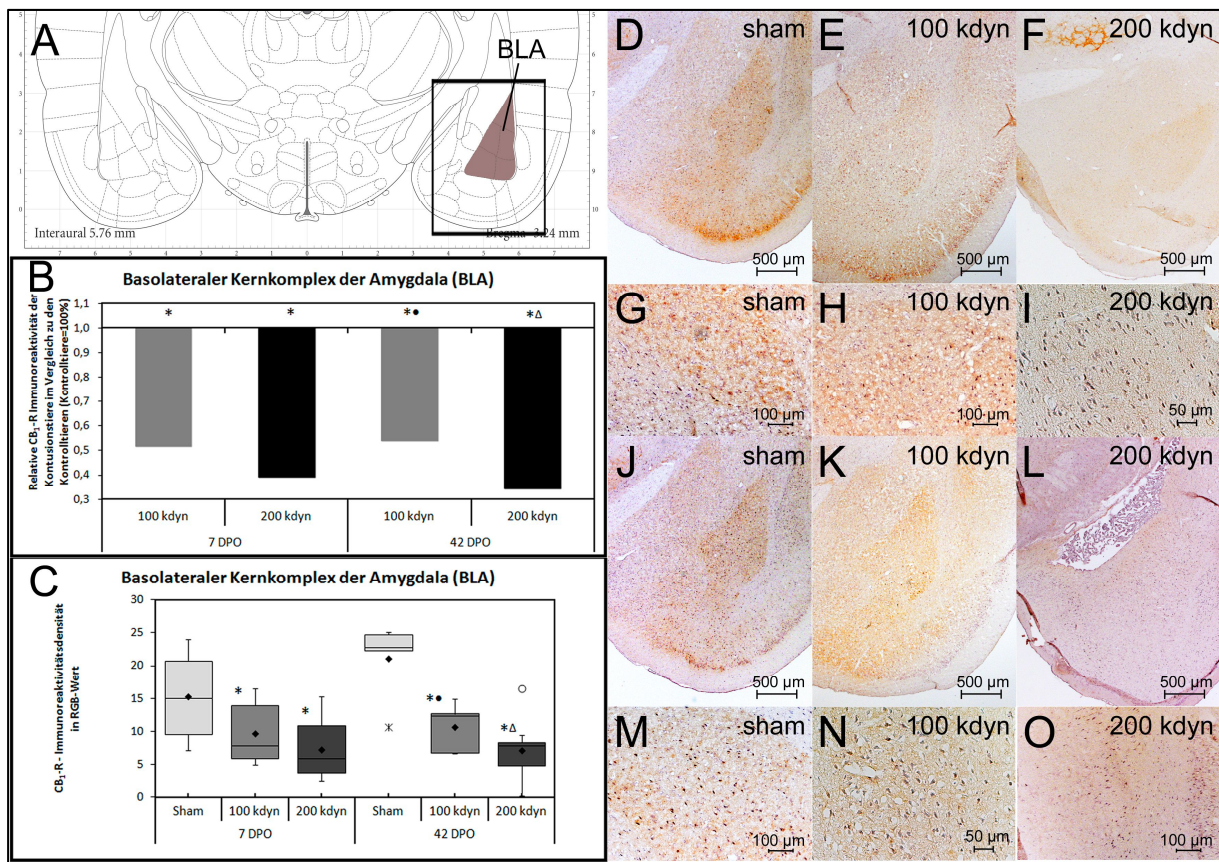
#### 3.2.1.1. Amygdala

In der Amygdala waren die ermittelten CB<sub>1</sub>-R-Immunreaktivitätsdichten im BLA nach leichter und schwerer Rückenmarksläsion signifikant geringer im Vergleich zu den Kontrolltieren. (100 kdyn und 200 kdyn vs. Sham,  $p < 0,05$ , DPO-7 und DPO-42; s. Abb. 16 B und C). Innerhalb der Läsionsgruppen war die CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität am Tag 42 nach schwerer Läsion signifikant geringer im Vergleich zu den 100 kdyn Tieren ( $p < 0,05$ ).

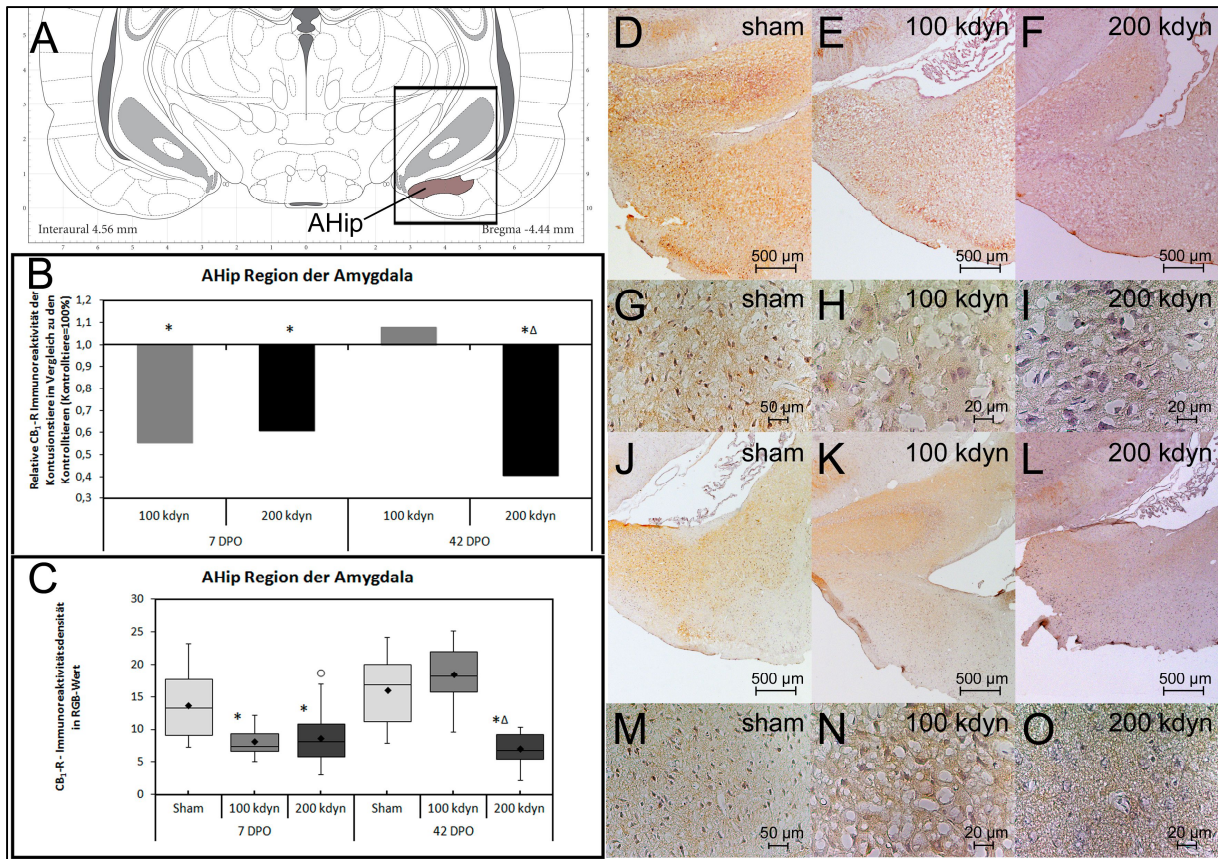
Im Kerngebiet der AHip konnte ebenfalls in den leichten und schweren Läsionsgruppen der DPO-7 Kohorte eine signifikant geringere CB<sub>1</sub>-R IR-Dichte nachgewiesen werden ( $p < 0,05$  vs. Kontrollgruppe). In der DPO-42 Kohorte wurde eine signifikant geringere Expression des CB<sub>1</sub>-R in der schweren Läsionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe nachgewiesen ( $p < 0,05$ ; s. Abb. 17 B und C).



In der leichten Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte konnte die CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität auf einem der Kontrollgruppe vergleichbaren Niveau nachgewiesen werden.



**Abbildung 16:** Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität des basolateralen Kernkomplexes (BLA) der Amygdala; in **A** dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus (**D-F** und **J-L**) abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); **B**: Relativer Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität des basolateralen Kernkomplexes (BLA) der Amygdala (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn;  $\Delta = p < 0,05$  100 vs. 200kdyn;  $\bullet = p < 0,05$  DPO7 vs DPO42); **C**: Whisker Box Plot der CB<sub>1</sub>-R IR im Vergleich der Kontroll- und Läsionstiere (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn;  $\Delta = p < 0,05$  100 vs. 200kdyn;  $\bullet = p < 0,05$  DPO7 vs DPO42); **D-F**: BLA in 20-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-7; **G-I**: BLA bei 100-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn; **J-L**: BLA in 20-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-42; **M-O**: BLA in 100-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-42.



**Abbildung 17:** Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität der Hippocampus-Amygdala Übergangszone; in **A** dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus (**D-F** und **J-L**) abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); **B:** Relativer Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität der Hippocampus-Amygdala-Übergangszone (AHip) (\*=p<0,05 sham vs. 100/200kdyn; Δ=p<0,05 100 vs. 200kdyn, ●=p<0,05 DPO7 vs DPO42); **C:** Whisker Box Plot der CB<sub>1</sub>-R IR im Vergleich der Kontroll- und Läsionstiere (\*=p<0,05 sham vs. 100/200kdyn; Δ=p<0,05 100 vs. 200kdyn, ●=p<0,05 DPO7 vs DPO42); **D-F:** AHip in 20-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-7; **G-I:** AHip bei 100-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn; **J-L:** AHip in 20-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-42; **M-O:** AHip in 100-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-42.

### 3.2.1.2. Hippocampus

Im Hippocampus zeigten sich im Vergleich der Läsionstiere zu den Kontrolltieren Veränderungen in den Regionen des Gyrus Dentatus und in den Regionen des Cornu Ammonis CA1 und CA3 bzgl. der Intensitäten der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität. Die histochemischen Veränderungen sind in Abbildung 18 dargestellt.

Im Stratum moleculare und Stratum granulare des Gyrus dentatus konnte für die Tiere der leichten Läsionsgruppe der DPO-7 Kohorte eine signifikant geringere Immunoreaktivität des CB<sub>1</sub>-R im Vergleich zur Kontrollgruppe (p<0,05) und zur schweren Läsionsgruppe (p<0,05) gezeigt werden (s. Abb. 19).

In der DPO-42 Kohorte zeigte sich eine tendenziell, aber nicht signifikant stärkere Expression des CB<sub>1</sub>-R in der schweren Läsionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Expression

des CB<sub>1</sub>-R war in der schweren Läsionsgruppe verglichen mit der leichten Läsionsgruppe signifikant stärker ( $p < 0,05$ ; s. Abb. 19).

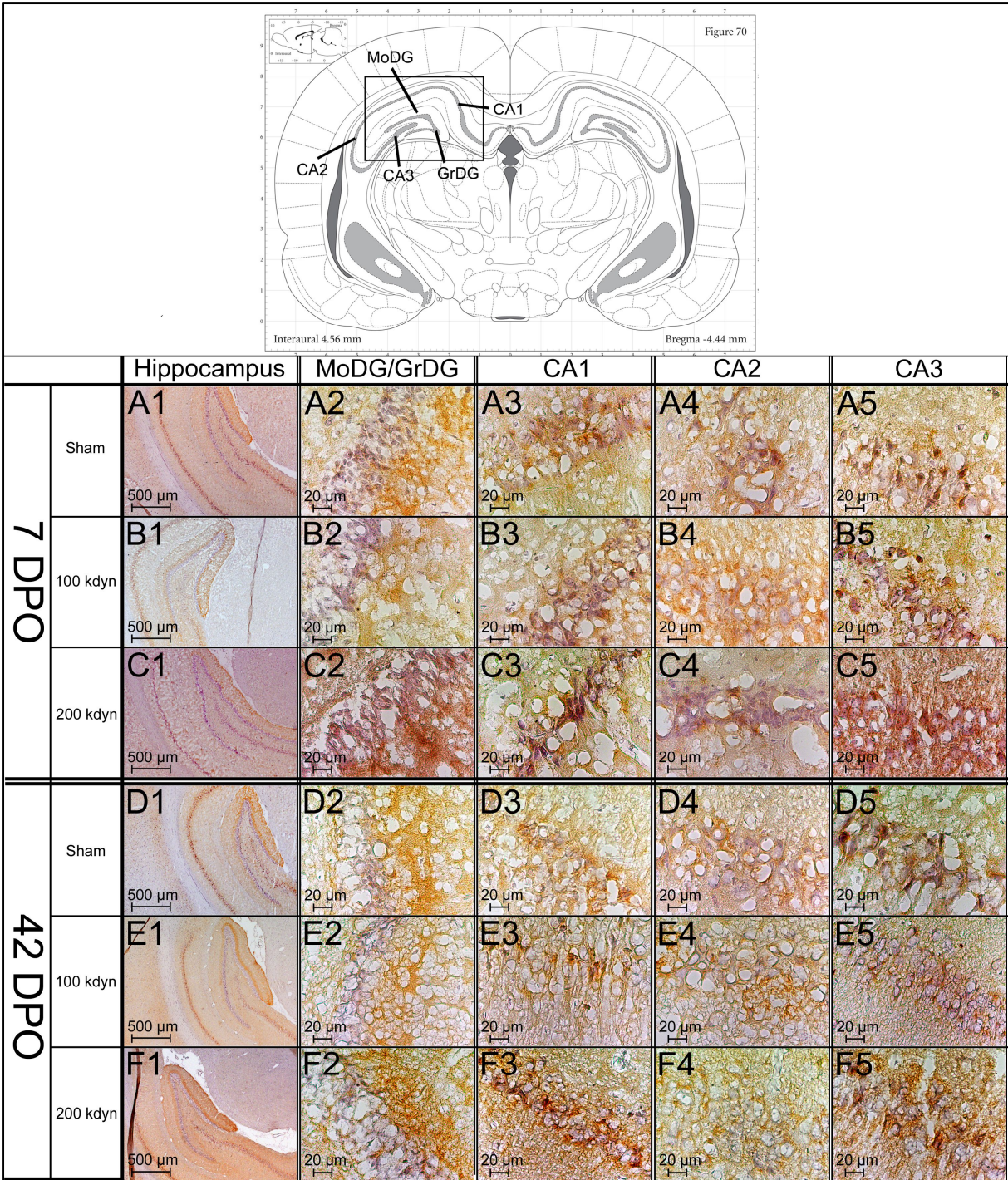
In der Subregion CA1 des Cornu Ammonis zeigten sich in der DPO-7 Kohorte keine signifikanten Veränderungen in der Expression des CB<sub>1</sub>-R. Für die leichte Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte konnte keine signifikant vermehrte Expression des CB<sub>1</sub>-R nachgewiesen werden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Vergleich der leichten Läsionsgruppen der DPO-7 Kohorte zur DPO-42 Kohorte zeigte sich eine signifikant erhöhte Immunoreaktivität des CB<sub>1</sub>-R in der DPO-42 Kohorte ( $p < 0,05$ ).

In der DPO-42 Kohorte zeigte sich eine stärkere Expression des CB<sub>1</sub>-R in der schweren Läsionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) und verglichen zur schweren Läsionsgruppe der DPO-7 Kohorte ( $p < 0,05$ ; s. Abb. 19).

