

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anaesthesiologie
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. N. Roewer**

**Untersuchungen zu immunologischen Pathomechanismen
bei der Entstehung chronischer Schmerzsyndrome**

Inaugural – Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

**Michael Stock
aus Würzburg**

Würzburg, Januar 2009

Referent: Prof. Dr. med. G. Sprotte
Koreferent: Prof. Dr. med. M. Heckmann
Dekan: Prof. Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2009

Der Promovend ist Arzt

*Gewidmet
meiner Familie*

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1.	Einleitung	1
1.1	Schmerz: Definition und Einteilung	1
1.2	Die beiden favorisierten Hypothesen zur Pathogenese idiopathischer Schmerzsyndrome	3
1.3	Eine weitere Hypothese zur Pathogenese chronischer Schmerzen: Persistierende immunpathologische Prozesse	4
1.4	Untersuchte Schmerzsyndrome	5
1.4.1	Das komplexe regionale Schmerzsyndrom CRPS	5
1.4.1.1	Definition, Klassifikation und klinische Symptomatik	5
1.4.1.2	Epidemiologie	8
1.4.1.3	Ätiologie und Pathogenese	8
1.4.1.4	Therapie	9
1.4.1.5	Prognose	11
1.4.2	Das Fibromyalgiesyndrom FMS	11
1.4.2.1	Definition, Klassifikation und klinische Symptomatik	11
1.4.2.2	Epidemiologie	13
1.4.2.3	Ätiologie und Pathogenese	14
1.4.2.4	Therapie	14
1.4.2.5	Prognose	15
1.5	Rationale und Ziel der vorliegenden Arbeit	16
2.	Material und Methoden	17
2.1	Material und Methoden für das In-vivo-Experiment	17
2.1.1	Tiere, Tierhaltung und Apparate für die Verhaltensexperimente	17
2.1.2	Auswahl des Patienten für das Passive-Transfer-Experiment	18
2.1.3	Auswahl der Kontrollprobanden für das Passive-Transfer-Experiment	19
2.1.4	Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Serumproben	19
2.1.5	Durchführung des In-vivo-Experiments	20
2.1.5.1	Abgleichung und Zusammensetzung der Behandlungsgruppen; Injektionsschema, Zeitplan	20

2.1.5.2	Testung von allgemeinem, Spezies-spezifischem Verhalten	21
2.1.5.2.1	Open-Field-Test	21
2.1.5.2.2	Food-displacement-Test	22
2.1.6	Statistische Auswertung des In-vivo-Experiments	22
2.2	Material und Methoden für die immunhistochemischen Untersuchungen	23
2.2.1	Geräte	23
2.2.2	Chemikalien, Puffer, Lösungen, Antikörper	23
2.2.3	Anfertigung der Gewebepräparate für die immunhistochemischen Färbungen	24
2.2.4	Untersuchungskollektive	25
2.2.4.1	Patientenkollektiv	25
2.2.4.2	Kontrollkollektiv	25
2.2.5	Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Serumproben	25
2.2.6	Durchführung der indirekten immunhistochemischen Färbungen	25
2.2.7	Mikroskopische Untersuchung und Auswertung	26
2.2.8	Statistische Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen	27
3.	Ergebnisse	28
3.1	Ergebnisse aus dem In-vivo-Experiment	28
3.1.1	Allgemeiner Ablauf des Passive-Transfer-Experiments	28
3.1.2	Testung von allgemeinem Spezies-spezifischem Verhalten	28
3.1.2.1	Open-Field-Test	28
3.1.2.2	Food-displacement-Test	33
3.2	Ergebnisse aus den immunhistochemischen Untersuchungen	35
3.2.1	Charakterisierung des Patienten- und Kontrollkollektivs	35
3.2.1.1	Alters- und Geschlechtsverteilung von Patienten- und Kontrollkollektiv	35
3.2.1.2	Korrelation der biographischen Daten mit den Schmerzdiagnosen	37
3.2.2	Serologische Befunde: Statistischer Vergleich der Immunreaktivitäten von Patienten- und Kontrollseren in Abhängigkeit von Geschlecht und Schmerzdiagnose	38

3.2.2.1	Immunreaktivität gegen periphere Nerven	40
3.2.2.2	Immunreaktivität gegen Spinalganglien	41
3.2.2.3	Immunreaktivität gegen Strukturen des Großhirnparenchyms	42
3.2.2.4	Immunreaktivität gegen Strukturen des Rückenmarks	43
3.2.2.5	Immunreaktivität gegen quergestreifte Muskulatur	44
3.2.2.6	Immunreaktivität gegen Blutgefäße	45
4.	Diskussion	46
4.1	Methodik	46
4.1.1	Methodik des Passive-Transfer-Modells	46
4.1.1.1	Auswahl von Patienten- und Kontrollseren, Injektionsschema und Verhaltenstests	47
4.1.1.2	Befunde aus den tierexperimentellen Untersuchungen und deren Aussagekraft	48
4.1.2	Methodik der immunhistochemischen Detektion von Autoantikörpern mittels indirekter Immunhistochemie; Aussagekraft und Anwendung in der experimentellen und klinischen Diagnostik	51
4.1.2.1	Charakterisierung des Patienten- und Kontrollkollektivs	53
4.1.2.1.1	Modus der Rekrutierung, Alters- und Geschlechtsgruppierung	53
4.1.2.1.2	Alters- und Geschlechtsverteilung in Haupt- und Untergruppen der Diagnosen	53
4.1.2.2	Serologische Befunde, Aussagekraft und Bewertungsmodus	53
4.1.2.3	Korrelation der Befunde des Patientenkollektivs mit den verschiedenen klinischen Schmerzdiagnosen	54
4.1.2.4	Korrelation der Befunde beider Kollektive mit dem Geschlecht	55
4.2	Diskussion über mögliche ätiopathologische Mechanismen bei der Entstehung chronischer idiopathischer Schmerzsyndrome unter Einbeziehung der vorliegenden Daten	55
5.	Zusammenfassung	57
6.	Literaturverzeichnis	58

Abkürzungen

5-HT ₃	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor Typ 3	Med.	Median
°C	Grad Celsius	Min.	Minimum
AEC	3-Amino-9-Ethylcarbazol	µl	Mikroliter
ANA	antinukleäre Antikörper	µm	Mikrogramm
APTES	3-Aminopropyltriethoxysilan	ml	Milliliter
cm	Zentimeter	MW	Mittelwert
cm ²	Quadratzentimeter	NaAc	Natriumacetat
CIDP	chronische inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie	NaCl	Natriumchlorid
CRPS	komplexes regionales Schmerzsyndrom (engl. complex regional pain syndrome)	Nr.	Nummer
CWP	chronic widespread pain	NRS	numerische Rangskala
dH ₂ O	destilliertes Wasser	NSAR	nicht steroidales Antirheumatikum
DMF	Dimethylformamid	PBS	Phosphatpuffer (engl. phosphate-buffered saline)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	PNS	peripheres Nervensystem
engl.	englisch	RIA	Radioimmune Assay
ETS	European Treaty Series	SEM	Standardfehler (engl. standard error of the mean)
FBS	fötales bovines Serum	Stabw.	Standardabweichung
FMS	Fibromyalgiesyndrom	weibl.	weiblich
g	Gramm, Erdbeschleunigung	TNF	Tumornekrosefaktor
GLOA	ganglionäre lokale Opioidanalgesie	TPO	Thyreoperoxidase
h	Stunde	UK	Vereinigtes Königreich (engl. United Kingdom)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxyd	USA	Vereinigte Staaten von Amerika (engl. United States of America)
IASP	International Association for the Study of Pain (Internationale Gesellschaft zum Studium des Schmerzes)	v/v	Volumen in Volumen
Ig	Immunglobulin	ZNS	zentrales Nervensystem
IQB	Interquartilenbereich		
IVIg	intravenöse Immunglobuline		
IVRSB	intravenöse regionale Sympathikusblockade		
kD	Kilodalton		
kg	Kilogramm		
M	Molar		
M.	Musculus		
männl.	männlich		
Max.	Maximum		

Signifikanzniveaus

*	P<0,05 („signifikant“)
**	P<0,01 („hochsignifikant“)
***	P<0,001 („höchstsignifikant“)

1. Einleitung

1.1 Schmerz: Definition und Einteilung

Gemäß der Definition der Internationalen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (International Association for the Study of Pain, IASP)¹ ist Schmerz „[...] ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verbunden ist oder mit Begriffen einer solchen umschrieben wird“. Schmerzen werden in der Literatur unter verschiedenen Gesichtspunkten eingeteilt, z. B. anhand der Dauer, der Lokalisation oder dem Charakter.

Eine Unterteilung der klinisch bedeutsamen Schmerzphänomene geschieht in der klinischen Praxis in erster Linie unter dem Gesichtspunkt der Ätiologie, nämlich Schmerz als Symptom einer bekannten Pathologie (Trauma, Infektion, Tumor, Psychose und andere) und Schmerz, dessen Ätiologie trotz eingehender Diagnostik weitgehend ungeklärt bleibt. In zweiter Linie wird nach dem Gesichtspunkt der Topographie der Schmerzsymptomatik unterteilt, dazu gehören Körperregion (z. B. Kopfschmerz) und betroffenes Organsystem (z. B. Bewegungsapparat, Nervensystem, Viszera) oder Gewebe (z. B. Muskel, Knochen, peripherer Nerv). In dritter Linie wird bei allen Schmerzsymptomen auch nach dem Zeitverlauf eingeteilt, d. h. in „akut“, „chronisch“ und „episodisch“.

Schmerz als Symptom einer Lokalpathologie wird in der Regel als „Nozizeptorschmerz“ definiert, wenn eine Plausibilität hinsichtlich Ausmaß, Charakteristik und Dauer der Schmerzen durch eine bestehende Gewebeschädigung gegeben ist und er daher durch die Erregung von Gewebсноzizeptoren generiert wird. Solche Schmerzen haben eine physiologische Schutz- und Warnfunktion, führen zu einer Diagnose, einer Kausaltherapie oder einer zuverlässigen Symptomkontrolle mit bewährten Konzepten der Schmerztherapie (z. B. bei inkurablen Tumorleiden).

Dem gegenüber stehen Schmerzen, die durch Verletzung, Entzündung, Kompression oder andere schädigende Einflüsse an Nerven entstehen, bei denen eine Erregung peripherer nozizeptiver Nervenendigungen nicht erforderlich ist, es bestehen dann definitionsgemäß neuropathische Schmerzen.

Eine weitere begriffliche Abgrenzung zum Nozizeptorschmerz wird gegenüber Schmerzen vorgenommen, die nicht auf eine erkennbare adäquate Noxe zurückzuführen sind und damit überwiegend in einer Dysfunktion des zentralen oder peripheren Nervensys-

tems begründet sein müssen. Diese Schmerzen sind wie die meisten neuropathischen Schmerzen auch durch ein überwiegend anderes pharmakologisches Ansprechverhalten charakterisiert, als die bekannten Formen des Nozizeptorschmerzes, wobei ein nicht unerheblicher Teil dieser Schmerzsyndrome mit den zur Schmerztherapie zugelassenen Pharmaka gar nicht oder völlig unzureichend beeinflussbar ist.

Solche, im eigentlichen Sinne pathologische Schmerzen können alle Organsysteme betreffen, d. h. alle Strukturen des Bewegungsapparats sowie Haut, Viszera und peripheres Nervensystem.

Im Rahmen chronifizierter Schmerzsyndrome bilden multilokuläre und mehrere Organsysteme betreffende Schmerzen eine wesentliche Grundlage für die Stadieneinteilung der Chronifizierung.

Das Fehlen einer beweisbaren Ätiologie oder Pathogenese begründete die Bezeichnung solcher Schmerzsyndrome als „idiopathisch“ oder „somatoform“.

Bei einem Teil der chronischen Schmerzsyndrome lässt sich wenigstens ein auslösendes Trauma im Sinne einer regelhaften pathologischen Initialzündung definieren, so z. B. bei den posttraumatischen Schmerzsyndromen, zu denen das Komplexe regionale Schmerzsyndrom (CRPS, engl. complex regional pain syndrome), der Stumpf-, der Neurom- und der Phantomschmerz gerechnet werden.

Bei einem anderen Teil treten die Schmerzen nach Infektionen auf. In erster Linie ist hier der Herpes Zoster zu nennen, der eine besonders hohe Prävalenz für die Initiierung chronischer Schmerzen aufweist.

Für das schicksalhafte und nicht vorhersehbare Fortbestehen der Schmerzen nach den auslösenden Traumen und Infektionen fehlen jedoch wie bei den klassischen idiopathischen Schmerzsyndromen elementare Bausteine einer pathobiologischen Begründung.

Die hinlänglich bekannte, häufige Komorbidität muskuloskeletaler, viszeraler und neuropathischer Schmerzen sowie von Schmerzen spontaner, posttraumatischer und postinfektiöser Genese lässt vermuten, dass nicht nur psychosoziale, sondern auch entscheidende pathobiologische Faktoren unter den unterschiedlich klassifizierten chronischen Schmerzsyndromen Gemeinsamkeiten aufweisen.

Chronische und episodische, darunter auch die meisten neuropathischen Schmerzsyndrome, können mangels pathogenetischer oder ätiologischer Merkmale keiner Diagnose im engeren Sinne zugeführt werden. Sie sind phänotypisch definierte Krankheitsbilder,

die nach ihren klinischen Merkmalen klassifiziert werden. Das umfassendste Klassifikationssystem für chronische Schmerzen wurde von der IASP erstellt, es differenziert etwa 300 Schmerzsyndrome². Darüber hinaus bestehen weitere Klassifikationssysteme innerhalb verschiedener klinischer Fachgesellschaften, die sich z. B. um Teilbereiche chronischer Schmerzen etabliert haben, so die internationale Myopain-Gesellschaft für Schmerzen des Bewegungsapparats und die internationale Kopfschmerzgesellschaft für Kopf- und Gesichtsschmerzen.

1.2 Die beiden favorisierten Hypothesen zur Pathogenese idiopathischer Schmerzsyndrome

Die favorisierte biologische Hypothese der Schmerzchronifizierung postuliert eine fehlerhafte oder inadäquate Verarbeitung nozizeptiver oder neuropathischer Informationsreize im zentralen Nervensystem. Dabei sollen periphere nozizeptive Reize zu irreversiblen, neuroplastischen Veränderungen im Bereich zentraler Neurone führen, um über Formen der kortikalen Neustrukturierung und Phänomene der Konditionierung die Prägung eines pathologischen Schmerzgedächtnisses entstehen zu lassen³.

In der Anamnese vieler Patienten mit chronischen Schmerzsyndromen lassen sich keine nozizeptiven Ereignisse rekonstruieren, die als Initialzündung für eine solche zentrale Fehlverarbeitung herangezogen werden könnten. Vielmehr beginnen die meisten chronischen Schmerzen spontan, verlaufen zunächst episodisch mit regionaler Betonung und münden dann zum Teil in polytope Ausbreitung und polymorpher Phänomenologie in ein chronisches Schmerzsyndrom. Polymorphie bedeutet in Zusammenhang mit chronischen Schmerzen, dass muskuloskeletale, neuropathische und viszerale Schmerzphänomene kombiniert auftreten. Ein typischer Symptomenkomplex mit polytopen und polymorphen Schmerzen wird als Fibromyalgiesyndrom (FMS) klassifiziert. Da bei weitem nicht alle polytopen und polymorphen Schmerzsyndrome die Klassifikationskriterien des FMS erfüllen, wird zur Vermeidung eines Klassifikationsbias für wissenschaftliche Studien auch vielfach der Oberbegriff „Chronic Widespread Pain Syndrome“ (CWP) verwendet^{4,5}.

Die favorisierte Hypothese zur Psychopathogenese chronischer Schmerzen sieht die Chronifizierung als fehlgeleiteten psychosomatischen Lernprozess im Sinne einer somatoformen Störung. Andere Hypothesen zur Psychogenese chronischer Schmerzen stüt-

zen sich auf Vergleiche zur Pathogenese der Konversionsneurosen oder dissoziativen Störungen⁶. Da psychosomatische Lernprozesse nur im Kontext mit prägenden sozialen Bedingungen zu verstehen sind, werden die bestehenden Hypothesen zu Chronifizierung von Schmerzen in einem „Bio-Psycho-Sozialen Modell“ zusammengefasst⁷.

Während in diesem Modell die psychosozialen Störungen betroffener Patienten einer standardisierten Diagnostik und individuellen Therapie zugänglich sind, ergibt sich aus dem biologischen Anteil der Hypothese, zumindest aus der postulierten neuroplastischen Veränderung in der zentralen Schmerzbahn, keine wegweisende therapeutische Konsequenz. Das unübersehbare Qualitätsdefizit bei der Behandlung chronischer Schmerzsyndrome scheint ganz wesentlich durch die Defizite im biologischen Verständnis der Schmerzursachen begründet zu sein.

1.3 Eine weitere Hypothese zur Pathogenese chronischer Schmerzen: Persistierende immunpathologische Prozesse

In den letzten Jahren wurden mehr und mehr klinische und experimentelle Daten publiziert, die Hinweise auf immunpathologische Mechanismen bei der Entstehung und Chronifizierung von Schmerzsyndromen erkennen lassen⁸⁻²⁶. So zeigten vergleichende proteinbiochemische Analysen von Serum und Liquor zwischen Proben von chronischen Schmerzpatienten und gesunden Kontrollprobanden deutliche Unterschiede beim quantitativen Nachweis von Zytokinen und Chemokinen. Diese Befunde weisen auf Fehlregulationen im Immunsystem hin. Zudem geht aus tierexperimentellen Befunden hervor, dass solche Fehlregulationen eine pathogenetische Rolle in der Entstehung chronischer Schmerzzustände haben könnten.

Bei mehreren, verschiedenartigen Schmerzsyndromen konnte gezeigt werden, dass Infektionen mit bakteriellen oder viralen Erregern vorausgingen²⁷⁻²⁹. Ein denkbarer pathophysiologischer Mechanismus wäre eine fehlgesteuerte Immunreaktion im Sinne eines „molekularen Mimikry“, wie sie beispielsweise auch beim Guillain-Barré-Syndrom als ursächlich vermutet wird³⁰. Hierbei soll es zu einer Kreuzreaktion kommen, bei der die durch die Infektion gegen den Erreger gebildeten Antikörper mit körpereigenen Strukturen interagieren und somit eine autoimmune Entzündungsreaktion vom Typ II nach Coombs und Gell³¹ induzieren. Ein gewisser Prozentsatz von Patienten mit chronischen, idiopathischen Schmerzen zeigt eine Diathese zur Produktion von Autoantikör-

pern, wie z. B. gegen nukleäre Antigene (ANA), Schilddrüsenantigene (anti-TPO) und andere (unpublizierte Beobachtungen), obwohl diese Befunde oft nicht zur Diagnosestellung der entsprechenden Autoimmunerkrankung ausreichend sind. Zudem zeigt eine Subgruppe von chronischen Schmerzpatienten unabhängig vom klinischen Phänotyp der Schmerzerkrankung nachhaltige therapeutische Effekte auf alle Symptome der Gesundheitsstörung durch intravenöse polyvalente Immunglobuline (IVIg)^{32, 33}, welche ebenfalls erfolgreich bei anderen Autoimmunerkrankungen, wie z. B. dem Guillain-Barré-Syndrom, der Myasthenia gravis, diversen autoimmunen Muskelerkrankungen oder der idiopathischen thrombozytopenischen Purpura eingesetzt werden^{30, 34-39}.

1.4 Untersuchte Schmerzsyndrome

1.4.1 Das komplexe regionale Schmerzsyndrom CRPS

1.4.1.1 Definition, Klassifikation und klinische Symptomatik

Das CRPS gehört per definitionem zu den posttraumatischen Schmerzsyndromen. Die noch immer weitläufig synonym verwendeten Bezeichnungen Morbus Sudeck, Sympathische Reflexdystrophie, Sudeck-Dystrophie, Kausalgie und Algodystrophie wurden nach einem Konsensus-Workshop durch den übergeordneten Terminus CRPS ersetzt⁴⁰. Heute wird zwischen CRPS Typ I und Typ II unterschieden, wobei bei Typ II eine Nervenverletzung vorliegt, nicht jedoch bei Typ I. In ihrer klinischen Ausprägung unterscheiden sich die beiden Subtypen jedoch kaum.

Ein eindeutiger diagnostischer Test existiert nicht, so ergibt sich die Diagnose meist aus der entsprechenden klinischen Präsentation. Gemäß Klassifikation der IASP⁴⁰, bei welcher ganz bewusst keine Parameter aus der apparativen Diagnostik in die Kriterien aufgenommen wurden, um den Charakter einer Klassifikation beizubehalten, müssen folgende Kriterien erfüllt sein: permanenter, vorwiegend als brennend empfundener Schmerz, der überproportional stark zum auslösenden Trauma empfunden wird, bei zusätzlich bestehender Hyperalgesie und Allodynie der Haut auf mechanische Reize. Der Schmerz ist nicht auf das Versorgungsgebiet eines Nerven begrenzt, es treten Ödeme, Störung der Durchblutung und der Schweißsekretion auf. Weiterhin müssen andere Erkrankungen ausgeschlossen werden, die das Ausmaß der Symptomatik ursächlich erklären würden, wie z. B. akutes entzündliches Geschehen, Thrombose, Lymphabflussstörungen und andere.

Auch andere sensorische Minus- und Plus Symptome, wie Kribbelparästhesien, Dys- bzw. Hypästhesien sowie Störung der Thermästhesie werden beobachtet. Zudem treten motorische Störungen im Sinne von Kraftverlust, seltener auch von Dystonie, Kontraktur, Tremor oder Myoklonien auf. Bei einigen Patienten entsteht ein sog. Neglect-Phänomen, eine Wahrnehmungsstörung, die durch die Missachtung von Reizen des betroffenen Areals gekennzeichnet ist. Die Patienten nehmen dieses deutlich vermindert oder überhaupt nicht mehr wahr und sehen die Extremität oft nicht mehr ihrem eigenen Körper zugehörig. Haar- und Nagelwachstum sind häufig verändert, zudem auch der Metabolismus von Knochen- und Muskelgewebe, was zur Entstehung einer Atrophie führen kann, die oft mit starker Bewegungs- und Funktionseinschränkung einhergeht. Hochlagerung der betroffenen Extremität lindert die Schmerzen meist, während das Herabhängen entsprechend zu Schmerzverstärkung führt. Dies resultiert aus den lageabhängig unterschiedlichen hydrostatischen Drücken auf die dicht innervierten Blutgefäße. Bei dem daraus abgeleiteten, von *Blumberg*⁴¹ eingeführten Ischämietest führt eine suprasystolische Kompression der betroffenen Extremität proximal der Läsion bei einem Teil der Patienten mit CRPS Typ I zur Beseitigung des Ruheschmerzes. In den Abbildungen 1 und 2 sind Beispiele für betroffene Extremitäten aufgezeigt.

