

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

Charakterisierung von Spinalganglienneuronen intakter und lädierter Afferenzen

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Christian Geis
aus Würzburg**

Würzburg, November 2004

Referentin: Professor Dr. med. Claudia Sommer

Koreferent: Professor Dr. med. Wolfgang Roggendorf

Dekan: Professor Dr. med. Georg Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 23.06.2005

Der Promovend ist Arzt

meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Einführung	1
1.2. Problemstellung	2
2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN	4
2.1. Neuropathischer Schmerz – Grundlagen und Mechanismen bei inkompletter Nervenläsion	4
2.2. Die Bedeutung lädierter und von der Läsion ausgesparter Fasern für die Schmerzentstehung nach peripherer Nervenverletzung	5
2.3. Neuronale Tracer – Fluorogold und Fluororuby	6
2.3.1. Fluorogold	6
2.3.2. Fluororuby	8
2.4. Anatomie und zytochemische Marker des Spinalganglions	8
2.4.1. Protein gene product 9.5 - PGP 9.5	9
2.4.2. Neurofilament 200 kD (NF 200)	10
2.4.3. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Isolectin B4 (IB4)	10
2.4.4. Tyrosin-Kinase Rezeptoren A, B (trkA, trkB) und RET	12
2.5. Die Bedeutung des Vanilloid Rezeptors 1 (VR1, TRPV1) bei der Schmerzentstehung	14
2.6. Pathophysiologische Rolle von Zytokinen bei neuropathischen Schmerzen	16
2.6.1. Interleukin 10 (IL-10)	16
2.6.2. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)	17

3. MATERIAL UND METHODEN	21
3.1. Versuchstiere	21
3.2. Modell der Chronic Constriction Injury (CCI)	21
3.3. Gewebeentnahme und Präparation	22
3.4. Fluorogold (FG) und Fluororuby (FR)	23
3.4.1. Intraneurale Injektion von FG	23
3.4.2. Intramuskuläre Injektion von FG	24
3.4.3. Intradermale Injektion von FG	24
3.4.4. Intraneurale Injektion von FR	24
3.5. Immunfluoreszenzfärbungen	26
3.5.1. Färbeprotokoll	26
3.5.2. Verfahrenskontrolle	29
3.6. Aufbau der Versuchsgruppen	30
3.7. Quantitative Analyse	30
3.8. Statistische Auswertung	33

4. ERGEBNISSE	34
4.1. Auswertung der Einzelfärbungen	34
4.1.1. PGP 9.5	34
4.1.2. TNF- α	35
4.1.3. IL-10	37
4.1.4. VR1	38
4.1.5. IB4	40
4.1.6. CGRP	41
4.1.7. Fluorogold	43
4.1.8. Fluororuby	45
4.2. Auswertung der Überlagerungen	47
4.2.1. Überlagerungen mit Fluorogold (FG i.n.)	47
4.2.1.1. <i>FG mit TNF-α</i>	47
4.2.1.2. <i>FG mit IL-10, VR1 und IB4</i>	48
4.2.1.3. <i>FG mit CGRP</i>	50
4.2.2. Überlagerungen mit Fluororuby	50
4.2.2.1. <i>FR mit TNF-α</i>	50
4.2.2.2. <i>FR mit IL-10, VR1 und IB4</i>	51
4.2.2.3. <i>FR mit CGRP</i>	53
4.2.3. Überlagerung TNF- α mit Fluorogold (FG i.m.)	55
4.2.4. Überlagerung TNF- α mit Fluorogold (FG i.d.)	56
4.3. Weitere Färbungen zur Charakterisierung der TNF-α positiven Neurone	58

5. DISKUSSION	62
5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse	62
5.2. Beurteilung der retrograden Fasermarkierung	62
5.3. Herausragende Rolle des pro-inflammatorischen Zytokins TNF-α bei der Allodynie- und Hyperalgesieentwicklung nach CCI	64
5.3.1. TNF- α Expression im Spinalganglion ohne Nervenschädigung	64
5.3.2. Selektiver Anstieg der TNF- α Immunreaktivität in mittelgroßen und großen Spinalganglienneurone nach CCI	64
5.3.3. Frage nach der Lokalisation und dem zeitlichen Verlauf der TNF- α Synthese	66
5.3.4. Nicht nur geschädigte, sondern auch intakte Afferenzen zeigen eine erhöhte Expression von TNF- α	68
5.3.5. TNF- α in Muskel- und Hautafferenzen	69
5.3.6. Koexpression von TNF- α mit anderen histochemischen Markern	70
5.4. Verminderte Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Spinalganglienneuronen nach CCI	71
5.5. Verminderte Expression des Capsaicinrezeptors VR1 in kleinen Spinalganglienneuronen nach CCI	72
5.6. Analyse der Ergebnisse der IB4 und CGRP Immunreaktivität	74
5.7. Schlussfolgerungen und Ausblick	75
6. ZUSAMMENFASSUNG	77
7. LITERATURVERZEICHNIS	78
8. DANKSAGUNG	
9. LEBENSLAUF	

1. EINLEITUNG

1.1. Einführung

Die Behandlung von Patienten mit chronischen Schmerzen geht im Klinikalltag oft mit nicht unerheblichen Problemen einher, da bei einem Teil der Patienten Schmerzfreiheit oder Schmerzreduktion mit den gängigen Analgetika oft nur insuffizient zu erreichen sind. Um dieses Phänomen besser zu verstehen, ist es sinnvoll, chronische Schmerzen nach ihrem pathophysiologischen Ursprung zu untergliedern:

1. Der nozizeptive Schmerz, auch als "normaler", "physiologischer" Schmerz bezeichnet, ist die Antwort des Organismus auf einen schädigenden Reiz. Dieser Reiz erregt die Nervenendigungen der afferenten, dünn myelinisierten A δ - und/oder unmyelinisierten C-Fasern direkt oder setzt ihre Erregungsschwelle für weitere Stimuli herab, sodass eine adäquate und "sinnvolle" Schmerzempfindung (z.B. als Warnsignal) auf den ursächlichen Stimulus resultiert. Beispiele hierfür sind u.a. Gewebeläsionen, Entzündungen, Ischämieschmerzen, aber auch Tumorschmerzen. Diese Art von Schmerzen ist meist gut nach dem WHO-Stufenschema zu behandeln.
2. Der neuropathische Schmerz, auch "pathophysiologischer" Schmerz, hingegen resultiert aus einer Schädigung des schmerzleitenden und schmerzverarbeitenden Nervensystems selbst. Diese Schädigung kann sowohl im zentralen, als auch im peripheren Nervensystem vorliegen und auf einer Störung in der funktionellen, anatomischen oder molekularen Ebene basieren. Im Gegensatz zu den nozizeptiven Schmerzen sind diese Schmerzen selten opiatempfindlich und nur unzureichend mit einfachen Analgetika zu behandeln (Attal 2000). Darunter fallen beispielsweise die Trigeminusneuralgie, Polyneuropathien, die postherpetische Neuralgie und das Karpaltunnelsyndrom. Meist werden auch die Deafferenzierungsschmerzen (Phantomschmerz etc.) und das komplexe regionale Schmerzsyndrom (CRPS) in dieser Gruppe eingeordnet. Klinisch können neuropathische Schmerzen mit Spontanschmerzen, die oft als brennend oder elektrisierend beschrieben werden, und mit evozierten Schmerzen einhergehen. Zu den evozierten Schmerzen gehören die Allodynie (Schmerzempfindung bei normalerweise nicht

schmerzhafter Reizung), die Hyperalgesie (übersteigertes Schmerzempfinden auf schmerzhafte Reize), oder die Hyperpathie (verzögertes Einsetzen, verstärkte Antwort und reizüberdauernde Nachantwort) (IASP 1979; Marx 2002; Otto et al. 2003).

1.2. Problemstellung

Die genauen Mechanismen der Schmerzentstehung bei Läsionen des zentralen und peripheren Nervensystems sind noch immer unklar. Anatomisch kann die Generierung und Weiterleitung der Schmerzimpulse in den peripheren Nervenendigungen, den Axonen, im Spinalganglion, im Hinterhorn des Rückenmarks oder in den aufsteigenden Bahnen, im Thalamus und im Kortex erfolgen.

Verschiedene Studien belegen, dass Schmerzen nach Läsion eines peripheren Nerven infolge eines hypersensitiven Spinalganglions entstehen kann (Xie et al. 1995; Hu und Xing 1998). Weiterhin haben vorangegangene Studien gezeigt, dass eine Vielzahl verschiedener Transmitter und Rezeptoren an der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischem Schmerz beteiligt sind, hierzu zählen u.a. die Vanilloid-Rezeptoren (VR1, nach neuer Nomenklatur TRPV1) (Hudson et al. 2001; Di Marzo et al. 2002; Walker et al. 2003), Neuropeptide (Fukuoka et al. 1998; Ma und Bisby 1998d; Ma und Bisby 1998a) sowie pro-inflammatorische Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) (Wagner und Myers 1996b; Sommer et al. 1998a; Sommer et al. 1998b; Wagner et al. 1998).

Da das Spinalganglion eine Schlüsselposition bei der Entstehung von Neuropathieschmerz nach Läsionen peripherer Nerven einnimmt (Xie et al. 1995; Hu und Xing 1998), haben wir in der vorliegenden Studie die Expression von TNF- α , Interleukin 10 (IL-10), TRPV1, Isolectin B4 und Calcitonin gene-related peptide (CGRP) mittels eines experimentellen inkompletten Nervenläsionsmodells, der sog. "chronic constriction injury" (CCI), systematisch untersucht. Da nach inkompletter Nervenläsionen nicht nur verletzte, sondern auch von der Läsion ausgesparte, benachbarte Spinalganglienneurone phänotypische Veränderungen zeigen (Fukuoka et al. 1998; Ma und Bisby 1998b; Fukuoka et al. 2000), ektope Aktivität entwickeln (Woolf 1992; Devor und Seltzer 1999) und somit gleichermaßen für die Schmerzentwicklung bedeutsam sein können, haben

wir die Expression der o.g. Marker in Neuronen von verletzten und von der Läsion ausgesparten Fasern getrennt analysiert. Dies konnte durch die Kombination von retrograder Fasermarkierung und anschließender Immunhistochemie der Spinalganglien realisiert werden.

2. THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1. Neuropathischer Schmerz – Grundlagen und Mechanismen bei inkompletter Nervenläsion

Viele Verletzungen im klinischen Alltag führen zu inkompletten Nervenläsionen. Auch im Tiermodell der CCI bleibt im Gegensatz zu Modellen mit kompletter Nervendurchtrennung ein Teil der Axone intakt. Es kommt zu einer Unterbrechung fast aller großen myelinisierten A β -Fasern, der meisten kleinen, dünn myelinisierten A δ -Fasern und von etwa zwei Dritteln der nicht myelinisierten C-Fasern (Munger et al. 1992; Sommer et al. 1993). So laufen intakte Nervenfasern benachbart im gleichen Nerven mit den durchtrennten Nerven. Somit sind auch die ‚intakten‘ Axone dem veränderten endoneuralen Milieu nach Nervenläsion ausgesetzt. Nach einer Nervenläsion sind dort vermehrt Mediatoren wie Bradykinin, Serotonin, Capsaicin, Adrenalin, Prostaglandine und Zytokine vorhanden (Hartung et al. 1989; Welk et al. 1990; George et al. 1999; Rivera et al. 2000; Schäfers et al. 2004). Diese Mediatoren, vor allem in Kombination, können die Erregbarkeitsschwelle von Axonen senken und diese somit sensibilisieren (Michaelis et al. 1998).

Neben der Sensibilisierung peripherer nozizeptiver Fasern ist vor allem die Entstehung ektooper Spontanaktivität in den primär afferenten Neuronen der Spinalganglien wesentlich für Hyperalgesie und Allodynie nach peripherer Nervenläsion (Liu et al. 2000b; Wu et al. 2001; Zimmermann 2001).

Es wurden unterschiedliche Erklärungsansätze dazu publiziert, was für die Entwicklung von ektooper Aktivität verantwortlich sein könnte:

- Nach Nervenverletzung wurde eine verminderte Expression bestimmter Untergruppen von Kalium-Kanälen (Rasband et al. 2001) sowie eine vermehrte Expression anderer Kationenkanäle (Tsuzuki et al. 2001) und eines bestimmten Natriumkanals (Lai et al. 2003) auf nozizeptiven Neuronen nachgewiesen.
- Nach peripherer Nervenläsion besteht eine erhöhte NO-Synthase-Expression in sensiblen Neuronen, welche wahrscheinlich durch den Transskriptionsfaktor c-jun kontrolliert wird (Verge et al. 1992; Zhang et al. 1993; Vizzard et al. 1995; Herdegen und Leah 1998).

2.2. Die Bedeutung lädierter und von der Läsion ausgesparter Neurone für die Schmerzentstehung nach peripherer Nervenverletzung

Eine wichtige Frage ist, in welchem Ausmaß zum einen die geschädigten, zum anderen die benachbarten, intakten Neurone zur Hyperalgesie- und Allodynieentstehung beitragen.

Einerseits existieren einige Studien, die alleine die geschädigten Afferenzen für die Entstehung neuropathischer Schmerzen verantwortlich machen. So wurde durch Verhaltenstestung an Ratten gezeigt, dass ein bestehendes Schmerzverhalten mittels Durchtrennung der Hinterwurzeln auf Höhe der zuvor geschädigten Spinalnerven gebessert werden konnte, während eine Durchtrennung der darüberliegenden Hinterwurzeln darauf keinen Einfluss hatte (Sheen und Chung 1993; Yoon et al. 1996). Andere Gruppen berichten über ektope Aktivität in geschädigten A δ -Fasern, welche gleichzeitig zu der Frühmanifestation neuropathischen Schmerzverhaltens in den ersten Tagen nach peripherer Nervenläsion aufgetreten war (Chul Han et al. 2000; Liu et al. 2000c; Liu et al. 2000d).

Dagegen zeigen zahlreiche Studien, dass auch benachbarte, von der Läsion nicht betroffene Neurone zur Entstehung von Allodynie und Hyperalgesie beitragen. Beispielsweise kamen Li et. al. bei ähnlicher Versuchsanordnung zu gegensätzlichen Ergebnissen wie Sheen and Chung und Yoon et. al. (s.o.) (Gold 2000; Li et al. 2000). In elektrophysiologischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass auch intakte C-Fasern zu einem frühen Zeitpunkt nach Nervenverletzung Spontanaktivität generieren und ein erhöhtes Ansprechen auf sympathische Transmitter aufweisen (Ali et al. 1999; Wu et al. 2001).

Es gibt im wesentlichen zwei gebräuchliche Tiermodelle für inkomplette periphere Nervenläsionen, die eine Differenzierung zulassen, ob intakte oder verletzte primär afferente Neurone für die Entstehung neuropathischer Schmerzen verantwortlich sind:

- Erstens das sog. "spinal nerve ligation" Modell, bei dem die Spinalnerven L5 und L6 fest ligiert werden, so dass die Afferenzen des Nervus ischiadicus zu den zugehörigen Ganglien geschädigt sind, während die Afferenzen zu den Ganglien L3 und L4 intakt bleiben (Kim und Chung 1992).
- Zweitens das schon erwähnte CCI Modell, wobei durch mehrfache Ligatur eine Schädigung am Nervus ischiadicus selbst gesetzt wird, welche aber nicht alle Fasern

betrifft (Bennett und Xie 1988). Hierbei befinden sich in den Spinalganglien L3 bis L6 Zellkörper verletzter Neurone direkt neben Somata intakter Neurone.

Mit Hilfe bestimmter neuronaler Tracer (Fluorogold und Fluororuby), die sich aufgrund bestimmter Eigenschaften entweder nur in intakten oder verletzten Neuronen anreichern, ist es möglich diese zwei verschiedenen Populationen getrennt zu identifizieren. Phänotypische Veränderungen der Spinalganglienneurone nach Nervenschädigung können so bei beiden Populationen getrennt untersucht werden.

2.3. Neuronale Tracer – Fluorogold und Fluororuby

2.3.1. Fluorogold

Fluorogold (FG, Fluorochrome, Inc., Denver, Colorado, USA) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der als retrograder Marker zu Forschungszwecken am Nervensystem von Versuchstieren verwendet wird (Dado et al. 1990). FG wird als helles, gelbes, kristallines Pulver geliefert und kann sowohl in aqua dest. als auch in 0,9% NaCl aufgelöst werden.

Zur Verdünnung von FG variieren die Angaben von 1% bis 10% (Schmued und Fallon 1986; Baron und Janig 1991; Persson et al. 1995; Tang et al. 1995). Nach einigen Pilotversuchen wurde für diese Experimente die Konzentration von 3% FG in einer 0,9%igen NaCl Lösung als optimal befunden (3,0 mg FG aufgelöst in 100µl 0,9% NaCl).

In dieser Verdünnung bei neutralem pH Wert (pH=7,4) besteht die größte Exzitation des Tracers bei der Wellenlänge von 323 nm und die größte Emission liegt bei der Wellenlänge von 408 nm (Suzuki et al. 1998). Unter einem Fluoreszenzmikroskop mit Breitband-Ultraviolett Exzitationsfilter erscheint Gewebe, das mit FG angefärbt wurde, weiß-bläulich, und zwar umso heller, je mehr FG aufgenommen wurde.

Für die Applikation von FG bestehen vielfältige Möglichkeiten. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die intraneurale (i.n.) Injektion (N. ischiadicus), die intramuskuläre (i.m.) Injektion (M. gastrocnemius) und die intradermale (i.d.) Injektion (Plantarseite der Pfote) angewendet (vgl. Abschnitt 3.4.). Wahrscheinlich wird die Aufnahme des FG durch aktive Endozytose in pinozytische Vesikel vollzogen, welche dann retrograd in den Axonen der afferenten Neuronen des Nervus ischiadicus zu den ipsilateralen zugehörigen

Spinalganglien (L3 bis L6) transportiert werden und dort in den Zellkörpern der markierten Axone gespeichert werden (Schmued und Fallon 1986). Der Zeitraum, in dem gute retrograde Anfärbung zu beobachten ist, wird mit zwei Tagen bis hin zu mehreren Monaten angegeben (Schmued und Fallon 1986; Baranowski et al. 1992; Puigdellivol-Sanchez et al. 1998). Nach einigen Testversuchen wurde für alle nachfolgenden Experimente eine post-OP Überlebenszeit von vier Tagen festgelegt, wobei sich eine sehr gute Anfärbung der Spinalganglienneurone zeigte.

Als fluoreszierender Farbstoff muss FG streng gekühlt (bei 4° C) und im Dunkeln gelagert werden. Erstaunlicherweise erweist sich FG bei richtiger Verwendung und Lagerung als sehr resistent gegen Ausbleichen (Garrett et al. 1991; Baranowski et al. 1992). So ist der Farbstoff bei angefärbtem und bereits geschnittenem Gewebe noch Monate später ohne weiteres deutlich im Fluoreszenzmikroskop auszumachen.

Außerdem zeigte sich auch, dass FG nicht aus den Strukturen austritt, in die es einmal aufgenommen wurde (Pieribone und Aston-Jones 1988; Garrett et al. 1991). So sind in einem Spinalganglion eindeutig FG positive Zellen neben ungefärbten Neuronen zu sehen, was belegt, dass das FG nicht etwa in benachbarte Zellen diffundiert und diese dann als falsch positiv beurteilt werden (vgl. Abb. 4). Lediglich bei den i.m. und i.d. Injektionen wird eine gewisse systemische Verteilung beschrieben, die bei den meisten neuronalen Tracern zu erwarten ist (Ogilvy und Borges 1988; Richmond et al. 1994). Dies wurde auch bei diesen Experimenten beobachtet, was sich dann in der Anfärbung von Bindegewebe und Satellitenzellen zeigte. Die Auswertung wurde dadurch aber nicht wesentlich beeinträchtigt, da diese Anfärbungen leicht von den tatsächlichen Ganglienzellen zu unterscheiden waren.

Am deutlichsten stellt sich das FG im Spinalganglion dar, wenn das Gewebe mit Paraformaldehyd fixiert ist. Leider konnten einige der nachfolgenden Immunfluoreszenzfärbungen nicht mit fixiertem Gewebe durchgeführt werden, weswegen auf eine Fixierung verzichtet wurde. Dies führte dazu, dass die Zellgrenzen der mit FG angefärbten Neurone etwas verwaschener waren und die mit FG gefüllten Vesikel im Zellinneren nicht mehr auszumachen waren (Schmued und Fallon 1986).

Wie schon öfters berichtet, besitzt FG gewisse toxische Eigenschaften (Schmued und Fallon 1986; Garrett et al. 1991). Die Tiere entwickelten nach intradermaler FG Injektion massive Ödeme an der Injektionsstelle, welche aber im Laufe des gleichen Tages

wieder rückläufig waren. Ähnliches wurde bei der intramuskulären Verabreichung beobachtet.

2.3.2. Fluororuby

Fluororuby (FR, Molekular Probes Europe BV, Leiden, Niederlande) ist ebenfalls ein fluoreszierender Farbstoff, der als retro- sowie anterograder Tracer in neuronalem Gewebe verwendet wird (Nance und Burns 1990). FR ist ein Dextran mit einem Molekulargewicht von 10000 D, das mit Tetramethylrhodamin konjugiert ist (Fritsch und Sonntag 1991).

Geliefert wird FR ebenfalls in Pulverform, welches dann mit aqua dest. aufgelöst wird. Eine Konzentration von 5% erwies sich zur Anfärbung der Spinalganglien Neurone als geeignet (25 mg FR aufgelöst in 500 µl aqua dest.). Dieses Gemisch wurde auf Eppendorf Cups à 20 µl FR aliquotiert und bei -20°C im Dunkeln gelagert.

Das Absorptionsmaximum dieses Tracers liegt bei 555 nm und das Emissionsmaximum bei 580 nm (Richmond et al. 1994). Bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop mit entsprechenden Filtereinstellungen erscheint FR gefärbtes Gewebe intensiv rot.

Für die Applikation von FR sind folgende Besonderheiten zu beachten:

1. FR wird nur durch beschädigte Axone aufgenommen (Glover et al. 1986; Richmond et al. 1994; Ma und Bisby 1998b).
2. FR wird nach intramuskulärer oder intradermaler Applikation nicht in das versorgende Axon aufgenommen und weitertransportiert (Fritsch und Sonntag 1991; Richmond et al. 1994).

Der Grund für diese Eigenschaften liegt darin, dass die konjugierten Dextrane durch ihr hohes Molekulargewicht so in ihrer Beweglichkeit eingeschränkt sind, dass sie nicht durch die Membran intakter Axone diffundieren können (Richmond et al. 1994).

2.4. Anatomie und zytochemische Marker des Spinalganglions

Die Spinalganglien L4 bis L6 der Ratte enthalten jeweils etwa 12.000 bis 15.000 Zellkörper primär afferenter Neurone (Schmalbruch 1987). Diese Neurone kann man nach ihrer Morphologie in unterschiedliche Gruppen einteilen.

So gibt es die sogenannte "kleine dunkle" Population der Spinalganglienneurone mit einer Querschnittsfläche bis etwa $600 \mu\text{m}^2$. Diese sind die Zellkörper der langsam leitenden C-Fasern mit unmyelinisierten Axonen oder $A\delta$ -Fasern mit dünn myelinisierten Axonen und sind polymodale Nozizeptoren, Chemonozizeptoren oder Thermozeptoren (Michael und Priestley 1999; Lawson 2002).

Zur anderen Gruppe zählen die "mittelgroßen und großen hellen" Spinalganglienneurone mit einer Querschnittsfläche zwischen $600 - 1200 \mu\text{m}^2$ bzw. über $1200 \mu\text{m}^2$. Diese sind die Zellkörper der schnell leitenden $A\alpha$ - und $A\beta$ -Fasern mit stärker myelinisierten Axonen, welche auf niederschwellige Stimuli ansprechen und Muskel- oder Hautafferenzen sind (McMahon 1999; Lawson 2002).