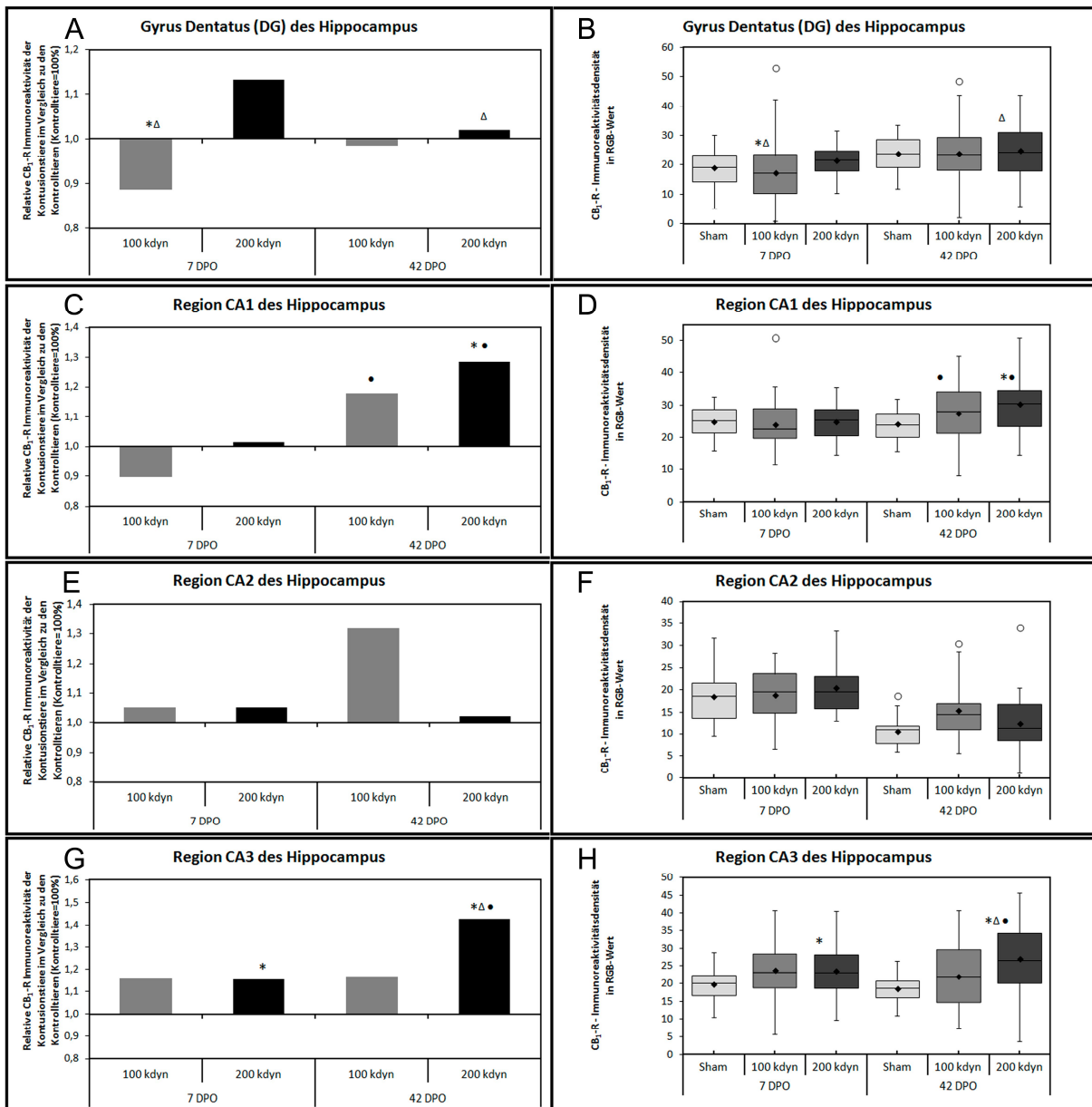
In der Subregion CA2 des Cornu Ammonis konnten keine signifikanten Änderungen der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität nachgewiesen werden.

In der Subregion CA3 des Cornu Ammonis konnte in der DPO-7 Kohorte eine signifikante Steigerung der Immunoreaktivität des CB<sub>1</sub>-R in der schweren Läsionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ; s. Abb. 19). In der leichten Läsionsgruppe konnte eine Steigerung der Expression auf nicht signifikantem Niveau gezeigt werden.

In der DPO-42 Kohorte wurde eine weitere Zunahme der Expression des CB<sub>1</sub>-R in der schweren Läsionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe nachgewiesen ( $p < 0,05$ ; s. Abb. 19). Im Vergleich der schweren Läsionsgruppe zur leichten Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte zeigte sich ebenfalls eine stärkere Expression des CB<sub>1</sub>-R ( $p < 0,05$ ). Zwischen der schweren Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte und der DPO-7 Kohorte konnte auch eine signifikant stärkere Expression des CB<sub>1</sub>-R nachgewiesen werden ( $p < 0,05$ ; s. Abb. 19).



**Abbildung 18: Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität im Hippocampus;** oben dargestellt und darin markiert ist der Bildausschnitt aus (A1-F1) abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); **A1-F1:** in 20-facher Vergrößerung untereinander dargestellt ist die immunhistochemische Färbung des CB<sub>1</sub>-R des Hippocampus der Kontrolltiere (Sham), leichten Läsionstiere (100 kdyn) und schweren Läsionstiere (200 kdyn) nach Überlebenszeitraum aufgeteilt; oben Kohorte vom 7. postoperativen Tag (7 DPO); unten Kohorte vom 42. postoperativen Tag (42 DPO); **A2-F2:** immunhistochemische Färbung des CB<sub>1</sub>-R im Stratum moleculare (MoDG) und Stratum granulare (GrDG) des Gyrus dentatus (DG) dargestellt in 400-facher Vergrößerung; **A3-F3:** immunhistochemische Färbung des CB<sub>1</sub>-R in der Subregion CA1 des Cornu Ammonis dargestellt in 400-facher Vergrößerung; **A4-F4:** immunhistochemische Färbung des CB<sub>1</sub>-R in der Subregion CA2 des Cornu Ammonis dargestellt in 400-facher Vergrößerung; **A5-F5:** immunhistochemische Färbung des CB<sub>1</sub>-R in der Subregion CA3 des Cornu Ammonis dargestellt in 400-facher Vergrößerung.



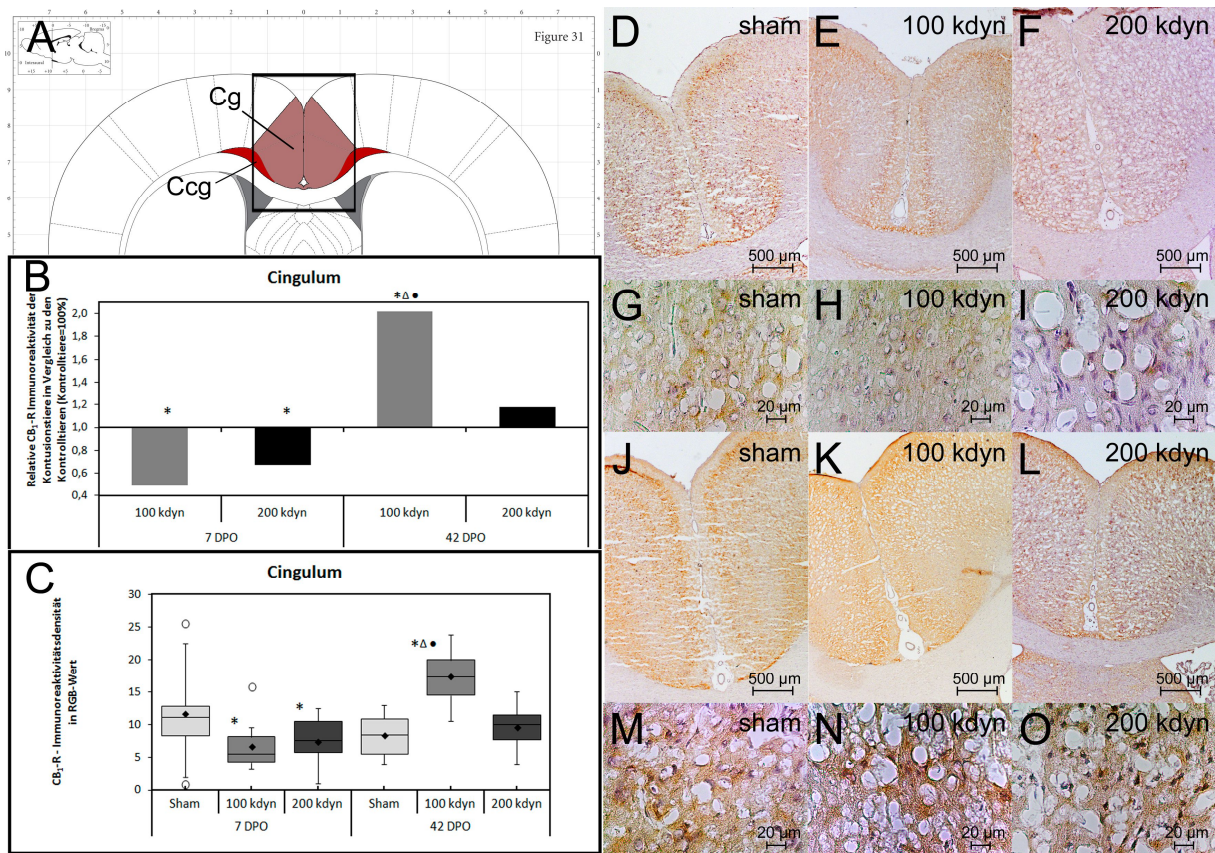
**Abbildung 19:** Statistische Auswertung der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität in den Regionen des Hippocampus; **A,C,E,G:** Relativer Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität im Gyrus dentatus (DG) (**A**), Subregion CA1 des Cornu Ammonis (**C**), Subregion CA2 des Cornu Ammonis (**E**), Subregion CA3 des Cornu Ammonis (**G**); (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn;  $\Delta = p < 0,05$  100 vs. 200kdyn,  $\bullet = p < 0,05$  DPO7 vs. DPO42); **B,D,F,H:** Whisker Box Plot der CB<sub>1</sub>-R IR im Vergleich der Kontroll- und Läsionstiere im Gyrus dentatus (DG) (**B**), Subregion CA1 des Cornu Ammonis (**D**), Subregion CA2 des Cornu Ammonis (**F**), Subregion CA3 des Cornu Ammonis (**H**); (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn;  $\Delta = p < 0,05$  100 vs. 200kdyn,  $\bullet = p < 0,05$  DPO7 vs. DPO42).

### 3.2.1.3. Cingulum und anteriorer cingulärer Kortex

Im Cingulum (Cg) und im anterioren cingulären Kortex (Ccg) fiel in der leichten und schweren Läsionsgruppe in der DPO-7 Kohorte die CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität stark ab. Im Vergleich der Kontrolltiere zur leichten und schweren Läsionsgruppe ergab sich ein  $p < 0,01$  in der DPO-7 Kohorte.

Es konnte für die leichte Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte ein signifikant über das Niveau der Kontrollgruppe gestiegenes immunopositives Intensitätsniveau gezeigt werden ( $p < 0,05$ ). Ebenfalls signifikant höher war das Intensitätsniveau der leichten Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte im Vergleich zur leichten Läsionsgruppe der DPO-7 Kohorte ( $p < 0,05$ ) und im Vergleich zur schweren Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte ( $p < 0,05$ ).

Die Expression des CB<sub>1</sub>-R konnte in der schweren Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte auf niedrigem Intensitätsniveau nachgewiesen werden (s. Abb. 20).



**Abbildung 20:** Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität der Kerngebiete des Cingulum (Cg) und des anterioren cingulären Kortex (Ccg); in **A** dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus **(D-F und J-L)** abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); **B:** Relativer Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität der des Cingulum (Cg) und des anterioren cingulären Kortex (Ccg) (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn; Δ= $p < 0,05$  100 vs. 200kdyn, ●= $p < 0,05$  DPO7 vs DPO42); **C:** Whisker Box Plot der CB<sub>1</sub>-R IR im Vergleich der Kontroll- und Läsionstiere (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn; Δ= $p < 0,05$  100 vs. 200kdyn, ●= $p < 0,05$  DPO7 vs DPO42); **D-F:** Cg und Ccg in 20-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-7; **G-I:** Cg und Ccg bei 400-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn; **J-L:** Cg und Ccg in 20-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-42; **M-O:** Cg und Ccg in 400-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-42.

## 3.2.2. Diencephalon

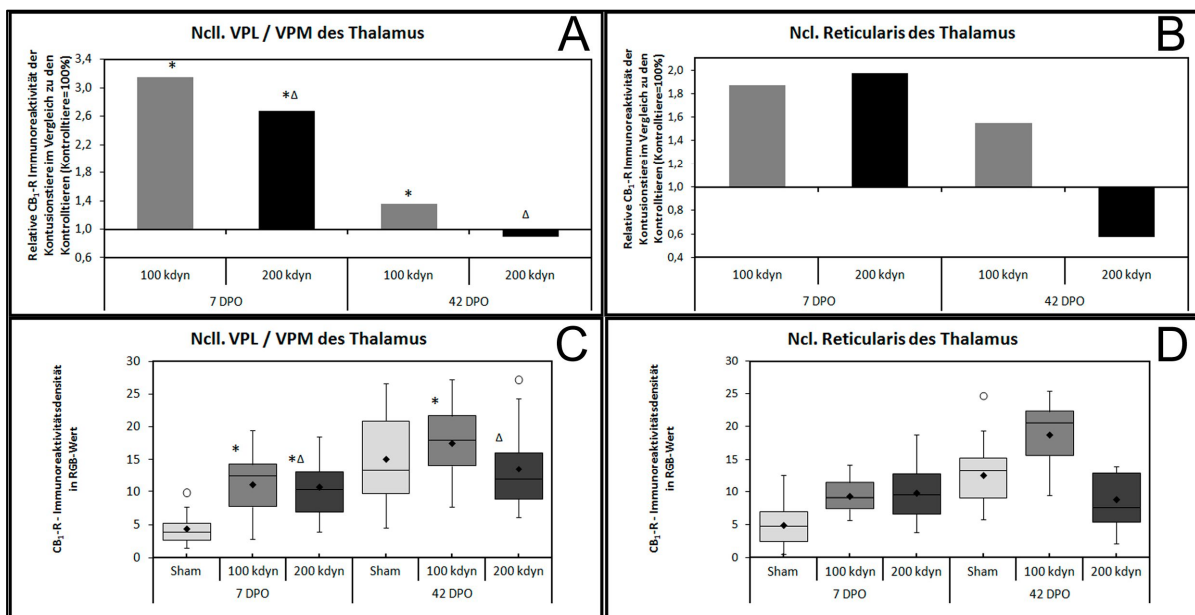
### 3.2.2.1. Thalamische Kerngebiete

In den Kerngebieten des Thalamus konnten, wie in Tabelle 4 dargestellt, in den Kerngebieten des Ncl. ventralis posteromedialis (VPM), Ncl. ventralis posterolateralis (VPL) und Ncl. Reticularis (Rt) signifikante Änderungen der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität nachgewiesen werden (s. Abb. 21). In den Kerngebieten des Hypothalamus und Subthalamus ließen sich keine Veränderungen der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität nachweisen.