Der Verlauf der Erkrankung ist interindividuell stark unterschiedlich. Die Symptome sind anfangs oft nicht von denen durch das initiale Trauma hervorgerufenen abzugrenzen und breiten sich regelhaft weit über das ursprünglich geschädigte Areal aus.

Die Klassifikation dieses Schmerzsyndroms ist im Wesentlichen auf Symptomenkomplexe der distalen Extremitäten beschränkt, auch wenn vergleichbare Symptome im Gesicht und am Rumpf bekannt sind. Sehr häufig erfolgt eine Wanderung bzw. Ausbreitung der Symptome auf angrenzende Gebiete. Fibromyalgiesyndrom und CRPS, wie auch andere chronische idiopathische Schmerzsyndrome, sind überzufällig häufig miteinander vergesellschaftet. So haben Patienten mit bereits bestehenden idiopathischen Schmerzen erfahrungsgemäß ein erhöhtes Risiko, ein CRPS zu entwickeln. Umgekehrt breitet sich die Symptomatik des CRPS nicht selten auf andere Areale aus⁴² und geht in ein polytopes, polymorphes Schmerzsyndrom über.

Die Symptomatik beinhaltet zusammenfassend persistierende, starke Schmerzen, trophische und autonome Störungen, sensorische Minus- und Plus-Symptome (Hypästhesie und Allodynie), Funktionseinschränkungen der Willkürmotorik und häufig

Tremor. Die vorausgegangenen Traumata sind häufig distale Radiusfrakturen oder chirurgische Eingriffe, wie beispielsweise die operative Versorgung eines Karpaltunnelsyndroms oder einer Dupuytren'schen Kontraktur.



Abbildungen 1 und 2 (aus dem Bildarchiv des Schmerzzentrums, mit Genehmigung von Prof. Sprotte) zeigen zwei Beispiele komplexer regionaler Schmerzsyndrome:

Es sind deutlich Schwellung, livide Verfärbung und in Falle der rechten Hand auch das Auftreten von trophischen Veränderungen der Nägel und einer sog. Glanzhaut zu erkennen.

Das Beispiel an der linken unteren Extremität zeigt auch die weit nach proximal reichende Ausdehnung sichtbarer Veränderungen im Seitenvergleich.

1.4.1.2 Epidemiologie

Aufgrund der Unschärfe, die mit jeder auf klinischen Merkmalen basierten Klassifikation verbunden ist und der verschiedenartigen klinischen Ausprägung muss davon ausgegangen werden, dass das CRPS unterdiagnostiziert ist. Die Inzidenz beträgt etwa 0,5 pro 100000 Einwohner.⁴³⁻⁴⁶ Frauen sind etwa dreimal so häufig betroffen wie Männer. Der Altersgipfel des Erkrankungsbeginns liegt zwischen 30 und 50 Jahren.

1.4.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Ätiologie und Pathogenese des CRPS sind nach wie vor ungeklärt. Sowohl der lokale als auch der zentrale Anteil der neuronalen Reaktion auf ein Gewebetrauma erscheint beim CRPS bezüglich Intensität, Dauer und topographischer Ausbreitung überdimensioniert zu sein. Die mit der Gewebeschädigung initiierte neurogene Entzündung überschreitet die anatomischen Grenzen der peripheren Innervation und korreliert nicht quantitativ mit dem Ausmaß des auslösenden Gewebeschadens. Obwohl der Symptomenkomplex des CRPS weitgehend unabhängig vom Ausmaß des Gewebeschadens auftritt, setzt die Verletzung biologische Bedingungen, die offensichtlich für das Entstehen der komplexen Pathologie entscheidend sind. Möglicherweise ist es die mit dem peripheren Trauma bzw. die dadurch entstandenen Schmerzreize verbundene Störung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke im Bereich der Eintrittszone der betroffenen nozizeptiven Neurone im Rückenmark, die für die Initiierung einer spinalen Immunpathologie verantwortlich gemacht wird⁴⁷⁻⁵⁰.

Die zumindest beim frischen CRPS Typ I im Vordergrund der klinischen Symptome sichtbare Entzündungsreaktion im Bereich der betroffenen distalen Extremität (Schwellung, Rötung, Überwärmung, Schmerz) wird als dominant neurogenen Ursprungs angesehen^{45, 51-54}. Nozizeptive Neurone setzen mit der Aktivierung von Aktionspotentialen antidrom und orthodrom Neuropeptide (Substanz P, CGRP und andere) frei. Diese verursachen peripher (antidrom) die neurogene Entzündung und beeinflussen vermutlich zentral (orthodrom), in Kombination mit der Aktivierung von Astroglia und der damit verbundenen Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, die Funktion der Blut-Hirn-Schranke^{47, 48}. Dieses physiologische Grundmuster der neurogenen Entzündung scheint beim CRPS quantitativ und temporal unkontrolliert abzulaufen.

Die mit dem Symptomenkomplex assoziierten autonomen Störungen im Sinne von Störungen der Vasomotorik und Sudomotorik entsprechen einer lokalen sympathischen Dysregulation. In tierexperimentellen Modellen mit peripheren Nervenverletzungen konnten Phänomene beschrieben werden, die eine sympathisch-sensorische Kopplung zwischen Grenzstrangganglien und Spinalganglien erklären könnten (Einsprossung sympathischer Fasern in Spinalganglien). Diese Befunde sollten das Phänomen des „sympathisch unterhaltenen Schmerzes“ erklären^{55, 56}. Beim CRPS wurden auch mit Hilfe der funktionellen Magnetresonanztomographie Befunde erhoben, die Phänomene der kortikalen Reorganisation erkennen lassen, d. h., dass sich ein Teil der zentralnervösen Pathologie des CRPS auch durch neuroplastische Veränderungen manifestiert. Diese Befunde stützen die Hypothese der Chronifizierung durch ein pathologisches „Schmerzgedächtnis“⁵⁷⁻⁵⁹. Es lassen sich beim CRPS zudem Hinweise auf eine genetische Disposition finden⁶⁰.

1.4.1.4 Therapie

Die therapeutischen Ansätze des CRPS basieren im Wesentlichen auf empirisch gewonnenen Erkenntnissen. Nur die schweren und fortgeschrittenen Verläufe dieses Symptomenkomplexes sind zweifelsfrei zu klassifizieren, sind aber auch therapeutisch kaum beeinflussbar⁶¹. Es bestehen pharmakologische, interventionelle, physio- und ergotherapeutische Ansätze, die in multidisziplinär organisierten Schmerzzentren in der Regel mit psychotherapeutischer Begleitung zur Anwendung kommen. Die wenigen randomisierten kontrollierten Studien, die zur Pharmakotherapie des CRPS durchgeführt wurden, haben nur schwache Evidenzen einer Wirksamkeit für wenige Therapieansätze aufzeigen können.

Von allen Pharmaka, deren Effektivität zur Behandlung des CRPS je in Studien überprüft wurde, konnten Bisphosphonate die beste Datenlage erzielen^{62, 63}. In der klinischen Praxis werden unter der Annahme, dass es sich beim CRPS um ein neuropathisches Schmerzsyndrom handelt, alle Pharmaka eingesetzt, die auch bei anderen neuropathischen Schmerzsyndromen zur Anwendung kommen, vor allem trizyklische Antidepressiva und Antikonvulsiva. Die Wirksamkeit einer Cortisontherapie ist nur in einer randomisierten Studie mit schwacher Evidenz belegt⁶⁴. Für die Wirksamkeit anderer Formen einer Immuntherapie gibt es nur anekdotische Hinweise, so z. B. für Thalido-

mid⁶⁵ und andere TNF-alpha blockierende Substanzen⁶⁶. Die systemische Anwendung von Ganglienblockern, wie die intravenöse Infusion von Phentolamin und die orale Gabe von Phenoxybezamin wurde vor allem in den USA praktiziert, eine Wirksamkeit konnte aber in randomisierten Studien für diese Therapien nicht belegt werden⁶¹.

Bei den interventionellen Therapiemethoden kommen Leitungsanästhesien, vor allem die Plexus-brachialis-Blockade, die Blockade sympathischer Ganglien, die ganglionäre lokale Opioidanalgesie (GLOA)^{67, 68}, intravenöse regionale Sympathikusblockaden mit Guanethidin (IVRSB)⁶⁹ und die elektrische Hinterhornstimulation durch epidural implantierte Reizelektroden zur Anwendung (engl. spinal cord stimulation, SCS).

Die insgesamt enttäuschenden Therapieergebnisse sowie die schlechte Studienlage für die wenigen wirksamen Therapieansätze lassen erkennen, dass die klinische Symptomatik des CRPS nur eine phänotypische Homogenität herstellen lässt. Unter pathogenetischen Gesichtspunkten erscheint das CRPS jedoch keinesfalls als eine homogene Krankheitsentität.

Die Arbeitshypothese, dass die Pathogenese chronischer Schmerzsyndrome auf der Grundlage persistierender immunpathologischer Prozesse beruhen könnte, führte auch beim CRPS zu Therapieversuchen mit intravenösen Immunglobulinen. Die beobachteten positiven Therapieeffekte betrafen unter verschiedenen Qualitätskriterien 20-40% der behandelten Patienten, waren zwar meistens von begrenzter Dauer aber auch im Rahmen einer Intervalltherapie über Jahre reproduzierbar und führten teilweise auch zur vollständigen Wiederherstellung der körperlichen Funktionen³³.

In einer randomisierten kontrollierten Studie mit Crossover Design wurde inzwischen auch die Wirksamkeit dieser Therapie statistisch belegt (*Goebel A. et al.*, Liverpool, UK; Publikation der Studie in Vorbereitung).

Physiotherapie, Ergotherapie, Gesundheitsedukation, Verhaltenstherapie und das Erlernen von Bewältigungsstrategien sind bei Patienten mit CRPS supportive Maßnahmen, die in hohem Maße individuell auf die bestehenden Defizite der Patienten abgestimmt werden und in der Regel erst dann tragend zum Einsatz kommen, wenn die Ruheschmerzen unter Kontrolle sind.

1.4.1.5 Prognose

Eine generelle Aussage über die Prognose des CRPS ist weder anhand der Art, der Schwere oder der Lokalisation des auslösenden Traumas, noch anhand anderer Faktoren möglich. Die klinischen Verläufe reichen von spontaner Remission bis hin zur vollständigen Unbrauchbarkeit der betroffenen Extremität, der Ausbreitung der Symptomatik auf andere Bereiche und der Ausprägung eines persistierenden, generalisierten Ganzkörperschmerzsyndroms.

1.4.2 Das Fibromyalgiesyndrom FMS

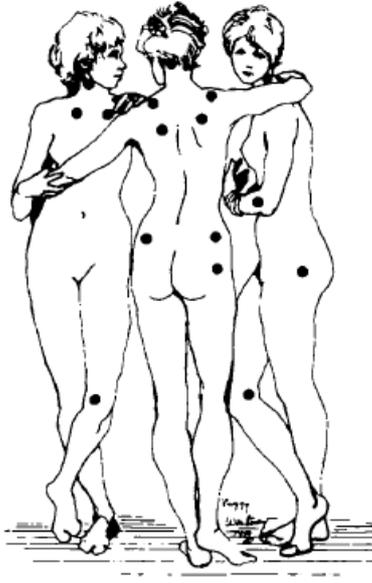
1.4.2.1 Definition, Klassifikation und klinische Symptomatik

Das FMS ist gemäß der Kategorisierung nach *Leiber*⁷⁰ ein klassifiziertes Syndrom erster Ordnung, es wird ausschließlich nach den Kriterien der Schmerzsymptomatik klassifiziert, obwohl die Patienten in der Regel gleichzeitig unter vielfältigen anderen Krankheitssymptomen leiden. Wegen der vorwiegend den Bewegungsapparat betreffenden generalisierten Ruhe- und Belastungsschmerzen⁷¹ wird das Syndrom überwiegend dem Rheumatischen Formenkreis zugeordnet, obwohl die Schmerzen nicht auf entzündliche Prozesse in den betroffenen Geweben zurückgeführt werden können.

Die unautorisierte Einführung des FMS als klinische Diagnose wird kontrovers diskutiert. Die interdisziplinär organisierte Festlegung und durch die amerikanische Rheumatologengesellschaft autorisierte Einführung der Klassifikationskriterien durch *Wolfe et al.*⁷² war allein zum Zwecke der klinischen Forschung geschehen. Studien mit möglichst homogenen klinischen Eingangskriterien sollten es ermöglichen, diagnostische Parameter zu ermitteln, die den klinischen Phänotyp zu einer Diagnose mit Pathogenese und Mechanismus-basierten Therapieansätzen führen sollten. Eine einfache Umformulierung der Klassifikations- zu Diagnosekriterien war nicht vorgesehen.

Klassifikationskriterien des American College of Rheumatology⁷² sind generalisierter, weit verbreiteter Schmerz an drei oder mehr Körperregionen von mindestens drei Monaten Dauer mit reproduzierbarer Überempfindlichkeit und Schmerzhaftigkeit bei einer Druckbelastung von 4 kg/cm² an 11 von 18 vorgegebenen, jeweils symmetrisch an beiden Körperhälften definierten Druckpunkten, den sog. „Tender Points“. Eine Übersicht über die Verteilung dieser Druckpunkte gibt Abbildung 3. Selbst der bei der Erstellung dieser Kriterien federführende Autor, *Wolfe*, rief jedoch unlängst die Fachwelt dazu auf,

diese Kriterien kritisch zu hinterfragen und nicht länger in der klinischen Praxis als Diagnosekriterien zu missbrauchen⁷³.



- Hals: vorderer Intertransversalspalt auf Höhe der Halswirbel C5-7
- zweite Rippe, Knorpel-Knochengrenze
- zwei Zentimeter distal des lateralen Epicondylus humeri
- Knie: proximal des medialen Gelenkspaltes
- M. splenius capitis: subokzipitale Muskelansätze
- M. Trapezius: freier, oberer Rand
- M. Supraspinatus: oberhalb der Mitte der Spina scapulae
- gluteal: oberer, äußerer Quadrant
- dorsal der Spitze des Trochanter major

Abbildung 3: „Tenderpoints“ beim Fibromyalgiesyndrom (*Wolfe et al.* ⁷², nach „Les trois grâces“, Baron Jean-Baptiste Regnault, 1793, Louvre, Paris).

Im Mittelpunkt der Erkrankung stehen zusammenfassend chronische, polytope, polymorphe Schmerzen, wobei die zu den Klassifikationskriterien führenden Schmerzen im Bewegungsapparat im Vordergrund stehen. Idiopathische Kopf- und Gesichtsschmerzsyndrome sind aber sehr häufig ein Teil der Gesamtsymptomatik, ebenso wie abdominelle Schmerzen im Rahmen eines Reizdarmsyndroms, welches eine hohe Komorbidität mit dem FMS aufweist^{74, 75}. Begleitend treten in variabler Ausprägung allgemeine Krankheitssymptome auf, die den Klassifikationskriterien des sog. „Chronic-Fatigue-Syndroms“ gleichen, oder Schlaf-, Konzentrations- und Merkfähigkeitsstörungen, Einschränkungen der allgemeinen Leistungsfähigkeit, verminderte Regenerationsfähigkeit, neurovegetative Störungen der Blasen und Darmfunktion, sexuelle Dysfunktionen, fluktuierende Störungen der Sensibilität oder Motorik ohne objektive Zeichen einer Neuropathie, regional begrenzte oder generalisierte Störungen der Thermästhesie, ausgeprägte Wetterfühligkeit und schließlich eine große Bandbreite psychischer Störungen. Die Erkrankung beginnt häufig schleichend und unspezifisch und kann mit periodischen Verstärkungen ablaufen, die mit Stress, banalen Infekten, Witterungsänderungen oder ohne ersichtlichen Auslöser beginnen und von unterschiedlich langer Dauer sind.

Das FMS tritt als Begleitsymptomatik überzufällig häufig bei Erkrankungen des Rheumatischen Formenkreises auf. In dieser Kombination hat es sich eingebürgert, es mit dem Suffix „sekundär“ zu bezeichnen, beim Fehlen einer solchen Komorbidität mit dem Suffix „primär“. Eine solche Einteilung in primäre und sekundäre Verlaufsformen ist unter dem Gebot der Neutralität von Klassifikationskriterien hinsichtlich kausaler Zuordnungen nicht legitim. Diese Unterteilung ist aber die logische Folge der von *Wolfe*⁷³ beklagten Verwechslung der Begriffe „Klassifikation“ und „Diagnose“. Die Schnittstelle zwischen primär und sekundär bleibt solange ein Artefakt, als die Pathogenese beim „sekundären“ Phänotyp genauso ungeklärt ist wie beim „primären“. Für beide Verlaufsformen ergeben sich außerdem durch diese Einteilung keine wissenschaftlich fundierten Informationen über ein differenziertes therapeutisches Konzept.

Da es sich beim FMS um eine klassifizierte Gesundheitsstörung handelt, deren Symptome im Einzelnen gegenüber den allgemeinen Krankheitssymptomen von Systemerkrankungen wenig Spezifität aufzuweisen haben, muss auch eine Diagnostik bezüglich anderer Erkrankungen erfolgen. Dazu gehören u. a. die infektiöse Mononukleose und andere Infektionserkrankungen, die rheumatoide Arthritis, der systemische Lupus erythematodes und andere Kollagenosen, diverse Myopathien und die Sarkoidose. Je breiter eine solche orientierende Diagnostik angelegt ist, desto häufiger finden sich beim FMS auch unspezifische Befunde wie antinukleäre Antikörper (ANA) oder Antikörper gegen Schilddrüsenantigene (anti-TPO) oder viele Infektionserreger. Eine Bewertung solcher Befunde im Hinblick auf mögliche Kausalzusammenhänge zur klinischen Symptomatik kann angesichts des enormen Kausalbedürfnisses und der häufigen sozialmedizinischen Fragen zur Erwerbsfähigkeit der Patienten streng genommen nur in einem interdisziplinären Rahmen erfolgen.

1.4.2.2 Epidemiologie

Betroffen sind etwa zwei Prozent der Bevölkerung, das Verteilungsverhältnis zwischen Frauen und Männern wird mit 8:1 angegeben^{76, 77}. Da die Druckschmerzmessung die Unterscheidungsmerkmale gegenüber anderen polytopen und polymorphen Schmerzsyndromen liefert, ist es allein diese Methode, die auch die sehr auffälligen Verteilungsunterschiede bestimmt. Die Messung der Druckschmerzschwellen ergibt allerdings nur beim weiblichen Geschlecht eine hinreichende Diskriminierung zwischen normalen und

pathologischen Befunden (Dissertation A. Brack aus der Schmerzambulanz der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, 1994). Aus diesem Grund ist das Ausmaß der Differenz zwischen den Prävalenzen beider Geschlechter zu wesentlichen Anteilen einem Klassifikationsbias zuzurechnen. Der Altersgipfel des Krankheitsbeginns liegt zwischen dem vierundzwanzigsten und dem fünfzigsten Lebensjahr⁷⁸, seltener sind auch Kinder und Jugendliche betroffen⁷⁹.

1.4.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Ätiologie und Pathogenese des FMS sind unbekannt. Die gängigen Routinelaborparameter, insbesondere die Entzündungswerte, liegen in den meisten Fällen im Normbereich, es wurden erhöhte Spiegel an Substanz P in Muskulatur, Serum und Liquor im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden gefunden⁸⁰⁻⁸². In der Anamnese betroffener Patienten finden sich häufig schwerwiegende seelische Belastungen, sogenannte „Life-Events“ und andere frühkindliche psychische Traumata^{83, 84}. Ob es sich dabei um statistisch belegbare, kausal interpretierbare Zusammenhänge handelt, ist nach wie vor umstritten. Da psychopathologische Komorbiditäten beim FMS sehr häufig erkannt werden, vor allem Depression und Angststörungen, sind traumatisierende Lebensereignisse auch wichtige Ansätze für die Psychotherapie im Rahmen einer multimodalen Behandlung der Patienten. Wegen der großen Wissensdefizite über pathobiologische Kausalfaktoren des FMS ist es allerdings nicht legitim, diese Gesundheitsstörungen selbst dann als somatoform zu klassifizieren, wenn eine psychopathologische Komorbidität besteht. In der Literatur finden sich zudem zahlreiche Hinweise auf infektiöse, immunologische und neuroendokrine Auffälligkeiten⁸⁵⁻⁸⁷, auch eine genetische Beteiligung wird vermutet⁸⁸.

1.4.2.4 Therapie

Bei unbekannter Pathogenese gibt es bislang keine kausale Therapie und die Erkrankung wird als nicht heilbar betrachtet. Auch hier ist ein multimodales Therapiekonzept nötig, unter Einbeziehung von pharmakologischen (Antidepressiva, Antikonvulsiva, 5-HT₃-Antagonisten)^{82, 89, 90}, physikalischen (Massage, Krankengymnastik, Physiotherapie, Kryotherapie, Training der allgemeinen Fitness)⁹¹ und psychotherapeutischen Maßnahmen⁸³. Von Seiten der Psychotherapie werden vor allem Gesundheitsedukation,

das Erlernen von Strategien zur Stressbewältigung und Entspannung und andere Verfahren der Verhaltenstherapie gegenüber analytisch ausgerichteten Verfahren vorgezogen. Alle genannten Ansätze führen allerdings nur bei einem Teil der Patienten zu einer zufriedenstellenden Linderung der Beschwerden, sodass bei der Bewertung der Therapieergebnisse der Fokus eher auf den Erfolg der Bewältigungsstrategien hinsichtlich Alltagsbelastungen und Zukunftsängsten erfolgen sollte als auf die Bewertung der körperlichen Symptome.

Wie bereits erwähnt, wird am Schmerzzentrum der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg eine Subgruppe von Fibromyalgiepatienten erfolgreich mit IVIg behandelt. Das Besondere an der klinischen Wirkung dieser Therapie ist eine individuell sehr konstante Latenzzeit des Wirkungseintritts mit immer der gleichen zeitlichen Abfolge, mit der die Allgemeinsymptome und die Schmerzen für längere Zeiträume ganz oder in wesentlichen Anteilen verschwinden.

