

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Klaus V. Toyka

**EVALUATION DER ANTIHYPERALGETISCHEN UND NEUROREGENERATIVEN  
WIRKUNG VON  
TOPIRAMAT NACH TIEREXPERIMENTELLER  
PERIPHERER NERVENLÄSION**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von

Stefan Bischofs  
aus Münster

Würzburg, Dezember 2005

Referentin: Professor Dr. med. Claudia Sommer  
Koreferent: Professor Dr. med. W. Roggendorf  
Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 27. Juni 2006

Der Promovend ist Arzt.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
1.1	OPERATIONSMODELLE ZUR INDUKTION EINER SCHMERZHAFTEN MONONEUROPATHIE SOWIE ZUM STUDIUM DER NEURODE- UND –REGENERATION.....	1
1.2	PATHOPHYSIOLOGISCHE GRUNDLAGEN DER NEURODEGENERATION (WALLER’SCH DEGENERATION).....	2
1.2.1	Zelluläre Veränderungen im distalen Nervensegment .....	3
1.2.2	Molekulare Veränderungen im distalen Nervensegment.....	3
1.3	REGENERATION PERIPHERER NERVEN.....	5
1.4	KLINISCHE SYMPTOME DER SCHMERZHAFTEN NEUROPATHIE.....	6
1.5	MEDIKAMENTÖSE THERAPIE NEUROPATHISCHER SCHMERZEN .....	6
1.6	TOPIRAMAT .....	7
1.7	ZIELSETZUNG DIESER STUDIE .....	9
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>10</b>
2.1	TIERE / TIERHALTUNG /ANÄSTHESIE .....	10
2.2	CCI-LÄSION .....	10
2.3	CRUSH-LÄSION.....	11
2.4	MEDIKATION .....	12
2.5	VERHALTENSTESTUNG .....	13
2.5.1	Testung der Hitzehyperalgesie.....	13
2.5.2	Testung der Allodynie .....	14
2.5.3	Testung der Mechano-Nozizeption .....	14
2.5.4	Testung der Kälte-Allodynie .....	14
2.5.5	Testung der motorischen Funktion.....	15
2.6	HISTOLOGIE UND MORPHOMETRIE.....	15
2.7	ELEKTROPHYSIOLOGIE .....	16
2.8	MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR ZYTOKINEXPRESSION .....	18
2.8.1	Gewebeasservierung .....	18
2.8.2	RNA-Aufreinigung .....	18
2.8.3	Reverse Transkription .....	19

2.8.4	Real-time-PCR (Polymerase-Kettenreaktion).....	20
2.9	STATISTISCHE ANALYSE .....	22
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>23</b>
3.1	EINFLUSS DER TOPIRAMAT-BEHANDLUNG AUF DAS KÖRPERGEWICHT .....	23
3.2	VERHALTENSTESTUNGEN .....	23
3.2.1	Einfluss der Topiramat-Behandlung auf die Entwicklung von Hitzehyperalgesie .....	23
3.2.2	Einfluss der Topiramat-Behandlung auf die Entwicklung mechanischer Allodynie (von-Frey Test) .....	25
3.2.3	Einfluss der Topiramat-Behandlung auf die Entwicklung mechanischer Hyperalgesie (Randall-Selitto Test) .....	26
3.2.4	Einfluss der Topiramat-Behandlung auf die Entwicklung von Kälteallodynie (Aceton-Test) .....	27
3.2.5	Einfluss der Topiramat-Behandlung auf das motorische Verhalten (Attal Score).....	29
3.3	HISTOLOGIE UND MORPHOMETRIE.....	30
3.3.1	Auswertung der Kaliberspektren des N. ischiadicus 3 mm distal der Läsion.....	30
3.3.2	Immunhistochemische Auswertung der epidermalen Innervation der Footpads .....	34
3.4	AUSWERTUNG DER ELEKTROPHYSIOLOGISCHEN VERLAUFSBEOBACHTUNG .....	36
3.4.1	Muskelsummenaktionspotenziale (MSAPs) .....	37
3.4.2	Nervenfaserleitgeschwindigkeiten (NLGs) .....	37
3.5	mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha mitsamt seiner Rezeptoren Typ 1 und 2 und IL-1 beta sowie eines antiinflammatorischen Zytokins (IL-10) 12 und 24 Stunden nach Crush- Läsion .....	38
3.5.1	TNF-alpha mRNA-Expression im N. ischiadicus sowie Spinalganglien L4/L5 nach Crush-Läsion.....	39
3.5.2	TNF-alpha Rezeptor 1 und 2 mRNA-Expression im N. ischiadicus sowie Spinalganglien nach Crush-Läsion .....	40
3.5.3	IL-10 mRNA-Expression im N. ischiadicus sowie Spinalganglien L4/L5 nach Crush-Läsion.....	42

3.5.4	IL-1 beta mRNA-Expression im N. ischiadicus sowie Spinalganglien L4/L5 nach Crush-Läsion.....	44
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>47</b>
4.1	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....	47
4.2	ZUR SCHMERZFORSCHUNG AM TIERMODELL .....	47
4.3	TOPIRAMAT ALS ANTIHYPERALGETISCHE SUBSTANZ? .....	49
4.4	TOPIRAMAT ALS NEUROPROTEKTIVE ODER PRO-REGENERATIVE SUBSTANZ?.....	51
4.5	ZUR GEWÄHLTEN DOSIERUNG VON TOPIRAMAT .....	52
4.6	ZUR ZYTOKINREGULATION DURCH TOPIRAMAT .....	53
4.7	NEUROPROTEKTION / NEUROREGENERATION IM PERIPHEREN NERVENSYSTEM ..	55
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>59</b>

## **1 EINLEITUNG**

Topiramate (Topamax®), ein im klinischen Bereich bereits seit mehreren Jahren angewandtes Medikament zur Behandlung epileptischer Anfälle, zeigt sich in aktuellen Studien auch als potenziell wirksam in der Behandlung neuropathischer Schmerzen, Migräne sowie bipolarer affektiver Störungen. In der Grundlagenforschung durchgeführte Studien zeigten darüber hinaus einen neuroprotektiven Effekt in Tiermodellen einer globalen cerebralen Ischämie (Lee et al. 2000) und in einem Modell einer Läsion des Nervus (N.) facialis (Smith-Swintosky et al. 2001). In einem Rattenmodell zur Entstehung neuropathischer Schmerzen erwies sich Topiramate als effektiv in der Blockade der Entwicklung von Allodynie (Shadiack et al. 1999).

All diese Ergebnisse zeigen zum einen eine Wirkung von Topiramate auf zentralnervöser Ebene, zum anderen aber auch eine Wirkung nach Läsionen des peripheren Nervensystems. Gegenstand dieser Studie ist die genauere Evaluation der Wirkung von Topiramate nach peripherer Nervenläsion und die damit einhergehende Wirkung auf (a) die Entwicklung neuropathischen Schmerzes und (b) das Ausmaß neuronaler De- und Regenerationsvorgänge.

### **1.1 Operationsmodelle zur Induktion einer schmerzhaften Mononeuropathie sowie zum Studium der Neurode- und –regeneration**

Zum Studium der schmerzhaften Mononeuropathie am Tiermodell sind im Verlauf der letzten Jahrzehnte zahlreiche Operationsmethoden entwickelt worden.

So wird zum Studium von Phantomschmerzen vornehmlich das Modell der Axotomie verwendet, bei dem der N. ischiadicus in toto durchtrennt wird (Wall et Gutnick 1974). Die regenerative Aussprossung im distalen Stumpf führt zur Bildung eines Neuroms (Ramon y Cajal S 1991) mit spontan aktiven Neuronen, die wiederum auf chemische, thermische und mechanische Reize reagieren (Devor 1994) und zu beobachtende Phänomene der Hyperalgesie und Allodynie erklärbar machen.

Andere Modelle wiederum repräsentieren klinisch wesentlich häufigere Situationen der inkompletten Nervenläsion posttraumatischer, infektiöser, toxischer sowie diabetogener Ätiologie.

Im Modell der chronisch konstriktiven Nervenläsion (chronic constrictive injury = CCI) nach Bennett und Xie (1988) werden proximal der Trifurkation des N. ischiadicus drei lockere Ligaturen um den Nerv angebracht. Die Kompression des Nerven vereint demnach eine ischämische Läsion mit einer direkt traumatischen kompressiven Läsion und führt zu partieller Degeneration des Nerven. Zu beobachtbare Veränderungen im Verhalten der Tiere lassen auf die Entwicklung einer Hyperalgesie und Allodynie nach CCI schließen, wie sie auch bei der schmerzhaften Neuropathie beim Menschen zu beobachten sind. Außerdem kommt es zu morphologischen Veränderungen im Nerven distal der Läsion im Sinne einer Waller-Degeneration (Clatworthy et al. 1995).

Zu ähnlichen morphologischen Veränderungen und Änderungen des Verhaltens kommt es nach Durchführung der 1986 von de Koning erstmals beschriebenen Crush-Läsion. Hierbei wird mithilfe einer Pinzette der N. ischiadicus für jeweils dreimal 10 Sekunden maximal komprimiert. Ein Vorteil dieses Läsionsmodells ist, dass im Gegensatz zur CCI-Läsion kein Fremdmaterial am oder um den Nerven verbleibt und es somit nicht zu pathologischen Entzündungsvorgängen durch Fremdkörperreaktionen kommt.

In der vorliegenden Studie entschieden wir uns für das CCI-Modell nach Bennett und Xie sowie für das Crush-Modell nach de Koning. In beiden Tiermodellen kommt es zu einem partiellen Untergang von Nervenfasern sowie im Sinne einer Hyperalgesie und Allodynie zu deutenden Verhaltensänderungen. In beiden Modellen kommt es nach Untergang zur Aussprossung von Neuronen aus dem proximalen Stumpf im Sinne einer Regeneration (siehe unten).

### **1.2 Pathophysiologische Grundlagen der Neurodegeneration (Waller'sche Degeneration)**

Die posttraumatisch nach einer peripheren Nervenläsion auftretenden pathophysiologischen Mechanismen sind experimentell gut untersucht worden.

### **1.2.1 Zelluläre Veränderungen im distalen Nervensegment**

Sowohl nach einer chronisch konstriktiven Läsion (CCI) als auch nach Crush-Läsion eines peripheren Nerven kommt es zu morphologischen Veränderungen im Sinne der bereits von Waller 1850 beschriebenen Waller'schen Degeneration (Waller 1850). Hauptort degenerativer Vorgänge ist hierbei das distale Nervenende. Durch Induktion axonaler Proteasen und Calciueinstrom (George et al. 1995) kommt es zu einem Untergang von Axoplasma und Axolemm. Untergegangene Myelinscheiden werden zunächst von Schwann-Zellen phagozytiert (Stoll et al. 1989), erst zwei Tage nach der Läsion invadieren hämatogene Makrophagen das distale Nervenende und phagozytieren das restliche Myelin (Brück 1997).

### **1.2.2 Molekulare Veränderungen im distalen Nervensegment**

Parallel zu zellulären Veränderungen kommt es zu erheblichen Veränderungen der molekularen Zusammensetzung im distalen Nervensegment (Gillen et al. 1997). Schwann-Zellen dedifferenzieren von myelinproduzierenden zu prä/nicht-myelinproduzierenden und werden durch Wachstumsfaktoren (glial growth factors (GGF)) zur Teilung angeregt (Carrol et al. 1997) ebenso werden Neurotrophine (Nerve growth factor (NGF), Insuline-like growth factor-I (IGF-I)) im degenerierenden Nervensegment hochreguliert (Heumann et al. 1987, Cheng et al. 1996). Die Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine wird stark verändert. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass insbesondere ein Subtyp der exzitatorisch wirkenden Glutamatrezeptoren, der N-Methyl-D-Aspartat (NMDA-) Rezeptor, in großem Maße an der Höhe der Expression pro-inflammatorischer Zytokine beteiligt ist (Kleinschnitz et al. 2004).

### **TNF-alpha**

Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF-alpha) als ein ubiquitär vorkommendes und pleiotropes Zytokin scheint hierbei eine besondere Rolle zu spielen. Erstmals wurde es aufgrund seiner antikanzerösen Eigenschaften beschrieben, seine Wirkung ist jedoch weitaus vielfältiger als zunächst vermutet, so fungiert TNF-alpha als wichtiger Mediator von Apoptosevorgängen, Entzündungs- sowie Immunreaktionen. Eine übersteigerte Produktion spielt beispielsweise eine große Rolle in der Pathogenese eines großen Spektrums humaner Erkrankungen: unter anderem Sepsis, Diabetes, Krebserkrankungen, Osteoporose sowie Autoimmunkrankheiten wie Multiple



Sklerose, Rheumatoide Arthritis (Chen et al. 2002). In den letzten Jahren jedoch wurde immer mehr die Rolle von TNF-alpha in der Pathogenese des neuropathischen Schmerzes deutlich. Nach kompressiver Läsion eines peripheren Nerven finden sich endo- wie epineural erhöhte TNF-alpha-Protein-Level (George et al. 2004), jedoch sind auch im Plasma erhöhte Konzentrationen an TNF-alpha nachweisbar (Wells et al. 1992). Die endoneurale Injektion von TNF-alpha führt im Tiermodell zu Verhaltensänderungen im Sinne neuropathischer Schmerzen (Wagner and Myers 1996). Durch TNF-alpha-neutralisierende Antikörper konnte nach CCI die Entwicklung sowohl von Hitzehyperalgesie wie auch mechanischer Allodynie gehemmt werden (Lindenlaub et al. 2000, Schäfers et al. 2001, Sommer et al. 2001). Neben der Rolle bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen konnte gezeigt werden, dass auch bei der Waller'schen Degeneration TNF-alpha eine wichtige Funktion übernimmt. Insbesondere ist TNF-alpha an der Makrophagenrekrutierung beteiligt, TNF-alpha-knockout Mäuse wiesen eine verspätete Makrophagenrekrutierung sowie einen damit einhergehenden verspäteten Myelinabbau auf (Liefner et al. 2000, Stoll et al. 1993).

Die Rolle von TNF-alpha ist demnach bereits intensiv untersucht worden. Während der ersten 24 Stunden nach der Läsion kommt es jedoch zudem zu einer Hochregulierung diverser anderer Zytokine, unter anderem von Interleukin (IL)-1 beta mRNA (Gillen et al. 1998), IL-6- sowie IL-10 mRNA (Bourde et al. 1996, Gillen et al. 1998). Die Wirkungen sind hierbei vielfältig und noch nicht ausreichend erklärt. Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 beta direkt die Synthese von nerve growth factor (NGF) in Schwann Zellen induziert (Lindholm et al. 1987). Das proinflammatorische Zytokin IL-6 ist ebenfalls an der Entstehung neuropathischer Schmerzen beteiligt und wird nach Nervenläsion hochreguliert (Bourde et al. 1996, Bolin et al. 1995). Durch die antiinflammatorische Behandlung mit IL-10 nach CCI wurde die Entwicklung thermaler Hyperalgesie, die Makrophageninvasion und endoneurale TNF-alpha Expression gehemmt (Wagner et al. 1998).

### 1.3 Regeneration peripherer Nerven

Die von dem proximalen Nervenstumpf ausgehende Aussprossung von Axonen ist durch eine noch intakte Basallamina, zum Beispiel im Falle der Crush-Läsion, erheblich erleichtert, aussprossende Axone erhalten hierdurch eine Leitstruktur, die nach einer Axotomie auftretende Neuombildung durch das unkontrollierte Aussprossen von Neuronen tritt seltener auf. Die von dem proximalen Nervensegment ausgehende Regeneration durch Aussprossung von Nervenfasern kann elektrophysiologisch gut objektiviert werden. Die Wachstumsgeschwindigkeit liegt nach einer Crush-Läsion, also bei noch vorhandener intakter Basallamina als Leitstruktur, bei 3-4 mm/die, nach Axotomie bei lediglich 2,5 mm/die (Fugleholm et al. 1994). Parallel hierzu werden zahlreiche Adhäsionsmoleküle (N-CAM (neural cell adhesion molecule), Ninjurin (nerve injury-induced protein)) hochreguliert (Araki et al. 1996, Martini et al. 1994). Neurotrophe Faktoren (GDNF (glial cell-line derived neurotrophic factor)) und deren Rezeptoren (GFR-alpha 1) werden ebenfalls hochreguliert (Naveilhan et al. 1997). Zytokine spielen für eine erfolgreiche Regeneration ebenfalls eine wichtige Rolle: TNF-alpha als proinflammatorisches Zytokin dient vor allem der Makrophagenrekrutierung und Myelinabräumung, wohingegen die Neuroregeneration in TNF-alpha knockout Mäusen nicht affiziert wurde (Liefner et al. 2000). Die neuronale Regeneration ist verzögert in IL-6 defizienten Mäusen (Zhong et al. 1999). Proinflammatorische Zytokine wie zum Beispiel IL-1 beta, stimulieren die Produktion von nerve growth factor (NGF) und kontribuieren somit zur erfolgreichen Regeneration (Griffin et al. 1993).

Oftmals ist eine erfolgreiche neuronale Regeneration jedoch durch das unkontrollierte Fehleinsprossen von Neuronen gekennzeichnet. Es kommt zu Fehlinnervationen, klinisch beispielsweise zu synergistischen Phänomenen, bei denen eine Muskelgruppe unwillkürlich durch das willkürliche Anspannen einer anderen Muskelgruppe aktiviert wird (Augenschluss beim Versuch, den Mundwinkel zu heben bei Fehleinsprossung im N. facialis Gebiet).

#### **1.4 Klinische Symptome der schmerzhaften Neuropathie**

Neben der atrophischen Veränderung der von sensomotorischen Nerven versorgten Muskulatur kommt es trotz der unterschiedlichen Ätiologie der Nervenläsion zur Entwicklung sensibler Störungen. Diese treten entweder spontan und reizunabhängig (paroxysmal versus anhaltend) oder evoziert und reizabhängig auf. Hierbei werden negative Veränderungen im Sinne einer Verminderung des Empfindens und positive Veränderungen im Sinne einer Verstärkung unterschieden (Koltzenburg 1998). Zu den positiven Veränderungen zählen vor allem die Entwicklung einer Hyperalgesie sowie Allodynie. Als erstere bezeichnet man eine verstärkte Reaktion auf einen taktilen mechanischen oder thermischen Schmerzreiz, als Allodynie das Auftreten abnormer Schmerzempfindung auf üblicherweise nicht schmerzhafte Reize. Neben diesen Kardinalsymptomen berichten Patienten zusätzlich noch von Dysästhesien (abnorme Sensation empfunden als eindeutige Missempfindung) und Hypästhesien (Gefühlsminderung). In den in unserer Studie verwendeten Tiermodellen der CCI- und Crush-Läsion entwickelten die Tiere ebenfalls Verhaltensveränderungen, die auf die Entwicklung einer schmerzhaften Neuropathie mit oben beschriebenen klinischen Symptomen schließen lassen und die in den Verhaltenstestungen untersucht wurden.

#### **1.5 Medikamentöse Therapie neuropathischer Schmerzen**

Die medikamentöse Therapie neuropathischer Schmerzen umfasst mehrere Präparategruppen, wobei grundsätzlich zentral wirkende Medikamente günstigere Effekte als solche mit peripherem Angriffspunkt haben (Wessely 2001). Infrage kommen Präparate aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika, Antidepressiva, Opiate sowie Antiepileptika. Antidepressiva insbesondere vom Amitryptilin-Typ gelten als erste therapeutische Wahl und zeichnen sich nicht nur durch eine antidepressive sondern auch eine direkte analgetische Wirkung aus (Onghena et al. 1992). Die Wirksamkeit konnte in zahlreichen Metaanalysen gezeigt werden (Max 1995, McQuay et al. 1996). Neben den Antidepressiva zählen Antiepileptika (Carbamazepin, aber auch neuere Antiepileptika wie Gabapentin, Lamotrigin und Pregabalin) als Mittel der ersten Wahl zur Behandlung neuropathischer Schmerzen und gehören zur Standardtherapie der

Gesichtsneuralgien aber auch anderer neuropathischer Schmerzen vorwiegend brennend-lanzinierenden einschießenden Charakters (Polyneuropathie, Postzosterneuralgie). Insofern ist die Untersuchung einer antihyperalgetischen Wirkung von Topiramat als neuerem Antiepileptikum in der Behandlung neuropathischer Schmerzen vielversprechend.

### 1.6 Topiramat

Topiramat (2,3:4,5-bis-O-(1-Methylethyliden)-beta-D-Fructopyranose Sulfamat) wurde erstmals 1986 aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit der O-Sulfamat-Gruppe zu den bekannt antiepileptisch wirksamen Carboanhydrasehemmern als ebenfalls antiepileptisch wirksame Substanz in Betracht gezogen (Gordocki et al. 1986). Nachfolgende Studien zeigten eine antikonvulsive Wirkung sowohl im Tiermodell als auch in randomisierten Plazebo-kontrollierten Studien bei humaner Epilepsie (Cha et al. 2002, Koh et al. 2001, Niebauer et al. 1999, Rigoulot et al. 2003, Biton et al. 1999). Verschiedene molekulare Wirkmechanismen wurden hierfür verantwortlich gemacht. So zeigte Topiramat eine Wirkung im Sinne einer

1. Verstärkung von Chloridströmen durch GABAerge ( $\gamma$ -amino-butyric-acid) Mechanismen am GABA-A Rezeptor-Subtyp (White et al. 2000, Shank et al. 1994, Kuzniecky R et al. 1998).
2. Beeinflussung spannungsabhängiger Natrium-Kanäle möglicherweise durch Stabilisierung der Kanäle im inaktiven Status (Rogawski et al. 1990, Wu et al. 1998, Zona C et al. 1997).
3. Konzentrationsabhängigen Blockade von AMPA/Kainat-Rezeptor induzierten Einflusstströmen (Skradski S et al. 2000, Gibbs et al. 2000, Poulsen et al. 2004).
4. Negativen Modulation von L-Typ Calcium Kanälen (Zhang et al. 2000) sowie
5. Inhibition insbesondere der Carbo-Anhydrase-Isoenzyme CA II und CA IV (Dodgson et al. 2000).