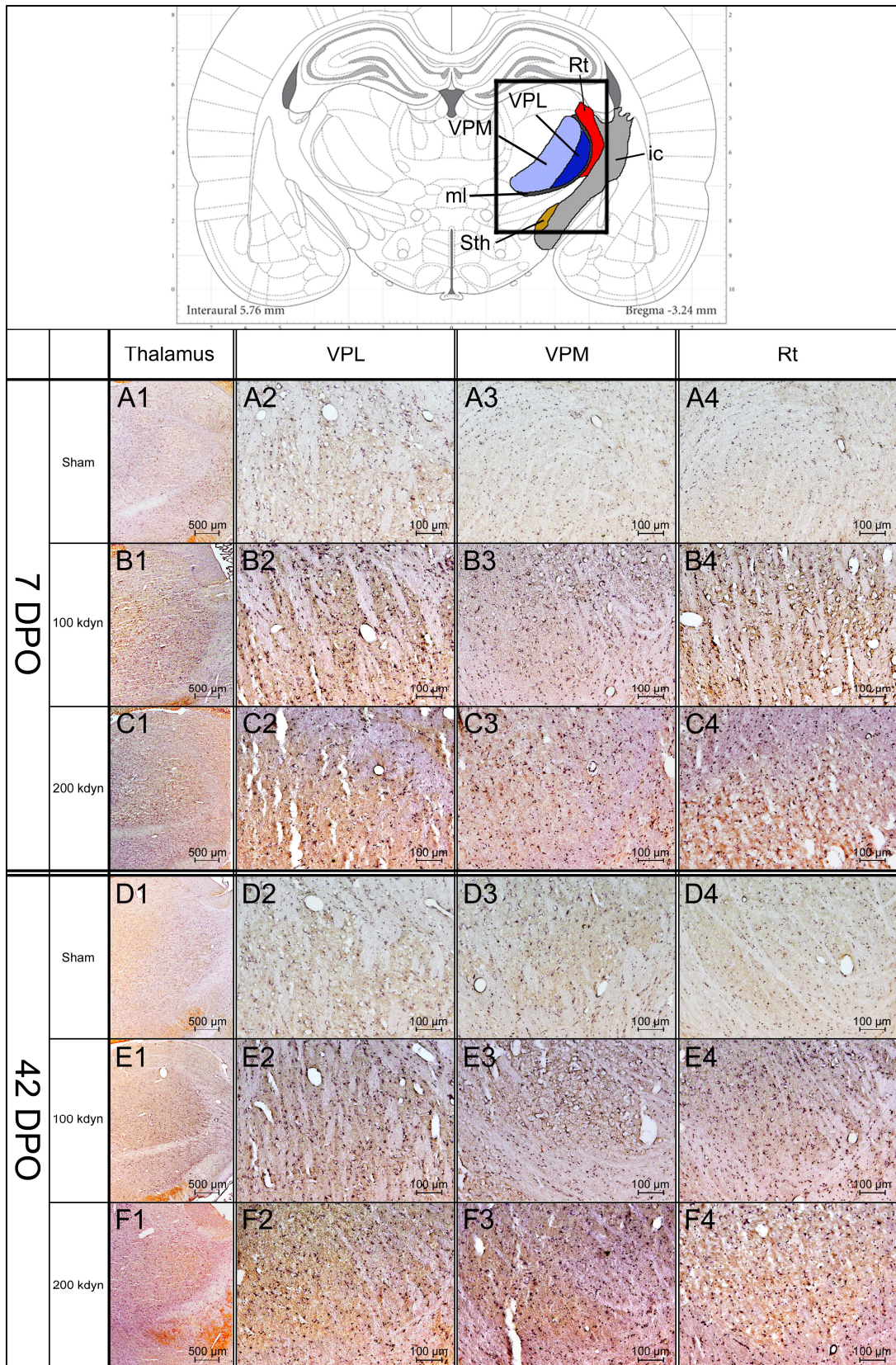
Im Bereich des VPM und VPL konnte in der DPO-7 Kohorte eine Steigerung der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität in beiden Läsionsgruppen nachgewiesen werden. Es ergab sich ein  $p < 0,05$  für die leichte Läsionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe und ebenfalls ein  $p < 0,05$  für die schwere Läsionsgruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Abbildung 22 zeigt die immunohistochemische Darstellung.

In der DPO-42 Kohorte wurde für die leichte Läsionsgruppe eine weiterhin stärkere Expression des CB<sub>1</sub>-R nachgewiesen verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) und der schweren Läsionsgruppe ( $p < 0,05$ ), während in der schweren Läsionsgruppe die CB<sub>1</sub>-R Expression wieder stark rückläufig war.

Im Rt zeigte sich eine gleichsinnige Veränderung der Expression des CB<sub>1</sub>-R (s. Abb. 21).



**Abbildung 21: Statistische Auswertung der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität in den Kerngebieten des Thalamus; A,B:** Relativer Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität im Ncl. ventralis posterolateralis (VPL) und Ncl. ventralis posteromedialis (VPM) (A), Ncl. Reticularis (Rt) (B); (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn; Δ= $p < 0,05$  100 vs. 200kdyn, ●= $p < 0,05$  DPO7 vs DPO42); **C,D:** Whisker Box Plot der CB<sub>1</sub>-R IR im Vergleich der Kontroll- und Läsionsgruppen in den thalamischen Kerngebieten Ncl. Ventralis posterolateralis (VPL) und Ncl. ventralis posteromedialis (VPM) (C), Ncl. Reticularis (Rt) (D) (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn ; Δ= $p < 0,05$  100 vs. 200kdyn, ●= $p < 0,05$  DPO7 vs DPO42).



**Abbildung 22:** Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität in den Kerngebieten des Thalamus; oben dargestellt ist der Bildausschnitt aus (A1-F1) abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); A1-F1: in 20-facher Vergrößerung untereinander dargestellt ist die immunohistochemische Färbung des CB<sub>1</sub>-R des Thalamus der Kontrolltiere (Sham), leichten Läsionstiere (100 kdyn) und schweren Läsionstiere (200 kdyn) nach Überlebenszeitraum aufgeteilt; oben Kohorte vom 7. postoperativen Tag (7 DPO); unten Kohorte vom 42. postoperativen Tag (42 DPO); A2-F2: immunohistochemische Färbung des CB<sub>1</sub>-R im Ncl. ventralis posterolateralis (VPL) dargestellt in 100-facher Vergrößerung; A3-F3: immunohistochemische Färbung des CB<sub>1</sub>-R im Ncl. ventralis posteromedialis (VPM) dargestellt in 100-facher Vergrößerung; A4-F4: immunohistochemische Färbung des CB<sub>1</sub>-R im Ncl. reticularis (Rt) dargestellt in 100-facher Vergrößerung.

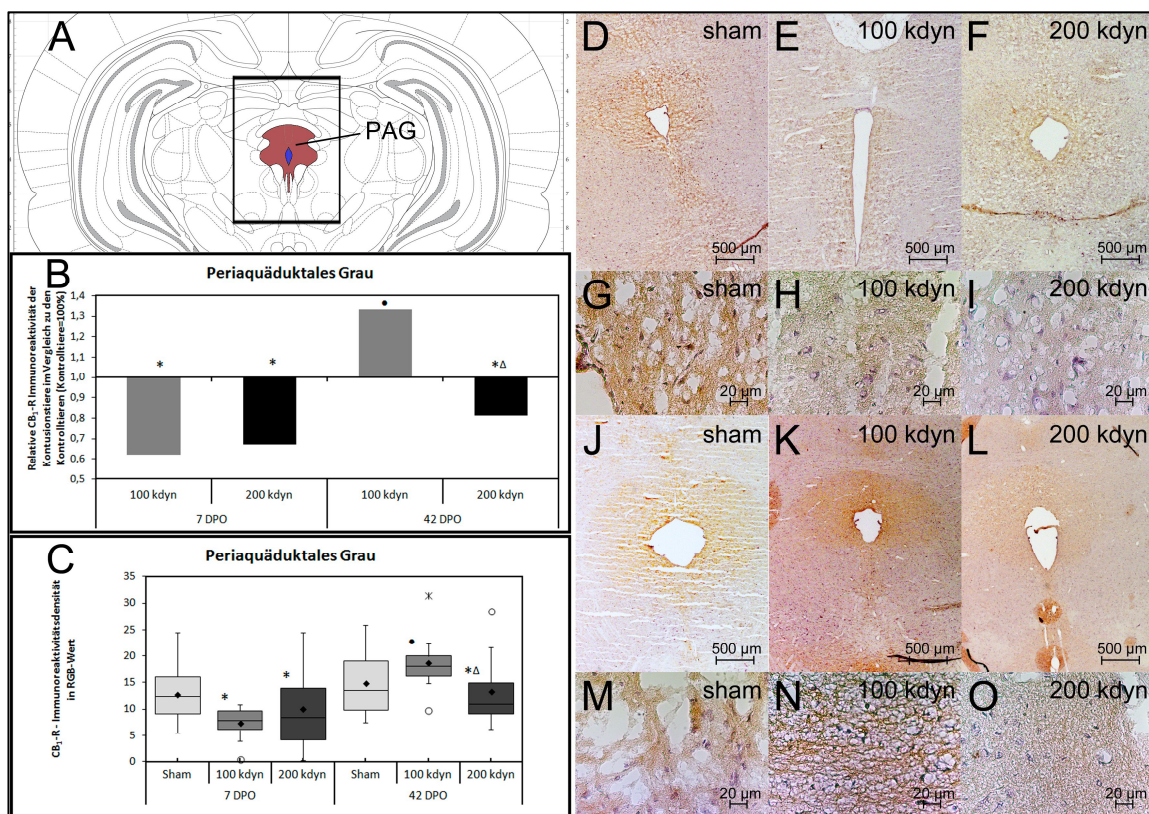


### 3.2.3. Mesencephalon

#### 3.2.3.1. Periaquäduktales Grau

Im periaquäduktalen Grau konnte in der DPO-7 Kohorte im Vergleich der leichten Läsionsgruppe mit der Kontrollgruppe eine signifikant geringere CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität nachgewiesen werden ( $p < 0,01$ ). Ebenfalls konnte eine signifikant geringere CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität im Vergleich der schweren Läsionsgruppe mit der Kontrollgruppe der DPO-7 Kohorte nachgewiesen werden ( $p < 0,01$ ; s. Abb. 23).

In der leichten Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte konnte eine wieder auf das Niveau der Kontrolltiere angestiegene CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität nachgewiesen werden. In der schweren Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte verblieb die CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität auf signifikant niedrigem Niveau verglichen mit der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ) und verglichen mit der leichten Läsionsgruppe der DPO-42 Kohorte ( $p < 0,01$ ; s. Abb. 23).



**Abbildung 23: Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität des periaquäduktalen Grau (PAG);** in A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus (D-F und J-L) abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); B: Relativer Vergleich der CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität des periaquäduktalen Grau (PAG) (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn; Δ= $p < 0,05$  100 vs. 200kdyn, ●= $p < 0,05$  DPO7 vs DPO42); C: Whisker Box Plot der CB<sub>1</sub>-R IR im Vergleich der Kontroll- und Läsionstiere des periaquäduktalen Grau (PAG) (\*= $p < 0,05$  sham vs. 100/200kdyn; Δ= $p < 0,05$  100 vs. 200kdyn, ●= $p < 0,05$  DPO7 vs DPO42); D-F: PAG in 20-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-7; G-I: PAG bei 400-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn; J-L: PAG in 20-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-42; M-O: PAG in 400-facher Vergrößerung vlnr sham, 100kdyn, 200kdyn nach DPO-42.

### **3.3. Koexpression und Kolo-kalisation des CB<sub>1</sub>-R mit Chemokinen und TRPV-1**

Zusätzlich zur Analyse der Expressionsmuster und -dichten des CB<sub>1</sub>-R in den oben beschriebenen Regionen wurde die Expression der Chemokin Liganden 2 und 3 (CCL-2 und CCL-3), sowie ihrer Chemokin-Rezeptoren 2 und 1 (CCR-2 und CCR-1) untersucht.

Zudem wurde eine Koexpression des CB<sub>1</sub>-R mit dem transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV1) und seiner phosphorylierten Form (TRPV1-P) untersucht. Zusammengefasst sind die Ergebnisse in Tabelle 5 dargestellt.

#### **3.3.1. Telencephalon**

##### ***3.3.1.1. Amygdala***

In den untersuchten Kerngebieten der Amygdala, BLA und AHip, zeigte sich keine Koexpression mit den Chemokin Liganden CCL-2 und CCL-3, sowie deren Rezeptoren CCR-2 und CCR-1. Eine Koexpression mit dem TRPV1 und dem TRPV1-P konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

##### ***3.3.1.2. Anteriorer cingulärer Kortex und Cingulum***

Im anterioren cingulären Kortex und im Cingulum konnte keine Koexpression der untersuchten Chemokine CCL-2 und CCL-3 sowie ihrer Rezeptoren CCR-2 und CCR-2 nachgewiesen werden. Eine Koexpression mit dem TRPV1 und dem TRPV1-P konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

##### ***3.3.1.3. Hippocampus***

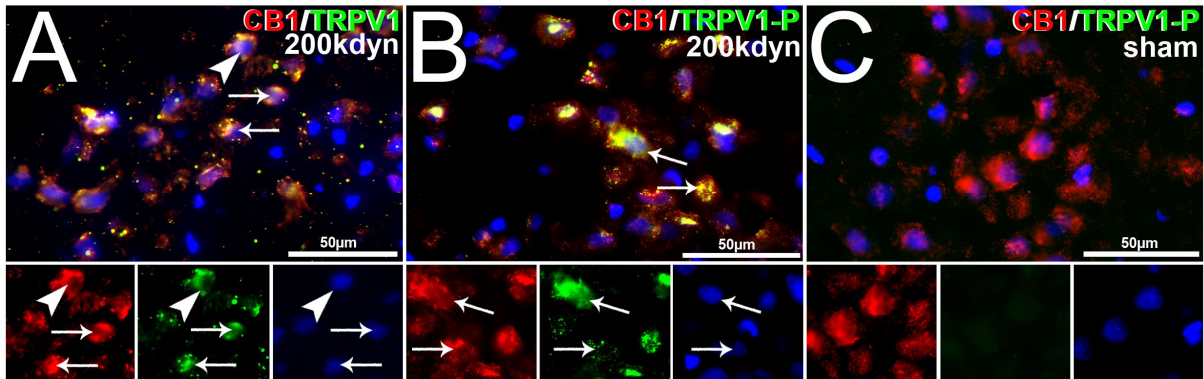
In den Kerngebieten des Hippocampus konnte eine Koexpression des CB<sub>1</sub>-R und des TRPV1 in den Subregionen CA1 und CA3 des Cornu Ammonis nachgewiesen werden (S. Abb. 23). Diese Koexpression konnte in den Gehirnen der Kontrolltiere und der Läsionstiere beider Läsionsgruppen nachgewiesen werden (s. Tab. 5). Es wurde ebenfalls eine Koexpression des CB<sub>1</sub>-R mit dem TRPV1-P in den oben genannten Regionen des Cornu Ammonis für die 200kdyn-Läsionstiere nach DPO 42 nachgewiesen. Diese Koexpression konnte für die 100kdyn Läsionstiere und die Tiere der Kontrollgruppe nicht nachgewiesen werden.

Ebenfalls wurde die Koexpression mit dem Chemokin Liganden CCL-2, dem zugehörigen Chemokin Rezeptor CCR-1, sowie dem Chemokin Liganden CCL-3 und dem dazu gehörigen Chemokin Rezeptor CCR-1 nachgewiesen in den Subregionen CA1 und CA3 des Cornu Ammonis. Hier konnte eine neuronale Expression in einer Doppelfärbung mit dem neuronalen

Antikörper NeuN nachgewiesen werden (s. Abb. 24). Diese Koexpression konnte ebenfalls auf einigen Pyramidenzellen im Stratum granulare (GrDG) und in der Polymorphen Zellschicht des Hippocampus gezeigt werden.