1.4.2.5 Prognose

Es existieren nur wenige systematische Untersuchungen über Langzeitverläufe repräsentativer Patientenpopulationen⁹². Neben seltenen Spontanheilungen scheint in der Tendenz das FMS chronisch progredient zu verlaufen. Es kann spekuliert werden, ob die Progredienz der Symptome mehr durch Faktoren der Pathobiologie, gesundheitsschädigender Therapie oder der psychosozialen Desintegration vorangetrieben wird, die den schwereren Verläufen und bevorzugt den Erkrankungen sozial schwach gestellter Patienten häufig auf dem Fuße folgt.

Bei der Langzeitbeobachtung einer großen Population von Patienten mit chronischen polytopen Schmerzen in Mittelengland fiel eine signifikant erhöhte Karzinomprävalenz in einem Beobachtungszeitraum von zehn Jahren auf^{93, 94}. Bei den Frauen betraf dies im Wesentlichen das Mammakarzinom, bei Männern das Prostatakarzinom.

1.5 Rationale und Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, Untersuchungen zu potentiellen immunpathologischen Mechanismen bei verschiedenen chronischen, idiopathischen Schmerzsyndromen durchzuführen. Dazu wurde zunächst in einem sog. „Passive-Transfer-Experiment“ Serum einer Patientin mit CRPS in Versuchsmäuse injiziert und daraufhin deren Spezies-spezifisches Verhalten im Vergleich zu Kontrollmäusen untersucht, welchen Serum von gesunden Probanden injiziert wurde. Da die in diesem Teilexperiment durch das Patientenserum hervorgerufenen Verhaltensänderungen als deutliche Hinweise auf die Pathogenität dieses Serums interpretiert wurden, entstand die Hypothese des Vorliegens einer humoralen Autoimmunpathogenese bei chronischen Schmerzzuständen. Als Suchtest zum Nachweis von Serumautoantikörpern gegen eine Vielzahl verschiedener potentieller Autoantigene folgten dann in einem weiteren Schritt immunhistochemische Färbungen muriner Gewebepräparate, die mit Seren von Patienten mit verschiedenen chronischen Schmerzsyndromen (CRPS und FMS) inkubiert wurden.

2. Material und Methoden

2.1 Material und Methoden für das In-vivo-Experiment

Das im Folgenden beschriebene In-vivo-Experiment beruht auf dem Prinzip des sog. passiven Transfers von Erkrankungen (engl. „Passive-transfer of disease“), d. h. der passiven Immunisierung von Mäusen mit Serum von Patienten mit der zu untersuchenden Erkrankung unter der Annahme, dass beim Vorliegen von an der Pathogenese der Erkrankung beteiligten Serumbestandteilen, insbesondere Autoantikörpern, dadurch ähnliche Symptome auch im Versuchstier induziert werden können. Die Injektionen erfolgten intraperitoneal, da diese Methode technisch einfach durchzuführen ist und ein Großteil des injizierten Serums in die systemische Blutzirkulation aufgenommen wird. Da es sich bei dem beschriebenen Experiment um einen Vorversuch für weitere, detaillierte Untersuchungen handelte, wurden die anschließend durchgeführten Verhaltens-tests so ausgewählt, dass in erster Linie allgemeines, Spezies-spezifisches exploratives Verhalten untersucht wurde, welches als unspezifischer, aber sensitiver Indikator für generelle Gesundheitsstörungen betrachtet wird. Alle Teilerperimente wurden im „Department of Experimental Psychology“ der Universität Oxford durchgeführt.

2.1.1 Tiere, Tierhaltung und Apparate für die Verhaltensexperimente

Alle In-vivo-Teilerperimente wurden in Übereinstimmung mit dem „Home Office UK Animals (Scientific Procedures) Act“ von 1986 durchgeführt. Es wurden acht Wochen alte Mäuse vom Stamm C57BL/6 (Harlan Limited, Bicester, UK) verwendet. In allen Teilerperimenten wurde mit weiblichen Mäusen gearbeitet, da es bei diesen bei der Haltung in Gruppen seltener bzw. in geringerer Ausprägung zur Ausbildung von Hierarchien und Rangordnungskämpfen kommt als bei männlichen⁹⁵. Gemäß Appendix A der Europäischen Konvention zum Schutz von Vertebraten für experimentelle oder sonstige wissenschaftliche Zwecke (ETS Nr. 123, Straßburg, 2004) sollen Tiere mit ausgeprägtem Sozialverhalten wann immer möglich in Gruppen gehalten und eine Anreicherung der Umgebung zur Simulation des natürlichen Lebensraums sichergestellt werden. Da es zudem allgemeingültige Lehrmeinung ist, dass eine solche Anreicherung das Verhalten der Tiere normalisiert, ohne Testergebnisse zu verfälschen⁹⁶, wurden die Mäuse in Gruppen von jeweils fünf Tieren in transparenten Kunststoffkäfigen (Animal Care Systems, Colorado, USA) gehalten, deren Boden mit Espenholz-

schnitzeln bedeckt war und zudem Röhren und Höhlen aus Pappkarton als „environmental Enrichments“ zur Verfügung standen. Alle Tiere innerhalb einer solchen Gruppe wurden derselben Behandlung unterzogen. Die Tiere wurden bei einem Licht-Dunkel-Zyklus von 12/12 Stunden gehalten, wobei alle Testungen in der Lichtphase (zwischen 08.00 und 20.00 Uhr) durchgeführt wurden, außer die, bei denen der Beobachtungszeitraum über Nacht reichte. Standardisierte Futterpellets (PCP Pellets, William Lillico and Son, Betchworth, UK) und Wasser standen den Tieren ad libitum zur Verfügung.

Sämtliche Testapparate wurden von Mitarbeitern des „Institute of Experimental Psychology“ der Universität Oxford selbst hergestellt und entsprechen international gültigen Standards. Die genauen Abmessungen und Beschreibungen der verwendeten Geräte sind in den entsprechenden Kapiteln aufgeführt. Bei allen verwendeten Tests wurden die Tiere fünf bis zehn Minuten vor Beginn der Untersuchungen in einen separaten Testraum gebracht. Zu Beginn jeder Testserie wurden zunächst weibliche Testmäuse desselben Stamms, die nicht in den Experimenten verwendet wurden, an der jeweiligen Apparatur getestet, um dem Testapparat einen Spezies-spezifischen Geruch zu geben und somit die Testbedingungen für alle Tiere konstant zu halten. Zudem wurden die Testapparaturen vor jedem erneuten Versuch erst feucht, dann trocken ausgewischt. Die Mäuse wurden durch Bleichen der Körperbehaarung an genau definierten Arealen gekennzeichnet, um Verwechslungen zu vermeiden.

2.1.2 Auswahl des Patienten für das Passive-Transfer-Experiment

Die für das Passive-Transfer-Experiment ausgewählte Patientin war zum Zeitpunkt der Blutentnahme 36 Jahre alt und zog sich zwei Jahre vor der Blutentnahme ein CRPS Typ I der rechten Hand zu, ausgelöst durch ein minimales Distorsionstrauma beim Griff in eine sich noch drehende Waschtrommel. An der betroffenen Extremität waren deutliche Zeichen von Schwellung und livider Verfärbung erkennbar und die betroffene Hand war merklich kälter als die kontralaterale. Eine Veränderung der Schweißsekretion bestand nicht, ebenso keine motorischen Defizite. Die Patientin beschrieb einen starken, vorwiegend brennenden Schmerz von durchschnittlicher Intensität von 6-7 auf der numerischen Rangskala (NRS), welche von 0 (Schmerzfreiheit) bis 10 (größtmöglicher vorstellbarer Schmerz) reicht. Zudem bestand eine Kälteallodynie, d. h. eine Schmerzverstärkung bei der Applikation von nicht noxischen Kältereizen, wie z. B. beim Auf-

sprühen einer Alkohollösung auf das betroffene Areal. Sensible Defizite bestanden im Sinne einer Hypästhesie bei leichter Berührung an den Fingerspitzen der Finger II, III und IV. Konventionelle therapeutische Maßnahmen, wie eine intravenöse regionale Sympathikusblockade oder die Therapie mit Antidepressiva und Opioiden, waren bislang nicht oder nur gering erfolgreich bzw. mit starken Nebenwirkungen behaftet gewesen. Die Patientin wurde seit Oktober 2001 in mehrwöchigen Abständen mit jeweils 30 Gramm IVIg behandelt und zeigte eine fast vollständige, auf die Wirkdauer der Immunglobuline beschränkte und reproduzierbare Beseitigung aller Krankheitssymptome und der im Wesentlichen schmerzbedingten Funktionsstörungen. Die Blutentnahme erfolgte acht Wochen nach der letzten Gabe von IVIg, etwa eine Woche nach dem Wiederauftreten der CRPS-Symptomatik.

2.1.3 Auswahl der Kontrollprobanden für das Passive-Transfer-Experiment

Das den Kontrollmäusen injizierte Serum setzte sich zu gleichen Teilen aus Serumproben von vier gesunden Mitarbeiterinnen des Weatherall Institute of Molecular Medicine der Universität Oxford zusammen, die zum Zeitpunkt der Entnahme 29 bis 46 Jahre (Mittelwert: 37,75; Stabw.: 7,68) alt waren.

2.1.4 Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Serumproben

Die Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Seren erfolgte bei Patientin und Kontrollprobandinnen zu denselben Bedingungen. Die Punktion einer peripheren Vene zur Blutentnahme erfolgte zwischen 08.00 und 12.00 Uhr. Das Blut wurde in Kunststoffbehältnissen (S-Monovetten®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gesammelt. Nach Gerinnung bei dreißigminütiger Lagerung bei Raumtemperatur erfolgte eine zehnmündige Zentrifugation bei 2000 x g und das so gewonnene Serum wurde umgehend in codierten Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Um bei den Versuchstieren mögliche chemische, peritoneale Reizungen durch Lipide zu vermeiden, wurden Patientin und Kontrollprobandinnen angewiesen, eine Nahrungskarenz von mindestens zwölf Stunden vor der Blutentnahme einzuhalten. Um weitere Störgrößen zu reduzieren, durften in diesem Zeitraum außerdem kein Alkohol oder Nikotin konsumiert und keine Medikamente eingenommen werden. Die Serumproben wurden vor den Injektionen zusätzlich über Nacht bei 4 °C mittels einer semipermeab-

len Membran (Sigma, St. Louis, Missouri, USA), die für Substanzen ab einem Molekulargewicht größer 12 kD undurchlässig ist, gegen jeweils zehn Volumina physiologischer Kochsalzlösung dialysiert, um den Elektrolytstatus in allen Proben konstant zu halten. Um Komplementfaktoren zu inaktivieren wurden die Proben daraufhin 30 Minuten lang in sterilen Glasgefäßen im Wasserbad bei 56 °C erwärmt.

2.1.5 Durchführung des In-vivo-Experiments

2.1.5.1 Abgleichung und Zusammensetzung der Behandlungsgruppen; Injektionsschema, Zeitplan

Aus insgesamt 20 Mäusen wurden zwei Gruppen gebildet: Zehn Mäusen wurde das Serum der CRPS-Patientin, zehn weiteren das gepoolte Serum der Kontrollprobandinnen injiziert. Um die Gruppen untereinander homogen zu gestalten, wurden alle Tiere drei Tage vor Beginn der eigentlichen Injektions- und Testreihen dem sog. Food-displacement-Test (s. 2.1.5.2.2) unterzogen und anhand der Ergebnisse in die oben genannten Gruppen aufgeteilt, da dieser Test als valider Indikator für generelles, Spezies-spezifisches exploratives Verhalten gilt. Auf die Durchführung weiterer Tests wurde zu diesem Zeitpunkt bewusst verzichtet, um eine Habituation der Tiere an die Versuchsaapparate zu vermeiden. Die Serumproben wurden unmittelbar vor der Injektion aufgetaut und auf 38 °C erwärmt. Die anschließenden Verhaltensexperimente wurden anhand des unten angegebenen Zeitplans (s. Tabelle 1) durchgeführt. Jeder Maus wurde an fünf aufeinander folgenden Tagen jeweils ein Milliliter Serum injiziert. Die Verhaltenstests werden im Folgenden näher erläutert. Die Injektionen erfolgten stets morgens zwischen 08.00 und 10.00 Uhr, die Verhaltenstests im Verlauf des Tages, jedoch frühestens eine Stunde nach der Injektion. Es wurde ein genauer zeitlicher Abstand von fünf Minuten zwischen den Injektionen und ebenfalls zwischen den anschließenden Tests eingehalten, um ein interindividuell konstantes Intervall zwischen Injektionen und Verhaltenstests zu gewährleisten. Fünf Tage nach der letzten Testung wurden die Mäuse mittels intrakardialer Infusion von physiologischer Kochsalzlösung und anschließender zervikaler Dislokation getötet. Verschiedenartige Organsysteme, darunter Gewebe von ZNS, PNS und Skelettmuskulatur wurden für weiterführende Untersuchungen entnommen, in Isopentan (Sigma, St. Louis, Missouri, USA) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Tag	Injektion von Serum (1 ml pro Tag und Maus)	Food-displacement-Test (Messung nach 2 h und über Nacht)	Open-Field-Test
-3		x	
1	x		
2	x	x	x
3	x		
4	x		
5	x		
8		x	x
15			x

Tabelle 1:
Injektionsschema für die Serumproben und Zeitplan für die Durchführung der beiden Verhaltensexperimente Food-displacement und Open-Field-Test.

2.1.5.2 Testung von allgemeinem, Spezies-spezifischem Verhalten

2.1.5.2.1 Open-Field-Test

Der Open-Field-Test (engl. „offenes Feld“) erfasst das angeborene, explorative Verhalten von Mäusen und anderen Nagetieren. Eine Maus wird mit dem Kopf zur Wand in eine Ecke einer grauen, oben offenen Plastikbox mit der Fläche von 30 x 50 cm und 18 cm hohen Wänden platziert. Die Grundfläche der Box (s. Abbildung 4) ist durch weiße Linien in 15 Quadrate von jeweils 10 x 10 cm Größe unterteilt. Die Dauer dieses Experiments betrug drei Minuten pro Maus, gemessene Parameter waren die Anzahl der insgesamt erlaufenen Quadrate, die Latenzzeit bis zum ersten Aufrichten („Rear“), d. h. dem freien Stehen auf den Hinterpfoten mit explorativer Intention und dem Versuch, über die Wände des Apparates hinwegzusehen, sowie die Gesamtzahl aller „Rears“. Da an Tag 2 zusätzlich bei einigen Mäusen der Patientengruppe neuartige, bislang unbekannte Phänomene, nämlich ein starkes Zittern des gesamten Körpers sowie massives Aufstellen aller Körperhaare (fortan als „Shivering“ und „Piloerektion“ bezeichnet) beobachtet wurden, wurde das Auftreten dieser Symptome im weiteren Verlauf als zusätzlicher Testparameter mit aufgenommen.

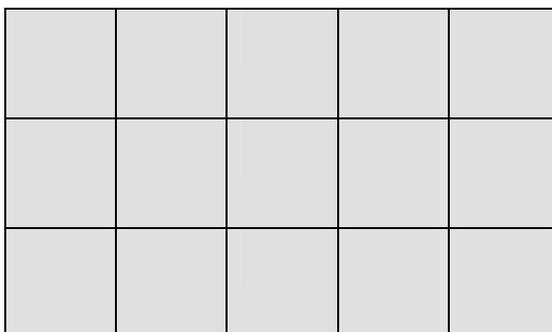


Abbildung 4:
Grundfläche des Open-Field-Testapparats, welche durch Linien in 15 Quadrate von je 10 cm Seitenlänge unterteilt war.

2.1.5.2.2 Food-displacement-Test

Dieser Test beurteilt das angeborene Verhalten von Nagetieren, Höhlen zu graben. Eine an einem Ende verschlossene, 20 cm lange Plastikröhre mit 6,8 cm Durchmesser wurde mit 200 g der oben genannten (2.1.1) standardisierten Futterpellets gefüllt und in einem Individualkäfig platziert. Die offene Seite der Röhre wurde mittels Schrauben, die in der Wand der Röhre fixiert waren, drei Zentimeter gegenüber dem Boden des Käfigs angehoben um zu verhindern, dass das Futter auch ohne die Aktivität der Maus aus dem Behälter fallen konnte. Dieses Experiment begann nachmittags um 17.00 Uhr. Die von der Maus ausgegrabene Futtermenge wurde nach zwei Stunden und am nächsten Morgen, nach 15 Stunden gemessen. Abbildung 5 zeigt den Versuchsaufbau.



Abbildung 5:
Aufbau der Food-Displacement-Testapparatur: Bei den oben beschriebenen Untersuchungen wurde jedoch nur jeweils eine Maus pro Käfig gehalten.

2.1.6 Statistische Auswertung des In-vivo-Experiments

Da wie beschrieben die Mäuse nur anhand des Food-displacement-Tests in die beiden Gruppen aufgeteilt waren, lagen für den Open-Field-Test keine Ausgangsdaten vor Beginn der Behandlungen vor. Da zudem durch Fehlinjektionen die Gruppengröße der Kontrollmäuse im Verlauf des Experiments reduziert werden musste, war eine statistische Analyse unter Berücksichtigung des zeitlichen Verlaufs im Sinne einer Mehrfaktoren-Varianzanalyse mit Messwiederholung nicht möglich. Es wurden daher Mediane der jeweiligen Daten zwischen den beiden Gruppen zu jedem einzelnen Testzeitpunkt

mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Die Häufigkeit des Auftretens von Piloerektion im Rahmen des Open-Field-Tests wurde mittels Fisher's-Exact-Test beurteilt. Bei explorativem Vorgehen wurden P-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant erachtet. Alle Analysen wurden mit der Version 4.03 des Statistikprogramms Prism® (Graphpad Software Incorporated, La Jolla, Kalifornien, USA) durchgeführt.

2.2 Material und Methoden für die immunhistochemischen Untersuchungen

2.2.1 Geräte

Kryotom:	Leica CM 1900 (Leica, Wetzlar, Deutschland)
Objektträger :	Multispot Slides (Hendley-Essex Limited, UK)
Abdeckgläser:	Multispot Coverslips (Hendley-Essex Limited, UK)
Wippschüttler:	Buehler WS 10 (Buehler, Hechingen, Deutschland)
Lichtmikroskop:	Nikon Eclipse E400 (Nikon, Tokio, Japan)
Zentrifugen:	Heraeus Multifuge 3 Plus (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA); Eppendorf 5417 C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
Analysewaage:	Sartorius LA230S (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
Kunststoffröhrchen:	S-Monovetten®, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.2.2 Chemikalien, Puffer, Lösungen, Antikörper

Decon 90:	Decon Laboratories Limited, Hove, UK
PBS:	Oxoid, Basingstoke, UK
Isopentan :	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Paraformaldehyd:	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Wasserstoffperoxyd:	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Methanol:	Riedel-de Haën, Honeywell, Seelze, Deutschland
AEC :	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
DMF :	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
APTES :	Sigma, St. Louis, Missouri, USA
Eindeckmedium:	Dako S3025 (Dako, Glostrup, Dänemark)

Zweitantikörper: Dako PO212 Meerrettichperoxidase-konjugierter Kaninchen-anti-human-pan-Ig (Dako, Glostrup, Dänemark)
Mayers Hämalaun: BDH Chemicals (VWR International, Lutterworth, UK)
Eindeckmedium: Dako S3025 (Dako, Glostrup, Dänemark)

2.2.3 Anfertigung der Gewebepräparate für die immunhistochemischen Färbungen

Um eine bessere Haftung der Gewebsschnitte auf den Objektträgern zu erzielen, wurden diese mit APTES gemäß folgendem Protokoll beschichtet, sodass eine positive Ladung der Glasoberfläche entstand. Die Objektträger wurden 5 Minuten lang mit dem Tensid Decon 90 (2% in dH₂O) benetzt, dann zunächst 5 Minuten in laufendem Leitungswasser dann zweimal weitere 5 Minuten in dH₂O ausgewaschen und 2 Stunden bei 60 °C getrocknet. Darauf folgte eine fünfminütige Inkubation in APTES (2% v/v in Methanol) und erneut, wie oben beschrieben, ein Auswaschen erst unter fließendem Leitungswasser, dann zweimal in dH₂O mit anschließender Trocknung. Für die Gewebepräparate wurden Mäuse des Stammes C57BL/6 einen Tag post partum durch zervikale Dislokation getötet, in auf Trockeneis gekühltem Isopentan für 15-20 Sekunden schockgefroren und in Aluminiumfolie bei -80°C gelagert. Gewebsschnitte von 10 µm Dicke wurden mittels eines Kryotoms angefertigt. Auf jeden Objektträger wurden drei verschiedene Schnitte aufgebracht (s. Abbildung 6): jeweils ein Frontalschnitt durch Kopf der Maus sowie ein Transversal- und ein Frontalschnitt durch den gesamten Mauskörper. Die so angefertigten Präparate wurden 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet, paarweise in Aluminiumfolie gewickelt und bei -20°C gelagert.

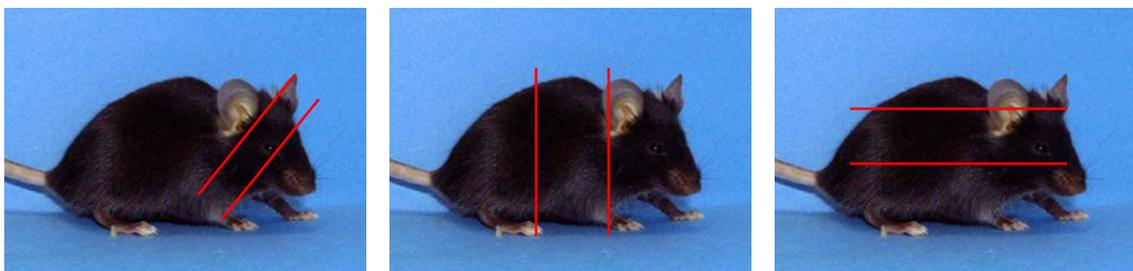


Abbildung 6: Schnittführung bei Anfertigung der Gewebepräparate. Die Schnitte wurden zwischen den jeweils angegebenen Linien durchgeführt⁹⁷.

