





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

**Systemische Zytokinexpression bei schmerzhaften und schmerzlosen  
Polyneuropathien**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Jan Philipp Rogausch  
aus Marburg**

**Würzburg, Januar 2009**

**Referentin: Professor Dr. med. Claudia Sommer**  
**Korreferentin: Professor Dr. med. Anna-Leena Sirén**  
**Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 10.07.2009**

**Der Promovend ist Arzt.**

**Meinen Eltern gewidmet.**



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Neuropathische Schmerzen und klinische Charakteristika	1
1.2	Polyneuropathien (PNPs)	1
1.3	Einteilung der PNPs	2
1.3.1	Metabolische PNPs	2
1.3.2	Vaskulär bedingte PNPs	3
1.3.3	Immunopathien	3
1.3.4	Hereditäre PNPs	3
1.3.5	Toxische PNPs	4
1.3.6	Neuropathie der kleinen Fasern	4
1.4	Messung neuropathischer Schmerzen und der Begleitsymptome	4
1.4.1	Neuropathic Pain Symptom Inventory	5
1.4.2	Deutsche Neuropathic Pain Scale	5
1.4.3	Mehrdimensionale Aspekte von neuropathischen Schmerzen: Graded Chronic Pain Scale und Allgemeine Depressionsskala	5
1.5	Zytokine und Zytokinrezeptoren	6
1.6	Zielsetzung der Arbeit	7
<b>2</b>	<b>Methoden und Materialien</b>	<b>9</b>
2.1	Patientengruppe	9
2.1.1	Einschlusskriterien für die Patientengruppe	9
2.1.2	Einschlusskriterien für die Gruppe mit schmerzhafter PNP	10
2.1.3	Einschlusskriterien für die Gruppe mit schmerzloser PNP	11
2.2	Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe	11
2.3	Blutentnahme für die Zytokinmessungen	12
2.3.1	Untersuchte Zytokine	12
2.4	RNA Extraktion	13
2.4.1	Protokoll der RNA Extraktion	13
2.4.2	Reverse Transkription	14
2.4.3	Protokoll der Reversen Transkription	14
2.5	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	16
2.5.1	Protokoll der qRT-PCR	18
2.5.2	Auswertung der qRT-PCR	20
2.6	Messung der Proteine	21
2.6.1	Protokoll der enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)	22
2.6.2	Auswertung der Proteinmessungen	23
2.7	Statistik	24
<b>3</b>	<b>Materialien und Geräte</b>	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>

4.1	Auswertung der klinischen Daten	32
4.1.1	Häufigkeit der schmerzhaften und schmerzlosen PNPs	32
4.1.2	Ätiologien der PNPs	33
4.1.3	Alter, Geschlecht und Krankheitsdauer	33
4.2	Fragebogenauswertung	34
4.2.1	Intensitätsskalen (GCPS und NPSD)	34
4.2.2	Charakteristika neuropathischer Schmerzen (NPSI und NPSD)	35
4.2.3	Behinderung (GCPS)	37
4.2.4	Allgemeine Depressionsskala	38
4.3	Labordaten	39
4.3.1	Routinediagnostik	39
4.3.2	Ergebnisse der qRT-PCR	39
4.3.3	Subgruppen-Analyse	42
4.3.4	Ergebnisse der ELISA	43
4.4	Zytokinexpression und Schmerzfragebögen	45
4.5	Zytokinexpression und ADS	47
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>48</b>
5.1	Erfassung von neuropathischen Schmerzen mit Hilfe von Fragebögen und ihre Probleme	49
5.2	Die Bedeutung von Zytokinen in der Pathogenese von PNPs	50
5.3	Zytokine bei schmerzhaften PNPs	51
5.3.1	Systemische Zytokine	51
5.3.2	Zytokine im PNS	52
5.4	Wirkmechanismen von TNF bei neuropathischen Schmerzen	53
5.5	Grenzen der Studie und Rolle von Einflussfaktoren auf Zytokine	56
5.5.1	Analytische Probleme	57
5.5.2	Depression	57
5.5.3	Medikation	58
5.6	Folgerungen aus den Ergebnissen	60
5.6.1	Folgerungen für die Diagnostik	60
5.6.2	Folgerungen für die Therapie	60
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>61</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>63</b>
7.1	Patienten mit schmerzhafter PNP	63
7.2	Patienten mit schmerzloser PNP	65
7.3	Neuropathie Erhebungsbogen	66
<b>8</b>	<b>Referenzen</b>	<b>70</b>



## Abkürzungsverzeichnis (englische Begriffe in *kursiv*)

Abb.	Abbildung
ADS	Allgemeine Depressionsskala
Ag	Antigen
Ak	Antikörper
CCI	<i>chronic constriction injury</i>
cDNA	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
CIDP	chronische inflammatorische und demyelinisierende Polyneuropathie
CMT	Charcot-Marie-Tooth Erkrankung
CRP	C-reaktives Protein
Ct	<i>threshold cycle</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbant assay</i>
Fa.	Firma
GBS	Guillain-Barré-Syndrom
GK	Glukokortikoide
GCPS	<i>Graded Chronic Pain Scale</i>
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IL	Interleukin
kDa	kilo Dalton
MADSAM	<i>multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MGB	<i>minor groove binder</i>
MMN	multifokale motorische Neuropathie
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NF-κB	<i>nuclear factor-kappa B</i>

NPSD	<i>Neuropathic Pain Scale deutsch</i>
NPSI	<i>Neuropathic Pain Symptom Inventory</i>
NRS	numerische Ratingskala
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PNP	Polyneuropathie
PNS	peripheres Nervensystem
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
SFN	<i>small fiber neuropathy</i>
Streptavidin-HRP	<i>Streptavidin-horse-raddish-peroxidase</i>
TZA	Trizyklische Antidepressiva
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF/ TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor – $\alpha$
TNF-R	TNF-Rezeptor
UPM	Umdrehungen pro Minute
VANP	vaskulitische Neuropathie

## 1 Einleitung

### 1.1 Neuropathische Schmerzen und klinische Charakteristika

Schmerz ist ein unangenehmes Gefühls- oder Sinneserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird (International Association for the Study of Pain (IASP 1994)). Der Definition nach sind Schmerzen als neuropathische Schmerzen zu bezeichnen, wenn sie primär durch eine Läsion oder Dysfunktion des Nervengewebes verursacht werden (IASP 1994). Im Folgenden werden die wichtigsten Charakteristika neuropathischer Schmerzen tabellarisch aufgeführt.

Allodynie	Schmerzhafte Wahrnehmung normalerweise nicht-schmerzhafter mechanischer, dynamischer oder thermischer Reize
Attackenschmerz	einschießende Schmerzen, beschreibbar als „lanzierend“, „reißend“
Dysästhesie	unangenehme Missempfindungen, spontan oder nach Berührung der Haut
Hyperästhesie	gesteigerte Wahrnehmung sensibler Reize jedweder Art außer den spezifischen Sinnesreizen
Hyperalgesie	überschießendes Schmerzempfinden bei Applikation schmerzhafter Reize
Spontanschmerzen	Dauerschmerz, der oft als „brennend“ beschrieben wird

**Tabelle 1.1: Klinische Nomenklatur und Charakteristika neuropathischer Schmerzen (Sommer 2003)**

### 1.2 Polyneuropathien (PNPs)

Unter einer Polyneuropathie (PNP, Mehrzahl PNPs) versteht man eine generalisierte Schädigung peripherer Nerven. Eine PNP manifestiert sich klinisch mit unterschiedlichen Ausfallserscheinungen (Synonym: Minussymptome) und/oder Reizerscheinungen (Synonym: Plussymptome, Tabelle 1.1), meist in symmetrischer, distal betonter Verteilung. Neuropathische Schmerzen sind ein häufig

unterschätztes und unzureichend therapiertes Symptom von PNPs. Paradoxerweise können Schmerzen und Minussymptome, wie Hypästhesie oder Pallhypästhesie, im gleichen Innervationsgebiet eines Nerven auftreten (Baumgartner et al. 2002).

### 1.3 Einteilung der PNPs

Ein wesentliches Merkmal von PNPs ist, dass völlig unterschiedliche Ätiologien zu identischen oder zumindest sehr ähnlichen klinischen Symptomen führen können. Es gibt zahlreiche Möglichkeiten, die große Gruppe der PNPs sinnvoll einzuteilen, beispielsweise nach dem klinischen Verteilungstyp (distal, proximal, symmetrisch, asymmetrisch, Schwerpunktverteilung) oder dem überwiegenden Schädigungsmuster (axonal, demyelinisierend, Mischformen). Die gebräuchlichste Einteilung erfolgt nach der zugrunde liegenden Ursache, wie im Folgenden ausgeführt (Neundorfer 2007).

#### 1.3.1 Metabolische PNPs

Bei den metabolischen Ursachen der PNP ist der *Diabetes mellitus* in den Industrienationen führend (Hilz et al. 2000; Kapur 2003). Neben völlig schmerzfreien Verläufen können typischerweise permanente oder nächtliche brennende Schmerzen an den Füßen auftreten. Auch zahlreiche andere Schmerzbeschreibungen wie „scharf“, „heiß“, „elektrisierend“, „dumpf“ werden entsprechend den Ergebnissen einer Studie mittels standardisierter Fragebögen, zur Beschreibung der Schmerzen von Patienten mit diabetischer PNP verwendet (Galer et al. 2000). Die Schmerzlokalisierung ist meist „tief“ (Otto et al. 2003), kann aber auch „oberflächlich“ empfunden werden.

Die *Amyloid-Neuropathie* schädigt oft selektiv dünne myelinisierte und unmyelinisierte Fasern und manifestiert sich daher typischerweise schon früh mit Schmerzen, insbesondere bei Beginn der Symptome nach dem 50. Lebensjahr (Conceicao und De Carvalho 2007). Das meist sehr schmerzhafte, seltene POEMS-Syndrom ist ätiologisch noch unvollständig aufgeklärt und vereint die klinischen Symptome und laborchemischen Befunde einer **PNP**, **Organomegalie**, **Endokrinopathie**, eines **M**-Gradienten in der Eiweißelektrophorese und von Hauterscheinungen (**skin lesions**).

### 1.3.2 Vaskulär bedingte PNPs

Klinisches Minussymptom einer systemischen nekrotisierenden Vaskulitis ist häufig der Ausfall multipler sensibler peripherer Nerven sowie Schmerzen im Bereich der Nerven ausfälle; im Krankheitsverlauf treten häufig infolge der Schädigungen von motorischen Axonen auch Paresen auf (Pagnoux und Guillevin 2005). Im Gegensatz zur oben genannten systemischen Vaskulitis befällt die nicht-systemische Vaskulitis isoliert das periphere Nervensystem (PNS). *Vaskulitische Neuropathien (VANP)* sind in der überwiegenden Zahl der Fälle schmerzhaft, oft auch noch nach erfolgreicher Behandlung der Paresen (Collins et al. 2003).

### 1.3.3 Immunopathien

Die *chronisch inflammatorische demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)* zeigt meist einen distal-symmetrischen Verteilungstyp mit proximaler und distaler Muskelschwäche und sensiblen Ausfällen. Der Verlauf ist in den meisten Fällen schmerzlos, aber Schmerzen als führendes klinisches Symptom der CIDP wurden beschrieben (Boukhris et al. 2007). Die *multifokale motorische Neuropathie (MMN)* führt zu asymmetrischer Muskelschwäche mit motorischen Leitungsblöcken und tritt ohne sensible Ausfalls- oder Reizerscheinungen auf, ist also typischerweise schmerzlos. In die Gruppe der durch Immunopathien erworbenen PNPs gehört auch die *multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy (MADSAM)*. Sie wird klinisch ähnlich der MMN mit asymmetrischen Paresen, aber zusätzlichen sensiblen Ausfällen manifest (Saperstein et al. 2001). PNPs können auch als *paraneoplastisches Syndrom* auftreten, insbesondere bei Bronchialkarzinom, dann handelt es sich typischerweise um eine nicht-schmerzhafte, sensible ataktische PNP (so genannte Ganglionitis mit anti-Hu-Antikörpern). Ein Teil der paraneoplastischen PNPs präsentiert sich auch mit Schmerzen (Chalk et al. 1992).

### 1.3.4 Hereditäre PNPs

*Hereditäre Neuropathien* beginnen meist distal mit motorischen und sensiblen Ausfällen und verlaufen langsam progredient, aber in den meisten Fällen schmerzlos. Schmerzhafte Verläufe und plötzliche rasche Progredienz der Sym-

ptome können als Hinweis auf eine zusätzliche immunologische Komponente gesehen werden (Mäurer et al. 2005).

#### 1.3.5 Toxische PNPs

Beispiele für toxische PNPs sind die *Chemotherapie-induzierten PNPs*, wobei in diesem Zusammenhang v.a. Vincaalcaloide und Taxane zu nennen sind, bei deren Einsatz das Auftreten einer PNP sogar therapielimitierend sein kann. Die Chemotherapie-induzierten PNPs äußern sich meist initial mit Missempfindungen. Die *Alkohol-assoziierte PNP* kann mit Schmerzen einhergehen, ist jedoch auch oft schmerzlos (D'Amour und Butterworth 1994).

#### 1.3.6 Neuropathie der kleinen Fasern

Die Neuropathie der kleinen Fasern (*small fiber neuropathy [SFN]*) ist gekennzeichnet durch starke akrale Schmerzen bei ansonsten neurologisch weitgehend unauffälligen Patienten. Eine SFN kann beispielsweise bei Diabetes mellitus, M. Fabry oder Hypothyreose auftreten; meist lässt sich allerdings keine Ursache für die Beschwerden finden und die Fälle bleiben idiopathisch (Gorson und Ropper 1995). Die großen Nervenfasern sind intakt, was sich in normalen Leitungsstudien widerspiegelt. Hingegen findet sich neben der typischen klinischen Präsentation in der klinischen Untersuchung und bei der quantitativen sensorischen Testung eine Beeinträchtigung der Funktionen der kleinen nicht bzw. dünn myelinisierten Fasern (Warm- und Kaltempfindung; Temperaturunterschiedswahrnehmung) und in der Hautbiopsie eine längenabhängige Reduktion der intraepidermalen Nervenfasern (Lacomis 2002).

### 1.4 Messung neuropathischer Schmerzen und der Begleitsymptome

Zur Differenzierung unterschiedlicher Schmerzformen, insbesondere zur Erkennung neuropathischer Schmerzen und ihrer wissenschaftlichen Untersuchung, wurden seit Mitte des letzten Jahrhunderts Fragebögen entwickelt. Die Antworten werden auf einer numerischen Ratingskala (NRS) in einer Zahlenreihe von null bis zehn abgebildet, wobei eine Null „keine Schmerzen“ und eine Zehn die „schlimmsten vorstellbaren Schmerzen“ bzw. eine maximale Ausprägung des

Symptoms bedeuten. Im Folgenden werden die in dieser Studie verwendeten Fragebögen kurz beschrieben.

#### 1.4.1 *Neuropathic Pain Symptom Inventory*

Das *Neuropathic Pain Symptom Inventory* (NPSI) wurde 2004 von Bouhassira in Frankreich entwickelt (Bouhassira et al. 2004). Der deutsche Fragebogen ist eine modifizierte Fassung des bereits validierten französischen Fragebogens und erfasst Angaben über die Schmerzlokalisierung, die aktuelle Schmerzmedikation, Qualitäten des Schmerzes (brennend, einschnürend, drückend, wie elektrische Schläge, stechend), Dauer des Spontanschmerzes und Anzahl der Schmerzattacken sowie Fragen zu möglicherweise vorhandenen evozierten Schmerzen auf Berührung, Druck oder Kälte und Parästhesien. Zur topographischen Zuordnung der Schmerzen ist ein Körperschema abgebildet, in welches die Schmerzlokalisierung eingezeichnet werden kann. Der abgefragte Zeitraum umfasst die vergangenen 24 Stunden. Der Summenscore des NPSI gibt die Summe aller 10 NRS-Werte pro Fragebogen bei einem Maximum von 100 (10 x 10) wieder.

#### 1.4.2 *Deutsche Neuropathic Pain Scale*

Die *Neuropathic Pain Scale* deutsch (NPSD) ist eine Übersetzung der seit 1997 im anglo-amerikanischen Sprachraum etablierten Neuropathie-Skala von Galer und Jensen (Galer und Jensen 1997). Sie gliedert sich in einen Fragenteil über Schmerzintensität und -qualität, mechanische Allodynie, Schmerzverlauf und die Unannehmlichkeit der Schmerzen sowie zwei weitere Fragen zur Lokalisation der Schmerzen als „tief“ oder „oberflächlich“.

#### 1.4.3 Mehrdimensionale Aspekte von neuropathischen Schmerzen: *Graded Chronic Pain Scale* und Allgemeine Depressionsskala

Wenngleich Schmerzen ein klinisches Symptom darstellen, haben sie Auswirkungen auf das tägliche Leben, die Arbeit und die Stimmung der Patienten (Von Korff und Simon 1996). Dies zeigte auch der Einfluss schmerzhafter diabetischer PNPs auf den Schlaf und die Lebensqualität der Patienten in standardisierten Befragungen mit Fragebögen (Galer et al. 2000). Zur Graduierung der Behinde-

rung durch chronische Schmerzen mittels eines auf NRS basierenden Fragebogens wurde von v. Korff die *Graded Chronic Pain Scale* (GCPS) entwickelt und validiert (Von Korff et al. 1992). Zur Messung der psychischen Zeichen von Depression bei Patienten wurde in Deutschland die Allgemeine Depressionsskala (ADS) eingeführt, welche sich als Screeninginstrument auf das Vorliegen einer klinisch manifesten Depression eignet (Hautzinger 1991). Die Entwickler des Fragebogens gehen davon aus, dass ab einer Punktzahl von 16 von max. 60 erreichbaren Punkten eine behandlungsbedürftige Depression vorliegt.

### 1.5 Zytokine und Zytokinrezeptoren

Zytokine sind lösliche (Glyko-)Proteine mit einem Molekulargewicht von 15 bis 30 kilo Dalton (kDa). Sie werden nach Stimulation von Immunzellen freigesetzt und wirken über hochaffine, membranständige und auch lösliche Rezeptoren auf die sezernierende Zelle selbst (autokrine Wirkung), die benachbarten (parakrine Wirkung) oder entlegenen Zellen (endokrine Wirkung). Die Halbwertszeit der meisten Zytokine beträgt einige Minuten, ihre Plasmakonzentration liegt im Bereich von pg/ml (Volk et al. 1998).

Man unterscheidet fünf Klassen der Zytokinrezeptoren: die Klasse 1-Zytokinrezeptoren (Hämatopoietin Familie Rezeptoren), die Klasse 2-Zytokinrezeptoren (Interferon/Interleukin [IL]-10 Familie Rezeptoren), die Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor (TNF-R, Mehrzahl TNF-Rs) Familie, die IL-1 Rezeptor Familie, die *Transforming Growth Factor- $\beta$*  Rezeptoren und die Chemokin Rezeptoren (Vilček 2003).

**IL-2** (pro-inflammatorisch) ist ein 15 kDa Protein, das an membranständige, niedrig-, mittel- und hochaffine Klasse 1-Rezeptoren bindet, welche Strukturgleichheiten mit den IL-4- und IL-7-Rezeptoren besitzen. Intrazelluläre Proteinkinasen der Janus-Familie-Tyrosin-Kinasen 1 und 3 und der Signal Transduktoren und Aktivatoren der Transkription 5a, 5b sind an der Signaltransduktion beteiligt (Lin und Leonard 2003). **Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$**  (TNF; pro-inflammatorisch) wird als 26 kDa Typ-2 Transmembranprotein produziert und nach Spaltung durch das *TNF- $\alpha$  converting enzyme* als Homotrimer mit drei Bindungsstellen für den TNF-R1 (konstitutiv expremiert) und den TNF-R2 (induzierbar) freigesetzt. Der wichtigste intrazelluläre Signalweg der TNF-Rs aktiviert die



*p38 mitogen activated protein kinase* (MAPK), welche dann Transkriptionsfaktoren, insbesondere den *nuclear factor- $\kappa$ B* (*nf- $\kappa$ B*) und die *c-Jun N-terminal* Kinase, hochreguliert (Aggarwal 2000). **IL-4** (anti-inflammatorisch) lenkt eine Immunreaktion zur T-Helferzell 2 (Th<sub>2</sub>)-Antwort mit Produktion von IL-5, IL-10, IL-13 und B-Zell-Stimulation. Die Bindung von IL-4 an hochaffine Klasse 1-Rezeptoren hemmte in Monozyten, die mit Lipopolysaccharid stimuliert wurden, die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF, IL-1 und IL-6 (Okada et al. 2003). **IL-10** (anti-inflammatorisch) wird von aktivierten Monozyten, Makrophagen, Th-Zellen, B-Zellen und anderen Zellen produziert. Das IL-10-Gen unterliegt Regulatorgenen, an die TNF (über *nf- $\kappa$ B*), Prostaglandin E2 (über cyclisches Adenosin triphosphat und Proteinkinase C) und verschiedene Hormone wie Glukokortikoide (über *glucocorticoid response element*) angreifen. Das Protein hat anti-inflammatorische Eigenschaften, z.B. durch Hemmung der Gentranskription pro-inflammatorischer Zytokine (Ding et al. 2003).