Mit Hilfe immunhistochemischer oder Immunfluoreszenzfärbungen mit verschiedenen Zellmarkern kann man diese beiden großen Gruppen weiter in Subpopulationen einteilen, von denen jede bestimmte Charakteristika aufweist und definierte Aufgaben bei der Weiterleitung afferenter Impulse hat. Inwiefern sich Änderungen der zytochemischen Architektur der primären Afferenzen im Spinalganglion nach Nervenverletzung auf die Entstehung neuropathischer Schmerzen auswirken, wird im weiteren untersucht.

2.4.1. Protein gene product 9.5 - PGP 9.5

Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) ist ein Isoenzym einer Carboxyl-Hydrolase für Ubiquitin. Das Vorkommen dieses Moleküls ist im peripheren Nervensystem der Säugetiere weit verbreitet und gilt als genereller Marker für neuronale und neuroendokrine Zellen (Ma und Bisby 2000). PGP 9.5 ist sowohl in allen Axonen des peripheren Nervensystems der Ratte zu finden (Lindenlaub und Sommer 2002), als auch in allen Zellkörpern der Spinalganglienneurone der Ratte (Calzada et al. 1994). Hierbei ist zu beachten, dass sich weder umgebendes Gewebe, noch andere, nicht-neuronale Zellen mit Antikörpern gegen PGP 9.5 anfärben lassen (Li und Zhou 2001). Wegen dieser Eigenschaften werden in dieser Arbeit Spinalganglienschnitte mit Antikörpern gegen PGP 9.5 gefärbt, um die Gesamtzahl aller Neurone im Spinalganglion zu bestimmen und neuronale von nicht-neuronalen Zellen abzugrenzen, wie es auch schon in der Literatur beschrieben ist (Kerekes et al. 2000).

2.4.2. Neurofilament 200 kD (NF 200)

Die Gruppe der "großen, hellen" Spinalganglienneurone enthält verklumpte Nissl-Substanz. Der freie Raum im Zytoplasma ist mit Mikrotubuli und Neurofilament ausgefüllt. Demgegenüber besitzen die "kleinen, dunklen" Neurone eine gleichmäßig im Zytoplasma verteilte Nissl-Substanz und wenig Neurofilament (Goldstein et al. 1991). Vor allem die große Untereinheit des Neurofilaments mit einem Molekulargewicht von 200 kD ist vornehmlich in den großen Spinalganglienneuronen zu finden (Perry et al. 1991; Yoshimura et al. 1998; Ma 2002). NF 200 ist somit ein Marker für die großen Zellkörper der schnell leitenden A-Faser-Neurone, welcher schon oft zur Identifizierung dieser Ganglienzellgruppe verwendet wurde (Perry et al. 1991; Marvizon et al. 2002; Segond von Banchet et al. 2002).

2.4.3. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Isolectin B4 (IB4)

Die kleinen Spinalganglienneurone mit geringem Gehalt an NF 200 bilden die Gruppe, die vor allem für die Schmerzempfindung und –weiterleitung verantwortlich sind. Diese Neurone können histochemisch wiederum unterteilt werden in Zellen, die Calcitonin gene-related peptide (CGRP) enthalten oder Bindungsstellen für Isolectin B4 (IB4) aufweisen (Chopra et al. 2000; Ahluwalia et al. 2002).

CGRP ist ein exzitatorisches Neuropeptid, dessen Expression durch den Einfluß von Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor, NGF) von den Nervenzellen selbst synthetisiert wird, nachdem NGF an den Tyrosin-Kinase A (TrkA) Rezeptor gebunden hat (Bennett et al. 1996; Ogun-Muyiwa et al. 1999). So ist es naheliegend, dass bei den meisten CGRP enthaltenden Neuronen auch der TrkA Rezeptor nachgewiesen werden kann (Bennett et al. 1996).

Etwa 40% der Spinalganglienneurone exprimieren CGRP und die afferenten Endigungen ihrer Axone projizieren in die Lamina I und die äussere Lamina II des Hinterhorns des Rückenmarks (Coprav et al. 2001; Lu et al. 2003).

Wenn CGRP entlang des Axons in die Peripherie transportiert wird, spielt es dort eine Rolle bei der neurogenen Entzündung, da es als potenter Vasodilatator agiert und außerdem in Interaktionen mit immunkompetenten Zellen wie Makrophagen tritt (Won et al. 1998).

Ausserdem wurden auch an Rückenmarksneuronen und Spinalganglienneuronen CGRP-Rezeptoren nachgewiesen. Eine Aktivierung dieser Rezeptoren durch CGRP führt zu einer Veränderung der Transmitterfreisetzung und trägt dazu bei, dass die Erregungsschwelle für schädliche Stimuli bei diesen Neuronen herabgesetzt wird und die Entwicklung einer spinalen Übererregbarkeit gegenüber inflammatorischen Reizen gefördert wird (Hu-Tsai et al. 1996; Ohtori et al. 2001; Segond von Banchet et al. 2002).

Das Vorkommen der CGRP positiven, primär afferenten nozizeptiven Neurone (sog. peptiderge Neurone) erstreckt sich sowohl auf Muskel-, als auch auf Hautafferenzen und sie scheinen nicht einer speziellen sensorischen Modalität zugeordnet zu sein (Ambalavanar et al. 2003).

Gegenüber der peptidergen Subpopulation der kleinen nozizeptiven Spinalganglienneurone zeichnen sich die Neurone der anderen Untergruppe dadurch aus, dass sie kein CGRP enthalten, dafür aber Bindungstellen für das pflanzliche IB4 (Pflanzenspezies: *Griffonia simplicifolia*) exprimieren (Ogun-Muyiwa et al. 1999).

Diese Subpopulation der "kleinen dunklen" Neurone verliert während der postnatalen Entwicklung der Ratte durch Herabregulierung der Expression des TrkA Rezeptors die Affinität zu dem neurotrophen NGF (McMahon 1999; Zwick et al. 2002). Dafür kommt es zu einer vermehrten Expression eines anderen Tyrosin-Kinase Rezeptors, des sog. RET Rezeptors. Dieser wiederum ist ein Rezeptor für den glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), einen anderen neurotrophen Faktor (Stucky und Lewin 1999; Li und Zhou 2001).

Der Anteil IB4 positiver Neurone an allen Spinalganglienneuronen liegt etwa bei 30% und die Axone dieser Neurone enden in der inneren Lamina II des Hinterhorns des Rückenmarks (Zwick et al. 2002).

So existieren zwei unterschiedliche Subpopulationen primär afferenter nozizeptiver Neurone im Spinalganglion, die sich in ihren biochemischen und elektrophysiologischen Eigenschaften, sowie den anatomischen Regionen der Endigungen ihrer Axone unterscheiden und somit unterschiedliche Funktionen im schmerzverarbeitenden System wahrnehmen (Stucky und Lewin 1999). Die CGRP positiven Neurone spielen eine größere Rolle bei inflammatorischen Reaktionen, während die IB4 bindenden Neurone mehr bei der Entstehung des neuropathischen Schmerz beteiligt scheinen (Ogun-Muyiwa et al. 1999; Li und Zhou 2001).

Allerdings ist diese strikte Trennung in peptiderge und nicht-peptiderge nozizeptive Neurone nicht mehr ganz korrekt, da bei neueren Untersuchungen mehr Untergruppen klassifiziert wurden, u.a. Spinalganglienneurone, die sowohl IB4 Bindungsstellen exprimieren und gleichzeitig CGRP produzieren können (Petruska et al. 2000; Kashiba et al. 2001; Petruska et al. 2002).

2.4.4. Tyrosin-Kinase Rezeptoren A, B (trkA, trkB) und RET

Die Tyrosin-Kinase Rezeptoren A und B (trkA und trkB) gehören einer Familie von Rezeptoren an, die als Signal-übermittelnde Rezeptoren für verschiedene Neurotrophine dienen (Boeshore et al. 1999). Nachdem diese neurotrophen Faktoren an den jeweiligen trk Rezeptor gebunden haben, kommt es zur Autophosphorylierung des Tyrosins. Die so aktivierten Rezeptorkomplexe stimulieren intrazelluläre Mechanismen, die wiederum zu spezifischen Reaktionen führen, wie beispielsweise vermehrter Gentranskription oder Aktivierung von Ionenkanälen (Qiao und Vizzard 2002).

Der trkA Rezeptor ist ein hochaffiner Rezeptor für NGF (Bennett et al. 2000; Fukuoka et al. 2001). Unter dessen Einfluss kommt es zur Produktion von Neuropeptiden (wie CGRP) und Substanz P, sowie zu einer erhöhten Produktion eines anderen neurotrophen Faktors, den sog. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Michael et al. 1999; Fukuoka et al. 2001). Spinalganglienneurone, die den trkA Rezeptor exprimieren, sind meist positiv für CGRP und gehören somit der Gruppe der kleinen, peptidergen nozizeptiven Spinalganglienneurone an (Ogun-Muyiwa et al. 1999; Stucky und Lewin 1999).

Der trkB Rezeptor ist sowohl auf präsynaptischen primär afferenten Neuronen, als auch postsynaptisch auf Rückenmarksneuronen lokalisiert und ist die Bindungsstelle für den BDNF und Neurotrophin 4 und 5 (NT 4/5) (Kashiba et al. 1995; Shu et al. 1999). Durch BDNF aktivierte Neurone spielen unter anderem eine Rolle bei der Entstehung inflammatorischer Hyperalgesie und verstärken die Informationsübertragung nozizeptiver Stimuli vom ersten auf das zweite Neuron (Mannion et al. 1999). TrkB positive Neurone im Spinalganglion besitzen myelinisierte Axone, haben einen grossen Zelldurchmesser, sind nicht mit trkA exprimierenden Neuronen kolokalisiert und sind wahrscheinlich Mechano- und Propriozeptoren (Bennett et al. 1998; Michael et al. 1999; Kashiba et al. 2003).

Einen weiteren Rezeptor dieser Familie bildet die transmembrane Tyrosin-Kinase RET in Verbindung mit GFR α , wobei GFR α die extrazelluläre Bindungsstelle und RET die daran gekoppelte, signalübertragende Einheit des Rezeptors darstellt (Honda et al. 1999; Bennett et al. 2000; Kashiba et al. 2003). Wie unter 2.4.3. erwähnt ist dieser Komplex der Rezeptor für ein weiteres Neurotrophin, GDNF, unter dessen Einfluss auch das inhibitorische Neuropeptid Somatostatin gebildet wird (Bennett et al. 1998; Kashiba et al. 2001). GDNF ist auch für die Entwicklung der IB4-Bindungsfähigkeit dieser Zellen verantwortlich, nachdem diese die Affinität zu NGF verloren haben (Bennett et al. 1998; Bennett et al. 2000; Zwick et al. 2002).

Die genannten neurotrophen Faktoren, die zumeist von dem innervierten Gewebe gebildet und dann retrograd zum Perikarion transportiert werden, sorgen unter physiologischen Bedingungen für die Entwicklung und Differenzierung der Neurone, die ihre jeweiligen Rezeptoren exprimieren (McMahon 1999). So entstehen die beschriebenen Subpopulationen der Spinalganglienneurone, die dann unterschiedliche Aufgaben im afferenten Reizleitungssystem wahrnehmen. Unter pathophysiologischen Voraussetzungen (wie beispielsweise einer peripheren Nervenläsion) kommt es jedoch zu schwerwiegenden Veränderungen dieser Regulationsmechanismen, was wichtig für das Verständnis der Entstehung neuropathischer und entzündungsbedingter Schmerzen ist.

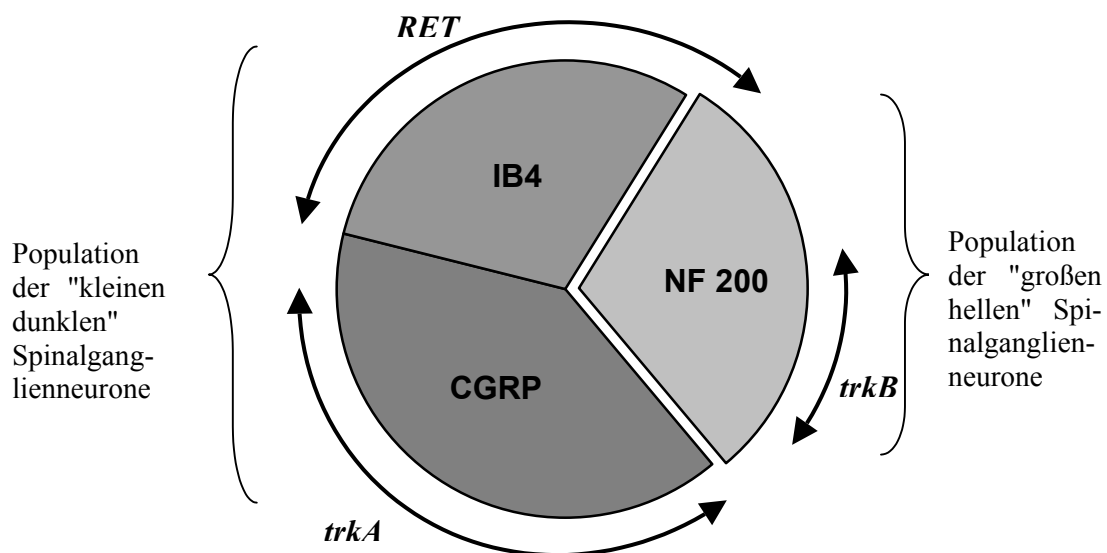


Diagramm 1: Schematische Darstellung der Verteilung der Spinalganglienneurone nach zytochemischen Merkmalen (unter physiologischen Bedingungen). Modifiziert nach McMahon und Bennett (McMahon 1999)

2.5. Die Bedeutung des Vanilloid Rezeptors 1 (VR1, TRPV1) bei der Schmerz- entstehung

Eine weitere Möglichkeit nozizeptive Neurone zu identifizieren, ist der Nachweis der Capsaicinempfindlichkeit bestimmter Spinalganglienneurone. Capsaicin ist der scharf schmeckende Inhaltsstoff des Chili-Pfeffers aus der Pflanzengattung *Capsicum annuum*. Chemisch gesehen ist Capsaicin ein Stoff aus der Gruppe der Vanilloide (N-Vanillyl-8-methyl-6-nonemamid) (Cordell und Araujo 1993). Die Capsaicin-sensitiven Zellen sind vorwiegend C- und A δ -Faser-Neurone und finden sich in großem Anteil sowohl in der peptidergen als auch in der nicht-peptidergen Gruppe der nozizeptiven, primär afferenten Neurone (Michael und Priestley 1999; Ahluwalia et al. 2002; Ma 2002). Die Aktivierung dieser Neurone bewirkt die Öffnung eines unselektiven Kationenkanals, worauf K⁺-Ionen ausströmen und Na⁺-, Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen einströmen (wobei die Affinität für Ca²⁺-Ionen deutlich höher ist) (Cesare et al. 1999) und Aktionspotentiale entstehen können (Helliwell et al. 1998; Ohtori et al. 2001). An den Nervenendigungen führt dies zu einer Freisetzung von verschiedenen Transmittern (u.a. NGF, CGRP, Substanz P und pro-inflammatorischen Zytokinen), welche in der Peripherie eine neurogene Entzündung und allergische Hypersensitivitätsreaktionen und im Hinterhorn des Rückenmarks eine nozizeptive Transmission bewirken (Sauer et al. 2001; Tognetto et al. 2001; Saade et al. 2002).

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen man menschlichen Probanden Capsaicin intradermal injizierte. Hier stellte man fest, dass sich eine Hitze- und mechanische Hyperalgesie an der Injektionsstelle entwickelte (Simone et al. 1987). Im Verlauf kam es weiter um diese Stelle zu einer sekundären mechanischen Hyperalgesie und Allodynie (Simone et al. 1991). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei verschiedenen Tierexperimenten (Hartung et al. 1989; Di Marzo et al. 2002; Walker et al. 2003). Die genauen Mechanismen für die Entstehung ektooper Aktivität und folglich von Hyperalgesie und Allodynie bei exogener Capsaicingabe sind sehr komplex und noch immer unklar, obwohl schon vielen Erklärungsansätzen nachgegangen wurde.

Bei weiterer Dosissteigerung der exogenen Capsaicinzufuhr kommt es zu einer Agonist-induzierten Konformationsänderung im Rezeptormolekül, was dazu führt, dass der Ionenkanal geschlossen bleibt (Szallasi und Blumberg 1999). Ausserdem kommt es bei

wiederholter Stimulierung durch Capsaicin zu Tachyphylaxie und bei einer langdauernden Capsaicingabe zu einer Herabregulierung der Rezeptorexpression (Hu-Tsai et al. 1996; Shu und Mendell 1999a; Szallasi und Blumberg 1999). Diese Eigenschaften kann man zur Therapie langdauernder Schmerzsymptome nutzen, indem man beispielsweise schmerzhaft Bereiche mit capsaicinhaltigen Externa behandelt (Bevan und Szolcsanyi 1990; Szallasi und Blumberg 1996).

Bei Tierversuchen und bei in-vitro Versuchen beobachtete man, dass eine hohe Capsaicingabe neurotoxisch wirkt und zum Zelltod der Capsaicin-sensitiven Neurone führt (Hu-Tsai et al. 1996). So kommt es bei neugeborenen Ratten zu einem Verlust des Großteils der kleinen Spinalganglienneurone (Jancso et al. 1977).

1997 gelang die Klonierung eines Capsaicinrezeptors, der Vanilloid Rezeptor 1 (VR1) genannt wurde, da auch andere Vanilloide (wie beispielsweise Resiniferotoxin) an diesen Rezeptor binden können (Bevan und Szolcsanyi 1990; Caterina et al. 1997; Di Marzo et al. 2002). Eine andere Bezeichnung ist TRPV1, da der VR1 enge Verbindungen mit der "transient receptor potential" (TRP)-Familie aufweist (Caterina et al. 1997; Tognetto et al. 2001).

Bei weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass der VR1 auch durch große Hitze (über 42°C) und Protonen bei Hyperazidität (pH<5,9) aktiviert werden kann (Cesare et al. 1999). Allerdings scheint es so zu sein, dass der Hitzereiz den alleinigen Stimulus zur Aktivierung des VR1 und damit zur Öffnung des Ionenkanals darstellt, wobei Vanilloide und ein niedriger pH-Wert die Schwelle soweit herabsetzen können, dass auch eine Aktivierung bei Zimmertemperatur möglich ist (Szallasi und Blumberg 1999; Ohtori et al. 2001).

Wie oben erwähnt sind VR1 positive (capsaicin-empfindliche) Neurone mit CGRP produzierenden und auch IB4-bindenden Spinalganglienneuronen kolokalisiert. Die Entwicklung dieser Neurone wiederum steht in enger Beziehung mit den neurotrophen Faktoren NGF und GDNF über ihre jeweiligen Rezeptoren (trkA und RET, vgl. 2.4.3.). Es zeigte sich, dass auch die Regulierung der VR1 Expression der Anwesenheit dieser neurotrophen Faktoren unterliegt (Winter et al. 1988; Shu und Mendell 1999a). So führt beispielsweise eine erhöhte NGF Zufuhr zu einer gesteigerten VR1 mRNA Expression, während bei NGF Knockout-Mäusen oder durch Inhibierung des trkA Rezeptors gegenteilige Effekte erzielt wurden (Shu und Mendell 1999a; Winston et al. 2001; Di Marzo

et al. 2002). Genauso konnte gezeigt werden, dass die Umstellung in der Affinität von NGF zu GDNF primär afferenter Neurone in der Postnatalphase der Ratte in der gleichen Weise bei der VR1 Expression nachweisbar ist (Abfall der VR1-Assoziation mit trkA bei gleichzeitigem Anstieg der Koexpression mit RET) (Guo et al. 2001). Dies führt zu der Vermutung, dass neben NGF (bei peptidergen Neuronen) auch GDNF (bei nicht-peptidergen Neuronen) an der VR1 Regulation beteiligt ist (Ogun-Muyiwa et al. 1999).

2.6. Pathophysiologische Rolle von Zytokinen bei neuropathischen Schmerzen

2.6.1. Interleukin 10 (IL-10)

Interleukin 10 (IL-10) ist ein überwiegend anti-inflammatorisches Zytokin, welches hauptsächlich von Zellen der monozytären Zelllinie (v.a. Makrophagen und Monozyten), sowie von T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen produziert wird (Fiorentino et al. 1991).

Zytokine sind chemische Botenstoffe, die vergleichbar mit Hormonen in geringer Konzentration wirksam sind. Obwohl sie auch mittels Blutplasma oder innerhalb anderer Strukturen transportiert werden können, bleibt ihr Wirkungsbereich hauptsächlich auf die nähere Umgebung ihres Bildungsorts begrenzt. Während man zuerst dachte, dass Zytokine lediglich Transmitterstoffe für die Zell-Zell Kommunikation des Immunsystems sind, fand man später heraus, dass auch andere Zellen, die nicht dem Immunsystem angehören (z.B. Neurone), Zytokinrezeptoren besitzen, bzw. Zytokine produzieren können (Bartfai und Schultzberg 1993).

Anti-inflammatorische Zytokine haben die Aufgabe, die Immunantwort auf entzündliche Reize zu minimieren. IL-10 bewirkt dies auf indirektem Weg, so hat es u.a. negativen Einfluss auf die antigenpräsentierende Eigenschaft der Monozyten und Makrophagen, es kann die MHC II Expression auf Makrophagen reduzieren, frühzeitig die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie z.B. TNF- α , IL-1 β und IL-6 auf mRNA-Ebene supprimieren, sowie zahlreiche andere pro-inflammatorische Vorgänge gegensinnig beeinflussen (Bogdan et al. 1991; Fiorentino et al. 1991; Bogdan et al. 1992; Marie et al. 1996; Kanaan et al. 1998).

In den letzten Jahren wurde erkannt, dass Zytokine als wichtige Mediatoren der Zellkommunikation auch bei der Reaktion auf periphere Nervenläsionen eine Schlüsselrolle einnehmen. Sie beeinflussen die Entstehung entzündlicher Reaktionen nach Nervenverletzung und die Regeneration bzw. Degeneration betroffener Zellen und wirken somit auch auf das resultierende Schmerzempfinden (George et al. 2000; Plunkett et al. 2001). So ist beispielsweise exogen zugeführtes IL-10 in der Lage, Hyperalgesie und Allodynie nach peripherer Nervenläsion zu verringern (Poole et al. 1995; Wagner et al. 1998; Okamoto et al. 2001). Dies ist vorwiegend auf die oben angesprochene Fähigkeit des IL-10 zurückzuführen, die Produktion anderer pro-inflammatorischer Zytokine und deren Signalkaskaden zu inhibieren, weswegen IL-10 auch als „cytokine synthesis inhibitory factor“ bekannt ist (Moore et al. 1990; Wagner et al. 1998; Kim et al. 2002).

Die neuroimmune anti-inflammatorische und anti-hyperalgesierende Wirkung von IL-10 nach peripherer Nervenläsion ist durch einige Studien belegt, wobei diese Erkenntnisse meist durch Verhaltenstestung gewonnen wurden (Kanaan et al. 1998; Wagner et al. 1998; Okamoto et al. 2001) oder durch den Nachweis erhöhter IL-10 Plasmaspiegel oder veränderte IL-10 mRNA Konzentrationen in Schwann-Zellen und im Endoneurium (Jander et al. 1996; George et al. 2000; Taskinen et al. 2000; Plunkett et al. 2001; Winkelstein et al. 2001). Dagegen gibt es nur sehr wenige Daten über die IL-10 Konzentrationen (bzw. über deren Veränderungen nach peripherer Nervenläsion) im Spinalganglion, dem Sitz der Zellkörper der primär afferenten Neurone. Dies soll im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen weiter untersucht werden.

2.6.2. Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α)

Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) gehört wie IL-10 zur Gruppe der Zytokine, allerdings wird TNF- α in die Untergruppe der Zytokine mit pro-inflammatorischen Eigenschaften eingeteilt.