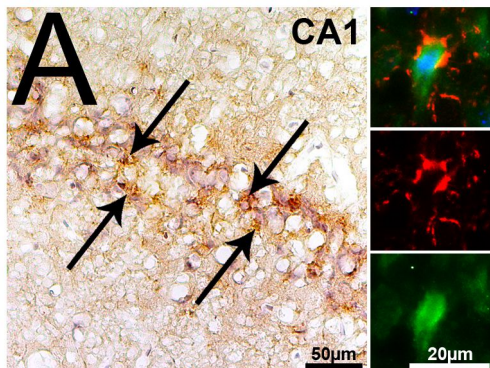
	Anatomische Region	CB <sub>1</sub> -R			CCL2 / CCR2			CCL3 / CCR1			TRPV1 / TRPV1-P		
		Sham	100 kdyn	200 kdyn	Sham	100 kdyn	200 kdyn	Sham	100 kdyn	200 kdyn	Sham	100 kdyn	200 kdyn
<b>DPO 7</b>	<i>Amygdala</i>												
	BLA	+++	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	AHip	+++	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	Cg	++	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
	<i>Hippocampus</i>												
	DG	+++	+	+++	+ / +	+ / +	+ / +	+	+ / (+)	+ / +	- / -	- / -	- / -
	CA1	++	+	+	- / -	- / -	- / -	/ (+)	+ / (+)	+ / +	+ / -	+ / -	+ / -
	CA3	++	+++	+++	+ / +	+ / +	+ / +	+	+ / (+)	+ / +	+ / -	+ / -	+ / -
								/ (+)					
								+					
							/ (+)						
<i>Thalamus</i>													
VPM	-	+	+	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	
VPL	-	+	+	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	
PAG	++	+	+	- / -	+++ / +	+++ / (+)	- / -	++ / +	+++ / +	+ / -	+ / -	+ / -	
									+				
<b>DPO 42</b>	<i>Amygdala</i>												
	BLA	+++	+	+	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
	AHip	+++	+++	+	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
	Cg	++	+++	+	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
	<i>Hippocampus</i>												
	DG	+++	+	+++	+ / +	+ / +	+ / +	+	+ / (+)	+ / +	- / -	- / -	- / -
	CA1	++	++	+++	- / -	- / +	++ / +	/ (+)	+ / (+)	+++ / +	+ / -	+ / -	+ / +
	CA3	++	+++	+++	+ / +	+ / +	+++ / ++	+	+ / (+)	+	+ / -	+ / -	+ / +
								/ (+)		+++ / +			
								+		+			
							/ (+)						
<i>Thalamus</i>													
VPM	+	+++	++	- / -	- / -	+++ / ++	- / -	- / -	++ / +	- / -	- / -	- / +	
VPL	+	+++	++	- / -	- / -	+++ / ++	- / -	- / -	++ / +	- / -	- / -	- / +	
PAG	++	++	+	- / -	- / -	+++ / +	- / -	- / -	+++ / +	+ / -	+ / -	+ / +	
									+				

**Tabelle 5: Vergleich der gemessenen Koexpression des Cannabinoid- Rezeptor 1 (CB<sub>1</sub>-R), des Chemokin Ligand 2 (CCL-2) und Chemokin-Rezeptors 2 (CCR-2) des Chemokin-Liganden 1 (CCL-1) und Chemokin-Rezeptors 1 (CCR-1) und transient receptor potential vanilloid receptor 1 (TRPV1) und der phosphorylierten Form des TRPV1 (TRPV1-P) sortiert nach Region.** -, keine; (+), sehr schwache; +, schwache; ++, moderate; +++ starke Ausprägung der Immunoreaktivität; Tage post operationem (DPO); Kontrolltiere (Sham); Läsionstiere der Gruppen 100 kilodyn (kdyn) bzw. 200 kilodyn (kdyn); Amygdala: Ncl. amygdalae lateralis und basalis lateralis (BLA), Hippocampus-Amygdala-Übergangszone (AHip), Cingulum und anteriorer cingulärer Kortex (Cg), Hippocampus: Stratum moleculare und Stratum granulare des Gyrus dentatus (DG), Cornu ammonis Subregionen CA1 und CA3, Thalamus: Ncl. ventralis posteromedialis (VPM), Ncl. ventralis posterolateralis (VPL), Periaquäduktales Grau (PAG).

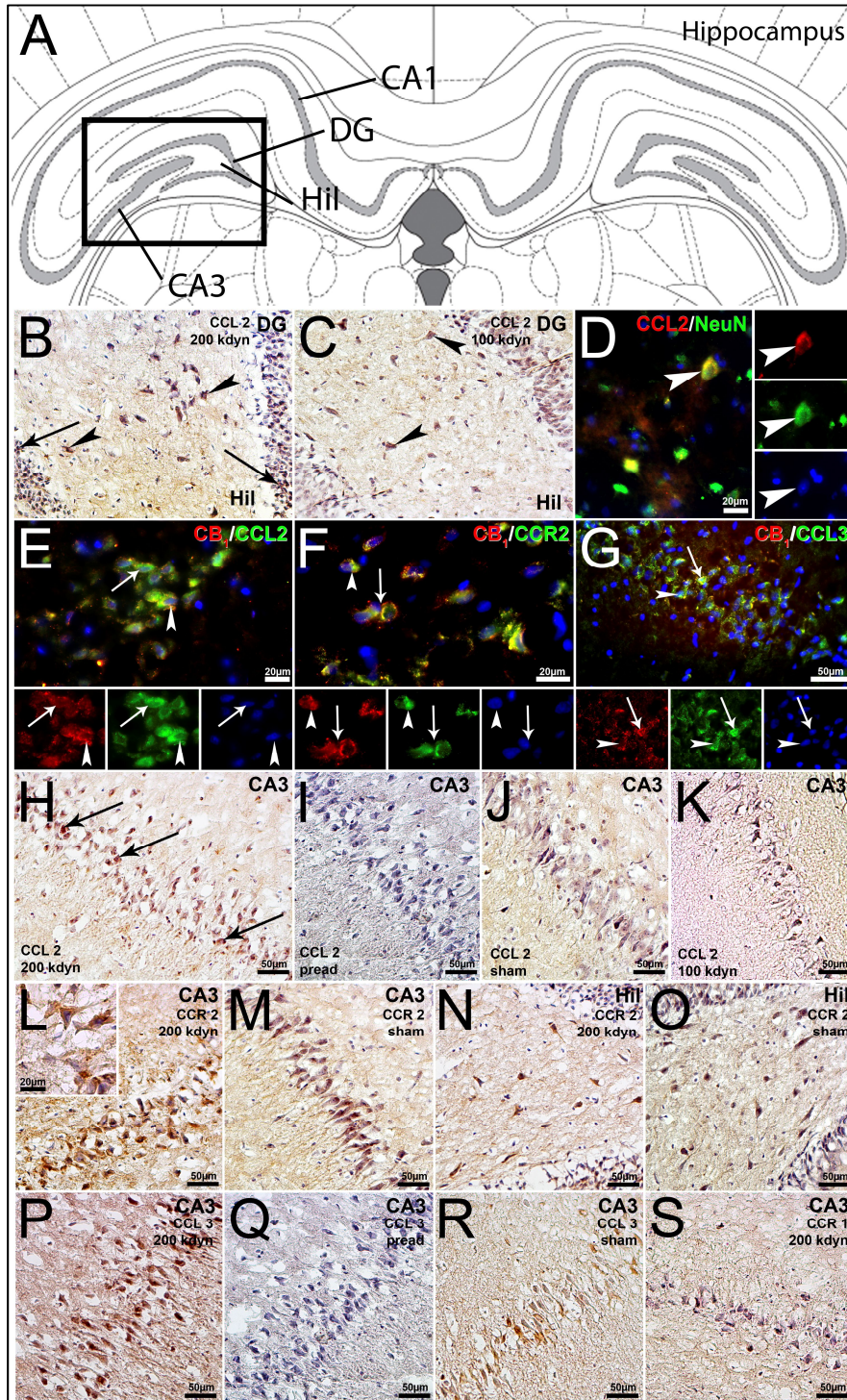


**Abbildung 24:** Darstellung der Koexpression des TRPV1/TRPV1-P und des CB<sub>1</sub>-R im Hippocampus in der Subregion CA1 des Cornu Ammonis. **A** zeigt die Koexpression (gelb, mit Pfeilen markiert) des CB<sub>1</sub>-R (rot), mit dem TRPV1 (grün) und DAPI (blau) in CA1 der 200kdyn Läsionstiere. **B** zeigt die Koexpression (gelb, mit Pfeilen markiert) des CB<sub>1</sub>-R (rot), mit dem TRPV1-P (grün) und DAPI (blau) in CA1 der 200kdyn Läsionstiere DPO 42. **C** zeigt die Koexpression (gelb, mit Pfeilen markiert) des CB<sub>1</sub>-R (rot), mit dem TRPV1-P (grün) und DAPI (blau) in CA1 der Kontrolltiere.

**Abbildung 25:** Darstellung der neuronalen, Färbung mit NeuN, Expression des CB<sub>1</sub>-R im Hippocampus in der Subregion CA1 des Cornu



**Ammonis.** **A** zeigt die einzelnen Neurone im Zellverband der Subregion CA1 des Cornu Ammonis links. Im Triplet Oben: gemeinsamer Nachweis von NeuN und CB<sub>1</sub>-R Antikörper; Mitte: Nachweis des CB<sub>1</sub>-R Antikörpers (rot); Unten: Nachweis des NeuN-Antikörpers (grün).



**Abbildung 26:** Darstellung der Koexpression der Chemokine CCL-2 und CCL-3 sowie der zugehörigen Rezeptoren CCR-2 und CCR-1 und dem  $CB_1$ -R. In A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus (B-S) abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); B zeigt die Expression des CCL-2 im Hilus (Hil) des Gyrus Dentatus (DG) des Hippocampus bei 200kdyn-Läsionstieren DPO 42. C zeigt die Expression des CCL-2 im Hilus des Gyrus Dentatus (DG) des Hippocampus bei 100kdyn-Läsionstieren DPO 42. D zeigt eine Doppelfärbung des CCL-2 (rot) und NeuN (grün) und DAPI+Kern (blau). In E-G ist die Koexpression des  $CB_1$ -R (jeweils rot) und CCL-2 (grün; E), CCR-2 (grün; F) und CCL-3 (grün; G) und DAPI+Kerne (jeweils blau) im CA3 des Hippocampus der 200kdyn-Läsionstiere dargestellt. H-K zeigt die Immunoreaktivität der CCL-2 Expression in der Subregion CA3 des Cornu Ammonis im Vergleich der 200kdyn-Läsionstiere (H), nach Präadsorption (I), bei den Kontrolltieren (J) und den 100kdyn-Läsionstieren (K). L und M zeigt den Unterschied der Immunoreaktivität der CCR-2 Expression in der Subregion CA3 des Cornu Ammonis im Vergleich zwischen 200 kdyn-Läsionstieren (L) und Kontrolltieren (M). N und O zeigen den Unterschied der Immunoreaktivität der CCR-2 Expression in der Hilusregion des Hippocampus im Vergleich zwischen 200kdyn-Läsionstieren (N) und Kontrolltieren (O). P-R zeigt die Immunoreaktivität der CCL-3 Expression in der Subregion CA3 des Cornu Ammonis im Vergleich der 200kdyn-Läsionstiere (P), nach Präadsorption (Q) und bei den Kontrolltieren (R). S zeigt die fehlende Immunoreaktivität des CCR-1 in der Subregion CA3 des Cornu Ammonis des Hippocampus.

### **3.3.2. Diencephalon**

#### ***3.3.2.1. Thalamus***

In den Kerngebieten des Thalamus wurde eine Koexpression des CB<sub>1</sub>-R und des TRPV1-P in den 200kdyn-Läsionstieren nach DPO 42 nachgewiesen. Die neuronale Zuordnung konnte in einer Doppelfärbung mit einem Anti-NeuN Antikörper nachgewiesen werden (s. Abb. 27). Bei den Kontrolltieren und den 100kdyn-Läsionstieren wurde diese Koexpression nicht nachgewiesen. In den Kerngebieten Rt, VPM und VPL der 200kdyn-Läsionstiere konnte in der 42-DPO Kohorte ebenfalls eine Koexpression und Kolokalisation mit den Chemokin Liganden CCL-2 und CCL-3 und den zugehörigen Chemokin Rezeptoren CCR-2 und CCR-1 nachgewiesen werden. Diese Koexpression konnte in den 100kdyn-Läsionstieren und den Kontrolltieren ebenfalls nicht nachgewiesen werden.

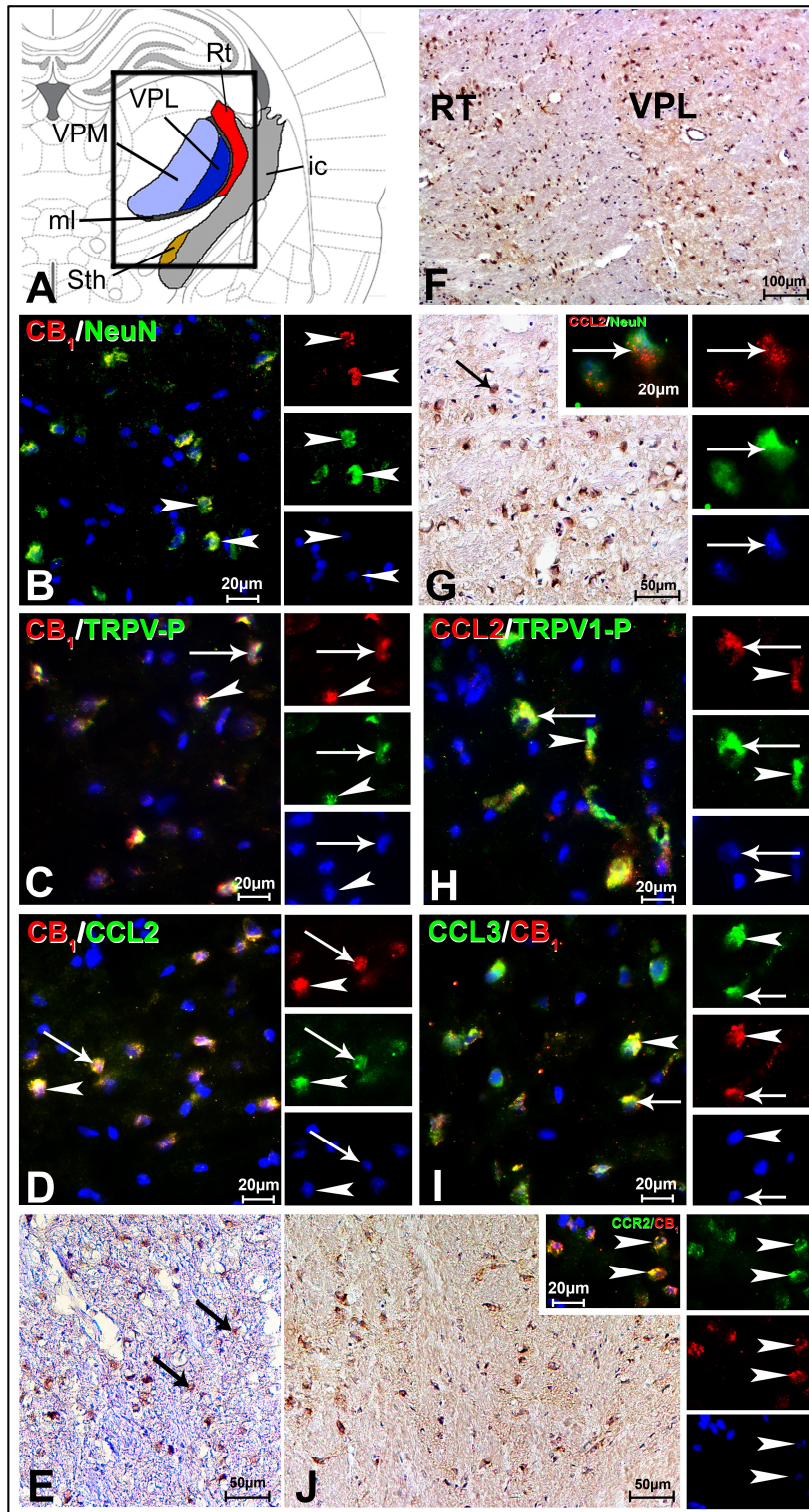
### **3.3.3. Mesencephalon**

#### ***3.3.3.1. Periaquäduktales Grau***

In den Neuronen des gesamten PAG konnte eine Koexpression des CB<sub>1</sub>-R mit dem TRPV1 für die 200kdyn-Läsionstiere nachgewiesen werden. Es konnte auch eine Koexpression mit dem TRPV1-P in vereinzelt Neuronen des PAG in den 200kdyn-Läsionstieren nach DPO-42 nachgewiesen werden.