#### 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Neuropathische Schmerzen sind ein häufiges Symptom von PNPs, unabhängig von deren Ursache (immunologisch, toxisch, entzündlich, etc.). Warum manche PNPs schmerzhaft verlaufen und andere schmerzlos ist unklar. Bislang konnte beispielsweise kein Zusammenhang zwischen klinischen Zeichen und dem schmerzhaften oder schmerzlosen Verlauf einer PNP gefunden werden (Rasmussen et al. 2004). Eine plausible Erklärung wäre, dass beispielsweise nur solche PNPs schmerzhaft sind, bei denen die C-Fasern (Nozizeptoren) betroffen, aber nicht völlig degeneriert sind. Histologisch ließen sich schmerzhaft PNP aber nicht von schmerzlosen PNPs unterscheiden (Malik et al. 2001). Eine andere Hypothese ist, dass Entzündungsmediatoren zu einer peripheren Sensibilisierung führen und somit das die Nervenfasern umgebende Mikromilieu zur Schmerzhaftigkeit einer PNP beiträgt. Auch eine zentralnervöse Sensibilisierung als Ursache wird diskutiert (Campbell und Meyer 2006).

In den vergangenen Jahren wurden unterschiedliche Tiermodelle zur Untersuchung neuropathischer Schmerzen etabliert (Bennett und Xie 1988; Seltzer et al. 1990). Diese Modelle basieren teils auf mechanischen Nervenläsionen, die zu einer Waller'schen Degeneration führen, und teils auf entzündlichen Läsionen

der Nerven. Tierexperimentell lies sich insbesondere im Modell der *chronic constriction injury* (CCI) (Bennett und Xie 1988) die Rolle von Zytokinen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Schmerzen gut belegen (Sommer 2001; Stoll et al. 2002). So führte zum Beispiel eine inkomplette Nervenläsion nach wenigen Stunden zum Anstieg pro-inflammatorischer Zytokine, insbesondere des TNF, im peripheren Nerven (Üçeyler et al. 2007) und wenige Tage später auch im Spinalmark (DeLeo et al. 1997). Eine mögliche pathogenetische Rolle von Zytokinen bei neuropathischen Schmerzen ließ sich daraus ableiten. In Ausweitung dieser Idee könnten die von aktivierten Gliazellen sezernierten Zytokine mit Neuronen im zentralen Nervensystem interagieren (Marchand et al. 2005; Myers et al. 2006).

Aufbauend auf diesen Befunden stellten wir die Hypothese auf, dass bei Patienten mit schmerzhafter PNP im Gegensatz zu Patienten mit schmerzloser PNP ein pro-inflammatorisches Zytokinprofil zu finden sein sollte und gingen der Rolle von pro- (IL-2, TNF) und anti-inflammatorischen (IL-4, IL10) Zytokinen bei schmerzhaften und schmerzlosen PNPs nach. In einer prospektiven Studienanordnung sollten systemische Zytokinprofile (relative Genexpression und Proteine) bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen und Patienten ohne neuropathische Schmerzen untersucht werden.

Die Arbeit baute sich aus folgenden Einzelschritten auf:

- Rekrutierung der Patienten- und Kontrollgruppe
- Messung der neuropathischen Schmerzen sowie der damit assoziierten Erscheinungen anhand von Fragebögen
- Entnahme und Asservierung der Vollblut- und Serumproben
- Extraktion von *messenger* Ribonucleinsäure (*messenger ribonucleic acid*, mRNA) aus Vollblut zur Durchführung der quantitativen *real-time* Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)
- Messung der Proteinspiegel im Serum
- Statistische Auswertung der Daten

## 2 Methoden und Materialien

Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt. Das schriftliche Einverständnis zur Studienteilnahme wurde nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung von allen Teilnehmern eingeholt.

### 2.1 Patientengruppe

Für die Patientengruppe wurden 32 Patienten mit schmerzhafter PNP (siehe Tabelle 7.1, Anhang) und 20 Patienten mit schmerzloser PNP (siehe Tabelle 7.2, Anhang) während ihrer stationären Behandlung in der Neurologischen Universitätsklinik Würzburg rekrutiert.

#### 2.1.1 Einschlusskriterien für die Patientengruppe

Die für die Diagnose der PNP relevanten Daten wurden schriftlich auf einem Neuropathie-Erhebungsbogen (siehe Grafik 7.3, Anhang) erfasst. Die Diagnose wurde anhand anamnestischer Daten, dem Befund in der neurologischen Untersuchung, Laboranalysen aus Blut und Liquor sowie elektrophysiologischen Messungen gestellt. Routineblutentnahmen zur Untersuchung des Blutbildes, Differentialblutbildes, der Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit, des C-reaktiven Proteins (CRP), der Serumelektrolyte, der Parameter der Leber-, Nieren- und Schilddrüsenfunktion wurden vorgenommen. Bei entsprechendem Hinweis wurden Tests auf monoklonale Immunglobuline, Vitamin B6- und B12-Mangel, Folsäure-Mangel, antinukleäre Antikörper, extrahierbare antinukleäre Antikörper, antineutrophile cytoplasmatische Autoantikörper und Rheumafaktoren durchgeführt. Nüchtern-Glukosewerte und HbA<sub>1c</sub>-Werte wurden zum Ausschluss bzw. Nachweis eines Diabetes mellitus gemessen. Bei Nachweis monoklonaler Immunglobuline im Serum wurde zudem der Urin auf Bence-Jones-Proteine untersucht. Bei allen Patienten wurde eine Lumbalpunktion durchgeführt und der Liquor wurde neben der Routinediagnostik (u.a. Zellzahl und Liquoreiweißbestimmung) mittels Immunfixation und isoelektrischer Fokussierung auf oligoklonale Banden untersucht.

Die elektrophysiologischen Messungen beinhalteten Leitungsstudien von motorischen und sensiblen Nerven der oberen und unteren Extremitäten, sowie elek-

tromyographische Untersuchungen ausgewählter Muskeln. Patienten, bei denen sich die Ursache der PNP mit den genannten diagnostischen Schritten nicht klären ließ, wurden einer Nervus suralis- und/oder Hautbiopsie unterzogen. Die CIDP, VANP und MADSAM wurden nach international akzeptierten und etablierten Kriterien diagnostiziert (Lewis et al. 1982; Collins et al. 2000; Hughes et al. 2001). Die Diagnose SFN wurde bei Patienten mit Schmerzen an den Extremitäten gestellt, die Normalwerte in den elektrophysiologischen Leitungsstudien hatten und eine längenabhängige Reduktion der intraepidermalen Nervenfaserdichte aufwiesen (Lacomis 2002). Die Diagnose einer hereditären Neuropathie setzte eine eindeutige positive Familienanamnese voraus oder den Nachweis einer definierten Mutation. Eine hereditäre PNP wurden als Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT) 1 klassifiziert, wenn die motorische Nervenleitgeschwindigkeit im Nervus medianus niedriger als 36 m/s, als CMT 2, wenn sie größer als 36 m/s lag.

#### 2.1.2 Einschlusskriterien für die Gruppe mit schmerzhafter PNP

In der Gruppe der schmerzhaften PNP wurden zur Messung der neuropathischen Schmerzen verschiedene Schmerzfragebögen (NPSI, GCPS, NPSD) und zum Screening auf depressive Symptome die ADS eingesetzt. Die Mehrzahl der Patienten der Experimentalgruppe beantworteten die Fragen zum Zeitpunkt der Blutentnahme. Folgende Tabelle gibt die Einschlusskriterien der Patienten in die Gruppe „Patienten mit schmerzhafter PNP“ wieder:

Einschlusskriterien „Patienten mit schmerzhafter PNP“
<ul style="list-style-type: none"> <li>• anamnestische Angaben von Schmerzen</li> <li>• Charakteristika neuropathischer Schmerzen im NPSI und NPSD</li> <li>• Schmerzintensität auf NRS &gt; 3 zum Zeitpunkt der Befragung und/oder</li> <li>• Maximale Schmerzintensität auf NRS &gt; 3 in den vergangenen vier Wochen</li> </ul>

**Tabelle 2.1: Einschlusskriterien der „Patienten mit schmerzhafter PNP“; NRS=numerische Ratingskala; NPSI=Neuropathic Pain Scale Inventory; NPSD=Neuropathic Pain Scale deutsch.**

Die Mehrzahl der Patienten, mit Ausnahme von zehn Patienten ohne Schmerzmedikation, nahm peripher oder zentral wirksame Analgetika ein (siehe Tabelle 7.1, Anhang). Einige Patienten mit inkoheränten Angaben auf den ausgehändigten Fragebögen und grenzwertiger Schmerzhaftigkeit wurden nach Sichtung der Dauermedikation mit Analgetika eingruppiert.

### 2.1.3 Einschlusskriterien für die Gruppe mit schmerzloser PNP

Die Patienten mit schmerzloser PNP wurden ebenfalls mit Fragen aus den Fragebögen NPSI, NPSD und GCPS zum Zeitpunkt der Blutentnahme befragt. Sie beantworteten die ADS zu einem zur Blutentnahme versetzten Zeitpunkt. Die folgende Tabelle gibt die Einschlusskriterien in die Gruppe der „Patienten mit schmerzloser PNP“ wieder:

Einschlusskriterien „Patienten mit schmerzloser PNP“
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Anamnestisch keine Angabe von Schmerzen</li> <li>• keine Charakteristika neuropathischer Schmerzen im NPSI und NPSD</li> <li>• aktuelle Schmerzintensität auf NRS = 0</li> <li>• Keine dauerhafte Einnahme von Analgetika</li> </ul>

**Tabelle 2.2: Einschlusskriterien der „Patienten mit schmerzloser PNP“; NRS=numerische Ratingskala; NPSI=Neuropathic Pain Scale Inventory; NPSD=Neuropathic Pain Scale deutsch.**

Die Mehrzahl der Patienten nahm keine Schmerzmittel ein. Lediglich zwei Patienten nahmen Nicht-Opioid-Analgetika bei Bedarf gegen gelegentliche, nicht neuropathische Schmerzen ein (siehe Tabelle 7.2, Anhang).

### 2.2 Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe umfasste 44 Personen, die in Alter (+/- drei Jahre) und Geschlecht mit der Patientengruppe paarweise übereinstimmten (Mitarbeiter der Klinik und Besucher bzw. Angehörige und Patienten der Klinik bzw. Nachbarkliniken). Die folgende Tabelle gibt die Einschlusskriterien für die Kontrollgruppe wieder:

Einschlusskriterien „Kontrollgruppe“
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Zeichen oder Hinweise auf PNP</li> <li>• Keine chronischen oder akuten Schmerzen</li> <li>• Keine chronischen oder akuten Entzündungszeichen</li> <li>• Normale Werte für CRP und Leukozytenzahl</li> <li>• Kein Hinweis auf Diabetes mellitus</li> </ul>

**Tabelle 2.3: Einschlusskriterien der „Kontrollgruppe“**

### 2.3 Blutentnahme für die Zytokinmessungen

Die schriftliche Einwilligung zur Blutentnahme erfolgte bei Patienten und Kontrollpersonen nach mündlicher und schriftlicher Aufklärung über die Studienrahmenbedingungen, die Datenschutzbestimmungen und das Widerrufsrecht.

Da sich neben den Schmerzen auch andere Faktoren nachweislich auf die Expression von Zytokinen im peripheren Blut auswirken, wurden bei den in die Studie eingeschlossenen Patienten die folgenden Ausschlusskriterien angewendet: keine sportliche Betätigung in den letzten 24 Stunden, kein Alkohol- und kein Nikotinkonsum in den letzten 24 Stunden. Die Blutentnahme wurde auf die Morgenstunden zwischen acht und zehn Uhr beschränkt, da auch eine zirkadiane Rhythmik der Zytokinsekretion bekannt ist.

Peripher-venöses Blut wurde in jeweils zwei Serummonovetten und vier Ethyldiamintetraacetat (EDTA)-Monovetten entnommen und sofort auf Eis gelagert. Das EDTA-Blut wurde innerhalb einer halben Stunde in 2 ml-Cups à 500 µl aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend erfolgte die Lagerung bei -80 °C bis zur mRNA Extraktion. Das Blut in den Serummonovetten wurde fünf Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute (UPM) zentrifugiert, auf Eis gelagert und ebenfalls aliquotiert. Bis zur Messung der Serumproteine wurden die Proben bei -80 °C eingefroren.

#### 2.3.1 Untersuchte Zytokine

Wir untersuchten in allen Blutproben die relative Genexpression und die Proteinmenge der Zytokine IL-2, TNF, IL-4 und IL-10.

## 2.4 RNA Extraktion

Zur RNA Extraktion aus Vollblut wurde die Guanidinsäure-Phenol-Methode nach Chomczynski mit einigen Modifikationen verwendet (Chomczynski und Sacchi 1987; Kruse et al. 1997). Zur Vermeidung von Kontaminationen mit RNAsen und Desoxyribonucleinsäure (*desoxyribonucleic acid*, DNA) wurden die Arbeiten unter Luftabzug, mit Einmalhandschuhen und sterilen Gefäßen, Pipettenspitzen, Spritzen in einem separat von den anderen Kliniklaboren gelegenen Raum durchgeführt.

### 2.4.1 Protokoll der RNA Extraktion

Materialien: siehe Tabelle 3.1

500 µl jeder Blutprobe wurden nach dem Auftauen auf Eis gelagert und mit 500 µl Guanidinthiocyanat versetzt. Durch Aufziehen und Ausspülen in eine Spritze (20G-Kanüle, 1-ml Omnifix F-Spritze) wurden die Blutzellen lysiert und die chromosomale DNA mechanisch geschert. Es wurden 650 µl Phenol-Chloroform-Lösung zugegeben und die Suspension durch Schütteln (Vortex GLW L46) homogenisiert. Anschließend erfolgte eine zehn minütige Lagerung auf Eis. Die RNA wurde durch Zentrifugation (15 Min., 4 °C und 10000 UPM) von Zelldebris und DNA getrennt. Die RNA verblieb dabei im Überstand, der anschließend abpipettiert (Volumen: 600 µl) und auf 1,5 ml-Cups verteilt wurde. Zur Fällung der RNA wurden 600 µl Isopropanol zugegeben und die Proben bei -20 °C für mind. 40 Min. inkubiert. Mittels Zentrifugation (15 Min., 4 °C, 10000 UPM) wurde die RNA sedimentiert. Das Pellet wurde erneut mit gleichen Volumina Guanidinthiocyanat und Isopropanol gelöst (je 600 µl) und die RNA für mind. 45 Min. bei -20 °C ausgefällt. Per Zentrifugation (20 Min., 4 °C, 14000 UPM) wurde die RNA sedimentiert und durch Dekantieren von der Lösung getrennt. Sie wurde mit 70%-Ethanol in Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser (500 µl) gewaschen und dabei 10 Min. auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (20 Min., 4 °C, 14000 UPM) wurde das RNA-Pellet nach Dekantieren des Überstandes bei Raumtemperatur für mindestens 30 Min. getrocknet, um den Alkohol vollständig zu entfernen. Anschließend wurde die extrahierte RNA in 33 µl DEPC-Wasser gelöst. Die Proben wurden über Nacht bei -20 °C inkubiert und die RNA-Aus-

beute am Tag darauf photometrisch bestimmt. Dazu wurde in neuen 1,5-ml-Cups eine 1:30-Verdünnung der jeweiligen Probe hergestellt. Nach Eichung des Photometers auf „null“ für DEPC-Wasser wurde die Extinktion der verdünnten Proben je dreimal gemessen und der Mittelwert ermittelt. Die Messung der optischen Dichte wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm vorgenommen. Zur Bestimmung der Integrität der extrahierten RNA wurde die 260/280 *ratio* bestimmt. Bis zur Umschreibung in komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) erfolgte die Lagerung der Proben unter Lichtschutz bei -20 °C.

#### 2.4.2 Reverse Transkription

Zur Umschreibung der extrahierten RNA in cDNA wurde ein modifiziertes Protokoll der TaqMan® Gene Expression Assays (Firma [Fa.] Applied Biosystems, Forster City, USA) verwendet, welches eine rekombinante Reverse Transkriptase des *Moloney Murine Leukemia Virus* verwendet. Die Effizienz des Enzyms wird erhöht, indem Kofaktoren wie MgCl<sub>2</sub>, Desoxynucleotidtriphosphate, spezifische Inhibitoren, pH-Wert und Temperatur optimiert und konstant gehalten werden.

#### 2.4.3 Protokoll der Reversen Transkription

Materialien: siehe Tabelle 3.2

Nach dem Auftauen wurden die RNA-haltigen Proben geschüttelt, zentrifugiert und auf Eis gelagert. Es wurden jeweils 750 ng RNA in die RT eingesetzt. Das entsprechende Volumen wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Volumen} = \frac{750 \text{ ng RNA}}{OD - \text{Mittelwert}}$$

Zunächst wurde ein Ansatz mit 750 ng RNA, DEPC-Wasser und 5 µl Random Hexameres hergestellt (Tabelle 2.4). Die Reaktionslösung wurde anschließend für 3 Min. bei 85 °C erhitzt, um die RNA aus der Sekundärstruktur zu entfalten, störende Proteine zu denaturieren und eine Anlagerung der *Random Hexameres* an die RNA zu ermöglichen. Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt.



Substanz (Menge oder Konzentration)	Reaktionsansatz	Zielkonzentration
RNA-Probe (entsprechend 750 ng)	X $\mu$ l	
Aqua dest.	+ Y $\mu$ l	
	$\Sigma$ 32,8 $\mu$ l	
Random Hexameres	+ 5 $\mu$ l	1,25 $\mu$ M
Oligo Desoxythymidin	+ 2 $\mu$ l	0,5 $\mu$ M
Master-Mix (siehe folgende Tabelle 2.5)	+ 60,2 $\mu$ l	Siehe Tabelle 2.5
Gesamtvolumen	$\Sigma$ 100 $\mu$ l	

**Tabelle 2.4: Pipettierschema der reversen Transkriptions-PCR**

Um mRNA in cDNA zu überführen wurden zusätzlich je Probe 2  $\mu$ l Oligo Desoxythymidin als *primer* zur Anlagerung an die Poly-A-Sequenz der mRNA eingesetzt. Die weiteren Reagenzien inklusive dem Enzym Reverse Transkriptase wurden als Master Mix (Tabelle 2.5) in einen Kolben pipettiert.

Substanz	Volumen	Zielkonzentration
10 X RT Buffer	10 µl	1 X (500 mM KCl, 100 mM Tris HCl, pH 8,3)
MgCl <sub>2</sub>	22 µl	5,5 mM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	20 µl	2 mM
RNase Inhibitor	2 µl	0,4 U/µl
MuLV Reverse Transkriptase	6,2 µl	3,1 U/µl
Gesamtvolumen	∑ 60,2 µl	

**Tabelle 2.5: Pipettierschema des Mastermix der reversen Transkriptions-PCR, dATP = Desoxyadenosintriphosphat, dCTP = Desoxycytidintriphosphat, dGTP = Desoxyguanosintriphosphat, dTTP = Desoxythimidintriphosphat, MuLV = *Moloney Murine Leukemia Virus***

Die Einstellungen des GeneAmpCycler 9700 lauteten wie folgt:

Dauer	Schritt	Temperatur
10 Min	Annealing	25 °C
60 Min.	Reverse Transkription	48 °C
5 Min.	Enzymaktivierung	96 °C
∞	Lagerung bis Entnahme	4 °C

**Tabelle 2.6: Cycler Programm der reversen Transkriptions-PCR**

Die cDNA wurde anschließend direkt in die qRT-PCR eingesetzt oder bei -20 °C gelagert.

## 2.5 Quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR)

Die relative Genexpression verschiedener Zytokine wurde mittels qRT-PCR bestimmt (Wilhelm und Pingoud 2003). Die folgende Terminologie ist zum Verständnis der qRT-PCR Methode hilfreich:

<b>Begriff</b>	<b>Definition</b>
<i>target</i>	Zielsequenz des Gens, dessen RNA Expression gemessen wird, z.B. IL-2, TNF, IL-4, IL-10.
<i>housekeeping gene</i>	Vergleichsgen, dessen RNA Expression gemessen wird und zur Normalisierung der Messwerte des <i>target</i> dient, z.B. 18srRNA
<i>Threshold cycle (C<sub>t</sub>)</i>	Zyklusanzahl, bei der die Signalintensität des <i>target</i> bzw. <i>housekeeping gene</i> die Grundlinie ( <i>baseline</i> ) über mehr als zehn Standardabweichungen verlässt und in die exponentiale Phase der Reaktion eintritt.
<i>primer</i>	Basensequenz des Startpunktes im Zielgen für die PCR.
<i>calibrator</i>	Referenzprobe, welche die Vergleichsgruppe repräsentiert und in jeder PCR der Experimentalproben mit gemessen wird.

**Tabelle 2.7: Terminologie der qRT-PCR**

Als Nachweisverfahren für die Amplifikation wurde das TaqMan<sup>®</sup> Verfahren der Fa. Applied Biosystems verwendet. Es nutzt die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*. Neben dem *primer* in 5'-3'- und dem *primer* in 3'-5'-Richtung werden weitere Oligonukleotide zur Signalgebung (Taq Man<sup>®</sup> Minor Groove Binder[MGB]) eingesetzt (Heid et al. 1996). Ihre Nukleotidsequenz ist komplementär zu einer Sequenz zwischen den Primersequenzen der gesuchten cDNA. Die Signalsequenz ist mit einem am 3'-Ende gebundenen Quencher (6-Carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamin, TAMRA) und einem 5'-gebundenen Fluorophor (Reporter) markiert. Im intakten Zustand wird der Fluorophor so von einem Quencher verdeckt, dass kein Signal emittiert wird. Trennt die Polymerase während der DNA-Polymerisation das 3'-Nukleotid vom 5'-Nukleotid, so setzt der Fluorophor auf Lichtanregung Energie frei, die photometrisch detektiert werden kann. Die zur Messung der Zytokin cDNA verwendete Signalsequenz ist mit 6-Carboxy-Fluoreszein (FAM) besetzt und wird durch Licht bei

488 nm angeregt, worauf sie Licht bei 518 nm entsendet. Die VIC-Signalsequenz für die 18srRNA emittiert Licht bei 554 nm. Der Zyklus, ab dem Signalwerte über der Grundlinie gemessen werden, wird als  $C_t$ -Wert registriert. Hohe  $C_t$ -Werte deuten auf niedrige Expression hin und niedrige  $C_t$ -Werte deuten umgekehrt auf eine hohe Expression hin.