Diese Vielfalt zellulärer wie molekularer Wirkmechanismen einer antiepileptisch wirksamen Substanz konnte bisher nur für Topiramat eindeutig aufgezeigt werden, anschließende Studien untersuchten mögliche neuroprotektive Effekte zunächst in

Modellen der Epilepsie (Rigoulot et al. 2003). Es fand sich hier eine deutliche Reduktion neuronalen Schadens in allen hippocampalen Subregionen sowie den Laminae II-IV der ventralen Cortices nach experimentellem Status epilepticus der Ratte. Diese beschriebenen neuroprotektiven Eigenschaften zeigten sich auch nach Behandlung mit Topiramate im Anschluss an eine globale cerebrale Ischämie und waren hier dosisabhängig (Lee et al. 2000). In einem Rattenmodell nach globaler Ischämie war bereits eine Dosis von 20mg/kg intravenös suffizient, fast sämtliche histologische Zeichen hippocampalen ischämischen Zelltodes zu eliminieren (Edmonds et al. 2001). In einer aktuellen Studie erwies sich Topiramate erstmals auch als neuroregenerativ wirksame Substanz. Auf zellulärer Ebene erhöhte sich unter Topiramate-Behandlung die Zahl der aussprossenden Neurone sowohl in hippocampalen wie auch corticalen Zellkulturen, auf funktioneller Ebene zeigte sich nach Kompression des N. facialis eine deutlich schnellere Erholung motorischer Funktionen (Smith-Swintosky et al. 2001).

In klinischen Studien hingegen wurde, da einige Antiepileptika als Mittel der ersten Wahl in der Behandlung neuropathischer Schmerzen gelten, insbesondere die potenzielle Wirksamkeit von Topiramate als antihyperalgetische Substanz untersucht. Hierbei zeigte sich in einer Pilotstudie zur Behandlung der Trigeminus-Neuralgie eine statistisch signifikante Schmerzreduktion (Gilron et al. 2001), in Anbetracht der geringen Patientenzahl kann diese aber nicht als gesichert gelten. Bei diabetischer Polyneuropathie zeigte sich in einer Pilotstudie eine in vivo wie in vitro Reduktion des Nervenfaserverlustes (Vinik et al. 2003). Eine Pilotstudie zur Behandlung neuropathischer Schmerzen bei diabetischer Polyneuropathie zeigte in Einzelfällen erfolgversprechende Ergebnisse und signifikante Reduktion des Schmerzerlebens (Kline et al. 2003). Eine antihyperalgetische Wirkung von Topiramate kann jedoch nach einer aktuellen Metaanalyse noch nicht als gesichert angesehen werden (Carroll et al. 2004), auch konnte in 3 Plazebo-kontrollierten randomisierten klinischen Studien keine signifikante Reduktion des Schmerzerlebens bei schmerzhafter diabetischer Neuropathie aufgezeigt werden (Thienel et al. 2004).

## **1.7 Zielsetzung dieser Studie**

Wie oben beschrieben, konzentrierte sich die Forschung zunächst auf zelluläre wie molekulare Mechanismen der antikonvulsiven Wirkung von Topiramat. Zunehmend zeigten sich dann aber nach ischämischer Läsion des zentralen Nervensystems neuroprotektive Eigenschaften. Die Erforschung neuroprotektiver wie auch neuroregenerativer Eigenschaften erwies sich als zunehmend vielversprechender, insbesondere nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl auf zellulärer als auch funktioneller Ebene die Regeneration nach N.-facialis-Läsion durch Kompression statistisch signifikant erhöht war. In Anbetracht dessen, aber auch im Hinblick auf die stark differierenden Ergebnisse in klinischen Studien zur Behandlung neuropathischer Schmerzen, führten wir eine genauere Evaluation im Hinblick auf neuroregenerative sowie antihyperalgetische Eigenschaften von Topiramat insbesondere nach peripherer Nervenläsion durch. In einem weiteren Schritt sollte auf zellulärer Ebene untersucht werden, inwieweit es zu Änderungen der Expression von Zytokinen und deren Rezeptoren kommt, die bekanntermaßen und wie oben beschrieben sowohl zur Schmerzentwicklung aber auch zur De- und Regeneration nach peripherer Nervenläsion in erheblichem Maße kontribuieren.

## **2 MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Tiere / Tierhaltung /Anästhesie**

Für die Versuche wurden erwachsene, weibliche Sprague Dawley Ratten (Körpergewicht 190-220g, Charles River, Deutschland) verwendet.

Die Haltung der Tiere fand bei einer Umgebungstemperatur von 22 bis 24°C in Plexiglasboxen (5 Tiere je Box) unter Einhaltung eines 14:10 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus statt. Die Ratten erhielten Standard-Nagetierfutter sowie Wasser ad libitum.

Sämtliche chirurgische Interventionen und Gewebeentnahmen wurden unter tiefer Barbituratanästhesie (intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital, Narcuren<sup>®</sup>, Rhone-Merieux, Laupheim) durchgeführt.

Die Genehmigung der Tierversuche wurde mit Aktenzeichen 16/02 durch die Regierung von Unterfranken erteilt.

### **2.2 CCI-Läsion**

Für die erste Versuchsreihe wurden zehn Ratten einer unilateralen CCI-Läsion (chronisch konstriktive Läsion (injury)) unterzogen, zwei Ratten dienten als Kontrolltiere und wurden weder operiert noch behandelt.

Nach der 1988 von Bennett und Xie beschriebenen Methode wurde zunächst die Haut über dem Oberschenkel des Hinterlaufes rechts in einer Länge von circa 2,5cm inzidiert. Nach Darstellung des Musculus (M.) vastus lateralis sowie M. biceps femoris wurden selbige durch stumpfe Präparation getrennt bis zur Darstellung des N. ischiadicus. Im Anschluss an die Freipräparation des N. ischiadicus wurden ca. 5mm proximal der Trifurkation drei Ligaturen aus resorbierbarem 4.0 chromiertem Catgut in einem Abstand von jeweils 1mm um den Nerven platziert und bis zum Auslösen einer kurzen Zuckreaktion im Hinterlauf festgezogen (Abbildung 1). Durch Muskel-, Faszien- sowie Hautnaht mit schwarzer Seide 6.0 wurde die Wunde verschlossen (Bennett und Xie 1988).

Bis zur vollständigen Wiedererlangung des Bewusstseins fand die Aufbewahrung sämtlicher Ratten in einer bei 37°C temperierten Plexiglasbox statt.

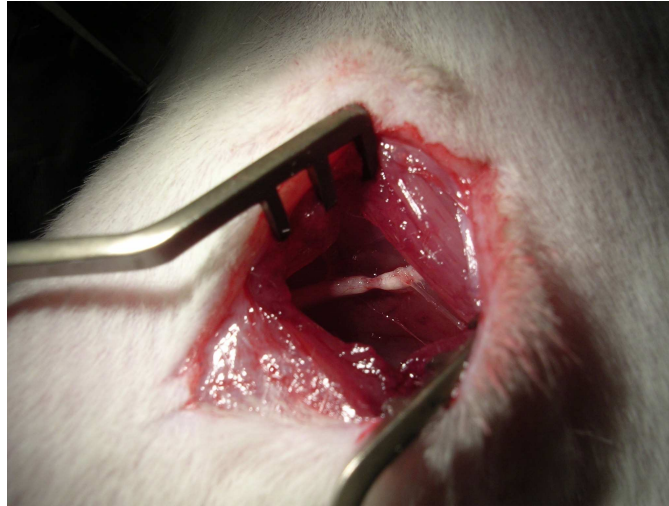


**Abb. 1** Operationssitus einer Ratte mit CCI-Läsion nach Anbringen der drei Ligaturen um den N. ischiadicus 5mm proximal der Aufteilung in N. peroneus communis sowie N. tibialis.

### 2.3 Crush-Läsion

In der zweiten, dritten elektrophysiologischen sowie vierten molekularbiologischen Versuchsreihe (siehe unten) erhielten jeweils 10 Ratten eine unilaterale rechtsseitige Crush-Läsion nach der von de Koning 1986 beschriebenen Methode (de Koning et al. 1986, siehe Abbildung 2). Der N. ischiadicus wurde hierzu nach obiger Beschreibung freipräpariert. Wiederum 5mm proximal der Trifurkation wurde der Nerv von seinem paranervalen Bindegewebe gelöst und sodann mit einer Pinzette der Größe Nr. 5 an drei unmittelbar aufeinanderfolgenden Zeitpunkten für jeweils 10 Sekunden (s) maximal komprimiert. Anschließend wurde die Wunde wiederum mit schwarzer Seide 6.0 durch oben beschriebene Nähte verschlossen, die Aufbewahrung der Tiere fand in analoger Weise statt.





**Abb. 2** Operationssitus einer Ratte mit Crush-Läsion nach Kompression des N. ischiadicus 5mm proximal der Aufteilung in N. peroneus communis und N. tibialis.

## 2.4 Medikation

Im Rahmen der medikamentösen Behandlung wurden aus oben genannten Gruppen jeweils fünf Ratten mit einer intraperitonealen Injektion von zweimal täglich 30 mg/kg Körpergewicht Topiramat (Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development, LLC) behandelt, fünf Ratten mit einer physiologischen 0,9%-igen NaCl-Lösung, zwei Ratten dienten als Kontrolle und wurden dementsprechend nicht behandelt.

Die Behandlung erfolgte zu den Zeitpunkten 8:00 und 20:00 Uhr und begann in der ersten bis dritten Versuchsreihe zum Zeitpunkt der Operation, bei der molekularbiologischen Untersuchung der Zytokinexpression entschieden wir uns für eine zweitägige präoperative Vorbehandlung der Tiere mit Topiramat in einer Dosierung von 50mg/kg Körpergewicht bzw. NaCl. Somit wurde ein ausreichender Wirkspiegel bereits zu den frühen Gewebsentnahmepunkten von 12 bzw. 24 Stunden sichergestellt (Shank et al. 2000).

Nach Durchführung der unten beschriebenen Verhaltenstestung fand die Gewebeentnahme der Versuchstiere der Gruppen 1 und 2 an Tag 28 (Verhaltenstestung und Histomorphologie), der Gruppe 3 nach 3 Monaten

(Elektrophysiologische Studie), der Gruppe 4 zum Zeitpunkt 12 bzw. 24 Stunden (Molekularbiologische Studie) post operationem statt.

## **2.5 Verhaltenstestung**

Sämtliche Testungen zur motorischen wie sensiblen Funktion des N. ischiadicus wurden durch einen bezüglich der medikamentösen Behandlung verblindeten Untersucher durchgeführt. Die Verhaltenstestung erfolgte stets zu gleichen Tageszeitpunkten durch den gleichen Untersucher, zur Herstellung optimaler Untersuchungsbedingungen wurde der Raum für weitere Personen gesperrt. Die verschiedenen sensorischen Modalitäten wurden an drei aufeinanderfolgenden Tagen präoperativ bestimmt und ein Mittelwert als Ausgangswert bestimmt. Neben der Bestimmung eines Null-Wertes erlaubte diese Vorgehensweise auch eine Gewöhnung der Tiere an die Testungen. Danach erfolgte die Testung in regulären Intervallen an den den Graphen zu entnehmenden Zeitpunkten.

### **2.5.1 Testung der Hitzehyperalgesie**

Rückzugslatenzen auf einen Hitzestimulus wurden durch die erstmals 1988 von Hargreaves et al. beschriebene Methode bestimmt (Hargreaves et al. 1988). Hierzu wurde der Plantartester von Ugo Basile (Comerio, Italien) verwandt. Die Versuchstiere wurden einzeln und in zufälliger Reihenfolge in eine Plastikbox auf eine 3mm starke Glasplatte gesetzt. Nach einer Gewöhnungszeit von mindestens 5 Minuten (min) wurde ein Infrarotstrahl exakt unter der zu testenden Hinterpfote platziert. Als Rückzugslatenz wurde die Zeit in Sekunden bestimmt, zu der die Ratte mit dem Zurückziehen der Hinterpfote aufgrund des Hitzereizes nach Anstellen der Infrarotquelle reagierte. Zur Vermeidung von Gewebeschädigungen wurde maximale Einwirkungszeit der Infrarotstrahlen mit 18s festgelegt. Die Rückzugslatenzen der zur Operation ipsilateralen wie kontralateralen Hinterpfote wurden in drei Testungen je Zeitpunkt auf 1/10-Sekunde bestimmt, danach wurde der Mittelwert berechnet. Ein adäquates Intervall von mindestens 15min zwischen den einzelnen Messungen wurde eingehalten. Eine Abnahme der Rückzugslatenz bedeutet demnach eine frühere Reaktion auf einen Hitzereiz und dementsprechend eine stärker ausgeprägte Hitzehyperalgesie.

### **2.5.2 Testung der Allodynie**

Zur Messung der Rückzuglatenz auf einen mechanischen Reiz verwandten wir das elektronische von-Frey Haar (Ugo Basile, Comerio, Italien). Zunächst wurden die Tiere hierfür auf ein Gitter aus Fliegendraht gesetzt. Die Spitze des von-Frey Haares wurde analog dem konventionellen von-Frey Haar auf die Haut der ipsi- bzw. kontralateralen Hinterpfote aufgesetzt. Anschließend wurde über 2s ein gleichmäßig zunehmender Druck mit dem von-Frey Haar auf die Haut ausgeübt. Unmittelbar nach Zurückziehen der Hinterpfote wurde der entsprechende Wert (in Gramm) des maximal ausgeübten Druckes angezeigt. Das Zeitintervall zwischen Messungen an derselben Pfote betrug hierbei mindestens 1 min, das zur kontralateralen Pfote mindestens 30s. Nach mindestens 5 Messungen je Pfote wurde der Mittelwert berechnet, zwei Kontrollratten dienten als Kontrollwerte.

### **2.5.3 Testung der Mechano-Nozizeption**

Nach der Randall-Selitto Methode (Randall et al. 1959) und unter Benutzung eines Analgesimeters (Ugo Basile, Comerio, Italien) wurde die Mechano-Nozizeption untersucht. Hierbei wurde mithilfe des Analgesimeters eine zunehmende Kraft auf die Hinterpfote ausgeübt und ebenfalls die Kraft (in Gramm) gemessen, bei der es zu einer Rückzugsreaktion der Hinterpfote der Ratte kam. Nach dreimaliger Messung wurde ein Mittelwert berechnet, NaCl-behandelte Tiere und unoperierte Tiere dienten als Kontrolle.

### **2.5.4 Testung der Kälte-Allodynie**

Die Rückzugszeitdauern auf einen Kältereiz zur Quantifizierung der Kälte-Allodynie wurden nach der von Choi et al. beschriebenen Methode bestimmt (Choi et al. 1994). Hierzu wurden die Tiere wiederum auf oben beschriebenes Gitternetz gesetzt. Zunächst wurde zum Ausschluß unspezifischer Reaktionen ipsi- wie kontralateral ein Tropfen 37°C warmen Wassers auf die Haut der Fußsohle aufgebracht. War diese Reaktion negativ, wurde ein Tropfen Aceton mithilfe einer Polyethylen-Pipette ohne unmittelbaren Kontakt der Pipette mit der Fußsohle auf selbige aufgebracht. Als positive Reaktion auf den durch Aceton ausgelösten Kältereiz wurde ein ruckartiger Rückzug der Hinterpfote mit Beibehalten einer Schonstellung länger als 1s gewertet. Die Zeit bis zum mindestens 2s andauernden Wiederaufsetzen der Pfote wurde

gemessen. Eine weniger als 1s andauernde Reaktion wurde als Kälte-unspezifisch und mit 0 bewertet, da diese auch beim Aufbringen eines Tropfen 37°C warmen Wassers beobachtet wurde. Aceton wurde mindestens drei Mal sowohl ipsi- als auch kontralateral zur operierten Seite appliziert, zwischen zwei Messungen wurde ein Zeitintervall von mindestens 5min festgesetzt. Abschließend wurden die Mittelwerte berechnet.

### **2.5.5 Testung der motorischen Funktion**

Zur Beurteilung und Quantifizierung der motorischen Funktion des Hinterlaufes beobachteten wir insbesondere das Spontanverhalten sowie die Positionierung der ipsilateralen, also operierten Pfote (Attal et al. 1990). Hierfür wurden die Versuchstiere zur ausreichenden Adaptation zunächst für mindestens 5min in die Beobachtungsbox gesetzt. Im Anschluss daran wurde jedes Tier einzeln für 15min (3x 300s) beobachtet. Die Zeitdauern, während der sich die ipsilaterale Hinterpfote in einer bestimmten Position befand, wurden entsprechend dem Protokoll nach Attal et al. notiert und der Motorische-Funktions-Score anschließend berechnet.

### **2.6 Histologie und Morphometrie**

Zur Gewinnung des zu untersuchenden Gewebes wurden die Tiere wiederum in eine tiefe Barbituratanästhesie (intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital, Narcuren<sup>®</sup>, Rhone-Merieux, Laupheim) versetzt.

Anschließend wurde analog zur oben beschriebenen Operationsmethode der N. ischiadicus freigelegt, entnommen und in 0,9%-iger NaCl-Lösung gewaschen. Nach Fixierung in 2,5-igem Glutaraldehyd sowie post-Fixierung in einer Lösung von 1% Osmium Tetroxid wurde das Nervengewebe in Plastik eingebettet. Die Färbung in 0,2%-igem Toluidinblau wurde nach Anfertigung 1µm starker Semidünnschnitte mit dem Leitz Kryostat 1720 durchgeführt. Zur morphometrischen Analyse wurden pro Nerv drei repräsentative und zufällig ausgewählte Bildausschnitte mithilfe eines Zeiss Axiophot 2 Mikroskops in einer 1750fachen Vergrößerung aufgenommen. Durch Verbindung des Mikroskops mit einer Sony CCD Kamera und deren Anschluss an einen PC fand die Auswertung anschließend mit der Image Pro Plus 4.0 Software

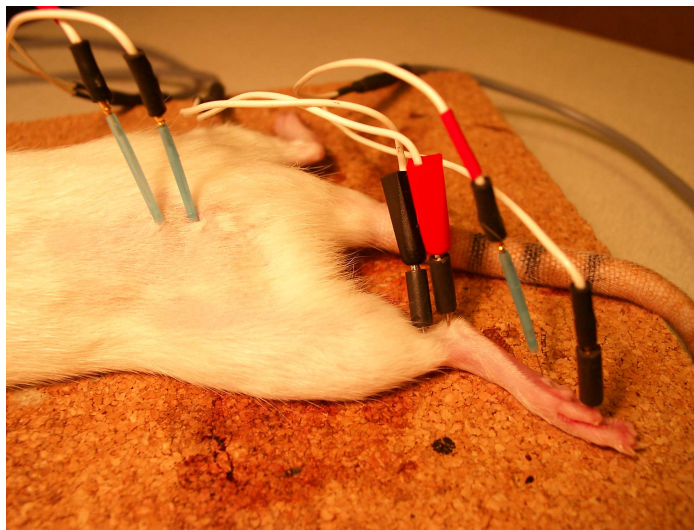
(Media Cybernetics, Leiden, Niederlande) statt. Hierbei wurden zunächst von jedem Nervenanschnitt drei Bilder aufgenommen. Nach Festlegung eines Schwellenwertes der Farbintensität wurde die Fläche jeder einzelnen intakten Myelinscheide automatisch bestimmt und manuell nachkorrigiert. Der Schwellenwert wurde für jeden Nervenschnitt individuell aufgrund der gefärbten Bestandteile festgesetzt. So wurde sichergestellt, dass nur die tatsächlich immunreaktive Fläche und nicht eventuelle Hintergrundfärbung registriert wurde. Anschließend wurden die drei repräsentativen Bildausschnitte je Nerv verrechnet und ein Kaliberspektrum je Nerv erstellt, anhand dessen die Größenverteilung intakter Myelinscheiden ersichtlich ist.

Zur Quantifizierung der epidermalen Innervation wurden unter einem Sektionsmikroskop drei Proben aus der Plantarhaut (Footpad) im Innervationssegment L4/L5 entnommen, sogleich in 4%-igem phosphatgepuffertem Paraformaldehyd (pH 7.4) für 3 Stunden fixiert und in 10%-iger Sucroselösung über Nacht eingebettet. Nach Umbettung in Tissue Tek<sup>®</sup> wurde das Gewebe in Flüssigstickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-20^{\circ}\text{C}$  verwahrt. 10  $\mu\text{m}$  starke Schnitte wurden mithilfe des Leitz Kryostat 1720 angefertigt. Durch Immunfluoreszenzfärbung mit dem pan-neuronalen Marker PGP 9.5 (Ultraclone, UK, 1:800) konnten sodann die epidermalen Nervenfasern wiederum unter Benutzung des Zeiss Axiophot 2 Mikroskopes visualisiert werden. Zur Quantifizierung der epidermalen Nervenfaserdichte wurden bei einer 40fachen Vergrößerung sämtliche die Epidermis erreichende Nervenfasern gezählt und in Verhältnis zur Länge der ausgewerteten Epidermis gesetzt (Image Pro Plus 4.0 Software). 3 repräsentative und zufällig ausgewählte Bildausschnitte je Footpad wurden ausgewertet, anschließend ein Mittelwert berechnet.

## 2.7 Elektrophysiologie

In regulären den Graphiken zu entnehmenden Intervallen wurden unter einer neuroleptisch-analgetischen Kombinationsanästhesie (Hypnorm, Janssen, Deutschland) Studien zur Beurteilung der elektrophysiologischen Parameter im Verlauf der Neurode- und -regeneration durchgeführt (Zielasek et al. 1996). Die Hauttemperatur wurde unter einer Wärmelampe bei  $33.5\text{-}34.5^{\circ}\text{C}$  konstant gehalten.