Eine Kolokalisation des CB<sub>1</sub>-R mit den Chemokin-Liganden CCL-2 und CCL-3 konnte bei den 100kdyn- und 200kdyn-Läsionstieren nach DPO7 nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte nicht für die Kontrolltiere nach DPO7.

Bei den 200kdyn-Läsionstieren nach DPO42 konnte ebenfalls eine Kolokalisation des CB<sub>1</sub>-R mit den Chemokin-Liganden CCL-2 und CCL-3 nachgewiesen werden. Die neuronale Ausprägung wurde mit einer Doppelfärbung mit NeuN nachgewiesen. Der Nachweis der Kolokalisation gelang nicht im PAG der 100kdyn-Läsionstiere und der Kontrolltiere nach DPO 42.



**Abbildung 27:** Dargestellt ist die Expression der Chemokin Liganden CCL-2 und CCL-3, sowie des Transient Rezeptor Potenzial Vanilloid 1 Rezeptors (TRPV1) in Doppelimmunofluoreszenz mit CB<sub>1</sub>-R bzw. als Immunoreaktivitätsfärbung. A dargestellt und markiert ist der Bildausschnitt aus (B-J) abgeändert aus Paxinos und Watson (2007); Dargestellte zelluläre Koexpressionen des CB<sub>1</sub>-Rezeptors (rot) und von NeuN (grün) sowie DAPI+Kern (blau) in B und des phosphorylierten Transienten Rezeptor Potenzial Vanilloid 1 - Rezeptors (TRPV1-P) (grün) in C und des Chemokin Liganden CCL2 in (grün) in D. In E dargestellt ist der Nachweis von CCL3 im VPL der 200kdyn-Läsionstiere an DPO 42. In F dargestellt ist der Nachweis von CCL2 im Rt und VPL bei 200kdyn-Läsionstieren an DPO 42. In G höhere Vergrößerung des Nachweises von CCL2 im VPL bei 200kdyn-Läsionstieren an DPO 42 und Doppelimmunfluoreszenz von CCL2 (rot) und NeuN (grün) sowie DAPI+Kern (blau) H Nachweis der Koexpression von CCL2 (rot) und des TRPV1-P (grün) und DAPI+Kern (blau) I Nachweis der Koexpression von CCL3 (rot) und CCL3 (grün) und DAPI+Kern (blau) J Nachweis von CCR2 im VPL bei 200kdyn-Läsionstieren an DPO 42 und Nachweis der Koexpression von CCR2 (grün) und CB<sub>1</sub>(rot) und DAPI+Kern (blau).

## 4. Diskussion

In der vorgelegten Arbeit wurden das Expressionsmuster und die Immunreaktivitätsdichten von CB<sub>1</sub>-R im Gehirn von Ratten untersucht, bei denen zuvor standardisierte spinale Läsionen unterschiedlicher Stärke (100-kdyn oder 200-kdyn) auf der Höhe TH9 appliziert wurden. Kontrolltiere erhielten nur eine Laminektomie auf derselben spinalen Höhe ohne Läsionsapplikation.

Zunächst wurden die Expressionsmuster der verwendeten Antikörper gegen CB<sub>1</sub>-R in den Kontrolltieren etabliert. Die immunhistochemischen Färbungen mit dem in der vorgelegten Arbeit vornehmlich verwendeten C-terminalen Antikörper (siehe Material und Methoden) erbrachte dabei vergleichbare Expressionsmuster wie zuvor für diesen Antikörper vom Entwicklerteam beschrieben (Egertová, et al., 2000; Egertová, et al., 2003; Farquhar-Smith, et al., 2000). Konkret wurde CB<sub>1</sub>-R immunhistochemisch in anatomischen Arealen des Hippocampus und der Amygdala, des Gyrus cinguli, in bestimmten Kerngebieten des Thalamus und im periaquäduktalen Grau nachgewiesen. Entsprechende Kontrolluntersuchungen (s. Kap 2) legten die Spezifität dieses Antikörpers nahe. Zudem wurden im Rahmen der Vorarbeiten zu diesem Projekt auch Probeschnitte mit einem kommerziellen N-terminalen Antikörper durchgeführt, der vergleichbare Färbemuster in überlappenden anatomischen Gehirnregionen erbrachte. Die Unterschiede zwischen C-terminalen und N-terminalen Antikörpern wurden zuvor von anderen Arbeitsgruppen erarbeitet: Insgesamt zeigte sich hier, dass sich die anatomischen Expressionsmuster von CB<sub>1</sub>-R am validesten mit dem C-terminalen Antikörper nachweisen ließen, sodass entsprechend auch in der hier vorgelegten Arbeit dieser Antikörper für die Untersuchungen verwendet wurde (Farquhar-Smith, et al., 2000; Grimsey, et al., 2008).

Die Applikation einer Rückenmarkläsion änderte an der anatomischen CB<sub>1</sub>-R Expressionsverteilung, wie sie für die Kontrolltiere erarbeitet wurde, nichts. Was sich änderte waren die Immunreaktivitätsdichten: In den schmerz- und lernrelevanten Kerngebieten der Amygdala, des Hippocampus, des Thalamus, des Cingulum und des PAG nahmen abhängig von der Stärke der Läsion und von der Zeit nach dem Trauma die Expression der CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivitätsdichten zu oder ab. Der CB<sub>1</sub>-R Rezeptor war dabei interessanterweise koexprimiert mit den Chemokinen CCL-2 und CCL-3 sowie deren Rezeptoren CCR-2 und CCR-1. An DPO 42 war der schmerzrelevante Rezeptor TRPV1 koexprimiert mit CB<sub>1</sub>-R in Tieren, die



eine schwere (200-kdyn) spinale Läsion erhielten und zentrale Schmerzen aufwiesen. Diese Koexpression war nachweisbar in den Kerngebieten des Thalamus, PAG und Hippocampus; damit also in Gehirnarealen, die für die Schmerzverarbeitung wesentlich sind.

Diese Ergebnisse geben erstmalig Hinweise auf eine mögliche Involvierung des CB<sub>1</sub>-R und des Chemokin-Effektor-/Rezeptor-Systems in die Entstehung zentraler Schmerzen auf supra-spinaler Ebene nach Rückenmarkverletzungen. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen Gehirnregionen diskutiert.

#### **4.1. CB<sub>1</sub>-R Expression und Immunoreaktivitätsdichten im anterioren Kortexareal des Cingulum und Kerngebieten der Amygdala**

Zusammengefasst war der CB<sub>1</sub>-R in den Kontusionsgruppen der DPO7-Kohorte im anterioren Kortexareal des Cingulums auf signifikant niedrigerem immunhistochemischen Level nachweisbar im Vergleich zu der konstitutiven Expression in den Kontrolltieren. In der DPO42-Kohorte hingegen wurden eine gegenüber der Kontrollgruppe induzierte Expression in der 100 kdyn-Gruppe und eine konstante Expression in der 200 kdyn-Gruppe nachweisbar.

Das Cingulum (Lat. = Gürtel) ist eine Assoziationsbahn des Telencephalons, die unter dem Gyrus cinguli dorsal des Balkens verläuft und als Teil des Papez-Bogens zum limbischen System gehört.

In unterschiedlichen Anteilen des Cingulums werden verschiedene kognitive Funktionen verarbeitet, die u.a. die Schmerzverarbeitung, Angstreaktionen und das Risiko- und Konfliktmanagement betreffen (Vogt, 2005; Xiao, et al., 2018; Bliss, et al., 2016). Das anteriore Kortexareal des Cingulum ist u.a. in emotionale Regungen wie Freude und Traurigkeit, Angst und Problemlösung (Konzentration auf eine Aufgabe) involviert (Vogt, 2005; Xiao, et al., 2018; Bliss, et al., 2016). Auch wurden Verbindungen des anterioren Kortexareals des Cingulum zum CeA der Amygdala sowie zum PAG u.a. nachgewiesen (Vogt, 2005).

Die verminderte Immunoreaktivität des CB<sub>1</sub>-R in der DPO7-Kohorte könnte dahingehend interpretiert werden, dass die modulatorische Wirkung dieses Rezeptors in einem Areal, das mit emotionalen Funktionen verknüpft ist, nach einem spinalen Trauma eine Rolle spielt (Angst, Konfliktmanagement, Schmerz). Die erarbeiteten immunhistochemischen Daten können natürlich nicht funktionell interpretiert werden, da dies eine grundlegende Limitation

des der vorgelegten Arbeit zugrunde liegenden Studienparadigmas ist. Vor dem Hintergrund der zuvor ermittelten Verhaltensdaten (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008) könnten die im Spätverlauf ermittelten Unterschiede der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität in den verschiedenen Läsionsgruppen aber durchaus in Zusammenhang gebracht werden mit den unterschiedlichen Reaktionen auf Berührungs- und Wärmereize: Die 100-kdyn Läsionsgruppe zeigte im Spätverlauf (DPO42) keine schmerzassoziierten Verhalten mehr im Gegensatz zu den 200-kdyn Tieren, die neuropathische Schmerzkorrelate (Allodynie) boten und in denen auch an DPO 42 noch herabgesetzte CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität messbar waren (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008).

Das Cingulum ist als Teil des limbischen Systems mit anderen anatomischen Strukturen im Gehirn verbunden, die ebenfalls Änderungen in der CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivitätsdichte zeigten, wie z.B. Kerngebiete der Amygdala. Die Amygdala empfängt aus dem Thalamus, dem Insel Kortex, dem anterioren Kortexareal des Cingulums und aus dem Assoziationskortex sensorische Informationen (Neugebauer, 2007; Veinante, et al., 2013; Thompson, et al., 2017). Der Großteil der Informationen erreicht die Amygdala über den Ncl. lateralis der Amygdala (LA) und Ncl. basolateralis der Amygdala (BLA) (Neugebauer, 2007; Veinante, et al., 2013; Thompson, et al., 2017). Diese Informationen werden im Verbindungskreis des Ncl. lateralis (LA) und Ncl. basolateralis (BLA) mit affektiven Informationen, wie z.B. Angst und Erregung, verbunden und als gemeinsame Information in den Ncl. centralis der Amygdala (CeA) weitergeleitet (Neugebauer, 2007; Veinante, et al., 2013; Greenwald, et al., 2018; Thompson, et al., 2017). Nozizeptive Informationen erreichen den CeA auch direkt aus dem Hirnstamm und aus dem Rückenmark über den Tractus spinoreticularis (Neugebauer, 2007; Veinante, et al., 2013). Diese nozizeptiven Informationen werden in den lateralen Kapselanteil (CeLC) des CeA weitergeleitet (Neugebauer, 2007; Veinante, et al., 2013; Thompson, et al., 2017). Von dort ziehen wiederum Projektionsbahnen zu anderen Anteilen des limbischen Systems, dem Hypothalamus und Hirnstammregionen, wie dem Periaquäduktalen Grau (PAG) (Neugebauer, 2007; Thompson, et al., 2017), einer Gehirnregion, die ebenfalls Änderungen in der CB<sub>1</sub>-R Expressionsdichte zeigte (siehe unten).

In der vorgelegten Arbeit zeigten sich in den Kerngebieten des BLA und AHip der Amygdala Veränderungen bezgl. des CB<sub>1</sub>-R: In beiden Kontusionsgruppen der DPO7-Kohorte waren die CB<sub>1</sub>-R-Immunreaktivitätsdichten im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant herabgesetzt. Im zeitlichen Verlauf ließ sich die verminderte Expression für beide Kerngebiete dann nur noch

in der 200 kdyn-Gruppe der DPO42-Kohorte nachweisen. In der 100 kdyn-Gruppe war die verminderte CB<sub>1</sub>-R Expression zu diesem Zeitpunkt noch im BLA nachweisbar.

Die Funktion des CB<sub>1</sub>-R als Inhibitor von GABAerger Transmitterausschüttung (Patel, et al., 2010) könnte vor diesem Hintergrund zur Folge haben, dass durch die Unterdrückung der Hemmung den eingehenden Schmerzsignalen in der Amygdala eine höhere affektive Gewichtung zugeordnet wird. In einem peripheren Nervenläsionsmodell zeigten die betroffenen Ratten z.B. depressive Verhaltenskorrelate welche mit einer Volumenzunahme des BLA und zentralen Kernkomplexes der Amygdala einherging (Goncalves, et al., 2008). Depressive Verstimmtheit ist dabei eine typische Begleitreaktion chronischer neuropathischer Schmerzen (Yalcin, et al., 2014).

Darüber hinaus wurde in anderen Tiermodellen zur Untersuchung peripherer neuropathischer Schmerzen neuroplastische Veränderungen in der Amygdala beschrieben (Carrasquillo, et al., 2007; Narita, et al., 2007; Luongo, et al., 2013). In diesem Kontext könnten auch die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit interpretiert werden. Insbesondere die Tiere, die nach einer 200 kdyn Läsion im Spätverlauf schmerzassoziiertes Verhalten aufwiesen, zeigten auch signifikante langanhaltende Veränderungen der CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivitätsdichten. Möglicherweise hat also die Expressionsregulierung des CB<sub>1</sub>-R im BLA und AHip der Amygdala auch Auswirkungen auf die Entstehung von zentralen neuropathischen Schmerzen nach einem spinalen Trauma. Diese möglichen neuroplastischen Veränderungen in der Amygdala nach einem spinalen Trauma müssen in weiterführenden funktionellen Untersuchungen weiter belegt werden (z.B. durch Ergänzung bildgebender Verfahren oder elektrophysiologischer Untersuchungen).