Seinen Namen und seine vergleichsweise frühe Entdeckung verdankt TNF- α der Beobachtung, dass bakteriell infizierte Tumormassen in einigen Fällen nekrotisch wurden und einen Regress zeigten. Man vermutete damals, dass die Bakterien eine Substanz sezernierten, die für diese Tumoren zytotoxisch wirken. Bei genauerer Untersuchung stellte sich allerdings heraus, dass diese Substanz (die Tumor-Nekrose-Faktor genannt wurde) ein körpereigener Stoff war, welcher durch den antigenen Reiz des Lipopolysac-

charids der Bakterien vermehrt sezerniert wurde und so zytotoxisch auf die Tumorzellen wirken konnte. Weitere Forschung zeigte, dass TNF- α mit dem Protein Cachectin identisch ist, von dem man schon vorher wusste, dass es für die katabole Stoffwechsellage und die Fieberentstehung bei Krebspatienten mitverantwortlich ist (Beutler et al. 1985; MacEwan 2002a).

Heute ist TNF- α biochemisch isoliert und steht an der Spitze einer Superfamilie von Zytokinen mit etwa 20 verschiedenen homologen Substanzen (Gruss und Dower 1995; MacEwan 2002a). TNF- α wird von Makrophagen, Monozyten, B- und T-Lymphozyten, Fibroblasten und Schwann-Zellen produziert (Griffin et al. 1993; Wagner und Myers 1996b; Schuerwegh et al. 2003). Es wird als 26 kDa transmembranes Protein exprimiert und kann mittels einer Metalloprotease in die 17 kDa lösliche Form konvertiert werden. Dieses lösliche TNF- α in trimerischer Form ist der Ligand für zwei transmembrane Glycoproteinrezeptoren, die TNF-Rezeptor 1 und 2 genannt werden (TNFR1 bzw. TNFR2). Diese werden nach Quervernetzung dreier Rezeptormoleküle durch TNF- α aktiviert und starten so die intrazelluläre Signalkaskade (MacEwan 2002b). Es konnten auf fast allen Körperzellen TNF-Rezeptoren nachgewiesen werden, welche dann im aktivierten Zustand entsprechende biochemische Prozesse in Gang setzen (Beutler et al. 1985; Ryffel und Mihatsch 1993; Baker und Reddy 1998).

So wirkt TNF- α in Zellen des Immunsystems pro-inflammatorisch über eine gesteigerte IL-1 und IL-6 Bildung (Monozyten), einen Anstieg der Antikörperbildung (B-Zellen) und eine vermehrte Produktion von Interferon γ und IL-2 (T-Zellen) (Homma et al. 2002; Schuerwegh et al. 2003). Im ZNS wird über eine Stimulation der Prostaglandin E₂-Synthese Fieber induziert. Weiterhin werden Osteoklasten und Fibroblasten aktiviert und in der Leber die Bildung von Akute-Phasen-Proteinen initiiert (Perlmutter et al. 1986; Burger 2000; Davidson et al. 2001). Der TNFR1 besitzt ausserdem eine sogenannte „death domain“, die zur Apoptose und Nekrose der betreffenden Zelle führt. Andere Signalstrukturen bewirken hingegen auch eine gesteigerte Proliferation oder Differenzierung der Zellen (Shubayev und Myers 2001; MacEwan 2002a).

TNF- α ist an der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen beteiligt, wobei die entzündungsstimulierenden Wirkungen des TNF- α bei der rheumatoiden Arthritis und den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sicherlich die bekanntesten sind. Allerdings hat es auch pathogenetische Bedeutung bei Multipler Sklerose, Guillain-Barré-

Syndrom, septischem Schock, zerebraler Manifestation der Malaria, chronisch obstruktiven Lungenerkrankungen und vielen Krankheitsbildern mehr (Sharief et al. 1993; Chung 2001; Gimenez et al. 2003; Hollifield et al. 2003).

In den letzten Jahren konnte auch eine Bedeutung von Zytokinen, insbesondere von TNF- α , bei der Generierung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen belegt werden. So wurden bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen und nach Nervenverletzung im Tierversuch erhöhte TNF- α Spiegel im umgebenden Gewebe und im Plasma festgestellt (Wells et al. 1992; George et al. 1999; Empl et al. 2001).

Bei Unterbrechung der Kontinuität eines peripheren Nervens kommt es zur Wallerschen Degeneration mit endoneuralem Ödem, erhöhter vaskulärer Permeabilität, Proliferation von Schwann- und Endothelzellen und Demyelinisierung von Axonen. Das zur gleichen Zeit vermehrt freigesetzte TNF- α ist an diesem Prozess wahrscheinlich maßgebend beteiligt (Sommer und Schäfers 1998; George et al. 1999; Taskinen et al. 2000; Shubayev und Myers 2002b).

Genauso erzeugt die Applikation von exogenem TNF- α auf ein Spinalganglion, auf den Nervus ischiadicus oder subkutane Injektion von TNF- α ektope Aktivität in nozizeptiven A δ - und C-Fasern und führt zu Hyperalgesie und Allodynie (Wagner und Myers 1996a; Sorkin et al. 1997; Junger und Sorkin 2000; Liu et al. 2000a). In der gleichen Weise resultiert ein verstärktes Schmerzempfinden und eine verminderte Reizschwelle für thermische und mechanische Stimuli, wenn TNF- α intraplantar injiziert oder auf ein Spinalganglion appliziert wird (Cunha et al. 1992; Perkins und Kelly 1994; Homma et al. 2002; Liu et al. 2002). Eine Hochregulation der Expression der TNF-Rezeptoren im Spinalganglion sechs Stunden nach Nervenverletzung weist auch auf eine Bedeutung von TNF- α in der frühen Phase der Entstehung von neuropathischen Schmerzen hin (Schäfers et al. 2003c).

Antikörper gegen TNFR1, TNF- α -Rezeptor Fusionsproteine (wie Etanercept) sowie Thalidomid, ein TNF- α Inhibitor, können die Entstehung neuropathischer Schmerzen vermindern (Sommer et al. 1998a; George et al. 2000; Schäfers et al. 2001; Sommer et al. 2001).

Insgesamt kann man es also als erwiesen betrachten, dass TNF- α eine bedeutende Rolle bei der Generierung ektope Aktivität spielt und somit zur Entwicklung von Hyperalgesie und Allodynie führen kann. Dabei wird davon ausgegangen, dass im lädierten Ner-

ven wirksamer TNF- α aus Schwann-Zellen freigesetzt wird (Griffin et al. 1993; Wagner und Myers 1996b). Über die Rolle von TNF- α in den Spinalganglienneuronen selbst ist wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher der Frage nachgegangen werden, wie sich die Expression von TNF- α in den Spinalganglien nach einer inkompletten Nervenläsion verändert. Es sollte insbesondere untersucht werden, ob von einer solchen Änderung der Expression nur geschädigte Neurone oder auch benachbarte, ungeschädigte Neurone betroffen sind, und ob bestimmte Subpopulationen von Neuronen vermehrt betroffen sind.

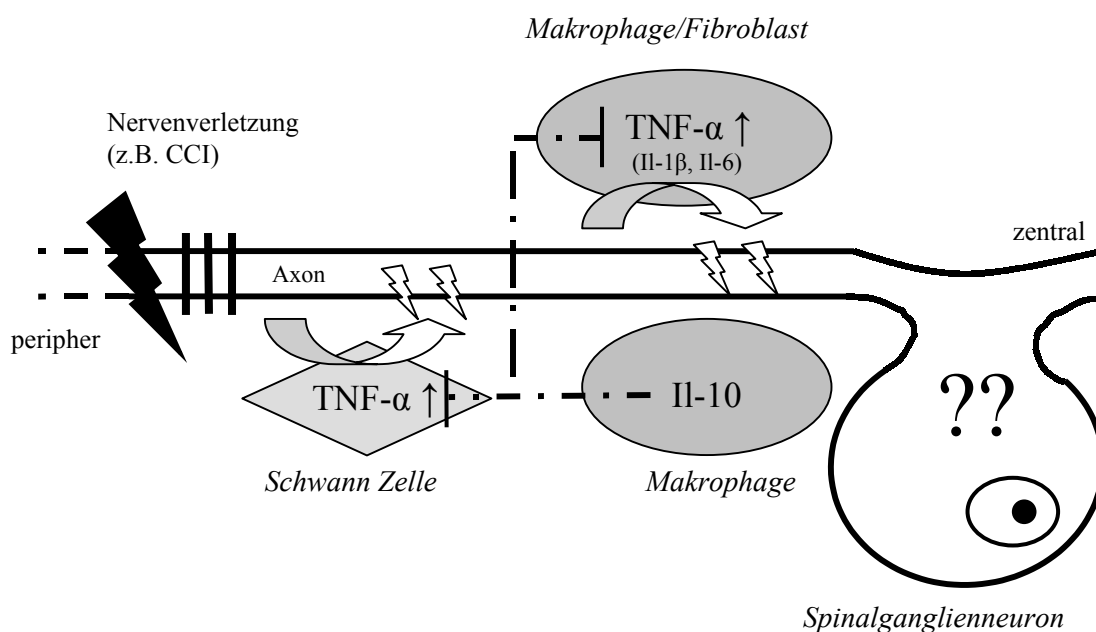




Diagramm 2: Stark vereinfachte, schematische Darstellung der gegensätzlichen Wirkungen von TNF- α und IL-10 bei peripherer Nervenläsion

TNF- α ↑: gesteigerte Produktion von TNF- α

: gesteigerte Sekretion von TNF- α

: Wirkung von TNF- α (endoneurales Ödem, erhöhte vaskuläre Permeabilität, Proliferation von Schwann- und Endothelzellen, Demyelinisierung)

: Blockierende Wirkung von IL-10 auf die Produktion der proinflammatorischen Zytokine (v.a. TNF- α)

?? : Unklare Rolle der Spinalganglienneurone in diesem Zusammenhang

weitere Einzelheiten: s. Text

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. Versuchstiere

Für die durchgeführten Experimente wurden 36 weibliche Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann GmbH, Borcheln), die ein Alter von etwa 8 Wochen und ein Gewicht von 220 bis 280 g aufwiesen, verwendet.

Die Tiere wurden in Plexiglaskäfigen in Gruppen zu viert oder fünft bei einem hell:dunkel-Zyklus von 12:12 Stunden gehalten. Trockenfutter und Wasser waren ad libitum vorhanden.

Die Tierversuche wurden durch die Regierung von Unterfranken zugelassen (Genehmigungen vom 14.08.1998 und 31.10.2000).

3.2. Modell der Chronic Constriction Injury (CCI)

Diejenigen Tiere, die eine Operation nach dem Modell der CCI und/oder eine intraneurale Injektion von Fluorogold oder Fluororuby bekamen, wurden durch eine intraperitoneale Injektion von 50 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital (Narcoren®, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) in tiefe Narkose versetzt.

Diejenigen Tiere, die eine intradermale oder intramuskuläre Injektion von Fluorogold erhielten, wurden durch Diethylether (Merck, Darmstadt, Deutschland) narkotisiert.

Anschließend erfolgte die Operation der Chronic Constriction Injury nach Bennett und Xie (Bennett und Xie 1988) in einer Variation nach Sommer und Myers (Sommer et al. 1993). Der Nervus ischiadicus wurde auf der rechten Seite mittels stumpfer Durchtrennung des Musculus biceps femoris unter lichtmikroskopischer Sicht eines WILD M3B Mikroskops (Leica, Bensheim, Deutschland) freigelegt und proximal der Trifurkation auf einer Länge von ca. 15 mm freipräpariert. Im mittleren Abschnitt des freiliegenden Nervens wurden drei Ligaturen aus chromiertem Catgut 4.0 (Ethicon, Norderstedt, Deutschland) im Abstand von etwa 1 mm angelegt. Diese wurden jeweils nur so fest angezogen, dass der Nerv leicht eingeschnürt und ein leichtes Zucken der entsprechenden Extremität zu beobachten war. Durch diese Prozedur wird der Blutfluss der superficialen epineuralen Gefäße um ca. 50% eingeschränkt, aber nicht völlig gestoppt (Myers et al. 1991; Sasaki et al. 1997). Der Wundverschluss erfolgte in anatomischen Schichten

(Muskelnaht: Seide Silkam® 4.0, Aesculap AG & Co, Tuttlingen, Deutschland; Haut: Klammern, APPOSE ULC, Tyco Healthcare, Norwalk, USA).

Auf eine Scheinoperation der kontralateralen Seite konnte verzichtet werden, da keine Verhaltenstestung durchgeführt wurde und für die Kontrollgruppen eigene Tiere eingesetzt wurden. Bei diesen Tieren wurde auf derselben Seite der Nervus ischiadicus freigelegt, allerdings keine CCI angelegt, sondern entsprechend der Versuchsgruppe lediglich Fluorogold und Fluororuby intraneural injiziert.

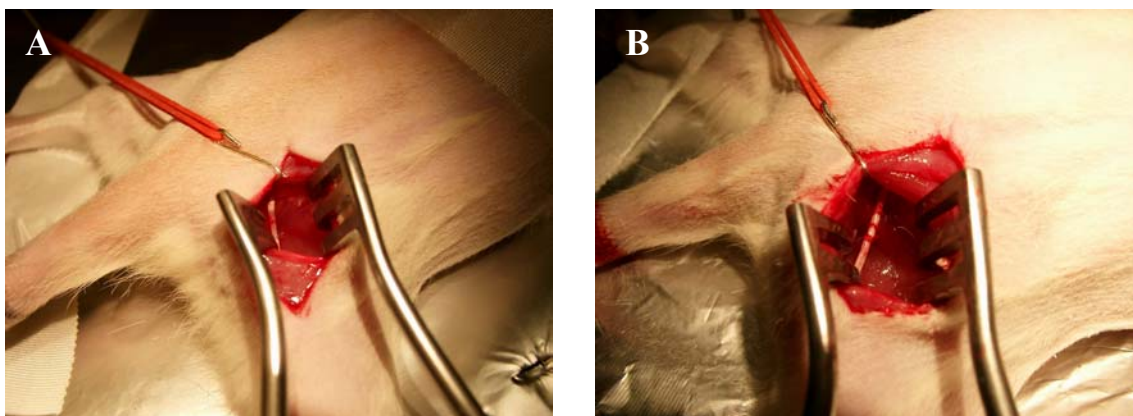


Abbildung 1: Modell der Chronic Constriction Injury (CCI)

A: freipräparierter Nervus ischiadicus

B: Nervus ischiadicus nach Anlegen der drei locker angezogenen Ligaturen

3.3. Gewebeentnahme und Präparation

Nach der Überlebenszeit von 4 Tagen wurden die Tiere wiederum in Pentobarbitalnarkose anästhesiert und anschließend getötet.

Daraufhin wurden die Spinalganglien L4 und L5 beidseits sowie das Rückenmark (Höhe L3 bis L5 in drei, den Segmenten entsprechenden Teilen) entnommen.

Das Gewebe wurde in kleinen Einbetttschälchen (Cryomold®, Miles Inc., Elkhart, USA) mit Tissue Tek® O.C.T. Compound (Sakura, Zoeterwonde, Niederlande) eingebettet und in 2-Methylbutan (Carl-Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland), was in flüssigen Stickstoff abgekühlt wurde, eingefroren. Die Lagerung bis zur Verarbeitung erfolgte bei -80 C° .

Zur histologischen Weiterverarbeitung wurden im Kryostaten (Leica CM 3050 S, Bensheim, Deutschland) von den Spinalganglien L4 bzw. L5 (je nach Versuchsgruppe) 10 µm dicke Querschnitte angefertigt. Diese Gewebeschnitte wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern (SuperFrost®Plus, Menzel-Gläser, Deutschland) aufgebracht und bei Raumtemperatur 30 Minuten getrocknet.

3.4. Fluorogold (FG) und Fluororuby (FR)

Zur Differenzierung zwischen intakten und durch die CCI geschädigten Neuronen wurden die retrograden Tracer Fluorogold (FG) und Fluororuby (FR) beim CCI Modell der Ratte eingesetzt. Durch deren unterschiedliche Eigenschaften und Verabreichungsarten ist es möglich, am Schnittbild eines Spinalganglions Neurone zu identifizieren, deren Axon von der Nervenläsion unbeeinträchtigt blieb, sowie Neurone, deren Axon durch die CCI beschädigt wurde.

3.4.1. Intraneurale Injektion von FG

Diese Form der Verabreichung wurde gewählt, um möglichst alle afferenten Nervenfasern, die in dem entsprechenden Nerven verlaufen, mit FG anzufärben. Dazu wurden jeweils 5 µl der FG Lösung mit einer Hamilton-Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) und 30 G Kanüle in den Nervus ischiadicus injiziert. Bei Tieren mit CCI Nervenläsion wurde das FG unmittelbar nach der CCI im Abstand von 3-4 mm distal der letzten Ligatur injiziert. Bei den Kontrolltieren ohne CCI wurde dieselbe Menge FG an der gleichen Stelle des Nervus ischiadicus injiziert (vgl. Abb. 2).

Bei CCI-Tieren wird das FG nur in denjenigen Fasern transportiert, die nicht von der CCI beschädigt wurden (Ma und Bisby 1998b). Beschädigte Axone können das distal der Verletzung injizierte FG nicht zu den entsprechenden Somata der Ganglienzellen transportieren, sodass davon ausgegangen werden kann, dass alle mit FG angefärbten Zellkörper im Spinalganglion unbeschädigt sind und von der CCI nicht betroffene Axone besitzen.

Die intraneurale Injektion selbst führt nur zu einer unwesentlichen Schädigung der im Nerv verlaufenden Axone, sodass dieser Nerv als intakt betrachtet werden kann (Puigdellivol-Sanchez et al. 2002).

3.4.2. Intramuskuläre Injektion von FG

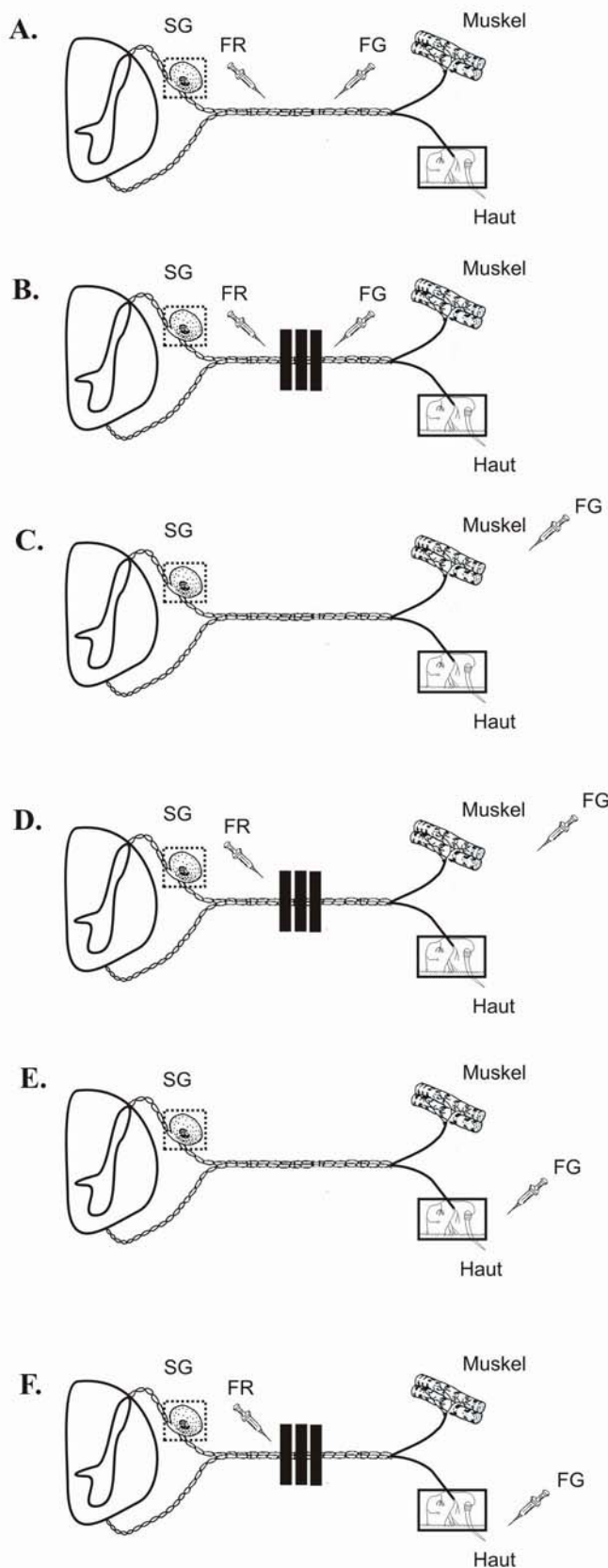
In einer anderen Versuchsgruppe wurde FG intramuskulär in den Musculus gastrocnemius injiziert, um im Spinalganglion die entsprechenden Muskelafferenzen identifizieren zu können. Wie vielfach beschrieben ist intramuskulär verabreichtes FG in der Lage, von den Nervenendigungen aufgenommen und retrograd zum Spinalganglion transportiert zu werden (Kitamura und Richmond 1994; Richmond et al. 1994; Gomez-Ramirez et al. 1999). Gemäß diesem Modell wurden bei CCI Tieren wie bei Kontrolltieren jeweils 20 µl gelöstes FG mit dem gleichen Instrumentarium in den rechten Musculus gastrocnemius injiziert (vgl. Abb. 2).

3.4.3. Intradermale Injektion von FG

In einer dritten Versuchsgruppe wurden 20 µl gelöstes FG intradermal im Bereich der Phalangen II, III und IV der Plantarseite der rechten Hinterpfote der Tiere injiziert (vgl. Abb. 2), um im Spinalganglion die Afferenzen aus diesem Hautareal darzustellen. Die Zellkerne der Axone aus diesem Dermatome befinden sich hauptsächlich im ipsilateralen Spinalganglion L4, welche auch für die weitergehenden Untersuchungen herangezogen wurden (Prats-Galino et al. 1999).

3.4.4. Intranurale Injektion von FR

Um die Neurone im Spinalganglion nachzuweisen, deren Axone nach einer CCI geschädigt sind, wurden 5 µl gelöstes FR mit einer Hamilton Spritze und einer 30 G Nadel in den Nervus ischiadicus injiziert (vgl. Abb. 2). Bei Tieren mit einer CCI Nervenläsion wurde FR unmittelbar nach Anlegen der CCI 3-4 mm proximal der ersten Ligatur injiziert. Bei den Kontrolltieren ohne CCI wurde FR nur bei denjenigen Tieren verabreicht, die auch eine intraneurale FG Injektion bekamen (FR Injektion 10 mm proximal der FG Injektion). Bei diesen Tieren (ohne CCI-induzierte Nervenschädigung) stellte sich gemäß den Erwartungen kein FR in den Spinalganglien dar. Deswegen wurde bei Kontrolltieren, die lediglich eine intramuskuläre oder intradermale FG Injektion erhielten, auf eine Behandlung mit FR verzichtet.

**Abbildung 2:**

Schematische Darstellung der FG und FR Verabreichung in den einzelnen Gruppen des Hauptversuchs

A+B: Gruppe 1

FG und FR intraneural injiziert; FR ca. 10 mm proximal von FG

A: Kontrolle

B: CCI (3 schwarze Balken)

FR-Injektion: 3-4 mm proximal der CCI

FG-Injektion: 3-4 mm distal der CCI

C+D: Gruppe 2

FG intramuskulär injiziert; FR intraneural, nur bei CCI-Tieren, 3-4 mm proximal der CCI

C: Kontrolle

D: CCI

E+F: Gruppe 3

FG intradermal injiziert; FR intraneural, nur bei CCI-Tieren, 3-4 mm proximal der CCI

E: Kontrolle

F: CCI

A-F: 4 Tage nach Injektion Entfernung der ipsilateralen Spinalganglien (SG) L4 und L5 bei jedem Versuchstier

(Schäfers et al. 2003a)

3.5. Immunfluoreszenzfärbungen

Das Wirkungsprinzip der Immunfluoreszenzfärbungen basiert wie bei der Immunhistochemie darauf, dass hochgereinigte, exogen zugeführte Antikörper spezielle Antigene im untersuchten Gewebe erkennen und diese gebundenen Antikörper mittels an Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Sekundäntikörpern im Mikroskop sichtbar gemacht werden.