Für die Messungen wurde der Medelec 92a Elektromyograph (Medelec, Surrey, UK) verwendet. Nach Fixierung des Versuchstieres auf einer Korkplatte wurden Stahlnadelelektroden (DISA13L60 und 64, Kopenhagen, Dänemark) subkutan platziert. Hierbei wurde die Elektrode für die proximale Stimulation (Anode und Kathode) auf Höhe des Austrittspunktes des N. ischiadicus aus den Foramina intervertebralia platziert, zur distalen Stimulation gerade über dem lateralen Malleolus. Die Ableitelektroden (Picker, München, Deutschland) wurden an der Basis der Großzehe und im Zehenzwischenraum Digni II und III angebracht.



**Abb. 3** Platzierung der Elektroden für proximale und distale Stimulation sowie der Ableitelektroden.

Zur Beurteilung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit wurden zunächst das Schwellenpotenzial sowie die Stimulationsintensität bestimmt, bei der das Muskelsommenaktionspotenzial (MSAP) die größte Amplitude aufwies. Zur Beurteilung wurden die Latenz und Amplitude der MSAPs sowie Persistenz, Latenz und Dauer der F-Welle registriert. Zur Berechnung der Nervenleitgeschwindigkeit wurde die Distanz zwischen stimulierender und ableitender Elektrode in mm gemessen und in Bezug zur durchlaufenen Zeit gesetzt (Differenz zwischen proximaler und distaler Latenz) Sämtliche Potenziale wurden unverzüglich auf Papier gedruckt und anschließend durch einen verblindeten Untersucher ausgewertet.

## **2.8 Molekularbiologische Untersuchungen zur Zytokinexpression**

Die Zytokinexpression wurde durch Messung der im Gewebe (N. ischiadicus sowie Spinalganglien) exprimierten mRNA quantifiziert. Hierbei wurde die quantitative Real-time PCR verwendet. Mit dieser Methode ist der Fortschritt der PCR „real time“ zu beobachten. Es wird also nicht die akkumulierte Menge an PCR-Produkt am Ende der Amplifikation berechnet, sondern die Zyklusanzahl (Ct-Wert) bestimmt, nachdem erstmals ein Signal detektierbar ist. Je größer die Menge an mRNA respektive cDNA zu Beginn der Amplifikationszyklen ist, desto eher ist ein Signal zu messen und desto kleiner der Ct-Wert. Bei der verwendeten komparativen Ct-Methode ist besonders von Vorteil, dass keine Standardkurve erstellt werden muss und ein direkter Vergleich in vitro von Ziel-mRNA zur endogenen Kontrolle möglich ist. Ausserdem kann mehr Gewebe zur Zytokinbestimmung eingesetzt werden, da keine cDNA mehr zur Erstellung von Standardkurven benötigt wird.

### **2.8.1 Gewebeasservierung**

Nach einer Überlebenszeit von 12 bzw. 24h post operationem wurden analog zu den oben bereits beschriebenen Bedingungen bei der vierten Versuchsgruppe die Gewebeproben entnommen. Der distal der Läsion entnommene N. ischiadicus sowie Spinalganglien der Segmente L4 und L5 wurden von ihrem umgebenen Bindegewebe freipräpariert, gewogen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zur weiteren Verarbeitung fand die Aufbewahrung in sterilen Eppendorf Caps (2ml, Eppendorf GmbH, Eppendorf, Germany) bei  $-80^{\circ}\text{C}$  statt.

### **2.8.2 RNA-Aufreinigung**

Die RNA-Aufreinigung erfolgte unter Einhaltung der üblichen Sauberkeitsregeln statt (Verwendung autoklavierter Spitzen, Gebrauch von Einmalhandschuhen, Arbeit unter Luftabzug).

In einem ersten Schritt wurde das aufzureinigende Gewebe langsam auf Eis aufgetaut. Gemäß der Anleitung der Firma Life Technologies™ wurde das Gewebe (N. ischiadicus distal, Spinalganglien L4/ L5) in bereits mit 600µl TRIZOL®-Reagenz (Life Technologies™, USA) gefüllte 2ml Eppendorf-Caps überführt. Mittels eines Dispergierstabes (Micra D8, Micra, UK, 23500rpm (rounds per minute) wurde jede

Gewebeprobe einzeln für 30 s homogenisiert, zwischen zwei Gewebeproben wurde der Dispergierstab zunächst mit SDS 1%, dann mit DEPC-Wasser (1l demineralisiertes Wasser + 1ml DePC (Diethyl Pyrocarbonat)) behandelt. Nach einer Inkubationszeit des Homogenates für 5min bei Raumtemperatur wurden jeweils 300µl Chloroform zu der Probe hinzugefügt. Nach Durchmischen (Vortex) der Probe wurde diese zunächst für zehn weitere Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend für 15min bei 13000rpm und 4°C zentrifugiert. Die RNA-haltige obere Phase der Probe wurde in ein 1,5ml Eppendorf-Cap überführt. Durch Zugabe von 300µl Isopropylalkohol sowie 1,1µl Glykogen, Durchmischung, 10min Inkubation bei Raumtemperatur sowie abschließendem Zentrifugieren über 15min bei 13000rpm und 4°C wurde die RNA gefällt und abpipettiert. Durch Zugabe von 1ml Ethanol 75%, Durchmischen sowie erneutem Zentrifugieren der Probe bei 13000rpm und 4°C über 10min wurde eine weitere Ausfällung und Konzentrierung der RNA erreicht. Abschließend wurde wiederum der Überstand abpipettiert und die Probe bei 42°C für 15 min auf einem Heizblock getrocknet. Die nun aufgereinigte RNA wurde durch Zugabe von 30 µl DEPC-Wasser, gründlicher Durchmischung und 10min Inkubation bei 55°C auf dem Heizblock gelöst. Die RNA-Proben wurden bei -80°C gelagert.

Zur weiteren Verarbeitung (Reverse Transkription) wurde zur Bestimmung der optischen Dichte der RNA-Probe selbige auf Eis aufgetaut, anschließend 3µl der Probe zu bereits in 1,5ml Eppendorf-Caps vorgegebene 87µl DEPC-Wasser gegeben. Nach Durchmischung fand am Eppendorf Photometer (Eppendorf GmbH, Eppendorf, Germany) die automatische Bestimmung der optischen Dichte der Probe statt. Die Konzentration der RNA-Probe wurde in ng (RNA)/µl (Probe) angegeben und diente der Berechnung der einzusetzenden Menge an Probe für die folgende Reverse Transkription.

### **2.8.3 Reverse Transkription**

Für die Reverse Transkription der RNA in cDNA wurden je Probe die gleiche Menge an RNA, 500ng, eingesetzt. Das Probevolumen wurde in ein 0,2ml Eppendorf-CAP überführt und auf Eis gelagert. Anschließend wurde bis zum Erreichen eines Gesamtvolumens von 34,75µl DEPC-Wasser hinzugefügt. Zu der durchmischten Probe wurde abschließend 65,25µl Premix (siehe Tabelle 1) pipettiert, das Gesamtvolumen betrug 100 µl.



**Premix (Tabelle 1**, sämtliche Komponenten der Firma Applied Biosystems, Applera Int. Inc., Woolston, Warrington, UK)

Komponente	Volumen
10xRT Buffer	10,0µl
25mM MgCl <sub>2</sub>	22,0µl
DesoxyNTPs Mixture	20,0µl
Random Hexamers	5,0µl
RNase Inhibitor	2,0µl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50U/µl)	6,25µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>65,25µl</b>

Die Reverse Transkription wurde in einem Thermocycler (Applera Int. Inc., Woolston, Warrington, UK) unter folgenden Bedingungen ausgeführt (Tabelle 2):

**Reverse Transkription (Tabelle 2)**

	Primer-Bindung	Reverse Transkription	RT-Inaktivierung
<b>Zeit</b>	10min	60min	5min
<b>Temperatur</b>	25°C	37°C	95°C

Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

**2.8.4 Real-time-PCR (Polymerase-Kettenreaktion)**

Die abschließend durchgeführte Real-time-PCR zur Quantifizierung der Zytokinexpression von TNF-alpha, IL-1 beta, bzw. IL-10 wurde ebenfalls unter oben angegebenen hygienischen Bedingungen und nach Anleitung des Herstellers (Applied Biosystems, Applera Int. Inc., Woolston, Warrington, UK) durchgeführt. Sämtliche Komponenten wurden bei diesem Hersteller bezogen.

Als endogene Kontrolle diente 18s-RNA. Zunächst wurde der Premix (siehe Tabelle 3) jeweils für die spezifischen (TNF-alpha-)Proben sowie für die 18s-RNA Kontrollen vorbereitet. 45µl des TNF-alpha-Premix wurden in die erste Hälfte (48 Wells) der 96-Well-Platte (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) vorgegeben, in die restlichen 48 Wells jeweils 45 µl des 18s-RNA-Premix. Nach Auftauen der cDNA-

Proben auf Eis wurden diese in Triplets (3 Wells je cDNA-Probe) hinzupipettiert. Hierbei wurde für die spezifischen TNF-alpha-Proben ein Volumen von 5 µl, für die 18-sRNA-Proben ein Volumen von 2,5 µl verwendet. Als Nullkontrollen dienten sowohl für die TNF-alpha- als auch die 18-sRNA-Proben ein Triplett DePC-Wasser.

**Premix (µl je Probe, Tabelle 3, sämtliche Komponenten der Firma Applied Biosystems, Applera Int. Inc., Woolston, Warrington, UK)**

	TNF-alpha-Premix	18s-RNA-Premix
RNase free water	17,5µl	20µl
Master Mix UMM	25µl	25µl
Primer	2,5µl	2,5µl
Probevolumen	5µl	2,5µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>50µl</b>	<b>50µl</b>

Die Wellplatte wurde mit Caps verschlossen und in den auf 94°C vorgeheizten Real-Time-PCR-Cycler (7700 Sequence Detector Thermocycler, Perkin Elmer, ABI Prism TM) gesetzt. Unter folgenden Bedingungen wurde die Real-Time-PCR durchgeführt. Die Cycler-Bedingungen lauteten wie folgt (siehe Tabelle 4).

**Cycler-Einstellung (Tabelle 4)**

	Inkubation	Denaturierung	Amplifikation	
			40 Zyklen	
Zeit	2min	10min	0:15 min	1:00 min
Temperatur	50°C	95°C	95°C	60°C

Zur relativen Quantifizierung der mRNA im Ausgangsgewebe wurde die komparative Ct-Methode verwendet (Winer et al. 1999). Der Ct-Wert einer Probe ist hierbei die Anzahl an Amplifikationszyklen, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Dieser Schwellenwert liegt in der exponentiellen Phase der Amplifikation. Der Ct-Wert der Ziel-mRNA (TNF-alpha, IL-1 beta, IL-10) wird hierbei in Relation gesetzt zum Ct-Wert der endogenen Kontrolle (18s RNA) und in  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  angegeben. Dieser Wert wird dann in Relation gesetzt zum

Ct-Wert eines Kalibrators (Ct-Wert von Geweben unoperierter und unbehandelter Kontrolltiere). ( $\Delta\Delta Ct = [(Ct_{\text{Ziel}}(\text{unbekannte Probe}) - Ct_{\text{endogene Kontrolle}}(\text{unbekannte Probe})] - [(Ct_{\text{Ziel}}(\text{Kalibrator}) - Ct_{\text{endogene Kontrolle}}(\text{Kalibrator}))]$ ).

### 2.9 Statistische Analyse

Die Daten zur statistischen Analyse der Verhaltenstestungen wurden zunächst zur Feststellung von Gruppenunterschieden (Topiramat- vs. NaCl-behandelte Tiere) durch einen two-way ANOVA (analysis of variance) analysiert. Durch einen post-hoc Test wurden die Daten der einzelnen Testtage analysiert. Zur Analyse der morphometrischen wie auch molekularbiologischen Ergebnisse wurde ebenfalls der two-way ANOVA verwendet. Die Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit 5% festgelegt, Werte  $p < 0,05$  wurden demnach als statistisch signifikant betrachtet und sind graphisch durch ein \*-Symbol gekennzeichnet.

### **3 ERGEBNISSE**

#### **3.1 Einfluss der Topiramat-Behandlung auf das Körpergewicht**

Sämtliche Ratten zeigten nach CCI-Operation einen Gewichtsverlust von 10% ihres Ausgangs-Körpergewichtes. Bis zum Ende der Beobachtung an Tag 28 erreichten NaCl-behandelte Tiere ihr ursprüngliches präoperatives Körpergewicht, wohingegen Topiramat-behandelte Tiere bis zum Ende der Studie ihr ursprüngliches Körpergewicht nicht wiedererlangten. Im Zeitverlauf erreichten Crush-behandelte Tiere ihr präoperatives Körpergewicht schneller als CCI-behandelte Tiere, Topiramat-behandelte jedoch wiederum später als NaCl-behandelte Ratten.

#### **3.2 Verhaltenstestungen**

Für die Verhaltenstestungen wurden in einer ersten Versuchsgruppe zehn Ratten mit CCI behandelt und über einen Zeitraum von 28 Tagen beobachtet. Fünf Tiere erhielten zweimal täglich 30mg/kg Körpergewicht Topiramat intraperitoneal, fünf weitere eine intraperitoneale Injektion von 5ml NaCl. Zwei weitere Kontrolltiere wurden weder operiert noch behandelt.

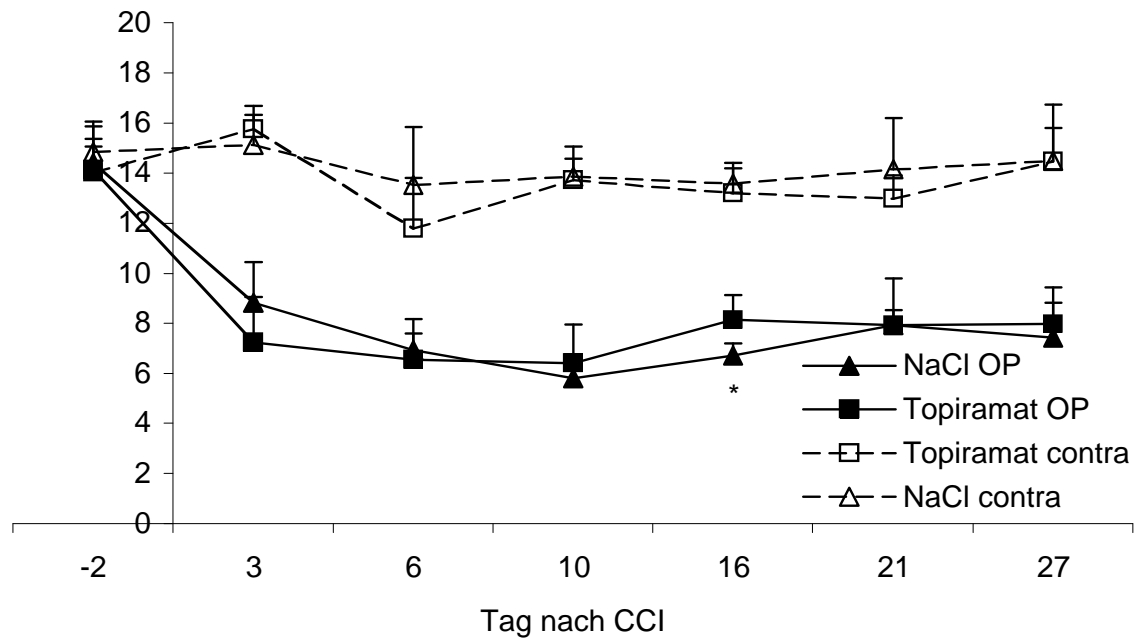
In einer zweiten Versuchsgruppe wurden zehn Ratten mit einer Crush-Läsion des N. ischiadicus behandelt und ebenfalls über 28 Tage beobachtet. Fünf Ratten erhielten wiederum die oben angegebene Dosis Topiramat, fünf weitere NaCl zweimal täglich. Ebenso dienten zwei Ratten als Kontrolltiere.

##### **3.2.1 Einfluss der Topiramat-Behandlung auf die Entwicklung von Hitzehyperalgesie**

Sämtliche Versuchstiere zeigten sowohl nach CCI als auch nach Crush eine deutliche Abnahme der Wegzuglatenz auf einen Hitzereiz bereits am Tag 3 postoperativ (Abbildung 4).

Ein eindeutiger signifikanter Effekt der Topiramat-Behandlung zeigte sich in der mit CCI behandelten Gruppe lediglich an Tag 16, hier war die Wegzuglatenz der Topiramat-behandelten Tiere geringer reduziert als die der NaCl-behandelten Ratten.

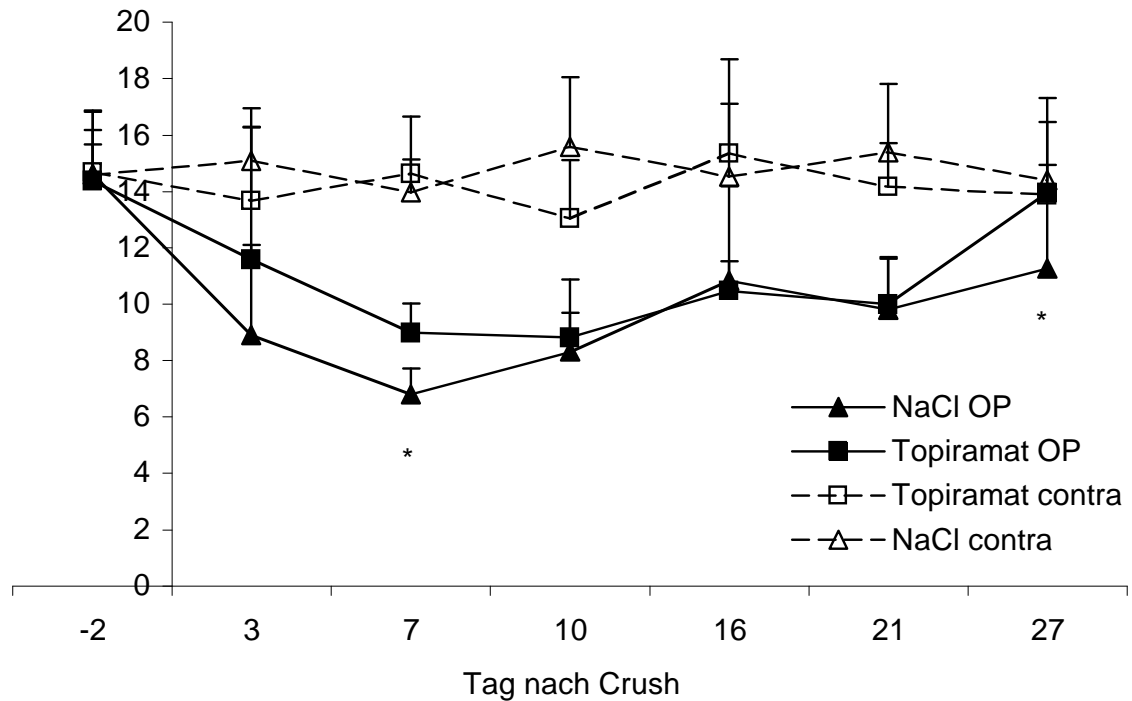
Die Hitzehyperalgesie war demnach an Tag 16 geringer ausgeprägt, jedoch noch bis zum Tag 28 in beiden Gruppen zu beobachten.



**Abb. 4** Hitzehyperalgesie nach CCI. An Tag 16 statistisch signifikant geringer ausgeprägte Hitzehyperalgesie unter Topiramamatbehandlung (\*= $p < 0,05$ ).

Bei den mit Crush behandelten Versuchstieren zeigte sich eine geringere Reduktion der Wegzugslatenz bei Topiramamat-behandelten Tieren an Tag 7 und 27 postoperativ. Zu Ende der Beobachtung zeigten Topiramamat-behandelte Tiere im Gegensatz zu den NaCl-behandelten Tieren keine Hitzehyperalgesie mehr.

Die nicht operierten und nicht behandelten Kontrolltiere zeigten keine Änderung der Wegzugslatenzen über den Beobachtungszeitraum (Abbildung 5).



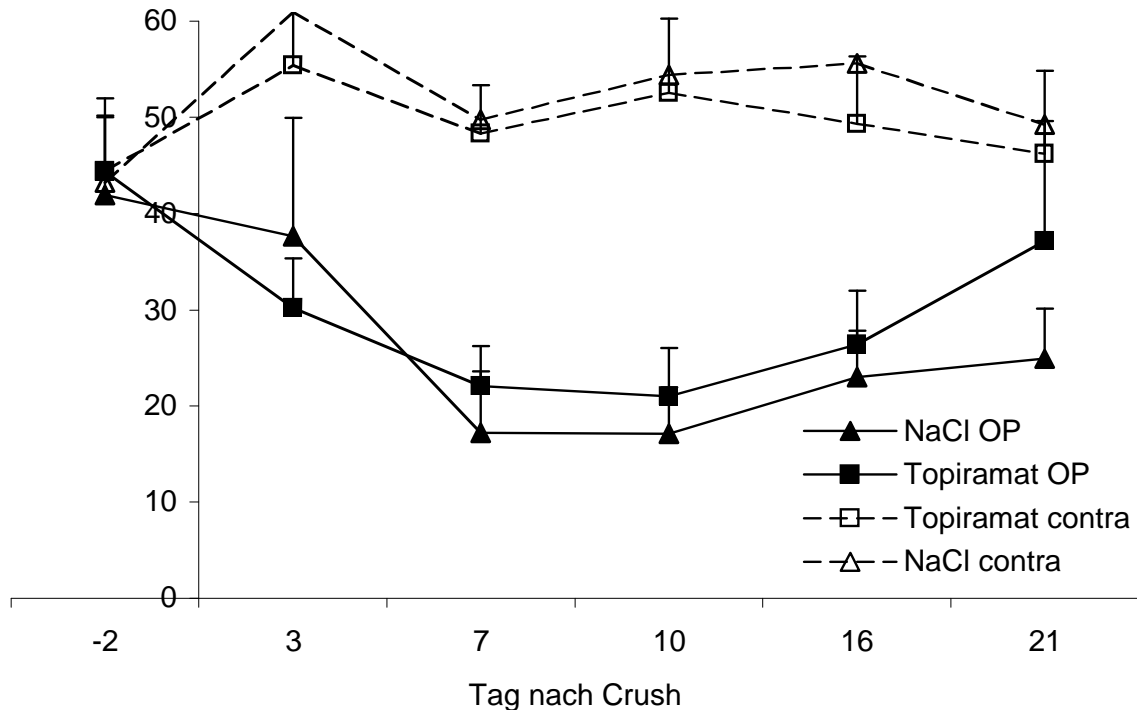
**Abb. 5** Hitzehyperalgesie nach Crush. An Tag 7 und 27 geringer ausgeprägte Hitzehyperalgesie bei Topiramatbehandlung (\*= $p < 0,05$ ).