2.2.4 Untersuchungskollektive

2.2.4.1 Patientenkollektiv

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden Seren von insgesamt 45 Patienten mit chronischen Schmerzsyndromen verwendet, die sich folgendermaßen aufteilten: 22 Patienten litten am Fibromyalgiesyndrom, 23 Patienten am CRPS.

Die klinischen und demographischen Daten der in die Studie eingeschlossenen Schmerzpatienten sind in 3.2.1 zusammengefasst.

2.2.4.2 Kontrollkollektiv

Die Kontrollseren wurden in Kooperation mit dem Institut für Transfusionsmedizin und Hämotherapie der Universität Würzburg gewonnen, wobei gesunden Blutspendern, die an keinem länger als drei Monate persistierenden oder akuten Schmerzsyndrom leiden durften und in Geschlecht und Alter (± 5 Jahre) mit den Schmerzpatienten übereinstimmen mussten, im Rahmen der Spende zusätzlich Blut abgenommen und unter den selben Bedingungen wie die Proben der Schmerzpatienten verarbeitet und gelagert wurde. Als weitere Ein- und Ausschlusskriterien für die Kontrollprobanden galten die allgemein gültigen Voraussetzungen des Instituts für Transfusionsmedizin und Hämotherapie zur Durchführung einer Blutspende.

Die demographischen Daten der verwendeten Kontrollprobanden sind ebenfalls in 3.2.1 aufgeführt.

2.2.5 Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Serumproben

Die Entnahme, Aufbereitung und Lagerung der Serumproben wurden wie unter 2.1.4 beschrieben durchgeführt. Eine Dialyse bzw. Hitzeinaktivierung erfolgte jedoch nicht.

2.2.6 Durchführung der indirekten immunhistochemischen Färbungen

Alle Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Gewaschen wurde, falls nicht anders angegeben, stets für drei Minuten in PBS. Die wie oben beschrieben vorbereiteten Gewebepräparate wurden vor Beginn der Färbung 15 Minuten lang aufgetaut, 10 Minuten in Paraformaldehyd (4% in PBS) fixiert und dreimal gewaschen. Daraufhin wurde die endogene Peroxidase des Gewebes durch Inkubation in einer Wasserstoffperoxyd-/Methanollösung (10 ml H₂O₂ in 200ml 70% Methanol in dH₂O) blockiert, da die-

se später sonst durch Umsetzung des Substrates Färbeartefakte hervorrufen würde. Nach weiterem dreimaligen Waschen wurden die Gewebsschnitte 20 Minuten lang in jeweils 500 µl FBS (5% in PBS) blockiert, um unspezifische Bindungen der humanen Immunglobuline an F_c-Rezeptoren des murinen Gewebes zu vermeiden. Es folgte eine sechzigminütige Inkubation der Gewebsschnitte mit 500 µl von Verdünnungen der Patienten- bzw. Kontrollseren (1:100 in 1% FBS in PBS). In einem Färbedurchgang wurden insgesamt etwa 7 bis 10 Patienten- mit den jeweils korrespondierenden Kontrollseren untersucht. Zusätzlich wurde jedes Mal eine Negativ- (PBS) und eine Positivkontrolle einbezogen. Die Positivkontrolle bestand aus einer Serumprobe eines Patienten mit chronisch-inflammatorischer demyelinisierender Neuropathie (CIDP), welche starke Bindung an peripheren Nerven der Mäuse zeigte. Jede Probe wurde mit den drei verschiedenen Geweben eines Objektträgers (s. 2.2.3) 60 Minuten lang inkubiert, um später das Bindungsverhalten der Antikörper an verschiedenen Organsystemen begutachten zu können. Nach dreimaligem Waschen der Präparate wurden diese für 30 Minuten mit jeweils 500 µl der Verdünnung des Zweitantikörpers inkubiert (Meerrettichperoxidase-konjugierter Kaninchen-anti-human-pan-Ig, 1:100 in 1% FBS in PBS). Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden 500 µl des Substrats aufgetragen (AEC, 5mg/ml in DMF, verdünnt 1:16 v/v in 0.1 M NaAc-Puffer, pH 5.2, aktiviert durch 0,1% v/v H₂O₂), welches durch die antikörpergebundene Meerrettichperoxidase in einen rötlichen, wasserunlöslichen Farbstoff umgewandelt wurde. Das Substrat wurde nach 8 Minuten abgenommen und die Gewebsschnitte wurden einmalig in PBS gewaschen. Anschließend wurden die Präparate für 60 Sekunden in Mayers Hämalaun gegengefärbt, um einen besseren Überblick über die anatomische Situation zu gewährleisten, dann viermal kurz in dH₂O und einmal 5 Minuten in PBS gewaschen. Nach Trocknung über Nacht wurden die Präparate mit Eindeckmedium und Deckgläsern abgedeckt und bis zur mikroskopischen Auswertung in Dunkelheit bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.7 Mikroskopische Untersuchung und Auswertung

Die Gewebsschnitte wurden spätestens zwei Tage nach der Immunfärbung von zwei unabhängigen Personen bei 4-, 10- und 20-facher Vergrößerung verblindet lichtmikroskopisch untersucht, d. h. die Untersucher wussten nicht, ob es sich beim vorliegenden

Präparat um mit Patienten- oder Kontrollserum gefärbtes Gewebe handelte. Folgende Organsysteme wurden nach dem jeweiligen Bindungsverhalten untersucht: Großhirn- und Rückenmarksparenchym, quergestreifte Muskulatur, Blutgefäße, Spinalganglien und periphere Nerven. Die Bindungsstärke bzw. Farbintensität wurde anhand einer Nominalskala von 0 bis 3 eingeschätzt, abgestuft in jeweils vier weitere Unterteilungen. Dem Wert 0 entsprach dabei keine Färbung wie bei der Negativkontrolle, dem Wert 3 die maximale Färbintensität wie bei der Positivkontrolle.

2.2.8 Statistische Auswertung der immunhistochemischen Untersuchungen

Die Verteilung der Daten wurde mittels Komolgorow-Smirnow-Test untersucht. Die statistischen Auswertungen bezüglich der demographischen Daten der untersuchten Kollektive erfolgte mittels Student's T-Test. Die Mediane der Intensitätsscores zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv, ebenso wie zwischen den verschiedenen Schmerzdiagnosen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test verglichen. Da dieser Test nicht anwendbar ist, wenn alle Individuen denselben Messwert annehmen, wurde in diesen Fällen der Wilcoxon signed-rank-Test verwendet. Da es sich auch in diesem Fall um ein exploratives Vorgehen handelte, wurden hier ebenfalls P-Werte $\leq 0,05$ als statistisch signifikant erachtet. Alle Analysen wurden mit der Version 4.03 des Statistikprogramms Prism® (Graphpad Software Incorporated, La Jolla, Kalifornien, USA) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Ergebnisse aus dem In-vivo-Experiment

3.1.1 Allgemeiner Ablauf des Passive-Transfer-Experiments

Alle Telexperimente wurden gemäß des vorgegebenen Zeitplans unter Einbehaltung der Zeitintervalle zwischen den Injektionen bzw. zwischen den Verhaltenstestungen durchgeführt. Es wurde stets die volle Dosis des zu injizierenden Serums erfolgreich appliziert. An Tag 3 erfolgte eine Serie von Fehlinjektionen, wobei fünf Mäusen der Kontrollgruppe akzidentiell Serum der Schmerzpatientin injiziert wurde, sodass diese Mäuse für alle weiteren Tests nicht mehr zur Verfügung standen.

3.1.2 Testung von allgemeinem Spezies-spezifischem Verhalten

Alle Tiere verhielten sich bei der allgemeinen Haltung zwischen den einzelnen Telexperimenten normal und zeigten gewohnte soziale Interaktion.

3.1.2.1 Open-Field-Test

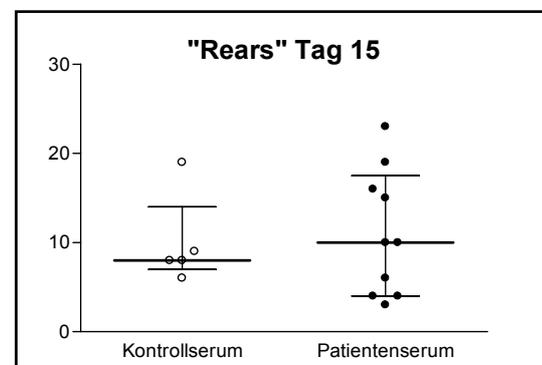
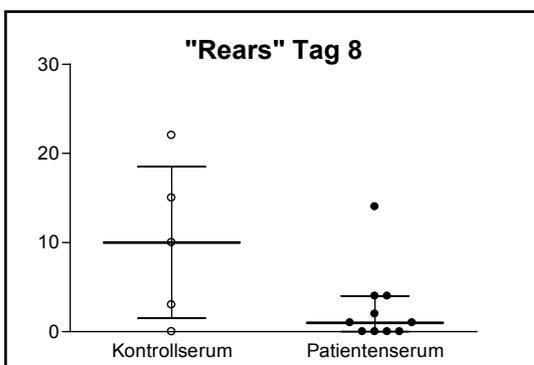
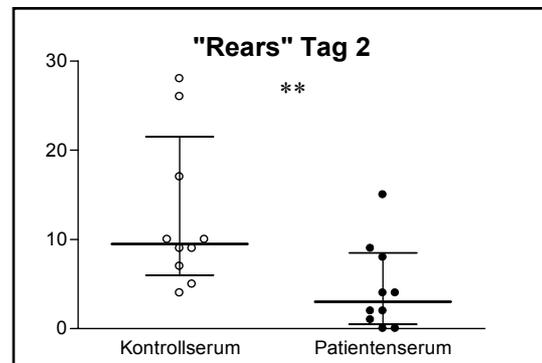
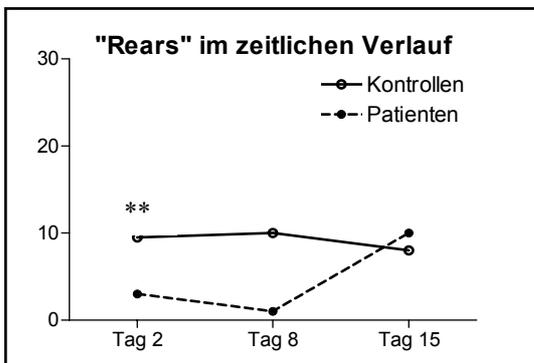
Wie bereits in Abschnitt 2.1.5.2.1 angegeben, erfasst der Open-Field-Test insbesondere exploratives Verhalten, es wurden die erlaufenen Quadrate, das Aufrichten („Rearing“) mit explorativer Intention und die Latenz bis zum ersten „Rear“ bewertet. Zudem zeigten nur Mäuse, denen Serum der CRPS-Patientin injiziert wurde, Piloerektion und Shivering. Diese Phänomene, die nur unter Exposition gegenüber einem neuen, unbekanntem freien Feld, niemals jedoch in Gruppen- oder Individualkäfigen oder im Rahmen anderer Testungen auftraten, wurden nur an Tag 2, nicht jedoch an den Tagen 8 und 15 beobachtet. Die Ergebnisse der gemessenen Parameter sind im Folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt. In den Graphen, die die einzelnen Tage repräsentieren, sind Mediane und Interquartilenbereiche dargestellt. Bei den Graphen, die eine Übersicht über den zeitlichen Verlauf geben, wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit auf Fehlerbalken verzichtet.

Gesamtzahl der „Rears“

Die Aktivität bezüglich der „Rears“ war in der Patientengruppe an Tag 2 im Vergleich zur Kontrollgruppe hochsignifikant reduziert. Diese Verhaltensänderung war tendenziell auch an Tag 8 noch zu beobachten, nivellierte sich dann im Verlauf, sodass an Tag 15 ein normales Aktivitätsniveau vorlag und kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen feststellbar war.

„Rears“ Tag 2	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	0,0	15,0	3,0	0,5-8,5	0.007**
Kontrollserum	10	4,0	28,0	9,5	6,0-21,5	
„Rears“ Tag 8	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	0,0	14,0	1,0	0,0-4,0	0.129 (ns)
Kontrollserum	5	0,0	22,0	10,0	1,5-18,5	
„Rears“ Tag 15	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	3,0	23,0	10,0	4,0-17,5	0,953 (ns)
Kontrollserum	5	6,0	19,0	8,0	7.0-14,0	

Tabelle 2: Gesamtzahl der „Rears“ an den Tagen 2, 8 und 15.



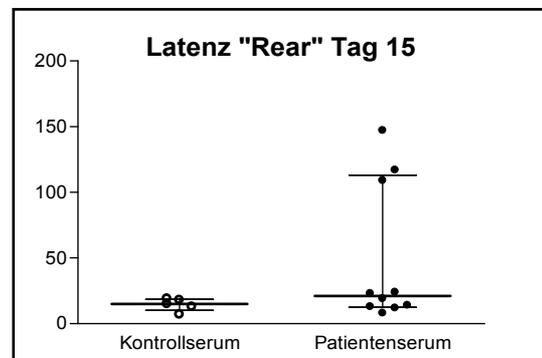
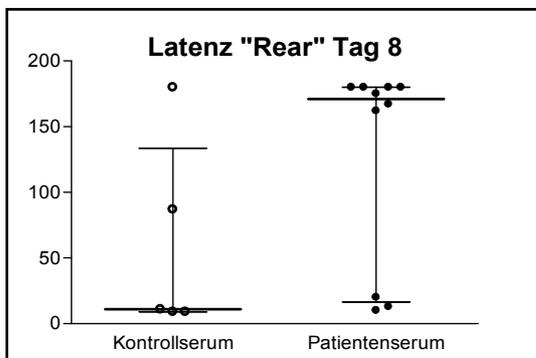
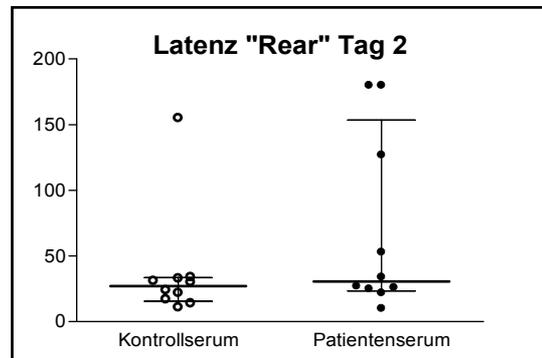
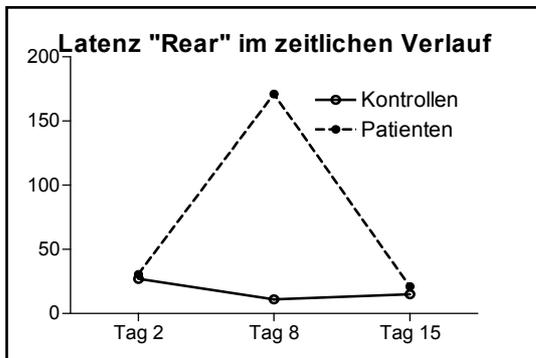
Graphen 1-4: Gesamtzahl der „Rears“ im zeitlichen Verlauf und einzeln an den Tagen 2, 8 und 15.

Latenz bis zum ersten „Rear“

Zu allen drei Zeitpunkten zeigte sich bei den Mäusen, denen Patientenserum injiziert wurde, eine teilweise deutlich erhöhte Latenz bis zum ersten „Rear“, die im Mittel an Tag 8 am stärksten ausgeprägt, jedoch vermutlich aufgrund der starken Streuung der Daten und der reduzierten Gruppengröße der Kontrollmäuse zu keinem Zeitpunkt signifikant war.

Latenz Tag 2		Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	10,0	180,0	30,5	23,5-153,5	0,280 (ns)	
Kontrollserum	10	11,0	155,0	27,0	15,5-33,5		
Latenz Tag 8		Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	10,0	180,0	171,0	16,5-180,0	0,129 (ns)	
Kontrollserum	5	9,0	180,0	11,0	9,0-133,5		
Latenz Tag 15		Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	8,0	147,0	21,0	12,5-113	0,254 (ns)	
Kontrollserum	5	7,0	19,0	15,0	10,0-18,5		

Tabelle 3: Latenzzeiten bis zum ersten „Rears“ an den Tagen 2, 8 und 15.



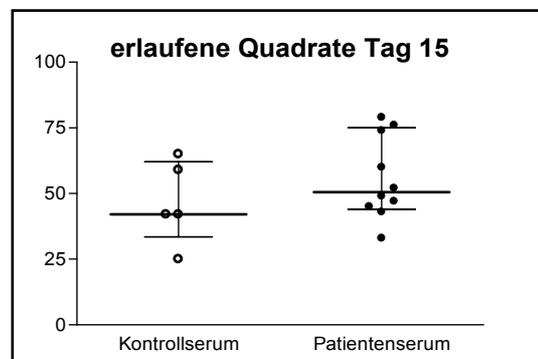
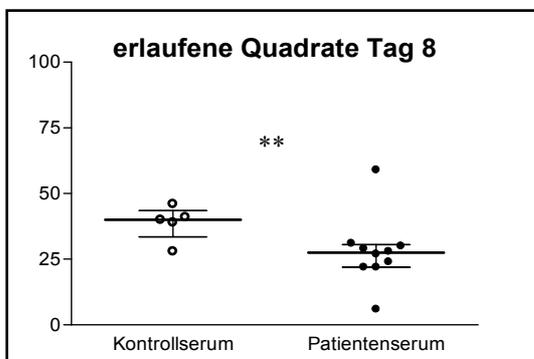
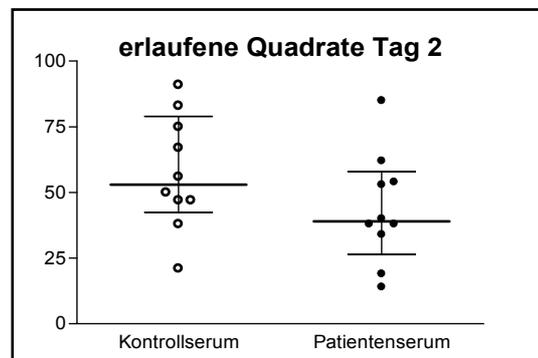
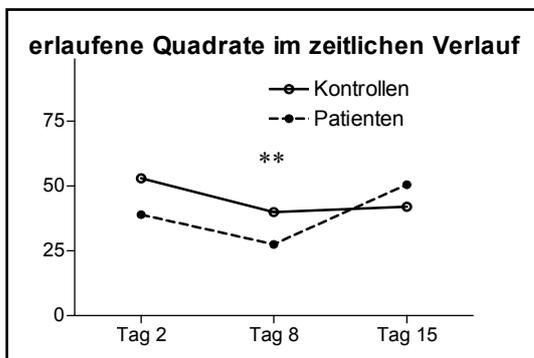
Graphen 5-8: Latenzen zum ersten „Rear“ im zeitlichen Verlauf und einzeln an den Tagen 2, 8 und 15.

Anzahl erlaufener Quadrate

Die Mäuse, denen Patientenserum injiziert wurde, zeigten zunächst eine reduzierte Reduktion der Exploration im Vergleich zu Kontrollgruppe, gemessen an den erlaufenen Quadraten. Dieser Unterschied war nur an Tag 8 signifikant. Gegen Ende des Experiments, an Tag 15, übertraf die Laufleistung der Patienten- die der Kontrollgruppe sogar geringfügig.

Quadrate Tag 2	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	14,0	85,0	39,0	26,5-58,0	0,166 (ns)
Kontrollserum	10	21,0	91,0	53,0	42,5-79,0	
Quadrate Tag 8	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	6,0	59,0	27,5	22,0-30,5	0,040*
Kontrollserum	5	28,0	46,0	40,0	33,5-43,5	
Quadrate Tag 15	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	33,0	79,0	50,5	44,0-75,0	0,254 (ns)
Kontrollserum	5	25,0	65,0	42,0	33,5-62,0	

Tabelle 4: Anzahl der erlaufenen Quadrate an den Tagen 2, 8 und 15.



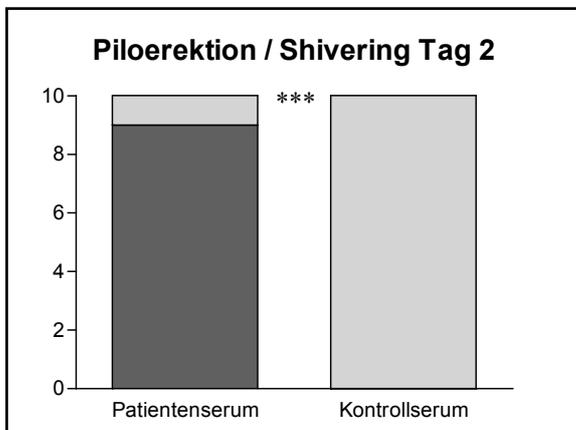
Graphen 9-12: Anzahl der erlaufenen Quadrate im zeitlichen Verlauf und einzeln an den Tagen 2, 8 und 15.

Auftreten von Piloerektion und Shivering

Die Phänomene Piloerektion und Shivering traten stets zusammen auf und werden daher gemeinsam betrachtet. Diese Erscheinungen waren ausschließlich an Tag 2 und nur während des Open-Field-Tests zu beobachten. Bei Kontrollmäusen traten diese Symptome nie in Erscheinung.

Piloerektion / Shivering Tag 2	Anzahl Mäuse	Piloerektion (Anzahl)	Piloerektion (%)	P-Wert
Patientenserum	10	9/10	90	<0,0001 ***
Kontrollserum	10	0/10	0	

Tabelle 5: Auftreten von Piloerektion und Shivering an Tag 2.