Der große Vorteil dieser Methode gegenüber der Immunhistochemie mit entsprechendem Chromogen besteht darin, dass Doppelimmunfluoreszenzen mit zwei verschiedenen Primäntikörpern aus verschiedenen Tierspezies angelegt werden können (Wessendorf und Elde 1985; Czaja 2000). Durch geeignete Wahl von Sekundäntikörpern, an die wiederum verschiedene Farbstoffe gekoppelt sind, können zwei unterschiedliche Antigene auf dem gleichen Gewebsschnitt mit zwei verschiedenen Farben sichtbar gemacht werden. So konnten bei diesen Experimenten u.a. IB4 und VR1, sowie IL-10 und PGP 9.5 Doppelimmunfluoreszenzen angelegt werden. Diese Möglichkeit spart Gewebematerial und bietet Gelegenheit, beide Färbungen an demselben Schnitt zu vergleichen.

3.5.1. Färbeprotokoll

Die Gefrierschnitte wurden aufgetaut und ca. 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Die Fixierung erfolgte für 10 Minuten in 100% Aceton bei -20°C . Anschließend wurden die Präparate 5 Minuten auf einer Heizplatte bei 40°C getrocknet. Die weiterfolgenden Schritte fanden in der feuchten Kammer statt.

Die Schnitte wurden mit einer Lösung von 10% BSA (Rinderserumalbumin) in PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7,4; 0,1 M) 30 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Diese Proteinlösung verhindert eine spätere unspezifische Hintergrundanfärbung: die Primäntikörper (Proteine) können an stark geladenen Bindegewebelementen adsorbiert werden. Der nachfolgend zugegebene Sekundäntikörper bindet auch an diese Primäntikörper und das Ergebnis sind falsch positive Anfärbungen. Durch die Zugabe einer Proteinlösung vor dem Primäntikörper werden diese elektrisch geladenen Stellen besetzt und eine Adsorption des Antikörpers verhindert.

Das BSA wurde danach vorsichtig abgeklopft und der erste Antikörper aufgetragen.

Tabelle 1: In den Versuchen verwendete Antikörper (AK) mit Ursprungsspezies (Host), Verdünnung (Konz.) und zugehörigem Sekundärantikörper (Sek. AK)

AK	Host	Konz.	Sek. Ak	Konz. Sek. AK	Farbe
TNF-α	Rabbit	1:100	Cy-3	1:100	rot
VR1	Rabbit	1:500	Cy-3	1:100	rot
IL-10	Mouse	1:20	Cy-2	1:100	grün
IB4	BS-I from Bandeiraea simplificifolia	1:100	ExtrAvidin	1:200	grün
CGRP	Rabbit	1:250	Cy-3	1:100	rot
PGP 9.5	Rabbit	1:500	Cy-3	1:100	rot
TrkA	Rabbit	1:100	Cy-3	1:100	rot
TrkB	Rabbit	1:100	Cy-3	1:100	rot
RET (C-19)	Rabbit	1:100	Cy-3	1:100	rot
NF 200	Rabbit	1:100	Cy-3	1:100	rot

TNF- α , polyclonal: Serotec Ltd.; Oxford, UK

VR1, polyclonal: Affinity Bioreagents, Inc.; Golden, CO, USA

IL-10, monoclonal: Pharmingen; San Diego, CA, USA

IB4, BS-I Isolectin B4: Sigma Chemicals Company; St. Louis, MO, USA

CGRP, polyclonal: Peninsula Laboratories, Inc.; San Carlos, CA, USA

PGP 9.5, polyclonal: UltraClone Limited; Weelaw Isle of Wight, UK

TrkA, polyclonal: Chemicon International; Temecula, CA, USA

TrkB, polyclonal: Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, CA, USA

Ret (C-19), polyclonal: Santa Cruz Biotechnology, Inc.; Santa Cruz, CA, USA

NF 200, polyclonal: Sigma Chemicals Company; St. Louis, CA, USA

CyTM2: Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

CyTM3: Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

ExtrAvidin®-FITC Conjugate: Sigma Chemicals Company; St. Louis, MO, USA

Alle Antikörper wurden zuvor in o.g. Konzentration verdünnt; als Puffer diente 1% BSA in PBS, außer bei folgenden Ausnahmen:

- TrkA Immunfluoreszenz-Puffer: 1% BSA in PBS + 0,3% Triton
- IB4 Immunfluoreszenz-Puffer: 1000ml PBS + 1000µl Triton + 14,6 mg CaCl² + 20,8 mg MgCl²

Die Präparate wurden dann mit dem ersten Antikörper über Nacht (ca. 18h) bei -4°C inkubiert. Darauf folgend wurden die Schnitte 3 mal mit PBS gewaschen und der zweite, entsprechend verdünnte Antikörper aufgetragen. Die Präparate blieben dann 2 Stunden mit diesem Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert, bevor sie wiederum 3-mal mit PBS gewaschen wurden. Anschließend wurden die Schnitte mit DABCO (25 ml PBS; 75 ml Glycerol ~87%; 2,5 g DABCO = 1,4 Diazabicyclo [2.2.2.]octan) eingedeckt.

Folgende Besonderheiten waren bei den Färbungen zu beachten:

1. Die CGRP Immunofluoreszenz bedurfte einer speziellen Vorbehandlung: Die Präparate wurden erst 5 Minuten mit 4% PFA, anschließend jeweils 2 Minuten mit 50% Aceton, 100% Aceton und wieder 50% Aceton fixiert. Danach wurden sie 2-mal mit PBS gewaschen und das o.g. Procedere schloss sich mit dem Blocken der Schnitte mit 10% BSA in PBS an.
2. Isolectin B4 ist kein Antikörper, sondern ein Lectin aus der Pflanzenspezies *Bandeiraea simplicifolia*, womit Lectinbindungsstellen dargestellt werden können. Das praktische Vorgehen bei der Färbung entspricht dem o.g. Schema mit dem erwähnten Verdünnungspuffer, allerdings liegt eine andere chemische Reaktion zugrunde. Das verwendete Isolectin B4 ist mit Biotin gekoppelt, was mit dem ExtrAvidin® nach der Avidin-Biotin-Methode reagiert. Die freien Stellen des

tetrameren Glycoproteins Avidin des Sekundärantikörpers ermöglichen die Bindung des Biotins. Avidin besitzt eine starke Affinität für diese Bindung, was der Grund für die hohe Spezifität dieser Methode ist. Das Avidin des Sekundärantikörpers ist wiederum mit fluoreszierendem Isothiocyanat (FITC) gekoppelt, was bei einer Absorption bei einer Wellenlänge von 495 nm im Fluoreszenzmikroskop eine grüne Farbe erscheinen lässt.

3.5.2. Verfahrenskontrolle

Um unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers mit den Gewebsschnitten auszuschließen, wurde bei jeder Färbereihe für einen Kontrollschnitt der Primärantikörper gegen 10%-iges BFA ausgetauscht. Keine der Kontrollen wies eine positive Anfärbung auf, sodass eine Kreuzreaktion des zweiten Antikörpers mit dem Gewebe ausgeschlossen werden konnte.

Weiterhin wurde im Fall von TNF- α und IL-10 die Spezifität des ersten Antikörpers durch das Verfahren der Präabsorption mit dem Antigen nachgewiesen. Dazu wurden die jeweiligen verdünnten Antiseren mit dem entsprechenden Antigen (Rekombinantes rat TNF- α , bzw. IL-10, beides R&D Systems, Deutschland) in 10fachem Überschuss bei 4°C über Nacht inkubiert. Danach wurden die Proben für eine Stunde zentrifugiert und mit den Überständen eine Immunfluoreszenzfärbung (wie oben beschrieben) durchgeführt. Genauso wie bei den Kontrollen durch Weglassen des Primärantikörpers zeigte sich auch hier keine Anfärbung, so dass die Spezifität des Antikörpers für das zugehörige Antigen nachgewiesen ist.

3.6. Aufbau der Versuchsgruppen

Tabelle 2: Versuchsaufbau mit Gruppeneinteilung (1-3: FG intraneural i.n., intramuskulär i.m. und intradermal i.d.) und Anzahl der Versuchstiere für jede Untergruppe

Gruppe	Operation	FG	FR	Anzahl
1	CCI, re.	3%, 5µl, i.n.	5%, 5µl, i.n.	n = 6
	--	3%, 5µl, i.n.	5%, 5µl, i.n.	n = 5
2	CCI, re.	3%, 20µl, i.m.	5%, 5µl, i.n.	n = 3
	--	3%, 20µl, i.m.	--	n = 3
3	CCI, re.	3%, 20µl, i.d.	5%, 5µl, i.n.	n = 3
	--	3%, 20µl, i.d.	--	n = 4

3.7. Quantitative Analyse

Für die quantitativen Analysen wurden bei allen Versuchstieren Gewebeschnitte aus dem rechten Spinalganglion L4 ausgewertet, für die semiquantitativen Auswertungen der weitergehenden Untersuchungen wurden Gewebsschnitte aus dem rechten Spinalganglion L5 verwendet. Diese Ganglien enthalten den Grossteil der Afferenzen aus dem Nervus ischiadicus (neben den Ganglien L3 und L6) (Swett et al. 1991). Hier werden auch die Veränderungen der Zytokinexpression und der Morphologie der Spinalganglienneurone nach CCI erwartet. Das Schnittmaterial der Versuchstiere war zahlenkodiert. Somit erfolgte die Auswertung erfolgte streng standardisiert unter verblindeten Konditionen, um subjektive Beurteilungsfehler zu vermeiden. Außerdem erfolgten alle Auswertungen durch den gleichen Untersucher an demselben Fluoreszenzmikroskop unter gleichen Bedingungen.

Unmittelbar nach dem Schneiden der Ganglien wurden alle Gewebsschnitte mittels der relevanten Fluoreszenzfilter für FG und FR unter einem Fluoreszenzmikroskop Axiophot 2 (Carl-Zeiss Jena GmbH, Jena, Deutschland) in 100facher Vergrößerung darge-

stellt. Mit Hilfe des Morphologieprogramms Image-Pro Plus Version 4.0 (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, USA) wurden alle Schnitte digitalisiert und gespeichert. Für die Immunfluoreszenzfärbungen wiederholte sich dieses Vorgehen.

Tabelle 3: Exzitationsmaxima der zur Darstellung der FG/FR Anfärbung und der Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Fluoreszenzfilter

	Exzitationsmaximum	Farbe
FG	365 nm	weiß-bläulich
Cy-2, FITC	450-490 nm	grün
Cy-3, FR	546 nm	rot

Für die Serienschnitte, die FG oder FR Anfärbung zeigen, und jede Immunfluoreszenz (TNF- α , IL-10, VR1, IB4, CGRP und PGP 9.5) wurde jeder 10. Schnitt des Ganglions (um Doppelzählungen einzelner Zellen zu vermeiden (Garrett et al. 1991; Chopra et al. 2000; Puigdellivol-Sanchez et al. 2002)) mit Hilfe des Computerprogramms Image Pro-Plus quantitativ analysiert. Dazu wurde jeweils eine Farbintensität und eine Kontrasteinstellung als Schwellenwert festgelegt und jede Zelle mit sichtbarem Nukleus, die eine Farbintensität oberhalb dieses Wertes zeigte, als positiv gewertet. Für diese Zellen wurden die Anzahl und die Querschnittsfläche bestimmt und die Ergebnisse in Diagramme übertragen, die dann die Relation zwischen Fläche und Anzahl der positiven Zellen darstellen. Durch spezielle Filtermechanismen im Image Pro-Plus Programm und durch manuelle Bearbeitung jedes Schnittes konnte gewährleistet werden, dass korrekt angefärbte Spinalganglienneurone von umgebendem, immunreaktivem Gewebe getrennt und diese artifiziellen Veränderungen von der Analyse ausgeschlossen werden. Dieselben Maßnahmen wurden ergriffen, um dicht beieinander liegende Neurone getrennt in die Auswertung zu übernehmen, die vom Computerprogramm nur als Einheit erkannt wurden (vgl. Abbildung 3).

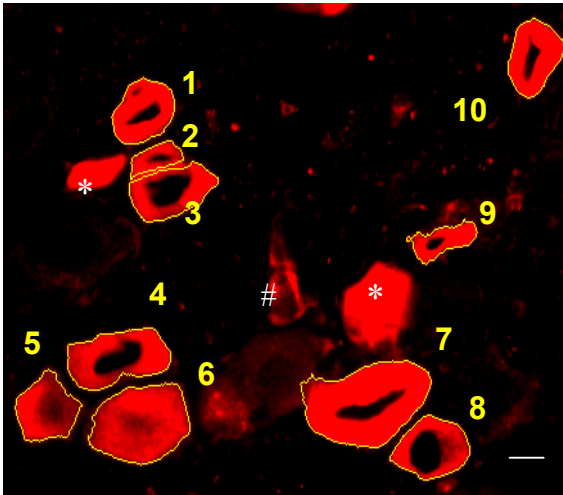


Abbildung 3:

Auswertung eines Spinalganglienschnitts am Beispiel einer VR1 Immunfluoreszenz:

1-10: Anzahl und Querschnittsfläche der gelb umrandeten Neurone werden bestimmt

*: Neurone ohne Nukleus gehen nicht in die Auswertung ein

#: Artefakte werden von der Auswertung ausgeschlossen

Maßstab: 5 μ m

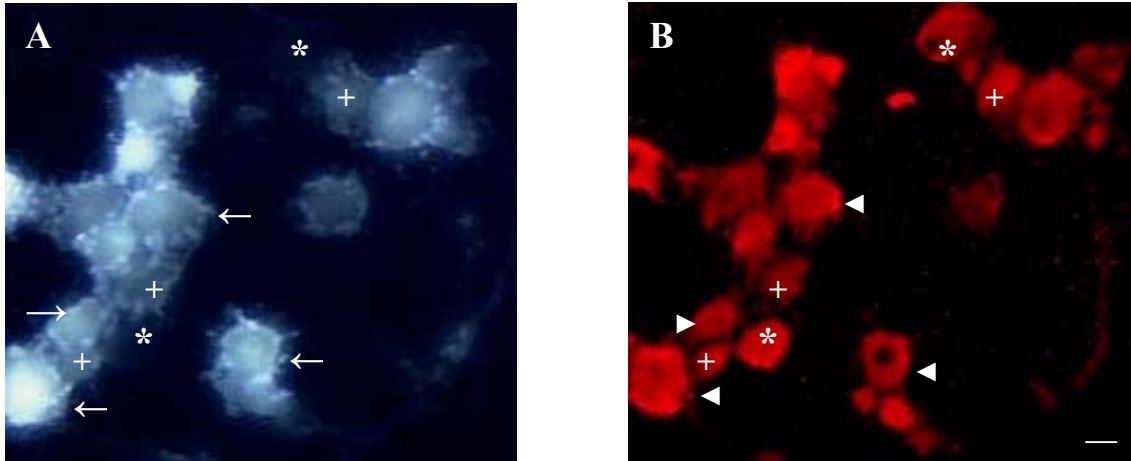
(Schäfers et al. 2003a)

Die Anzahl aller Zellkörper im Ganglion wurde durch die Auszählung aller PGP 9.5 positiven Zellen bestimmt (vgl. Abschnitt 2.4.1.).

Da FG angefärbte Zellen eine ausgeprägte Fluoreszenz aufweisen (sog. „Halo-Effekt“ (Ichikawa und Sugimoto 2000)) strahlten diese so über die Zellgrenzen hinaus, dass die Messung der realen Zellgröße auch mit den Filtermechanismen des Image Pro-Plus Bildbearbeitungsprogramms nicht möglich war. So war es notwendig, alle gemessenen Werte der Querschnittsfläche von FG positiven Zellen mit einem Korrekturfaktor von 0,9 zu multiplizieren. Dieser Korrekturfaktor wurde durch den Vergleich der Querschnittsflächen gleicher Zellen desselben Schnitts mit FG und PGP 9.5 Anfärbung bestimmt.

**Abbildung 4: "Halo-Effekt" und fehlende Diffusion von FG in Nachbarzellen;
Maßstab: 15 μ m**

1. FG gefärbte Neurone (A) und PGP 9.5 Immunfluoreszenz (B) am gleichen Spinalganglienschnitt. Deutlich ist das Überstrahlen der FG positiven Zellen über die Zellgrenzen hinaus zu sehen (dünne Pfeile). Durch multiplizieren mit dem Korrekturfaktor wird eine Angleichung an die korrekte Zellgröße (PGP 9.5 positive Neurone, Pfeilköpfe) erreicht.
2. FG aus angefärbten Zellen diffundiert nicht in Nachbarzellen: Klar sind benachbarte FG positive (+) und FG negative (aber PGP 9.5 positive (*)) Zellen auszumachen.



Um weitere Aussagen über die gesunden und geschädigten Neurone treffen zu können, wurden die digitalisierten Bilder der Schnitte mit den einzelnen Immunfluoreszfärbungen mit den entsprechenden Bildern der gleichen Schnitte, die lediglich FG und/oder FR enthalten, mit Hilfe von Image Pro-Plus übereinandergelegt. Dann wurden die Neurone, die eine Doppelfärbung der Fluoreszenzfärbung und eines Farbstoffs zeigen, nach dem beschriebenen Muster ausgewertet und in Diagrammen zusammengefasst.

Außerdem wurden an einem CCI-Tier und einem Kontrolltier noch zusätzlich semi-quantitativ ausgewertet, ob und in welchem Maße TNF- α positive Neurone noch andere Zellmarker exprimieren. Dazu wurden von den rechten L5 Ganglien jeder 2. Schnitt nach TNF- α und die dazwischenliegenden nach verschiedenen anderen Zellmarkern (TrkA, TrkB, RET, VR1 und NF 200), bzw. der gleiche, TNF- α Immunreaktivität zeigende Schnitt, nach IB4 gefärbt. Anschließend wurden wieder alle Schnitte digitalisiert und die TNF- α angefärbten Zellen auf Kolo-kalisation mit anderen Zellmarkern der entsprechenden Neurone der Nachbarschnitte verglichen.

3.8. Statistische Auswertung

Die Messwerte der einzelnen Gruppen wurden jeweils untereinander mit dem one-way Anova und nachgeschaltetem Fisher's post hoc Test verglichen (Programm Stat View 5.0). Unterschiede wurden ab einem p-Wert $< 0,05$ als statistisch signifikant betrachtet. Anschließend wurden alle Daten als Mittelwert \pm Standardfehler in Diagrammen und Tabellen dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Auswertung der Einzelfärbungen

4.1.1. PGP 9.5

Um die Gesamtanzahl der Zellkörper in einem Spinalganglion zu ermitteln, wurde von allen Versuchstieren eine Schnittserie nach PGP 9.5 gefärbt und ausgezählt. Entsprechend den Erwartungen zeigt sich sowohl bei den CCI-Tieren, als auch bei den Kontrolltieren eine Anfärbung aller Spinalganglienzellen ohne Unterschiede hinsichtlich der Farbintensität oder anderer morphologischer Kriterien.

Für beide Versuchsgruppen ergibt sich ein fast identischer Mittelwert und Größenverteilung der Spinalganglienneurone, was bedeutet, dass die untersuchten Ganglien beider Versuchsgruppen annähernd die gleiche Anzahl von Neuronen mit gleicher Größenverteilung enthalten. Deshalb kann im Folgenden der Vergleich positiver Neurone anderer Färbungen dieser Versuchsgruppen auch in Diagrammen mit Zahlenwerten vollzogen werden. Prozentangaben beziehen sich jedoch immer auf die Anzahl PGP 9.5 positiver Zellen.

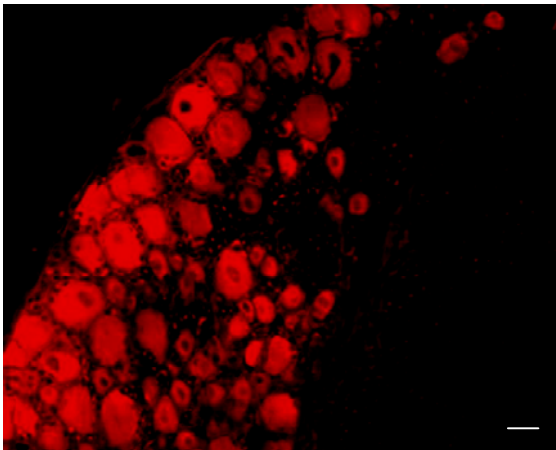


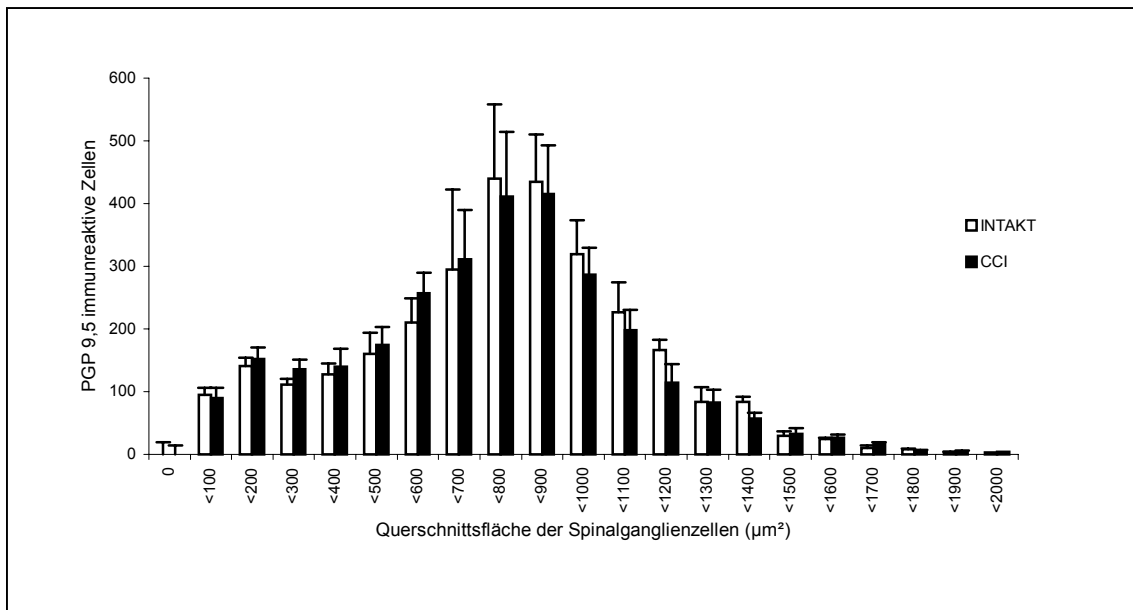
Abbildung 5:

PGP 9.5 Immunfluoreszenz

Anfärbung aller Spinalganglienzellen

Maßstab: 20 µm

Diagramm 3: Häufigkeits- und Größenverteilung PGP 9.5 pos. Neurone vor und 4 Tage nach CCI; Nahezu identischer Kurvenverlauf



4.1.2. TNF- α

Die TNF- α Immunreaktivität präsentiert sich unter dem Fluoreszenzmikroskop als deutlich intrazellulär gelegene Anfärbung. Die Abgrenzung zum nur schwach gefärbten Umgebungsgewebe ist durch die klare Darstellung der Zellgrenzen ohne weiteres möglich.

Bei den nicht operierten Kontrolltieren zeigt sich TNF- α Immunreaktivität vornehmlich in den meisten kleinen Neuronen im Ganglion (Schnittfläche $< 600 \mu\text{m}^2$). Insgesamt erweisen sich $45 \pm 3,5 \%$ aller Spinalganglienneurone als TNF- α positiv.

Nach CCI kommt es zu einem statistisch signifikanten Anstieg ($p < 0,0005$) der TNF- α Expression im Spinalganglion: $70 \pm 3,3 \%$ aller Neurone zeigen TNF- α spezifische Anfärbung (vgl. Tabelle 4). Dabei bleibt die Immunreaktivität der kleinen Zellen wie bei den Kontrolltieren erhalten, aber zusätzlich weisen vor allem mittelgroße Ganglienzellen (Schnittfläche $600-1200 \mu\text{m}^2$) eine signifikante Erhöhung in der TNF- α Immunreaktivität auf.