### 3.2.2 Einfluss der Topiramat-Behandlung auf die Entwicklung mechanischer Allodynie (von-Frey Test)

Die Versuchstiere entwickelten sowohl nach CCI als auch nach Crush-Läsion eine ausgeprägte mechanische Allodynie in Form einer reduzierten Wegzugslatenz auf von-Frey Haar Stimulation.

Nach CCI zeigte sich zwischen den Topiramat- und NaCl-behandelten Tieren keine Differenz der Wegzugslatenzen im Beobachtungszeitraum bis zum Tag 28 postoperativ (keine Abbildung).

Auch nach Crush-Läsion zeigten die Versuchstiere lediglich eine Tendenz (nicht signifikant) zu erhöhten Wegzugslatenzen unter Topiramatbehandlung (Abbildung 6).

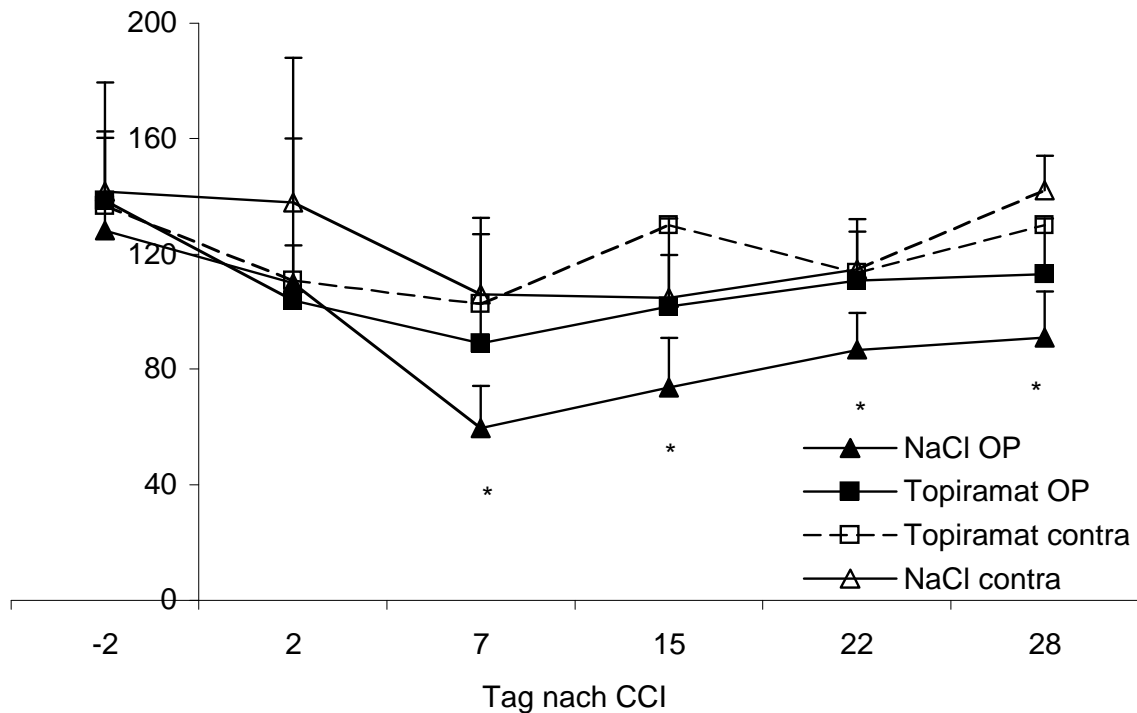


**Abb. 6** Mechanische Allodynie nach Crush. Zu beobachten ist lediglich eine Tendenz zu geringer ausgeprägter mechanischer Allodynie unter Topiramatebehandlung (nicht signifikant).

Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes wiesen beide Gruppen sowohl nach CCI als auch nach Crush-Läsion noch eine ausgeprägte mechanische Allodynie auf, nicht operierte und nicht behandelte Kontrolltiere zeigten keine Änderung der Wegzuglatenzen.

### 3.2.3 Einfluss der Topiramate-Behandlung auf die Entwicklung mechanischer Hyperalgesie (Randall-Selitto Test)

Eine mechanische Hyperalgesie entwickelte sich nach CCI lediglich bei den mit NaCl behandelten Tieren, Topiramate-behandelte Ratten zeigten keine Reduktion der Wegzuglatenzen und differierten nicht von denen der nicht operierten und unbehandelten Kontrolltiere. Topiramate-behandelte Tiere entwickelten demnach keine mechanische Hyperalgesie nach CCI (Abbildung 7).



**Abb. 7** Mechanische Hyperalgesie nach CCI. Unter Topiramatbehandlung keine Entwicklung einer Hyperalgesie (\*= $p < 0,05$ ).

Nach Crush-Läsion des N. ischiadicus zeigten Topiramat-behandelte Tiere eine Tendenz zu höheren Wegzugslatenzen an Tag 15 postoperativ (nicht signifikant). Reduzierte Wegzugslatenzen zeigten sich in allen Versuchstieren nach Crush (keine Abbildung).

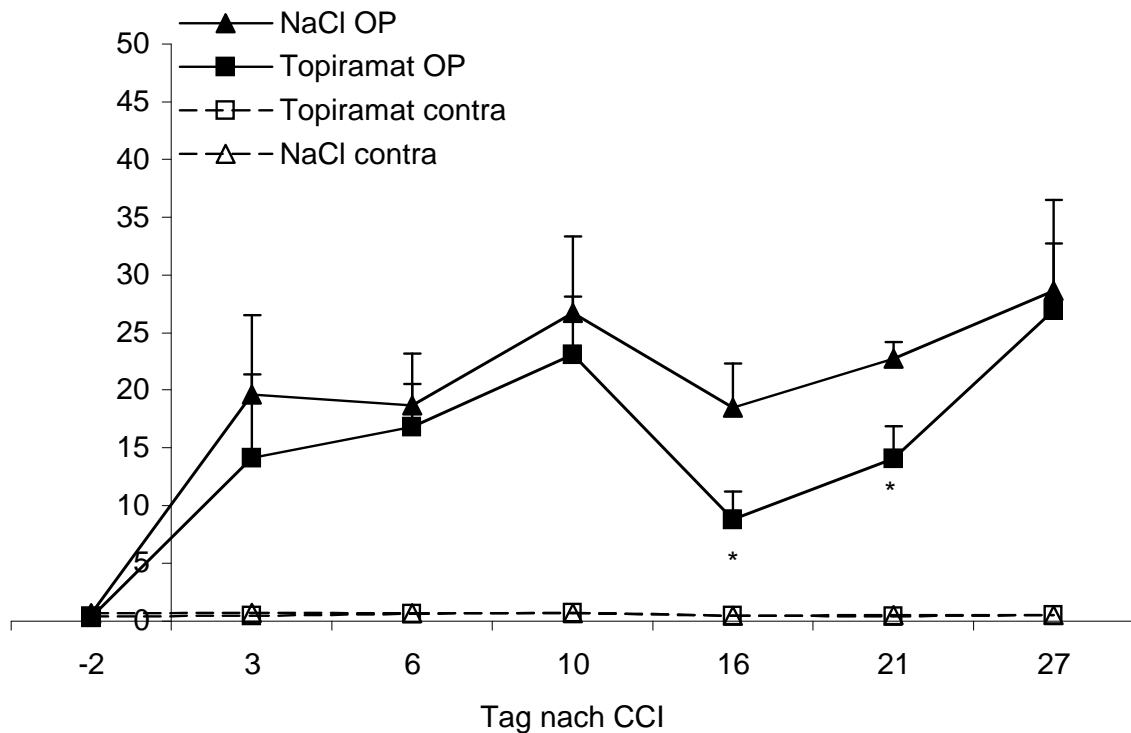
### 3.2.4 Einfluss der Topiramat-Behandlung auf die Entwicklung von Kälteallodynie (Aceton-Test)

Sämtliche Ratten zeigten nach CCI bzw. Crush-Läsion erhöhte Wegzugszeiten auf einen Kältereiz, entwickelten demnach allesamt eine Kälteallodynie. Unoperierte und unbehandelte Kontrolltiere zeigten keine Änderung ihres Verhaltens.

Nach CCI zeigten Topiramat-behandelte Versuchstiere an Tag 16 und 21 postoperativ geringere Wegzugszeiten als NaCl-behandelte Tiere, jedoch zeigte sich

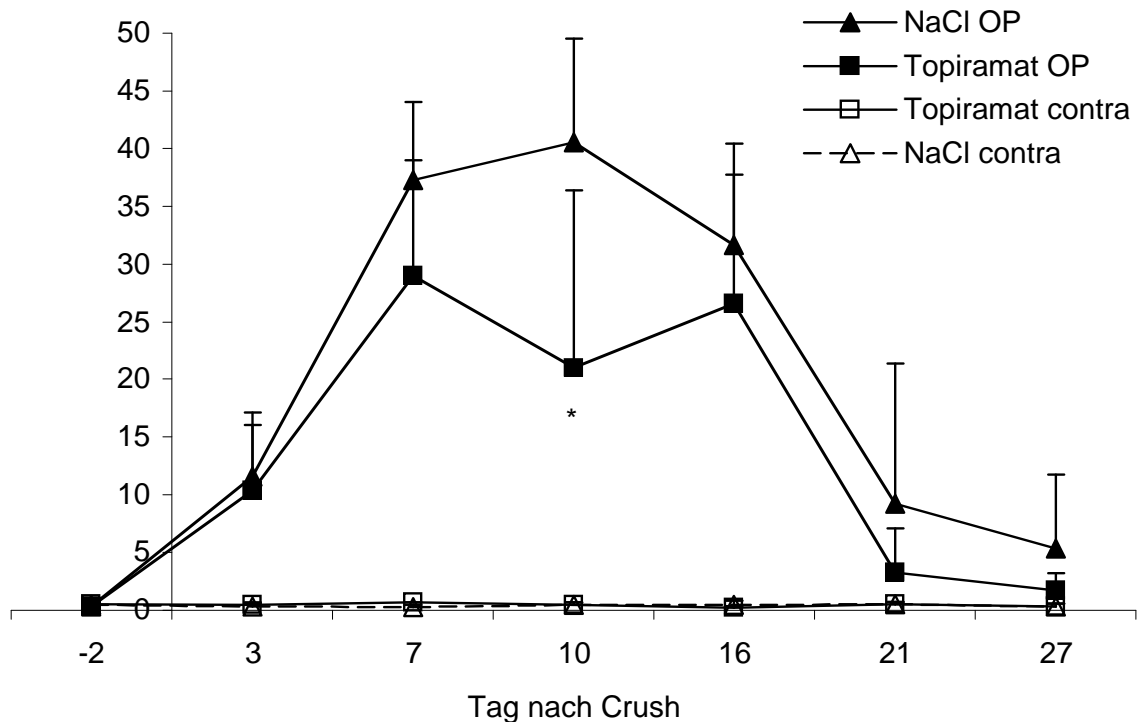


zu Beginn und Ende des Beobachtungszeitraumes kein signifikanter Unterschied zwischen Topiramat- und NaCl-behandelten Ratten, ebenso war die Kälteallodynie in beiden Gruppen bis zum Ende der Studie präsent (Abb. 8).



**Abb. 8** Kälteallodynie nach CCI. Geringer ausgeprägte Kälteallodynie unter Topiramatbehandlung an Tag 16 und 21 (\*= $p < 0,05$ ).

Analog hierzu zeigten sich nach Crush-Läsion geringere Wegzugszeiten bei Topiramat-behandelten Tieren zur Mitte des Behandlungszeitraumes an Tag 10, jedoch wiederum nicht zu Beginn und Ende der Studie (Abb. 9).



**Abb. 9** Kälteallodynie nach Crush. Geringer ausgeprägte Kälteallodynie unter Topiramatbehandlung an Tag 10 (\*= $p < 0,05$ ).

### 3.2.5 Einfluss der Topiramat-Behandlung auf das motorische Verhalten (Attal Score)

Nach CCI und Crush-Läsion zeigten alle Versuchstiere eine ausgeprägte Änderung ihres Spontanverhaltens. Die zur Operation ipsilaterale Hinterpfote wurde in eine Schonhaltung gebracht, zu Beginn des Beobachtungszeitraumes kaum aufgesetzt, und häufig beleckt.

Nach CCI und Crush-Läsion zeigte sich ein deutlich erhöhter Motor-Index, eine pathologische Positionierung der Hinterpfote anzeigend, sowohl in Topiramat- als auch NaCl-behandelten Versuchstieren. Zwischen Topiramat- und NaCl-behandelten Tieren zeigte sich hierbei keine Differenz, die Motor-Indices waren bis zum Ende der Beobachtung an Tag 28 pathologisch bei sämtlichen Versuchstieren (keine Abbildung).

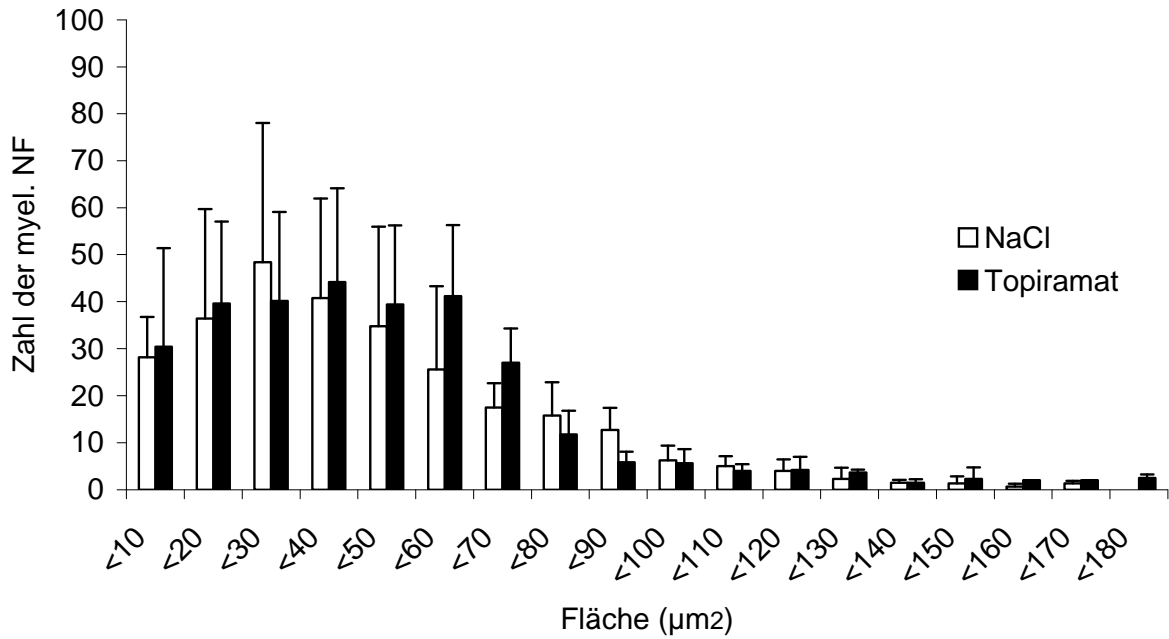
### **3.3 Histologie und Morphometrie**

Für die histologischen Auswertungen zur Beurteilung eines Topiramats-Effektes auf die Neuroregeneration wurden in einer ersten Versuchsgruppe zehn Ratten nach CCI über 28 Tage mit zweimal täglich 50 mg/kg Topiramats (n=5) beziehungsweise 5 ml NaCl (n=5) intraperitoneal behandelt. Analog hierzu fand die Behandlung nach Crush-Läsion des N. ischiadicus statt, die Gewebegewinnung beider Gruppen erfolgte am Tag 28 post operationem.

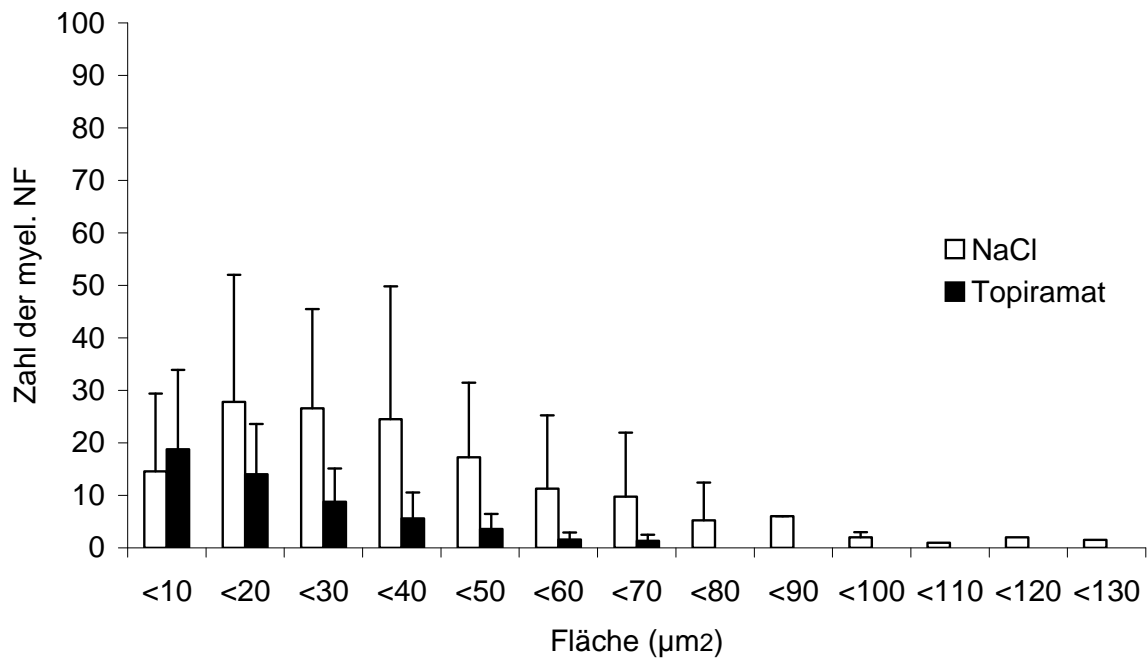
#### **3.3.1 Auswertung der Kaliberspektren des N. ischiadicus 3 mm distal der Läsion**

Zur Beurteilung und Quantifizierung der nach einer peripheren Nervenläsion stattfindenden Neuroregeneration wurde zunächst je Nerv ein Kaliberspektrum eines zufällig ausgewählten und computerunterstützt analysierten Bildausschnitts (Vergrößerung 1750x) angefertigt. Hierdurch wurde beurteilbar, in welchem Umfang myelinisierte Nervenfasern nach Nervenläsion untergehen und in welchem Maße eine Neuroregeneration in Form des Auftretens kleiner dünn myelinisierter Fasern stattfindet. Zur Beurteilung eines Einflusses der Topiramats-Behandlung wurden die Ergebnisse nach Auswertung der einzelnen Nervenanschnitte miteinander verrechnet und bezüglich der medikamentösen Behandlung in Gruppen zusammengefasst.

Nach CCI-Läsion kam es ipsilateral zu einer deutlichen Reduktion vor allem mittelgroßer und großer myelinisierter Nervenfasern (Abbildung 10, 11). Die Anzahl kleiner Nervenfasern reduzierte sich ebenfalls, 28 Tage nach CCI kam es noch zu keiner deutlichen Bildung kleinkalibriger Nervenfasern im Sinne einer Nervenfaserverregeneration. Sowohl contra- wie auch ipsilateral zeigten sich keine Unterschiede im Kaliberspektrum zwischen Topiramats- und NaCl-behandelten Tieren.



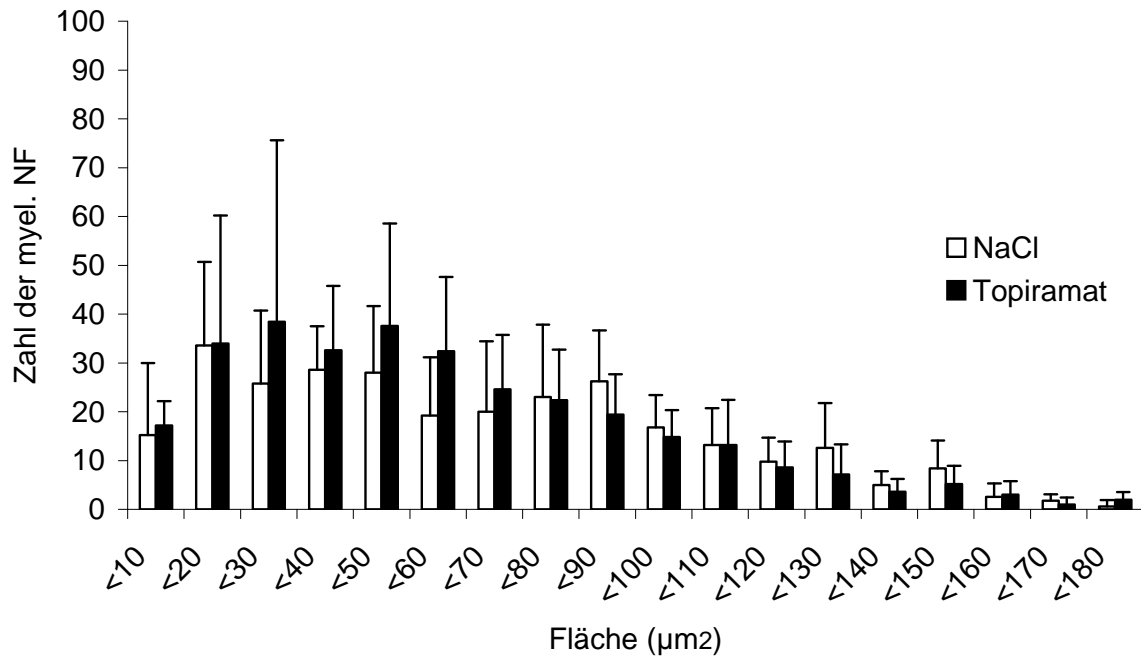
**Abb. 10** Fläche der myelinisierten intakten Nervenfasern (NF) auf der contralateralen Seite 28 Tage nach CCI.