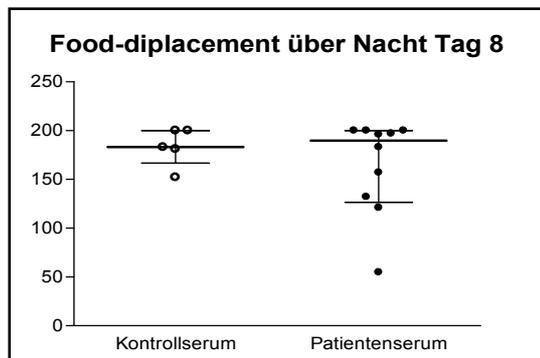
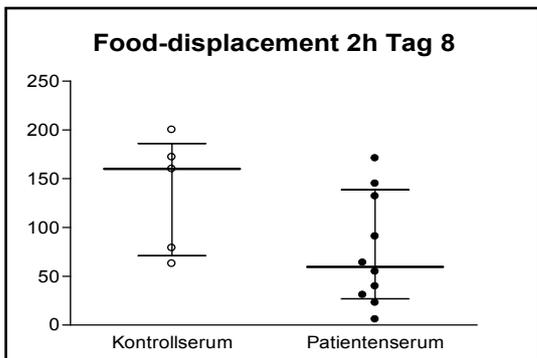
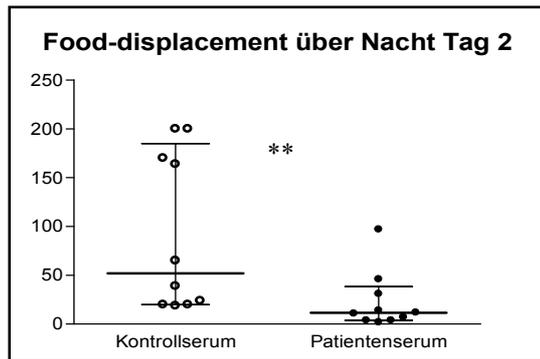
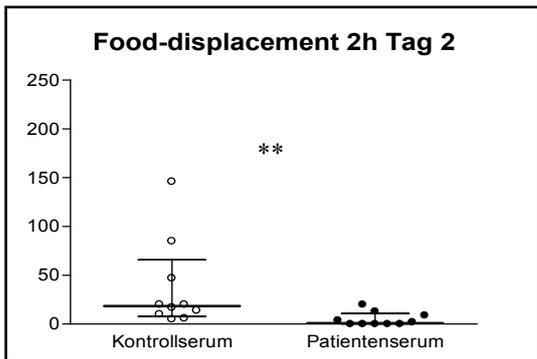
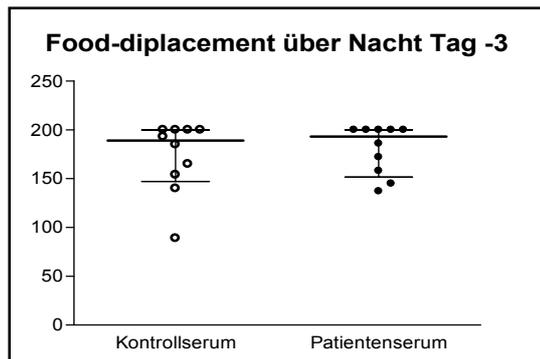
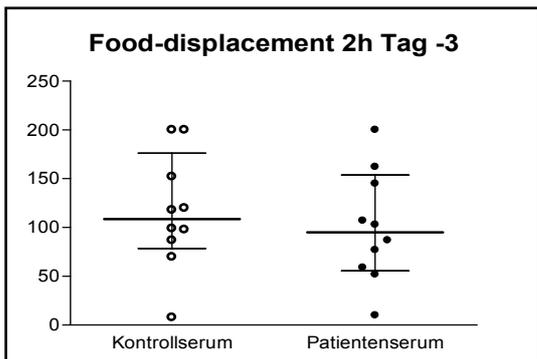
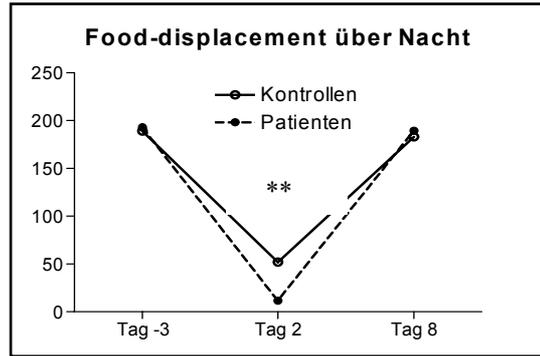
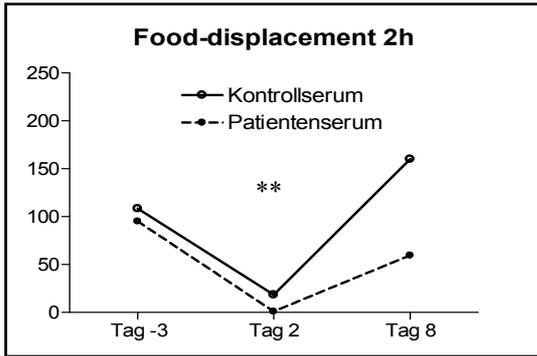
Graph 13: Auftreten von Piloerektion und Shivering an Tag 2.

3.1.2.2 Food-displacement-Test

Wie bereits in 2.1.5.1 erwähnt, wurden die Mäuse anhand dieses Tests vor Beginn der Injektions- und Testserien (Tag -3) gleichmäßig in zwei Gruppen aufgeteilt, da er ein globales Maß zur Abschätzung von allgemeinem, Spezies-spezifischem Verhalten, Motivation zur Exploration und motorischen Fähigkeiten darstellt. Demnach unterscheiden sich die beiden Gruppen in der Aktivität in diesem Test zu Beginn, an Tag -3, nur unwesentlich. Im Verlauf zeigte sich eine deutlich reduzierte Aktivität bei den Mäusen, denen Patientenserum injiziert wurde, im Vergleich zu den Kontrollmäusen. Ähnlich wie bei der „Rear“-Aktivität im Open-Field-Test waren die Unterschiede an Tag 2 hochsignifikant, sowohl bezüglich der nach zwei Stunden als auch der über Nacht ausgegrabenen Futtermenge. Auch an Tag 8 schien diese Aktivität noch reduziert zu sein, die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren jedoch nicht mehr signifikant. Die Ergebnisse der gemessenen Parameter sind im Folgenden tabellarisch und graphisch dargestellt. Wie bei den Ergebnissen des Open-Field-Tests sind auch hier nur in den Graphen, welche die einzelnen Tage repräsentieren, zusätzlich zu den Medianen die Interquartilenbereiche dargestellt.

Food-displacement 2h Tag -3	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	10,0	200,0	95,0	55,5-153,5	0,529 (ns)
Kontrollserum	10	8,0	200,0	108,5	78,5-176,0	
Food-displacement über Nacht Tag -3	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	137,0	200,0	193,0	151,5-200,0	0,739 (ns)
Kontrollserum	10	89,0	200,0	189,0	147,0-200,0	
Food-displacement 2h Tag 2	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	0,0	20,0	1,0	0,0-11,0	0,002**
Kontrollserum	10	5,0	146,0	18,5	8,0-66,0	
Food-displacement über Nacht Tag 2	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	2,0	97,0	11,5	4,0-38,5	0,007**
Kontrollserum	10	19,0	200,0	52,0	20,0-185,0	
Food-displacement 2h Tag 8	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	6,0	171,0	59,5	27,0-138,5	0,075 (ns)
Kontrollserum	5	63,0	200,0	160,0	71,0-186,0	
Food-displacement über Nacht Tag 8	Anzahl Mäuse	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
Patientenserum	10	55,0	200,0	189,5	126,5-200,0	0,679 (ns)
Kontrollserum	5	152,0	200,0	183,0	166,5-200,0	

Tabelle 6: Food-displacement (Menge der ausgegrabenen Futterpellets in Gramm) an den Tagen -3, 2 und 8, jeweils nach zwei Stunden bzw. über Nacht.



Graphen 14-21: Food-displacement (Menge der ausgegrabenen Futterpellets in Gramm) im zeitlichen Verlauf und an Tagen -3, 2 und 8, jeweils nach zwei Stunden und über Nacht.

3.2 Ergebnisse aus den immunhistochemischen Untersuchungen

3.2.1 Charakterisierung des Patienten- und Kontrollkollektivs

3.2.1.1 Alters- und Geschlechtsverteilung von Patienten- und Kontrollkollektiv

Das Alter der 45 eingeschlossenen Patienten, darunter 10 Männer (22,2 %) und 35 Frauen (77,8 %), lag zwischen 18 und 68 Jahren. Das mittlere Alter betrug 45,2 Jahre (Männer: 41,2 Jahre, Frauen: 46,3 Jahre; Graph 22, Tabelle 7).

Das Alter der 43 eingeschlossenen Kontrollprobanden, darunter 10 Männer (23,3 %) und 33 Frauen (76,7 %), lag zwischen 20 und 63 Jahren. Das mittlere Alter betrug 43,2 Jahre (Männer: 42,1 Jahre, Frauen: 43,6 Jahre; Graph 23, Tabelle 8).

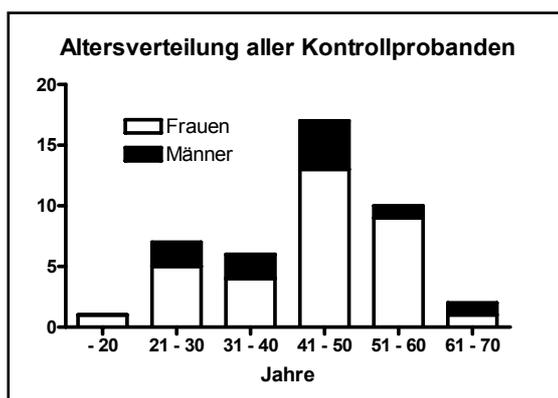
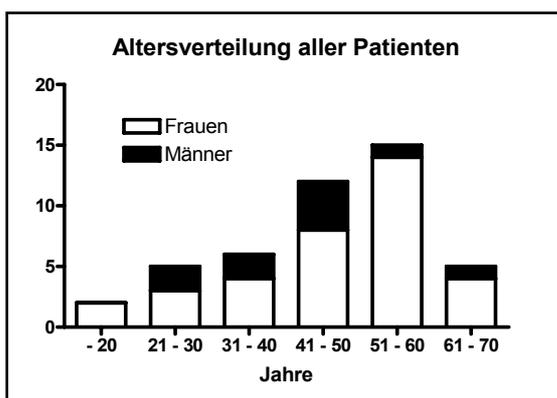
Unabhängig von diesem Kollektiv wurden die Seren der Patientin und der Kontrollprobandinnen, welche im In-vivo-Experiment verwendet wurden, ebenfalls in die Diagnostik einbezogen.

	Anzahl	Prozent	Min	Max	Mittelwert	Stabw
Gesamt	45	100,0 %	18	68	45,2	12,6
Männer	10	22,2 %	27	62	46,3	12,9
Frauen	35	77,8 %	18	68	41,2	10,9

Tabelle 7: Alters- und Geschlechtsverteilung des Patientenkollektivs

	Anzahl	Prozent	Min	Max	Mittelwert	Stabw
Gesamt	43	100,0 %	20	63	43,2	11,9
Männer	10	23,3 %	27	63	42,1	12,2
Frauen	33	76,7 %	20	63	43,6	12,0

Tabelle 8: Alters- und Geschlechtsverteilung des Kontrollkollektivs.



Graphen 22 und 23: Einteilung der Patienten und Kontrollprobanden, getrennt nach Geschlecht, in Altersgruppen mit jeweils einer Dekade als Intervall; schwarzer Säulenanteil für das männliche, weißer Säulenanteil für das weibliche Geschlecht.

Es wurden demnach zu 10 männlichen Schmerzpatienten 10 korrespondierende Kontrollprobanden rekrutiert, wobei der maximale Altersunterschied eines Patienten zum entsprechenden Kontrollprobanden 6 Jahre betrug. Den 35 weiblichen Patienten wurden 33 Kontrollprobandinnen zugewiesen, welche im Alter ebenfalls um maximal 6 Jahre abwichen. Zu zwei weiblichen Patienten im Alter von 61 bzw. 68 Jahren konnte keine korrespondierenden Kontrollprobandinnen rekrutiert werden. Der statistische Vergleich der Mittelwerte der Patienten- und Kontrollkollektive ergab nicht signifikante Altersunterschiede sowohl für die jeweiligen geschlechtsunabhängigen ($P=0,454$), als auch für die eingeschlossenen männlichen ($P=0,864$) und weiblichen ($P=0,365$) Kollektive (s. Tabellen 9-12). Auch der Unterschied der Altersmittelwerte aller männlichen gegenüber allen weiblichen Individuen war nicht signifikant ($P=0,284$).

	Anzahl	Min	Max	Mittelwert	Stabw	P-Wert
alle Individuen	88	18,00	68,00	44,24	12,23	
alle Patienten	45	18,00	68,00	45,20	12,57	0,454 (ns)
alle Kontrollen	43	20,00	63,00	43,23	11,93	

Tabelle 9: Vergleich der Altersverteilungen von Patienten- und Kontrollkollektiv.

	Anzahl	Min	Max	Mittelwert	Stabw	P-Wert
alle männlichen Individuen	20	27,00	63,00	41,65	11,24	
alle männlichen Patienten	10	27,00	62,00	41,20	10,87	0,864 (ns)
alle männlichen Kontrollen	10	27,00	63,00	42,10	12,17	

Tabelle 10: Vergleich der Altersverteilungen aller eingeschlossenen männlichen Individuen.

	Anzahl	Min	Max	Mittelwert	Stabw	P-Wert
alle weiblichen Individuen	68	18,00	68,00	45,00	12,48	
alle weiblichen Patienten	35	18,00	68,00	46,34	10,87	0,365 (ns)
alle weiblichen Kontrollen	33	20,00	63,00	43,58	12,17	

Tabelle 11: Vergleich der Altersverteilungen aller eingeschlossenen weiblichen Individuen.

	Anzahl	Min	Max	Mittelwert	Stabw	P-Wert
alle Individuen	88	18,00	68,00	44,24	12,23	
alle männlichen Individuen	20	27,00	63,00	41,65	11,24	0,284 (ns)
alle weiblichen Individuen	68	18,00	68,00	45,00	12,48	

Tabelle 12: Geschlechtsspezifischer Vergleich der Altersverteilungen aller eingeschlossenen Individuen.

3.2.1.2 Korrelation der biographischen Daten mit den Schmerzdiagnosen

Das Patientenkollektiv wurde in die beiden Diagnoseuntergruppen „Fibromyalgiesyndrom (FMS)“ und „Komplexes regionales Schmerzsyndrom (CRPS)“ unterteilt. Beide Geschlechter waren in der CRPS-Gruppe annähernd gleich vertreten (10 Männer, 13 Frauen), die Fibromyalgie-Gruppe bestand jedoch gänzlich aus weiblichen Patienten (n=22).

Diagnose	Männer		Frauen		Alter	
	Anzahl	Prozent	Anzahl	Prozent	MW	Stabw
Gesamt	10	22,2 %	35	77,8 %	45,2	12,6
FMS	0	0,0 %	22	100,0 %	45,8	12,4
CRPS	10	43,5 %	13	56,5 %	44,7	13,0

Tabelle 13: Alters- und Geschlechtsverteilung innerhalb der beiden Diagnosegruppen.

Bezüglich der Altersmittelwerte der beiden verschiedenen Schmerzdiagnosen CRPS und FMS ergaben sich ebenfalls nicht signifikante Altersunterschiede sowohl für die geschlechtsunabhängigen ($P=0,769$), als auch für die eingeschlossenen weiblichen ($P=0,740$) Kollektive (s. Tabellen 14 und 15). Da keine männlichen Patienten mit Fibromyalgiesyndrom rekrutiert wurden, entfällt hier der Vergleich zwischen den beiden Diagnosegruppen.

	Anzahl	Min	Max	Mittelwert	Stabw	P-Wert
alle Patienten	45	18,00	68,00	45,20	12,57	
alle CRPS-Patienten	23	19,00	68,00	44,65	13,01	0,769 (ns)
alle FMS-Patienten	22	18,00	61,00	45,77	12,37	

Tabelle 14: Vergleich der Altersverteilungen der beiden Diagnosegruppen CRPS und FMS.

	Anzahl	Min	Max	Mittelwert	Stabw	P-Wert
alle weiblichen Patienten	35	18,00	68,00	46,34	12,93	
weibliche CRPS-Patienten	13	19,00	68,00	47,31	14,29	0,740 (ns)
weibliche FMS-Patienten	22	18,00	61,00	45,77	12,37	

Tabelle 15: Vergleich der Altersverteilungen der weiblichen eingeschlossenen Individuen der beiden Diagnosegruppen CRPS und FMS.

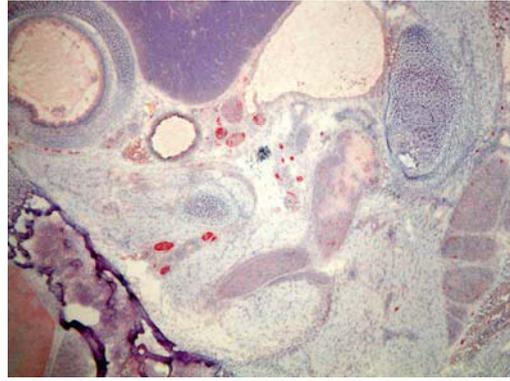
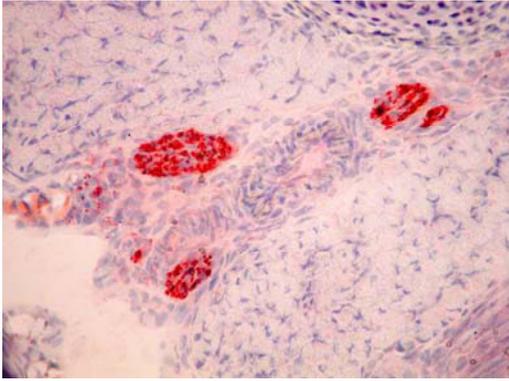
3.2.2 Serologische Befunde: Statistischer Vergleich der Immunreaktivitäten von Patienten- und Kontrollseren in Abhängigkeit von Geschlecht und Schmerzdiagnose

Die immunhistochemischen Färbungen verliefen stets erfolgreich gemäß oben genanntem Protokoll (s. 2.2.6). Die in jedem Färbedurchgang eingeschlossene Positivkontrolle zeigte jedes Mal hohe Immunreaktivität gegen peripheres Nervengewebe, die Negativkontrolle zeigte nie Färbung oder unspezifischen Hintergrund.

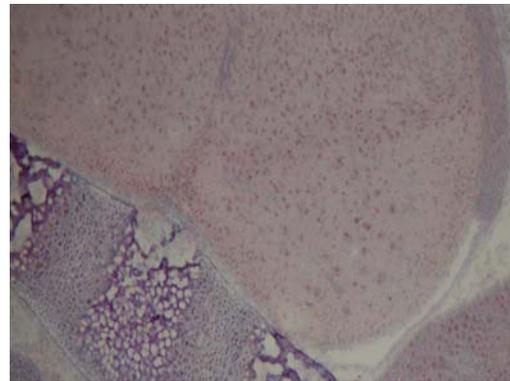
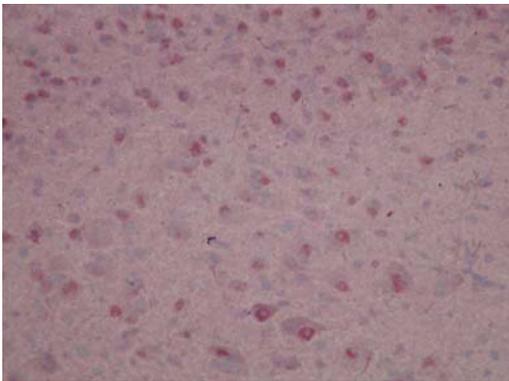
Es werden im Folgenden die Färbeintensitäten an sechs verschiedenen Strukturen bzw. Organsystemen ausgewertet, bei denen sich im Verlauf der Versuchsreihen Färbung zeigte und die mit der klinischen Symptomatik vereinbar sind: periphere Nerven, Spinalganglien, Strukturen innerhalb des ZNS (aufgeteilt in Rückenmark- und Großhirnparenchym), Blutgefäße und quergestreifte Muskulatur. In den folgenden Bildern (Abbildungen 7-12) sind Beispiele für einige der genannten Bindungen aufgezeigt. Die statistische Auswertung erfolgte anhand der Vergleiche der in 2.2.7 genannten Einteilung der Färbeintensitäten. Diese sind, nach folgenden Gruppierungen aufgeteilt, in Scatterplots graphisch dargestellt: eine geschlechtsspezifische und -unspezifische Gegenüberstellung aller Patienten gegenüber allen Kontrollprobanden, ein geschlechtsunspezifischer Vergleich zwischen den Diagnosegruppen CRPS und FMS sowie eine diagnosenunabhängige Gegenüberstellung zwischen allen Männern und allen Frauen. Aufgrund des Skallenniveaus und der gemäß Komolgorov-Smirnov-Test stets nicht normal verteilten Daten werden in den Graphen Mediane und in den entsprechenden Tabellen zusätzlich Interquartilenbereiche angegeben.

Insgesamt ergaben sich anhand der gemessenen Parameter keinerlei signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppierungen. Vereinzelt wurden starke Antikörperbindungen beobachtet, jedoch sowohl bei Patienten als auch bei gesunden Kontrollprobanden.

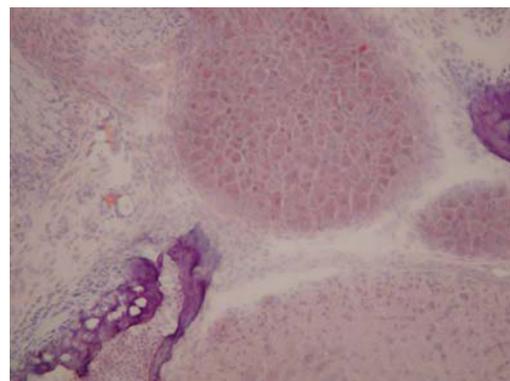
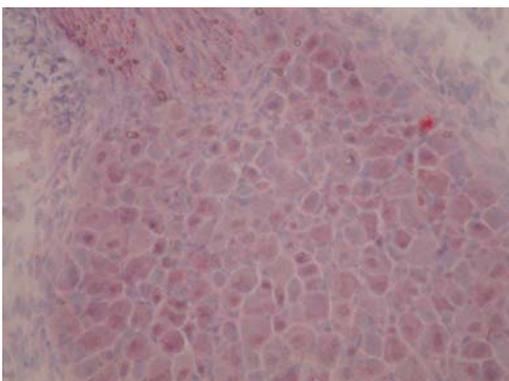
Bei Färbungen mit den im vorangegangenen In-vivo-Modell verwendeten Seren der CRPS-Patientin und der Kontrollprobandinnen wurden keine eindrucklichen Antikörperbindungen an den untersuchten Strukturen bzw. Organsystemen gesehen.



Abbildungen 7 und 8:
Beispiele für Antikörperbindungen an peripheren Nerven (20- und 4-fache Vergrößerung).