Zur Ermittlung des primerspezifischen *calibrator* wurden zunächst alle Proben der Kontrollgruppe gemessen. Aus den erhaltenen  $C_t$ -Werten wurde der Mittelwert gebildet und diejenige Probe, deren  $C_t$ -Wert dem errechneten Mittelwert am nächsten kam wurde als *calibrator* ausgewählt. Der so bestimmte *calibrator* wurde primerspezifisch auf jeder PCR-Platte mitgeführt und diente als interne Kontrolle, sowie als Marker für die Interplattenvergleichbarkeit. Ein PCR-Lauf wurde nur dann in die Endauswertung aufgenommen, wenn der  $C_t$ -Wert des *calibrator* zwischen den Läufen um weniger als eins schwankte. In jedem Lauf wurde zusätzlich eine Negativkontrolle aus DEPC-Wasser mitgeführt, die keine cDNA enthielt. Sie diente als Kontrolle der Reagenzien auf evtl. Kontaminationen. Alle *target* Proben wurden als Triplet, alle 18srRNA-Proben als Doublet gemessen.

### 2.5.1 Protokoll der qRT-PCR

Materialien: siehe Tabelle 3.3

Zunächst wurde für *target* und 18srRNA jeweils ein Master-Mix pipettiert. Folgende Tabelle gibt die Komponenten und das Pipettierschema des Master-Mix, des *target* und der 18srRNA wieder:

<b>Substanz</b>	<b>Target (Volumen / well)</b>	<b>18 srRNA (Volumen / well)</b>
DEPC–Wasser	17,5 µl	20 µl
Master Mix UMM	+ 25 µl	+ 25 µl
<i>primer</i> (8 µM), Signalsequenz (5 µM 20X Mix)	+ 2,5 µl	+ 2,5 µl
<i>target</i> (cDNA)	+ 5 µl	+ 2,5 µl
Gesamtvolumen	∑ 50 µl	∑ 50 µl

**Tabelle 2.8: Substanzen und Mengen der qRT-PCR**

Für die Zytokinmessung wurden 5 µl cDNA in 45 µl Mix gegeben, für die 18srRNA-Messung 2,5 µl cDNA in 47,5 µl Mix. Der Gesamtansatz betrug damit 50 µl. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte in einem ABI Prism 7700 Cycloer (Fa. Applied Biosystems). Das Gerät besitzt einen Argon Ionen Laser der Licht von 488 nm und 514 nm emittiert und die freigesetzten Reporter zur Fluoreszenz anregt.

Die Einstellungen des Cycloer lauteten wie folgt:

<b>Dauer</b>	<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>
2 Min.	Enzymaktivierung	50 °C
10 Min.	Denaturierung	95 °C
40 Zyklen à 75 Sekunden:		
15 Sek.	DNA-Denaturierung	95 °C
1 Min.	DNA-Anlagerung/ -Verlängerung	60 °C

**Tabelle 2.9 : Cycloer–Programm der quantitativen *real-time* PCR**

Bei einigen Proben erwies sich die gemessene Zytokin mRNA als sehr niedrig, so dass die  $C_t$ -Werte der Triplets stark variierten oder deutlich über der von der Herstellerfirma als noch zuverlässig angegebenen Grenze von 36 Zyklen lagen. Proben, die bei einer zweiten Messung erneut große Varianzen in den Triplets aufwiesen wurden zur Stabilisierung der  $C_t$ -Werte mit einem 25 µl Gesamtansatz untersucht, um eine Stabilisierung der  $C_t$ -Werte und höhere Reliabilität zu

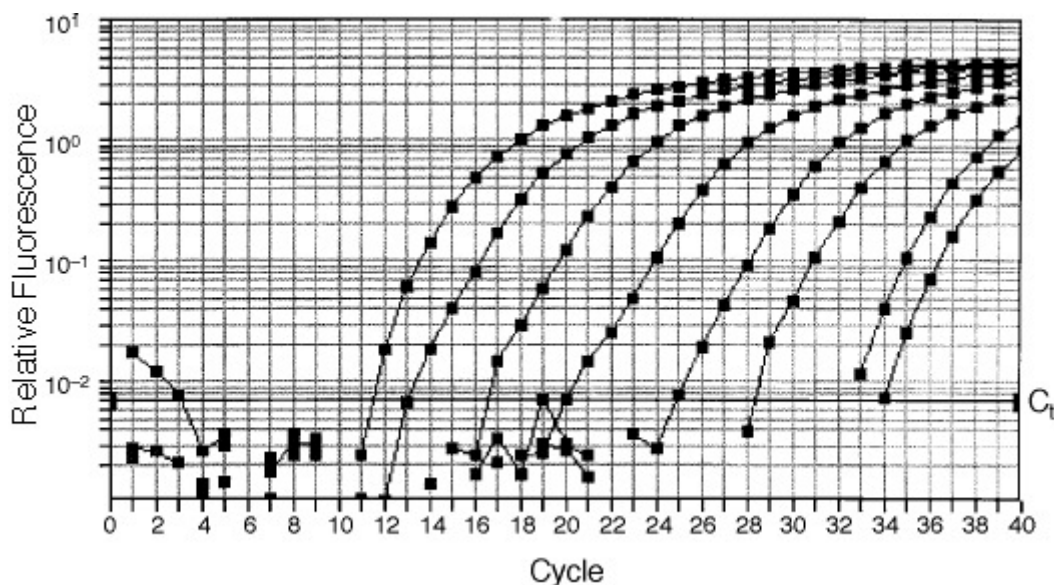
erreichen. Dazu wurde ein Mastermix in den oben genannten Volumenverhältnissen hergestellt. Das Pipettierschema für *target* und 18s RNA lautete wie folgt:

Substanz	Target	18 srRNA
Mastermix (DEPC-Wasser, MasterMix UMM, <i>primer</i> & Signalsequenz)	22,5 $\mu$ l	23,7 $\mu$ l
Probe	5 $\mu$ l	2,5 $\mu$ l
Gesamtvolumen	$\Sigma$ 27,5 $\mu$ l	$\Sigma$ 26,2 $\mu$ l

**Tabelle 2.10: Alternativer Ansatz der qRT-PCR**

### 2.5.2 Auswertung der qRT-PCR

Die qRT-PCR verläuft in drei Phasen (Abbildung [Abb.] 2.1): Phase 1 (*baseline*) ist von suboptimalen Enzymwirkungen und einer Kopienzahländerung unterhalb der Exponentialfunktion gekennzeichnet. Phase 2 (log-Phase) beginnt mit Erreichen eines Schwellenwertes (dem  $C_t$ -Wert, siehe oben) und folgt einer Exponentialfunktion (Verdopplung der Kopienzahl bei jedem Zyklus). Phase 3 ist durch Überproduktion der Kopien und erneuter Abflachung der Kurve erkennbar.



**Abb. 2.1: qRT-PCR mit acht eingesetzten Proben**

Die angewendete Methode vergleicht die  $C_t$ -Werte des *target* in Bezug auf die 18srRNA, die in allen untersuchten Zellen eine in etwa gleich hohe, stabile Ex-

pression hat. Anschließend werden die Werte auf den *calibrator* bezogen. Diese Normalisierung der  $C_t$ -Werte gegen den auf jeder Platte mitgeführten *calibrator* wird als  $\Delta\Delta C_t$ -Methode bezeichnet (s.u.). Die Auswertung wurde mit Excel-Software durchgeführt. Die Beziehung zwischen *target* und 18 srRNA lässt sich mit

$$\Delta C_t \text{ target} = C_t (\text{Probe target}) - C_t (\text{Probe } 18\text{s RNA})$$

$$\Delta\Delta C_t = - (\Delta C_t \text{ target} - \Delta C_t \text{ Calibrator})$$

beschreiben. Sie ist die Grundlage der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Bei der anschließenden Berechnung der relativen Genexpression gilt:

$$\text{Kopienzahl} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

Die  $C_t$ -Werte des *calibrator* werden damit als eins oder 100% gesetzt. Alle  $C_t$ -Werte der übrigen Proben werden darauf bezogen. Somit macht die qRT-PCR keine absoluten Angaben über mRNA Mengen, sondern gibt immer nur das Verhältnis zwischen einer Einzelprobe einer Population oder Gruppe und einem ausgewählten *calibrator* wieder.

Nach Abschluss eines jeden PCR-Laufes wurde der Schwellenwert (*threshold-value*) für die Berechnung der  $C_t$ -Werte einheitliche bei 0,02 und die *baseline* auf 3–30 Zyklen (Zytokine) bzw. 3–15 Zyklen (18srRNA) festgelegt, so dass die Ergebnisse der einzelnen Läufe vergleichbar waren.

## 2.6 Messung der Proteine

Die Proteinspiegel wurden aus Serumproben mit kommerziell erhältlichen *enzyme-linked immunosorbant assay* (ELISA)-Kits nach dem Sandwich-ELISA-Verfahren bestimmt (Engvall und Perlmann 1971). Das Prinzip basiert auf der Bindung des Proteins (Antigen[Ag]) mit einem gebundenen spezifischen Antikörper (Ak), dem *coating-Ak*, und einem zweiten löslichen Ak, dem *detection-Ak*. Die *detection-Ak* sind an ein Enzym gekoppelt, dass ein lösliches Substrat zu einem Chromogen enzymatisch umsetzt. Die Farbintensität kann photometrisch

quantifiziert werden und ist direkt proportional zum gebundenen Protein. Es wurden folgende Kits verwendet:

Name des Testes	Hersteller
IL-2 EASIA-kit	Kat.Nr. KAC 1241, Fa. Biosource, Belgien
Human TNF- $\alpha$ Immunoassay kit	Kat.Nr. KHC 3011, Fa. Biosource, Belgien
Human IL-4 UltraSensitive Immunoassay kit	Kat.Nr. KHC 0044, Fa. Biosource, Belgien
Human IL-10 Immunoassay Quantikine <sup>®</sup> HS	Kat.Nr. HS100B, Fa. R&D Systems, Wiesbaden

**Tabelle 2.11 : enzyme-linked immunosorbant assay: Kits und Hersteller**

Da die Proteinmenge vieler Zytokine an bzw. unter der Nachweisgrenze lag, wurden zum Teil ultra-sensitive ELISA eingesetzt. Die untere Nachweisgrenze der verwendeten ELISA ist folgender Tabelle zu entnehmen (Angaben der Hersteller):

Zytokin	Sensitivität	Linearer Bereich
human IL-2	0,1 IU/ml	0,9 - 30 IU/ml
human TNF- $\alpha$	1,7 pg/ml	
human IL-4	0,27 pg/ml	0,39 - 25 pg/ml
human IL-10	0,5 pg/ml	

**Tabelle 2.12: enzyme-linked immunosorbant assay: Sensitivität**

### 2.6.1 Protokoll der enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA)

Materialien: siehe Tabelle 3.4 bis 3.7

Geräte: siehe Tabelle 3.8

Die Serumproben wurden langsam auf Eis aufgetaut und durch Schütteln in Lösung gebracht. Es wurde eine Verdünnungsreihe der mitgelieferten Standardlösungen angelegt. Die Ausgangskonzentration lag bei 30 U/ml (IL-2), 1000 pg/ml (TNF), 25 pg/ml (IL-4), 50 pg/ml (IL-10), der Verdünnungs-Faktor bei eins zu zwei über fünf bis sechs Verdünnungsstufen. Die Reaktionslösung mit *Streptavidin-horse-raddish-peroxidase* (Streptavidin-HRP) für Messungen von IL-



4 und von TNF und das Waschkonzentrat in Puffer wurden zu einer Arbeitslösung pipettiert. In die mit *coating*-Ak beschichteten Mikrotiterplatten wurden dann Standardlösung, Negativ-Kontrolle und Serumproben (Doublets) zu je 100 µl pro well einpipettiert. Beim TNF ELISA wurden 50 µl Inkubationspuffer pro *well* eingegeben. Zur Bindung der Proteine an die beschichteten Ak wurden die Platten unter Lichtschutz über Nacht inkubiert. Der Überstand mit nicht-gebundenem Protein wurde entfernt und drei Waschschriffe (je 0,4 ml pro well, Einwirkzeit 15 bis 30 Sekunden) durchgeführt. Je 100 µl des löslichen Ak-Enzym-Konjugates (HRP-Konjugat für IL-2; Biotin-Konjugat für TNF und IL-4; Alkalische Phosphatase-Konjugat für IL-10) wurden einpipettiert und erneut über mehrere Stunden und unter Lichtschutz inkubiert. Das Entfernen des Überstandes und dreimaliges Waschen diente dazu nicht-gebundene Ak zu eliminieren. In den Messungen für TNF und IL-4 wurde die Streptavidin-HRP-Arbeitslösung zu je 100 µl hinzugefügt, über 30 Minuten inkubiert und anschließend der Überstand entfernt und erneut dreimal gewaschen. Als abschließender Schritt wurde das Substrat (Tetramethylbenzidin [TMB] für IL-2, TNF und IL-4, Nikotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat [NADPH] für IL-10) zu je 100 µl hinzugefügt und unter Lichtschutz für 30 bis 120 Minuten inkubiert, so dass in einer enzymatischen Reaktion das Substrat (Chromogen) umgesetzt wurde. Zur Beendigung der Reaktion wurde eine Stopp-Lösung (50 bzw. 100 µl) eingesetzt. Die Extinktion der Standards und der Proben wurde bei 450 nm (TMB) bzw. 490 nm (NADPH) gegen den Leerwert (Chromogen und Stopp-Lösung) am Photometer gemessen.

#### 2.6.2 Auswertung der Proteinmessungen

Da eine enzymatische Reaktion einem sigmoiden Verlauf folgt, muss zur Erstellung einer Kalibrationskurve eine Normalisierung der Extinktionswerte erfolgen. Durch Umrechnung der Werte ließen sich diese im Zahlenbereich von null bis zehn darstellen. Mit log/log-Papier wurde eine Kalibrationskurve erstellt und der Extinktionswert  $x$  (direkt proportional zur Konzentration des Chromogens,  $x$ -Achse) und die Proteinkonzentration ( $y$ -Achse) abgelesen.

## 2.7 Statistik

Zur statistischen Auswertung unserer Daten verwendeten wir die *superior performing software systems* Version 13.0 (München, Deutschland). Da die Fragebögen auf NRS basierten wurde die Auswertung auf Ebene ordinal verteilter Werte vorgenommen. Für die Fragebogendaten und Zytokine wurden nicht-parametrische Korrelationen nach Spearman-Rho erstellt.

Die Zytokinexpression anhand der  $C_t$ -Werte der einzelnen Gruppen war bei der Prüfung auf Normalverteilung nicht-normalverteilt. Daher wurde der nicht-parametrische Kruskal-Wallis-H-Test für nicht-normalverteilte Stichproben sowie der Mann-Whitney-U-Test für den Paarvergleiche verwendet. Bei nicht-parametrischen Tests werden anstelle der absoluten Werte Ränge über die gesamte Wertemenge vergeben. Die Auswertung der ELISA-Daten erfolgte mittels Mann-Whitney-Test. P-Werte  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant definiert.

### 3 Materialien und Geräte

<b>Material/Reagenz/Gerät</b>	<b>Fa./Herstellung</b>
Roti – Quick - Kit	Fa. Roth, Karlsruhe
100 % Ethanol	Fa. J. Baker
DEPC-Wasser	Eigene Herstellung*
2ml- und 1,5ml-Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf, Hamburg
1ml-Omnifix-F-Spritzen	Fa. Braun
20G-Spritzennadel	Fa. Becton Dickinson
Vortex GLW L46	Fa. Hartenstein
Zentrifuge 5417	Fa. Eppendorf, Hamburg
Bio-Photometer mit Drucker Absauger für Küvette Meßküvette (UVette)	Fa. Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 3.1: RNA Extraktion und Messung der optischen Dichte; Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser wurde in sterilen 2 l-Flaschen angesetzt: Demineralisiertes Wasser und DEPC im Volumenverhältnis 1000:1, Inkubation über Nacht und anschließend Sterilisation im Autoklaven.**

<b>Reagenzien</b>	<b>Konzentration</b>	<b>Hersteller</b>
Oligo d(T) <sub>16</sub> 50	50 µM	Fa. Applied Biosystems, Forster City, USA
Random Hexameres	50 µM	
10 X RT Buffer II		
Deoxynucleotidtriphosphate		
Mix	10 mM	
MultiScribeReverse	50 U/µl	
RNAse Inhibitor	20 U/µl	
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	
Aqua destilata		Fa. DeltaSelect, Dreieich
GeneAmpCycler 9700		Fa. Applied Biosystems, Forster City, USA
0,2ml-Reaktionsgefäße		Fa. Eppendorf, Hamburg
Hitzeblock		Fa. Hartenstein

**Tabelle 3.2: reverse Transkriptions-PCR**

Reagenzien	Hersteller
TaqMan Universal PCR Master Mix	Fa. Applied Biosystems, Forster City, USA
Signalsequenz (dye, Fluoreszenzmolekül) : 18s rRNA (VIC-MGB, Assay ID: HS99999901_s1) Human IL-2 (20X, FAM-MGB, Assay ID : HS00174114_m1) Human TNF-alpha (20X, FAM-MGB, Assay ID: HS00174128_m1) Human IL-4 (20X, FAM-MGB, Assay ID : HS00174122_m1) Human IL-10 (20X, FAM-MGB, Assay ID : HS00174086_m1)	Fa. Applied Biosystems, Forster City, USA
Aqua destilata	Fa. DeltaSelect, Dreieich
7700 Prism Thermocycler	Fa. Applied Biosystems, Forster City, USA

**Tabelle 3.3: qRT-PCR; Pipetten der Fa. Gilson (RNA Extraktion, Messung der optischen Dichte, reverse Transkription) und Fa. Eppendorf (PCR) wurden mit Filterspitzen der Fa. Eppendorf und der Fa. Starlab verwendet.**

<b>Material / Reagenzien</b>	<b>Menge pro Messung</b>
Mikrotiterplatte mit 96 anti-IL-2-beschichteten Einlassungen (wells)	1
IL-2-Standart in humanem Serum und Konservierungsmittel	100 µl/well (Verdünnungsreihe)
Reaktionslösung (B) für humanes Serum	100 µl/well
Anti-IL-2-Antikörper konjugiert mit horseradish peroxidase in Pufferlösung für Proteine und Konservierungsmittel	50 µl/well
Kontroll-Lösung mit humanem Plasma und Konservierungsmitteln	100 µl/well (Kontrolle)
Wasch-Konzentrat in Puffer und Konservierungsmitteln	0,4 ml/well
Chromogen (TMB)	100 µl/well
Stopp – Lösung	200 µl/well

**Tabelle 3.4: Substanzen und Materialien des IL-2 EASIA (Fa. Biosource Europa S.A.,Belgien)**

<b>Materialien und Reagenzien</b>	<b>Menge pro Messung</b>
Hu-IL-4 Standard	100 µl/well (Verdünnungsreihe)
Standard Verdünnungs-Lösung (NaCl)	100 µl/well (Kontrolle)
Hu-IL-4 Antikörper-beschichtete Titerplatte mit 96 Einlassungen (wells)	1
Hu IL-4 Antikörper konjugiert mit Biotin	100 µl/well
Streptavidin-HRP Konzentrat (100X)	100 µl/well (Arbeitsverdünnung auf 1/100)
Streptavidin-HRP Verdünnung	
Wasch Konzentrat in Pufferlösung	0,4 ml/well
Chromogen (TMB)	100 µl/well
Stopp – Lösung	100 µl/well
Verschlusskappen	

**Tabelle 3.5: Substanzen und Materialien für IL-4 US ELISA (Fa. Biosource, Belgien)**

<b>Materialien und Reagenzien</b>	<b>Menge pro Messung</b>
Hu-TNF-alpha Standart	100 µl/well (Verdünnungsreihe)
Inkubations Puffer-Lösung	50/well
Standart Verdünnungs-Lösung (NaCl)	100 µl/well (Kontrolle)
Hu-TNF-alpha Antikörper-beschichtete Titerplatte mit 96 Einlassungen (wells)	1
Hu-TNF-alpha Antikörper konjugiert mit Biotin	100 µl/well
Streptavidin-HRP Konzentrat (100X)	100 µl/well (Arbeitsverdünnung auf 1/100)
Streptavidin-HRP Verdünnung	
Wasch Konzentrat in Pufferlösung	0,4 ml/well
Chromogen (TMB)	100 µl/well
Stopp – Lösung	100 µl/well
Verschlusskappen	

**Tabelle 3.6: Substanzen und Materialien für TNF ELISA (Fa. Biosource, Belgien)**



<b>Materialien und Reagenzien</b>	<b>Menge pro Messung</b>
Substrat-Verdünnungslösung	
Calibrator-Verdünnungslösung RD6-10	
IL-10 Antikörper-beschichtete Titerplatte mit 96 Einlassungen (wells)	1
IL-10 Standard-Lösung	200 µl/well (Verdünnungsreihe)
Assay Verdünnungs-Lösung RD1-10	50 µl/well
IL-10 Antikörper konjugiert mit alkalischer Phosphatase	200 µl/well
Amplifikations-Lösung	50 µl/well ( in Amplifikations-Verdünnungs-Lösung)
Wasch Konzentrat in Pufferlösung (10X)	0,4 ml/well
Substrat (Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat)	50 µl/well
Stopp-Lösung	50 µl/well
Verschlusskappen	

**Tabelle 3.7: Substanzen und Materialien für IL-10 ELISA (Fa. R&D Systems, Wiesbaden)**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Pipetten	Fa. Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Fa. Eppendorf, Hamburg
Destilliertes Wasser	Fa. DeltaSelect, Dreieich
Reaktionsgefäße	Fa. Eppendorf, Hamburg
Photometer	Fa. Eppendorf, Hamburg

**Tabelle 3.8: Geräte der ELISA-Messung**

## 4 Ergebnisse

Diese Arbeit hatte als wichtigstes Ergebnis eine bei Patienten mit schmerzhafter PNP und Patienten mit schmerzloser PNP signifikant unterschiedliche Expression und Produktion pro- und anti-inflammatorischer Zytokine. Pro-inflammatorische Zytokine lagen bei Patienten mit schmerzhafter PNP höher, während anti-inflammatorische Zytokine bei Patienten mit schmerzloser PNP überwogen. Bevor diese Daten graphisch dargestellt werden, folgt ein Überblick über die klinischen Daten der Patientengruppe sowie die Ergebnisse der Befragung mit Schmerzfragebögen.