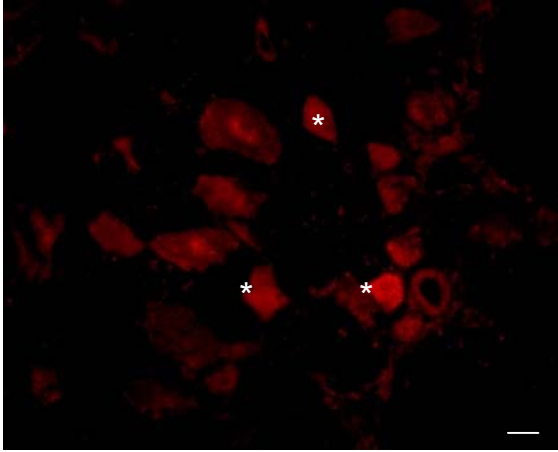


Abbildung 6:

TNF- α Immunfluoreszenz
Maßstab: 10 μ m

Abb.: 6a:

Kontrolle; Anfärbung v.a. kleiner
 Ganglienzellen (*)

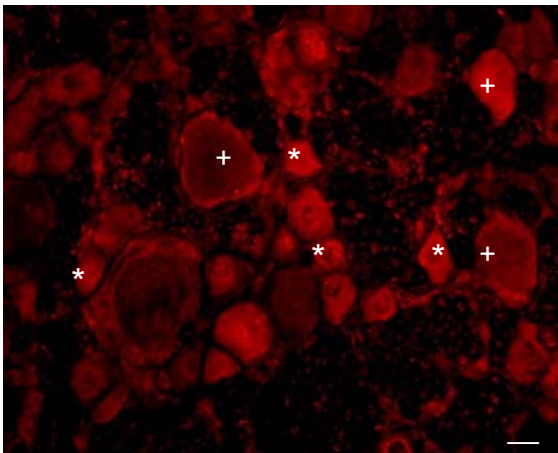
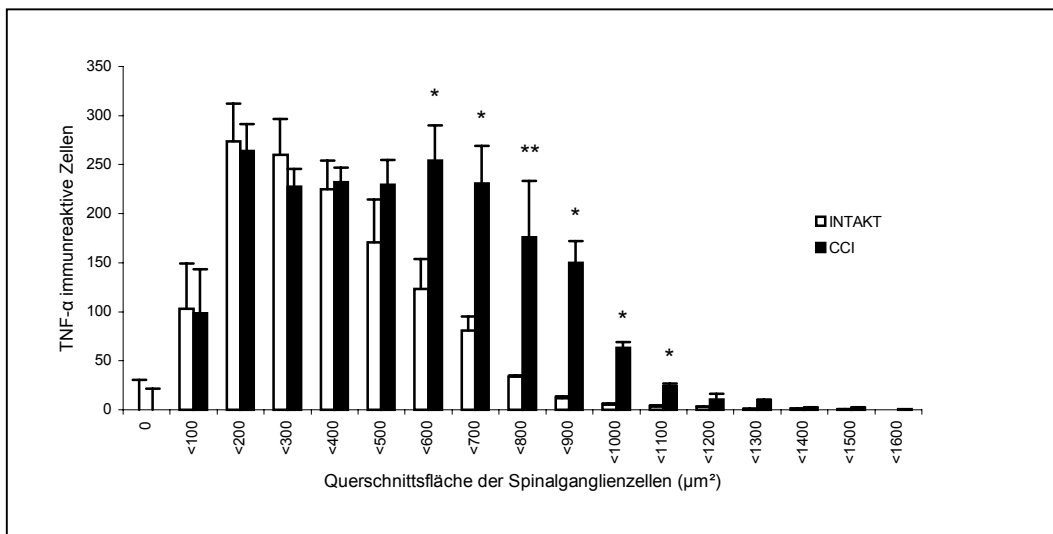


Abb.: 6b:

CCI; deutlich mehr und v.a. größe-
 re Neurone (+) angefärbt

Diagramm 4: Häufigkeits- und Größenverteilung TNF- α pos. Neurone vor und nach CCI;
 Statistisch signifikanter Anstieg mittelgroßer Spinalganglienzellen nach CCI
 (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$)



4.1.3. IL-10

Bei der IL-10 Färbung weist auch ein kleiner Teil des umgebenden Bindegewebes eine Grünfärbung auf, welches aber ohne weiteres von den Zellkörpern abzugrenzen ist und von der Auswertung ausgeschlossen bleibt.

Die IL-10 Immunfluoreszenz ist sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den CCI-Tieren zumeist in den kleinen Neuronen (Schnittfläche $200\text{-}700\ \mu\text{m}^2$) präsent. Dabei kommt es nach CCI zu einer statistisch signifikanten Abnahme ($p < 0,005$) der IL-10 Expression in diesem Größenbereich. Bei Tieren ohne Schädigung des Nervus ischiadicus sind $46 \pm 5,8\%$ aller Spinalganglienneurone IL-10 positiv, bei Tieren mit CCI $27 \pm 4,1\%$ (vgl. Tabelle 4).

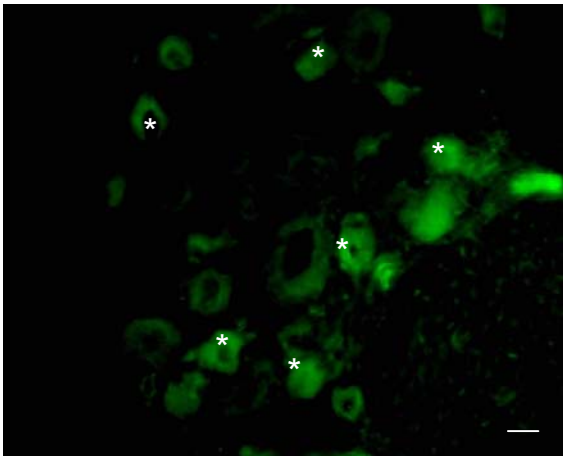


Abbildung 7:

IL-10 Immunfluoreszenz
Maßstab: 10 μm

Abb.: 7a:

Kontrolle; Anfärbung v.a. kleiner
Ganglienzellen (*)

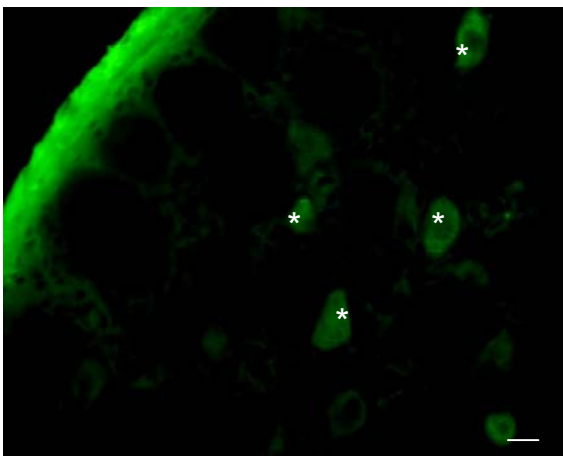
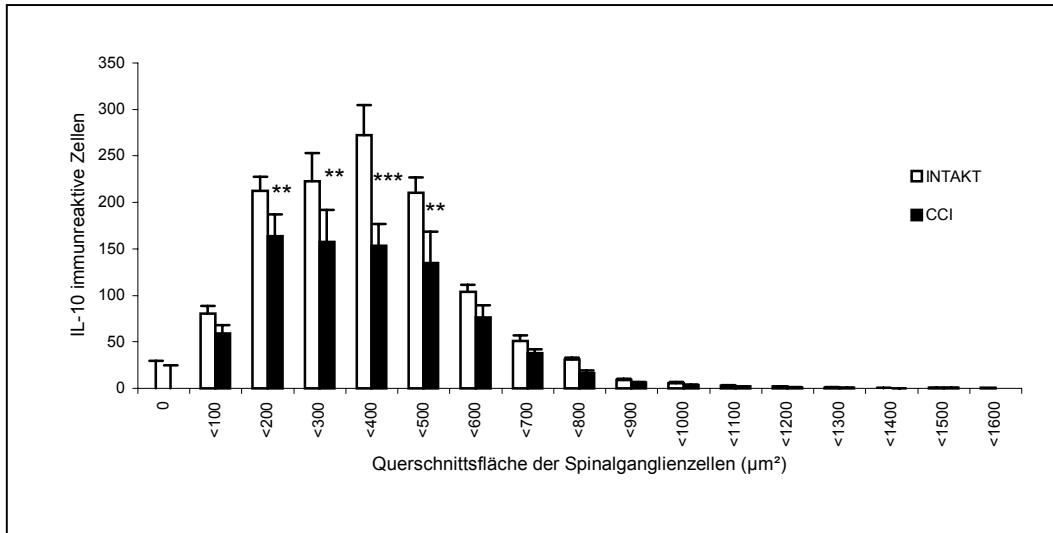


Abb.: 7b:

CCI; Abnahme IL-10 immunreak-
tiver Zellen, aber keine Änderung
der Größenordnung der positiven
Neurone

Diagramm 5: Häufigkeits- und Größenverteilung IL-10 pos. Neurone vor und nach CCI; Statistisch signifikante Abnahme im Bereich kleiner Spinalganglienzellen nach CCI (**: $p < 0,005$; ***: $p < 0,0005$)



4.1.4. VR1

Mittels der VR1 Immunfluoreszenzfärbung lässt sich eine klar intrazellulär gelegene Immunreaktivität erzielen, wobei die Zellgrenzen der VR1 positiven Neurone deutlich auszumachen sind und der Nukleus nicht angefärbt wird.

Wie die IL-10 positiven Ganglienzellen weisen auch die VR1-immunreaktiven Neurone eine Verteilung v.a. im Bereich der kleinen Spinalganglienneurone (Schnittfläche 100 – 800 μm^2) auf. Bei den Kontrolltieren erscheinen $44 \pm 5,5$ % aller Ganglienneurone als VR1 positiv. Demgegenüber sind nur $28 \pm 5,0$ % aller Spinalganglienneurone der Tiere mit CCI nach VR1 angefärbt (vgl. Tabelle 4). Diese Abnahme der VR1 Immunreaktivität zeigt sich statistisch signifikant bei Neuronen mit einer Querschnittsfläche zwischen 300 μm^2 und 700 μm^2 ($p < 0,05$ bis $p < 0,0005$).

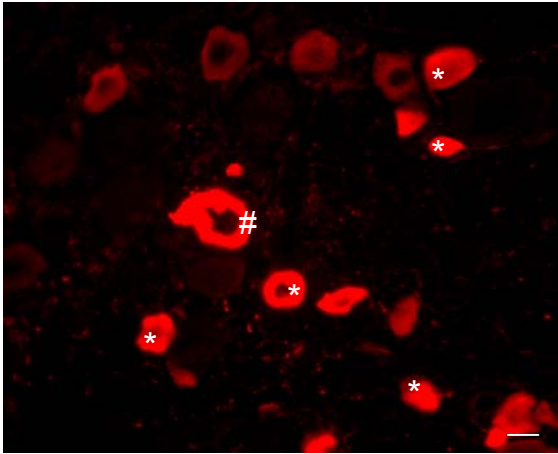


Abbildung 8:

VR1 Immunfluoreszenz
Maßstab: 10 μm

Abb.: 8a:

Kontrolle; klare Anfärbung kleiner Ganglienzellen(*); Artefakte (#) von Auswertung ausgenommen

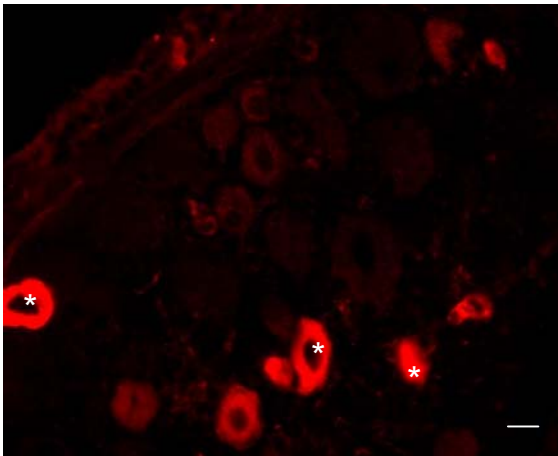
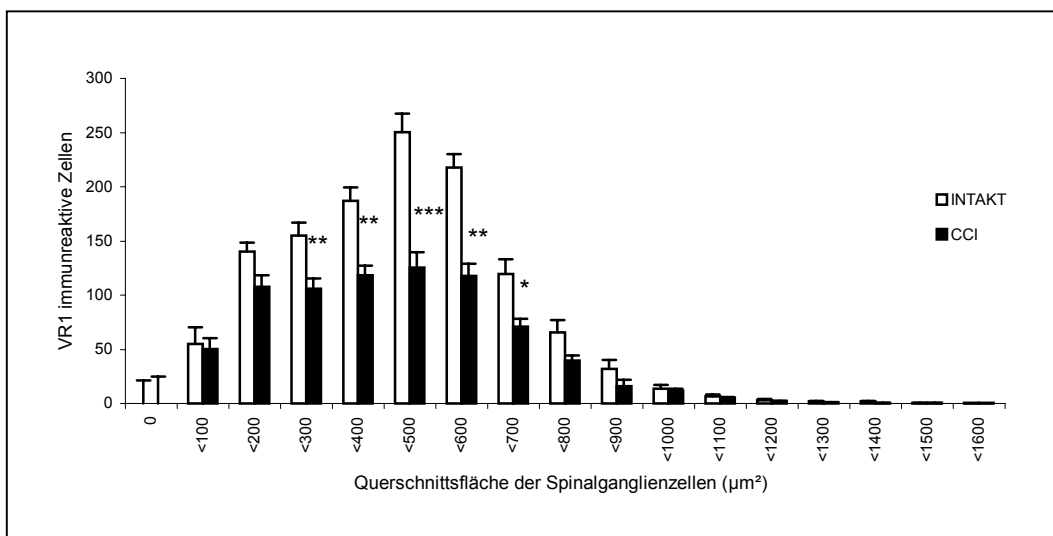


Abb.: 8b:

CCI; deutliche Abnahme VR1 immunreaktiver Zellen

Diagramm 6: Häufigkeits- und Größenverteilung VR1 pos. Neurone vor und nach CCI; Statistisch signifikante Abnahme im Bereich kleiner Spinalganglienzellen nach CCI (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$; ***: $p < 0,0005$)



4.1.5. IB4

Die IB4 Bindung zeigt sich als Anfärbung der Zellmembran und intrazellulär gelegener Granula der IB4 positiven Neurone. Neben Ganglienzellen zeigen im Spinalganglion auch einige kleinere, ringförmige Strukturen (wahrscheinlich Satellitenzellen und Astrozyten) eine Anfärbung von IB4 Bindungsstellen. Da sich die vorliegende Arbeit auf die IB4 Bindung von DRG Neuronen fokussierte, wurden diese Elemente nicht in die Auswertung miteinbezogen.

Die Gruppe der IB4 bindenden Neurone befindet sich größtenteils ebenfalls im Spektrum der Spinalganglienneurone mit kleiner Querschnittsfläche. So besitzen die meisten IB4 bindenden Ganglienzellen eine Fläche von weniger als $700\mu\text{m}^2$, wenn auch einige Zellen größere Werte aufweisen. Nach CCI kommt es in diesem Bereich zu einer statistisch signifikanten Abnahme ($p < 0,005$) der IB4 positiven Zellen von $51 \pm 2,5\%$ zu $36 \pm 2,9\%$ aller Neurone im Spinalganglion (vgl. Tabelle 4).

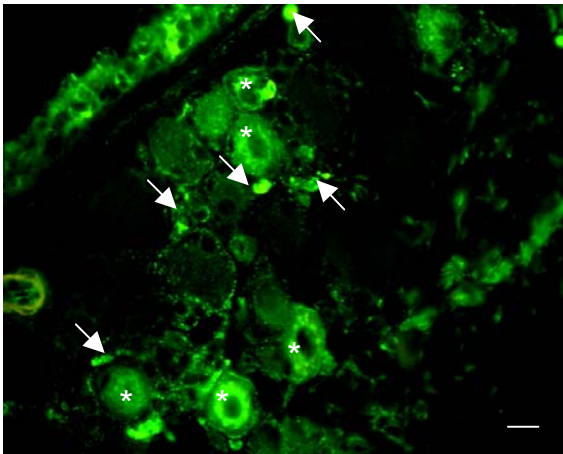


Abbildung 9:

IB4 Immunfluoreszenz
Maßstab: 10 μm

Abb.: 9a:

Kontrolle; grüne Anfärbung kleiner Ganglienzellen (*); Pfeile zeigen auf Satellitenzellen, welche nicht in die Auswertung eingehen

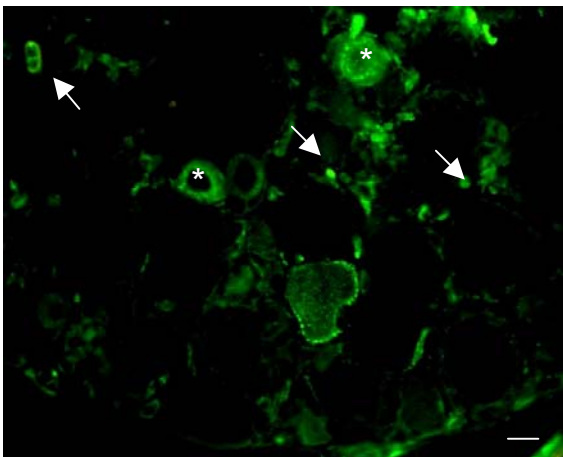
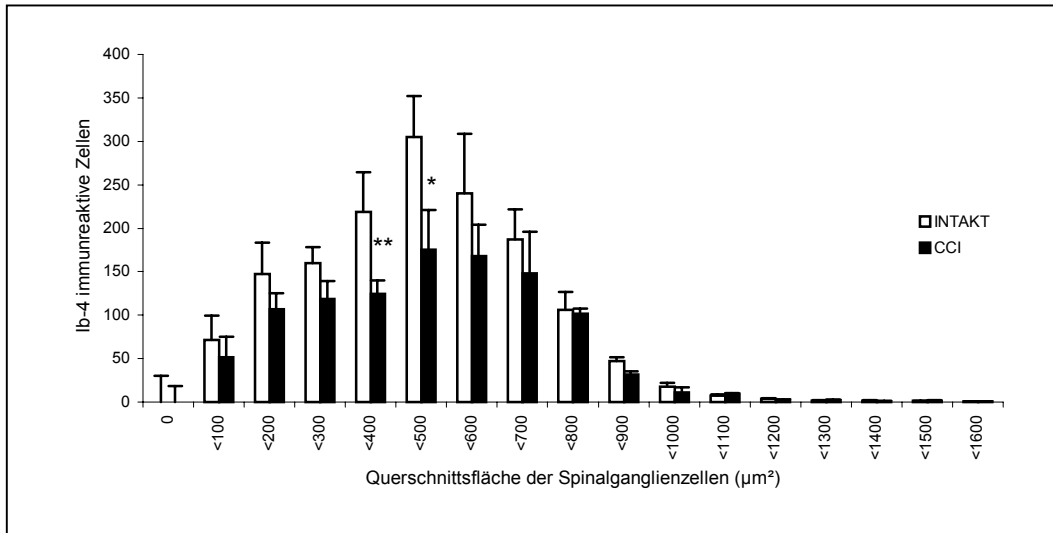


Abb.: 9b:

CCI; Abnahme IB4 bindender Spinalganglienneurone; keine Veränderung der Zellgrößen

Diagramm 7: Häufigkeits- und Größenverteilung IB4 bindender Neurone vor und nach CCI;
 Abnahme im Bereich kleiner Spinalganglienzellen nach CCI; statistisch signifikant in den Untergruppen der Neurone mit Querschnittsfläche von 300 bis 500 μm^2 (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,005$)



4.1.6. CGRP

Die CGRP Immunfluoreszenz erscheint als kräftige Anfärbung des Zytoplasmas, wodurch eine klare Abgrenzung zu CGRP negativen Neuronen mit lediglich unspezifisch schwacher Anfärbung erreicht wird.

CGRP positive Neurone sind sowohl ein Teil des Spektrums kleiner (Schnittfläche $< 600 \mu\text{m}^2$), als auch mittelgroßer (Schnittfläche $600 - 1200 \mu\text{m}^2$) Ganglienzellen. Nach CCI ändert sich weder die Anzahl noch die Größenverteilung CGRP immunreaktiver Ganglienzellen: $40 \pm 6,2$ % aller Spinalganglienneurone sind CGRP positiv bei den Kontrolltieren, $43 \pm 7,3$ % nach CCI (vgl. Tabelle 4).

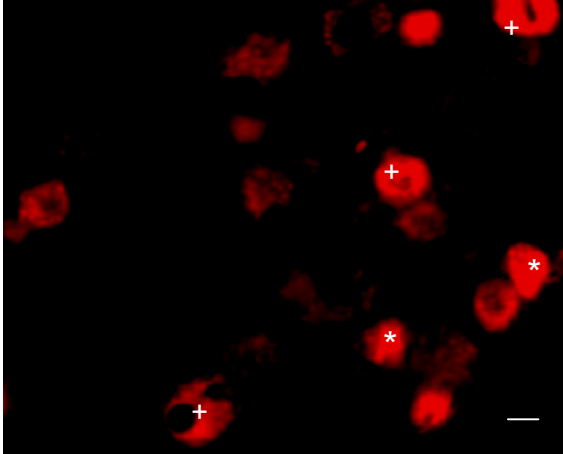


Abbildung 10:

CGRP Immunfluoreszenz
Maßstab: 10 µm

Abb.: 10a:

Kontrolle; kleine (*) und mittelgroße (+) Spinalganglienneurone sind angefärbt

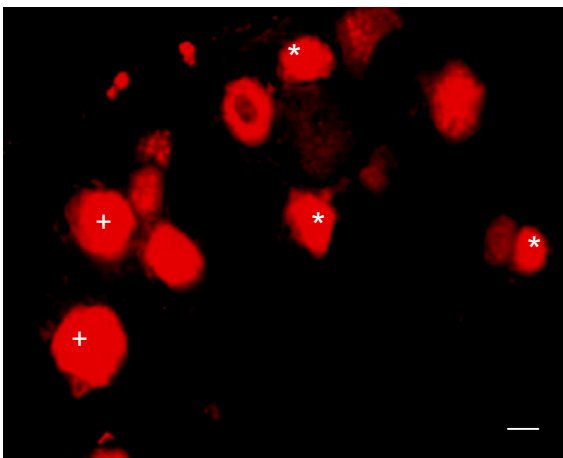


Abb.: 10b:

CCI; unverändertes Bild im Vergleich zur Kontrolle in Bezug auf Anzahl und Größe CGRP positiver Zellen

Diagramm 8: Häufigkeits- und Größenverteilung CGRP pos. Neurone vor und nach CCI; Keine signifikante Veränderung der Zellzahl oder der Zellgrößen nach CCI

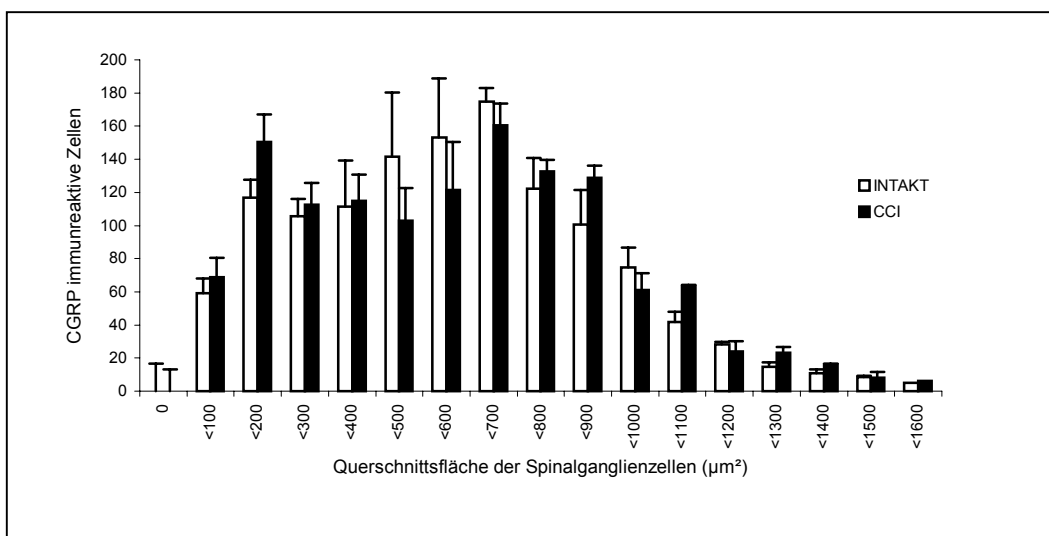


Tabelle 4: Zusammenfassung der TNF- α , IL-10, VR1, IB4 und CGRP Expression im Spinalganglion bei Versuchsgruppen mit und ohne CCI. Alle Werte beziehen sich auf den Prozentanteil an den jeweiligen PGP 9.5 positiven Neuronen (entspricht Anteil an allen Spinalganglienneuronen, vgl. oben). Die letzte Zeile zeigt das Verhältnis von CCI- zu Kontrollgruppen für jede Immunfluoreszenz. Statistisch signifikante Veränderungen werden für die Gesamtexpression von TNF- α , IL-10 und IB4 erreicht (**: $p < 0,005$; ***: $p < 0,0005$).