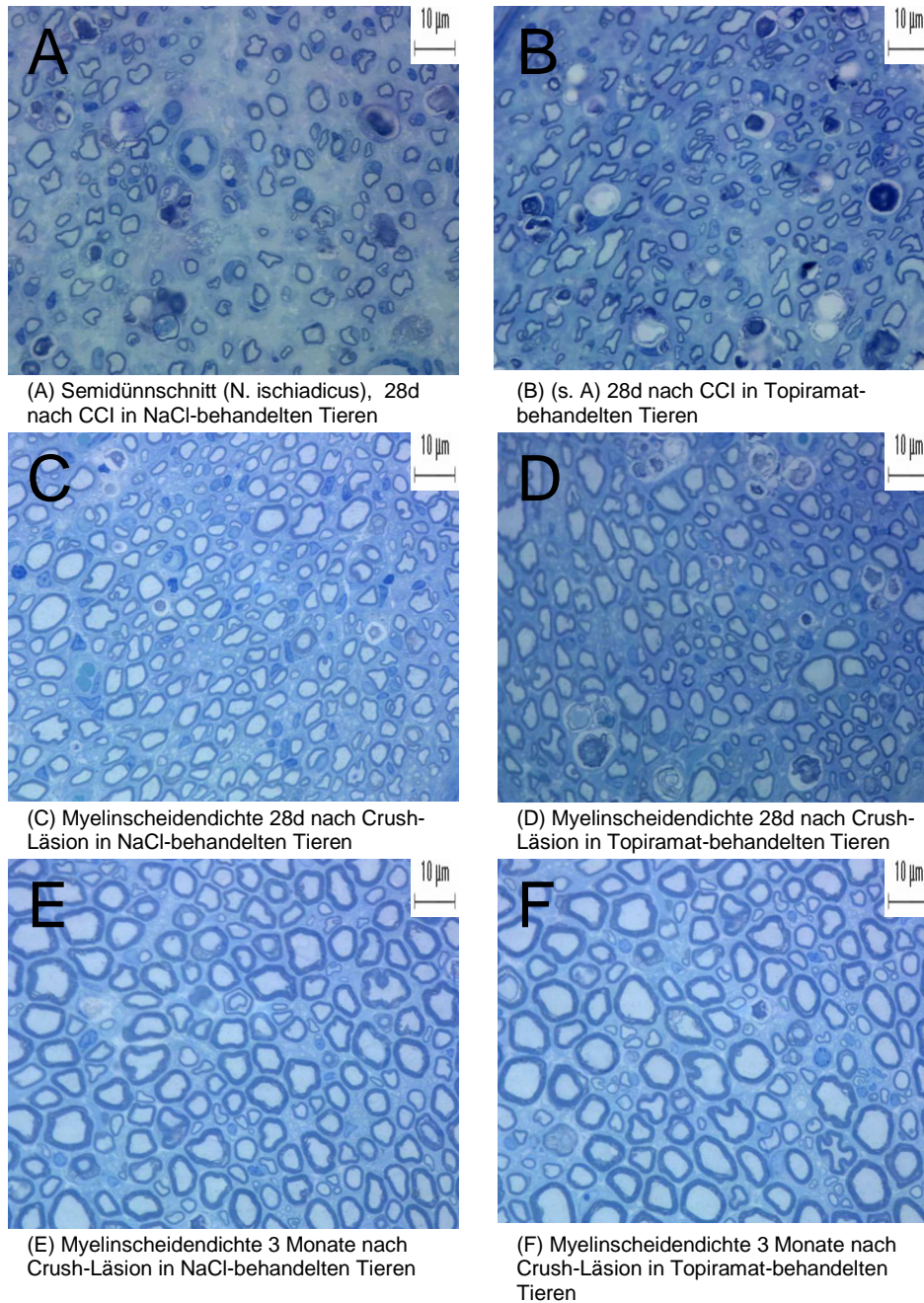
**Abb. 11** Fläche der myelinisierten intakten Nervenfasern auf der ipsilateralen Seite 28 Tage nach CCI. Reduktion insbesondere großer myelinisierter intakter Nervenfasern.

Nach Crush-Läsion kam es 28 Tage postoperativ ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion insbesondere mittelgroßer und großer Nervenfasern (Abbildung 12, 14).

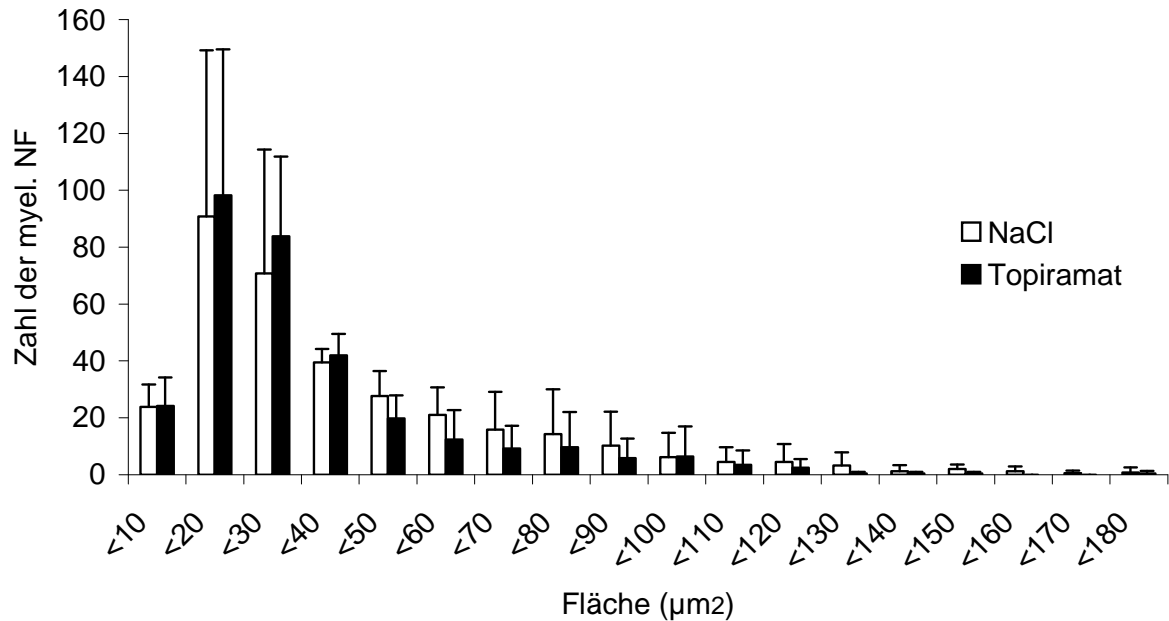
Im Gegensatz zur CCI-Läsion fand sich hier allerdings in beiden Behandlungsgruppen eine deutlich größere Anzahl kleinkalibriger Nervenfasern, eine beginnende Regeneration anzeigend. Unter Topiramatbehandlung war lediglich eine Tendenz zur stärkeren Ausbildung dieser Regeneratgruppen erkennbar, die statistisch jedoch nicht signifikant war.



**Abb. 12** Fläche der myelinisierten intakten Nervenfasern auf der contralateralen Seite 28 Tage nach Crush.



**Abb. 13** Repräsentative Semidünnschnitte des N. ischiadicus distal der entsprechenden Läsion (CCI bzw. Crush) 28 Tage respektive 3 Monate post lesionem. Deutliche Abnahme der Myelinscheidendichte 28 Tage nach CCI mit Auftreten einzelner Regeneratgruppen, 28 Tage nach Crush bereits höhere Anzahl von Regeneratgruppen. 3 Monate post lesionem deutliche Dichtezunahme. Zu allen Zeitpunkten wie Läsionstypen kein Unterschied Topiramatbehandlung versus NaCl-Behandlung objektivierbar.



**Abb. 14** Fläche der myelinisierten intakten Nervenfasern auf der ipsilateralen Seite 28 Tage nach Crush.

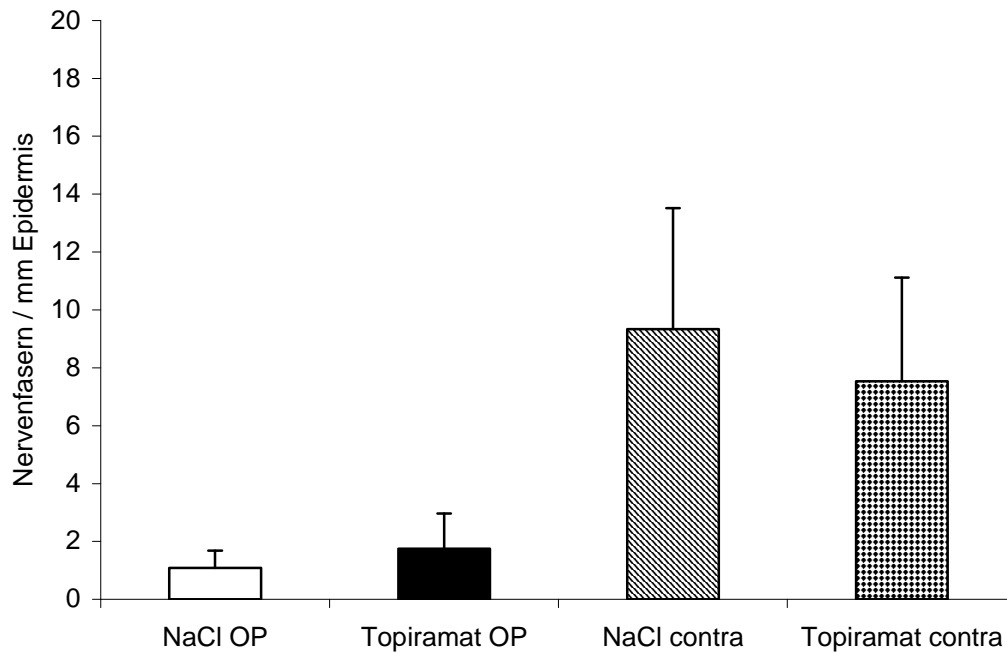
Zusammenfassend war zwischen den mit CCI bzw. Crush-Läsion behandelten Tieren ein Unterschied insofern feststellbar, als dass nach Crush-Läsion der Anteil regenerierender kleiner und dünn myelinisierter Fasern nach Analyse im Kaliberspektrum höher lag als nach Behandlung mit CCI. Unter Topiramatebehandlung war eine Tendenz zu einer erhöhten Zahl kleiner dünn myelinisierter Nervenfasern erkennbar, ein statistisch signifikanter Einfluss der Topiramate-Behandlung auf die Neuroregeneration nach peripherer Nervenläsion war anhand dieser Analyse in unseren Läsionsmodellen aber nicht nachweisbar.

### 3.3.2 Immunhistochemische Auswertung der epidermalen Innervation der Footpads

Zur Quantifizierung der epidermalen Nervenfaserdichte wurde zunächst die immunhistochemische Färbung der an Tag 28 entnommenen Footpads im Innervationssegment L4/L5 mit dem panneuronalen Marker PGP 9.5 (Ultraclone, UK, 1:800) durchgeführt.

Nach CCI wie auch nach Crush-Läsion zeigte sich eine deutliche Reduktion der epidermalen Nervenfaserdichte im Vergleich zu den unoperierten und unbehandelten

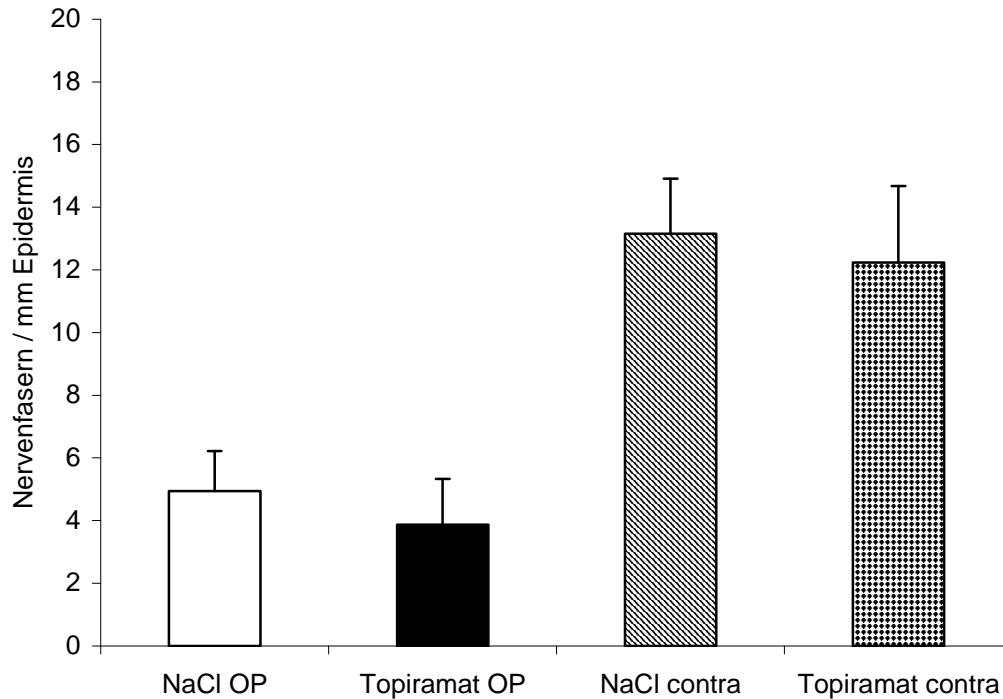
Kontrolltieren. Nach Crush-Läsion zeigte sich im Vergleich zur CCI-Läsion (Abbildung 15) eine Tendenz zu einer größeren Anzahl von Nervenfasern je mm Epidermis, der statistisch jedoch nicht signifikant war (keine Abbildung). Ein Effekt durch Topiramat-Behandlung war in keinem der beiden Läsions-Modelle nachweisbar.



**Abb. 15** Epidermale Nervenfaserdichte, PGP 9.5-immunreaktive Fasern/mm Epidermis 28 Tage nach CCI.

Auch in der im Folgenden beschriebenen elektrophysiologischen Versuchsgruppe war die epidermale Innervation 3 Monate post operationem noch deutlich reduziert, auch hier zeigte sich kein Effekt der Topiramat-Behandlung (Abbildung 16).





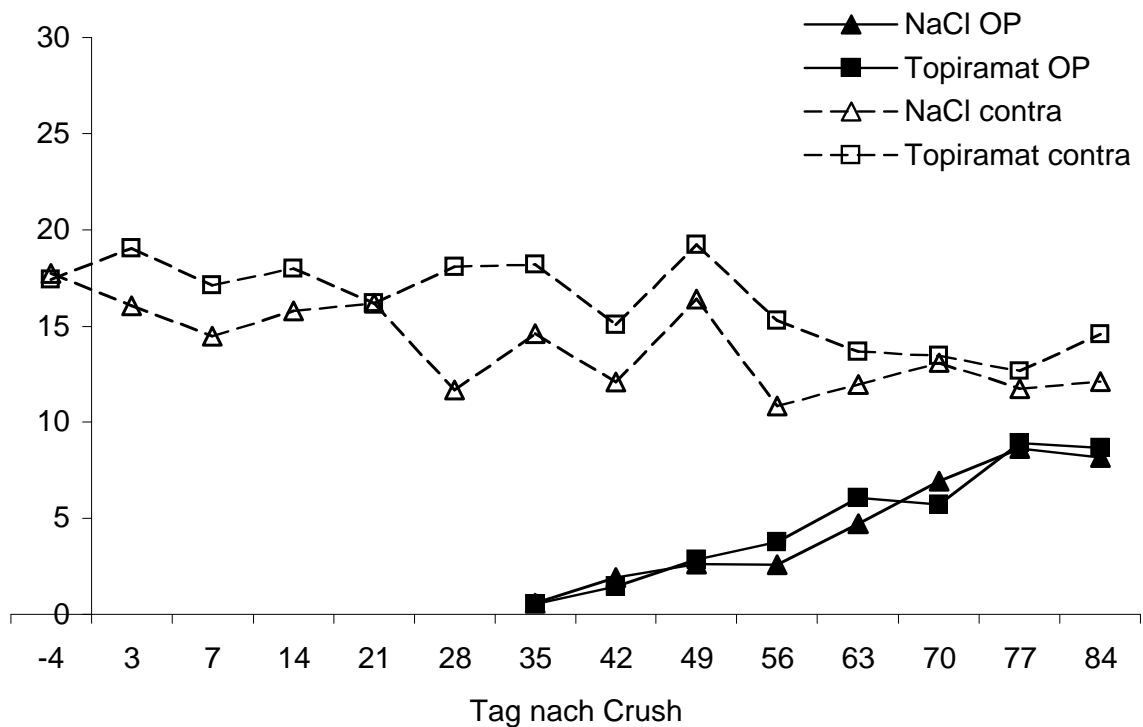
**Abb. 16** Epidermale Nervenfaserdichte, PGP 9.5-immunreaktive Fasern/mm Epidermis 3 Monate nach Crush.

### 3. 4 Auswertung der elektrophysiologischen Verlaufsbeobachtung

Da an Tag 28 die in den verhaltensbeobachtenden sowie histologischen Auswertungen untersuchten Parameter ihre präoperativen Ausgangswerte noch nicht erreicht hatten, entschieden wir uns zu einer elektrophysiologischen Langzeitanalyse nach Crush-Läsion. Zur Verlaufsbeobachtung der elektrophysiologischen Parameter nach peripherer Nervenläsion wurden 10 Ratten mit einer unilateralen Crush-Läsion behandelt. Fünf Tiere erhielten zweimal täglich 50mg/kg Topiramate, fünf weitere eine Injektion von zweimal täglich 5ml NaCl, zwei weitere unoperierte und unbehandelte Versuchstiere dienten als Kontrollen.

### 3.4.1 Muskelsummenaktionspotenziale (MSAPs)

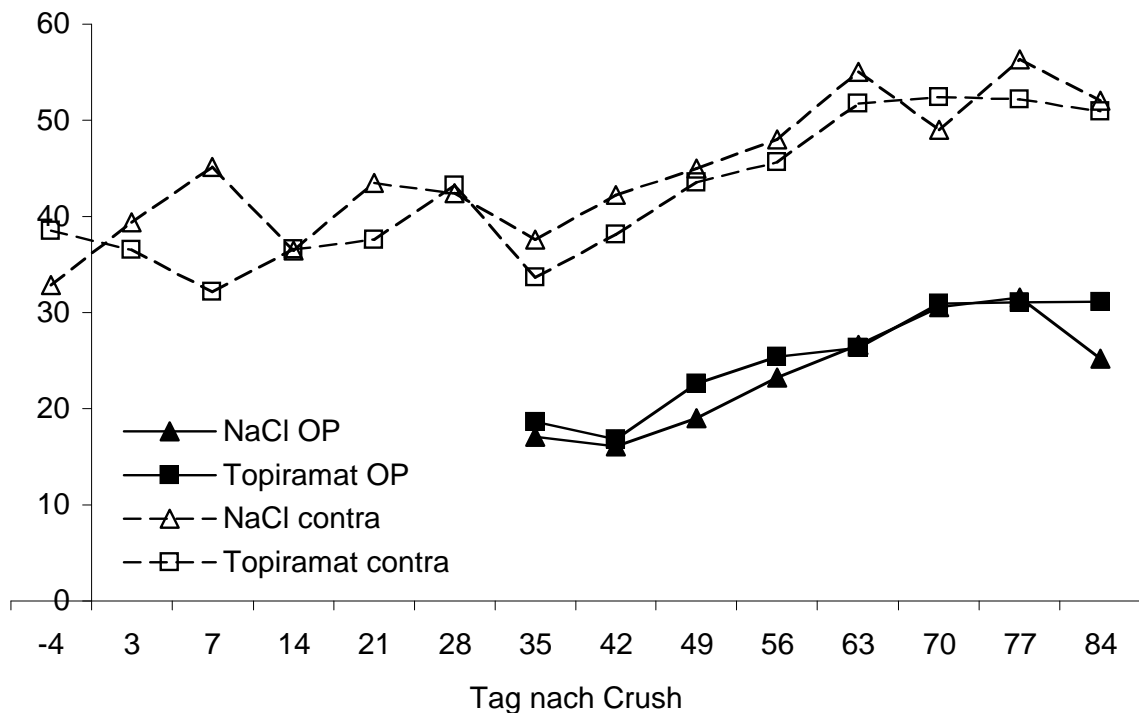
Muskelsummenaktionspotenziale waren erst ab Tag 35 post operationem zu registrieren (Abbildung 17). Ab diesem Zeitpunkt stieg die Amplitude kontinuierlich an, erreichte aber bis zum Ende der Beobachtung 3 Monate nach Crush-Läsion nicht die Ausgangswerte. Auch zeigte sich kein Effekt bezüglich einer Behandlung mit Topiramamat im Vergleich zur NaCl-Behandlung.



**Abb. 17** Muskelsummenaktionspotenziale (MSAP) im Verlauf bis 3 Monate nach Crush-Läsion. Kein signifikanter Unterschied zwischen Topiramamat- und NaCl-Behandlung.

### 3.4.2 Nervenfaserverleitgeschwindigkeiten (NLGs)

Ähnlich zu den Ergebnissen der Messung der MSAPs fand sich erst ab Tag 35 nach Crush-Läsion eine messbare Nervenleitgeschwindigkeit sowohl in NaCl- als auch Topiramamat-behandelten Tieren (Abbildung 18). Bis zum Ende der Beobachtung stiegen auch hier die Nervenleitgeschwindigkeiten kontinuierlich an, erreichten aber ebenfalls nicht die Ausgangswerte, auch eine Differenz bezüglich NaCl- oder Topiramamat-behandelter Tiere war nicht zu registrieren.