### 4.1 Auswertung der klinischen Daten

#### 4.1.1 Häufigkeit der schmerzhaften und schmerzlosen PNPs

Die 52 Patienten mit PNP teilten sich auf in 32 Patienten (62 %) mit Schmerzen und 20 Patienten (38 %) ohne Schmerzen, entsprechend einem Verhältnis der Patienten mit schmerzhafter PNP zu Patienten mit schmerzloser PNP von 1,6 zu 1.

#### 4.1.2 Ätiologien der PNPs

Die Ätiologien der PNPs sind in der folgenden Tabelle 4.1 aufgelistet:

Patienten mit schmerzhafter PNP (n)	Patienten mit schmerzloser PNP (n)
VANP (9)	VANP (5)
CIDP (6)	CIDP (2)
axonale PNP (5)	axonale PNP (3)
SFN (3)	MADSAM (2)
diabetische PNP (2)	hereditäre PNP (2)
axonale PNP mit Perivaskulitis (2)	axonale PNP mit Perivaskulitis (2)
Amyloid-Neuropathie (1)	MMN (1)
PNP bei MGUS (1)	paraneoplastische PNP (1)
Vitamin B12-Mangel Neuropathie (1)	axonale Neuropathie bei Hypothyreose (1)
paraneoplastische Neuropathie (1)	gemischt axonale und demyelinisierende PNP (1)
axonale PNP bei POEMS-Syndrom (1)	

**Tabelle 4.1: Ursachenspektrum schmerzhafter und schmerzloser PNP. Abkürzungen:**  
**CIDP = Chronische inflammatorische und demyelinisierende PNP; MADSAM = *multifocal acquired demyelinating sensory and motor neuropathy*; MGUS = Monoklonale Gammopathie unklarer Signifikanz; MMN = multifokale motorische Neuropathie; POEMS = Polyneuropathie, Organomegalie, Endokrinopathie, M-Gradient, Hautläsionen (*skin lesions*); SFN = *small fiber neuropathy*; VANP = vaskulitische Neuropathie**

#### 4.1.3 Alter, Geschlecht und Krankheitsdauer

Die demographischen Daten der Patientengruppen sind der folgenden Tabelle 4.2 zu entnehmen:

	<b>Geschlecht (n)</b>	<b>Mittleres Alter (Jahre, Spannweite)</b>	<b>Mittlere Dauer (Jahre, Spannweite)</b>
<b>Patienten mit schmerzhafter PNP</b>	Frauen 15 Männer 17	62 (25 bis 81)	5 (1/12 bis 24)
<b>Patienten mit schmerzloser PNP</b>	Frauen 3 Männer 17	59 (25 bis 75)	8 (1/12 bis 20)

**Tabelle 4.2: Gruppendaten der Patientengruppen (siehe auch Tab. 7.1 und 7.2 im Anhang)**

Die durchschnittliche Krankheitsdauer lag bei den schmerzlosen PNP zwar mit acht Jahren im Durchschnitt höher als bei den schmerzhaften PNP mit fünf Jahren, eine Korrelation zwischen Krankheitsdauer und Zytokinexpression war aber nicht nachweisbar ( $p > 0,05$  für alle vier Zytokine).

Hinsichtlich der Geschlechterverteilung zeigte sich ein höherer Anteil weiblicher Patienten bei den schmerzhaften PNP. In unserer Studienpopulation fanden wir keinen Unterschied in der systemischen Zytokinexpression für IL-2, TNF, IL-4 und IL-10 bei Männern und Frauen ( $p > 0,05$  für alle vier Zytokine).

Zusammenfassend lagen bei den Patienten PNPs unterschiedlicher Ätiologie sowohl schmerzhaften als auch schmerzlosen Verlaufs vor. Die demographischen Daten in beiden Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander und zeigten keinen Zusammenhang mit der Zytokinexpression im Blut.

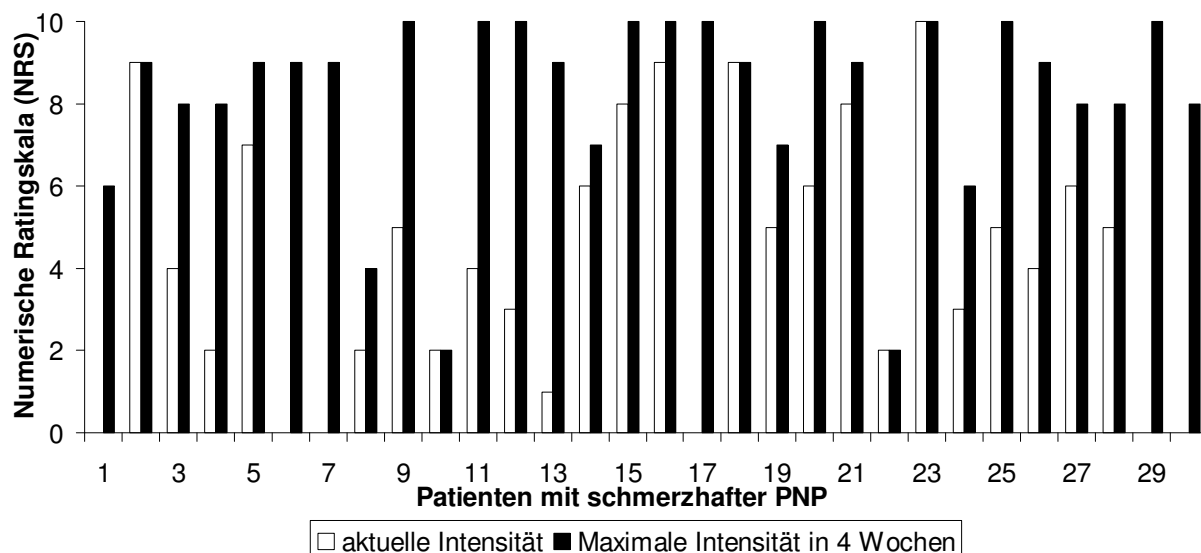
#### 4.2 Fragebogenauswertung

Die 32 Patienten mit schmerzhafter PNP wurden nach Schmerzen auf einer NRS befragt. 30 der 32 Patienten beantworteten den NPSI, die GCPS und die ADS, 28 Patienten zudem die NPSD. 17 Patienten ohne Schmerzen wurden mit der ADS befragt. Nach Auswertung der Antworten wurde der Median je Gruppe und Skala berechnet.

##### 4.2.1 Intensitätsskalen (GCPS und NPSD)

Die aktuelle Schmerzintensität war mittelstark. Im NPSD und GCPS lag sie zwischen 4 und 6 NRS. Die mediane Schmerzintensität der Patienten mit schmerzhafter PNP lag in den vergangenen vier Wochen (GCPS) zwischen fünf und

sechs NRS. Die maximale Schmerzstärke in den letzten vier Wochen war bei 27 von 30 Patienten größer fünf auf einer NRS (GCPS, Abb. 4.1).



**Abb. 4.1 Schmerzintensität: aktuell und letzte vier Wochen**

#### 4.2.2 Charakteristika neuropathischer Schmerzen (NPSI und NPSD)

Die Fragen nach evozierten Schmerzen wurden von zwei Drittel der Befragten positiv beantwortet. Hier zeigten sich am häufigsten Schmerzen auf Druck (63%, mediane Stärke 6/10, Tabelle 4.3) und Berührungsempfindlichkeit der Haut (54%, mediane Stärke 6/10). Parästhesien waren sehr häufig (83%, mediane Stärke 8/10, Tabelle 4.3). Der Median des Summenscores des NPSI lag mit 28/100 (n= 30, Spannweite 0/100 bis 75/100) vergleichsweise niedrig.

Die „Unannehmlichkeit“ der Schmerzen wurde von 28 Patienten hoch bewertet (mediane Stärke 8/10, Tabelle 4.4), und die Schmerzen als „tief“ lokalisiert (mediane Stärke 7/10, Tabelle 4.4). Der als NPS6 bezeichnete Durchschnittswert aus sechs erfragten Schmerzqualitäten lag in der unteren Hälfte der NRS (Tabelle 4.4).

<b>Frage nach ...</b>	<b>Prozent positiver Antworten</b>	<b>NRS der positiven Antworten (Median)</b>
Spontanschmerzen		
Brennen	55 %	7/10
Einschnüren	45 %	6,5/10
Druck	61 %	6/10
Dauer der Spontanschmerzen in 24 Std.		
Dauerhaft (mehr als 12 Stunden)	47 %	
Zwischen 1 und 12 Stunden	26 %	
Weniger als 1 Stunde	26 %	
Schmerzattacken		
Wie elektrische Schläge	33 %	6/10
Stechend	66 %	7/10
Anzahl der Schmerzattacken in 24 Std.		
Mehr als 20	22 %	
Weniger als 20	58 %	
Evozierte Schmerzen		
Durch Reiben	16 %	6/10
Durch Druck	63 %	6/10
Durch Kontakt mit kaltem Gegenstand	16 %	7/10
Gefühlsstörungen		
Kribbeln	83 %	6/10
Ameisenlaufen	83 %	7/10

**Tabelle 4.3: Ergebnisse des NPSI (n=30); NRS=numerische Ratingskala**

<b>Frage nach...</b>	<b>Median (Spannweite)</b>
Schmerzqualitäten (NPS6)	17/60 (0/60 – 45/60)
Unannehmlichkeit der Schmerzen	8/10 (2/10 – 10/10)
Tief drinnen empfundenen Schmerzen	7/10 (0/10 – 10/10)
Oberflächlich empfundenen Schmerzen	5/10 (0/10 – 9/10)
Summenscore	41/100 (14/100 – 76/100)

**Tabelle 4.4: Ergebnisse des NPSD (n=28), Auswertung nach den von Galer und Jensen (Galer und Jensen 1997) beschriebenen Berechnungen**

#### 4.2.3 Behinderung (GCPS)

Je nach Anzahl an Schmerzpunkten (Schmerzintensität) und Behinderungspunkten (Behinderung und Tage mit Schmerzen) wurden die Patienten zur Klassifizierung in vier Kategorien eingeteilt.

<b>Numerische Klasse</b>	<b>Verbale Klasse</b>
Grad 0	schmerzfrei
Grad 1	wenig Behinderung, geringe Schmerzintensität
Grad 2	wenig Behinderung, hohe Schmerzintensität
Grad 3	hohe Behinderung, mäßig einschränkend
Grad 4	hohe Behinderung, schwer einschränkend

**Tabelle 4.5: Auswertung des GCPS nach (Von Korff et al. 1992).**

Beachtenswert war, dass es sich hier um chronische Schmerzen handelte, die sich auch auf die Lebensqualität der Patienten auswirkten. Die Mehrzahl der Patienten wurde in der GCPS als durch die Schmerzen im Alltagsleben hochgradig behindert eingestuft (Grad 3 und 4 der GCPS, Tabelle 4.6).

<b>GCPS – Klasse *</b>	<b>Patientenanzahl (Prozent)</b>
0	0 (0 %)
1	4 (13 %)
2	3 (10 %)
3	10 (30 %)
4	13 (43 %)

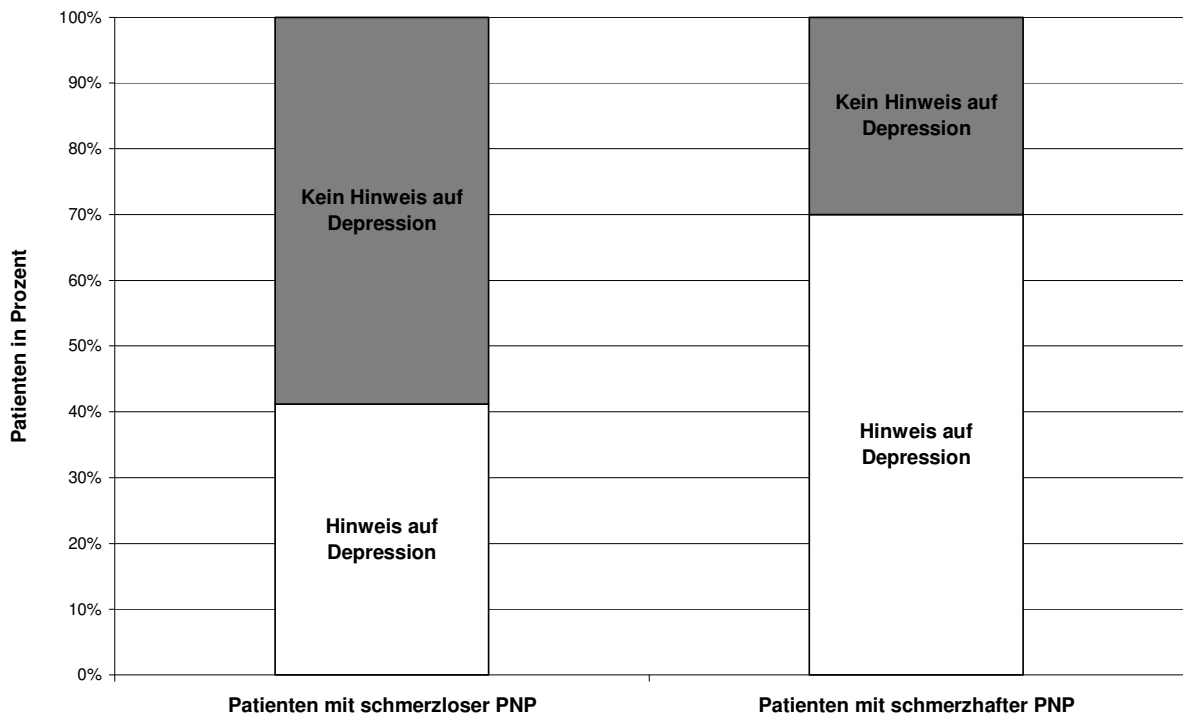
**Tabelle 4.6: Klassifizierung der Behinderung nach der GCPS (n=30)**

\* verbale Klassifikation: siehe Tabelle 4.5

#### 4.2.4 Allgemeine Depressionsskala

Die Antwortmöglichkeiten „selten“, „manchmal“, „öfters“, „meistens“ wurden mit Punktwerten von null bis drei gewichtet und die Summe aller Punkte als Gesamtwert (Minimum 0, Maximum 60) ermittelt. Ein Summenwert > 16 gilt als Hinweis auf eine klinisch relevante Depression (Hautzinger und Bailer 1993). Patienten mit Schmerzen hatten signifikant häufiger erhöhte ADS-Werte als Patienten ohne Schmerzen: 21 von 30 Patienten (70 %) mit schmerzhafter PNP und erhöhtem ADS Wert im Gegensatz zu sieben von 17 Patienten (41 %) mit schmerzloser PNP und erhöhtem ADS Wert (Abb. 4.2,  $p < 0,0001$ ). Die Wahrscheinlichkeit eine schmerzhaft PNP zu haben lag bei Patienten mit Hinweis auf eine Depression höher als bei Patienten ohne Hinweis auf eine Depression (odds ratio=3,33).





**Abb. 4.2: ADS bei Patienten mit schmerzloser PNP und schmerzhafter PNP  
( $p < 0,0001$ )**

### 4.3 Labordaten

#### 4.3.1 Routinediagnostik

In der Routinediagnostik fanden sich bei keinem Patienten Anzeichen einer systemischen Entzündung (i.e. Fieber in Kombination mit Leukozytose und CRP Erhöhung). Lediglich zwei Patienten wiesen Leukozytenerhöhungen  $>10000/\mu\text{l}$  infolge einer Kortisonpulstherapie auf. Vier der Patienten hatten milde CRP Erhöhungen im Bereich von 1,5 bis 4,9 mg/dl (Normwert 0 bis 0,5 mg/dl).

#### 4.3.2 Ergebnisse der qRT-PCR

Zur Darstellung der relativen Zytokinexpression wurde ein Scatterplot gewählt, welcher die relative Genexpression einer Probe einem Punkt auf einer linearen Skala zuordnet (Abb. 4.3 bis 4.6). Der Mann-Whitney-U-Test wurde für die Paarvergleiche zwischen zwei Gruppen verwendet.

Die relative Genexpression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2 und TNF war bei Patienten mit schmerzhafter PNP in etwa doppelt so hoch wie bei Pati-

enten mit schmerzloser PNP ( $p=0,03$  und  $p=0,001$ ) und bei den Kontrollen ( $p=0,001$  und  $p<0,0001$ , Abb. 4.3 und 4.4).

Die relative IL-4 Genexpression war tendenziell niedriger bei Patienten mit schmerzhafter PNP als bei Patienten mit schmerzloser PNP und Kontrollen (nicht signifikant, Abb. 4.5). IL-10 mRNA wurde bei Patienten mit schmerzhafter PNP nur etwa halb so hoch exprimiert wie bei Patienten mit schmerzloser PNP ( $p=0,001$ ) und bei gesunden Kontrollen ( $p=0,004$ , Abb. 4.6).

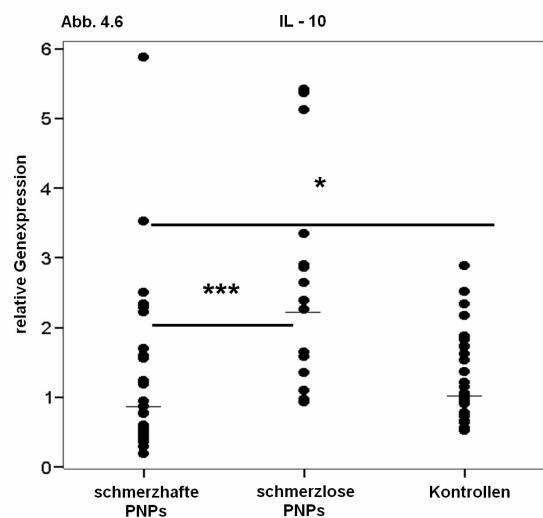
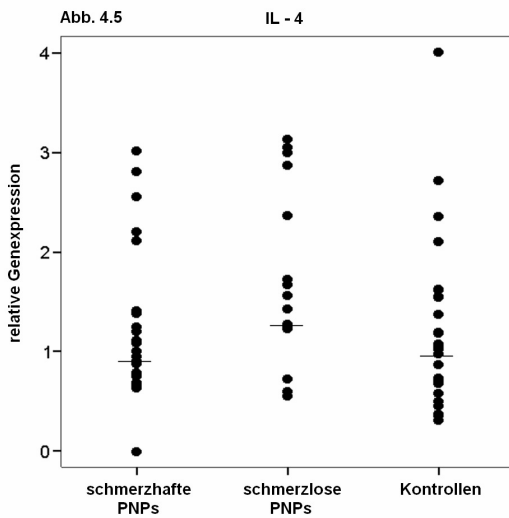
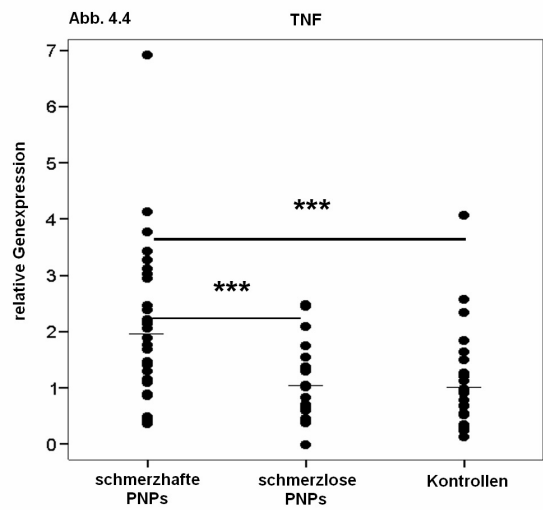
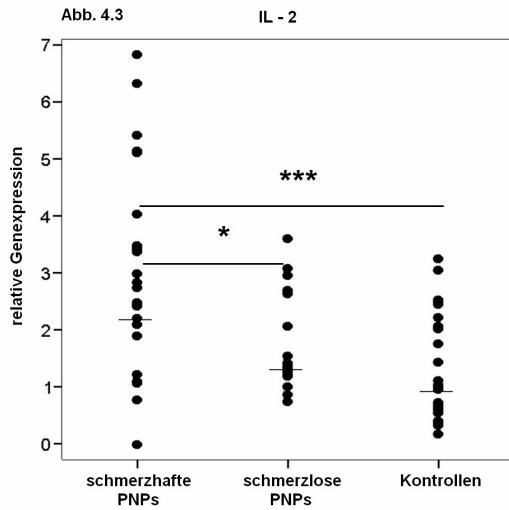


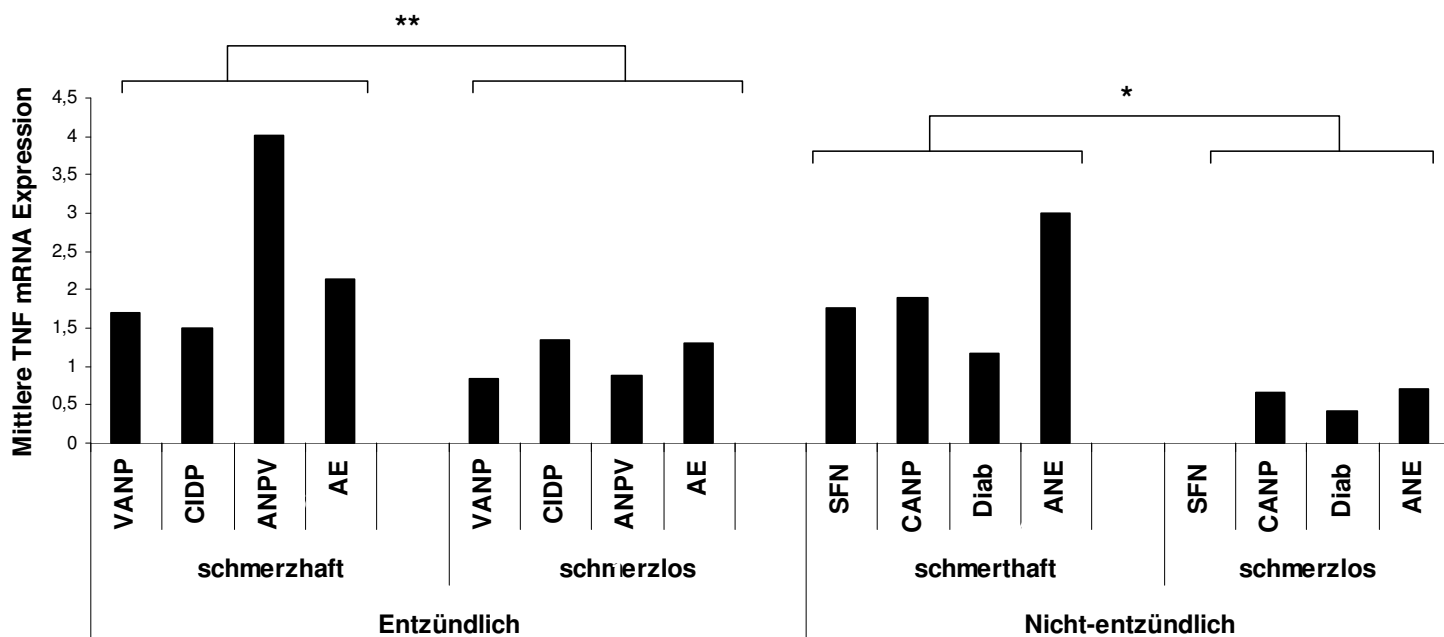
Abb. 4.3 bis 4.6: Relative Genexpression von IL-2, TNF, IL-4, IL.10. Der Median (50%-Perzentile) pro Gruppe ist mit einem horizontalen Strich markiert. Die Sternchen über den horizontalen Balken zeigen das Signifikanzniveau des Gruppenvergleichs an: \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ .

#### 4.3.3 Subgruppen-Analyse

Um den möglichen Einfluss der PNP-Ätiologie, insbesondere einer entzündlichen Ursache, auf die Zytokinexpression zu untersuchen, wurde ein Vergleich verschiedener Diagnoseuntergruppen durchgeführt. Dabei wurden VANP, CIDP, MADSAM und axonale PNP mit perivaskulärer Entzündung als entzündliche PNPs den nicht-entzündlichen PNPs (SFN, chronische axonale PNP, diabetische PNP, u.a.) gegenübergestellt.

Es zeigte sich, dass TNF in der Gruppe entzündlicher PNPs höher exprimiert wurde ( $p=0,01$ ). Dagegen lag IL-2 in der Gruppe der nicht-entzündlichen PNPs deutlich höher ( $p<0,0001$ ). Beide Gruppen unterschieden sich nicht in ihrer IL-4- und IL-10 Expression.

In Abb. 4.7 sind die 27 inflammatorischen PNPs und die 25 nicht-inflammatorischen PNPs isoliert anhand der TNF Genexpression betrachtet. Da sich einzelne Patienten in den Subgruppen „andere schmerzhafte PNP“, „CIDP“ und „diabetische schmerzlose PNP“ befanden, wurde ab einer Subgruppengröße  $> 2$  Patienten der Mittelwert gebildet. Wie für die Gesamtgruppen zeigten Patienten mit schmerzhafter PNP höhere TNF Genexpression als Patienten mit schmerzloser PNP sowohl bei den inflammatorischen PNPs ( $p<0,001$ ) als auch bei den nicht-inflammatorischen PNPs ( $p<0,05$ ).



**Abb. 4.7: relative Genexpression von TNF im Vergleich der Diagnosegruppen, \*\* p<0,001, \* p<0,05. Abkürzungen (Anzahl der Patienten pro Gruppe): AE = andere entzündliche PNP (4, darunter MADSAM Neuropathie, MMN); ANE = andere nicht – entzündliche PNP (9, darunter hereditäre PNP, paraneoplastische PNP, gemischt axonale und demyelinisierende PNP, Amyloid – Neuropathie, PNP bei Vitamin B12 – Mangel, PNP bei Hypothyreose); ANPV = axonale Neuropathie mit perivaskulärer Entzündung (4); Diab = diabetische PNP (3); CANP = chronisch axonale Neuropathie (8); CIDP = chronisch inflammatorische demyelinisierende PNP (7); SFN = small fiber Neuropathie (3); VANP = vaskulitische Neuropathie (14)**

#### 4.3.4 Ergebnisse der ELISA

Die Messung systemischer Zytokinproteine ergab den Messungen der Genexpression analoge Ergebnisse. Die Menge des IL-2 Proteins lag im Median etwa dreimal höher bei Patienten mit schmerzhafter PNP im Vergleich zu Patienten mit schmerzloser PNP (p=0,04, Abb. 4.8). Die IL-2 Proteinspiegel lagen bei Patienten mit schmerzloser PNP zum Teil unterhalb der Messgrenze der ELISA (Sensitivität: siehe Methoden und Materialien, Messung der Proteine) und wurden zur Auswertung als 0,01 pg/ml gesetzt.

Die Produktion von TNF Protein folgte ebenfalls der mRNA Expression: im Serum von Patienten mit schmerzhafter PNP fand sich etwa doppelt so viel Protein wie im Serum von Patienten mit schmerzloser PNP (p=0,004) und Kontrollen

( $p=0,009$ , Abb. 4.9). Im TNF ELISA wurden alle Proben der Patienten mit schmerzhafter PNP und der Kontrollen oberhalb der Messsensitivität gemessen. Die Proben der Patienten mit schmerzloser PNP lagen teils oberhalb (vier Proben) teils unterhalb (16 Proben) der Testsensitivität.

Der Vergleich der Gruppen für das IL-4 Protein entsprach in der Tendenz der Genexpression: bei Patienten mit schmerzloser PNP lag die Proteinproduktion höher als bei Patienten mit schmerzhafter PNP (nicht signifikant) und bei Kontrollen ( $p<0,001$ , Abb. 4.10). Auch Patienten mit schmerzhafter PNP zeigten höheres IL-4 Protein als die Kontrollen ( $p<0,001$ ). Das Protein lag bei allen Proben der Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP oberhalb der Nachweisgrenze, bei den Kontrollen waren elf von 38 Proben oberhalb der Testsensitivität.

Die Menge des IL-10 Proteins lag bei schmerzlosen PNP höher als bei den anderen Gruppen (nicht signifikant, Abb. 4.11). IL-10 Proteine lagen bei sieben Proben unter der Testsensitivität.

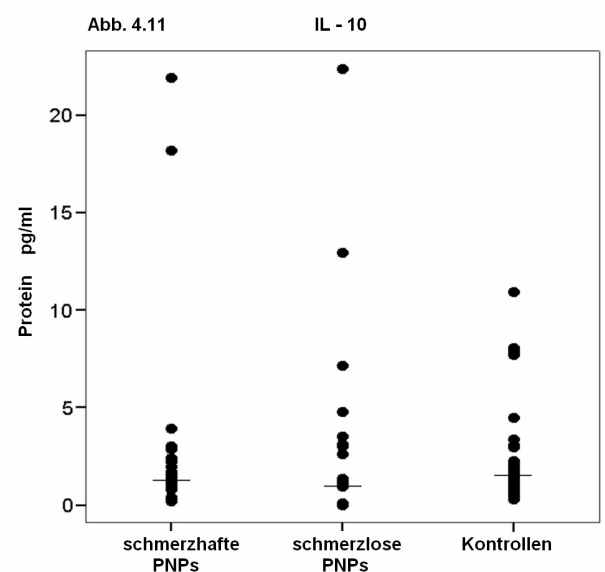
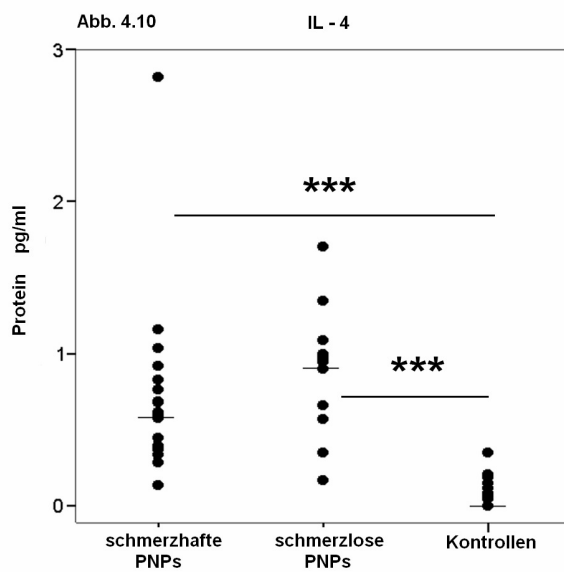
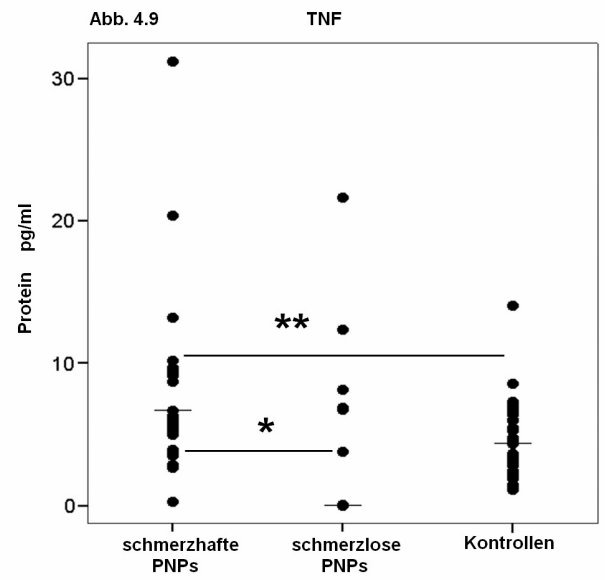
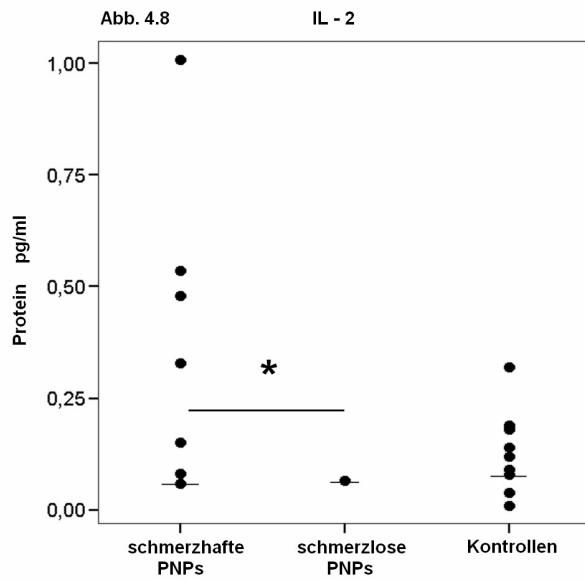


Abb. 4.8 bis 4.11: Proteinproduktion von IL-2, TNF, IL-4, IL-10. Der Median (50%-Perzentile) pro Gruppe ist mit einem horizontalen Strich markiert. Die Sternchen über den horizontalen Balken zeigen das Signifikanzniveau des Gruppenvergleichs an: \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 4.4 Zytokinexpression und Schmerzfragebögen

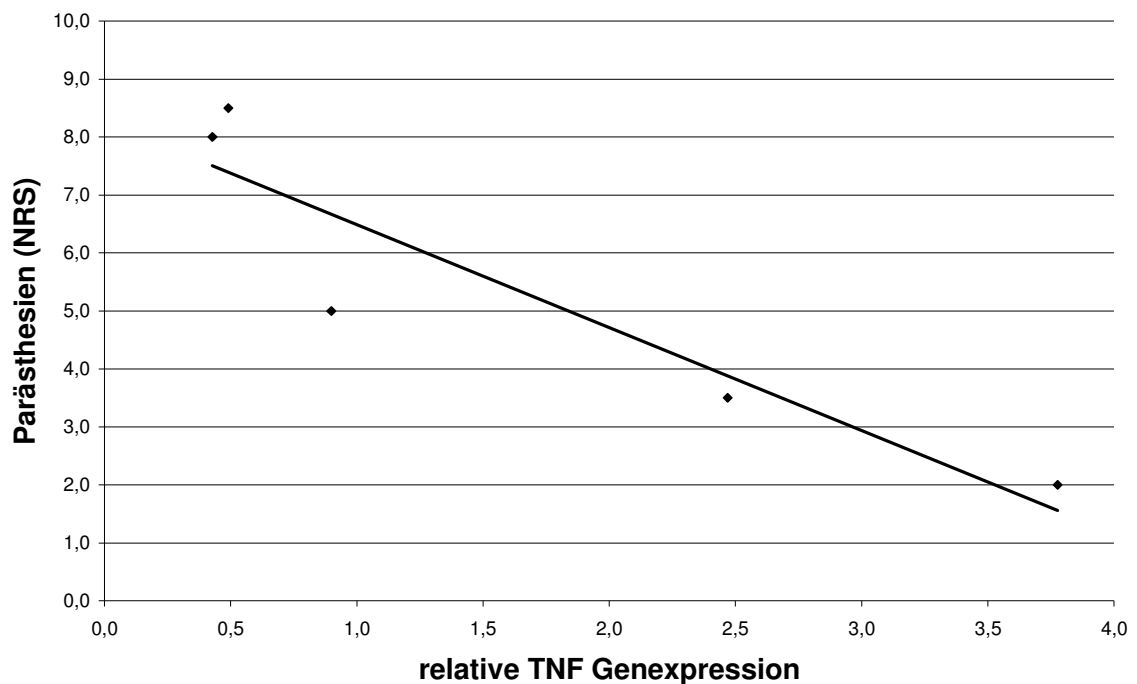
Eine Korrelation der mRNA Expression der Zytokine mit Daten der Schmerzfragebögen wurde für die Subgruppen nicht-entzündliche PNP ( $n = 25$ ) und CIDP ( $n = 6$ ) gefunden. Bei Patienten mit CIDP korrelierte hohe Schmerzintensität mit

hoher IL-2 bzw. TNF Expression (Tabelle 4.7). Umgekehrt korrelierte hohe TNF Expression mit niedriger NRS für Parästhesien (Abb. 4.12). Die Expression von IL-10 nahm mit steigender Schmerzintensität und steigendem NPSI-Summen-score in dieser Untergruppe ab (Tabelle 4.7).

Nicht-entzündliche PNP	
IL-2 und evozierte Schmerzen (NPSI)	Rho. = 0,692, p < 0,001
IL-2 und Anzahl der Schmerzattacken (NPSI)	Rho. = 0,566, p < 0,001
CIDP	
IL-2 und Schmerzintensität (NPSD)	Rho. = 0,9, p < 0,001
TNF und Frequenz der Schmerzattacken (NPSI)	Rho. = 0,9, p < 0,001
TNF und Parästhesien (NPSI)	Rho. = -1,0, p < 0,001
IL-10 und Summenscore (NPSI)	Rho. = -0,9, p < 0,001
IL-10 und Schmerzintensität (NPSD)	Rho. = -0,9, p < 0,001

**Tabelle 4.7: mRNA Expression und Plussymptome. Rho. = Spearman correlation coefficient**





**Abb. 4.12: Graphische Darstellung der mittleren relativen TNF Expression in Abhängigkeit von den Parästhesien der Patienten mit CIDP.**

#### 4.5 Zytokinexpression und ADS

Die TNF Expression und TNF Proteinproduktion bei Patienten mit Schmerzen und erhöhten ADS-Werten als Hinweis auf eine Depression lagen höher als bei Patienten ohne Hinweis auf eine Depression (n=49, p=0,02). Je höher der ADS-Summenwert lag, desto niedriger wurde IL 10 exprimiert (n=49, rho= -0,9).

## 5 Diskussion

In unserer Studie wurden ausgewählte pro- und anti-inflammatorische Zytokine in Vollblut und in Serum von Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP und gesunden Kontrollen untersucht. Die Patienten mit schmerzhafter PNP hatten im Vergleich zu Patienten mit schmerzloser PNP und gesunden Kontrollen eine erhöhte systemische Genexpression und erhöhte Proteinspiegel des pro-inflammatorischen Zytokins IL-2 (Abb. 4.3 und 4.8) und des pro-inflammatorischen Zytokins TNF (Abb. 4.4 und 4.9). Im Gegensatz dazu fand sich bei Patienten mit schmerzloser PNP eine erhöhte IL-10 Genexpression (Abb. 4.6) und eine erhöhte IL-4 Genexpression mit auch erhöhten Serumproteinspiegeln (Abb. 4.5 und 4.10). In einer Subgruppenanalyse fanden sich zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen PNPs Unterschiede in der TNF Expression (bei entzündlichen PNPs erhöht) und in der IL-2 Expression (bei nicht-entzündlichen PNPs erhöht). Die für die Gesamtgruppen gefundenen Unterschiede waren aber auch in den Subgruppen nachweisbar, wie am Beispiel des TNF dargestellt (Abb. 4.7). Diese Auswertung zeigt, dass die in den Gruppen „schmerzhafte PNPs“ und „schmerzlose PNPs“ gefundenen Unterschiede nicht wesentlich durch Unterschiede in der Ätiologie der PNPs beeinflusst waren.

In der folgenden Diskussion werden zunächst die **Fragebogenergebnisse** mit den Ergebnissen von Studien verglichen, in denen gleiche oder ähnliche Fragebögen verwendet wurden. Anschließend werden diejenigen PNPs vorgestellt, für die **pathogenetische Zusammenhänge** mit Zytokinen beschrieben wurden. Bisherige Studienergebnisse zu Veränderungen der **Zytokine bei schmerzhaften Neuropathien** werden mit den Ergebnissen dieser Studie verglichen. Am Beispiel des TNF sollen dann mögliche **Wirkmechanismen von Zytokinen** bei neuropathischen Schmerzen vorgestellt werden. Schließlich werden mögliche **Einflussfaktoren auf die Ergebnisse** diskutiert und **Folgerungen** aus den Ergebnissen der Studie gezogen.

### 5.1.1 Erfassung von neuropathischen Schmerzen mit Hilfe von Fragebögen und ihre Probleme

Zur Erkennung und Erfassung neuropathischer Schmerzen haben sich verschiedene Schmerzfragebögen als nützlich erwiesen, die auch in der hier vorliegenden Studie verwendet wurden (Bennett et al. 2007). Der Vorteil von Schmerzfragebögen ist, dass sie als einfaches Screeninginstrument eingesetzt werden können; von Nachteil ist, dass sie subjektive Angaben des Patienten erfassen.

In unserer Studie hatten Patienten mit einer schmerzhaften PNP mittelstarke Schmerzen und berichteten mehrheitlich Plus-Symptome, z.B. dynamische und mechanische Reizsymptome (Tabelle 4.3, Tabelle 4.4). Eine andere Studie konnte zeigen, dass eine erhöhte Berührungsempfindlichkeit überwiegend bei neuropathischen Schmerzen vorkommt, während Kälteempfindlichkeit und Druckschmerzhaftigkeit sowohl bei neuropathischen als auch bei nicht-neuropathischen Schmerzen auftraten (Rasmussen et al. 2004). Dies wird durch unsere Ergebnisse unterstützt, da die Mehrheit der Patienten evozierte Schmerzen auf Druck und Berührung verspürte, während die Minderheit der Patienten über Kälteempfindlichkeit klagte (Tabelle 4.3).

Die Patienten wurden durch die Schmerzen hochgradig in Arbeit und Freizeit behindert (GCPS Grad 3 und 4, Tabelle 4.6). Die Zunahme der Beeinträchtigung wurde auch als Maß der Chronifizierung der neuropathischen Schmerzen herangezogen (Frettloh et al. 2003).

Die als „tief“ bezeichneten Spontanschmerzen wurden in vorherigen Studien als besonders häufig bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen vorkommend beschrieben (Otto et al. 2003). Auch wir fanden bei mehr als der Hälfte der untersuchten Patienten Spontanschmerzen (Tabelle 4.3) und starke „tief“ lokalisierte Schmerzen (Tabelle 4.4).

In einer weiteren Studie an Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP gab die überwiegende Zahl von Patienten mit schmerzhafter PNP mehr als eine Schmerzqualität, z.B. „stechend“ oder „quetschend“ an (Vrethem et al. 2002). 17 von 30 der von uns befragten Patienten gaben ebenfalls Spontanschmerzen von

mehr als einer Qualität an, wobei am häufigsten „drückende“ Schmerzen genannt wurden (Tabelle 4.3).

In zwei Studien beklagten etwa 80% der Patienten mit neuropathischen Schmerzen Parästhesien (Vrethem et al. 2002; Otto et al. 2003). Diese Daten stimmen mit unseren Ergebnissen überein, wo etwa 80% der Patienten mit schmerzhafter PNP Gefühlsstörungen wie „Ameisenlaufen“ und „Kribbeln“ angaben (Tabelle 4.3).