	TNF- α	IL-10	VR1	IB4	CGRP
Intakt % PGP	45 +/- 3,5	46 +/- 5,8	44 +/- 5,5	51 +/- 2,5	40 +/- 6,2
CCI % PGP	70 +/- 3,3	27 +/- 4,1	28 +/- 5,0	36 +/- 2,9	43 +/- 7,3
CCI/Intakt	1,55***	0,58**	0,64	0,71**	1,08

4.1.7. Fluorogold

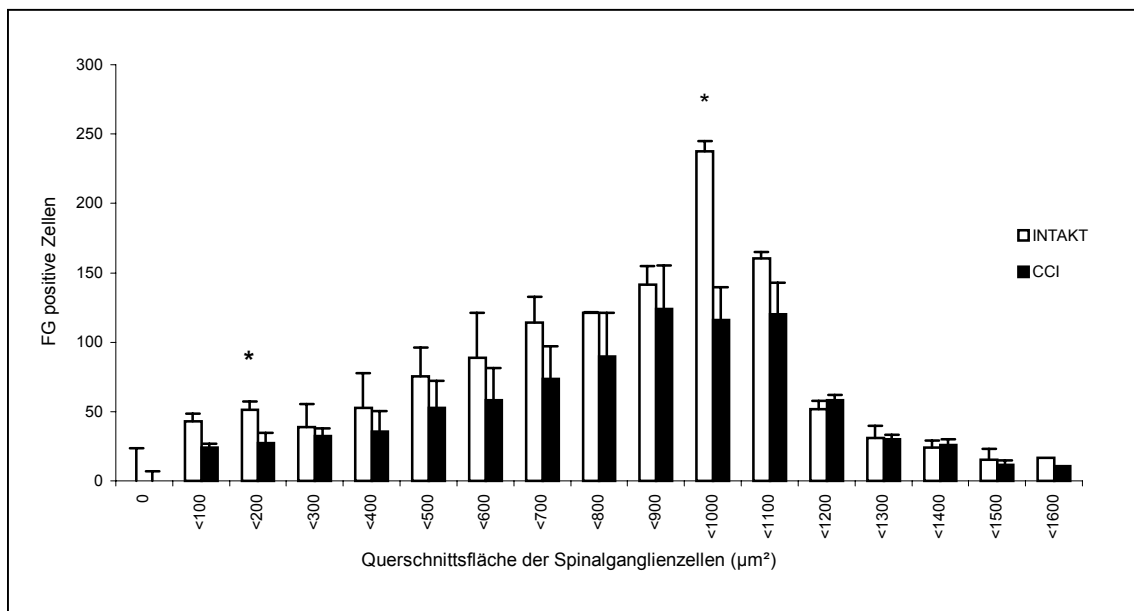
Die retrograde Anfärbung der unbeschädigten Ganglienzellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluorogold ist in allen untersuchten Ganglien auszumachen. Das Spektrum der dabei angefärbten Neurone erstreckt sich über sämtliche im Ganglion vorhandenen Zellgrößen, mit einem Maximum im Bereich der mittelgroßen bis großen Neurone, was auch gut mit der Größenverteilung der PGP 9.5 positiven Zellen übereinstimmt (vgl. Diagramm 9). Dies zeigt, dass FG zwar nicht alle Zellen im Ganglion erreicht, dafür aber eine Population von Zellen, die einen repräsentativen Ausschnitt aller Ganglienzellen darstellt. Kleinere Zellen zeigen eher eine kräftige, helle Anfärbung, demgegenüber weisen große FG positive Neurone ein etwas blasser erscheinendes Zytoplasma auf.

Erwartungsgemäß findet man nach der intraneuralen Injektionsform die meisten FG angefärbten Neurone im Ganglion (Durchschnittswerte $n = 1228/908$; für: intakt/CCI). Danach enthalten die intradermal injizierten Tiere ($n = 772/520$) mehr FG positive Zellen als die intramuskulär behandelten ($n = 387/281$), wobei die Ganglien der i.m. inji-

zierten Tiere größere FG positive Zellen aufweisen. Interessanterweise ergibt die Summe der FG positiven Zellen der i.d. und i.m. Tiere annähernd die Anzahl der FG angefarbten Neurone der i.n. Tiere.

Bei allen 3 Verabreichungsarten (für jede Gruppe jeweils 3 CCI-Tiere sowie 3 Kontrolltiere) wird nach CCI bei annähernd unveränderter Größenverteilung eine statistisch signifikante verminderte Anfärbung der Spinalganglienneurone mit FG im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (FG i.n.: 70%, FG i.m.: 73% und FG i.d.: 67% des Wertes der Kontrollen; $p < 0,05$). Nach den Versuchshypothesen ist diese Abnahme auf die durch die CCI beschädigten Neurone zurückzuführen. Diese beschädigten Neurone müssten nach der Versuchshypothese mit Fluoruby angefärbt sein.

Diagramm 9: Häufigkeits- und Größenverteilung FG angefarbter Neurone vor und nach CCI (FG i.n. injizierte Versuchsgruppen); Verteilung der Zellgrößen über das gesamte Größenspektrum der Spinalganglienneurone (vgl. PGP 9.5 Immunfluoreszenz, Diagramm 3). Deutliche Abnahme FG positiver Neurone nach CCI (*: $p < 0,05$).

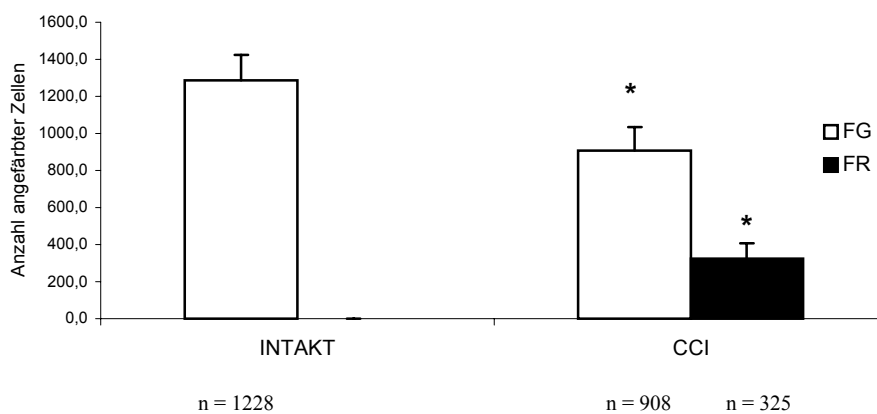


4.1.8. Fluororuby

Die retrograde Anfärbung der beschädigten Ganglienzellen mit Fluororuby wird erwartungsgemäß nur in den Spinalganglien der CCI-Tiere beobachtet (s.o.). Hier stellen sich die FR positiven Ganglienzellen intensiv rot angefärbt dar. Deren Spektrum erstreckt sich wiederum über die ganze Breite der Zellgrößen.

Interessanterweise deckt sich bei den Tieren mit Nervenläsion (CCI-Tiere der FG i.n. Gruppe; n=3) die Anzahl der FR angefärbten Neurone mit dem „Verlust“ an FG positiven Neuronen, was in guter Übereinstimmung mit den Versuchshypothesen steht. Außerdem finden sich bei Übereinanderlagerung FG und FR enthaltender Ganglienschnitte keine Zellen, die mit beiden Farbstoffen angefärbt sind. So kann davon ausgegangen werden, dass jeder Farbstoff eine eigene Zellpopulation nachweist, und dass die FR positiven Neurone die Population darstellen, die durch die CCI geschädigt wurde. Danach ist etwa ein Viertel der vorher intakten Neurone durch die CCI beeinträchtigt.

Diagramm 10: Anzahl FG und FR angefärbter Neurone vor und nach CCI (FG i.n. injizierte Versuchsgruppe). Statistisch signifikanter Rückgang FG positiver Neurone und Anstieg FR positiver Neurone bei CCI Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe (*: $p < 0,05$).

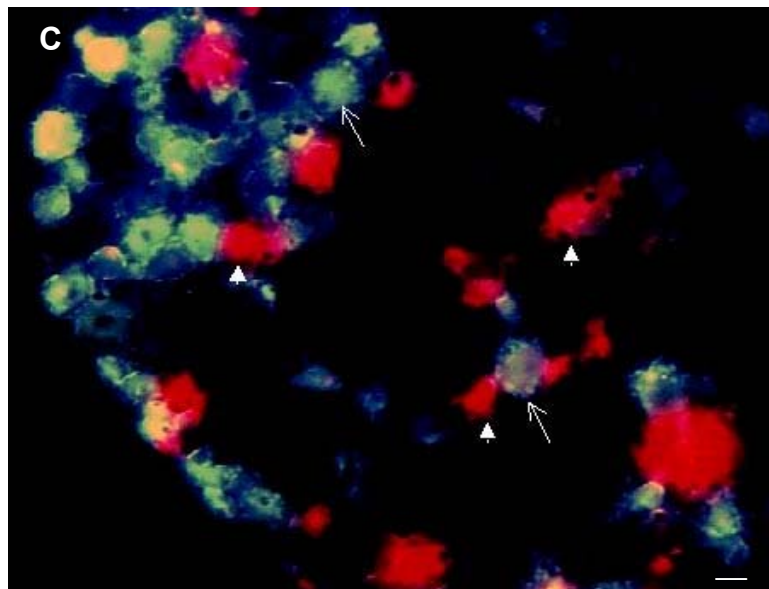
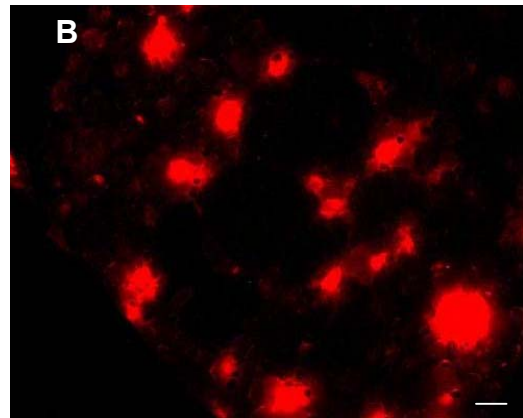
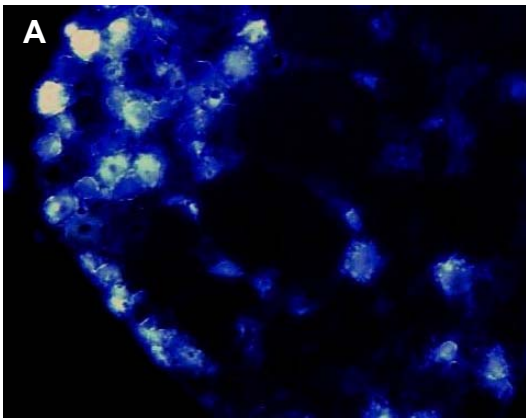


**Abbildung 11: CCI; FG, FR und Überlagerung am gleichen Spinalganglionschnitt;
Maßstab: 20 µm (A+B), 15 µm (C)**

A: FG angefärbte Zellen

B: FR angefärbte Zellen

C: Überlagerung von A und B. Klare Trennung der 2 Zellpopulationen, keine Doppelfärbung einzelner Zellen (Dünne Pfeile: FG positive Neurone; dicke Pfeile: FR positive Neurone).



4.2. Auswertung der Überlagerungen

Die erfassten Veränderungen der untersuchten Zellmarker und Zytokine wurden weiter daraufhin untersucht, ob diese eher in unverletzten (FG positiv) oder in geschädigten Neuronen (FR positiv) stattfinden.

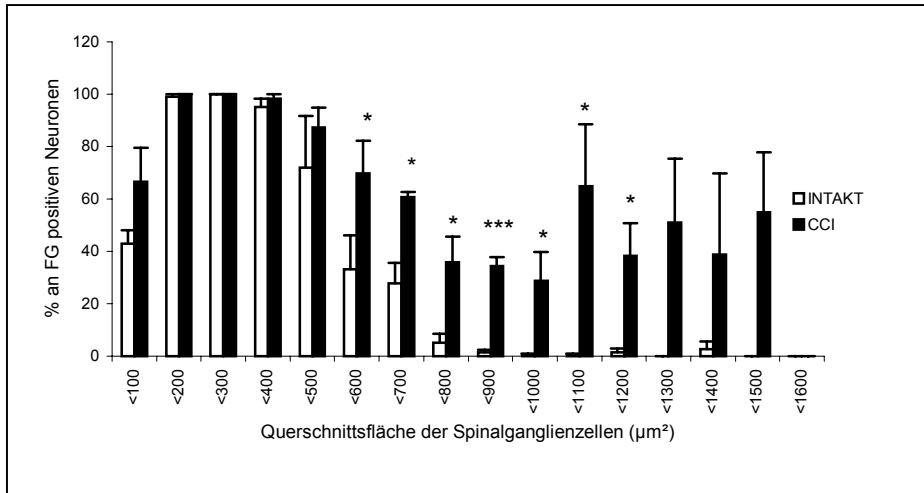
4.2.1. Überlagerungen mit Fluorogold (FG i.n.)

4.2.1.1. *FG mit TNF- α*

In den digital übereinander gelagerten Bildern von FG und TNF- α finden sich sowohl Neurone, die entweder nur FG enthalten oder nach TNF- α angefärbt sind, als auch Zellkörper, die beide Kriterien erfüllen. Nur letztere Neurone werden als positiv gewertet und in einem Diagramm dargestellt. Diese Voraussetzung gilt natürlich auch für die nachfolgend beschriebenen Kombinationen der Schnittbilder der anderen Immunfluoreszenzfärbungen und FG (vgl. Abbildung 12).

Hierbei zeigt sich, dass der bei der Einzelfärbung beobachtete Anstieg der TNF- α Expression in den mittelgroßen und großen Spinalganglienzellen auch statistisch signifikant bei der Subpopulation der unverletzten Neurone (FG positiv) zu finden ist. So lässt sich TNF- α vor der Nervenverletzung in $35 \pm 2,0$ % aller FG positiven Ganglienzellen nachweisen, wogegen dann nach CCI $48 \pm 3,0$ % der unverletzten Neurone TNF- α exprimieren ($p < 0,05$; vgl. Tabelle 5). Dieser Anstieg wiederum ist signifikant bei Zellgrößen über $500 \mu\text{m}^2$, wobei die TNF- α Expression in den kleinen, FG positiven Spinalganglienneuronen unverändert bleibt.

Diagramm 11: Häufigkeits- und Größenverteilung TNF- α und gleichzeitig FG positiver (d.h. intakter) Neurone als Anteil an den FG angefärbten Neuronen im Spinalganglion vor und nach CCI.
Statistisch signifikante Zunahme bei Zellgrößen $> 500 \mu\text{m}^2$ (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,005$)



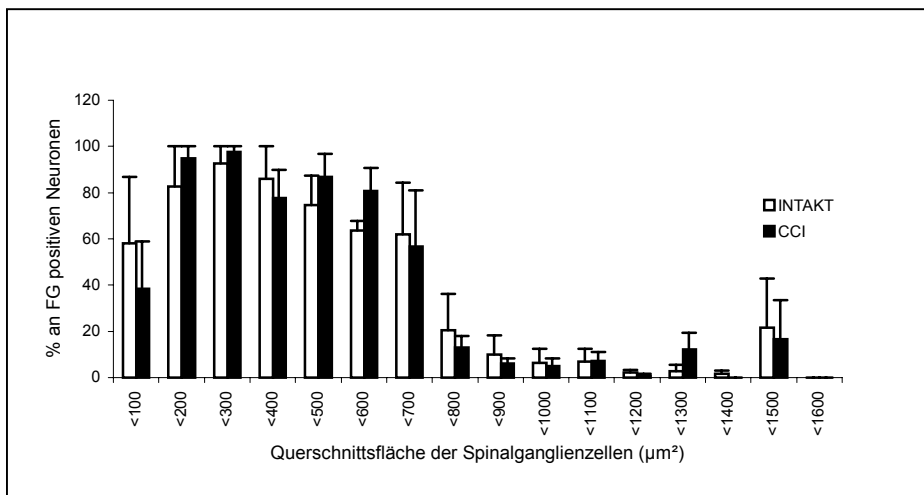
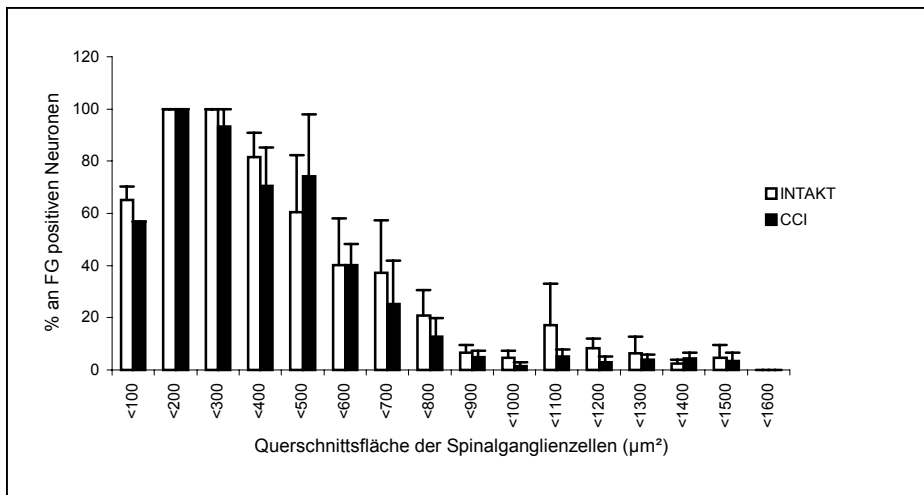
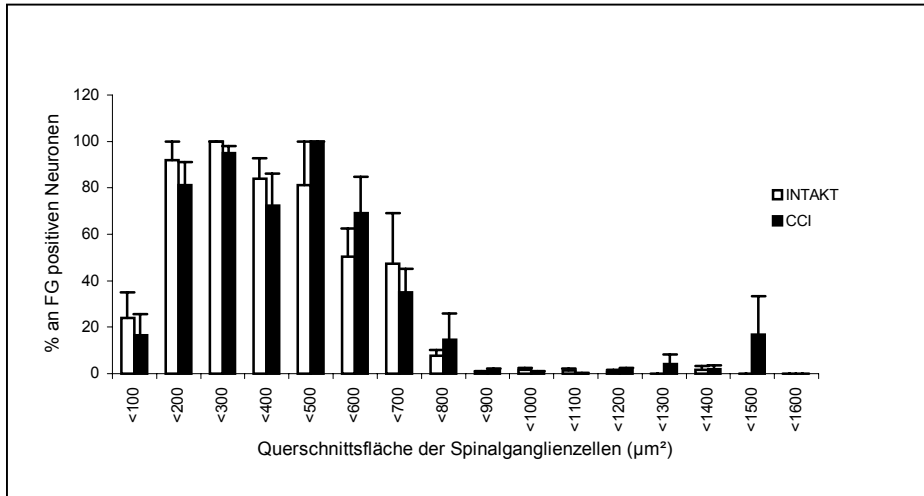
FG-TNF- α

4.2.1.2. FG mit IL-10, VR1 und IB4

Auch bei den mit FG übereinander gelagerten Bildern der Immunfluoreszenzfärbungen von IL-10, VR1 und IB4 finden sich sowohl einzeln gefärbte, als auch mit FG kolokalisierte Ganglienzellen.

Zwar bleibt die Expression dieser drei Zellmarker auch in Überlagerung mit FG auf kleine Ganglienzellen (Schnittfläche vornehmlich kleiner als $700 \mu\text{m}^2$) beschränkt, dagegen lässt sich aber der nachgewiesene Rückgang der Immunfluoreszenz bei den einzelnen Färbungen dieser drei Substanzen (vgl. oben) nicht in der Population der gesunden, FG positiven Neurone nachweisen. Lediglich bei VR1 lässt sich nach CCI ein Rückgang von einem Anteil von $36 \pm 8,0 \%$ aller FG angefärbten Neurone zu $29 \pm 7,8 \%$ beobachten, der allerdings statistisch unsignifikant bleibt (vgl. Tabelle 5).

Diagramm 12: Häufigkeits- und Größenverteilung IL-10, VR1, IB4 und gleichzeitig FG positiver (d.h. intakter) Neurone als Anteil an den FG angefärbten Neuronen im Spinalganglion vor und nach CCI.
A: FG und IL-10: keine signifikante Veränderung
B: FG und VR1: keine signifikante Veränderung
C: FG und IB4: keine signifikante Veränderung



4.2.1.3. *FG mit CGRP*

Erwartungsgemäß findet sich bei den Überlagerungen der Immunfluoreszenzfärbung von CGRP mit den FG zeigenden Schnittbildern keine statistisch signifikante Veränderung der CGRP Expression in unverletzten Spinalganglienneuronen nach CCI. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Einzelauswertung der CGRP Fluoreszenzfärbung ergibt sich auch in der Gruppe der unverletzten Ganglienzellen nur eine leichte Schwankung des Anteils der CGRP exprimierenden Neurone von $37 \pm 9,0$ % bei Kontrolltieren ohne CCI zu $43 \pm 9,1$ % bei Versuchstieren mit CCI (vgl. Tabelle 5). Die Größenverteilung dieser Ganglienzellen bleibt ebenfalls auf das Spektrum der kleinen und mittelgroßen Zellen beschränkt.

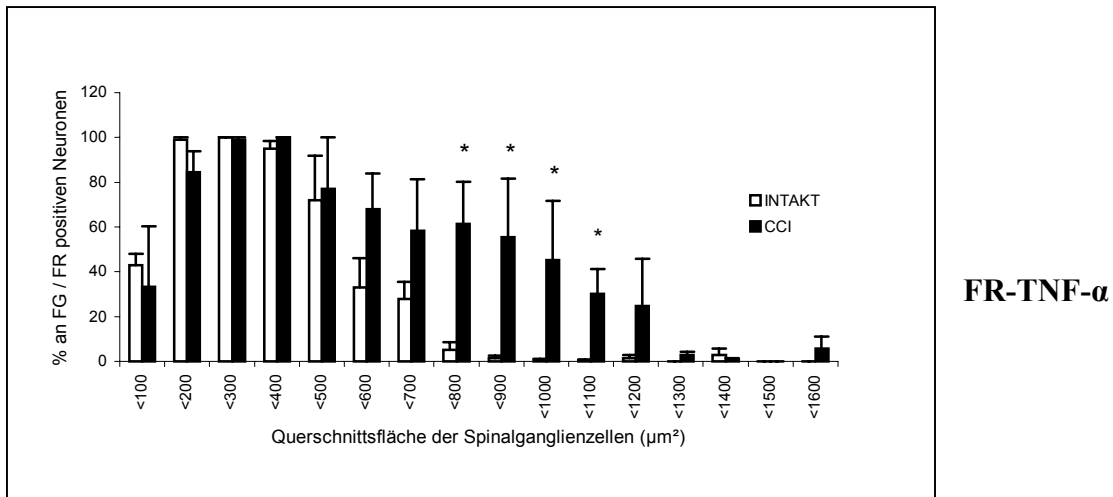
4.2.2. Überlagerungen mit Fluororuby

4.2.2.1. *FR mit TNF- α*

Ebenso wie bei den Überlagerungen mit Fluorogold werden auch bei den digital kombinierten Schnittbildern von Fluororuby und den entsprechenden Immunfluoreszenzfärbungen nur diejenigen Ganglienzellen als positiv gewertet, die deutlich beide Anfärbungen aufweisen.