**Abb. 18** Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) im Verlauf bis 3 Monate nach Crush-Läsion. Kein signifikanter Unterschied zwischen Topiramate- und NaCl-Behandlung.

### 3.5 mRNA-Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF-alpha mitsamt seiner Rezeptoren Typ 1 und 2 und IL-1 beta sowie eines antiinflammatorischen Zytokins (IL-10) 12 und 24 Stunden nach Crush-Läsion

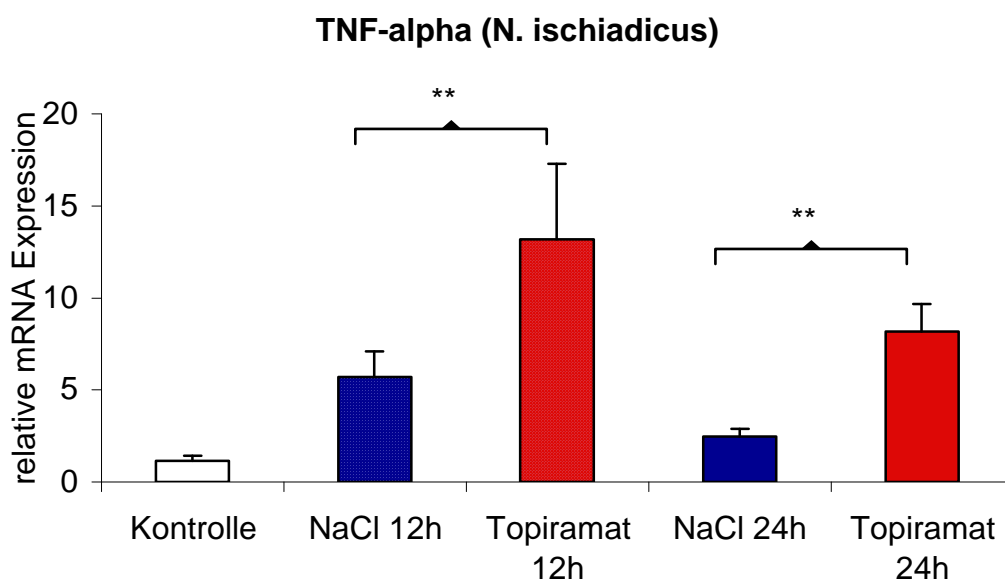
Analog zu obigem Protokoll wurde an 16 jeweils über 3 Tage vorbehandelten Ratten (je Gruppe 4 Ratten zweimal täglich 50mg/kg Topiramate, 4 Ratten 2x täglich 5ml NaCl) eine unilaterale Crush-Läsion durchgeführt. Zwei Ratten je Gruppe dienten als Kontrolltiere und wurden weder operiert noch behandelt. Durch die medikamentöse Vorbehandlung war ein ausreichender Wirkspiegel zum Zeitpunkt der Operation sichergestellt. Nach 12h (Gruppe 1) bzw. 24h (Gruppe2) wurden wie oben beschrieben der N. ischiadicus sowie die Spinalganglien L4 und L5 entnommen. Durch unmittelbares Schockgefrieren in Flüssigstickstoff wurde somit eine Untersuchung der *in vivo* mRNA-Expression sichergestellt. Nach RNA-Extraktion und reverser Transkription wurde für jede einzelne Gewebeprobe eine Real-Time-PCR durchgeführt.

### 3.5.1 TNF-alpha mRNA-Expression im N. ischiadicus sowie Spinalganglien L4/L5 nach Crush-Läsion

Bereits in den unbehandelten und nicht operierten Kontrolltieren war eine konstitutive mRNA Expression von TNF-alpha sowohl im intakten N. ischiadicus wie auch in den Spinalganglien L4/L5 detektierbar (Abbildung 19).

12 Stunden nach Crush-Läsion fand sich im N. ischiadicus distal der Läsion unter NaCl-Behandlung eine um das 4,9-fach erhöhte mRNA-Expression von TNF-alpha, unter Topiramat-Behandlung stieg die Expression um den Faktor 11,3 an.

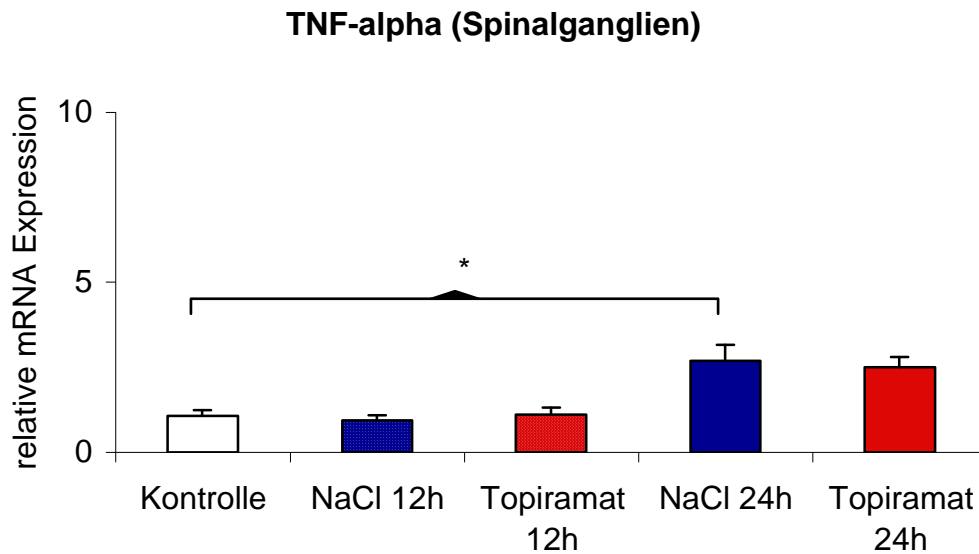
24 Stunden nach der Läsion reduzierten sich die gemessenen Werte für TNF-alpha-mRNA, sie waren aber im Vergleich zu den Kontrolltieren noch erhöht, wiederum unter NaCl-Behandlung auf das 2,1-fache, unter Topiramat-Behandlung auf das 7-fache.



**Abb. 19** TNF-alpha mRNA-Expression im N. ischiadicus distal der Crush Läsion (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ ).

In den Spinalganglien L4/L5 zeigte sich 12 Stunden nach Crush-Läsion noch kein signifikanter Effekt auf die TNF-alpha mRNA Expression (Abbildung 20).

24 Stunden post operationem war die Expression von TNF-alpha mRNA unter NaCl-Behandlung auf das 2,5-fache erhöht, unter Topiramat-Behandlung stieg sie auf das 2,3-fache.



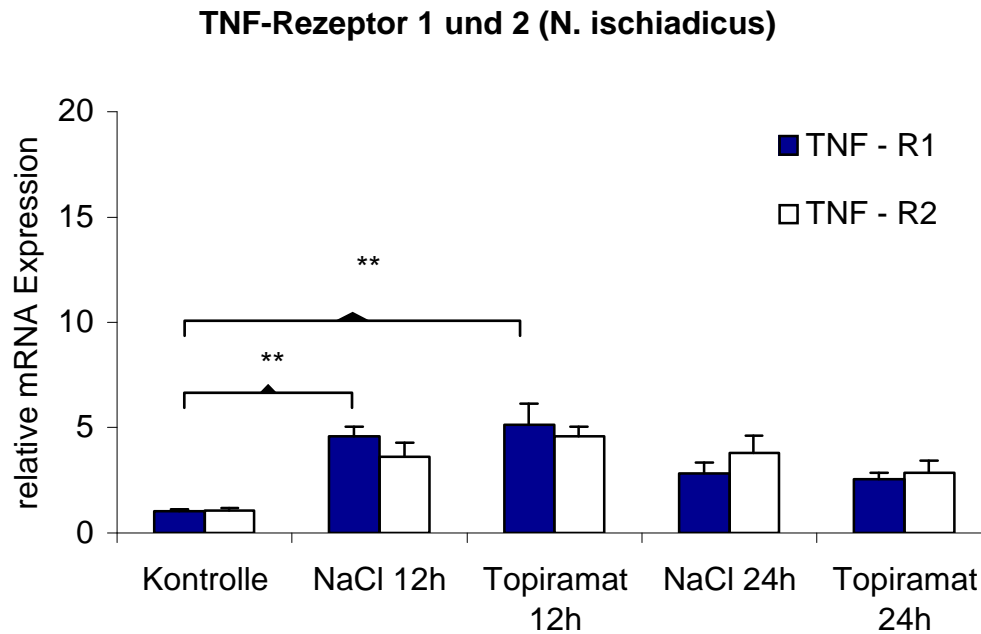
**Abb. 20** TNF-alpha mRNA-Expression in den Spinalganglien L4/L5 nach Crush-Läsion (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ ).

Unter Topiramat-Behandlung fand sich demnach zu den untersuchten Zeitpunkten eine im Vergleich zur NaCl-Behandlung deutlich erhöhte Expression an TNF-alpha mRNA im distal der Läsion gelegenen N. ischiadicus, in den Spinalganglien fand sich ein Anstieg der TNF-alpha mRNA-Expression erst 24 Stunden post operationem, zudem war ein Effekt der Topiramat-Behandlung nicht auszumachen.

### 3.5.2 TNF-alpha Rezeptor 1 und 2 mRNA-Expression im N. ischiadicus sowie in den Spinalganglien nach Crush-Läsion

Die Bestimmung der Expression von TNF-alpha Rezeptoren 1 sowie 2 diente primär der genaueren Beurteilung der beobachteten TNF-alpha mRNA Hochregulation unter Topiramat. Eine alleinige Hochregulation von TNF-alpha mit beispielsweise simultaner verminderter Expression der korrespondierenden Rezeptoren hätte summa summarum keinen Effekt auf nachfolgenden Ebenen.

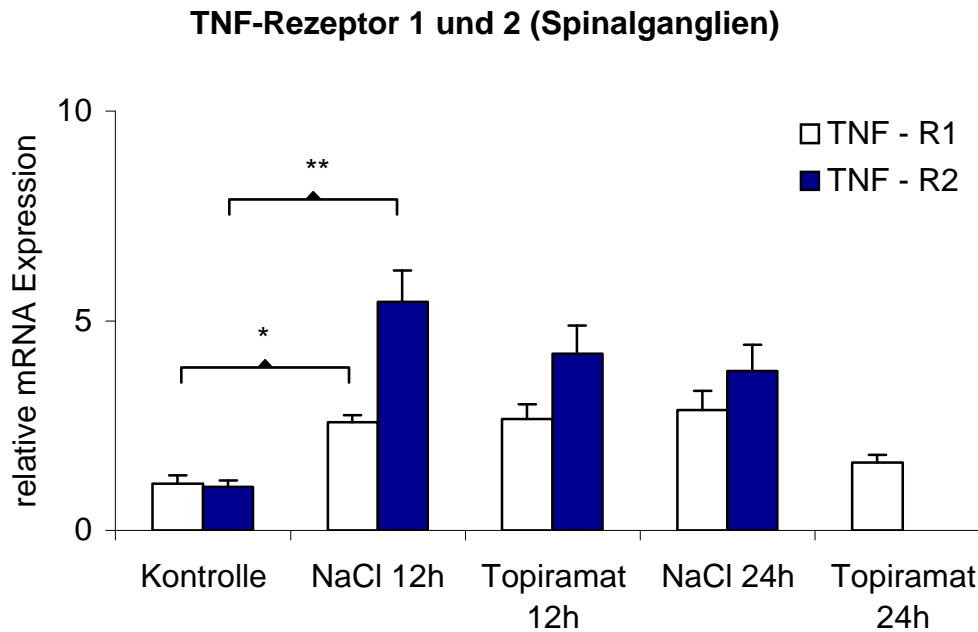
Es zeigte sich für TNF-alpha Rezeptoren 1 sowie 2 eine konstitutive Expression im N. ischiadicus wie in den Spinalganglien der unoperierten und unbehandelten Kontrolltiere (Abbildung 21).



**Abb. 21** TNF-alpha Rezeptor 1 und 2 Expression im N. ischiadicus distal der Crush-Läsion (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ ).

12 Stunden nach Crush-Läsion stieg im N. ischiadicus die Expression beider Rezeptoren an, wobei sich kein Effekt der Topiramamatbehandlung beobachten ließ. 24 Stunden nach der Läsion zeigte sich eine Expression ähnlicher Größe wie nach 12 Stunden, eine Alteration der Expression durch Topiramamatbehandlung fand sich hier ebenfalls nicht.

In den Spinalganglien stieg die Expression von TNF-alpha Rezeptor 1 wie 2 in deutlich geringerem Maße an als im N. ischiadicus, wiederum ließ sich kein Effekt der Behandlung mit Topiramamat beobachten (Abbildung 22).



**Abb. 22** TNF-alpha Rezeptor 1 und 2 Expression in den Spinalganglien L4/L5 (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ ).

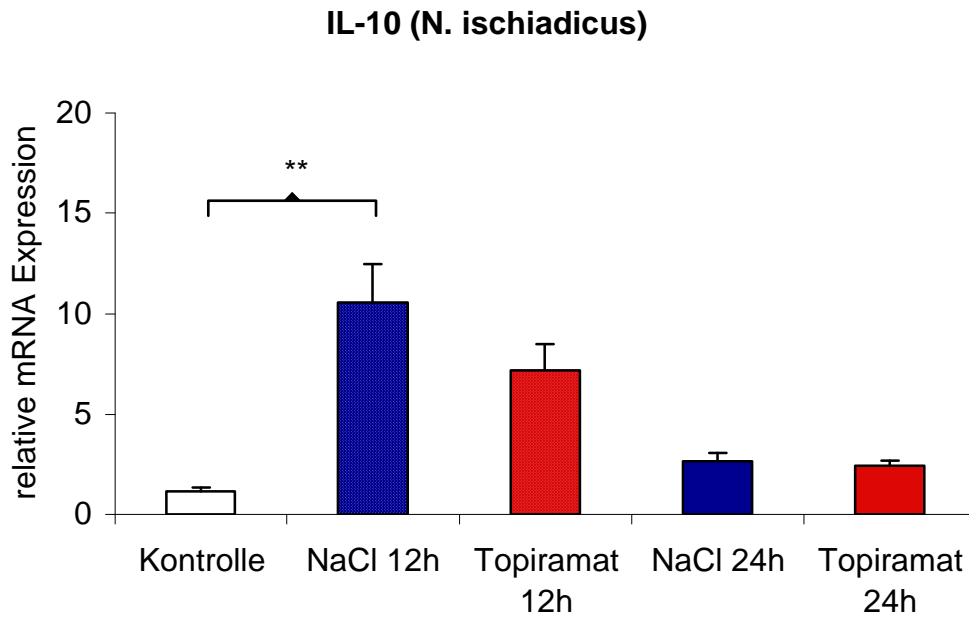
Zusammenfassend fand sich für die beiden untersuchten TNF-alpha Rezeptoren ein Anstieg der mRNA-Expression 12 wie 24 Stunden nach Crush-Läsion, eine Alteration durch Topiramamatbehandlung ließ sich jedoch nicht beobachten.

### 3.5.3 IL-10 mRNA-Expression im N. ischiadicus sowie in den Spinalganglien L4/L5 nach Crush-Läsion

Auch bei der Messung der Expression an IL-10 mRNA zeigte sich eine konstitutive Expression bereits im N. ischiadicus wie auch in den Spinalganglien der unoperierten Kontrolltiere (Abbildung 23).

Die Expression an IL-10 mRNA im N. ischiadicus stieg bereits 12 Stunden nach Durchführung der Crush-Läsion deutlich an, unter NaCl-Behandlung auf das 9,1-fache, unter Behandlung mit Topiramamat um den Faktor 6,2.

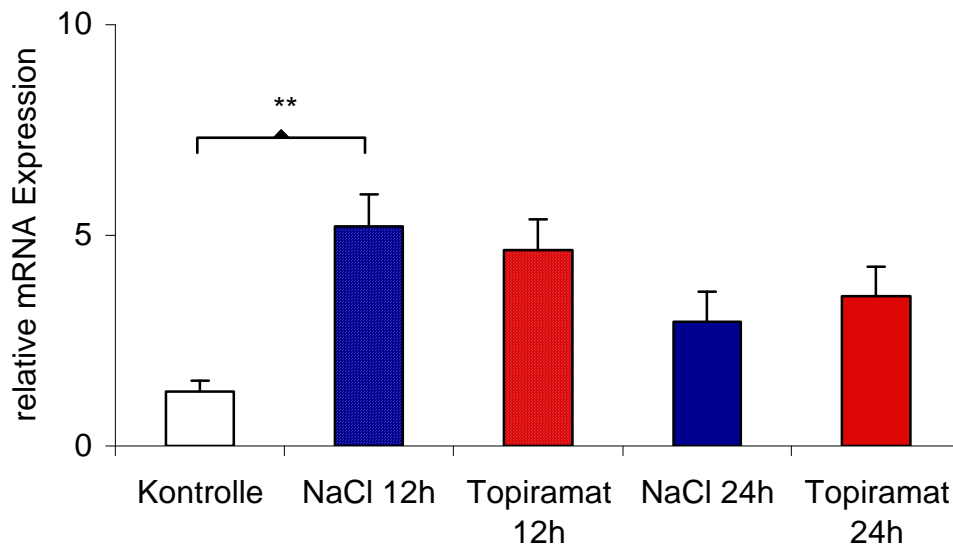
24 Stunden post operationem sanken auch hier bereits die gemessenen Werte zur IL-10 mRNA Expression. Sie waren aber im Vergleich zu den Kontrollwerten noch erhöht auf das 3,5-fache unter NaCl-Behandlung, auf das 2,5-fache unter Topiramamat-Behandlung.



**Abb. 23** IL-10 mRNA-Expression im N. ischiadicus distal der Crush-Läsion (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ ).

In den Spinalganglien L4/L5 fanden sich im Gegensatz zur TNF-alpha mRNA Expression bereits 12 Stunden nach Crush-Läsion deutlich erhöhte Werte für die IL-10 mRNA Expression (Abbildung 24). Diese stieg unter NaCl-Behandlung auf das 4,6-fache, unter Behandlung mit Topiramat um den Faktor 6,2 an. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen ließ sich jedoch nicht ausmachen. 24 Stunden post operationem sanken die Werte, blieben aber gegenüber den Kontrollwerten noch deutlich erhöht auf das 2,7-fache unter NaCl-Behandlung sowie auf das 3,9-fache unter Behandlung mit Topiramat (kein signifikanter Unterschied).



**IL-10 (Spinalganglien)**

**Abb. 24** IL-10 mRNA-Expression in den Spinalganglien L4/L5 nach Crush-Läsion (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ ).

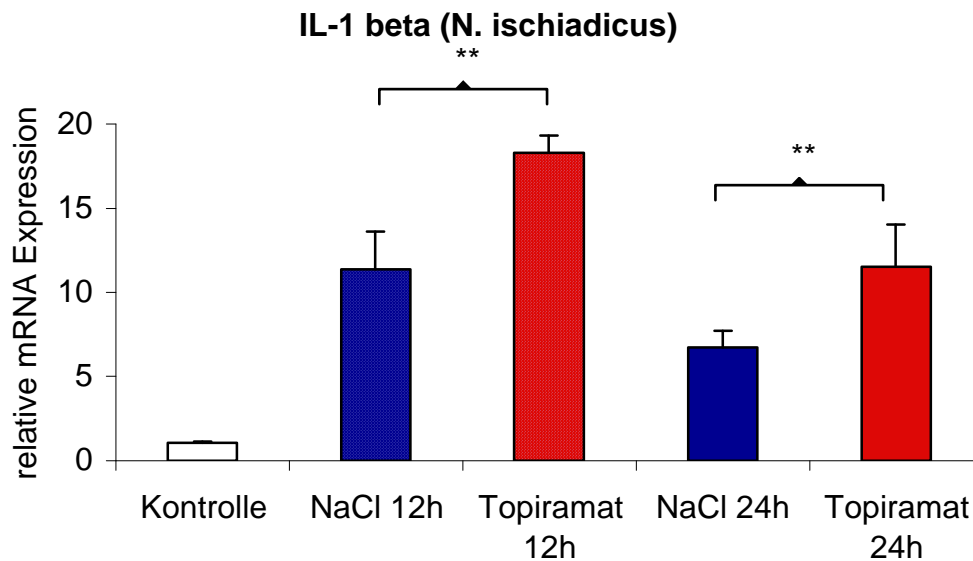
Zusammenfassend fand sich im N. ischiadicus distal der Läsion zu beiden Zeitpunkten eine deutlich erhöhte Expression an IL-10 mRNA, diese zeigte sich allerdings geringer ausgeprägt unter Behandlung mit Topiramamat (nicht signifikant). In den Spinalganglien fand sich zum einen bereits 12 Stunden nach Crush-Läsion eine deutlich erhöhte Expression an IL-10 mRNA (vergleiche Messung der TNF-alpha mRNA Expression), zum anderen fanden sich unter Topiramamat-Behandlung eher erhöhte Werte als unter NaCl-Behandlung (im Gegensatz zum N. ischiadicus).

### 3.5.4 IL-1 beta mRNA-Expression im N. ischiadicus sowie in den Spinalganglien L4/L5 nach Crush-Läsion

Auch für das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 beta fand sich eine konstitutive Expression bereits in den unoperierten und unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 25).