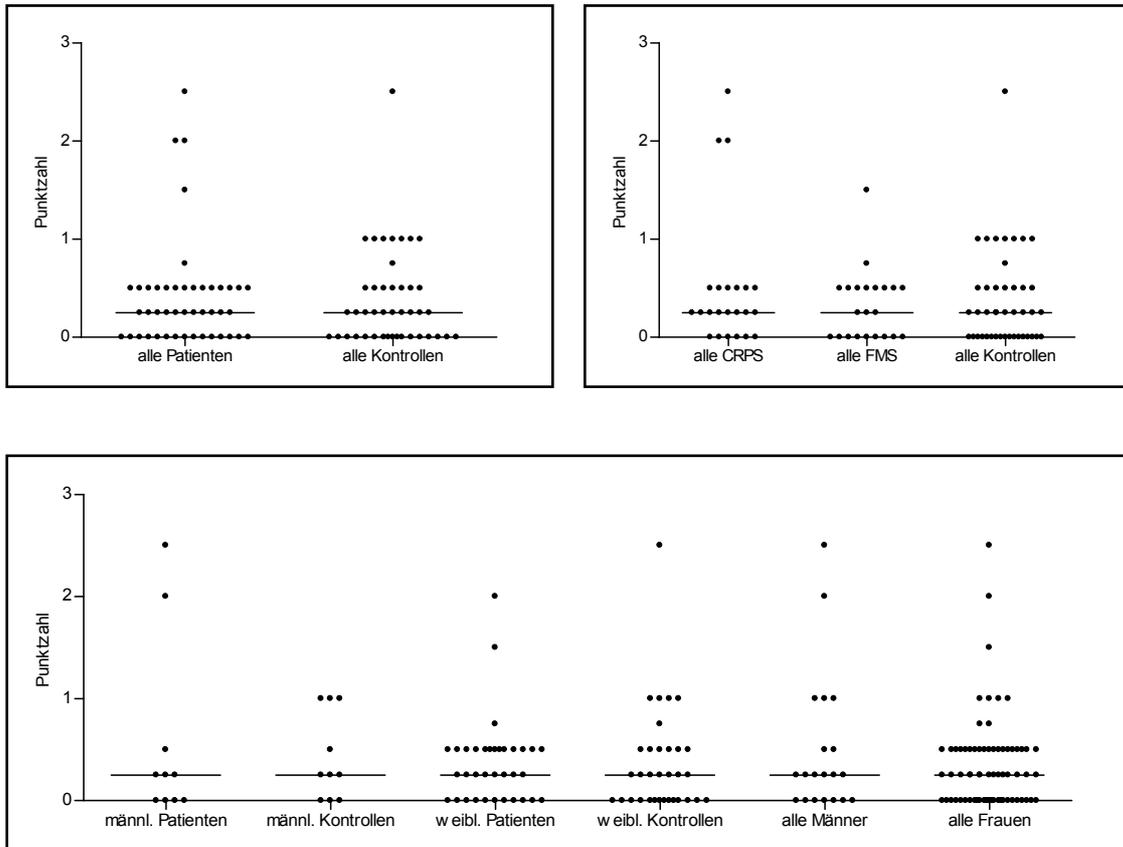


Abbildungen 9 und 10:
Beispiele für Antikörperbindungen an Strukturen des Rückenmarks (20- und 10-fache Vergrößerung).



Abbildungen 11 und 12:
Beispiele für Antikörperbindungen an Spinalganglien (20- und 10-fache Vergrößerung).

3.2.2.1 Immunreaktivität gegen periphere Nerven

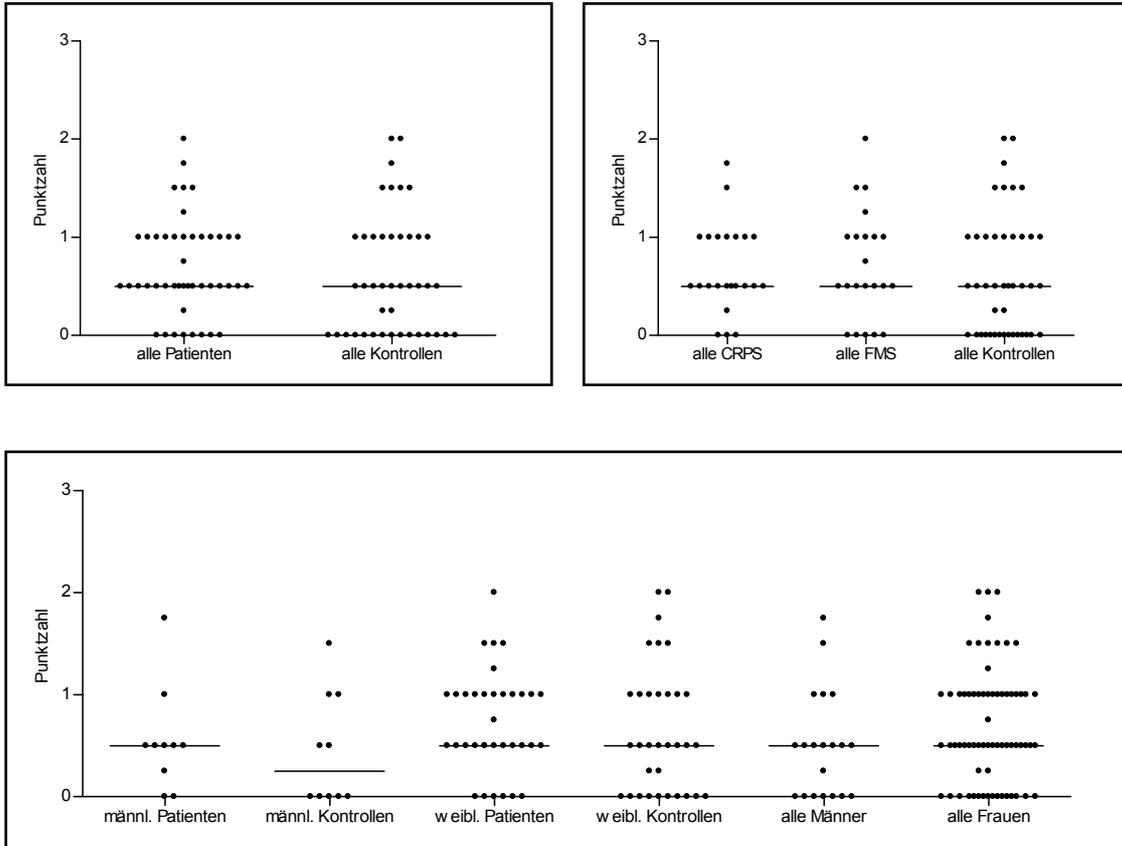


Graphen 24-26:
Bindungsstärken von Serumantikörpern an peripheren Nerven.

	Anzahl	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
alle Patienten	45	0,00	2,50	0,25	0,00-0,50	0,792
alle Kontrollen	43	0,00	2,50	0,25	0,00-0,50	(ns)
alle CRPS-Patienten	23	0,00	2,50	0,25	0,00-0,50	0,656
alle FMS-Patienten	22	0,00	1,50	0,25	0,00-0,50	(ns)
alle männlichen Patienten	10	0,00	2,50	0,25	0,00-1,25	0,796
alle männlichen Kontrollen	10	0,00	1,00	0,25	0,00-1,00	(ns)
alle weiblichen Patienten	35	0,00	2,00	0,25	0,00-0,50	0,600
alle weiblichen Kontrollen	33	0,00	2,50	0,25	0,00-0,50	(ns)
alle Männer	20	0,00	2,50	0,25	0,00-0,75	0,810
alle Frauen	68	0,00	2,50	0,25	0,00-0,50	(ns)

Tabelle 16:
Bindungsstärken von Serumantikörpern an peripheren Nerven.

3.2.2.2 Immunreaktivität gegen Spinalganglien

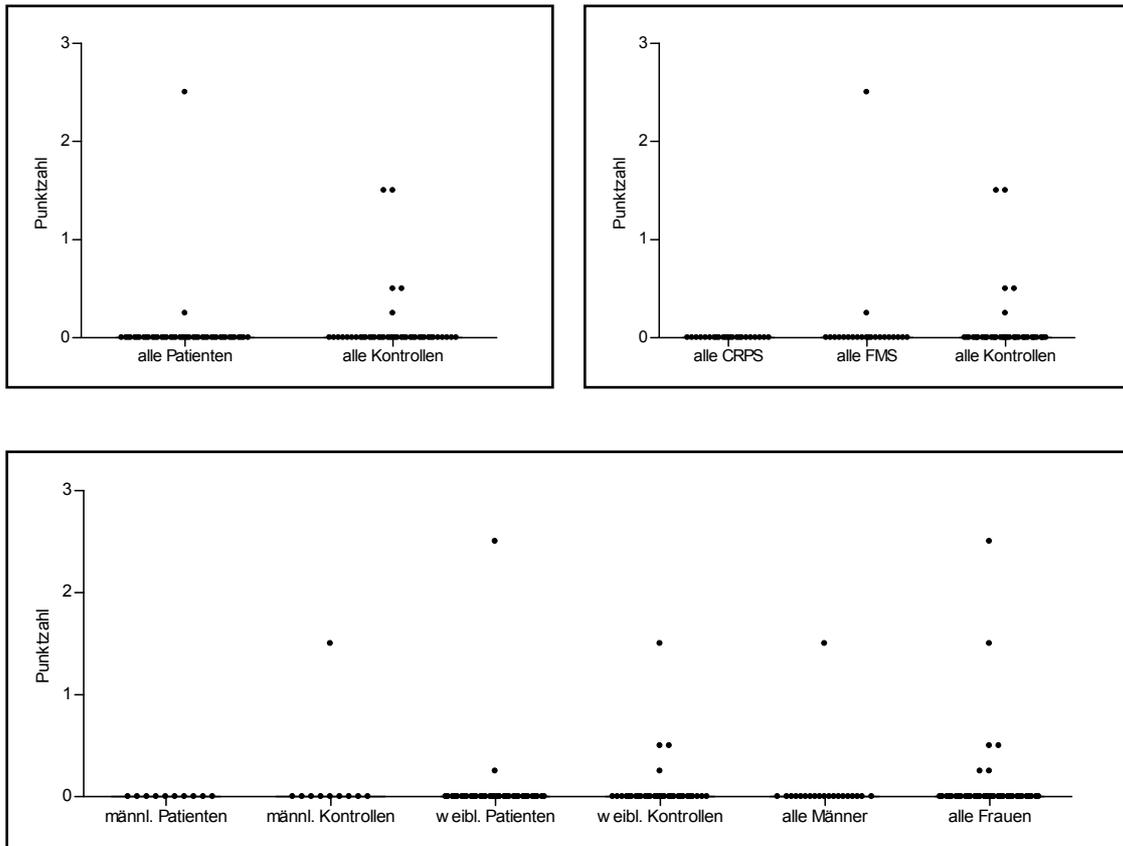


Graphen 27-29:
Bindungsstärken von Serumantikörpern an Spinalganglien.

	Anzahl	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
alle Patienten	45	0,00	2,00	0,50	0,50-2,00	0,317
alle Kontrollen	43	0,00	2,00	0,50	0,00-1,00	(ns)
alle CRPS-Patienten	23	0,00	1,75	0,50	0,50-1,00	0,900
alle FMS-Patienten	22	0,00	2,00	0,50	0,25-1,00	(ns)
alle männlichen Patienten	10	0,00	1,75	0,50	0,125-0,75	0,579
alle männlichen Kontrollen	10	0,00	1,50	0,25	0,00-1,00	(ns)
alle weiblichen Patienten	35	0,00	2,00	0,50	0,50-1,00	0,409
alle weiblichen Kontrollen	33	0,00	2,00	0,50	0,00-1,00	(ns)
alle Männer	20	0,00	1,75	0,50	0,00-0,75	0,159
alle Frauen	68	0,00	2,00	0,50	0,25-1,00	(ns)

Tabelle 17:
Bindungsstärken von Serumantikörpern an Spinalganglien.

3.2.2.5 Immunreaktivität gegen quergestreifte Muskulatur



Graphen 36-38:

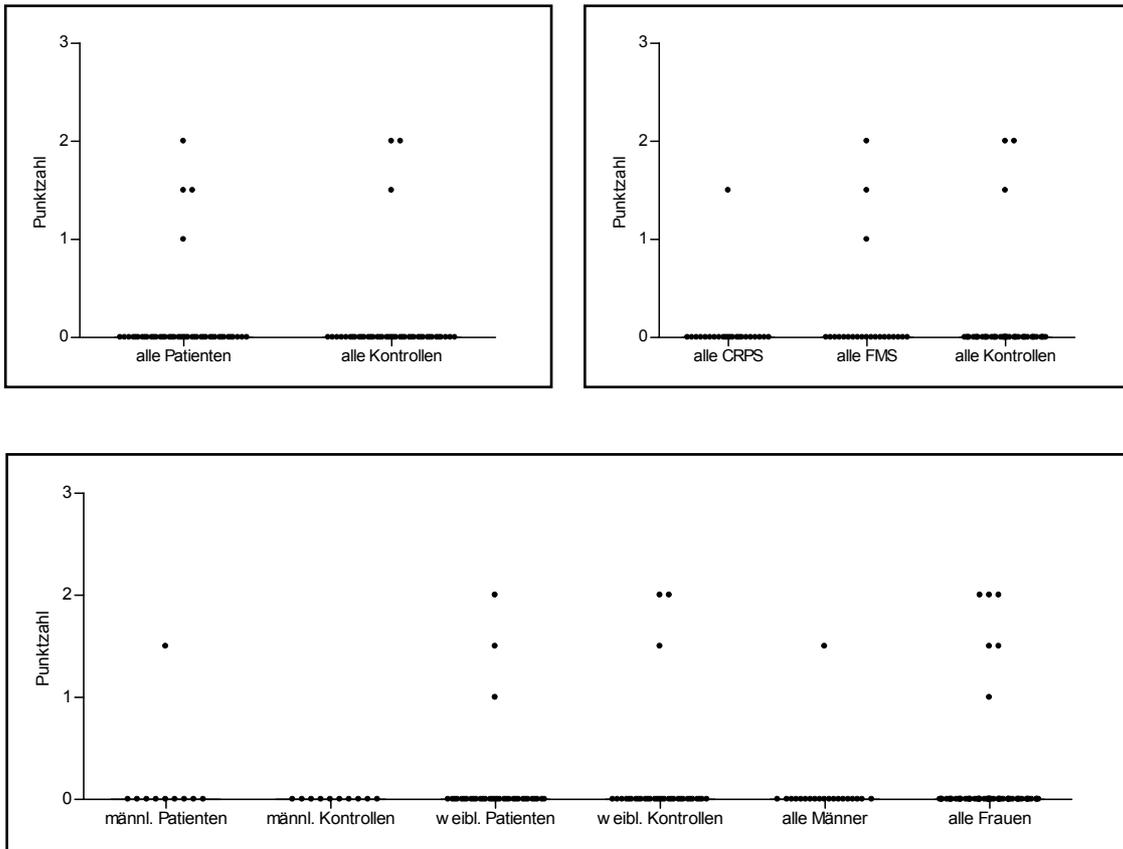
Bindungsstärken von Serumantikörpern an quergestreifter Muskulatur.

	Anzahl	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
alle Patienten	45	0,00	2,50	0,00	0,00-0,00	0,548
alle Kontrollen	43	0,00	1,50	0,00	0,00-0,00	(ns)
alle CRPS-Patienten	23	0,00	0,00	0,00	0,00-0,00	0,500
alle FMS-Patienten	22	0,00	2,50	0,00	0,00-0,00	(ns)
alle männlichen Patienten	10	0,00	0,00	0,00	0,00-0,00	1,00
alle männlichen Kontrollen	10	0,00	1,50	0,00	0,00-0,00	(ns)
alle weiblichen Patienten	35	0,00	2,50	0,00	0,00-0,00	0,643
alle weiblichen Kontrollen	33	0,00	1,50	0,00	0,00-0,00	(ns)
alle Männer	20	0,00	1,50	0,00	0,00-0,00	0,800
alle Frauen	68	0,00	2,50	0,00	0,00-0,00	(ns)

Tabelle 20:

Bindungsstärken von Serumantikörpern an quergestreifter Muskulatur.

3.2.2.6 Immunreaktivität gegen Blutgefäße



Graphen 39-41:
Bindungsstärken von Serumantikörpern an Blutgefäßen.

	Anzahl	Min	Max	Med	IQB	P-Wert
alle Patienten	45	0,00	2,00	0,00	0,00-0,00	0,895
alle Kontrollen	43	0,00	2,00	0,00	0,00-0,00	(ns)
alle CRPS-Patienten	23	0,00	1,50	0,00	0,00-0,00	0,583
alle FMS-Patienten	22	0,00	2,00	0,00	0,00-0,00	(ns)
alle männlichen Patienten	10	0,00	1,50	0,00	0,00-0,00	1,000
alle männlichen Kontrollen	10	0,00	0,00	0,00	0,00-0,00	(ns)
alle weiblichen Patienten	35	0,00	2,00	0,00	0,00-0,00	0,954
alle weiblichen Kontrollen	33	0,00	2,00	0,00	0,00-0,00	(ns)
alle Männer	20	0,00	1,50	0,00	0,00-0,00	0,780
alle Frauen	68	0,00	2,00	0,00	0,00-0,00	(ns)

Tabelle 21:
Bindungsstärken von Serumantikörpern an Blutgefäßen.

4. Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Methodik des Passive-Transfer-Modells

Die Methodik des „Passive-transfer of disease“ wurde bereits bei anderen Erkrankungen erfolgreich eingesetzt, um das Vorliegen einer humoralen Autoimmunpathogenese zu bestätigen, so z. B. bei der Myasthenia gravis⁹⁸, dem Stiff-Person-Syndrom⁹⁹ oder der Präeklampsie¹⁰⁰. Der Terminus „passiv“ ist dabei im Sinne einer Immunisierung aufzufassen. Das Prinzip beruht auf der Injektion von Serum, Plasma oder fraktionierten Plasmabestandteilen, insbesondere separierten Immunglobulinen eines Patienten mit der jeweiligen Erkrankung in Versuchstiere. Diese Injektion erfolgt meist systemisch, in eine periphere Vene oder in den Peritonealraum, bei speziellen Fragestellungen auch lokal, beispielsweise in das zerebrale Ventrikelsystem. Stellen sich dann im Verlauf für die Erkrankung charakteristische Symptome auch bei den Tieren ein, gilt dies als deutlicher Hinweis für die Pathogenität der injizierten Serum- bzw. Plasmafaktoren. Gegebenenfalls ist zudem noch eine gesonderte Gabe von Effektorproteinen nötig, wie z. B. von Komplementfaktoren, um die entsprechenden Symptome zu induzieren oder zusätzlich zu verstärken.

Voraussetzung bei solchen Experimenten ist eine vorliegende Kreuzreaktivität der Antikörper des Patienten mit dem Zielantigen des Versuchstieres. Diese wird normalerweise bei bekanntem oder vermutetem Antigen zunächst mittels indirekter Immunhistochemie oder anderer immunchemischer Methoden an Gewebe eines Tieres desselben Stammes nachgewiesen. Da im vorliegenden Fall, d. h. bei chronischen Schmerz Erkrankungen und insbesondere beim CRPS, bislang keinerlei Hinweise auf das Vorliegen einer Autoimmunpathogenese mit bekannten Autoantigenen vorlagen, erfolgte hier die umgekehrte Vorgehensweise, d. h. beginnend mit dem Passive-Transfer-Modell. Bei deutlichen Hinweisen auf die Präsenz von pathogenen Serumfaktoren im Tiermodell erfolgte als erste weitere Aufarbeitung die indirekte Immunhistochemie zur qualitativen bzw. semiquantitativen Detektion von Antikörperbindungen an murinem Gewebe.

4.1.1.1 Auswahl von Patienten- und Kontrollseren, Injektionsschema und Verhaltenstests

Die für das Passive-Transfer-Modell rekrutierte Patientin mit CRPS Typ I der rechten Hand wurde u. a. deshalb ausgewählt, weil sie in der Vergangenheit einen deutlichen, reproduzierbaren Effekt auf die Therapie mit gepoolten, humanen Immunglobulinpräparaten zeigte, was eine Beteiligung des Immunsystems an der Erkrankung erahnen lässt. Des Weiteren lag ein nur minimales auslösendes Trauma vor, sodass von keinerlei persistierender Lokalpathologie durch die vorausgegangene Verletzung ausgegangen werden kann. Die Patientin zeigte zudem viele klassische Symptome eines CRPS, wie Schwellung, livide Verfärbung und Kälte der Haut, einen typischen, starken Schmerz von brennendem Charakter und Kälteallodynie sowie geringgradige sensible Defizite, die keinem Versorgungsgebiet eines peripheren Nerven oder einer Nervenwurzel zugeordnet werden konnten. Die Hauptkriterien für die Gewinnung des von vier weiblichen Probanden gepoolten Serums, das den Kontrollmäusen injiziert wurde, waren das Fehlen von CRPS-typischen Beschwerden sowie von anderen chronischen Schmerzzuständen oder Grunderkrankungen.

Der Zeitplan und das Injektionsschema des Experiments waren so gewählt, dass durch mehrmalige tägliche Injektion von Serum ein hoher Plasmaspiegel von humanen Serumproteinen in der Blutzirkulation der Mäuse aufgebaut wurde. Die täglich injizierte Menge von einem Milliliter Serum war die durch Tierschutzbestimmungen in Großbritannien beschränkte, maximal mögliche Dosis. Da es sich im beschriebenen Experiment um einen Vorversuch handelte, wurden hierzu Verhaltenstests gewählt, die einen globalen Überblick über Spezies-spezifisches Verhalten zulassen und sensitive, aber unspezifische Marker für Gesundheitsstörungen darstellen. Die Durchführung von Schmerztests im eigentlichen Sinne, d. h. das bewusste Zufügen von schmerzhaften Stimuli wie mit dem Tail-flick-, dem Hot-plate-Test und anderen¹⁰¹ war nicht möglich, da eine hierfür notwendige, gesonderte Lizenz nicht vorlag. Es gibt jedoch Hinweise, dass eine Reduktion der explorativen Aktivität, wie sie hier beschrieben wurde, auch als Ausdruck chronischer Schmerzzustände interpretiert werden kann¹⁰².