Zusammenfassend kann bezüglich der qualitativen und quantitativen Messung von neuropathischen Schmerzen mittels Fragebögen festgestellt werden, dass

- sowohl spontane als auch evozierte Schmerzen auftraten,
- die Schmerzen eher „tief“ als „oberflächlich“ empfunden wurden,
- mit mehreren Qualitäten, darunter „stechend“, „drückend“, „brennend“ charakterisiert wurden,
- und sehr häufig mit Parästhesien assoziiert waren.

## 5.2 Die Bedeutung von Zytokinen in der Pathogenese von PNPs

Für die CIDP und das Guillain-Barré-Syndrom (GBS) wurden Hinweise auf eine pathogenetische Rolle von Zytokinen, z.B. von TNF gefunden. Die TNF Serumspiegel waren bei fünf von 20 untersuchten Patienten mit CIDP erhöht und mit subakutem Fortschreiten, schweren neurologischen Defiziten (Hughes-Grade drei und vier) und einer symmetrischer Muskelschwäche der Extremitäten assoziiert (Misawa et al. 2001). Es zeigte sich zudem, dass die erhöhten Werte von TNF im Serum dieser Patienten mit elektrophysiologischen Zeichen einer aktiven Demyelinisierung einhergingen. Dem widersprechend konnte in einer anderen Studie kein Unterschied der TNF Serumspiegel von Patienten mit CIDP im Vergleich zu Patienten mit anderen PNP und gesunden Kontrollen gefunden werden (Melendez-Vasquez et al. 1997). Dennoch zeigten histologische Befunde aus humanen Nervenbiopsien, dass bei aktiver Demyelinisierung in Patienten mit CIDP TNF in Makrophagen des Endoneuriums exprimiert wird (Fukuoka et al. 1998). Mit in-situ-Hybridisierung konnte an Suralis-Biopsien bei Patienten mit klinisch aktiver CIDP gezeigt werden, dass die Expression von IL-2, TNF und Interferon- $\gamma$  sowohl in Leukozyten der endo- und epineuralen Blutgefäßen und

des Perineuriums als auch in endoneural gelegenen Zellen (den Schwann-Zell-Arealen entsprechend) stattfand (Mathey et al. 1999). In Zellkultur hatte TNF auf Schwann-Zellen eine *nf-κB*-abhängige Wirkung, die zu einem phänotypischem Wechsel zu nicht-Myelin-formierenden Schwann-Zellen führte (Bonetti et al. 2000). Die CIDP, die von einer axonal betonten Variante (chronisch inflammatorische axonale PNP) unterschieden wird, entsteht wahrscheinlich auf Grundlage einer autoimmunen Entzündungsreaktion (Toyka und Gold 2003). Dem Nervenschaden liegen effektiv wohl neben der durch Makrophagen getriggerten Sekretion von IL-1, IL-6, IL-12 und TNF auch zelluläre Mechanismen durch T-Zellen zugrunde (Kiefer et al. 2001). Beim GBS wurde ein Zusammenhang zwischen positivem Ansprechen auf intravenöse Immunglobuline und Abnahme der TNF Serumspiegel der Patienten und somit ebenfalls ein indirekter Hinweis auf die pathogenetische Rolle von TNF gefunden (Sharief et al. 1999). Immunhistochemische Studien an Nervenbiopsien von Patienten mit GBS zeigten, dass T-Zellen im Epi- und Perineurium das *TNF converting enzyme* exprimierten (Kurz et al. 2005). Die hier vorgelegten Daten lassen sich in diese Aussagen nur bedingt einordnen, da die Krankheitsaktivität der Patienten mit CIDP nicht bestimmt wurde. In der Gesamtgruppe ergaben sich keine Unterschiede in der TNF Expression bei Patienten mit CIDP und Kontrollen (Daten nicht gezeigt).

### 5.3 Zytokine bei schmerzhaften PNPs

Das Hauptergebnis der vorliegenden Arbeit war eine erhöhte IL-2 und TNF Expression bei Patienten mit schmerzhafter PNP mit analogen Unterschieden in den Serumproteinspiegeln und umgekehrt eine erhöhte IL-4 und IL-10 Expression bei Patienten mit schmerzloser PNP, die für IL-4 ebenfalls auf der Proteinebene wieder gefunden wurde.

#### 5.3.1 Systemische Zytokine

Es gibt ältere Arbeiten, die erhöhte TNF und IL-1 $\beta$  Spiegel im Serum bei der schmerzhaften lepromatösen Neuropathie zeigten (Sarno et al. 1991). Durch den TNF-Inhibitor Thalidomid ließen sich die Schmerzen hemmen und dies ging mit einer Reduktion der TNF Spiegel einher (Sampaio et al. 1993). Zum Zeitpunkt

der Erstellung dieser Arbeit lag zum direkten Vergleich nur eine 2001 veröffentlichte Studie an Patienten mit PNP von Empl et al. vor (Empl et al. 2001). Dort wurde mittels ELISA ein erhöhter Serumspiegel des TNF-R1 (welcher als Surrogatmarker für TNF benutzt wurde) bei Patienten mit mechanischer Allodynie im Vergleich zu Patienten ohne Allodynie gezeigt. Der in dieser Subgruppe nachweisbare Unterschied ließ sich jedoch nicht zwischen den Gesamtgruppen „schmerzhafte PNP“ und „schmerzlose PNP“ finden.

Nach Abschluss der Arbeiten für diese Dissertation wurden weitere Studien zu diesem Thema veröffentlicht. Backonja et al. zeigten in einer relativ kleinen Gruppe von Patienten mit schmerzhafter PNP, dass die Serumspiegel von IL-1 $\beta$  und löslichem TNF-R höher lagen als in den Kontrollen. Umgekehrt waren die IL-10 Serumspiegel der Patienten niedriger als in den Kontrollen, was gut im Einklang mit den hier präsentierten Daten steht (Backonja et al. 2008). Bei der Bestimmung der TNF Proteinspiegel mittels ELISA konnten Backonja et al. hingegen keine Unterschiede zwischen Patienten mit Neuropathie und Kontrollen finden. Ludwig et al. untersuchten in einer kürzlich veröffentlichten Studie die Zytokine IL-6 und TNF im Serum und Liquor bei Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP. Weder die Serumspiegel noch die Liquorspiegel unterschieden sich in ihren Gruppen, aber eine Subgruppe von Patienten mit mechanischer Allodynie hatte erhöhte TNF Serumspiegel im Vergleich zu Patienten ohne dieses Symptom (Ludwig et al. 2008). Dieser Unterschied unterstreicht den von Empl et al. gefundenen Unterschied im TNF System bei Patienten mit mechanischer Allodynie (Empl et al. 2001). Eine weitere aktuelle Studie an Patienten mit POEMS-Syndrom zeigte erhöhte TNF, IL-6 und IL-1 $\beta$  Serumspiegel bei Patienten mit Hyperalgesie im Vergleich mit Patienten ohne dieses Symptom und Kontrollen (Koike et al. 2008).

### 5.3.2 Zytokine im PNS

Weitere Arbeiten orientierten sich an der Zytokinexpression und -produktion in peripheren Nerven bei neuropathischen Schmerzen. Hier zeigte sich in Patienten mit schmerzhafter PNP im Vergleich zu Patienten mit schmerzloser PNP eine höhere TNF Expression in Schwann-Zellen der Nervenpräparate (Empl et al. 2001). In einer weiteren immunohistologischen Arbeit an Suralisbiopsien bei

Patienten mit entzündlicher und nicht-entzündlichen PNP fanden Lindenlaub et al. eine erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine bei Patienten, die unter Schmerzen litten im Vergleich zu Patienten ohne Schmerzen (Lindenlaub und Sommer 2003).

Zusammenfassend lässt sich eine Übereinstimmung der hier präsentierten Ergebnisse mit den bislang veröffentlichten Studien zu Zytokinen bei neuropathischen Schmerzen finden. Die klinisch feststellbaren Symptome einer mechanischen Allodynie waren in einigen Fällen deutlicher mit TNF Spiegel erhöhungen verbunden, als es für die Gesamtgruppe der schmerzhaften Neuropathien der Fall war. In den hier vorgelegten Ergebnissen fanden sich positive Korrelationen zwischen IL-2 und evozierten Schmerzen sowie IL-2 und den Schmerzattacken bei Patienten mit nicht-entzündlicher PNP (Tabelle 4.7), während sich in den Gesamtgruppen keine Korrelation zwischen einem einzelnen Zytokin und einem einzelnen klinischen Symptom zeigte.

#### 5.4 Wirkmechanismen von TNF bei neuropathischen Schmerzen

Die Mechanismen, über die pro-inflammatorische Zytokine Schmerzen auslösen können, sollen im Folgenden am Beispiel von TNF mittels Daten aus der Grundlagenforschung erläutert werden. Nach Befunden zur Läsion im **peripheren Nerven** und in den zugehörigen **Spinalganglien**, werden die **Rezeptoren des TNF** vorgestellt. Die rezeptorvermittelten **Wirkungen des TNF** werden kurz benannt. Abschließend werden die Daten in die Ergebnisse der eigenen Arbeit eingebunden.

In lädierten **peripheren Nerven** ließ sich bereits nach einer Stunde TNF mRNA nachweisen (Üçeyler et al. 2007). Das TNF Protein erreichte nach zwölf Stunden seinen Gipfel und blieb mehrere Tage über dem Basalspiegel erhöht (George et al. 1999). Dieser TNF Anstieg war so sensitiv, dass selbst eine Hautinzision oder eine vorsichtige Manipulation des Nervus ischiadicus ausreichten, um TNF mRNA ansteigen zu lassen (George et al. 2004).

Durch Blockade der Freisetzung des TNF Proteins, durch antagonistische Bindung des extrazellulären TNF Proteins und durch Rezeptorblockade ließen sich

im Tiermodell mechanische Wegzugsschwellen und thermische Wegzugslatenzen normalisieren (George et al. 2000; Lindenlaub et al. 2000; Sommer et al. 2001). Dieser Effekt war am stärksten ausgeprägt, wenn die Blockade vor Entstehung dieser Symptome erfolgte (Sommer und Schäfers 1998; Schäfers et al. 2003c), aber auch danach konnten die Symptome im CCI Modell restituiert werden (Sommer et al. 2001).

Durch intraneurale Gabe von TNF oder IL-1 $\beta$  Protein in periphere Nerven ließ sich im Versuchstier Schmerzverhalten hervorrufen, mit dem stärkstem algetischen Effekt bei Mengen, die dem endogenen Anstieg nach einem Nervenschaden äquivalent waren (Zelenka et al. 2005). Die subkutane Applikation von TNF Protein auf afferente intakte Neurone von Ratten erhöhte die Entladungsrate der Spontanaktivität und veränderte die mechanische Reizschwelle in C-Fasern je nach Menge des applizierten TNF: bei einer Dosis von 5 ng wurde sie um bis zu 67% des Ausgangswertes gesenkt (Sorkin et al. 1997; Junger und Sorkin 2000).

Im gesunden **Spinalganglion** bei Tieren fand sich TNF in etwa 45% der neuronalen Zellsomata (Schäfers et al. 2003a). Im CCI Modell fand sich ein Anstieg von TNF vorwiegend in mittelgroßen neuronalen Zellen sowohl mit geschädigten als auch mit intakten Axonen (Schäfers et al. 2003a). In weiteren Arbeiten zeigte sich, dass in Spinalganglien eines geschädigten Nerven auch die (weiter unten beschriebenen) sekundären Signaltransduktoren *p38* MAPK und *c-Jun N-terminal kinase* anstiegen (siehe auch Abschnitt „Zytokine und Zytokinrezeptoren“) (Obata et al. 2004a). Dies wurde auch für nicht-geschädigte Zellen des Nachbarganglions und die Proteine der *p38* MAPK gezeigt (Obata et al. 2004b). Die **TNF-Rs** (TNF-R1, TNF-R2) wurden in verschiedenen Schmerzmodellen untersucht und es wurde gezeigt, dass es nach einem Nervenschaden zu einer Hochregulation dieser Rezeptoren in peripheren Nerven, dem Spinalganglion und im Spinalmark kommt (Schäfers et al. 2003b; Ohtori et al. 2004; George et al. 2005). Der konstitutiv exprimierte TNF-R1 scheint bei der Entstehung von Reizsymptomen von größerer Bedeutung zu sein, da seine Blockade, im Gegensatz zur Blockade des TNF-R2, die Symptome im CCI Modell minderte (Sommer et al. 1998). Zudem zeigten TNF-R1 defiziente Tiere eine schwächere Schmer-



verantwortlich nach einem Nervenschaden als Wildtyp-Mäuse (Vogel et al. 2006). Eine weitere Arbeit zeigte, dass die Aktivierung des TNF-R1 in Wildtyp-Ratten vor einem Nervenschaden zu ektopen Entladungen führte. Die zusätzliche Aktivierung des TNF-R2 verstärkte die Entladungsrate, während die alleinige TNF-R2 Aktivierung folgenlos blieb. Nach einer CCI Läsion wurde eine erhöhte Spontanaktivität durch die Aktivierung des TNF-R2 in intakten Neuronen des Nachbarganglions beobachtet (Schäfers et al. 2008).

Spricht man allgemein von den **Wirkungen des TNF** im PNS (peripherer Nerv und Spinalganglion) so werden Folgen auf Ebene der Genexpression von (kurzzeitigeren) Änderungen der Zellzusammensetzung und der Membraneigenschaften unterschieden. Die Signalkaskade nach Bindung des TNF an den TNF-R1 oder den TNF-R2 aktiviert mehrere Signaltransduktoren, darunter die Proteine der *p38* MAPK (Milligan et al. 2003; Schäfers et al. 2003c), die im Spinalganglion an der Entstehung von Symptomen der Hitzehyperalgesie und der mechanischen und taktilen Allodynie beteiligt sind (Ji et al. 2002; Schäfers et al. 2003c; Obata et al. 2004a). Das im Tiermodell beobachtete rasche Auftreten von Schmerzverhalten nach der Nervenläsion kann aber nur zum Teil mit Änderungen der Proteinexpression erklärt werden und daher sind direkte Wirkungen von TNF auf die Erregbarkeit der Nervenfasern wahrscheinlich vorhanden. Eine rasche Wirkung trat beim Modell der Hitzehyperalgesie auf: TNF erhöhte *in vitro* die Calciumkonzentration und die Freisetzung des Calcitonin Gene Related Peptid in sensiblen peripheren Neuronen (Oprea und Kress 2000; Pollock et al. 2002). Wirkungen von TNF auf die Membraneigenschaften ließen sich in weiteren Arbeiten zeigen: TNF konnte über den TNF-R1 *p38* MAPK abhängigen Signalweg einen Tetrodotoxin-resistenten Natriumkanal aktivieren, der somit zu einem verstärkten Natriuminflux bei der Depolarisation beitrug (Jin und Gereau 2006). Die *p38* MAPK regulierte außerdem die Phosphorylierung des spannungsabhängigen Natriumkanals 1.8 auf sensiblen Spinalganglionneuronen, was nach einem Nervenschaden zur erhöhten Exzitabilität dieser Neurone beitrug (Hudmon et al. 2008). In *patch-clamp* Untersuchungen an isolierten Rattenganglionen zeigte sich, dass spannungsabhängige Kaliumkanäle durch TNF nicht beeinflusst, aber spannungsabhängige Calciumkanäle geschlossen

und spannungsabhängige Natriumkanäle geöffnet wurden (Czeschik et al. 2008).

Zu fragen bleibt, ob sich diese Mechanismen eins zu eins auf Veränderung in menschlichen Nerven bei der PNP übertragen lassen. Im Gegensatz zu dem akuten Nervenschaden im Tiermodell handelt es sich bei PNPs meist um chronische Erkrankungen und zum Zeitpunkt der Messung hatten die Patienten bereits Schmerzen. Ob die Erhöhung der pro-inflammatorischen Zytokine im Blut der Patienten schon vor der Entstehung neuropathischer Schmerzen auftrat, ist mit dieser Arbeit nicht zu beantworten. Wir sehen sie aber als Ausdruck einer im Nerven stattgehabten Änderung der Zytokinbalance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen. Möglicherweise lag bereits vor Entstehung der PNP eine genetische Imbalance dieser Zytokine vor. Aber Polymorphismen dieser Gene sind beim Menschen bisher unzureichend untersucht worden.

Unterstützen lässt sich diese Interpretation durch die Ergebnisse bei den anti-inflammatorischen Zytokinen IL-4 und IL-10. IL-4 gilt als Th<sub>2</sub>-Zytokin und vorherige Studien zeigten, dass eine Reduktion dieses Zytokins bei Patienten mit chronischen Schmerzen und eine therapeutische Gabe im Modell der Nervenligatur mit Schmerzreduktion einhergingen (Hao et al. 2006; Üçeyler et al. 2006). IL-10 wird als TNF-antagonistisches Zytokin angesehen und durch die Gabe des Proteins am Ort der Nervenläsion konnte im CCI Modell eine Schmerzreduktion hervorgerufen werden (Wagner et al. 1998). Die algetische Wirkung des TNF beruhte somit auch auf einer Reduktion dieser anti-inflammatorischen Zytokine und umgekehrt.

### 5.5 Grenzen der Studie und Rolle von Einflussfaktoren auf Zytokine

Diese Studie wurde an Patienten während der Hospitalisierung durchgeführt und unterlag dadurch bedingt Einflussfaktoren, die im Folgenden diskutiert werden. Erstens unterlag die Messung der Zytokine in Zellen des peripher-venösen Blutes und im Serum prä-analytischen und analytischen Einflussfaktoren. Zum Zweiten zeigte ein bedeutender Teil der Patienten mit schmerzhafter PNP Zeichen einer Depression. Zum Dritten nahmen die meisten Patienten mit Schmerzen verschiedene Analgetika, darunter auch Trizyklische Antidepressiva (TZA), ein.

### 5.5.1 Analytische Probleme

Die ELISA Messungen wurden durch die niedrigen Proteinspiegel limitiert, so dass IL-4 und IL-10 auch mit ultrasensitiven Kits nicht in allen Proben nachweisbar waren. Diese methodischen Probleme traten auch in anderen Studien auf, so dass die Proteinbestimmung weiterhin ungenauer scheint als die der Genexpression (Volk et al. 1998; Alexander et al. 2005). Dennoch zeigte sich in der vorliegenden Arbeit sowohl auf mRNA Ebene als auch bei den Proteinen eine statistisch gesicherte einheitliche Tendenz, so dass die Ergebnisse durch zwei, von einander unabhängigen Methoden gestützt wurden. Weitere Einflüsse auf die systemischen Zytokine durch prä-analytische Einflussfaktoren, wie sportliche Aktivität (Ostrowski et al. 1999), Alkoholkonsum und zirkadiane Rhythmen der Expression wurden durch genaue Anamnese und Begrenzung der Blutentnahme auf die Morgenstunden ausgeschlossen.

### 5.5.2 Depression

Depression und neuropathische Schmerzen liegen häufig gemeinsam vor und nehmen mit dem Grad der Chronifizierung zu (Frettlöh et al. 2003). Studien an Patienten mit chronische Schmerzen als auch mit Depression zeigten Veränderungen von pro-inflammatorischen Zytokinmustern (Musselman et al. 2001; Schlatter et al. 2001; Anisman et al. 2005). Einen gesicherten pathogenetischen Zusammenhang der Depression mit Zytokinen gibt es dennoch nicht (Schiepers et al. 2005). Bei den hier untersuchten Patienten mit schmerzhafter PNP lagen signifikant häufiger erhöhte ADS-Werte vor als bei Patienten mit schmerzloser PNP. Die TNF mRNA lag bei Patienten mit schmerzhafter PNP und erhöhten ADS-Werten signifikant höher als bei Patienten mit schmerzhafter PNP und normalen ADS-Werten. Wir fanden eine negative Korrelation zwischen der IL-10 Genexpression und ADS-Werten, was Befunde aus einer bereits veröffentlichten Studie an Patienten mit melancholischer und nicht-melancholischer *major depression* bestätigt (Rothermundt et al. 2001). Auch mit den vorliegenden Ergebnissen lässt sich kein kausaler Zusammenhang zwischen Depression, chronischen Schmerzen und Zytokinen herstellen. Die in der vorliegenden Studie verwendete ADS wurde als Screeninginstrument eingesetzt und es bedürfte

einer weiteren Untersuchung, um die Diagnose einer Depression zu spezifizieren. Die erhöhten ADS Werte sind in erster Linie im Kontext mit den neuropathischen Schmerzen zu sehen.

### 5.5.3 Medikation

Verschiedene Medikamente können die Zytokinexpression beeinflussen (Alkharfy et al. 2000). **TZA** hemmen die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und erhöhen die Produktion des IL-10 in humanen Leukozyten *in vitro* (Xia et al. 1996; Kubera und Maes 2000). Dagegen sind die Daten aus klinischen Studien widersprüchlich. IL-2 Serumspiegel blieben unter Behandlung mit Clomipramin ebenso wie die IL-6 Serumspiegel unter der Einnahme von TZA unverändert (Weizman et al. 1994; Maes et al. 1995). Die Einnahme von TZA über sechs Wochen zeigte keine Änderung der TNF Serumspiegel in Patienten mit Depression, wengleich der lösliche TNF-R2 anstieg (Hinze-Selch et al. 2000). Sechs der 32 Patienten mit schmerzhafter PNP nahmen TZA ein. Ein Einfluss auf die Expression und Produktion der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine ist nicht auszuschließen, kann aber als Einflussfaktor aufgrund der niedrigen Zahl im Verhältnis zur Gesamtgruppe vernachlässigt werden.

Weitere Analgetika in der Gruppe der Patienten mit schmerzhafter PNP waren Gabapentin (neun Patienten), Pregabalin (vier Patienten), nicht-steroidale Antirheumatika (sechs Patienten) und Opioide (sieben Patienten).