## **4.2. CB<sub>1</sub>-R Expression und Immunoreaktivitätsdichten im Hippocampus**

Eine weitere anatomische Lokalisation von CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität war der Hippocampus, der ebenfalls mit o.g. Strukturen funktionell verknüpft ist und bei unterschiedlichen Lernprozessen mittels Langzeitpotenzierung sowie Entstehung von chronisch neuropathischen Schmerzen eine Schlüsselrolle spielt (Cox, et al., 2014; Bliss, et al., 1973; Mutso, et al., 2012). Zudem spielen hippocampale Regionen eine wichtige Rolle bei der Stressverarbeitung (Jalalvand, et al., 2008) bzw. zeigen auf Stress neuroplastische Veränderungen oder apoptotischen Zelltod, z.B. in der CA3 Region (Watanabe, et al., 1992). Interessant für die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit sind die Erkenntnisse bzgl. des CB<sub>1</sub>-R,

dass dieser posttraumatische Einflüsse auf die Neurogenese im Hippocampus hat (Wolf, et al., 2010). Die Untersuchung der CB<sub>1</sub>-R Expressionsmuster und Immunreaktivitätsdichten im Hippocampus erbrachte „regionale“ Unterschiede. So wurde im Vergleich zur Sham-Gruppe und 100 kdyn-Läsionsgruppe im Bereich des CA1 eine signifikant höhere CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivitätsdichte in der 200 kdyn-Gruppe der DPO42-Kohorte nachweisbar. Im Bereich des CA3 zeigte sich ebenfalls nur in der 200-kydyn Gruppe eine signifikant erhöhte Expression in der DPO7-Kohorte. Diese blieb auch in der 200 kdyn-Gruppe der DPO42-Kohorte signifikant erhöht. Im Gyrus Dentatus (DG) hingegen zeigte sich eine signifikant verminderte Expression des Rezeptors in der 100 kdyn-Gruppe im Gegensatz zu den 200-kydyn Tieren, die eine erhöhte CB<sub>1</sub>-R Expression aufwiesen. Parallel zu der erhöhten CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität zeigte sich eine Induktion der Chemokin-Immunoreaktivität in CA1, CA3 und DG, die teilweise mit dem CB<sub>1</sub>-R kolokalisiert war. Aufgrund der regional spezifischen Expression der Chemokine im Gehirn wurde auch für die Mediatoren eine modulatorische Funktion im Gehirn postuliert (Banisadr, et al., 2005). Dabei gibt es aus der Literatur Hinweise darauf, dass das Chemokin-Netzwerk mit dem Cannabinoid-System über G-Protein-gekoppelte heterologe Desensitivierung interagiert (Adler, et al., 2005; Benamar, et al., 2008).

Ebenfalls koexprimiert mit dem CB<sub>1</sub>-R war der TRPV1, welcher wiederum in der Schmerzverarbeitung eine essentielle Rolle spielt und ebenfalls in unterschiedlichen Regionen des Gehirns nachweisbar ist, die sowohl bei der Schmerzentstehung, aber auch in assoziierte emotionale Reaktionen (Angstverhalten, Stressreaktionen) involviert sind (Davis, et al., 2000; Mezey E, et al., 2000; Roberts, et al., 2004). So ist auch der Hippocampus neben seiner essentiellen Funktion bei Lern- und Gedächtnisprozessen in das Entstehen von akuten sowie neuropathischen Schmerzen involviert (Cox, et al., 2014; Bliss, et al., 1973; Mutso, et al., 2012; Davis, et al., 2000; Mezey E, et al., 2000; Roberts, et al., 2004; McKenna, et al., 1992). So wurde u.a. gezeigt, dass z.B. durch Mikroinjektionen von Lidocain in den DG des Hippocampus von Ratten die Schmerzwahrnehmung im Tierversuch reduziert werden konnte (McKenna, et al., 1992). In Tiermodellen zum inflammatorischen Schmerz konnten entsprechend neuroplastische Veränderungen in der CA1, CA3 und DG mit Verminderung der Fos-positiven Zellpopulation (Khanna, et al., 2004) und Änderungen in der Expression von Neurokinin-1- (NK1)-Rezeptoren und Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) Genexpression (Duric, et al., 2007) nachgewiesen werden.

In neuropathischen Schmerzmodellen konnte in Korrelation mit dem Auftreten entsprechender Schmerzen die Induktion inflammatorischer Mediatoren (IL1 $\beta$ ) im Hippocampus nachgewiesen werden (del Rey, et al., 2011). Ähnlich verhielt es sich in dem Modell der hier vorgelegten Arbeit. Wie oben bereits beschrieben wurden auch die Chemokine in dieser Gehirnregion nachweisbar: In der CA1 Region zeigte sich immunhistochemisch eine erhöhte Expression des CCL3/CCR1-Paares in der 200 kdyn-Gruppe der DPO42-Kohorte; das CCL2/CCR2-Paar wurde in dieser Region in der DPO7-Kohorte in keiner Gruppe und in der DPO42-Kohorte ausschließlich in der 200 kdyn-Gruppe, und damit bei Tieren, die chronische Schmerzen nach dem spinalen Trauma entwickelten, nachgewiesen (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008).

Die Expressionsmuster und Dichteveränderungen von CB<sub>1</sub>-R, Chemokinen CCL2 und CCL3 und deren Rezeptoren CCR2 und CCR1 sowie TRPV1 nach spinalen Kontusionsläsionen geben noch einmal mehr Hinweise darauf, dass die Entstehung von neuropathischen Schmerzen und emotionalen Veränderungen nach einem spinalen Trauma multimodalen, komplexen Interaktionen unterschiedlicher Mediatoren unterliegt.

### **4.3. CB<sub>1</sub>-R Expression und Immunoreaktivitätsdichten in Kerngebieten des Thalamus**

Der Thalamus ist essentiell für die Schmerzverarbeitung auf supraspinaler Ebene (Zhao, et al., 2007; Groenewegen, et al., 2004; Al-Chalabi, et al., 2018; Zhuo, 2007). Entsprechend wurde in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen und Modellen zur Erforschung neuropathischer Schmerzen neuronale Plastizität in unterschiedlichen thalamischen Kerngebieten nachgewiesen (Groh, et al., 2018; Saab, 2012; Zhang, et al., 2017; Park, et al., 2018). Auch bzgl. des in der vorgelegten Arbeit verwendeten spinalen Kontusionsmodells zur Erforschung zentraler neuropathischer Schmerzen wurden signifikante Veränderungen der CB<sub>1</sub>-R Expression und weiterer inflammatorischer Mediatoren (Chemokine) in dieser Gehirnregion nachweisbar.

So wurde im VPL und VPM des Thalamus eine signifikant induzierte Immunoreaktivitätsdichte des CB<sub>1</sub>-R in der 100 kdyn-Gruppe und in der 200 kdyn-Gruppe der DPO7-Kohorte und in der 100 kdyn-Gruppe der DPO42-Kohorte nachgewiesen.

Die Chemokine-Liganden-/Rezeptor-Paare CCL2/CCR2 und CCL3/CCR1 waren ausschließlich in der 200-kdyn Kohorte im chronischen Zeitverlauf (DPO 42) mittels Immunhistochemie nachweisbar.

Die schmerzrelevanten Laminae der spinalen Hinterhörner (Lamina I, V, und tiefer) projizieren über ihre Bahnen in unterschiedliche thalamische Kerngebiete, wobei v.a. der ventrale posteriore laterale Nucleus (VPL) und ventrale posteriore mediale Nucleus (VPM) eine wichtige Relaisstation bilden (Boadas-Vaello, et al., 2017). Von diesen Kerngebieten ziehen Bahnen zu unterschiedlichen kortikalen Arealen (u.a. somatosensorischer Kortex, Insel, anteriores Cingulum) (Treede, et al., 1999). Verletzungen des zentralen Nervensystems können über die Induktion unterschiedlicher neuroplastischer Veränderungen in Kerngebieten des Thalamus wie z.B. Reduktion inhibierender Einflüsse, Übererregbarkeit thalamischer Neurone, glialer Aktivierung zur Entwicklung zentraler neuropathischer Schmerzen führen: So wurde nach einem spinalen Trauma u.a. eine Suppression GABAerger Neurone in der Zona incerta nachgewiesen mit resultierenden Veränderungen im posterioren Kerngebiet des Thalamus, was wiederum mit einer Hyperalgesie der betroffenen Tiere korrelierte (Masri, et al., 2009). Daneben wurden Veränderungen in anderen Kerngebieten sichtbar, die auch die emotional-affektiven Aspekte neuropathischer Schmerzen betrafen (mediodorsaler Thalamus) (Whitt, et al., 2013). Elektrophysiologische Messungen in einem Modell zur Untersuchung von peripheren neuropathischen Schmerzen („Chronic Constrictive Injury = CCI) wiesen Änderungen in der Aktivität von Neuronen im VPM nach (Vos, et al., 2000). In der vorgelegten Arbeit könnte die Induktion pro-inflammatorischer Mediatoren (CCL2 und CCL3) im VPL, VPM und Rt über eine heterologe Desensitivierung des CB<sub>1</sub>-R zur Entwicklung chronischer neuropathischer Schmerzen nach schweren Läsionen mit beitragen. Ein derartiger Mechanismus wurde in der Literatur insbesondere für das Periaquäduktale Grau beschrieben, welches im Folgenden und letzten Abschnitt der Diskussion im Fokus steht.

#### **4.4. CB<sub>1</sub>-R Expression und Immunreaktivitätsdichten im Periaquäduktale Grau (PAG)**

Neben den bisher diskutierten anatomischen CB<sub>1</sub>-R Expressionslokalisationen waren auch Änderungen bzgl. der CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität im periaquäduktalen Grau (PAG) nachweisbar. So war die CB<sub>1</sub>-R Immunreaktivität in der DPO7-Kohorte beider Kontusionsgruppen

gegenüber der Kontrollgruppe signifikant vermindert. Zum späteren Überlebenszeitpunkt blieb die CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität in der 200 kdyn-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe und der 100 kdyn-Gruppe konstant signifikant vermindert, während die CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivität in der 100 kdyn-Gruppe wieder vergleichbare Dichtewerte wie in den Kontrollen erreichten. Damit waren die CB<sub>1</sub>-R Expressionsmuster im PAG und Thalamus ähnlich. Auch in dieser anatomischen Region bestand eine Koexpression mit den Chemokinen CCL2 und CCL3. Letztere ließen sich mit einer starken Immunoreaktivität nach einem spinalen Trauma im PAG nachweisen, während die Kontrolltiere keine Chemokin-Immunoreaktivität aufwiesen. Wie bereits in der Literatur beschrieben zeigten einzelne CB<sub>1</sub>-R immunreaktive Zellen im PAG auch eine Expression des schmerzassoziierten Rezeptors TRPV1 (Maione, et al., 2006; Ishikura, et al., 2015).

Damit wurden CB<sub>1</sub>-R und die untersuchten Chemokine in einer zusätzlichen Gehirnregion nachweisbar, die primär in der Schmerzverarbeitung eine wichtige Rolle spielt (Willis, et al., 2004). Die Schmerz-assoziierten neuroplastischen Veränderungen und nozizeptiven Modulationen im Hirnstamm sind komplex und involvieren diverse anatomische Strukturen, Kerngebiete und Neurotransmittersysteme (Boadas-Vaello, et al., 2017; Willis, et al., 2004). Das PAG erhält u.a. Input von spinalen Neuronen der Lamina I, IV-VIII und X, deren Axone den Spinomesenzephalen-Trakt bilden (Willis, et al., 2004). Zusätzlich erhält das PAG afferenten Input aus dem präfrontalen und Teilen des insulären Kortex, Kerngebieten der Amygdala und Hypothalamus und anderen Hirnstammarealen (Tractus soletarius, Nucleus cuneiformis, der pontinen retikulären Formation, dem Locus coeruleus und anderen katecholaminergen Kernen) (Willis, et al., 2004). Bzgl. der deszendierenden Bahnen projiziert das PAG über Axone zum Locus coeruleus und der rostralen ventromedialen Medulla mit Verbindungen zum Hinterhorn des Rückenmarks (Willis, et al., 2004). Diese deszendierenden Verbindungen sind eine der wesentlichen Schmerzleitungen zum Hinterhorn und werden unter pathologischen Bedingungen entsprechend verändert und moduliert (Willis, et al., 2004). So wurde z.B. nach chronischer Konstriktion peripherer Nerven (Chronic Constriction Injury = CCI, ein Tiermodell peripherer neuropathischer Schmerzen) eine Gliose und Induktion von Kinasen und Zytokinen im PAG beschrieben (Mor, et al., 2010; Ni, et al., 2016; Chu, et al., 2012). Palazzo et al. zeigten ebenfalls für das CCI-Modell eine verminderte Expression von CB<sub>1</sub>-R in PAG Neuronen (Palazzo, et al., 2012).

In diesen Kontext fügen sich auch die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit ein. Über die Applikation eines spinalen Traumas und durch bedingte Induktion von entzündlichen Veränderungen auf spinaler und supraspinaler Ebene (Knerlich-Lukoschus, et al., 2011) scheint das Endocannabinoid-System moduliert und herunterreguliert zu werden. Dieses ist nach den hier vorgelegten Ergebnissen interessanterweise abhängig von der Stärke der spinalen Schädigung und damit einhergehenden Begleitreaktionen (u.a. Entzündungsreaktion). Da Chemokine mit den analgetischen Effekten von Cannabinoid Rezeptor-Agonisten im PAG interferieren können (Benamar, et al., 2008), könnte dieser Mechanismus auch nach einem spinalen Trauma eine Rolle spielen. Wie o.g. wurden Chemokine nach schweren Läsionen in Tieren, die chronische Schmerzkorrelate aufwiesen, auch im PAG auf signifikant erhöhtem Dichtelevel messbar. In der Literatur wurde diesbezüglich eine mögliche heterologe Desensitivierung der G-Protein vermittelten Rezeptoren postuliert, wodurch über die Aktivierung von Chemokinen der CB<sub>1</sub>-R antagonisiert werden könnte (Chen, et al., 2007; Zhang, et al., 2004; Szabo, et al., 2002).

Spekulationen bzgl. funktioneller Zusammenhänge sind entsprechend des Ansatzes der vorgelegten Arbeit nicht möglich. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der aktuellen wissenschaftlichen Literatur kann aber festgehalten werden, dass periphere bzw. spinale Pathologien zu zellulären und molekularen Veränderungen auch auf supraspinaler Ebene führen, die über Modulation der absteigenden Bahnen wiederum die Entstehung neuropathischer Schmerzen mit beeinflussen könnten. Weitere Aufschlüsse könnten u.a. weiterführende experimentelle Ansätze mit Knock-out Mäusen geben, bei denen CB<sub>1</sub>-Rezeptoren fehlen. So könnten wichtige CB<sub>1</sub>-R vermittelte Funktionen in derartigen transgenen Tieren bzgl. Cannabinoid vermittelter Effekte auf motorische Aktivitäten, Angst, Furcht, Schmerz und kognitive Funktionen untersucht werden (Ledent, et al., 1999; Zimmer, et al., 1999; Ignatowska-Jankowska, et al., 2015; Sideris, et al., 2016). Der Einsatz transgener Tiere in dem in der vorgelegten Arbeit verwendeten spinalen Traumamodell könnte daher ggf. auch weitere Einblicke in die funktionellen Zusammenhänge spinaler und supraspinaler Modulationen von Schmerzprozessen geben.



## 5. Zusammenfassung

In der vorgelegten Arbeit wurde das Expressionsmuster und die Immunoreaktivitätsdichten von CB<sub>1</sub>-R im Gehirn von Ratten untersucht, bei denen zuvor standardisierte spinale Läsionen unterschiedlicher Stärke (100-kdyn oder 200-kdyn) auf der Höhe Th9 appliziert wurden. Kontrolltiere erhielten nur eine Laminektomie auf derselben spinalen Höhe ohne Läsionsapplikation. Bei der Analyse der Expressionsmuster standen Gehirnareale im Fokus, die potentiell in der Entstehung von Langzeitkomplikationen wie der Entwicklung zentraler neuropathischer Schmerzen, emotionaler Dysbalance und kognitiver Beeinträchtigungen nach einem spinalen Trauma involviert sein könnten (Jensen MP, 2007; Boadas-Vaello, et al., 2017; Zhao, et al., 2007; Abbadie, et al., 2009; Guindon, et al., 2009; Neugebauer, 2007; Groenewegen, et al., 2004; Zhuo, 2007). Es wurden unterschiedliche Überlebenszeitpunkte nach dem Trauma untersucht (7 Tage, 15 Tage, 42 Tage nach der Läsion oder Laminektomie). Dabei konnten signifikante Zeit- und Läsionsstärke-abhängige Veränderungen der CB<sub>1</sub>-R-Immunoreaktivitätsdichten in den Kerngebieten der Amygdala, des anterioren cingulären Kortex, Arealen des Hippocampus, des Thalamus und des PAG nachgewiesen werden.