Im Nervus ischiadicus distal der Läsion fand sich 12 wie 24 Stunden post lesionem eine deutlich erhöhte Expression von IL-1 beta sowohl in NaCl- wie auch in

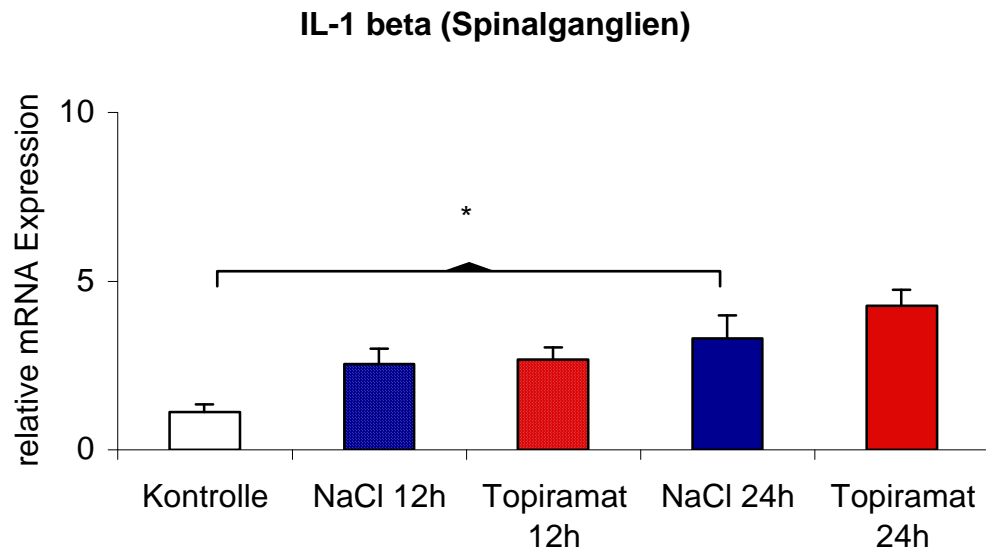
Topiramat-behandelten Tieren. Unter Topiramatbehandlung war diese signifikant höher als unter NaCl-Behandlung.



**Abb. 25** IL-1 beta Expression im N. ischiadicus distal der Crush-Läsion (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ ).

24 Stunden nach Crush-Läsion war die Expression bereits wieder herunterreguliert, jedoch noch deutlich erhöht gegenüber den Kontrolltieren.

In den Spinalganglien fand sich 12 Stunden post lesionem eine erhöhte Expression an IL-1 beta mRNA (nicht signifikant), 24 Stunden danach eine statistisch signifikant erhöhte Expression in beiden Behandlungsgruppen. Ein Topiramateffekt war zu beiden Zeitpunkten nicht zu beobachten (Abbildung 26).



**Abb. 26** IL-1 beta Expression in den Spinalganglien L4/L5 nach Crush-Läsion (\*= $p < 0,05$ , \*\*= $p < 0,01$ ).

## **4 DISKUSSION**

### **4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse**

Mit dieser Studie konnten verschiedene Wirkungen von Topiramaten auf die Entwicklung neuropathischen Schmerzes sowie neurode- wie -regenerativer Vorgänge nach peripherer Nervenläsion im Tiermodell aufgezeigt werden:

- 1) Moderate Wirkung auf die Entwicklung sowie Dauer von Verhaltensveränderungen, die im Sinne einer Neuropathie zu deuten sind, hierbei teilweise unterschiedliche Wirkung nach CCI im Vergleich zur Crush-Läsion.
- 2) Ein neuroprotektiver oder pro-regenerativer Effekt von Topiramaten war anhand der histologischen und morphometrischen Analyse sowohl nach CCI als auch nach Crush bis 28 Tage post lesionem nicht zu beobachten.
- 3) In der elektrophysiologischen Langzeitstudie über 3 Monate nach Crush waren Effekte von Topiramaten im Sinne erhöhter Nervenleitgeschwindigkeiten oder größerer Amplituden der Muskelsummenaktionspotenziale nicht zu beobachten.
- 4) Auf zellulärer Ebene fand sich eine deutlich höhere mRNA-Expression proinflammatorischer Zytokine (TNF-alpha, IL-1 beta) sowie eine niedrigere mRNA-Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 (n.s.), kein Effekt der Topiramatenbehandlung auf die Expression von TGF-beta sowie der TNF-Rezeptoren 1 und 2.

### **4.2 Zur Schmerzforschung am Tiermodell**

Bei den beiden in dieser Arbeit verwendeten Läsionsformen handelt es sich um etablierte und gut reproduzierbare Modelle einer peripheren Nervenläsion.

Bei der CCI-Läsion handelt es sich hierbei um ein vornehmlich zum Studium neuropathischer Schmerzen entwickeltes Modell. Die Tiere zeigen nach CCI Verhaltensmuster, die auf eine Hyperalgesie sowie Allodynie schließen lassen, zwei Kardinalsymptome, die von Menschen mit chronischen neuropathischen Schmerzen geklagt werden (Myers und Sommer 1994, Myers 1995). In der vorliegenden Studie war die Entwicklung oben genannter Verhaltensweisen ebenfalls gut reproduzierbar, interindividuelle Differenzen hielten sich in Grenzen.

Die Crush-Läsion dient neben dem Studium neuropathischer Schmerzformen unter anderem auch dem Studium neurode- sowie –regenerativer Prozesse nach peripherer Nervenläsion. Ein Vorteil ist hierbei die noch vorhandene Leitstruktur in Form des ununterbrochenen Epineuriums. Zudem findet nach der Läsion keine das Ergebnis eines regenerativen Prozesses verfälschende entzündliche Fremdkörperreaktion statt. Anhand insbesondere der elektrophysiologischen Daten war sowohl bezüglich der Muskelsummenaktionspotenziale als auch der gemessenen Nervenleitgeschwindigkeiten ein kontinuierlicher Regenerationsprozess in Form des Wiedereinsprossens von Axonen und des Aufbaus einer intakten Myelinscheide indirekt zu beobachten. In dieser Arbeit stützt sich die Beurteilung neuroregenerativer Prozesse also im Besonderen auf die nach der Crush-Läsion gewonnenen, histologisch morphometrischen sowie elektrophysiologischen Daten.

Durch strikte Beachtung oben beschriebener Umgangsformen mit den Tieren, insbesondere Einhaltung eines geregelten Tag-Nacht-Rhythmus, Habituationsphase in Form von Vortestungen, seltenem Raumwechsel, gleicher Untersucher sowie schematisierter Testanordnungen und –verfahren konnte gezeigt werden, dass diese beiden verwendeten Modelle experimenteller peripherer Nervenläsionen gut und reproduzierbar auf die Sprague-Dawley-Ratte übertragbar sind. Nach beiden Läsionsmodellen kam es zu im Sinne einer Hyperalgesie sowie Allodynie, den Kardinalsymptomen einer schmerzhaften Neuropathie, zu deutenden Verhaltensveränderungen. Die Entwicklung einer Hitzehyperalgesie verlief in beiden Läsionsmodellen nahezu analog in Ausmaß und Dauer der Verhaltensveränderungen, insbesondere jedoch bezüglich der Entwicklung der Kälteallodynie war zu erkennen, dass sich diese nach Crush-Läsion bereits an Tag

20 postoperativ nahezu vollständig zurückgebildet hatte, hingegen nach CCI-Läsion weiterhin andauerte.

Bei der Analyse der morphometrischen und histologischen Daten ist deutlich zu erkennen, dass der Anteil regenerierender kleiner dünn myelinisierter Nervenfasern im Kaliberspektrum 28 Tage nach Crush-Läsion deutlich erhöht gegenüber der CCI-Läsion zu finden ist.

Die immunhistochemische Auswertung der Footpads zeigte eine erhöhte Dichte epidermaler Nervenfasern nach Crush-Läsion.

Das Ausmaß von im Sinne einer Neuropathie zu deutenden Verhaltensveränderungen sowie die Dauer neurodegenerativer Prozesse scheinen demnach nach Crush-Läsion geringer beziehungsweise kürzer zu sein als nach CCI-Läsion.

#### **4.3 Topiramat als antihyperalgetische Substanz?**

In der vorliegenden Studie konnte mit den verwendeten Läsionsmodellen der CCI- sowie der Crush-Läsion kein eindeutiger Effekt von Topiramat auf die Entwicklung der Hauptsymptome neuropathischer Schmerzen, der Hyperalgesie sowie der Allodynie, ausgemacht werden. Jedoch sollten einige geringer ausgeprägte Effekte diskutiert werden:

Im CCI-Modell reduzierte Topiramat die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie sowie der Kälteallodynie. Während der Beobachtungsperiode von 28 Tagen entwickelten Topiramat-behandelte Tiere keine mechanische Hyperalgesie, zudem war die Entwicklung einer Kälteallodynie geringer ausgeprägt als unter NaCl-Behandlung.

Im Crush-Modell hingegen war die Wirkung auf die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie geringer ausgeprägt, eine Beeinflussung der Entwicklung einer Kälteallodynie konnte jedoch auch hier beobachtet werden. Zudem waren zu Beginn und Ende des Beobachtungszeitraumes statistisch signifikante Effekte auf die

Entwicklung einer Hitzehyperalgesie auszumachen, die unter Topiramatsbehandlung geringer ausgeprägt war.

Unterschiede zwischen den beiden Läsionsmodellen könnten in dem Ausmaß der Nervenschädigung zu begründen sein. Trotz der inkompletten Nervenschädigung im CCI-Modell im Gegensatz zum Crush-Modell, bei der es zu einer Unterbrechung sämtlicher Axone kommen sollte, waren sowohl Ausprägung neuropathischer Verhaltensauffälligkeiten als auch Ausmaß neurodegenerativer Prozesse im Crush-Modell (nach de Koning et al. 1986) geringer ausgeprägt. Zu beachten ist ebenfalls die beobachtete Hypersensitivität im Crush-Modell bereits an Tag 3 post lesionem. Demnach müssen noch einige impulsleitende Nervenfasern vorhanden gewesen sein. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bereits eine geringe Anzahl leitender Nervenfasern zur Generierung von im Sinne einer Hyperalgesie zu deutenden Verhaltensauffälligkeiten ausreichen (Sommer et al. 1995). Sicherlich ist auch die Entwicklung fremdkörperinduzierter epineuraler Entzündungsprozesse nach CCI-Läsion durch die Ligaturen zu beachten. Diese Faktoren könnten dazu beigetragen haben, dass (a) die neuropathie-assoziierten Verhaltensveränderungen im CCI-Modell länger anhielten und (b) die Regeneration im Crush-Modell durch eine inkomplette Axondurchtrennung aufgrund der noch vorhandenen, durch Schwann-Zellen gebildeten Leitstruktur erleichtert war.

Abschließend ist hinzuzufügen, dass unter Topiramatsbehandlung an einzelnen Zeitpunkten zwar signifikante Effekte im Sinne einer Reduktion von Hitzehyperalgesie, mechanischer Allodynie sowie Kälteallodynie zu registrieren waren, diese größenordnungsmäßig jedoch sehr gering waren. Es ist somit zu bezweifeln, ob Topiramats als antihyperalgetische Substanz in unseren Läsionsmodellen zu werten ist. Unterschiedliche Ergebnisse zwischen Randall-Selitto Test (keine Entwicklung einer mechanischen Allodynie nach CCI) sowie von Frey Test (Reduktion lediglich an Tag 21 nach CCI) könnten dadurch begründet sein, dass beide Testungen zwar die Entwicklung einer mechanischen Allodynie quantifizieren, im Randall-Selitto-Test jedoch komplexere supraspinal gelegene Reaktionen geprüft werden. Selbiges gilt für die Testung der Kälteallodynie. Es ist somit zu vermuten, dass in Randall-Selitto-Test sowie im Aceton-Test beobachtete Reaktionen nicht durch neuroprotektive oder –regenerative Vorgänge zu erklären

sind, sondern durch die Beeinflussung zentraler Schmerz-Verarbeitungsprozesse durch Topiramat.

#### **4.4 Topiramat als neuroprotektive oder pro-regenerative Substanz?**

In den beiden von uns verwendeten Modellen kommt es post lesionem zu einem Untergang von Neuronen im Sinne der Waller'schen Degeneration (siehe Einleitung). Vornehmlich durch Proteaseninduktion und Calciumeinstrom (George et al. 1995) kommt es zum axonalen Untergang, Myelinscheiden werden zunächst von Schwann-Zellen, dann von Makrophagen aus dem Blutkreislauf phagozytiert (Stoll et al. 1989, Brück 1997). Durch das Aussprossen von Axonen aus dem proximalen Nervenstumpf entlang von Leitstrukturen (Büngnersche Bänder) kommt es im optimalen Falle zur erfolgreichen Regeneration. Hierbei finden sich im histologischen Korrelat zunächst kleinkalibrige dünn myelinisierte, erst im weiteren Verlauf großkalibrige stark myelinisierte Nervenfasern.

Eine erfolgreiche neuronale Regeneration ist also im Wesentlichen durch die histologische Beurteilung distal der Läsion entnommener Nervenschnitte objektivierbar. Vom proximalen Nervenstumpf aussprossende Axone sind meist in so genannten Regeneratgruppen kleiner dünn myelinisierter Axone angeordnet. In der vorliegenden Studie fanden sich 28 Tage post lesionem erste Anzeichen neuronaler Regenerationsvorgänge in Form dieser Regeneratgruppen im histologischen Korrelat. Im Falle der Crush-Läsion waren diese jedoch in einem wesentlich größeren Ausmaß zu finden als nach CCI-Läsion. Die basallaminäre Leitstruktur spielt hier sicherlich eine entscheidende Rolle, zudem die fehlende epineurale Fremdkörperreaktion, wie sie nach CCI stattfindet.

Zur weiteren Objektivierung erfolgreicher regenerativer Vorgänge nach peripherer Nervenläsion dienen elektrophysiologische Parameter wie die Beurteilung der Muskelsummenaktionspotenziale sowie der Nervenleitgeschwindigkeiten. Beide Parameter lassen indirekt auf sowohl erfolgreiche axonale Wiedereinsprossung als auch Remyelinisierungsvorgänge schließen. In dieser Arbeit waren erstmals ab Tag 35 nach Crush-Läsion Muskelsummenaktionspotenziale (MSAP) sowie eine



Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) registrierbar. Sowohl die Amplitude der MSAP wie auch die Nervenleitgeschwindigkeit stiegen ab Tag 35 dann kontinuierlich an und erreichten ab Tag 77 beziehungsweise Tag 75 ein Plateau, so dass wir uns zur Beendigung dieser Verlaufsbeobachtung entschieden. Diese Kontinuität zeigt, dass gerade elektrophysiologische Studien zur Beurteilung neuroregenerativer Vorgänge ein sehr spezifisches und sensitives Mittel sind.

In Zusammenschau der histologischen Beurteilung sowie der elektrophysiologischen Verlaufsbeobachtung über einen Zeitraum von drei Monaten ist ein eindeutiger Effekt von Topiramamat auf neuroregenerative Vorgänge nicht auszumachen. In Anbetracht der zahlreichen untersuchten Parameter und in Anbetracht des langen Verlaufes der elektrophysiologischen Beobachtung scheint ein signifikanter neuroprotektiver oder pro-regenerativer Effekt durch Topiramamatbehandlung auch bei einem längeren Beobachtungszeitraum nicht wahrscheinlich, ist aber nicht gänzlich auszuschließen.

### **4.5 Zur gewählten Dosierung von Topiramamat**

Sicherlich ist zu diskutieren, ob die von uns zur Beurteilung antihyperalgetischer, neuroprotektiver oder pro-regenerativer Effekte gewählte Dosis von 30mg/kg Körpergewicht ausreichend ist. Eine Dosis-Findungskurve zur exakteren Objektivierung wäre sicherlich wünschenswert, die Vielzahl der untersuchten Parameter jedoch zwang uns zur Wahl einer spezifischen Dosis. Diese wählten wir mit 30mg/kg Körpergewicht aufgrund einiger bereits veröffentlichter Studien.

- a) Insbesondere in der von Smith-Swintosky veröffentlichten Studie, in der ein pro-regenerativer Effekt von Topiramamat nach N. facialis Kompressionsläsion beschrieben wurde, fand eine Dosis von 20mg/kg Verwendung (Smith-Swintosky et al. 2001). Dieser Effekt wurde durch eine höhere Dosis nicht beeinflusst.
- b) Niebauer und Gruenthal zeigten nach experimentellem Status epilepticus, dass eine Dosis von 20 mg/kg intraperitoneal die iktale Phase signifikant verkürzte und neuronale Zelluntergänge im Hippocampus verhinderte und Dosiserhöhungen auf 40 mg/kg oder sogar 80mg/kg nicht zu effektiverer Neuroprotektion führten (Niebauer und Gruenthal 1999).

- c) Shank et al. berechneten für die Ratte einen ED50-Wert (applizierte Konzentration einer Substanz, bei der 50% der Rezeptoren besetzt bzw. 50% der pharmakologischen Wirkung erreicht sind) von 13.5 mg/kg (Shank et al. 1994), Koh und Jensen bei intraperitonealer Applikation sogar einen ED50-Wert von 2.1 mg/kg (Koh und Jensen 2001). Unsere verwendete Dosis von 30 mg/kg intraperitoneal liegt demnach deutlich über dem kalkulierten ED50-Wert, höhere Dosierungen lassen demnach eher größere Nebenwirkungen als Nutzen erwarten.
- d) Edmonds et al. zeigten in ihrer Studie, dass die verwendete Dosis von 20 mg/kg fast sämtliche Zeichen hippocampalen Zelltodes eliminierten (Edmonds et al. 2001).

Dementsprechend entschieden wir uns in dieser Arbeit für eine Dosis von 30mg/kg intraperitoneal, um mögliche antihyperalgetische, neuroprotektive oder pro-regenerative Effekte von Topiramat zu evaluieren. Die Wahl einer niedrigeren Dosis erscheint angesichts der nur geringen zu beobachtenden Effekte wenig vielversprechend, ebenso die Wahl einer höheren Dosis in Anbetracht der bereits veröffentlichten Dosis-Findungs-Daten (Smith-Swintosky et al. 2001, Niebauer und Gruenthal 1999, Edmonds et al. 2001). Dennoch sind größere Effekte als die von uns beobachteten in höheren Dosierungen sicherlich nicht gänzlich auszuschließen.

### **4.6 Zur Zytokinregulation durch Topiramat**

Sicherlich überraschend war nach den nur moderaten Effekten, die wir bezüglich antihyperalgetischer, neuroprotektiver oder pro-regenerativer Wirkung von Topiramat erfassen konnten, dass es am Ort der Läsion unter Behandlung zu einer deutlichen Verschiebung des zellulären Zytokin-Milieus kommt. Wie oben bereits erläutert, kam es zu einer signifikanten Hochregulation insbesondere proinflammatorischer Zytokine (TNF-alpha, IL-1 beta). Nach peripherer Nervenläsion konnte gezeigt werden, dass es zu einer deutlichen Veränderung des zellulären Milieus kommt. Somit wird den Zytokinen in der Pathogenese des neuropathischen Schmerzes eine entscheidende Rolle zugesprochen, im Speziellen ist dies für TNF-alpha untersucht worden (siehe Einleitung). Bezüglich erfolgreicher neuronaler Regenerationsvorgänge konnte

gezeigt werden, dass unter anderem IL-1 beta (Stimulation der Expression von Nerve growth factor (NGF)) sowie IL-6 (geringe Konzentration verzögert neuronale Regeneration) diese beeinflussen, TNF-alpha jedoch in der Phase der Regeneration keine eminente Rolle zu spielen scheint (Zhong et al. 1999, Griffin et al. 1993, Liefner et al. 2000).

In der vorliegenden Arbeit fanden wir distal der Läsion unter Topiramatbehandlung eine deutlich erhöhte Expression von TNF-alpha mRNA 12 und 24 Stunden nach Crush. Die Expression von IL-1 beta war ebenfalls erhöht. Es ist also zu diskutieren, wie es (a) mechanistisch zur Ausschüttung dieser proinflammatorischen Zytokine durch Topiramat kommt und ob (b) die nur geringe Modulation neuropathischer Schmerzen in unserem Tiermodell sowie (c) die fehlende Beeinflussung neuronaler Regenerationsvorgänge hierdurch in Teilen erklärt werden können.

Neuere Studien machen zusätzlich zu den in der Einleitung bereits beschriebenen Mechanismen eine Wirkung von Topiramat auf den Glutamat-Rezeptor vom NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- Subtyp wahrscheinlich (Deutsch et al. 2002). Im Tiermodell zeigte sich hierbei, dass Topiramat die Wirkung von MK-801 als NMDA-Rezeptor-Antagonist in Teilen aufhebt. Daraus wurde eine indirekte oder direkte agonistische Wirkung von Topiramat am NMDA-Rezeptor geschlussfolgert. Es konnte zudem gezeigt werden, dass der NMDA-Rezeptor in erheblichem Maße an der Produktion proinflammatorischer Zytokine nach peripherer Nervenläsion beteiligt ist (Kleinschnitz et al. 2004). Eine Möglichkeit zur Erklärung der erhöhten Expression proinflammatorischer Zytokine durch Topiramatbehandlung wäre demnach diese agonistische NMDA-Rezeptor-Wirkung. Zum einen könnte dies indirekt über den Antagonismus am AMPA/Kainat-Rezeptor-Subtyp der Glutamatrezeptoren geschehen, zum anderen durch direkte agonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor. NMDA-Rezeptoren sind in einer ultrastrukturellen Studie zur Identifikation von NMDA-Rezeptoren am peripheren Nerven bereits lokalisiert worden (Coggeshall et al. 1998) und könnten somit durch lokale Wirkung von Topiramat zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine stimuliert werden.

Auch ist zu diskutieren, ob diese lokale Produktion proinflammatorischer Zytokine in Teilen erklären kann, warum die Modulation neuropathischer Schmerzen so gering wie beobachtet ausfällt. Da proinflammatorische Zytokine, wie bereits

ausreichend erläutert, zur Generierung neuropathischer Schmerzen in großem Anteil beitragen, könnte eine lokale Topiramat-vermittelte Ausschüttung insbesondere von TNF-alpha eine eher algetische Wirkung vermitteln. Über zentrale GABAerge Mechanismen könnte diese periphere algetische Wirkung in Teilen kompensiert werden, so dass es nur zu einer geringen, insgesamt aber zu unbefriedigenden Modulation neuropathischer Schmerzen unter Topiramat kommt. Dies würde sich decken mit den unbefriedigenden Ergebnissen bezüglich der Reduktion neuropathischen Schmerzerlebens bei schmerzhafter diabetischer Polyneuropathie in 3 Placebo-kontrollierten randomisierten Studien (Thienel et al. 2004). Hierin zeigte sich unter Topiramatbehandlung gegenüber Placebo keine signifikante Differenz der Schmerzreduktion.