Für **Opioide** wird eine immunsupprimierende Wirkung postuliert (Sacerdote 2006). Morphin hemmte im mikromolaren Bereich pro-inflammatorische Zytokine *in vitro* (Roy et al. 1998). IL-2 kann mit peripheren Opioid-Rezeptoren interagieren (Song und Zhao 2000; Song et al. 2002) und die Wirkung von Opioiden auf periphere Rezeptoren wurde neben der bekannten zentralen Analgesie als weiterer Angriffspunkt einer immunvermittelten Analgesie beschrieben (Rittner et al. 2005). Die Gruppe der Patienten mit schmerzhafter PNP zeigte höhere Spiegel des IL-2 sowie des TNF auf mRNA und Proteinebene als die Vergleichsgruppen. Während ein Einfluss der Opioide auf TNF nach Studienlage unwahrscheinlich ist, könnte die Erhöhung von IL-2 bei diesen Patienten einen endogenen Antagonismus der Schmerzen darstellen, der durch Opioide mitgetragen wird (Yao et al. 2002).

**Glukokortikoide (GK, Mehrzahl GKs)** sind anti-inflammatorische Medikamente, die die Zytokinexpression und –produktion von Zellen verändern (Brattsand und Linden 1996). Sie wirken u. a. über einen Antagonismus am *nf-κB* der Expression pro-inflammatorischer Zytokine, wie dem TNF entgegen. Die Behandlung mit GKs zeigte in klinischen Studien unterschiedliche Resultate. Bei Gesunden blieben die Plasmaspiegel von TNF und IL-10 nach dreitägiger Einnahme von Dexamethason unverändert, während die Kapazität zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine auf einen Stimulus deutlich abnahm (Bleeker et al. 1997). Weitere Studien zeigten, dass präoperative Gaben von GKs eine reduzierende Wirkung auf die TNF Serumspiegel hatten und umgekehrt die IL-10 Serumspiegel erhöhten (El Azab et al. 2002; McBride et al. 2004). Bei Patienten mit Multipler Sklerose hatten verschiedene Therapieregime mit immunmodulierenden (Interferon  $\beta$ -1a) und immunsupprimierenden (Prednisolon, Azathioprin) Medikamenten keinen Einfluss auf die TNF Serumspiegel, aber bei Patienten mit kombinierter Therapie (Azathioprin, Prednisolon und Interferon  $\beta$ -1a) stiegen die IL-10 Serumspiegel (Braun Hashemi et al. 2006). Auch bei Patienten mit Morbus Basedow erhöhte die Einnahme von GKs die IL-10 Serumspiegel, während die des TNF unbeeinflusst blieben (Mysliwiec et al. 1999). Eine weitere Studie zeigte aber, dass die dauerhafte Einnahme von Prednisolon die Serumspiegel von TNF und IL-10 nicht veränderte (Andersson et al. 2005).

Fünf Patienten mit schmerzhafter PNP und vier Patienten mit schmerzloser PNP bekamen entweder oral oder parenteral GKs. Die IL-10 Proteinspiegel unterschieden sich in den zwei Gruppen nicht signifikant von den Kontrollen, während die mRNA bei schmerzlosen Patienten erhöht war, was einen Einfluss der GKs in den Patientengruppen unwahrscheinlich erscheinen lässt. Da die Anzahl der Patienten unter GKs in beiden Patientengruppen etwa gleich hoch lag, wurde der Effekt auf den Vergleich zwischen diesen Gruppen ausbalanciert und dürfte das Ergebnis nicht wesentlich beeinflusst haben.

Zusammenfassend lässt sich ein Einfluss der Medikation auf die Expression und Produktion von Zytokinen in verschiedenen Studien zeigen. Der Unterschied hinsichtlich der Zytokinspiegel zwischen den Patientengruppen war aber nicht

auf einzelne Medikamente oder deren Kombination in den Patientengruppen zurückzuführen.

Es erscheint daher legitim, die gemessenen Unterschiede der Zytokinspiegel zwischen den Gruppen in erster Linie mit dem Vorliegen oder dem Fehlen der Schmerzen in Zusammenhang zu bringen.

## 5.6 Folgerungen aus den Ergebnissen

### 5.6.1 Folgerungen für die Diagnostik

Wir konnten zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen dem Zytokinprofil und der Existenz von neuropathischen Schmerzen gibt. Die Folgerung für die Erkennung neuropathischer Schmerzen liegt also darin, dass man möglicherweise durch Bestimmungen der Zytokinexpressionen und der Proteinspiegel zusätzlich zu der klinischen Untersuchung und Befragung von Patienten zukünftig einen schmerzhaften Verlauf der Neuropathie früher erkennen und eventuell therapeutisch beeinflussen kann.

### 5.6.2 Folgerungen für die Therapie

Bisher können verschiedene Erkrankungen durch exogene Gabe von Zytokinen oder Zytokin-Inhibitoren therapeutisch beeinflusst werden; als Beispiel sei die Interferontherapie der Multiplen Sklerose genannt. Beim neuropathischen Schmerz gibt es Hinweise auf die schmerzlindernde Wirkung der Gabe von Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*); der Therapieversuch war aber klinisch nicht erfolgreich. Die bereits genannte anti-nozizeptive Wirkung anti-inflammatorischer Zytokine wurde ebenso im Tierversuch belegt, aber bislang nicht in klinischen Studien geprüft (Milligan et al. 2005; Hao et al. 2006). Hierbei war die pleiotrope und redundante Wirkung der Zytokine und ihre essentielle Bedeutung bei der Immunabwehr zu bedenken. Sie erschwerten bislang den therapeutischen Einsatz einzelner Zytokine. Dennoch wurden anti-TNF basierte Therapien bei Patienten mit therapierefraktären Schmerzen bereits mit Erfolg eingesetzt (Tobinick und Davoodifar 2004). Systematische klinische Studien liegen aber noch nicht vor.

## 6 Zusammenfassung

Bislang ist ungeklärt, warum PNPs teils schmerzhaft und teils schmerzlos verlaufen. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte Hypothese lautete, dass ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen der unterschiedlichen Schmerzausprägung zugrunde liegt.

Es wurden 32 Patienten mit schmerzhafter PNP, 20 Patienten mit schmerzloser PNP und 44 Kontrollpersonen auf die Expression und Produktion ausgewählter pro- und anti-inflammatorischer Zytokine untersucht. Zur Messung der Schmerzhaftigkeit wurden etablierte Schmerzfragebögen verwendet. Zusätzlich wurden nahezu alle Patienten mit der Allgemeinen Depressionsskala befragt. Die Diagnose, Ätiologie, Dauer, klinische Manifestation der PNP sowie die Medikation der Patienten wurde auf standardisierten Erhebungsbögen dokumentiert. Zur Messung der Zytokine wurde morgens Blut in EDTA- und Serummonovetten asserviert und entsprechend der Messmethodik weiterverarbeitet. Die relative Genexpression wurde aus Gesamt-RNA mittels reverser Transkription und quantitativer *real-time* PCR, die Serumproteine mittels *enzyme-linked immunosorbant assay* gemessen. Die Patienten mit schmerzhafter PNP hatten in der Mehrzahl Neuropathie-typische Plusssymptome und mittelstarke Schmerzen, die eine starke bis sehr starke Behinderung darstellten. Die hier untersuchten Zytokinmuster bei Patienten mit schmerzhafter und schmerzloser PNP zeigten eine Verschiebung zu pro-inflammatorischen Zytokinen bei Patienten mit schmerzhafter PNP. Die Zytokinexpression der Patienten mit schmerzhafter PNP war im Vergleich zu Patienten mit schmerzloser PNP und Kontrollen bezüglich der IL-2 und TNF Expression und Produktion signifikant erhöht. Umgekehrt lagen bei Patienten mit schmerzloser PNP die Produktion und die Expression des IL-4 im Vergleich zu Patienten mit schmerzhafter PNP und Kontrollen höher. Die Expression des IL-10 lag bei Patienten mit schmerzloser PNP ebenfalls höher als bei Patienten mit schmerzhafter PNP und Kontrollen, unterschied sich aber auf Proteinebene nicht in den drei Gruppen.

Die einleitend gestellte Hypothese, dass der schmerzhafte oder schmerzlose Verlauf einer PNP durch unterschiedliche Zytokinprofile bedingt ist, kann durch die vorliegenden Ergebnisse gestützt werden. In Zusammenschau mit den Daten

aus der Grundlagenforschung scheint einem pro-inflammatorischen Zytokinmuster eine entscheidende Rolle an der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen zuzukommen. Für TNF sind entsprechende pathophysiologische Wirkungen bekannt. Anti-inflammatorische Zytokine, wie IL-4 und IL-10 zeigten analgetische Wirkungen im Tierversuch. Die Mitwirkung des IL-2 an peripheren Opioid-Rezeptoren lässt eine endogene periphere Analgesie vermuten.

Hieraus lassen sich Folgerungen für zukünftige Diagnostik und Therapie neuropathischer Schmerzen ziehen. Durch Erkennung von Zytokin-Imbalancen wären schmerzhaftes PNPs früher einer adäquaten Therapie zuzuführen. Durch die Modulation von Zytokinprofilen im Rahmen schmerzhafter PNPs könnten sich zusätzlich therapeutische Möglichkeiten eröffnen.



## 7 Anhang

### 7.1 Patienten mit schmerzhafter PNP

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Dauer (Jahre)	Schmerzmedikation
1	M	71	2	Gabapentin
2	M	70	4	Amitriptylin
3	F	57	2	Escitalopram; Trimipramin; Diclofenac
4	M	49	2	Cyclophosphamid; Carbamazepin
5	M	57	2	Keine
6	F	72	5	Amitriptylin, Carbamazepin, Rofecoxib, Tramadol
7	M	64	3	Keine
8	M	44	2	Opipramol
9	M	64	1	Keine
10	M	73	10	Azathioprin
11	M	56	3	Gabapentin
12	F	41	1	Pregabalin
13	M	43	2	Keine
14	M	74	3	Keine
15	F	64	0	Gabapentin; Methylprednisolon i.v.
16	F	61	24	Ibuprofen
17	M	55	0	Tramadol; Gabapentin; Methylprednisolon i.v.
18	F	58	4	Gabapentin
19	F	25	0	Gabapentin
20	F	77	10	Keine
21	F	79	2	Gabapentin

22	F	36	10	Methylprednisolon i.v.; Pregabalin; Tramadol
23	M	58	1	Gabapentin; Tramadol
24	F	81	4	Amitriptylin; Rofecoxib; Azathioprin
25	M	60	0,2	Tilidin; Tramadol; Carbamazepin
26	F	68	4	Methylprednisolon
27	M	66	10	Fentanyl; Pregabalin; Diclofenac; Alendronat i.v.
28	M	80	3	Gabapentin; Amitriptyline; Chinin; Methylprednisolon
29	M	58	0	Diclofenac
30	F	72	24	Keine
31	F	71	7	Keine
32	F	65	10	Pregabalin

**Tabelle 7.1: Patienten mit schmerzhafter PNP; F=Frau; M=Mann; i.v.=intravenös**

## 7.2 Patienten mit schmerzloser PNP

Patient	Geschlecht	Alter (Jahre)	Dauer (Jahre)	Schmerzmedikation
1	F	69	10	Acetylsalicylsäure
2	M	62	1	Keine
3	M	49	1	Methylprednisolon i.v.
4	M	48	0	Keine
5	M	27	16	Methylprednisolon; Azathioprin
6	M	71		Keine
7	M	57	4	Keine
8	M	75	11	Keine
9	F	73	8	Methylprednisolon; Acetylsalicylsäure; Azathioprin
10	M	69	5	Keine
11	M	67	5	Keine
12	M	69	8	Keine
13	M	55	12	Keine
14	F	68	0	Keine
15	M	41	6	Keine
16	M	41	20	Azathioprin; Methylprednisolon
17	M	70	6	Keine
18	M	70	0	Keine
19	M	67	3	Keine
20	M	26	20	Keine

**Tabelle 7.2: Patienten mit schmerzloser PNP; F=Frau; M=Mann; i.v.=intravenös**

### 7.3 Neuropathie Erhebungsbogen

#### **Neuropathie Erhebungsbogen**

Tag der Untersuchung: .....

Name und Geburtsdatum:

.....

Klinische Diagnose:

.....

Entlassungsdiagnose:

.....

#### **Anamnese:**

Auftreten von Symptomen der Neuropathie:

Beginn: .....

Progredienz:  rasch: über.....Monate  langsamer über ..... Jahre

Art der Neuropathie:

distal symmetrisch

fokal

multifokal

Schwerpunkt Neuropathie

vorwiegend sensibel

vorwiegend motorisch

sensibel/motorisch

Ursachen erworbener Neuropathien:

Diabetes mellitus  ja, bekannt seit .....  nein

Alkohol  ja, bekannt seit .....  nein

Alkoholmenge/Tag .....

Urämie  ja, bekannt seit .....  nein

Hepathopathien  ja, bekannt seit.....  nein

Hypothyreose  ja, bekannt seit .....  nein

Paraneoplasie  ja, bekannt seit .....  nein

Art des Neoplasma: .....

Paraproteinämie  ja, bekannt seit .....  nein  
Grunderkrankung: .....

Kollagenose  ja, bekannt seit .....  nein

Malnutrition  ja, bekannt seit .....  nein

Mangel an .....

Noxen/Medikamente  ja, bekannt seit .....  nein

auslösende Noxe: .....

Entzündung/Infektion  ja, bekannt seit .....  nein

Entzündungsursache: .....

Sonstige Erkrankungen: .....

Hereditäre Neuropathie:  ja, bekannt seit .....  nein

bitte näher spezifizieren: .....

idiopathisch

Anamnestisch zu erhebende Beschwerden:

Paresen:.....

Taubheit:.....

Gangunsicherheit:.....

Berührungsempfindlichkeit:.....

Schmerzen .....

Autonome Symptome:

posturaler Schwindel  ja, bekannt seit .....  nein

Impotenz bei Männern  ja, bekannt seit .....  nein

Inkontinenz  ja, bekannt seit .....  nein

Hyperhidrosis  ja, bekannt seit .....  nein

Hypo-/Anhidrosis  ja, bekannt seit .....  nein

**Untersuchungsbogen:**

Sensibilität	Schraffur		spontan	evoziert
Gestörte Spitz-Stumpf-Diskrimination		Parästhesien		
Hypästhesie für Berührung		Dysästhesien		
Hypästhesie für Schmerz		Hyperalgesie		
Kalthypästhesie		Allodynie vFrey Haar		
Warmhypästhesie		Allodynie Wattebausch		
		Allodynie Stempel		

Lagesinn:

**rechts**  Großzehe

Fußgelenk

Kniegelenk

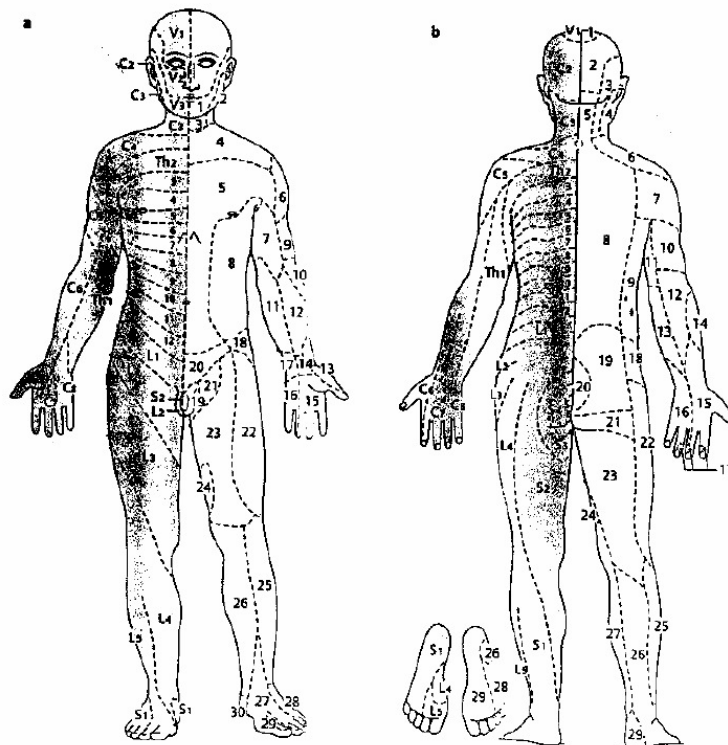
**links**  Großzehe

Fußgelenk

Kniegelenk

**Pallästhesie:**

als x/8 an getesteten Punkten eintragen



**Elektrophysiologie:**

N. suralis rechts Amplitude:..... $\mu$ V NLG:.....m/s  
N. suralis links Amplitude:..... $\mu$ V NLG:.....m/s  
N. tibialis rechts Amplitude:.....mV NLG:.....m/s  
F-Wellen-Latenz: F-Wellen-Persistenz: .....%  
N. tibialis links Amplitude:.....mV NLG:.....m/s  
F-Wellen-Latenz: F-Wellen-Persistenz: .....%  
N. medianus rechts Amplitude:.....mV NLG:.....m/s  
F-Wellen-Latenz: F-Wellen-Persistenz: .....%  
N. ulnaris rechts Amplitude:.....mV NLG:.....m/s  
F-Wellen-Latenz: F-Wellen-Persistenz: .....%  
N. med. sens. re.: Amplitude:..... $\mu$ V NLG:.....m/s  
N. uln. sens. re.: Amplitude:..... $\mu$ V NLG:.....m/s

sympathische Hautantwort:

Fußrücken  rechts  links

Andere Lokalisation: .....

Herzfrequenzvarianzanalyse: .....

Schellongtest: .....

**Medikamente:** Betablocker  Amitriptylin  Carbamazepin**Laborbefunde:**

BSG ..... CRP .....

Blutzucker ..... HbA1c .....

CDT ..... MCV .....

 $\gamma$ GT ..... ANA .....

ANCA ..... Borrelien-Serologie.....

Hepatitisserologie .....

Liquorbefunde:

Zellzahl ..... Liquorzucker .....

Liquoreiweiß .....

**Grafik 7.3 Neuropathie Erhebungsbogen**

## 8 Referenzen

Aggarwal BB. Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF-kappaB. *Ann Rheum Dis* 2000;59 Suppl 1:i6-16.

Alexander GM, Rijn MAV, Hilten JJv, Perreault MJ, Schwartzmann RJ. Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. *Pain* 2005;116:213-219.

Alkharfy KM, Kellum JA, Matzke GR. Unintended immunomodulation: part II. Effects of pharmacological agents on cytokine activity. *Shock* 2000;13(5):346-360.

Andersson A, Chaduvula M, Atkinson S, Khanolkar-Young S, Jain S, Suneetha L, Suneetha S, Lockwood D. Effects of Prednisolone treatment on cytokine expression in patients with leprosy type 1 reactions. *Infection and Immunity* 2005;73:3725-3733.

Anisman H, Merali Z, Poulter M, Hayley S. Cytokines as a precipitant of depressive illness: animal and human studies. *Curr Pharm Des* 2005;11(8):963-972.

Backonja MM, Coe CL, Muller DA, Schell K. Altered cytokine levels in the blood and cerebrospinal fluid of chronic pain patients. *J Neuroimmunol* 2008;195(1-2):157-163.

Baumgartner U, Magerl W, Klein T, Hopf HC, Treede RD. Neurogenic hyperalgesia versus painful hypoalgesia: two distinct mechanisms of neuropathic pain. *Pain* 2002;96(1-2):141-151.

Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33(1):87-107.



- Bennett M, Attal N, Backonja M, Baron R, Bouhassira D, Freynhagen R, Scholz J, Tölle T, Wittchen H, Jensen T. Using screening tools to identify neuropathic pain. *Pain* 2007;127(3):199-203.
- Bleeker MW, Netea MG, Kullberg BJ, Van der Ven-Jongekrijg J, Van der Meer JW. The effects of dexamethasone and chlorpromazine on tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-10 in human volunteers. *Immunology* 1997;91(4):548-552.
- Bonetti B, Valdo P, Stegagno C, Tanel R, Zanusso GL, Ramarli D, Fiorini E, Turazzi S, Carner M, Moretto G. Tumor necrosis factor alpha and human Schwann cells: signalling and phenotype modulation without cell death. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59(1):74-84.
- Bouhassira D, Attal N, Fermanian J, Alchaar H, Gautron M, Masquelier E, Rostaing S, Lanteri-Minet M, Collin E, Grisart J, Boureau F. Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. *Pain* 2004;108(3):248-257.
- Boukhris S, Magy L, Khalil M, Sindou P, Vallat JM. Pain as the presenting symptom of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy (CIDP). *J Neurol Sci* 2007;254(1-2):33-38.
- Brattsand R, Linden M. Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies. *Aliment Pharmacol Ther* 1996;10 Suppl 2:81-90; discussion 91-82.
- Braun Hashemi CA, Zang YC, Arbona JA, Bauerle JA, Frazer ML, Lee H, Flury L, Moore ES, Kolar MC, Washington RY, Kolar OJ. Serum immunologic markers in multiple sclerosis patients on continuous combined therapy with beta-interferon 1a, prednisone and azathioprine. *Mult Scler* 2006;12(5):652-658.
- Campbell JN, Meyer RA. Mechanisms of neuropathic pain. *Neuron* 2006;52(1):77-92.