Die Applikation einer Rückenmark-Läsion änderte an der anatomischen CB<sub>1</sub>-R Expressionsverteilung, wie sie für die Kontrolltiere erarbeitet wurde, nichts. Was sich änderte waren die Immunoreaktivitätsdichten: In den schmerz- und lernrelevanten Kerngebieten der Amygdala, des Hippocampus, des Thalamus, des Cingulum und des PAG nahmen abhängig von der Stärke der Läsion und von der Zeit nach dem Trauma die Expression der CB<sub>1</sub>-R Immunoreaktivitätsdichten zu oder ab. Diese Veränderungen gingen einher mit Änderungen im Schmerzverhalten der unterschiedlichen Läsionsgruppen (Knerlich-Lukoschus, et al., 2008). Der CB<sub>1</sub>-R war dabei interessanterweise koexprimiert mit den Chemokinen CCL-2 und CCL-3, sowie deren Rezeptoren CCR-2 und CCR-1. An DPO 42 war darüber hinaus der schmerzrelevante Rezeptor TRPV1 koexprimiert mit dem CB<sub>1</sub>-R in Tieren, die eine schwere (200-kdyn) spinale Läsion erhielten und zentrale Schmerzen aufwiesen. Diese Koexpression war nachweisbar in den Kerngebieten des Thalamus, PAG und Hippocampus. Damit also in Gehirnarealen, die für die Schmerzverarbeitung wesentlich sind (s. Abb. 28).

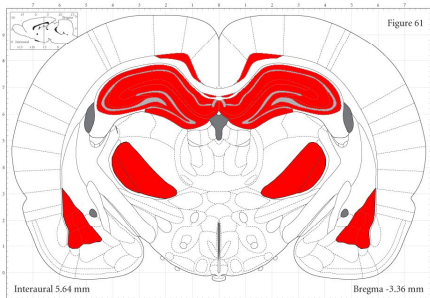
Diese Ergebnisse geben erstmalig Hinweise auf eine mögliche Involvierung des CB<sub>1</sub>-R und des Chemokine-Effektor-/Rezeptor-Systems in die Entstehung zentraler Schmerzen auf supraspinaler Ebene nach Rückenmarksverletzungen (s. Abb. 28). Die funktionelle Bedeutung dieser Beobachtungen wird im Fokus weiterführender Untersuchungen stehen (Applikation von Agonisten/Antagonisten; transgene Tiere, funktionelle Bildgebung).

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit (bzgl. der supraspinalen Veränderungen) mit denen vorangegangener Untersuchungen bzgl. spinaler Veränderungen in dem verwendeten Kontusionsmodell und der aktuellen Literatur kann abschließend festgehalten werden, dass ein lokales spinales Trauma weitreichende Veränderungen auf unterschiedlichen Ebenen des zentralen Nervensystems induziert und die Langzeitkomplikationen aus entsprechend komplexen strukturellen, funktionellen und molekularen Veränderungen resultieren (s. Abb. 28).

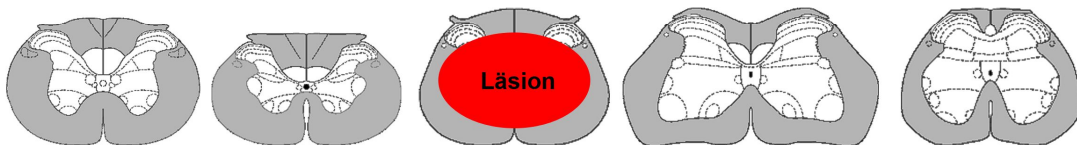
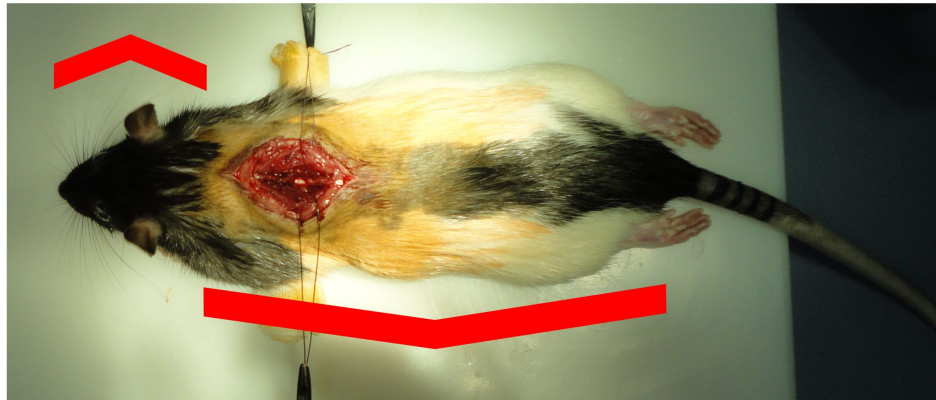
## supraspinale Ebene

- Kerngebiete der Amygdala (BLA)
- anteriores Kortexareal des Cingulum
- hippocampale Subregionen (CA1, CA3, DG)
- Thalamus (VPL, VPM)
- PAG

- kognitive Funktionen
- Emotionen
- komplexe, posttraumatische Schmerzsynrome



Knerlich-Lukoschus, Friederike; Noack, Malte et al. 2011. Spinal Cord Injuries Induce Changes in CB1 Cannabinoid Receptor and C-C Chemokine Expression in Brain Areas Underlying Circuitry of Chronic Pain Conditions. Journal of Neurotrauma.



## spinale Ebene

- Läsion und Läsionsrand
- ventrolaterale weiße Substanz
- Hinterhörner
- Hinterstränge

- posttraumatische Inflammation
- Einfluss auf regenerative Prozesse
- akute post-operative Schmerzen
- chronische (zentrale neuropathische) Schmerzen

Knerlich-Lukoschus, Friederike; et al. Force-dependent development of neuropathic central pain and time-related CCL2/CCR2 expression after graded spinal cord contusion injuries of the rat. Journal of Neurotrauma. 2008 25(5), pp. 427-448

**Abbildung 28: Schematische Zusammenfassung der in der Arbeit dargelegten Ergebnisse der supraspinalen Veränderungen.** Darstellung der Rattenhirnschnitte und der Rückenmark-Schnitte aus Paxinos und Watson, 2007. Bild von der standardisierten operativen Rückenmarkkontusion. Spinale Schädigung auf Höhe Th9. Teile vom Text und Darstellung mit freundlicher Genehmigung von PD Dr.med. F. Knerlich-Lukoschus aus Ihrer Habilitationsschrift „Chemokine und Chemokine-Rezeptoren in der sekundären Schadenscascade nach experimentellem spinalen Trauma in der Ratte“ von 2011.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbadie, Catherine, et al. 2009.** Chemokines and pain mechanisms. *Journal of Brain Research Reviews*. 2009, 60(1), S. 125-134.
- Abood, Mary E. 2010.** Molecular Biology of Cannabinoid Receptors: Mutational Analyses of the CB Receptors. [book auth.] Patricia H Reggio. *The Cannabinoid Receptors*. s.l. : Humana Press, 2010, 8, pp. 203-234.
- Adler, M W und Rogers, T J. 2005.** Are Chemokines the third major system in the brain? *J Leukoc Biol*. Dec 2005, 78(6), S. 1204-1209.
- Adler, Martin W, et al. 2005.** Viewing chemokines as a third major system of communication in the brain. *AAPS Journal*. Dec 2005, 7(4), S. E865-E870.
- Ahuja, Christopher S, Martin, Allan R und Fehlings, Michael G. 2016.** Recent advances in managing a spinal cord injury secondary to trauma. *F1000 Research Faculty Rev*. 2016, 1017.
- Al-Chalabi, Mustafa und Gupta, Sonu. 2018.** Neuroanatomy, Spinothalamic Tract [Updated 2018 Sep 7]. *StatPearls [Internet]*. -. . s.l. : Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2018 Jan, 2018.
- Asensio, V C und Campbell, I L. 1999.** Chemokines in the CNS: plurifunctional mediators in diverse states. *Trends Neurosci*. 1999, 22(11), S. 504-512.
- Banisadr, Ghazal, et al. 2005.** Constitutive Neuronal Expression of CCR2 Chemokine Receptor and its Colocalization with Neurotransmitters in Normal Rat Brain Functional Effect of MCP-1/CCL2 on Calcium Mobilization in Primary Cultured Neurons. *J Comp Neurol*. 14. Nov 2005, 492(2), S. 178-192.
- Benamar, Khalid, Geller, Ellen B. und Adler, Martin W. 2008.** First in vivo evidence for a functional interaction between chemokine and cannabinoid systems in the brain. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics*. 325, 2008, 2, S. 641-645.
- Bliss, T V und Lomo, T. 1973.** Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *Journal of Physiology*. 1973, 232(2), S. 331-356.
- Bliss, T V, et al. 2016.** Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. August 2016, 17(8), S. 485-496.
- Boadas-Vaello, Pere, et al. 2017.** Neuroplasticity of Supraspinal Structures Associated with Pathological Pain. *The Anatomical Record*. 2017, 300, S. 1481-1501.
- Carrasquillo, Y und Gereau, R W 4th. 2007.** Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. *J Neurosci*. 14. Feb 2007, 27(7), S. 1543-1551.
- Chen, X, et al. 2007.** Rapid heterologous desensitization of antinociceptive activity between mu or delta opioid receptors and chemokine receptors in rats. *Drug Alcohol Depend*. 17. April 2007, 88(1), S. 36-41.
- Chu, H, et al. 2012.** Effect of periaqueductal gray melanocortin 4 receptor in pain facilitation and glial activation in rat model of chronic constriction injury. *Neurol Res*. November 2012, 34(9), S. 871-888.

- Cox, Conor D, et al. 2014.** A Map of LTP-Related Synaptic Changes in Dorsal Hippocampus Following Unsupervised Learning. *Journal of Neuroscience*. 19. Februar 2014, 34(8), S. 3033-3041.
- Cristino, L, et al. 2006.** Immunohistochemical Localization of Cannabinoid Type 1 and Vanilloid Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Receptors in the Mouse Brain. *Neuroscience*. 2006, 139, S. 1405-1415.
- Davis, J B, et al. 2000.** Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature*. 11. May 2000, 405(6783), S. 183-187.
- del Rey, A, et al. 2011.** Chronic neuropathic pain-like behavior correlates with IL-1 $\beta$  expression and disrupts cytokine interactions in the hippocampus. *Pain*. Dec 2011, 152(12), S. 2827-2835.
- DSQ. 2018.** Deutsche Stiftung Querschnittlähmung. [Online] 2018. [Zitat vom: 04. 07 2018.] <http://www.dsq.de>. 1.
- Duric, V und McCarson, K E. 2007.** Neurokinin-1 (NK-1) receptor and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene expression is differentially modulated in the rat spinal dorsal horn and hippocampus during inflammatory pain. *Mol Pain*. 31. Oktober 2007, 3, S. 32.
- Egertová, M, Cravatt, B F und Elphick, M R. 2003.** Comparative analysis of fatty acid amide hydrolase and cb(1) cannabinoid receptor expression in the mouse brain: evidence of a widespread role for fatty acid amide hydrolase in regulation of endocannabinoid signaling. *Journal of Neuroscience*. 2003, 119(2), S. 481-496.
- Egertová, Michaela und Elphick, Maurice R. 2000.** Localisation of Cannabinoid Receptors in the rat brain using antibodies to the intracellular C-terminal tail of CB1. *Journal of Comparative Neurology*. 2000, 422(2), S. 159-171.
- Elphick, Maurice R und Egertová, Michaela. 2010.** Cannabinoid Receptor Genetics and Evolution. [Buchverf.] Patricia H Reggio. *The Cannabinoid Receptors*. s.l. : Humana Press, 2010, 5, S. 123-152.
- Farquhar-Smith, W P, et al. 2000.** Cannabinoid CB(1) receptor expression in rat spinal cord. *Moll Cell Neurosci*. 2000, 15(6), S. 510-521.
- Finnerup, N B, et al. 2001.** Pain and dysesthesia in patients with spinal cord injury: A postal survey. [Hrsg.] [www.nature.com/sc](http://www.nature.com/sc). *Spinal Cord*. 2001, 39, S. 256-262.
- Gao, Yong-Jing und Ji, Ru-Rong. 2010.** Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Journal of Pharmacological Therapies*. 2010, 126(1), S. 56-68.
- Gérard, CM, et al. 1991.** Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis. *Biochem. J*. 1991, 279, S. 129-134.
- Goncalves, L, et al. 2008.** Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Exp Neurol*. Sep 2008, 213(1), S. 48-56.
- Greenwald, J D und Shafritz, K M. 2018.** An Integrative Neuroscience Framework for the Treatment of Chronic Pain: From Cellular Alterations to Behavior. *Front Integr Neurosci*. 23. May 2018, 12, S. 18.

- Grimsey, N L, et al. 2008.** Specific detection of CB1 receptors; cannabinoid CB1 receptor antibodies are not all created equal. *J Neurosci Methods*. 15. June 2008, 171(1), S. 78-86.
- Groenewegen, Henk J. und Witter, Menno P. 2004.** Thalamus. [Buchverf.] George Paxinos. *The Rat Nervous System*. Third Edition. s.l. : Elsevier, 2004, 17, S. 407-444.
- Groh, A, et al. 2018.** Acute and Chronic Pain Processing in the Thalamocortical System of Humans and Animal Models. *Neuroscience*. 1. September 2018, 387, S. 58-71.
- Guindon, Josée und Hohmann, Andrea G. 2009.** The Endocannabinoid System and Pain. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*. 2009, 8, S. 403-421.
- Herkenham, Miles, et al. 1990.** Cannabinoid receptor localization in brain. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1990, Bd. Neurobiology, 87, S. 1932-1936.
- Howlett, AC, Barth, F und TI, Bonner. 2002.** International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of cannabinoid receptors. *Pharmacological Reviews*. 2002, 54(2), S. 161-202.
- Huffman, John W. 2010.** Cannabimimetic Indoles, Pyrroles and Indenes: Structure-Activity Relationships and Receptor Interactions. [Buchverf.] Patricia H Reggio. *The Cannabinoid Receptors*. s.l. : Humana Press, 2010, 3, S. 49-94.
- Hulsebosch, Claire E. 2002.** Recent Advances in Pathophysiology and treatment of spinal cord injury. *Advan in Physiol Edu*. 2002, 26, S. 238 - 255.
- Hulsebosch, Claire E., et al. 2009.** Mechanisms of Chronic Central Neuropathic Pain after Spinal Cord Injury. *Brain Research Review*. 2009, 60, S. 202-213.
- Hurst, Dow P und Reggio, Patricia H. 2010.** Models of Cannabinoid Inverse Agonism, Neutral Antagonism and Agonism: Tools for Rational Drug Design. [Buchverf.] Patricia H Reggio. *The Cannabinoid Receptors*. s.l. : Humana Press, 2010, 9, S. 235-280.
- IASP Task Force on Taxonomy. 1994.** Part III: Pain Terms, A Current List with Definitions and Notes on Usage, Classification of Chronic Pain. [Hrsg.] IASP. *IASP Press*. Second Edition, 1994, S. 209-214.
- Ignatowska-Jankowska, B M, et al. 2015.** A Cannabinoid CB1 Receptor-Positive Allosteric Modulator Reduces Neuropathic Pain in the Mouse with No Psychoactive Effects. *Neuropsychopharmacology*. December 2015, 40(13), S. 2948-2959.
- Ishikura, T, et al. 2015.** Possible involvement of TRPV1 and TRPV4 in nociceptive stimulation- induced nocifensive behavior and neuroendocrine response in mice. *Brain Res Bull*. September 2015, 118, S. 7-16.
- Jalalvand, E, et al. 2008.** Stress- and non-stress-mediated mechanisms are involved in pain-induced apoptosis in hippocampus and dorsal lumbar spinal cord in rats. *Neuroscience*. 19. November 2008, 157(2), S. 446-452.
- Jensen MP, Kuehn CM, Amtmann D, Cardenas DD. 2007.** Symptom burden in persons with spinal cord injury. *Arch Phys Med Rehabil*. 2007, 88(5), S. 638-645.