#### **4.7 Neuroprotektion / Neuroregeneration im peripheren Nervensystem**

Trotz der weiter fortschreitenden Aufklärung der Pathomechanismen neurodegenerativer Vorgänge im peripheren Nervensystem sind die Mechanismen, die zur Neuroregeneration führen, in weiten Teilen noch nicht verstanden und erklärbar. Somit bleibt gerade eine pharmakologische Beeinflussung selbiger Vorgänge schwierig. Prinzipiell könnte die neuronale Regeneration im peripheren Nervensystem durch folgende Angriffspunkte verbessert und erleichtert werden: (a) Reduktion neuronaler Apoptosevorgänge, (b) schnelleres oder zahlreicheres Wachstum der vom proximalen Nervenstumpf aussprossenden Axone und (c) geringere Narbenbildung (Neurombildung). Zur pharmakologischen Beeinflussung der Neuroregeneration sind in den letzten Jahren nur wenige Arbeiten veröffentlicht worden. Neuroprotektive Eigenschaften wurden unter anderem für Melanocortin beschrieben (Ter Laak et al. 2003, Rogerio et al. 2002). Als Antioxidans und Inhibitor der neuronalen NO-Synthase (nNOS), dem eine wichtige Rolle bei der Induktion neuronaler Apoptosevorgänge zugesprochen wird, reduzierte es neuronalen Zelltod sowie mit nachfolgender Narbenbildung einhergehende Astrozytenhypertrophie. Die durch Cisplatin induzierte Neurotoxizität konnte in einem Tiermodell durch Behandlung mit humanem Nervenwachstumsfaktor (human nerve growth factor) in Teilen reduziert werden (Tredici et al. 1999). Erst kürzlich veröffentlichte Studien attribuieren exogen zugeführtem Erythropoetin, für welches im zentralen

Nervensystem bereits eine anti-apoptotische Wirkung gezeigt werden konnte, ebenfalls eine anti-apoptotische Wirkung im peripheren Nervensystem (Campana und Myers 2003). Insgesamt bleibt die pharmakologische Beeinflussung neuroregenerativer Vorgänge im peripheren Nervensystem aber eher enttäuschend. Sicherlich gilt es zunächst, in der Grundlagenforschung weiter die zellulären wie molekularen Mechanismen dieser Vorgänge zu erforschen, um dann gezielt in diese pharmakologisch eingreifen zu können.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

In der vorliegenden Arbeit wurde die antihyperalgetische, neuroprotektive sowie pro-regenerative Wirkung eines neueren Antiepileptikums, Topiramats, nach peripherer Nervenläsion im Rattenmodell untersucht. Hierbei wurden Sprague-Dawley Ratten zwei verschiedenen Nervenläsionsmodellen unterzogen: der chronisch konstriktiven Nervenläsion (CCI) sowie der kompressiven Läsion (Crush) nach de Koning. Im Anschluss an beide Läsionsmodelle kam es zu schmerz-assoziiertem Verhalten, welches im Ausmaß nach CCI bzw. Crush vergleichbar war, die Dauer insbesondere der Kälteallodynie sowie mechanischer Hyperalgesie waren nach Crush-Läsion kürzer als nach CCI.

*Topiramat zeigte*

- modulierende Wirkung auf die Entwicklung der mechanischen Hyperalgesie wie Kälteallodynie nach CCI, auf Hitzehyperalgesie wie Kälteallodynie nach Crush-Läsion. Diese Effekte jedoch waren nur gering ausgeprägt.
- keine neuroprotektive oder pro-regenerative Wirkung in den von uns verwendeten Läsionsmodellen
- eine ausgeprägte Modulation des zellulären Zytokinmilieus distal der Nervenläsion im Sinne insbesondere einer Hochregulation proinflammatorischer Zytokine (TNF-alpha, IL1-beta)

Aus diesen Resultaten kann geschlossen werden, dass die vermutete und vielversprechende Wirkung von Topiramats als neuroprotektives oder proregeneratives Agens nach peripherer Nervenläsion sicherlich kritischer betrachtet werden muss als es nach den zitierten Vorstudien zu erwarten war.

Sicherlich wäre eine Dosis-Findungs-Studie mit Untersuchung einzelner Parameter (mechanische Allodynie, Kaliberspektren der Myelinscheiden) wünschenswert, aufgrund der Vorstudien, die allesamt eine Wirksamkeit von Topiramats in einer Dosierung von 20mg/kg Körpergewicht beschrieben, erscheint dies jedoch wenig vielversprechend.

Sicherlich interessant und wünschenswert wäre eine weitere mechanistische Aufklärung der zytokinmodulierenden Wirkung von Topiramate. Der mögliche und oben besprochene Mechanismus durch einen Agonismus am NMDA-Rezeptor könnte durch eine Inhibitionsstudie mit dem NMDA-Antagonisten MK-801 weiter aufgeklärt werden.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Araki T, Milbrandt J (1996) Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron* 17: 353-361.

Attal N, Filliatreau G, Perrot S, Jazat F, Di Giamberardino L, Guilbaud G. (1994). Behavioural pain-related disorders and contribution of the saphenous nerve in crush and chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Pain*, 59(2):301-12.

Bennett GJ, Xie Y. (1988). A peripheral mono-neuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 33: 87-107.

Bischofs S, Zelenka M, Sommer C (2004) Evaluation of topiramate as an antihyperalgesic and neuroprotective agent in the peripheral nervous system. *J Periph Nerv Syst Jun*; 9 (2): 70-8.

Biton V, Montouris GD, Ritter F et al. (1999) A randomized, placebo-controlled study of topiramate in primary generalized tonic-clonic seizures: Topiramate YTC Study group. *Neurology* 52: 1330-7.

Bolin LM, Verity AN, Silver JE, Shooter EM, Abrams JS (1995) Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem* 64: 850-58.

Bourde O, Kiefer R, Toyka KV, Hartung HP (1996) Quantification of interleukin-6 mRNA in Wallerian degeneration by competitive reverse transcription polymerase chain reaction. *J Neuroimmunol* 69: 135-140.

Brück W (1997) The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol* 7: 741-752.

Carrol SL, Miller ML, Frohnert PW, Kim SS, Corbett JA (1997) Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during Wallerian degeneration. *J Neurosci* 17: 1642-1659.



Carroll DG, Kline KM, Malnar KF (2004) Role of topiramate for the treatment of painful diabetic peripheral neuropathy. *Pharmacotherapy* 24 Sep (9): 1186-93.

Cha BH, Silveira DC, Liu X, Hu Y, Holmes G (2002) Effect of topiramate following recurrent and prolonged seizures during early development. *Epilepsy Res* 51, 217-232.

Chen G, Goeddel D (2002) TNF-R1 Signaling: A Beautiful Pathway. *Science* 296, 1634-35.

Clatworthy AL, Illich PA, Castro GA, Walters ET (1995) Role of peri-axonal inflammation in the development of thermal hyperalgesia and guarding behavior in a rat model of neuropathic pain. *Neurosci. Lett.* 184: 5-8.

Cheng HL, Randolph A, Yee D, Delafontaine P, Tennekoon G, Feldman EL (1996) Characterization of insulin-like growth factor-I and its receptor and binding proteins in transected nerves and cultured Schwann cells. *J Neurochem* 66: 525-536.

Choi Y, Yoon YW, Na HS, Kim SH, Chung IM (1994) Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 59: 369-376.

Coderre TJ, Grimes RW, Melzack R. (1986). Deafferentiation and chronic pain in animals : an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain. *Pain*, 26: 61-84.

Coggeshall RE, Carlton SM (1998) Ultrastructural analysis of NMDA, AMPA, and kainite receptors on unmyelinated and myelinated axons in the periphery. *J Comp Neurology* 2; 391 (1): 78-86.

Deutsch SI, Rosse RB, Billingslea EN, Bellack AS, Mastropaolo J (2002) Topiramate antagonizes MK-801 in an animal model of schizophrenia. *Eur J of Pharmacology* 449: 121-125.

Deutsch SI, Schwartz BL, Rosse RB, Mastropaolo J, Marvel CL, Drapalski AL (2003) Adjuvant topiramate administration: a pharmacologic strategy for addressing NMDA Receptor Hypofunction in Schizophrenia. *Clin Neuropharmacology* 26 (4) 199-206.

Devor M, Janig W, Michaelis M (1994) Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *J Neurophysiol.* Jan;71(1):38-47.

Devor M. (1992). Autotomy sense and nonsense. Reply to L. Kruger. *Pain*, 49: 156.

Dodgson S, Shank R, Maryanoff B (2000) Topiramate as an inhibitor of carbonic anhydrase isoenzymes. *Epilepsia* 41 (suppl 1): S35-39.

Duhmke R, Cornblath D, Hollingshead J (2004) Tramadol for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev.*; 2:CD003726.

Edmonds HL, Jiang YD, Zhang PY, Shank R (2001) Topiramate as a neuroprotectant in a rat model of global ischemia-induces neurodegeneration. *Life Sci Sep* 28; 69 (19): 2265-77.

Fugleholm K, Schmalbruch H, Krarup C (1994) Early peripheral nerve regeneration after crushing, sectioning, and freeze studied by implanted electrodes in the cat. *J Neurosci* 14: 2659-2673.

Gardocki JF, Labinsky LS, Brown GL, Maryanoff BE (1986) Anticonvulsant activity of McN-4853 (M) 2,3:4,5-bis-O-(L-methyle-ethylidene)- $\beta$ -D-fructopyranose sulfamate in mice and rats. *Epilepsia* 27: 648-9.

George A, Buehl A, Sommer C (2004) Wallerian degeneration after crush injury of rat sciatic nerve increases endo- and epineurial tumor necrosis factor-alpha protein. *Neurosci Lett* 372 (3): 215-19.

George EB, Glass JD, Griffin JW (1995) Axotomy-induced axonal degeneration is mediated by calcium influx through ion-specific channels. *J Neurosci* 15.: 5445-6454.

Gibbs JW, Sombati S, DeLorenzo RJ (2000) Cellular actions of topiramate: blockade of kainite-evoked inward currents in cultured hippocampal neurons. *Epilepsia* 41(suppl 1): S10-6.

Gillen C, Korfhage C, Müller HW (1997) Gene expression in nerve regeneration. *Neuroscientist* 3: 112-122.

Gillen C, Jander S, Stoll G (1998) Sequential expression of mRNA for proinflammatory cytokines and interleukin-10 in the rat peripheral nervous system: comparison between immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration. *J Neurosci Res* 51: 489-496.

Gilron I, Boohar SL, Rowan JS, Max MB (2001) Topiramate in trigeminal neuralgia: a randomized, placebo-controlled multiple crossover pilot study. *Clin Neuropharmacology* 24: 109-112.

Heumann R, Korsching S, Bandtlow C, Thoenen H (1987) Changes of nerve growth factor synthesis in nonneuronal cells in response to sciatic nerve transection. *J Cell Biol* 104: 1623-1631.

Kleinschnitz C, Brinkhoff J, Zelenka M, Sommer C, Stoll G (2004) The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. *J Neuroimmunol.* Apr;149(1-2):77-83.

Kline KM, Carroll DG, Malnar KF (2003) Painful diabetic peripheral neuropathy relieved with use of oral topiramate. *South Med J* Jun; 96(6): 602-5.

Koh S, Jensen FE (2001) Topiramate blocks perinatal hypoxia-induced seizures in rat pups. *Ann Neurol* Sep; 50(3): 366-72.

Koltzenburg M (1998) Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol* 11: 515-521.

Koning de P, Brakkee JH, Gispen WH. (1986). Methods for producing a reproducible crush in the sciatic and tibial nerve of the rat and rapid and precise testing of return of sensory function. *Journal of the Neurological Sciences*, 74:237-246.

Kruger L. (1992) The non-sensory basis of autotomy in rats: a reply to the editorial by Devor and the article by Blumenkopf and Lipman. *Pain*, 49: 153-155.

Kuzniecky R, Hetherington H, Ho S (1998) Topiramate increases cerebral GABA in healthy human. *Neurology* 51: 627-9.

Lee SR, Kim SP, Kim JE (2000) Protective effect of topiramate against hippocampal neuronal damage after global ischemia in the gerbils. *Neurosc Lett* 281; 183-186.

Liefner M, Siebert H, Sachse T, Michel U, Kollias G, Brueck W (2000) The role of TNF-alpha during Wallerian degeneration. *J Neuroimm* 108: 147-152.

Lindenlaub T, Teuteberg P, Hartung T, Sommer C (2000) Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. *Brain Res* 866: 15-22.

Lindholm D, Heumann R, Meyer M, Thoenen H (1987) Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature* 330: 658-659.

Martini R, Schachner M (1988) Immunoelectron microscopic localization of neural cell adhesion molecules (L1, N-CAM) in regenerating adult mouse sciatic nerve. *J Cell Biol* 106: 1735-1746.

Max M (1995) Thirteen consecutive well designed randomised trials show that antidepressants reduce pain in diabetic polyneuropathy and postherpetic neuralgia. *Pain For* 4: 248-253.

McQuay H, Tramer M, Nye B (1996) A systematic review of antidepressants in neuropathic pain. *Pain* 68: 217-227.

Mystakidou K, Parpa E, Tsilika E, Mavromati A, Smyrniotis V, Georgaki S, Vlahos L (2003) Long-term management of noncancer pain with transdermal therapeutic system-fentanyl. *J Pain* Aug; 4(6): 298-306.

Naveilhan P, ElShamy WM, Ernfors P (1997) Differential regulation of mRNAs for GDNF and its receptors Ret and GDNFR alpha after sciatic nerve lesion in the mouse. *Eur J Neurosci* 9:1450-1460.

Niebauer M, Gruenthal M (1999) Topiramate reduces neuronal injury after experimental status epilepticus. *Brain Res* 837: 263-269.

Ongghena P, van Houdenhove B (1992) Antidepressant-induced analgesia in chronic non-malignant pain. *Pain* 49:205-220.

Poulsen CF, Simeone TA, Maar TE, Smith-Swintosky V, White HS, Schousboe A (2004) Modulation by topiramate of AMPA and kainate mediated calcium influx in cultured cerebral cortical, hippocampal and cerebellar neurons. *Neurochem Res.* Jan;29(1):275-82.

Ramon y Cajal (1991) Cajal's degeneration and regeneration of the nervous system. Translated by RM May. De Felipe J, Jones EG. Oxford University Press. London.

Randall LO, Selitto JJ. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1959;4:409-419.

Rigoulot MA, Boehrer A, Nehlig A (2003) Effects of Topiramate in two models of genetically determined generalized epilepsy, the GAERS and the audiogenic Wistar AS. *Epilepsia*, 44(1): 14-19.

Rodin BE, Kruger L. (1984) Deafferentiation in animals as a model for the study of pain: an alternative hypothesis. *Brain Research, Review* 7, 213-228.

Rogawski MA, Porter RJ (1990) Antiepileptic drugs: pharmacological mechanism and clinical efficacy with consideration of promising developmental stage compounds. *Pharmacol Rev* 42: 223-86.

Schäfers M, Brinkhoff J, Neukirchen S, Marziniak M, Sommer C (2001) Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. *Neurosci Lett* 310: 113-116.

Shadiack AM, Molino LJ, Yagel SK (1999). The Novel Anticonvulsant Topiramate is antiallodynic in a Rat model of neuropathic pain. *Analgesia* 4:173-179.

Shank RP, Gardocki JF, Vaught JL, Davis CB, Schupsky JJ, Raffa RB, Dodgson SJ, Nortey SO, Maryanoff BE (1994). Topiramate: preclinical evaluation of a structurally novel anticonvulsant. *Epilepsia* 35: 450-460.

Shank RP, Gardocki JF, Streeter AJ, Maryanoff BE (2000). An overview of the preclinical aspects of topiramate: pharmacology, pharmacokinetics, and mechanism of action. *Epilepsia (Suppl. 1)* S10-16.

Skradski S, White HS (2000) Topiramate blocks kainite-evoked cobalt influx into cultured neurons. *Epilepsia* 41(suppl 1): S45-7.

Smith-Swintosky VL, Zhao B, Shank RP, Plata-Salaman CR (2001). Topiramate promotes neurite outgrowth and recovery of function after nerve injury. *Neuroreport* 2001;12(5):1031-1034.

Sommer C, Lalonde A, Heckman HM, Rodriguez M, Myers RR (1995). Quantitative neuropathology of a focal nerve injury causing hyperalgesia. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:635-643.

Sommer C, Lindenlaub T, Teuteberg P, Schäfers M, Hartung T, Toyka KV (2001) Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain Res* 913: 86-89.

Stoll G, Griffin JW, Li CY, Trapp BD (1989) Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation. *J Neurocytol* 18:671-683.

Stoll G, Jung S, Jander S, van der Meide P, Hartung HP (1993) Tumor necrosis factor-alpha in degeneration and immune-mediated demyelination of the rat peripheral nervous system. *J Neuroimmunol* 45: 175-182.

Thienel U, Neto W, Schwabe SK, Vijapurkar U (2004) Topiramate in painful diabetic polyneuropathy: findings from three double-blind placebo-controlled trials. *Acta Neurol Scand* 110 (4): 221-31.

Vinik A, Pittenger G, Burcus N, Anderson S, Stansberry K, McNear E, et al. (2003) Topiramate improves in vitro and in vivo measures of nerve fiber loss in patients with diabetic neuropathy. *J Periph Nerv Syst* 8 (Suppl.1).

Wagner R, Janjigian M, Myers RR (1998) Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. *Pain* 74: 35-42.

Wagner R, Myers RR (1996) Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviours. *Neuroreport* Nov 25; 7 (18), 2897-901.

Wall PD, Devor M, Inbal R et al. (1979). Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anesthesia dolorosa. *Pain*, 7: 103-113.

Wall PD, Gutnick M (1974) Ongoing activity in peripheral nerves: the physiology and pharmacology of impulses originating from a neuroma. *Exp Neurol*. Jun;43(3):580-93.

Waller A (1850) Experiments on the section of the glossopharyngeal and hypoglossal nerves of the frog and observations of the alterations produced thereby in the structure of their primitive fibers. *Phil Trans R Soc Lond (Biol)* 140: 423-429.

Wells MR, Racis SP, Vaidya U (1992) Changes in plasma cytokines associated with peripheral nerve injury. *J Neuroimmunol* 39: 261-268.

Wessely P (2001) *Neuropathische Schmerzen: Symptomatik, Diagnostik, Therapiemöglichkeiten*. Springer Verlag.

White HS, Brown SD, Woodheas JH, et al. (2000) Topiramate modulates GABA-evoked currents in murine cortical neurons by a nonbenzodiazepine mechanism. *Epilepsia* 41(suppl 1): S17-20.

Wiener J, Jung CK, Shackel I, Williams PM (1999) Development and validation of real-time quantitative reverse-transcriptase – polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac monocytes in vitro. *Annal. Biochem.* 270: 41-49.

Wu SP, Tsai JJ, Gean PW (1998) Frequency-dependent inhibition of neuronal activity by topiramate in rat hippocampal slices. *Br J Pharmacol* 125: 826-32.

Zhang XL, Velumian AA, Jones OT (2000) Modulation of high-voltage-activated calcium channels in dentate granule cells by topiramate. *Epilepsia* 41(suppl 1): S35-9.

Zhong J, Dietzel ID, Wahle P (1999) Sensory impairments and delayed regeneration of sensory axons in interleukin-6-deficient mice. *J Neurosci* 19:4305-4313.

Zielasek J, Martini R, Toyka KV (1996) Functional abnormalities in P0-deficient mice resemble human hereditary neuropathies linked to P0 gene mutations. *Muscle Nerve*; 19(8):946-952.

Zona C, Ciotti MT, Avoli M (1997) Topiramate attenuates voltage-gated sodium currents in rat cerebellar granule cells. *Neurosci Lett* 231: 123-6.



## Danksagung

Besonderer Dank gilt den folgenden Personen, die allesamt zum erfolgreichen Abschluss meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

- Frau Professor Dr. Claudia Sommer für die perfekte und unermüdliche Betreuung, die zahlreichen Diskussionen und Ratschläge, die Möglichkeit der Präsentation meiner Ergebnisse auf dem Kongress der European Neurological Society 2004 in Barcelona sowie für die unendliche Geduld besonders in der Anfangsphase meiner Arbeit!
- Herrn Prof. Dr. Wolfgang Roggendorf für die Mühe und Bereitschaft, sich als Koreferent eingehend mit der Arbeit zu beschäftigen!
- Herrn Prof. Dr. K.V. Toyka sowie Herrn Prof. Dr. P. Rieckmann für die hervorragende technische Ausstattung der Labore sowie die Möglichkeit der Mitnutzung Geräte ihrer Arbeitsgruppen!
- Frau Lydia Biko, Frau Sonja Peetz, Frau Barbara Gado, Frau Barbara Dekant sowie Herrn Dr. med. Marek Zelenka für die Einführung in die Methodiken und Techniken, die Geduld beim Erklären sowie die herzliche Zusammenarbeit!
- meinen Eltern, meiner Schwester sowie meiner Freundin Sonja für ihre Geduld und Ausdauer!

## Lebenslauf

### Stefan Bischofs

Geburtsdatum: 2. April 1979

Geburtsort: Münster

---

### Ausbildung

1989-1998	Kardinal-von-Galen Gymnasium, Münster, <b>Abitur</b>
1999-2002	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
2001	<b>Ärztliche Vorprüfung</b>
2002	<b>Erstes Staatsexamen</b>
2002-2003	Studium der Humanmedizin an der Università degli Studi di Padova, Italien.
2003-2004	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
2004	<b>Zweites Staatsexamen</b>
2004-2005	1. Terial des Praktischen Jahres an der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg
2005	2. Terial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Chirurgie des Ospedale cantonale di Lugano, Schweiz.
	3. Terial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Innere Medizin, University of Rochester, NY, USA.
2005	<b>Drittes Staatsexamen</b>