Der Food-displacement-Test diente zur Generierung von Ausgangswerten und wurde deshalb bereits vor den Injektionen erstmalig durchgeführt, um die Tiere anhand der Ergebnisse in die beiden Behandlungsgruppen aufzuteilen. Dieser Test erfasst das instink-

tive, explorative Verhalten von Nagetieren, Höhlen zu graben und unterliegt, wenn überhaupt, nur einer geringen Habituation und ist damit demnach häufiger durchführbar als andere Verhaltenstests.

Der Hauptparameter, der im Open-Field-Test beurteilt wird, ist ebenfalls die Exploration, wobei diese durch eine Vielzahl von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden kann, wie beispielsweise durch motorische Defizite oder Angst. Zudem unterliegt dieser Test einer deutlichen Habituation, eine repetitive Durchführung dieses Versuchs mit geringen zeitlichen Abständen ist daher nicht möglich bzw. verliert deutlich an Aussagekraft, weil die Motivation der Tiere von Mal zu Mal abnimmt. Aus diesem Grund wurde bei diesem Test auf die Gewinnung von Ausgangsdaten vor Beginn der Injektionen unter der Hypothese verzichtet, dass das explorative Verhalten im Food-displacement-Test hinreichend beurteilbar und eine Verteilung der Versuchstiere in die beiden Behandlungsgruppen anhand der akquirierten Daten möglich war.

4.1.1.2 Befunde aus den tierexperimentellen Untersuchungen und deren Aussagekraft

Im durchgeführten Passive-Transfer-Experiment zeigten sich im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Veränderungen von Spezies-spezifischem Verhalten von Mäusen, denen Serum der Patientin mit CRPS injiziert wurde. Insbesondere war eine Reduktion der explorativen und lokomotorischen Aktivität zu verzeichnen.

Der Food-displacement-Test wurde ursprünglich zur Beurteilung der Aktivität über Nacht etabliert. Da bei diesem Messzeitraum jedoch häufig ein „Ceiling-Effekt“ beobachtet wird, d. h. dass viele der Mäuse die komplette Futtermenge ausgraben, wurde um dies zu vermeiden, die Messung nach zwei Stunden als zusätzlicher Parameter mit aufgenommen. Dieser Messzeitraum ist international ebenfalls akzeptiert¹⁰³. Interessanterweise zeigte sich eine deutliche Diskrepanz im zeitlichen Auftreten verschiedener Verhaltensänderungen: Während die Gesamtzahl aller „Rears“ im Open-Field-Test und die Aktivität im Food-displacement-Test an Tag 2 am stärksten reduziert waren, erschien dies für die Latenzzeit zum ersten „Rear“ und die Zahl der erlaufenen Quadrate an Tag 8 im offenen Feld am deutlichsten. Die explorative Aktivität der Tiere, gemessen an der ausgegrabenen Futtermenge im Food-displacement-Test, war jedoch an Tag 2 gegenüber dem Ausgangswert ebenfalls deutlich reduziert, so dass vermutet wer-

den muss, dass humanes Serum per se einen deutlichen Effekt auf die Exploration der Tiere hat. Dies muss ggf. in weiteren Experimenten untersucht werden, unter Einbeziehung einer Behandlungsgruppe, deren Tieren eine neutrale Lösung, wie etwa NaCl, anstelle von Serum injiziert wird.

Aufgrund einer hohen Streuung der Daten und der im Verlauf reduzierten Gruppengröße der Kontrollmäuse ist die statistische Beurteilbarkeit jedoch eingeschränkt.

Da sich die Tiere zwischen den einzelnen Testungen normal in ihren Käfigen verhielten und dort auch keine Auffälligkeiten in motorischem oder sozialem Verhalten zu verzeichnen waren, sind die genannten Verhaltensänderungen weniger als Ausdruck einer generellen Malaise zu interpretieren, wie sie beispielsweise im Rahmen eines Endotoxinschocks, etwa bei verunreinigten Proben, zu erwarten gewesen wären. Vielmehr schien, insbesondere beim Open-Field-Test, ein separater Stressor, wahrscheinlich die abrupte Situationsänderung, als sekundärer Faktor ausschlaggebend für das beobachtete Verhalten zu sein. Diese Hypothese wird auch dadurch unterstützt, dass auch das stark ausgeprägte Shivering und die Piloerektion nur unter dieser Situation auftraten. Um zu klären, ob die beobachteten Effekte tatsächlich durch Antikörperbindungen hervorgerufen wurden, bedarf es einer weiterführenden histopathologischen Aufarbeitung der verschiedenen post mortem entnommenen Gewebe. Da keine weiteren Effektorproteine, wie humanes Komplement appliziert wurden und das mauseigene Komplementsystem nicht durch humane Immunglobuline aktiviert wird, ist davon auszugehen, dass keine Entzündungsreaktion im eigentlichen Sinne, sondern eher eine Modulation des Zielantigens, möglicherweise eines Rezeptors des sympathischen Nervensystems im pharmakologischen Sinne der Imitation eines Liganden zugrunde liegt. Obwohl die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten unter der Hypothese einer fehlgeleiteten humoralen Immunreaktion im Sinne der Existenz von pathogenen Autoantikörpern interpretiert werden, müssen ebenso andere Bestandteile des Patientenserums als möglicherweise kausal für die beobachteten Symptome diskutiert werden. So verdichten sich in der Literatur Hinweise auf den Einfluss anderer Botenstoffe, wie beispielsweise etwa von Zytokinen, Chemokinen und anderen in der Pathogenese chronischer Schmerzsyndrome und assoziierter Symptome, obgleich eine Interaktion solcher humaner Immunmediatoren mit den korrespondierenden Rezeptorsystemen der Mäuse bezweifelt werden muss. Da die Seren vor Injektion einer Hitzebehandlung unterzogen wurden, sind diese Mediator-

ren, insbesondere auch das Komplement, als pathogene Faktoren zudem eher unwahrscheinlich. Eine Verschiebung des Ionengleichgewichts als Ursache der Verhaltensänderungen kann ebenfalls ausgeschlossen werden, da alle injizierten Serumproben zuvor gegen physiologische Kochsalzlösung dialysiert wurden. Um letztendlich die Existenz von pathogenen Autoantikörpern im Serum der Patientin zu belegen, müssen in weiteren Versuchsreihen einzelne Immunglobulinfractionen aus dem Serum aufgereinigt, separat den Versuchstieren injiziert und die durchgeführten Tests reproduziert werden, vorzugsweise unter Einbeziehung von Testungen, welche die Kardinalsymptomatik, die persistierenden Schmerzen, erfassen. Zudem muss der Nachweis eines solchen Autoantikörpers mit immunchemischen Methoden gelingen, d. h. mittels Immunhistochemie, Immunoblot oder anderen. Sowohl Patienten- als auch Kontrollseren wurden wie oben beschrieben mit indirekter Immunhistochemie auf das Vorliegen von Autoantikörpern untersucht, wobei sich kein eindrücklicher Befund einer Immunreaktivität gegen die untersuchten Organsysteme zeigte. Auch die im beschriebenen In-vivo-Experiment verwendeten Seren der Patientin mit CRPS und der Kontrollprobandinnen wurde in die immunhistochemischen Untersuchungen einbezogen und auch bei Färbungen mit diesen Serumproben wurden an keinem Organsystem der Maus eindrückliche Antikörperbindungen festgestellt. In einer Arbeit von *Blaes et al.*¹⁰⁴, die nach Durchführung der hier beschriebenen Experimente erschien, wurde der Nachweis eines solchen Autoantikörpers erbracht. Mittels Immunhistochemie und Western-Blot-Analysen wurden Seren von Patienten mit CRPS und von gesunden Kontrollprobanden untersucht. Immunhistochemisch wurden bei 41,6% der Patienten Autoantikörper gegen Strukturen des autonomen Nervensystems beschrieben. Im Western-Blot wurden bei 91,6% (11 von 12) der Patienten Autoantikörper gegen diverse, bislang nicht näher klassifizierte neuronale Strukturen detektiert. In der Kontrollgruppe waren immunhistochemisch keine Autoantikörper nachweisbar, im Western-Blot zeigten 10% (2 von 20) der Kontrollen schwache Immunreaktivitäten.

In weiteren Versuchen muss zudem evaluiert werden, welcher Immunglobulinklasse bzw. -subklasse die detektierten Autoantikörper zugehörig sind und ob die im beschriebenen In-vivo-Experiment beobachteten Verhaltensänderungen durch zusätzliche Gabe von Komplementfaktoren verstärkt werden können.

Sollte sich bei solchen weiterführenden Untersuchungen der Verdacht auf ein bestimmtes Autoantigen richten, wäre in der weiteren Beweisführung auch die aktive Immunisierung von Versuchstieren angezeigt, wobei dem Versuchstier das vermutete Autoantigen und weitere Adjuvantien injiziert werden, sodass das körpereigene Immunsystem des Tieres dann in überschießendem Maße spezifische Autoantikörper und T-Zell-Klone gegen dieses Antigen bildet und damit möglicherweise indirekt erneut die beobachteten Symptome hervorruft. Ein Beispiel für ein solches Modell ist die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)¹⁰⁵, bei der die systemische Injektion diverser Proteine des ZNS eine autoimmune Entzündung von Gehirn und Rückenmark, ähnlich wie bei der Multiplen Sklerose, induziert. Diese Methode ist besser reproduzierbar als der passive Transfer, da man nicht auf Patientenserum angewiesen ist und der Versuchsaufbau daher unabhängig vom durchführenden Labor als standardisiertes Tiermodell für das CRPS bzw. andere Schmerzsyndrome fungieren könnte.

4.1.2 Methodik der immunhistochemischen Detektion von Autoantikörpern mittels indirekter Immunhistochemie; Aussagekraft und Anwendung in der experimentellen und klinischen Diagnostik

Die indirekte Immunhistochemie ist eine Methode, um Autoantikörper in Patientenserum nachzuweisen. Hierzu werden dünne Schnitte eines Gewebes, in welchem potentielle Autoantigene vermutet werden, angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Für die vorliegende Arbeit wurden Gewebepreparate von jungen Mäusen des Stammes C57BL/6 verwendet, da viele Antigene dieser Mäuse strukturell den korrespondierenden humanen Antigenen sehr ähnlich sind, sodass eine hohe Kreuzreaktivität besteht und die Wahrscheinlichkeit, dass etwaige Autoantikörper des Patienten auch an den Antigenen des Mausgewebes binden, sehr hoch ist. Außerdem wurden Mäuse dieses Stammes im vorangegangenen In-vivo-Experiment verwendet. Diese Methodik ist so weit etabliert, dass sie Einzug in die klinische Routinediagnostik gefunden hat, wie beispielsweise bei der autoimmunen, paraneoplastischen zerebellären Degeneration¹⁰⁶ oder dem systemischen Lupus erythematodes¹⁰⁷. Zudem bietet sie, wie im vorliegenden Experiment durchgeführt, einen weiten Überblick über viele verschiedene Organsysteme, da der gesamte Mausekörper in den Gewebepreparaten abgebildet wird.

Auf den Gewebsschnitt wird eine Verdünnung des zu untersuchenden Patientenserums aufgebracht und für eine bestimmte Zeit inkubiert. Sind Autoantikörper in dieser Serumprobe vorhanden, so binden sie in dieser Zeit das entsprechende Autoantigen des Gewebes. Daraufhin wird die Serumverdünnung abgenommen, das Gewebepräparat ausgewaschen, um nicht gebundene Serumbestandteile zu entfernen und mit einem zweiten, gegen menschliche Immunglobuline gerichteten Antikörper inkubiert, der an ein Enzym gekoppelt ist, welches in einem weiteren Schritt ein Substrat zu einem Farbstoff umwandelt, sodass überall dort, wo Antikörperbindungen stattgefunden haben, das Gewebe spezifisch angefärbt wird. Das Gewebe kann nun unter dem Lichtmikroskop begutachtet werden. Da bei dieser Methode eine Gegenfärbung aller anderen Strukturen möglich ist, besteht hier die Möglichkeit der anatomischen Orientierung, da auch alle anderen, nicht von Antikörpern gebundenen Strukturen, zu erkennen sind.

Immunhistochemische Verfahren eignen sich in der experimentellen Forschung zur Suche von Autoantigenen bei Erkrankungen mit ungeklärter Pathogenese gut als Screening-Methode, um sich einen allgemeinen Überblick über das Bindungsverhalten von Serumautoantikörpern zu verschaffen, bevor zu weiteren, spezielleren Verfahren, wie Western-Blot-Analysen, Immunfärbungen an bestimmten Zelllinien oder der Verwendung von Expressionsdatenbanken übergegangen wird. Nachteilig bei der Immunhistochemie ist, dass es sich um eine eher qualitative Methode handelt. Quantitative Aussagen über die Bindungsstärke der Autoantikörper lassen sich demnach nur durch die subjektive Beurteilung durch den Beobachter machen. Sie eignet sich zwar wie oben beschrieben für die klinische Routinediagnostik, um die Präsenz von Autoantikörpern nachzuweisen, eine absolute Quantifizierung eines Antikörpertiters ist jedoch nicht möglich, hierzu bedarf es weiterer Methoden, wie ELISAs, RIAs oder der Immunpräzipitation. Auch die Vergleichbarkeit verschiedener Proben untereinander ist erschwert, da aus organisatorischen Gründen nur eine geringe Anzahl an Färbungen in einem Teilexperiment möglich ist. Zudem werden eher intrazelluläre, zytoplasmatische und nukleäre als extrazelluläre, membranständige Antigene angefärbt, da die einzelnen Zellen des Gewebepräparats durchschnitten werden, anders als beispielsweise bei Immunfärbungen an Zelllinien, bei welchen intakte Zellen gefärbt werden.

4.1.2.1 Charakterisierung des Patienten- und Kontrollkollektivs

4.1.2.1.1 Modus der Rekrutierung, Alters- und Geschlechtsgruppierung

Das Patientenkollektiv wurde aus ambulant in der Schmerzambulanz der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg behandelten Patienten rekrutiert und kann bezüglich Alters- und Geschlechtsverteilung als repräsentativ für die dort therapierten Patienten erachtet werden. Die Einschlusskriterien für die Patienten waren das Vorliegen eines CRPS oder eines Fibromyalgiesyndroms. Diese beiden Schmerzerkrankungen wurden bewusst gewählt, da sie sich bezüglich klinisch-phänotypischer Präsentation und anatomischer Ausbreitung deutlich unterscheiden. Somit sollte untersucht werden, ob etwaige serologische Befunde pathognomonisch für bestimmte Schmerzerkrankungen sind oder unspezifische, generelle Suszeptibilitätsfaktoren für die Entwicklung chronischer Schmerzzustände darstellen.

Den insgesamt 45 Schmerzpatienten konnten 43 Kontrollprobanden zugeordnet werden. Der Rekrutierungszeitraum der Schmerzpatienten reichte von Juni 2001 bis Januar 2002, der der Kontrollprobanden von August bis Dezember 2001, sodass kein signifikanter Einfluss durch unterschiedliche Lagerungszeiten der Proben bei -80 °C entstehen konnte.

4.1.2.1.2 Alters- und Geschlechtsverteilung in Haupt- und Untergruppen der Diagnosen

Das Durchschnittsalter der Patienten der beiden verschiedenen Schmerzdiagnosen unterschied sich nicht signifikant. Der deutlich höhere Anteil an weiblichen Patienten bei beiden Diagnosen wurde bereits als charakteristisch erläutert und findet sich auch in den vorliegenden Untersuchungen, der Anteil der männlichen Patienten mit Fibromyalgiesyndrom, der in der Literatur mit etwa 10% angegeben wird, fehlt hier jedoch gänzlich.

4.1.2.2 Serologische Befunde, Aussagekraft und Bewertungsmodus

Wie in 4.1.2 beschrieben ist eine Quantifizierung der Bindungsstärke von Antikörpern an Gewebsstrukturen nur semiquantitativ möglich und die Vergleichbarkeit einzelner Färbeserien diesbezüglich eingeschränkt. In der mikroskopischen Auswertung ergaben sich durchaus vereinzelt Befunde, die mit der klinischen Symptomatik vereinbar sind, nämlich beispielsweise Antikörperbindungen an nicht näher charakterisierten vaskulä-

ren, peripher- oder zentralnervösen Strukturen. Solche Bindungen wurden jedoch auch vereinzelt bei gesunden Kontrollen beobachtet und sind somit am ehesten als unspezifische Immunreaktion unklarer Signifikanz einzuordnen. Insgesamt wurde keine eindeutige Zielorganstruktur gefunden, sodass eine dort stattfindende Antikörperbindung als pathognomonisch für die untersuchten Schmerzsyndrome erachtet werden könnte. Da der verwendete Zweitantikörper unspezifisch Immunglobuline der Klassen IgG, IgA und IgM detektiert, ist eine genaue Aussage über die Immunglobulinklasse der beobachteten Autoantikörper nicht möglich.

Zusammenfassend erlauben die hier erhobenen Daten demzufolge nicht die Erstellung eines kausalen, pathophysiologischen Zusammenhangs zwischen dem Auftreten von Autoantikörpern gegen verschiedenartige Antigene und chronischen Schmerzsyndromen oder schmerzassoziierten Symptomen.

Wie in 4.1.1.2 erwähnt, wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ein Autoantikörper beim CRPS identifiziert. In dieser Arbeit wurden mittels Western-Blot-Analysen und Immunhistochemie Bindungen an Strukturen eines isolierten Organs, an Gewebe des sympathischen Nervensystems, identifiziert. Ein wahrscheinlicher Grund, warum diese Befunde in der vorliegenden Arbeit nicht erhoben werden konnten, ist die histologische Aufarbeitung der Gewebsschnitte und die Tatsache, dass sympathische Grenzstrangganglien auf nur wenigen, vereinzelt Gewebsschnitten vorhanden und zudem aufgrund der geringen Größe schlecht detektierbar waren.

4.1.2.3 Korrelation der Befunde des Patientenkollektivs mit den verschiedenen klinischen Schmerzdiagnosen

Bei der weiteren, differenzierten Betrachtung der Daten wurde untersucht, ob sich zwischen den beiden Diagnosegruppen CRPS und FMS Unterschiede bezüglich der Immunreaktivität zeigen. Dies war anhand keines der betrachteten Organsysteme, auch nicht tendenziell, der Fall. Somit konnte auch hier kein Marker im Sinne eines Antikörpers gefunden werden, der eine Differenzierung der beiden untersuchten Schmerzsyndrome zulässt.

4.1.2.4 Korrelation der Befunde beider Kollektive mit dem Geschlecht

Beim statistischen Vergleich aller weiblichen gegenüber allen männlichen Individuen bezüglich des Bindungsverhaltens zeigte sich nur bei der Untersuchung des Großhirnparenchyms ein geschlechtsspezifischer signifikanter Unterschied, wobei die Seren der Frauen durchschnittlich höhere Immunreaktivität gegen bislang nicht näher charakterisierte Antigene zeigten. Da diese aber nicht mit einer bestimmten Symptomatik in Verbindung gebracht werden kann, sind diese Befunde am ehesten als Epiphänomene zu diskutieren. Der wahrscheinlichste Grund für die Produktion von solchen nicht krankheitsrelevanten Antikörpern sind vermutlich zurückliegende Schwangerschaften, bei welchen dem Immunsystem der Mutter neuartige, fetale bzw. paternale Antigene präsentiert werden.

Auch bei anderen untersuchten Organsystemen zeigte sich diese Tendenz eines durchschnittlich stärkeren Bindungsverhaltens von Antikörpern bei weiblichen im Vergleich zu männlichen Individuen, erlangte aber keine statistische Signifikanz.

4.2 Diskussion über mögliche ätiopathologische Mechanismen bei der Entstehung chronischer idiopathischer Schmerzsyndrome unter Einbeziehung der vorliegenden Daten

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Schmerzsyndrome werden, wie oben erwähnt, zu idiopathischen Gesundheitsstörungen gerechnet, da die pathophysiologischen Mechanismen nach wie vor unbekannt sind. Aus der klinischen Erfahrung heraus ist eine große Heterogenität dieser Erkrankungen in der phänotypischen Präsentation und im zeitlichen Verlauf unübersehbar und es wird zunehmend die Meinung vertreten, dass eine Einteilung von chronischen idiopathischen Schmerzsyndromen anhand von anatomischer Lokalisation oder klinischem Phänotyp nicht sinnvoll ist. Demnach wird zunehmend eine Mechanismus-basierte Klassifikation gefordert^{108, 109}. Die Rationale zur Suche nach immunpathologischen Prozessen bei chronischen Schmerzsyndromen basiert u. a. auf der häufigen Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen, wie der Hashimoto-Thyreoiditis und dem Therapieerfolg bei einer Subgruppe von Schmerzpatienten mit intravenös verabreichten Immunglobulinpräparaten, wie sie oft auch erfolgreich bei anderen Erkrankungen mit autoimmunem Geschehen eingesetzt werden. Zudem weisen Patienten mit chronischen Schmerzsyndromen eine deutlich erhöhte Seropräva-

lenz von Antikörpern gegen virale und bakterielle Erreger auf²⁷⁻²⁹, sodass eine fehlgeleitete Immunreaktion im Sinne eines molekularen Mimikry, d. h. der Kreuzreaktivität solcher Antikörper mit körpereigenen Strukturen, denkbar ist. Da eine Beteiligung des sympathischen Nervensystems zur Entstehung und Aufrechterhaltung des CRPS bei einer Subgruppe von Patienten vermutet wird¹¹⁰, ist die von *Blaes et al.*¹⁰⁴ beschriebene Immunreaktivität gegen Strukturen des sympathischen Nervensystems vereinbar mit den Überlegungen zu einer Autoimmunpathologie dieser Erkrankung.

Bei dem hier beschriebenen In-vivo-Experiment handelt es sich zwar nur um einen Einzelfall, die Patientin, deren Serum in den Versuchsmäusen signifikante Verhaltensänderungen induzierte, könnte jedoch einer solchen Subgruppe angehören, bei der offensichtlich Autoimmunphänomene eine entscheidende Rolle spielen. Das weitläufig bekannte schlechte Ansprechen vieler dieser Patienten auf Glucocorticoide ist kein Argument gegen eine Autoimmunpathologie, da auch Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, insbesondere dem Guillain-Barré-Syndrom, nicht von Cortison-, jedoch deutlich von Immunglobulinpräparaten profitieren.