- Khanna, S, et al. 2004.** Nociception-driven decreased induction of Fos protein in ventral hippocampus field CA1 of the rat. *Brain Res.* 9. April 2004, 1004(1-2), S. 167-176.
- Klinke, Rainer, Pape, Hans-Christian und Silbernagl, Stefan. 2005.** *Physiologie.* 5. Stuttgart : Georg Thieme Verlag KG, 2005. 3-13-796005-3.
- Knerlich-Lukoschus, F, et al. 2010.** Chemokine expression in the white matter spinal cord precursor niche after force-defined spinal cord contusion in adult rats. *Glia.* 2010, 58, S. 916-931.
- Knerlich-Lukoschus, F, et al. 2008.** Force-dependent development of neuropathic central pain and time-related CCL2/CCR2 expression after graded spinal cord contusion injuries of the rat. *Journal of Neurotrauma.* 2008, 25(5), S. 427-448.
- Knerlich-Lukoschus, F, et al. 2011.** Spatio-temporal CCR1, CCL3(MIP-1a), CXCR4, CXCL12 (SDF-1a) expression patterns in a rat spinal cord injury model of post traumatic neuropathic pain. *J Neurosurg Spine.* 18. Februar 2011.
- Knerlich-Lukoschus, Friederike, et al. 2011.** Spinal Cord Injuries Induce Changes in CB1 Cannabinoid Receptor and C-C Chemokine Expression in Brain Areas Underlying Circuitry of Chronic Pain Conditions. *Journal of Neurotrauma.* 2011, 28, S. 619-634.
- Ledent, C, et al. 1999.** Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science.* 15. Januar 1999, 283(5400), S. 401-404.
- Lee, B B, et al. 2014.** The global map for traumatic spinal cord injury epidemiology: update 2011, global incidence rate. [Hrsg.] [www.nature.com/sc](http://www.nature.com/sc). *Spinal Cord.* 2014, Bd. 52, S. 110-116.
- Luongo, L, et al. 2013.** Role of metabotropic glutamate receptor 1 in the basolateral amygdala-driven prefrontal cortical deactivation in inflammatory pain in the rat. *Neuropharmacology.* March 2013, 66, S. 317-329.
- Maione, S, et al. 2006.** Elevation of endocannabinoid levels in the ventrolateral periaqueductal grey through inhibition of fatty acid amide hydrolase affects descending nociceptive pathways via both cannabinoid receptor type 1 and transient receptor potential vanilloid type-1. *J Pharmacol Exp Ther.* March 2006, 316(3), S. 969-982.
- Masri, R, et al. 2009.** Zona Incerta: A Role in Central Pain. *Journal of Neurophysiology.* July 2009, 102(1), S. 181-191.
- McKenna, John E und Melzack, Ronald. 1992.** Analgesia produced by lidocaine microinjection into the dentate gyms. *Pain.* April 1992, 49(1), S. 105-112.
- MD PhD Fitch, Michael T und PhD Silver, Jerry. 2008.** CNS Injury, Glial scars, and Inflammation: Inhibitory extracellular matrices and regeneration failure. *Exp Neurol.* 2008, 209(2), S. 294-301.
- Mezey E, et al. 2000.** Distribution of mRNA for vanilloid receptor subtype 1 (VR1), and VR1-like immunoreactivity, in the central nervous system of the rat and human. *Proc Natl Acad Sci USA.* 28. March 2000, 97(7), S. 3655-3660.

- Moldrich, Gabriella und Wenger, Tibor. 2000.** Localization of the CB1 cannabinoid receptor in the rat brain. An immunohistochemical study. *Peptides*. 2000, 21, S. 1735-1742.
- Mor, D, et al. 2010.** Anatomically specific patterns of glial activation in the periaqueductal gray of the sub-population of rats showing pain and disability following chronic constriction injury of the sciatic nerve. *Neuroscience*. 14. April 2010, 166(4), S. 1167-1184.
- Mutso, Amelia A, et al. 2012.** Abnormalities in Hippocampal Functioning with Persistent Pain. *Journal of Neuroscience*. 25. April 2012, 32(17), S. 5747-5756.
- Nagoshi, Narihito und Fehlings, Michael G. 2015.** Investigational drugs for the treatment of spinal cord injury: review of preclinical studies and evaluation of clinical trials from Phase I to II. *Expert opinion on investigational drugs*. Mai 2015, 24(5), S. 645-658.
- Narita, M, et al. 2007.** Involvement of microglia in the ethanol-induced neuropathic pain-like state in the rat. *Neurosci Lett*. 27. Feb 2007, 414(1), S. 21-25.
- National Spinal Cord Injury Statistical Center. 2018.** <https://www.nscisc.uab.edu/>. [Online] The SCI Statistical Center is in the Department of Physical Medicine and Rehabilitation , which is located at Spain Rehabilitation Center in the UAB Hospital complex., 2018. [Zitat vom: 23. November 2018.] <https://www.nscisc.uab.edu/Public/Facts%20and%20Figures%20-%202018.pdf>.
- Neugebauer, Volker. 2007.** Amygdala - Pain Processing and Pain Modulation. [Buchverf.] Min Zhuo. *Molecular Pain*. s.l. : Springer Verlag, 2007, S. 265-279.
- Ni, H D, et al. 2016.** Glial activation in the periaqueductal gray promotes descending facilitation of neuropathic pain through the p38 MAPK signaling pathway. *J Neurosci Res*. Jan 2016, 94(1), S. 50-61.
- Palazzo, E, et al. 2012.** Changes in cannabinoid receptor subtype 1 activity and interaction with metabotropic glutamate subtype 5 receptors in the periaqueductal gray-rostral ventromedial medulla pathway in a rodent neuropathic pain model. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. March 2012, 11(2), S. 148-161.
- Park, A, et al. 2018.** Pain After Spinal Cord Injury Is Associated With Abnormal Presynaptic Inhibition in the Posterior Nucleus of the Thalamus. *Pain*. July 2018, 19(7), S. e1-727.
- Patel, Sachin und Hillard, Cecilia J. 2010.** Endocannabinoids as Modulators of Synaptic Signaling. [Buchverf.] Patricia H Reggio. *The Cannabinoid Receptors*. s.l. : Humana Press, 2010, 10, S. 281-308.
- Paxinos, George und Watson, Charles. 2007.** *The Rat Brain - in stereotaxic coordinates*. 6. s.l. : Elsevier, 2007.
- Pertwee, RG. 2005.** The therapeutic potential of drugs that target cannabinoid receptors or modulate the tissue levels or actions of endocannabinoids. *AAPS Journal*. 2005, 7, S. 625-654.
- Pertwee, Roger G und Thomas, Adèle. 2010.** Therapeutic Applications for Agents that Act at CB1 and CB2 Receptors. [Buchverf.] Patricia H Reggio. *The Cannabinoid Receptor*. s.l. : Humana Press, 2010, 13, S. 361-392.



- Pettit, Denise A. Dove, et al. 1998.** Immunohistochemical Localization of the Neural Cannabinoid Receptor in Rat Brain. *Journal of Neuroscience*. 1998, 51, S. 391-402.
- PhD Rabchevsky, Alexander G und PhD Smith, George M. 2001.** Therapeutic Interventions Following Mammalian Spinal Cord Injury. [Hrsg.] American Medical Association. *Arch Neurol*. 2001, 58, S. 721-726.
- Roberts, J C, Davis, J B und Benham, C D. 2004.** [3H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res*. 9. Januar 2004, 995(2), S. 176-183.
- Rohkamm, Reinhard. 2009.** *Taschenatlas Neurologie 3. Auflage*. s.l. : Georg Thieme Verlag KG, 2009. 978-3-13-124193-1.
- Saab, C Y. 2012.** Pain-related changes in the brain: diagnostic and therapeutic potentials. *Trends Neurosci*. October 2012, 35(10), S. 629-637.
- Scheff, S W, et al. 2003.** Experimental Modelling of a Spinal Cord Injury: Characterization of a Force-Defined Injury Device. *Journal of Neurotrauma*. 2003, 20(2), S. 179-193.
- Schwab, Jan M, et al. 2004.** Akute Rückenmarkverletzung: Experimentelle Strategien als Basis zukünftiger Behandlungen. *Deutsches Ärzteblatt*. 2004, 101, S. A 1422-1434 [Heft 20].
- Siddall, P J und Loeser, J D. 2001.** Pain following spinal cord injury. [Hrsg.] [www.nature.com/sc](http://www.nature.com/sc). *Spinal Cord*. 2001, 39, S. 63-73.
- Siddall, PJ. 2008.** Management of neuropathic pain following spinal cord injury: now and in the future. [Hrsg.] [www.nature.com/sc](http://www.nature.com/sc). *Spinal Cord*. 2008, 47, S. 352-359.
- Sideris, A, et al. 2016.** Cannabinoid 1 receptor knockout mice display cold allodynia, but enhanced recovery from spared-nerve injury-induced mechanical hypersensitivity. *Mol Pain*. 20. May 2016, 12.
- Szabo, I, et al. 2002.** Heterologous desensitization of opioid receptors by chemokines inhibits chemotaxis and enhances the perception of pain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 6. August 2002, 99(16), S. 10276-10281.
- Thompson, J M und Neugebauer, V. 2017.** Amygdala Plasticity and Pain. *Pain Res Manag*. 2017, 2017, S. 12.
- Tran, P B und Miller, R J. 2003.** Chemokine receptors in the brain: a developing story. *J Comp Neurol*. 2003, 457, S. 1-6.
- Treede, R D, et al. 1999.** The cortical representation of pain. *Pain*. Februar 1999, 79(2-3), S. 105-111.
- Van Steenwinckel, Juliette, et al. 2011.** CCL2 Released from Neuronal Synaptic Vesicles in the Spinal Cord Is a Major Mediator of Local Inflammation and Pain after Peripheral Nerve Injury. *The Journal of Neuroscience*. 2011, 31(15), S. 5865-5875.
- Veinante, P, Yalcin, I und Barrot, M. 2013.** The amygdala between sensation and affect: a role in pain. *Journal of Molecular Psychiatry*. 5. June 2013, 1(1), S. 9.

- Vogt, Brent A. 2005.** Pain and Emotion Interactions in Subregions of the Cingulate Gyrus. *Nature Reviews Neuroscience*. 6(7), 2005, S. 533-544.
- Vos, B P, et al. 2000.** Changes in neuronal activities in the two ventral posterior medial thalamic nuclei in an experimental model of trigeminal pain in the rat by constriction of one infraorbital nerve. *Somatosens Mot Res*. 2000, 17(2), S. 109-122.
- Watanabe, Y, et al. 1992.** Phenytoin prevents stress- and corticosterone-induced atrophy of CA3 pyramidal neurons. *Hippocampus*. Oktober 1992, 2(4), S. 431-435.
- Whitt, J L, et al. 2013.** Pathological Activity in Mediodorsal Thalamus of Rats with Spinal Cord Injury Pain. *Journal of Neuroscience*. 27. February 2013, 33(9), S. 3915-3926.
- Willis, William D., Westlund, Karin N. und Carlton, Susan M. 2004.** Pain System. [Buchverf.] George Paxinos. *The Rat Nervous System*. Third Edition. s.l. : Elsevier (USA), 2004, 27, S. 853-875.
- Wolf, S A, et al. 2010.** Cannabinoid receptor CB1 mediates baseline and activity-induced survival of new neurons in adult hippocampal neurogenesis. *Cell Commun Signal*. 17. Juni 2010, 8, S. 12.
- Wyndaele, M und Wyndaele, J-J. 2006.** Incidence, prevalence and epidemiology of spinal cord injury: what learns a worldwide literature survey? [Hrsg.] [www.nature.com/sc](http://www.nature.com/sc). *Spinal Cord*. 2006, 44, S. 523–529.
- Xiao, X und Zhang, Y Q. 2018.** A new perspective on the anterior cingulate cortex and affective pain. *Neurosci Biobehv Rev*. July 2018, 90, S. 200-211.
- Yalcin, I, Barthas, F und Barrot, M. 2014.** Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies. *Neurosci Biobehav Rev*. Nov 2014, 47, S. 154-164.
- Zhang, C, et al. 2017.** Reduced GABAergic transmission in the ventrobasal thalamus contributes to thermal hyperalgesia in chronic inflammatory pain. *Sci Rep*. 2. February 2017, 7:41439.
- Zhang, N, et al. 2004.** Proinflammatory chemokines, such as C-C chemokine ligand 3, desensitize mu-opioid receptors on dorsal root ganglia neurons. *J Immunol*. 1. July 2004, 173(1), S. 594-599.
- Zhao, Peng, Waxman, Stephen G und Hains, Brian C. 2007.** Modulation of Thalamic Nociceptive Processing after Spinal Cord Injury through Remote Activation of Thalamic Microglia by Cysteine-Cysteine Chemokine Ligand 21. *The Journal of Neuroscience*. 2007, 27(33), S. 8893-8902.
- Zhuo, M. 2007.** Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Mol Pain*. 2007, 3, S. 14.
- Zimmer, A, et al. 1999.** Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB1 receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 11. May 1999, 96(10), S. 5780-5785.
- Zlotnik, Albert und Yoshie, Osamu. 2000.** Chemokines: A New Classification System And Their Role In Immunity. *Immunity*. 2000, 12, S. 121-127.

## **Danksagung**

Bei Herrn Professor Dr. med. Michael Synowitz möchte ich mich für die Bereitstellung der Laboratorien bedanken.

Bei Frau PD Dr. med. habil. Friederike Knerlich-Lukoschus möchte ich mich herzlich für die Unterstützung, Motivation und Geduld sowie die hervorragende wissenschaftliche Betreuung bedanken. Erst ihr außergewöhnliches Engagement hat diese Arbeit möglich gemacht. Mein Dank gilt auch Frau Professor Dr. rer. nat. Dr. med. Janka Held-Feindt für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung.

Herzlichen Dank auch an Frau Ute Malkus-Coskun, Frau Brigitte Rehmke und Herrn Jörg Krause für die professionelle technische Unterstützung in einer stets kollegialen und angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Ilonka und Klaus Noack und meiner Ehefrau Jessica Noack für die stete Motivation und Unterstützung in allen Lebenslagen.

## **Publikation**

*Spinal Cord Injuries Induce Changes in CB1 Cannabinoid-Receptor and C-C Chemokine Expression in Brain Areas Underlying Circuitry of Chronic Pain Conditions*, Friederike Knerlich-Lukoschus, Malte Noack, Beata von der Ropp-Brenner, Ralph Lucius, Hubertus Maximilian Mehdorn und Janka Held-Feindt. *Journal of Neurotrauma* **28** (2011); 619-634.