- Chalk CH, Windebank AJ, Kimmel DW, McManis PG. The distinctive clinical features of paraneoplastic sensory neuronopathy. *Can J Neurol Sci* 1992;19(3):346-351.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
- Collins MP, Mendell JR, Periquet MI, Sahenk Z, Amato AA, Gronseth GS, Barohn RJ, Jackson CE, Kissel JT. Superficial peroneal nerve/peroneus brevis muscle biopsy in vasculitic neuropathy. *Neurology* 2000;55(5):636-643.
- Collins MP, Periquet MI, Mendell JR, Sahenk Z, Nagaraja HN, Kissel JT. Nonsystemic vasculitic neuropathy: insights from a clinical cohort. *Neurology* 2003;61(5):623-630.
- Conceicao I, De Carvalho M. Clinical variability in type I familial amyloid polyneuropathy (Val30Met): comparison between late- and early-onset cases in Portugal. *Muscle Nerve* 2007;35(1):116-118.
- Czeschik JC, Hagenacker T, Schäfers M, Büsselberg D. TNF-alpha differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neurosci Lett* 2008;434(3):293-298.
- D'Amour ML, Butterworth RF. Pathogenesis of alcoholic peripheral neuropathy: direct effect of ethanol or nutritional deficit? *Metab Brain Dis* 1994;9(2):133-142.
- DeLeo JA, Colburn RW, Rickman AJ. Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy. *Brain Res* 1997;759(1):50-57.
- Ding Y, Fu S, Zamarin D, Bromberg J. Interleukin-10. In: AW Thomson, MT Lotze, eds. *The cytokine handbook*. 4th ed. London: Elsevier Science Ltd (Academic Press), 2003: 603ff.

- El Azab SR, Rosseel PM, de Lange JJ, Groeneveld AB, van Strik R, van Wijk EM, Scheffer GJ. Dexamethasone decreases the pro- to anti-inflammatory cytokine ratio during cardiac surgery. *Br J Anaesth* 2002;88(4):496-501.
- Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, Steck AJ. TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* 2001;56(10):1371-1377.
- Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971;8(9):871-874.
- Frettlöh J, Maier C, Gockel H, Huppe M. [Validation of the German Mainz Pain Staging System in different pain syndromes]. *Schmerz* 2003;17(4):240-251.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E, Miki K, Tachibana T, Noguchi K. Changes in mRNAs for neuropeptides and the GABA(A) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model. *Pain* 1998;78:13-26.
- Galer BS, Gianas A, Jensen MP. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract* 2000;47(2):123-128.
- Galer BS, Jensen MP. Development and preliminary validation of a pain measure specific to neuropathic pain: the Neuropathic Pain Scale. *Neurology* 1997;48(2):332-338.
- George A, Buehl A, Sommer C. Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve. *Exp Neurol* 2005;192(1):163-166.
- George A, Kleinschnitz C, Zelenka M, Brinkhoff J, Stoll G, Sommer C. Wallerian degeneration after crush or chronic constriction injury of rodent sciatic

nerve is associated with a depletion of endoneurial interleukin-10 protein. *Exp Neurol* 2004;188(1):187-191.

George A, Marziniak M, Schäfers M, Toyka KV, Sommer C. Thalidomide treatment in chronic constrictive neuropathy decreases endoneurial tumor necrosis factor-alpha, increases interleukin-10 and has long-term effects on spinal cord dorsal horn met-enkephalin. *Pain* 2000;88(3):267-275.

George A, Schmidt C, Weishaupt A, Toyka KV, Sommer C. Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol* 1999;160(1):124-132.

Gorson KC, Ropper AH. Idiopathic distal small fiber neuropathy. *Acta Neurol Scand* 1995;92(5):376-382.

Hao S, Mata M, Glorioso JC, Fink DJ. HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain. *Mol Pain* 2006;2:6.

Hautzinger M. [The Beck Depression Inventory in clinical practice]. *Nervenarzt* 1991;62(11):689-696.

Hautzinger M, Bailer M. Allgemeine Depressions Skala. Manual.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6(10):986-994.

Hilz MJ, Marthol H, Neundorfer B. [Diabetic somatic polyneuropathy. Pathogenesis, clinical manifestations and therapeutic concepts]. *Fortschr Neurol Psychiatr* 2000;68(6):278-288.

Hinze-Selch D, Schuld A, Kraus T, Kuhn M, Uhr M, Haack M, Pollmacher T. Effects of antidepressants on weight and on the plasma levels of leptin, TNF-alpha and soluble TNF receptors: A longitudinal study in patients treated with amitriptyline or paroxetine. *Neuropsychopharmacology* 2000;23(1):13-19.

- Hudmon A, Choi JS, Tyrrell L, Black JA, Rush AM, Waxman SG, Dib-Hajj SD. Phosphorylation of sodium channel Na(v)1.8 by p38 mitogen-activated protein kinase increases current density in dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 2008;28(12):3190-3201.
- Hughes R, Bensa S, Willison H, Van den Bergh P, Comi G, Illa I, Nobile-Orazio E, van Doorn P, Dalakas M, Bojar M, Swan A. Randomized controlled trial of intravenous immunoglobulin versus oral prednisolone in chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *Ann Neurol* 2001;50(2):195-201.
- IASP. Classification of chronic pain. 2 ed. Seattle: IASP press, 1994.
- Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 2002;36(1):57-68.
- Jin X, Gereau R. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha. *J Neurosci* 2006;26(1):246-255.
- Junger H, Sorkin LS. Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha. *Pain* 2000;85(1-2):145-151.
- Kapur D. Neuropathic pain and diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2003;19 Suppl 1:S9-15.
- Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, Hartung HP. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol* 2001;64(2):109-127.
- Koike H, Iijima M, Mori K, Yamamoto M, Hattori N, Watanabe H, Tanaka F, Doyu M, Sobue G. Neuropathic pain correlates with myelinated fibre loss and cytokine profile in POEMS syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(10):1171-1179.

- Kruse N, Pette M, Toyka K, Rieckmann P. Quantification of cytokine mRNA expression by RT PCR in samples of previously frozen blood. *J Immunol Methods* 1997;210(2):195-203.
- Kubera M, Maes M. Serotonin-immune interactions in major depression. In: Patterson, Kordon, Christen, eds. *Neuro-immune Interactions in Neurologic and Psychiatric Disorders*. Berlin: Springer-Verlag, 2000: 79-87.
- Kurz M, Pischel H, Hartung HP, Kieseier BC. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is expressed in the inflamed peripheral nervous system. *J Peripher Nerv Syst* 2005;10(3):311-318.
- Lacomis D. Small-fiber neuropathy. *Muscle Nerve* 2002;26(2):173-188.
- Lewis RA, Sumner AJ, Brown MJ, Asbury AK. Multifocal demyelinating neuropathy with persistent conduction block. *Neurology* 1982;32(9):958-964.
- Lin J-X, Leonard WJ. Interleukin-2. In: AW Thomson, MT Lotze, eds. *The cytokine handbook*. 4th ed. London: Elsevier Science Ltd (Academic Press), 2003: 168ff.
- Lindenlaub T, Sommer C. Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies. *Acta Neuropathol* 2003;105:593-602.
- Lindenlaub T, Teuteberg P, Hartung HP, Sommer C. Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behavior and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. *Brain Res* 2000;866:15-22.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> Method. *Methods* 2001;25(4):402-408.

- Ludwig J, Binder A, Steinmann J, Wasner G, Baron R. Cytokine expression in serum and cerebrospinal fluid in non-inflammatory polyneuropathies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2008;79(11):1268-1273.
- Maes M, Meltzer HY, Bosmans E, Bergmans R, Vandoolaeghe E, Ranjan R, Desnyder R. Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. *J Affect Disord* 1995;34(4):301-309.
- Malik R, Veves A, Walker D, Siddique I, Lye R, Schady W. Sural nerve fibre pathology in diabetich patients with mild neuropathy: relationship to pain, qualitative sensory testing and peripheral nerve elektrophysiology. *Acta Neuropathol* 2001;101:367-374.
- Marchand F, Perretti M, McMahon SB. Role of the immune system in chronic pain. *Nature reviews* 2005;6:521-532.
- Mathey EK, Pollard JD, Armati PJ. TNF alpha, IFN gamma and IL-2 mRNA expression in CIDP sural nerve biopsies. *J Neurol Sci* 1999;163(1):47-52.
- Mäurer M, Toyka KV, Martini R. Die Rolle des Immunsystems bei hereditären demylinisierenden Neuropathien. *Nervenarzt* 2005;76:690-700.
- McBride WT, Allen S, Gormley SM, Young IS, McClean E, MacGowan SW, Elliott P, McMurray TJ, Armstrong MA. Methylprednisolone favourably alters plasma and urinary cytokine homeostasis and subclinical renal injury at cardiac surgery. *Cytokine* 2004;27(2-3):81-89.
- Melendez-Vasquez C, Redford J, Choudhary PP, Gray IA, Maitland P, Gregson NA, Smith KJ, Hughes RA. Immunological investigation of chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy. *J Neuroimmunol* 1997;73(1-2):124-134.
- Milligan E, Langer S, Sloane E, He L, Wieseler-Frank J, O'Connor K, Martin D, Forsayeth J, Maier S, Johnson K, Chavez R, Leinwand L, Watkins L. Controlling pathological pain by adenovirally driven spinal production of

the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10. *European Journal of Neuroscience* 2005;21(8):2136-2148.

Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, Tracey K, Martin D, Maier SF, Watkins LR. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 2003;23(3):1026-1040.

Misawa S, Kuwabara S, Mori M, Kawaguchi N, Yoshiyama Y, Hattori T. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy. *Neurology* 2001;56(5):666-669.

Musselman DL, Miller AH, Porter MR, Manatunga A, Gao F, Penna S, Pearce BD, Landry J, Glover S, McDaniel JS, Nemeroff CB. Higher than normal plasma interleukin-6 concentrations in cancer patients with depression: preliminary findings. *Am J Psychiatry* 2001;158(8):1252-1257.

Myers RR, Campana WM, Shubayev VI. The role of neuroinflammation in neuropathic pain: mechanisms and therapeutic targets. *Drug Discov Today* 2006;11(1-2):8-20.

Mysliwiec J, Kretowski A, Szelachowska M, Mikita A, Kinalska I. Serum pro- and anti-inflammatory cytokines in patients with Graves' disease with ophthalmopathy during treatment with glucocorticoids. *Rocz Akad Med Bialymst* 1999;44:160-169.

Neundorfer B. *Polyneuropathien*. Stuttgart, New York: Thieme, 2007.

Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K. Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Eur J Neurosci* 2004a;20(11):2881-2895.

Obata K, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, Mizushima T, Katsura H, Fukuoka T, Tokunaga A, Noguchi K. Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical



- and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 2004b;24(45):10211-10222.
- Ohtori S, Takahashi K, Moriya H, Myers RR. TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine* 2004;29(10):1082-1088.
- Okada H, Banchereau J, Lotze MT. Interleukin-4. In: AW Thomson, MT Lotze, eds. *The cytokine handbook*. 4th ed. London: Elsevier Science Ltd (Academic Press), 2003: 227ff.
- Oprea A, Kress M. Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci* 2000;20(16):6289-6293.
- Ostrowski K, Rhode T, Asp S, Schjerling P, Pedersen BK. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J Physiol* 1999;515:287-291.
- Otto M, Bak S, Bach FW, Jensen TS, Sindrup SH. Pain phenomena and possible mechanisms in patients with painful polyneuropathy. *Pain* 2003;101(1-2):187-192.
- Pagnoux C, Guillevin L. Peripheral neuropathy in systemic vasculitides. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17(1):41-48.
- Pollock J, McFarlane SM, Connell MC, Zehavi U, Vandenabeele P, MacEwan DJ, Scott RH. TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca<sup>2+</sup> mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones. *Neuropharmacology* 2002;42(1):93-106.
- Rasmussen PV, Sindrup SH, Jensen TS, Bach FW. Symptoms and signs in patients with suspected neuropathic pain. *Pain* 2004;110(1-2):461-469.

- Rittner HL, Machelska H, Stein C. Leucocytes in the regulation of pain and analgesia. *Journal of leukocyte biology* 2005;78(6):1215-1222.
- Rothermundt M, Arolt V, Fenker J, Gutbrodt H, Peters M, Kirchner H. Different immune patterns in melancholic and non-melancholic major depression. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 2001;251(2):90-97.
- Roy S, Cain K, Chapin R, Charboneau R, Barke R. Morphine modulates NF kappa B activation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;245(2):392-396.
- Sacerdote P. Opioids and the immune system. *Palliat Med* 2006;20(Suppl 1):s9-15.
- Sampaio E, Kaplan G, Miranda A, Nery J, Miguel C, Viana S, Sarno E. The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum. *J Infect Dis* 1993;168(2):408-414.
- Saperstein DS, Katz JS, Amato AA, Barohn RJ. Clinical spectrum of chronic acquired demyelinating polyneuropathies. *Muscle Nerve* 2001;24:311-324.
- Sarno E, Grau G, Vieira L, Nery J. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta during leprosy reactional states. *Clin Exp Immunol* 1991;84:103-108.
- Schäfers M, Geis C, Svensson CI, Luo ZD, Sommer C. Selective increase of tumor necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci* 2003a;17(4):791-804.
- Schäfers M, Sommer C, Geis C, Hagenacker T, Vandenabeele P, Sorkin LS. Selective stimulation of either tumor necrosis factor receptor differentially induces pain behavior in vivo and ectopic activity in sensory neurons in vitro. *Neuroscience* 2008;157(2):414-423.

- Schäfers M, Sorkin LS, Geis C, Shubayev VI. Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neurosci Lett* 2003b;347(3):179-182.
- Schäfers M, Svensson CI, Sommer C, Sorkin LS. Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* 2003c;23(7):2517-2521.
- Schiepers OJ, Wichers MC, Maes M. Cytokines and major depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29(2):201-217.
- Schlatter J, Ortuno F, Cervera-Enguix S. Differences in interleukins' patterns between dysthymia and major depression. *Euro Psychiatry* 2001;16:317-319.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43:205-218.
- Sharief MK, Ingram DA, Swash M, Thompson EJ. I.v. immunoglobulin reduces circulating proinflammatory cytokines in Guillain-Barre syndrome. *Neurology* 1999;52(9):1833-1838.
- Sommer C. [Cytokines in neuropathic pain]. *Anaesthesist* 2001;50(6):416-426.
- Sommer C. Painful neuropathies. *Curr Opin Neurol* 2003;16(5):623-628.
- Sommer C, Lindenlaub T, Teuteberg P, Schäfers M, Hartung T, Toyka KV. Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain Res* 2001;913(1):86-89.
- Sommer C, Schäfers M. Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res* 1998;784(1-2):154-162.

- Sommer C, Schmidt C, George A. Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol* 1998;151(1):138-142.
- Song P, Lie-Cheng W, Wang G, Zhou Z, Zhao Z. Interleukin-2 regulates membrane potentials and calcium channels via mu opioid receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuropharmacology* 2002;43(8):1324-1329.
- Song P, Zhao Z. Interleukin 2-induced antinociception partially coupled with mu receptor. *Cytokine* 2000;12(8):1240-1242.
- Sorkin LS, Xiao WH, Wagner R, Myers RR. Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience* 1997;81(1):255-262.
- Stoll G, Jander S, Myers RR. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: from Augustus Waller's observations to neuroinflammation. *J Peripher Nerv Syst* 2002;7(1):13-27.
- Tobinick E, Davoodifar S. Efficacy of etanercept delivered by perispinal administration for chronic back and/or neck disc-related pain: a study of clinical observations in 143 patients. *Curr Med Res Opin* 2004;20(7):1075-1085.
- Toyka KV, Gold R. The pathogenesis of CIDP: rationale for treatment with immunomodulatory agents. *Neurology* 2003;60(8, Suppl 3):S2-7.
- Üçeyler N, Tschärke A, Sommer C. Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain. *Brain Behav Immun* 2007;21(5):553-560.
- Üçeyler N, Valenza R, Stock M, Schedel R, Sprotte G, Sommer C. Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. *Arthritis Rheum* 2006;54(8):2656-2664.

- Vilček J. The cytokines: an overview. In: AW Thomson, MT Lotze, eds. The cytokine handbook. 4th ed. London: Elsevier Science Ltd (Academic Press), 2003: 3ff.
- Vogel C, Stallforth S, Sommer C. Altered pain behavior and regeneration after nerve injury in TNF receptor deficient mice. *J Peripher Nerv Syst* 2006;11(4):294-303.
- Volk H, Keyßer G, Burmester G. Zytokine und Zytokin-Rezeptoren. In: L Thomas, ed. Labor und Diagnose: Indikationen und Bewertungen von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. 5 ed. Frankfurt: TH-books-Verl.-Ges., 1998: 782-791.
- Von Korff M, Ormel J, Keefe FJ, Dworkin SF. Grading the severity of chronic pain. *Pain* 1992;50(2):133-149.
- Von Korff M, Simon G. The relationship between pain and depression. *Br J Psychiatry Suppl* 1996(30):101-108.
- Vrethem M, Boivie J, Arnqvist H, Holmgren H, Lindstrom T. Painful polyneuropathy in patients with and without diabetes: clinical, neurophysiologic, and quantitative sensory characteristics. *Clin J Pain* 2002;18(2):122-127.
- Wagner R, Janjigian M, Myers RR. Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. *Pain* 1998;74(1):35-42.
- Weizman R, Laor N, Podliszewski E, Notti I, Djaldetti M, Bessler H. Cytokine production in major depressed patients before and after clomipramine treatment. *Biol Psychiatry* 1994;35(42-7).
- Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem* 2003;4(11):1120-1128.

Xia Z, DePierre JW, Nässberger L. Tricyclic antidepressants inhibit IL-6, IL-1beta and TNF-alpha release in human blood monocytes and IL-2 and interferon-gamma in T cells. *Immunopharmacology* 1996;34:27-37.

Yao MZ, Gu JF, Wang JH, Sun LY, Lang MF, Liu J, Zhao ZQ, Liu XY. Interleukin-2 gene therapy of chronic neuropathic pain. *Neuroscience* 2002;112(2):409-416.

Zelenka M, Schäfers M, Sommer C. Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain. *Pain* 2005;116(3):257-263.

Ich möchte mich herzlich bei Frau Professor Dr. med. Claudia Sommer für die Überlassung des Themas der Arbeit und die stets hilfsbereite und motivierende Betreuung während der wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Frau Dr. med. Nurcan Üçeyler danke ich für die kontinuierliche Anleitung bei der Durchführung der klinischen und laborchemischen Arbeiten sowie die geduldige und kritische Prüfung der schriftlichen Form der Arbeit.

Den Mitarbeiterinnen des histologischen Labors, insbesondere Frau B. Gado, danke ich für die Kooperation und Unterstützung während der Laborarbeiten.

Ich danke Frau Professor Dr. med. Anna-Leena Sirén für die Übernahme des Koreferates der Arbeit.

Meinen Eltern danke ich für Ihre Unterstützung meiner Projekte und Ziele.





## Lebenslauf

- 11.11.1976 Geburt in Marburg an der Lahn als Sohn von Irmela Rogausch-Geldbach und Dr. Heinz Rogausch
- 1983 – 1987 Brüder-Grimm-Grundschule Marburg
- 1987 – 1996 Martin-Luther-Gymnasium
- 1996 – 1997 Zivildienst in der Schule für Praktisch Bildbare Marburg und in der Abteilung für Neuroradiologie der Universitätsklinik Marburg
- 1997 – 1998 Studium der Bibliothekswissenschaft und Musikwissenschaft (MA) an der Humboldt-Universität Berlin
- 1998 – 2001 Ausbildung zum staatlich examinierten Krankenpfleger an der Krankenpflegeschule vom Roten Kreuz am Alice-Hospital Darmstadt
- 2001 – 2003 Studium der Humanmedizin an der Johann-Wolfgang-Goethe-Universität Frankfurt am Main
- März 2003 Physikum
- 2003 – 2007 Studium der Humanmedizin an der Bayrischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Juni 2007 Zweites Staatsexamen und Approbation als Arzt

## Praktische Ausbildung

- 2006 – 2007 Praktisches Jahr

- Erstes Tertial Chirurgie générale et endocrinienne (Prof. Dr. Marescaux), Chirurgie urologique (Prof. Dr. Jagmin), Service d'Urgence, Hôpital Civil, Strasbourg (F)
- Zweites Tertial Médecine Interne (Prof. Dr. Pasquali, Prof. Dr. Weber), Hôpital Civil, Strasbourg (F)
- Drittes Tertial Neurologie (Prof. Dr. Wiendl, Prof. Dr. Sommer), Neurologische Klinik und Poliklinik (Prof. Dr. Toyka), Universitätsklinikum Würzburg

- 07 – 08/2003 Famulatur in der Abteilung für Hämatologie–Onkologie,  
Medizinische Klinik II der Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg
- 09 – 10/2003 Famulatur in der Abteilung für Gastroenterologie, Alice-Hospital,  
Darmstadt
- 02 – 03/2004 Famulatur in der Abteilung für Allgemein- und Knochenchirurgie,  
Missionsärztliche Klinik, Würzburg
- 09/2004 Famulatur in der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Julius-  
Maximilians-Universität Würzburg
- 08/2005 Famulatur in der Praxis für Kinderheilkunde, Dr. Nolte, Marburg
- 10/2005 Famulatur in der Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. Potrawa und  
Dr. Hausmann, Würzburg-Versbach
- Seit 10/2007 Assistenzarzt der Abteilung für Neurologie (Chefarzt:  
Privatdozent Dr. Weidauer), Sankt-Katharinen-Krankenhaus,  
Frankfurt am Main

Mitarbeit an folgenden Veröffentlichungen:

Üçeyler N, Rogausch J, Toyka K, Sommer C. Differential expression of cytokines  
in painful and painless neuropathies. *Neurology* 2007;69(1):42-49.

Sommer C, Richter H, Rogausch J, Frettöh J, Lungenhausen M, Maier C.  
Validation and discriminative power of the German translation of the Neuropathic  
Symptom Inventory (NPSI-D). *Pain*. Manuskript eingereicht.

A handwritten signature in black ink that reads "Jan Rogausch". The signature is written in a cursive, flowing style.