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden anhand eines Tiermodells zunächst Hinweise für die pathogene Relevanz von Serumfaktoren für die Entstehung von chronischen Schmerzsyndromen und assoziierten Symptomen gesucht. Es zeigten sich bei Versuchsmäusen nach intraperitonealer Injektion von Serum eines Patienten mit komplexem regionalem Schmerzsyndrom im Vergleich zu Kontrolltieren, denen Serum von gesunden Blutspendern injiziert wurde, Veränderungen des Spezies-spezifischen, explorativen Verhaltensmusters, welche erste Hinweise auf schmerzassoziiertes Verhalten liefern. Aufgrund dieser Befunde und der Hypothese der Präsenz einer humoralen Autoimmunreaktion bei der Entstehung chronischer Schmerzsyndrome wurde die Seroprävalenz für Antikörper gegen eine Vielzahl potentieller Autoantigene bei Patienten mit CRPS oder Fibromyalgiesyndrom im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden mittels immunhistochemischer Färbungen gegen murines Gewebe untersucht, wobei kein für die beschriebenen Schmerzerkrankungen pathognomonischer Autoantikörper identifiziert werden konnte. Die vorliegende Arbeit erfüllte ihren Zweck als Pilotprojekt, indem sie wichtige Daten lieferte, die für weitere Untersuchungen wegweisend sind. Dies bezieht sich im Besondern auf notwendige Änderungen bei den In-vitro-Methoden zur Detektion von Autoantikörpern. Zudem müssen die In-vivo-Experimente unter Einbeziehung algesiologischer Tests wiederholt und durch Fraktionierung der injizierten Serumproben erweitert werden, um gegebenenfalls Autoantikörper als Pathogene der Erkrankungen identifizieren zu können. Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Erkenntnisse bieten einen Einblick in mögliche pathophysiologische Mechanismen bei der Entstehung von chronischen, idiopathischen Schmerzzuständen und könnten als Basis für neue Überlegungen über den Einsatz immunmodulierender Therapiestrategien bei derartigen Syndromen dienen.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in

Goebel A, Stock M, Deacon R, Sprotte G, Vincent A.:

“Intravenous immunoglobulin response and evidence for pathogenic antibodies in a case of complex regional pain syndrome 1.”

Annals of Neurology 2005 März; 57(3):463-4

6. Literaturverzeichnis

1. Bonica, J. J. The need of a taxonomy. *Pain* 6, 247-8 (1979).
2. Merskey/Bogduk. *Classification of Chronic Pain, Second Edition* (IASP Press, Seattle, 1994).
3. Zenz, M. W., Jurna, I. & Ahrens, S. *Lehrbuch der Schmerztherapie Grundlagen, Theorie und Praxis für Aus- und Weiterbildung* (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1993, S. 89-108).
4. Eich, W. et al. [Definition, classification and diagnosis of fibromyalgia syndrome]. *Schmerz* 22, 255-66 (2008).
5. Sommer, C. et al. [Etiology and pathophysiology of fibromyalgia syndrome and chronic widespread pain]. *Schmerz* 22, 267-82 (2008).
6. Zenz, M. W., Jurna, I. & Ahrens, S. *Lehrbuch der Schmerztherapie Grundlagen, Theorie und Praxis für Aus- und Weiterbildung* (Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 1993, S. 785-793).
7. Kröner-Herwig, B. *Schmerzpsychotherapie Grundlagen - Diagnostik - Krankheitsbilder - Behandlung* (Springer Medizin Verl., Heidelberg, 2007, S. XXII).
8. Hains, B. C. & Waxman, S. G. Activated microglia contribute to the maintenance of chronic pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 26, 4308-17 (2006).
9. Twining, C. M. et al. Activation of the spinal cord complement cascade might contribute to mechanical allodynia induced by three animal models of spinal sensitization. *J Pain* 6, 174-83 (2005).
10. Sommer, C. et al. Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain Res* 913, 86-9 (2001).
11. Watkins, L. R. & Maier, S. F. Beyond neurons: evidence that immune and glial cells contribute to pathological pain states. *Physiol Rev* 82, 981-1011 (2002).
12. Minami, M., Katayama, T. & Satoh, M. Brain cytokines and chemokines: roles in ischemic injury and pain. *J Pharmacol Sci* 100, 461-70 (2006).
13. Wieseler-Frank, J., Maier, S. F. & Watkins, L. R. Central proinflammatory cytokines and pain enhancement. *Neurosignals* 14, 166-74 (2005).
14. Cornefjord, M., Nyberg, F., Rosengren, L. & Brisby, H. Cerebrospinal fluid biomarkers in experimental spinal nerve root injury. *Spine* 29, 1862-8 (2004).
15. Rittner, H. L. & Brack, A. Chemokines and pain. *Curr Opin Investig Drugs* 7, 643-6 (2006).
16. Watkins, L. R., Maier, S. F. & Goehler, L. E. Cytokine-to-brain communication: a review & analysis of alternative mechanisms. *Life Sci* 57, 1011-26 (1995).
17. Wieseler-Frank, J., Maier, S. F. & Watkins, L. R. Glial activation and pathological pain. *Neurochem Int* 45, 389-95 (2004).
18. Watkins, L. R., Milligan, E. D. & Maier, S. F. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. *Adv Exp Med Biol* 521, 1-21 (2003).
19. Jeanjean, A. P., Maloteaux, J. M. & Laduron, P. M. IL-1 beta-like Freund's adjuvant enhances axonal transport of opiate receptors in sensory neurons. *Neurosci Lett* 177, 75-8 (1994).
20. Moalem, G. & Tracey, D. J. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Brain Res Rev* 51, 240-64 (2006).
21. Watkins, L. R. & Maier, S. F. Immune regulation of central nervous system functions: from sickness responses to pathological pain. *J Intern Med* 257, 139-55 (2005).
22. Maier, S. F. & Watkins, L. R. Immune-to-central nervous system communication and its role in modulating pain and cognition: Implications for cancer and cancer treatment. *Brain Behav Immun* 17 Suppl 1, S125-31 (2003).
23. Oka, T., Aou, S. & Hori, T. Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta enhances nociceptive neuronal responses of the trigeminal nucleus caudalis in rats. *Brain Res* 656, 236-44 (1994).
24. Oka, T., Oka, K., Hosoi, M. & Hori, T. Intracerebroventricular injection of interleukin-6 induces thermal hyperalgesia in rats. *Brain Res* 692, 123-8 (1995).
25. Alexander, G. M., Perreault, M. J., Reichenberger, E. R. & Schwartzman, R. J. Changes in immune and glial markers in the CSF of patients with Complex Regional Pain Syndrome. *Brain Behav Immun* 21, 668-76 (2007).

26. Alexander, G. M., van Rijn, M. A., van Hilten, J. J., Perreault, M. J. & Schwartzman, R. J. Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. *Pain* 116, 213-9 (2005).
27. Goebel, A. et al. Immune responses to *Campylobacter* and serum autoantibodies in patients with complex regional pain syndrome. *J Neuroimmunol* 162, 184-9 (2005).
28. Goebel, A. Screening of patients with complex regional pain syndrome for antecedent infections. *Clin J Pain* 17, 378-9 (2001).
29. van de Vusse, A. C., Goossens, V. J., Kemler, M. A. & Weber, W. E. Screening of patients with complex regional pain syndrome for antecedent infections. *Clin J Pain* 17, 110-4 (2001).
30. Hahn, A. F. Guillain-Barre syndrome. *Lancet* 352, 635-41 (1998).
31. Gell, P. G. H. & Coombs, R. R. A. *Clinical aspects of immunology* (Blackwell, Oxford, 1963).
32. Caro, X. J., Winter, E. F. & Dumas, A. J. A subset of fibromyalgia patients have findings suggestive of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy and appear to respond to IVIg. *Rheumatology (Oxford)* 47, 208-11 (2008).
33. Goebel, A., Netal, S., Schedel, R. & Sprotte, G. Human pooled immunoglobulin in the treatment of chronic pain syndromes. *Pain Med* 3, 119-27 (2002).
34. Dalakas, M. C. The use of intravenous immunoglobulin in the treatment of autoimmune neuromuscular diseases: evidence-based indications and safety profile. *Pharmacol Ther* 102, 177-93 (2004).
35. Dalakas, M. C. Intravenous immunoglobulin in autoimmune neuromuscular diseases. *Jama* 291, 2367-75 (2004).
36. Dalakas, M. C. et al. High-dose intravenous immune globulin for stiff-person syndrome. *N Engl J Med* 345, 1870-6 (2001).
37. Dalakas, M. C. Intravenous immune globulin therapy for neurologic diseases. *Ann Intern Med* 126, 721-30 (1997).
38. Gold, R., Stangel, M. & Dalakas, M. C. Drug Insight: the use of intravenous immunoglobulin in neurology--therapeutic considerations and practical issues. *Nat Clin Pract Neurol* 3, 36-44 (2007).
39. Darabi, K., Abdel-Wahab, O. & Dzik, W. H. Current usage of intravenous immune globulin and the rationale behind it: the Massachusetts General Hospital data and a review of the literature. *Transfusion* 46, 741-53 (2006).
40. Stanton-Hicks, M. et al. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. *Pain* 63, 127-33 (1995).
41. Blumberg, H. & Hoffmann, U. [The so-called ischaemia test-a new diagnostic tool for reflex sympathetic dystrophy.]. *Schmerz* 6, 196-198 (1992).
42. Maleki, J., LeBel, A. A., Bennett, G. J. & Schwartzman, R. J. Patterns of spread in complex regional pain syndrome, type I (reflex sympathetic dystrophy). *Pain* 88, 259-66 (2000).
43. Ghai, B. & Dureja, G. P. Complex regional pain syndrome: a review. *J Postgrad Med* 50, 300-7 (2004).
44. Allen, G., Galer, B. S. & Schwartz, L. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. *Pain* 80, 539-44 (1999).
45. Birklein, F. Complex regional pain syndrome. *J Neurol* 252, 131-8 (2005).
46. Beckmann, J., Kock, F., Grifka, J. & Borisch, N. [CRPS type I psychological origin-case report]. *Z Rheumatol* 64, 581-5 (2005).
47. Gordh, T., Chu, H. & Sharma, H. S. Spinal nerve lesion alters blood-spinal cord barrier function and activates astrocytes in the rat. *Pain* 124, 211-21 (2006).
48. Gordh, T. & Sharma, H. S. Chronic spinal nerve ligation induces microvascular permeability disturbances, astrocytic reaction, and structural changes in the rat spinal cord. *Acta Neurochir Suppl* 96, 335-40 (2006).
49. Huber, J. D., Campos, C. R., Mark, K. S. & Davis, T. P. Alterations in blood-brain barrier ICAM-1 expression and brain microglial activation after lambda-carrageenan-induced inflammatory pain. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H732-40 (2006).
50. Huber, J. D. et al. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H1241-8 (2001).

51. Leis, S., Weber, M., Schmelz, M. & Birklein, F. Facilitated neurogenic inflammation in unaffected limbs of patients with complex regional pain syndrome. *Neurosci Lett* 359, 163-6 (2004).
52. Leis, S., Weber, M., Isselmann, A., Schmelz, M. & Birklein, F. Substance-P-induced protein extravasation is bilaterally increased in complex regional pain syndrome. *Exp Neurol* 183, 197-204 (2003).
53. Birklein, F., Schmelz, M., Schifter, S. & Weber, M. The important role of neuropeptides in complex regional pain syndrome. *Neurology* 57, 2179-84 (2001).
54. Weber, M., Birklein, F., Neundorfer, B. & Schmelz, M. Facilitated neurogenic inflammation in complex regional pain syndrome. *Pain* 91, 251-7 (2001).
55. Ramer, M. S., French, G. D. & Bisby, M. A. Wallerian degeneration is required for both neuropathic pain and sympathetic sprouting into the DRG. *Pain* 72, 71-8 (1997).
56. Ramer, M. S. & Bisby, M. A. Rapid sprouting of sympathetic axons in dorsal root ganglia of rats with a chronic constriction injury. *Pain* 70, 237-44 (1997).
57. Maihofner, C., Handwerker, H. O., Neundorfer, B. & Birklein, F. Patterns of cortical reorganization in complex regional pain syndrome. *Neurology* 61, 1707-15 (2003).
58. Maihofner, C., Handwerker, H. O., Neundorfer, B. & Birklein, F. Cortical reorganization during recovery from complex regional pain syndrome. *Neurology* 63, 693-701 (2004).
59. Pleger, B. et al. Patterns of cortical reorganization parallel impaired tactile discrimination and pain intensity in complex regional pain syndrome. *Neuroimage* 32, 503-10 (2006).
60. van de Beek, W. J., Roep, B. O., van der Slik, A. R., Giphart, M. J. & van Hilten, B. J. Susceptibility loci for complex regional pain syndrome. *Pain* 103, 93-7 (2003).
61. Rowbotham, M. C. Pharmacologic management of complex regional pain syndrome. *Clin J Pain* 22, 425-9 (2006).
62. Adami, S., Fossaluzza, V., Gatti, D., Fracassi, E. & Braga, V. Bisphosphonate therapy of reflex sympathetic dystrophy syndrome. *Ann Rheum Dis* 56, 201-4 (1997).
63. Varena, M. et al. Intravenous clodronate in the treatment of reflex sympathetic dystrophy syndrome. A randomized, double blind, placebo controlled study. *J Rheumatol* 27, 1477-83 (2000).
64. Christensen, K., Jensen, E. M. & Noer, I. The reflex dystrophy syndrome response to treatment with systemic corticosteroids. *Acta Chir Scand* 148, 653-5 (1982).
65. Ching, D. W., McClintock, A. & Beswick, F. Successful treatment with low-dose thalidomide in a patient with both Behcet's disease and complex regional pain syndrome type I: case report. *J Clin Rheumatol* 9, 96-8 (2003).
66. Huygen, F. J., Niehof, S., Zijlstra, F. J., van Hagen, P. M. & van Daele, P. L. Successful treatment of CRPS I with anti-TNF. *J Pain Symptom Manage* 27, 101-3 (2004).
67. Von Eisenhart-Rothe, R. & Rittmeister, M. [Drug therapy in complex regional pain syndrome type I]. *Orthopade* 33, 796-803 (2004).
68. Maier, C. & Gleim, M. [Diagnostic and treatment measures in patients with sympathetically maintained pain]. *Schmerz* 12, 282-303 (1998).
69. Gehling, M. et al. [Complex regional pain syndrome I and II. What effects the outcome?]. *Schmerz* 17, 309-16 (2003).
70. Leiber, B. & Burg, G. u. Die klinischen Syndrome Syndrome, Sequenzen und Symptomenkomplexe (Urban & Schwarzenberg, München [u.a.], S. XXV).
71. Wolfe, F. The fibromyalgia syndrome: a consensus report on fibromyalgia and disability. *J Rheumatol* 23, 534-9 (1996).
72. Wolfe, F. et al. The American College of Rheumatology 1990 Criteria for the Classification of Fibromyalgia. Report of the Multicenter Criteria Committee. *Arthritis Rheum* 33, 160-72 (1990).
73. Wolfe, F. Stop using the American College of Rheumatology criteria in the clinic. *J Rheumatol* 30, 1671-2 (2003).
74. Riedl, A. et al. Somatic comorbidities of irritable bowel syndrome: a systematic analysis. *J Psychosom Res* 64, 573-82 (2008).
75. Weir, P. T. et al. The incidence of fibromyalgia and its associated comorbidities: a population-based retrospective cohort study based on International Classification of Diseases, 9th Revision codes. *J Clin Rheumatol* 12, 124-8 (2006).
76. Lawrence, R. C. et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II. *Arthritis Rheum* 58, 26-35 (2008).

77. Lawrence, R. C. et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 41, 778-99 (1998).
78. Conrad, I. [Diagnosis and clinical signs of fibromyalgia]. *Schmerz* 17, 464-74 (2003).
79. Baldursdottir, S. [Juvenile primary fibromyalgia syndrome--review]. *Laeknabladid* 94, 463-72 (2008).
80. De Stefano, R. et al. Image analysis quantification of substance P immunoreactivity in the trapezius muscle of patients with fibromyalgia and myofascial pain syndrome. *J Rheumatol* 27, 2906-10 (2000).
81. Russell, I. J. et al. Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum* 37, 1593-601 (1994).
82. Stratz, T., Fiebich, B., Haus, U. & Muller, W. Influence of tropisetron on the serum substance P levels in fibromyalgia patients. *Scand J Rheumatol Suppl*, 41-3 (2004).
83. Keel, P. Psychological and psychiatric aspects of fibromyalgia syndrome (FMS). *Z Rheumatol* 57 Suppl 2, 97-100 (1998).
84. Van Houdenhove, B., Egle, U. & Luyten, P. The role of life stress in fibromyalgia. *Curr Rheumatol Rep* 7, 365-70 (2005).
85. Moldofsky, H. Sleep, neuroimmune and neuroendocrine functions in fibromyalgia and chronic fatigue syndrome. *Adv Neuroimmunol* 5, 39-56 (1995).
86. Steere, A. C. et al. Clinical manifestations of Lyme disease. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg [A]* 263, 201-5 (1986).
87. Thompson, M. E. & Barkhuizen, A. Fibromyalgia, hepatitis C infection, and the cytokine connection. *Curr Pain Headache Rep* 7, 342-7 (2003).
88. Limer, K. L., Nicholl, B. I., Thomson, W. & McBeth, J. Exploring the genetic susceptibility of chronic widespread pain: the tender points in genetic association studies. *Rheumatology (Oxford)* (2008).
89. Goldenberg, D. L. Pharmacological treatment of fibromyalgia and other chronic musculoskeletal pain. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 21, 499-511 (2007).
90. Arnold, L. M. Duloxetine and other antidepressants in the treatment of patients with fibromyalgia. *Pain Med* 8 Suppl 2, S63-74 (2007).
91. Busch, A. J., Barber, K. A., Overend, T. J., Peloso, P. M. & Schachter, C. L. Exercise for treating fibromyalgia syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, CD003786 (2007).
92. Wolfe, F. et al. Health status and disease severity in fibromyalgia: results of a six-center longitudinal study. *Arthritis Rheum* 40, 1571-9 (1997).
93. McBeth, J., Silman, A. J. & Macfarlane, G. J. Association of widespread body pain with an increased risk of cancer and reduced cancer survival: a prospective, population-based study. *Arthritis Rheum* 48, 1686-92 (2003).
94. McBeth, J. et al. Musculoskeletal pain is associated with a long-term increased risk of cancer and cardiovascular-related mortality. *Rheumatology (Oxford)* 48, 74-7 (2009).
95. Ginsburg, B. E. Social behavior and social hierarchy in the formation of personality profiles in animals. *Proc Annu Meet Am Psychopathol Assoc* 55, 95-114 (1967).
96. Wolfer, D. P. et al. Laboratory animal welfare: cage enrichment and mouse behaviour. *Nature* 432, 821-2 (2004).
97. RIKEN BioResource Center, --K., Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0074 Japan, <http://www.brc.riken.jp/lab/animal/images/00267.jpg>; Aufrufdatum: 14.01.2009.
98. Toyka, K. V., Brachman, D. B., Pestronk, A. & Kao, I. Myasthenia gravis: passive transfer from man to mouse. *Science* 190, 397-9 (1975).
99. Sommer, C. et al. Paraneoplastic stiff-person syndrome: passive transfer to rats by means of IgG antibodies to amphiphysin. *Lancet* 365, 1406-11 (2005).
100. Zhou, C. C. et al. Angiotensin receptor agonistic autoantibodies induce pre-eclampsia in pregnant mice. *Nat Med* 14, 855-62 (2008).
101. Le Bars, D., Gozariu, M. & Cadden, S. W. [Acute pain measurement in animals. Part 1]. *Ann Fr Anesth Reanim* 20, 347-65 (2001).
102. Mills, C. D., Grady, J. J. & Hulsebosch, C. E. Changes in exploratory behavior as a measure of chronic central pain following spinal cord injury. *J Neurotrauma* 18, 1091-105 (2001).
103. Deacon, R. M., Croucher, A. & Rawlins, J. N. Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav Brain Res* 132, 203-13 (2002).

104. Blaes, F. et al. Autoimmune etiology of complex regional pain syndrome (M. Sudeck). *Neurology* 63, 1734-6 (2004).
105. Lassmann, H. Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 163, 651-5 (2007).
106. Amyes, E. et al. Restricted IgG1 subclass of anti-Yo antibodies in paraneoplastic cerebellar degeneration. *J Neuroimmunol* 114, 259-64 (2001).
107. Sinico, R. A., Bollini, B., Sabadini, E., Di Toma, L. & Radice, A. The use of laboratory tests in diagnosis and monitoring of systemic lupus erythematosus. *J Nephrol* 15 Suppl 6, S20-7 (2002).
108. Woolf, C. J. et al. Towards a mechanism-based classification of pain? *Pain* 77, 227-9 (1998).
109. Marinus, J. & Van Hilten, J. J. Clinical expression profiles of complex regional pain syndrome, fibromyalgia and a-specific repetitive strain injury: more common denominators than pain? *Disabil Rehabil* 28, 351-62 (2006).
110. Gibbs, G. F., Drummond, P. D., Finch, P. M. & Phillips, J. K. Unravelling the pathophysiology of complex regional pain syndrome: focus on sympathetically maintained pain. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35, 717-24 (2008).

Danksagung

Mein spezieller Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Günter Sprotte für die Überlassung des Themas, seinen Anregungen und vielen spannenden Diskussionen.

Herrn Dr. med. Andreas Göbel und Herrn Heiko Vogel danke ich für die Betreuung und Hilfestellung bei der Planung und Durchführung dieser Arbeit.

Frau Prof. Angela Vincent möchte ich für die Möglichkeit der halbjährigen Laborhospitalation in der Neurosciences Group des Weatherall Institute of Molecular Medicine in Oxford danken und allen dort angestellten Mitarbeitern für fachliche Ratschläge und einen angenehmen Forschungsaufenthalt in England.

Für die Finanzierung meines Aufenthaltes in England danke ich Herrn Prof. Dr. med. N. Roewer.

Allen Angestellten des Instituts für Transfusionsmedizin und Hämotherapie möchte ich für die große Kooperationsbereitschaft bei der Akquirierung der Kontrollseren danken.

Besonders hervorzuheben ist die Bereitschaft aller Patienten und gesunder Kontrollprobanden zur Teilnahme an diesen Untersuchungen.

Großer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für die moralische Unterstützung, insbesondere meiner Mutter für das mehrfache Korrekturlesen dieser Arbeit.