Der selektive Anstieg der mittelgroßen und großen TNF- α positiven Ganglienneurone nach CCI, der sich generell im Spinalganglion (TNF- α Einzelfärbung) als auch in der Population der gesunden Neurone (Überlagerung mit FG) zeigt, findet sich auch in der Gruppe der geschädigten, also FR markierten Spinalganglienzellen. Nach CCI sind $57 \pm 5,7$ % aller geschädigten Ganglienzellen TNF- α positiv (im Gegensatz zu den $35 \pm 2,0$ % mit FG doppelgefärbten Zellen vor Nervenverletzung; vgl. Tabelle 5). Statistisch signifikant ($p < 0,05$) ist dieser Anstieg auch hier bei den mittelgroßen und großen Neuronen (ab $700 \mu\text{m}^2$ Querschnittsfläche).

Diagramm 13: Häufigkeits- und Größenverteilung TNF- α und gleichzeitig FG positiver (d.h. intakter) bzw. FR positiver (d.h. beschädigter) Neurone als Anteil an den FG angefärbten Neuronen im Spinalganglion vor bzw. FR angefärbten nach CCI.
Statistisch signifikante Zunahme bei Zellgrößen $> 700 \mu\text{m}^2$ (*: $p < 0,05$)



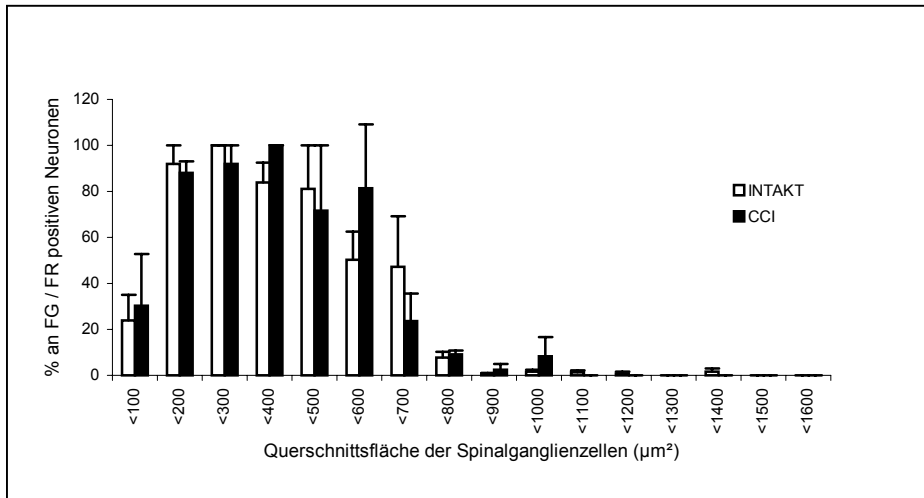
4.2.2.2. FR mit IL-10, VR1 und IB4

Wie auch bei den Überlagerungen der Fluoreszenzfärbungen von IL-10, VR1 und IB4 mit den unbeschädigten Neuronen nach CCI findet sich kein Unterschied der Expression dieser Zellmarker in den geschädigten, mit FR kolokalisierten Ganglienzellen. Zwar ist bei den Überlagerungen mit IL-10 ein leichter Anstieg ($41 \pm 5,3$ % aller FR positiven Zellen nach CCI zu $32 \pm 8,6$ % aller FG positiven Zellen vor CCI) und bei IB4 ein leichter Rückgang ($31 \pm 1,7$ % aller FR positiven Zellen nach CCI zu 40 ± 13 % aller FG positiven Zellen vor CCI) auszumachen, der allerdings in keinem Punkt statistisch signifikant wird (vgl. Tabelle 5).

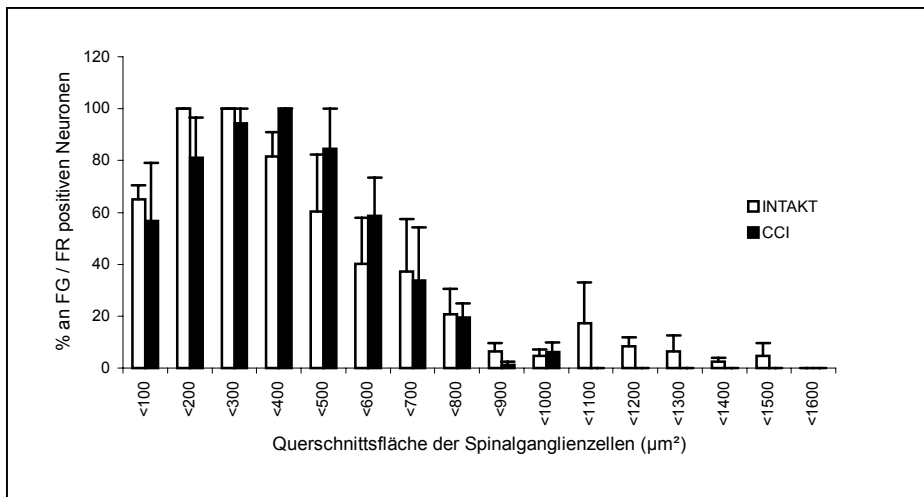
Somit lässt sich der bei den Einzelfärbungen beobachtete Rückgang der Expression dieser 3 Substanzen nach CCI (vgl. oben) weder exakt der Population der geschädigten, noch der Gruppe der ungeschädigten Ganglienzellen zuweisen.

Diagramm 14: Häufigkeits- und Größenverteilung IL-10, VR1, IB4 und gleichzeitig FG positiver (d.h. intakter) bzw. FR positiver (d.h. beschädigter) Neurone als Anteil an den FG angefärbten Neuronen im Spinalganglion vor bzw. FR angefärbten nach CCI.

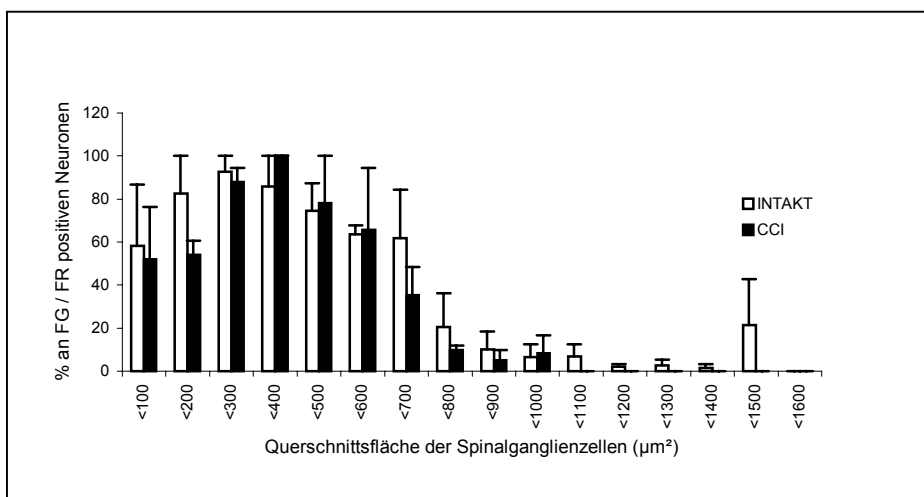
- A: FG/FR und IL-10: keine signifikante Veränderung
- B: FG/FR und VR1: keine signifikante Veränderung
- C: FG/FR und IB4: keine signifikante Veränderung



A
FR-II-10



B
FR-VR1



C
FR-IB4

4.2.2.3. FR mit CGRP

Die Auswertung der Überlagerung der CGRP Immunfluoreszenz mit den FR gefärbten Ganglienschnitten ergibt keine relevante Veränderung der CGRP Expression in den geschädigten Ganglienzellen nach CCI im Vergleich zu den ungeschädigten vor Nervenläsion (vgl. Tabelle 5). Auch mit derselben Größenverteilung der Neurone im kleinen und mittelgroßen Spektrum steht dies in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der CGRP Einzelauswertung.

Tabelle 5: Zusammenfassung der TNF- α , IL-10, VR1, IB4 und CGRP Expression in intakten (FG positiven) und geschädigten (FR positiven) Zellpopulationen im Spinalganglion bei Versuchsgruppen mit und ohne CCI. Die Prozentwerte beziehen sich auf den Anteil der jeweiligen FG bzw. FR positiven Neurone (entspricht Anteil an allen intakten bzw. geschädigten Spinalganglienneuronen, vgl. oben). Das Verhältnis der Expression der einzelnen Zellmarker von CCI- zu Kontrollgruppen ist für jede Immunfluoreszenz angegeben. Es zeigt lediglich bei TNF- α eine statistisch signifikante Zunahme (sowohl in der Population der intakten, als auch der geschädigten Neurone; *: $p < 0,05$).

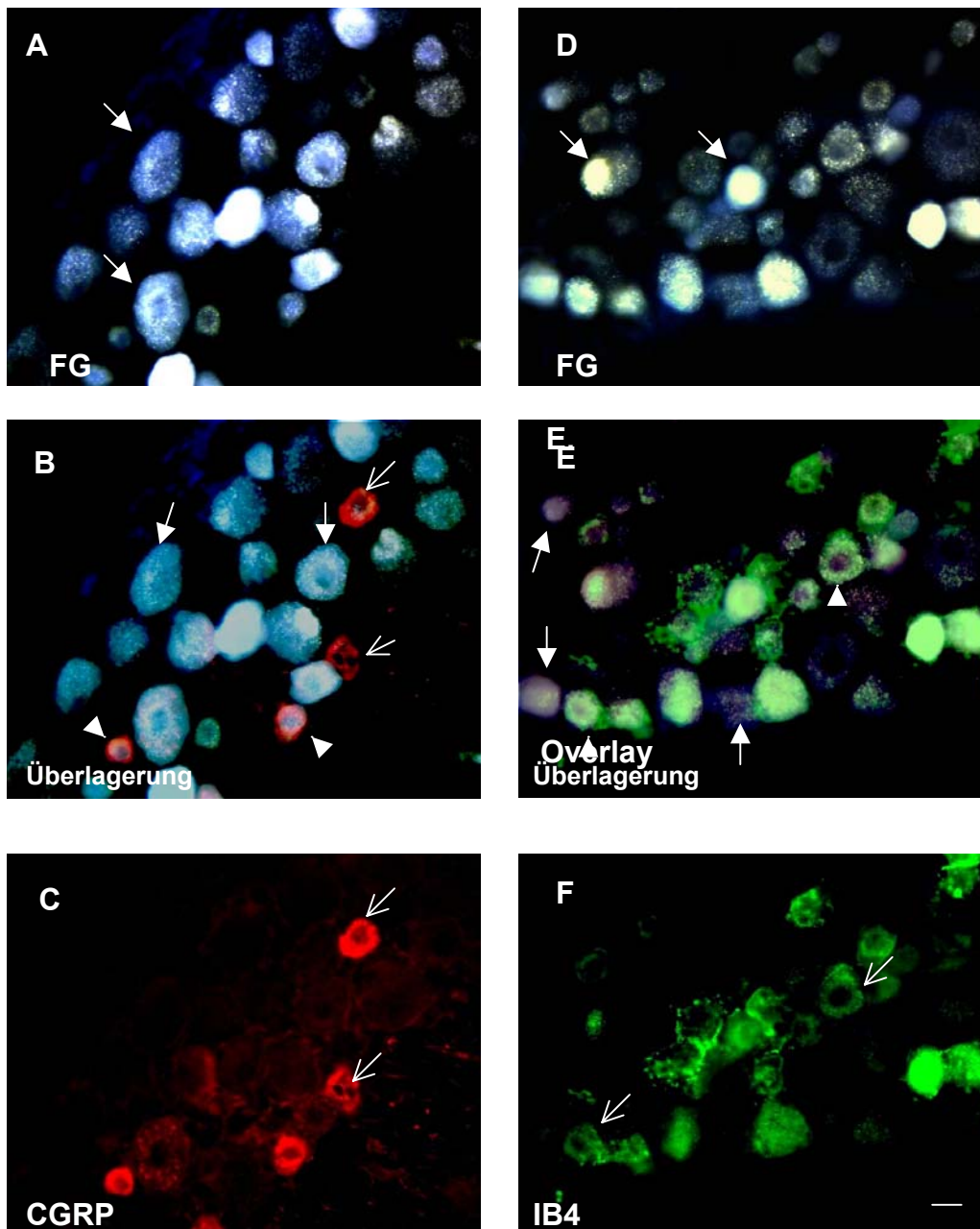
		TNF- α	IL-10	VR1	IB4	CGRP
Intakter Nerv	% FG	35 +/- 2,0	32 +/- 8,6	36 +/- 8,0	40 +/- 13,0	37 +/- 9,0
CCI Nerv	% FG	48 +/- 3,0	34 +/- 8,4	29 +/- 7,8	37 +/- 10,1	43 +/- 9,1
CCI/Intakt		1,37 *	1,06	0,81	0,92	1,16
CCI Nerv	%FR	57 +/- 5,7	41 +/- 5,3	37 +/- 3,0	31 +/- 1,7	44 +/- 3,5
CCI/Intakt		1,63 *	1,28	1,02	0,77	1,19

Abbildung 12: Beispiele für die Überlagerung von FG und Immunfluoreszenzfärbung am gleichen Spinalganglionschnitt; Maßstab: 20 µm;

A-C: Überlagerung von FG und CGRP (dicke Pfeile: FG positive Zellen; dünne Pfeile: CGRP positive Zellen; Pfeilköpfe: doppelt gefärbte Zellen)

D-F: Überlagerung von FG und IB4 (dicke Pfeile: FG positive Zellen; dünne Pfeile: IB4 positive Zellen; Pfeilköpfe: doppelt gefärbte Zellen)

(Schäfers et al. 2003a)



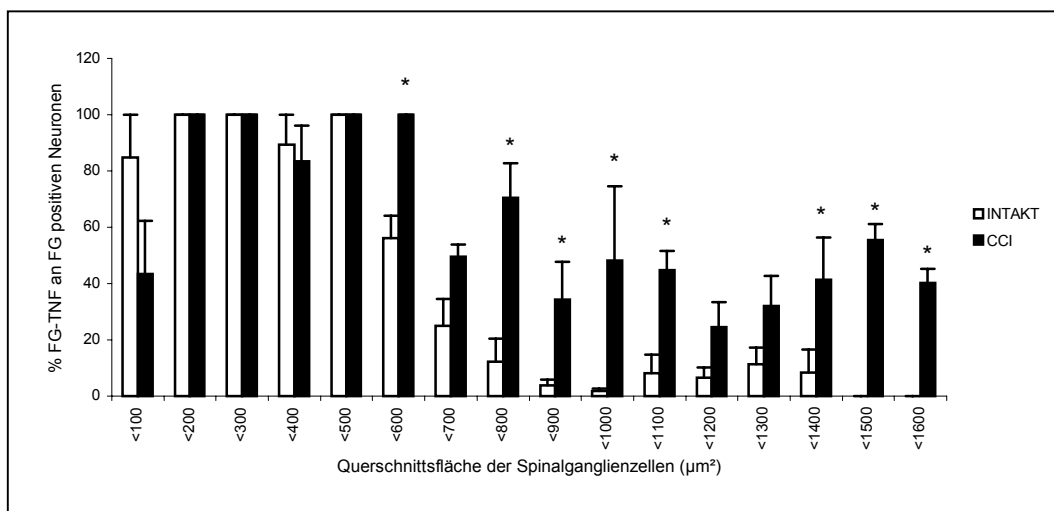
4.2.3. Überlagerung TNF- α mit Fluorogold (FG i.m.)

Um den Anstieg der TNF- α Immunreaktivität ungeschädigter Neurone nach CCI weiter zu charakterisieren, wurde dieses Phänomen in weiteren Versuchsgruppen ausgewertet. Das Ziel ist, Unterschiede oder Gemeinsamkeiten zwischen dermalen und muskulären Afferenzen des Spinalganglions auszumachen (intradermale bzw. intramuskuläre Injektion von Fluorogold).

Wie auch bei den Überlagerungen mit i.n. injiziertem FG weisen die meisten kleinen (durch i.d. bzw. i.m. FG Injektion dargestellten) Spinalganglienneurone vor CCI eine simultane Anfärbung von TNF- α und FG auf, die sich nach CCI nicht ändert.

Bei der Überlagerung der TNF- α Immunfluoreszenz mit den intakten, FG angefärbten Neuronen der muskulären Afferenzen zeigt sich hier ebenfalls der selektive Anstieg der Expression TNF- α positiver Ganglienzellen nach Nervenverletzung. So kommt es im Bereich der mittelgroßen Spinalganglienneurone ($600 - 1200 \mu\text{m}^2$) zu einem statistisch signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg doppelgefärbter Zellen von $18 \pm 5,0 \%$ vor CCI zu $54 \pm 6,3 \%$ nach CCI (in Relation zu allen FG markierten Muskelafferenzen). In der Gruppe der großen Neurone kommt es ebenfalls zu einer Zunahme ($20 \pm 10,4 \%$ zu $41 \pm 14,2 \%$), welche sich zwar in den einzelnen Unterklassen signifikant zeigt, was aber im Gruppenvergleich wegen der großen Standardfehler nicht erreicht wird (vgl. Tabelle 6).

Diagramm 15: Häufigkeits- und Größenverteilung TNF- α und gleichzeitig FG positiver (d.h. intakter) Neurone als Anteil an den FG angefärbten Neuronen im Spinalganglion vor und nach CCI (FG i.m. Gruppe)
Statistisch signifikante Zunahme bei mittelgroßen Neuronen (*: $p < 0,05$)



4.2.4. Überlagerung TNF- α mit Fluorogold (FG i.d.)

Auch bei den dermalen Afferenzen bemerkt man den Anstieg der TNF- α Immunreaktivität in mittelgroßen intakten Ganglienneuronen nach CCI, wenn auch in geringerem Ausmaß als bei den muskulären Afferenzen. In der Gruppe der mittelgroßen Neurone kommt es zu einem Anstieg TNF- α und FG kolokalisierter Zellen von $15 \pm 3,6\%$ auf $38 \pm 1,9\%$ aller FG positiven Zellen nach CCI (vgl. Tabelle 6). Diese Zunahme ist zwar in den einzelnen Unterklassen nicht signifikant, wohl aber im Vergleich der Gruppe mittelgroßer Ganglienzellen mit und ohne Nervenschädigung ($p < 0,005$). Im Spinalganglion finden sich zu wenig große Zellkörper dermalen Afferenzen um vergleichende Aussagen in dieser Gruppe machen zu können.

Diagramm 16: Häufigkeits- und Größenverteilung TNF- α und gleichzeitig FG positiver (d.h. intakter) Neurone als Anteil an den FG angefärbten Neuronen im Spinalganglion vor und nach CCI (FG i.d. Gruppe)
Statistisch nicht signifikante Zunahme bei mittelgroßen Neuronen

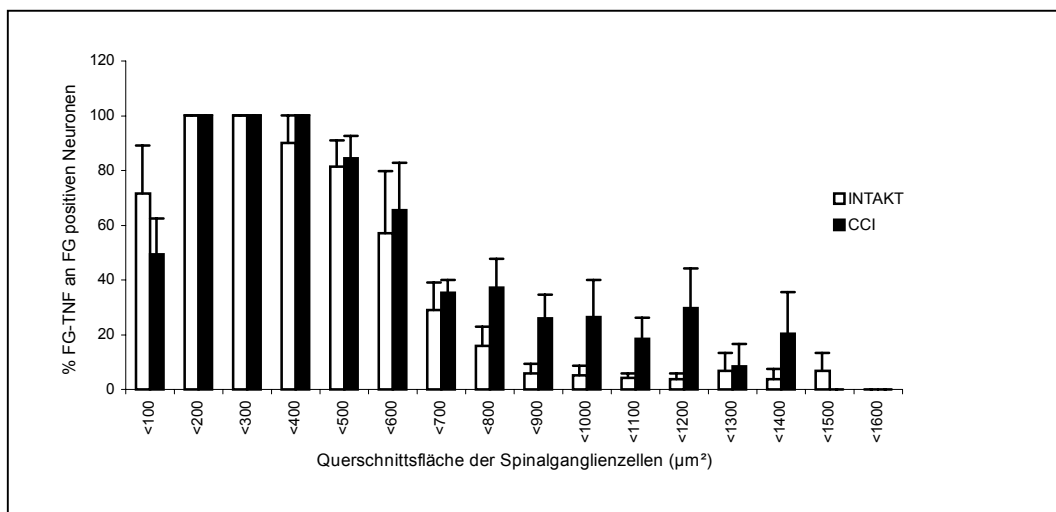


Tabelle 6: Zusammenfassung der TNF- α Expression in intakten (FG positiven) Neuronen im Spinalganglion (der FG i.m. und i.d. Gruppen; vor und nach CCI). Die Prozentwerte beziehen sich auf den Anteil der jeweiligen FG positiven Neurone (Anteil an intakten Muskel- bzw. Hautafferenzen). Eine statistisch signifikante Zunahme der TNF- α Expression zeigt sich bei beiden Gruppen im Bereich der mittelgroßen (Schnittfläche 600-1200 μm^2) Spinalganglienneurone (*: p<0,05; **: p<0,005)

			<600 μm^2	600 – 1200 μm^2	>1200 μm^2
FG i.m.	Intakter Nerv	% FG	98 +/- 2,2	18 +/- 5,0	20 +/- 10,4
	CCI Nerv	% FG	87 +/- 6,7	54 +/- 6,3	41 +/- 14,2
	CCI/Intakt		0,89	2,96 *	2,01
FG i.d.	Intakter Nerv	% FG	94 +/- 4,9	15 +/- 3,6	2 +/- 0,7
	CCI Nerv	% FG	93 +/- 3,7	38 +/- 1,9	10 +/- 5,6
	CCI/Intakt		0,98	2,47 **	5,94

4.3. Weitere Färbungen zur Charakterisierung der TNF- α positiven Neurone

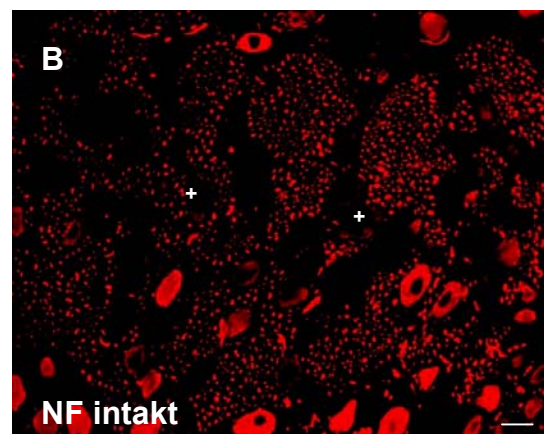
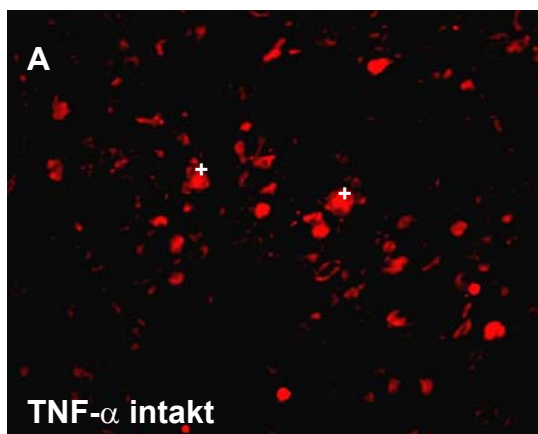
Um die Klassen der mittelgroßen und großen Spinalganglienneurone, die nach CCI eine vermehrte TNF- α Immunreaktivität aufweisen, genauer zu charakterisieren, wurden weitere Färbereihen angefertigt. Dabei wurden TNF- α positive Neurone auf Kolo-kalisation mit anderen zytochemischen Markern untersucht. So wurden nach TNF- α gefärbte Schnitte mit Nachbarschnitten, die nach Neurofilament 200 (NF), VR1, trkA, trkB oder RET gefärbt waren, bzw. mit den gleichen Schnitten, die in einer Doppelimmunfluoreszenz zusätzlich noch nach IB4 gefärbt waren, verglichen. Es ergeben sich folgende Ergebnisse:

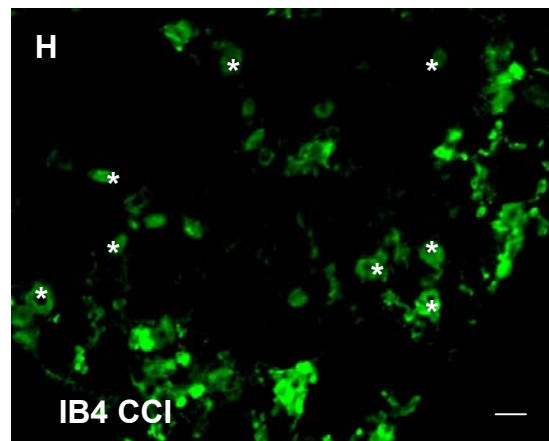
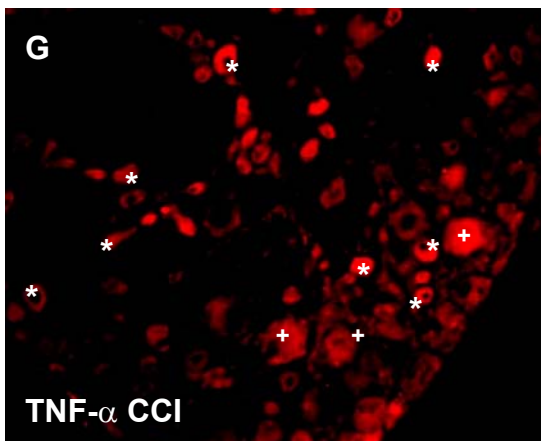
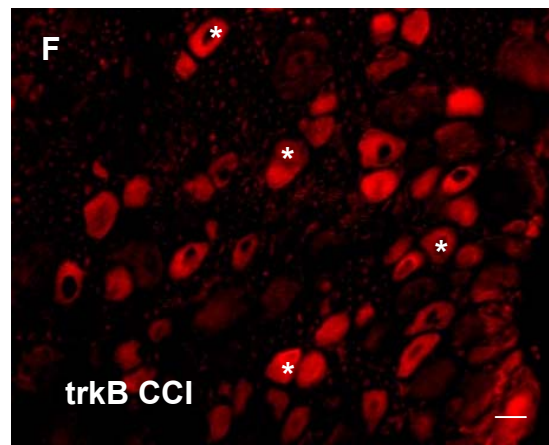
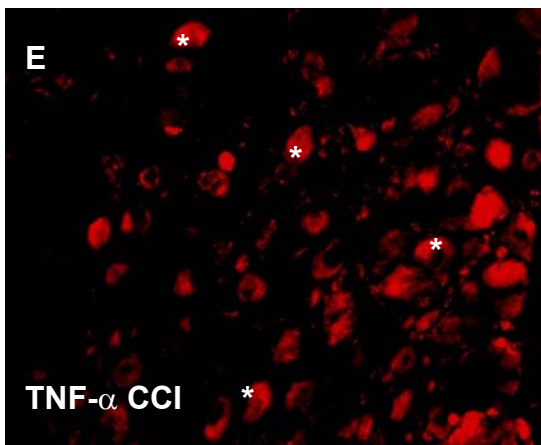
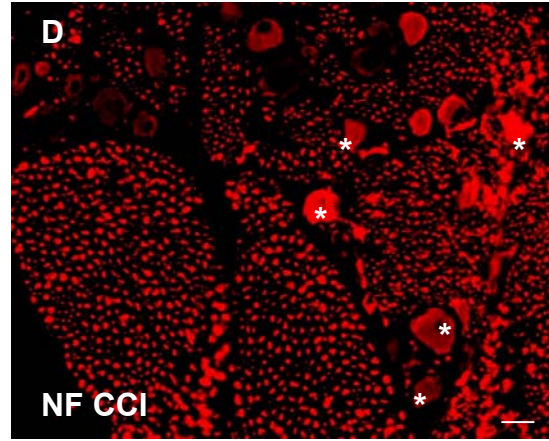
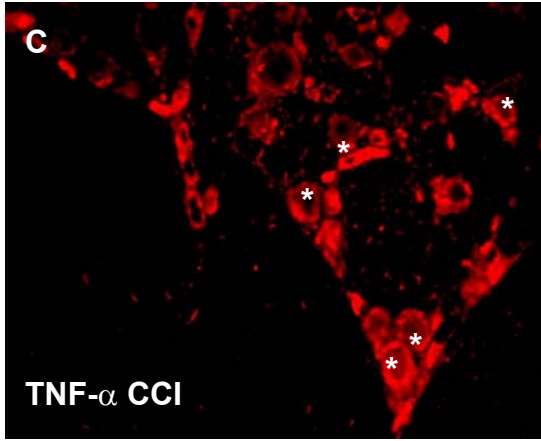
- a) Bei Kontrolltieren ohne Nervenschädigung sind die kleinen, TNF- α positiven Spinalganglienneurone NF negativ und somit als die Somata der C-Fasern anzusehen (vgl. 2.4.2.).
- b) Die mittelgroßen und großen TNF- α exprimierenden Neurone im Spinalganglion nach CCI sind meist NF und trkB positiv, aber nicht mit trkA kolokalisiert. Diese sind also eher der Gruppe der A-Faser-Neurone zuzuordnen.
- c) Nach CCI sind nur kleine, aber nicht große TNF- α exprimierende Neurone IB4 positiv; gleiches gilt für die Koexpression mit RET.
- d) Einige mittelgroße TNF- α positive Neurone nach CCI zeigen auch schwache VR1 Immunreaktivität.

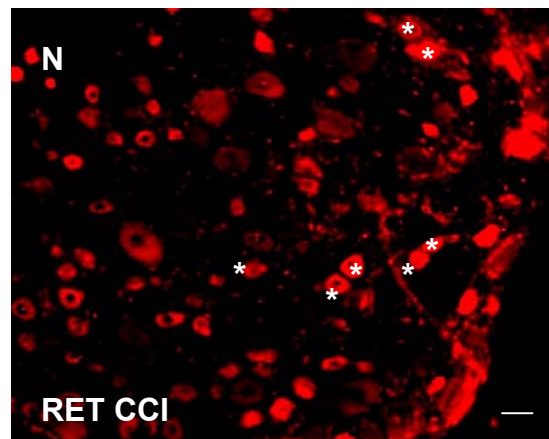
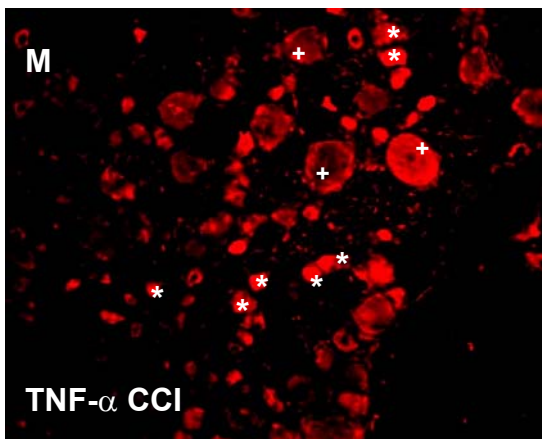
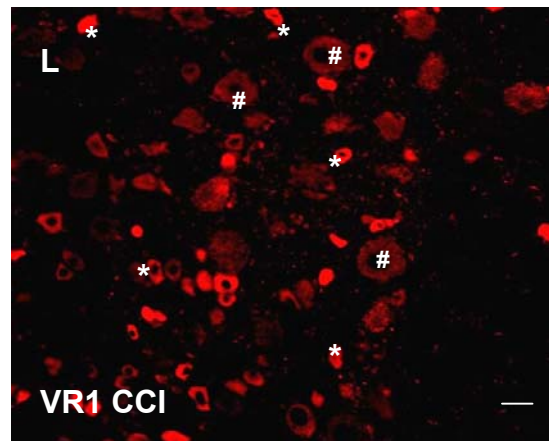
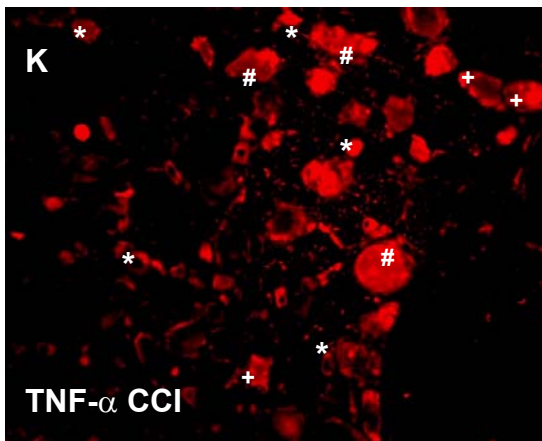
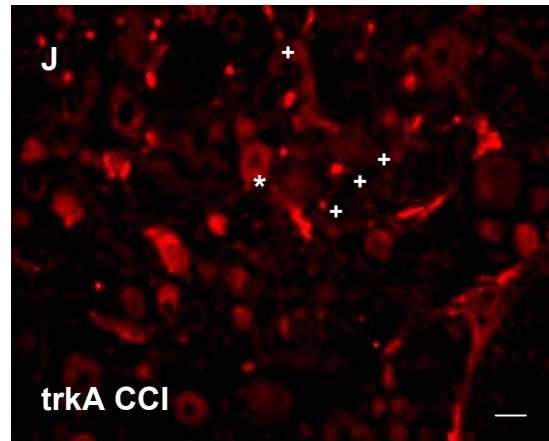
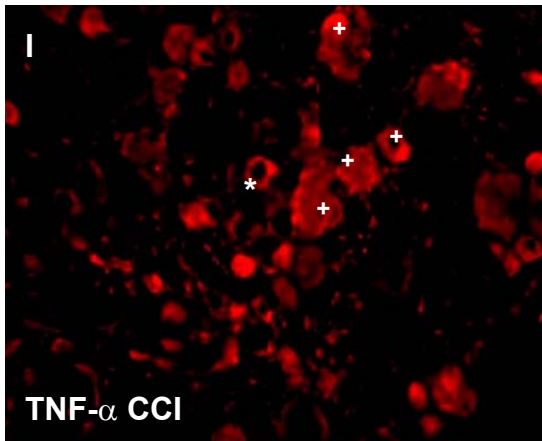
Abbildung 13: : Färbereihe an Serienschnitten zur weiteren Charakterisierung TNF- α exprimierender Neurone; Maßstab: 20 μ m

- A+B: Kontrolle; kleine TNF- α positive Zellen (A) exprimieren kein NF (B) (markiert mit +)
- C+D: CCI; nach CCI zeigen mittelgroße bis große TNF- α positive Zellen (C) auch NF Immunreaktivität (D) (markiert mit *)
- E+F: CCI; nach CCI sind die meisten mittelgroßen TNF- α angefärbten Neurone (E) auch trkB positiv (F) (markiert mit *)
- G+H: CCI; nach CCI weisen nur kleine (markiert mit *), aber keine großen (markiert mit +) TNF- α exprimierende Neurone (G) auch IB4 Bindungsstellen auf (H)
- I+J: CCI; nach CCI sind nur vereinzelt mittelgroße TNF- α positive Zellen (I) mit trkA exprimierenden Neuronen (J) kolokalisiert (markiert mit *), meist sind diese jedoch trkA negativ (markiert mit +)
- K+L: CCI; nach CCI weisen viele kleine TNF- α positive Neurone (K) Koexpression mit VR1 positiven Neuronen (L) auf (markiert mit *); die meisten mittelgroßen TNF- α exprimierenden Zellen sind VR1 negativ (markiert mit +), wobei einige mittelgroße bis große TNF- α positive Neurone auch eine schwache VR1 Immunreaktivität zeigen (markiert mit #)
- M+N: CCI; nach CCI zeigen nur die kleinen TNF- α positiven Neurone (M) Kolokalisation mit RET positiven Zellen (N) (markiert mit *); mittelgroße und große TNF- α exprimierende Neurone sind klar RET negativ (markiert mit +)

(Schäfers et al. 2003a)







5. DISKUSSION

5.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In den durchgeführten Experimenten konnte nach einer peripheren Nervenläsion (CCI) eine deutlich erhöhte Expression des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α in mittelgroßen und großen Spinalganglienneuronen nachgewiesen werden. Durch retrograde Fasermarkierung wurde dieser Anstieg nicht nur der Population der geschädigten, sondern auch der intakt verbliebenen Neurone zugeordnet. Sowohl Muskel-, als auch Hautafferenzen tragen zu dieser erhöhten TNF- α Expression bei. Im Vergleich mit anderen zytochemischen Markern (u.a. Neurofilament 200 und Tyrosin-Kinase Rezeptor B) konnten diese Neurone mit neu aufgetretener TNF- α -Immunreaktivität als schnell leitende A-Faser Neurone identifiziert werden.

Andere untersuchte Substanzen, wie das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, der Capsaicinrezeptor VR1 (TRPV1) und IB4 zeigten nach CCI eine verminderte Immunreaktivität im Spinalganglion, die vor allem auf kleine Neurone beschränkt blieb. Der Rückgang der Expression dieser Substanzen ist nicht eindeutig der Gruppe der geschädigten oder der intakten Neurone zuzuordnen.

Die Expression von CGRP blieb nach CCI unverändert und war vor allem in kleinen und mittelgroßen Spinalganglienneuronen zu finden.

5.2. Beurteilung der retrograden Fasermarkierung

Mittels der verwendeten Injektionsarten von FG und FR (intraneural, intramuskulär und intradermal) war es nicht möglich, alle Spinalganglienneurone der gewünschten Population zu markieren. Beim Vergleich der Gesamtpopulation der Spinalganglienzellen (mit PGP 9.5 markiert: durchschnittlich etwa 3000 gezählte Zellen pro Spinalganglion) und der Anzahl der FG positiven Neurone der FG i.n. injizierten Kontrollgruppe (durchschnittlich etwa 1200 gezählte Zellen) fällt auf, dass nicht einmal die Hälfte der Ganglienzellen eines Tieres ohne Nervenverletzung mit FG erreicht wurde.

Allerdings wurden bei allen Kontrolltieren ähnliche Werte für die Anfärbung der Spinalganglienneurone mit FG gemessen. Bei den Versuchstieren mit CCI ergibt die Summe der FG und FR positiven Neurone ebenfalls diese Anzahl der FG angefärbten Zellen

der nicht geschädigten Kontrollgruppe (vgl. Diagramm 10). Auch die Addition der FG positiven Zellen der FG i.m. und i.d. Gruppe ergibt näherungsweise den Wert der FG i.n. Gruppe (vgl. Abschnitt 4.1.7.).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Injektion von FG oder FR zwar nicht alle Neurone der gewünschten Zielgruppe erfasst werden können, dass aber innerhalb dieser eine Teilpopulation erreicht wird, die in allen untersuchten Versuchsgruppen zahlenmäßig konstant bleibt. Da bei dieser Arbeit nur Vergleiche innerhalb dieser Gruppen angestellt wurden, sind diese Vergleiche zulässig und können als repräsentativ für alle Zellen innerhalb einer Zielgruppe betrachtet werden.

Der in der Literatur bekannte „Halo-Effekt“ (Ichikawa und Sugimoto 2000) der FG positiven Neurone wurde durch die Multiplikation der gemessenen Flächenwerte mit dem Korrekturfaktors von 0,9 berichtigt. Das Größenspektrum der FG positiven Zellen mit korrigierten Querschnittsflächen deckt sich gut mit dem tatsächlichen Größenspektrum der Spinalganglienzellen (vgl. Abschnitt 3.7. und Diagramme 3 und 9).

Weiterhin ist zu erörtern, ob sich die beiden Farbstoffe auch wirklich nur in intakten, bzw. geschädigten Neuronen anreichern.

Eine Bestätigung dieser These ist die Beobachtung, dass bei den Kontrolltieren ohne Verletzung des Nervens wirklich kein FR im Spinalganglion nachzuweisen ist, wogegen dann bei allen CCI Tieren FR Immunfluoreszenz vorhanden ist. Weiterhin deckt sich der zahlenmäßige Rückgang der FG positiven Neurone bei den Kontrolltieren genau mit der neu aufgetretenen Anzahl FR positiver Neurone bei den CCI Tieren. Das ist natürlich kein endgültiger Beweis für die Richtigkeit der aufgestellten Behauptung. Dieser wäre nur durch einen Vergleich der FG/FR Anfärbung mit Zellmarkern, die sich selektiv in gesunden bzw. geschädigten Zellen anreichern, zu erbringen. Ein Beispiel hierfür ist der immunhistochemische Nachweis von „activating transcription factor 3“ (ATF-3), einem Zellmarker, der sich nur in geschädigten Neuronen nachweisen lässt (Herdegen und Leah 1998; Tsuzuki et al. 2001). Da aber die Eigenschaften von FG und FR schon hinreichend bekannt und in der Literatur beschrieben sind (Glover et al. 1986; Richmond et al. 1994; Ma und Bisby 1998b), wurde auf den formalen Nachweis verzichtet. An einigen Schnitten wurde stichprobenartig die Kollokalisierung von ATF-3 und FR überprüft, wobei sich eine gute Übereinstimmung zeigte.

5.3. Rolle des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α bei der Allodynie- und Hyperalgesieentwicklung nach CCI

5.3.1. TNF- α Expression im Spinalganglion ohne Nervenschädigung

In der Kontrollgruppe der Versuchstiere ohne periphere Nervenverletzung zeigen fast ausschließlich kleine Spinalganglienneurone mit Querschnittsfläche von weniger als $600 \mu\text{m}^2$ Immunreaktivität für TNF- α (vgl. Abbildung 6a und Diagramm 4). Im Vergleich mit anderen zytochemischen Markern stellt sich heraus, dass diese Zellen kein Neurofilament 200 enthalten, dafür aber Bindungsfähigkeit für IB4 aufweisen, sowie trkA und VR1 Rezeptoren exprimieren (vgl. Abbildung 13). Das sind klare Hinweise darauf, dass diese Neurone der Subpopulation der kleinen, primär nozizeptiven C- oder A δ -Faser-Neurone einzuordnen sind. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Beobachtungen einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung (Shubayev und Myers 2001), in welcher das Vorkommen von endogenem TNF- α sowohl in kleinen nozizeptiven, aber auch in großen mechanosensitiven Spinalganglienneuronen bei Versuchstieren ohne Nervenverletzung beschrieben wird. Dieser Widerspruch könnte einmal durch die verschiedenen Techniken der Aufbereitung und Färbeprozedur des Gewebes erklärbar sein (Paraffinschnitte und Immunhistochemie auf der einen Seite im Vergleich zu Gefrierschnitten und Immunfluoreszenzfärbungen in dieser Arbeit). Außerdem wurde in dieser Arbeit eine quantitative Auswertung der TNF- α Immunreaktivität in einer Versuchsgruppe unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, wogegen die Aussage von Shubayev und Myers auf semiquantitativen Beobachtungen beruht.

5.3.2. Selektiver Anstieg der TNF- α Immunreaktivität in mittelgroßen und großen Spinalganglienneuronen nach CCI

In der CCI-Gruppe kommt es vier Tage nach dieser partiellen Nervenschädigung zu einem statistisch signifikanten Anstieg der TNF- α Immunreaktivität im Spinalganglion von etwa 45% auf 70% (vgl. Tabelle 4). Dies wird vor allem durch einen selektiven Anstieg der TNF- α Immunreaktivität der mittelgroßen und großen Spinalganglienzellen mit einer Querschnittsfläche zwischen 600 und $1200 \mu\text{m}^2$ verursacht, während die kleinen Neurone keine wesentliche Veränderung ihrer TNF- α Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen (vgl. Diagramm 4). Die nach CCI vermehrt TNF- α exprimieren-

den Neurone enthalten auch Neurofilament 200, den Marker für schnell leitende A α - und A β -Faser-Neurone (vgl. Abbildung 13). Dieses Ergebnis wiederum stimmt überein mit anderen Beobachtungen aus der oben erwähnten Veröffentlichung (Shubayev und Myers 2001), die eine vermehrte und stärkere TNF- α Immunreaktivität in großen Spinalganglienneuronen einen Tag nach CCI beschreiben.

Die Rolle der mittelgroßen und großen Spinalganglienneurone bei der Entstehung und Erhaltung neuropathischer Schmerzen ist in der letzten Zeit immer mehr in das Interesse der Schmerzforschung geraten. So spricht man von einem "phänotypischen Switch", wenn große, proprio- oder mechanorezeptive und normalerweise nicht-nozizeptive, Neurone ihre typische Expression von Markersubstanzen, Rezeptoren oder Ionenkanälen ändern, damit auch ihre ursprüngliche Funktion verlieren und im nozizeptiven System wirksam werden.

So wurde eine verstärkte Expression von Substanz P in mittelgroßen und großen Spinalganglienneuronen mit niedriger Reizschwelle nachgewiesen, die Hyperexzitabilität im afferenten Reizleitungssystem bewirken und somit die Entstehung neuropathischer Schmerzen begünstigen (Noguchi et al. 1995; Neumann et al. 1996).

In elektrophysiologischen Untersuchungen nach peripherer Nervenläsion wird von der Entstehung ektopter Aktivität berichtet, die ihren Ursprung in großen myelinisierten A-Faser Neuronen hat und zeitgleich zur taktilen Allodynie führt (Liu et al. 2000). Es wurden auch Untereinheiten spezieller Kationenkanäle in großen afferenten Neuronen identifiziert, die zur Hyperalgesie- und Allodynieentstehung beitragen können (Porreca et al. 1999; Rasband et al. 2001).

Sehr interessant ist auch der Nachweis der vermehrten Expression des Neurotrophins BDNF in mittelgroßen und großen Spinalganglienneuronen nach Nervenverletzung (Michael et al. 1999; Zhou et al. 1999; Fukuoka et al. 2001). Das ist kongruent mit der Beobachtung in dieser Arbeit, dass die meisten mittelgroßen, TNF- α positiven Neurone nach CCI ebenfalls Immunreaktivität für den BDNF-Rezeptor trkB aufweisen (vgl. Abbildung 13).

Die geschilderten Mechanismen sind Prozesse in den A-Faser-Neuronen, die nach relativ kurzer Zeit zur Entstehung von Allodynie und Hyperalgesie beitragen könnten.

In dieser Arbeit wird der Nachweis erbracht, dass nach CCI selektiv die mittelgroßen und großen Spinalganglienneurone eine erhöhte Expression von TNF- α aufweisen. In

Abschnitt 2.6.2. werden die Mechanismen und der kausale Zusammenhang der Wirkung von TNF- α bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen mit Allodynie und Hyperalgesie ausführlich beschrieben. Die oben geschilderten Beobachtungen über den phänotypischen Switch mit der Involvierung mittelgroßer und großer Spinalganglienzellen mit myelinisierten A α - und A β -Fasern bei der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen können mit der hier beschriebenen erhöhten TNF- α Expression in eben diesen Neuronen in Zusammenhang gebracht werden. So wurde durch Einzelfaserableitung nachgewiesen, dass exogen auf Spinalganglienneurone aufgebrachtes TNF- α nicht nur zur Entladung von C-Faser-, sondern auch A β -Faser-Neurone führt (Liu et al. 2002; Zhang et al. 2002). Diese A β -Fasern steigern wiederum die Erregbarkeit afferenter Rückenmarksneurone. Dies geschieht einmal durch ihre erhöhte Entladungsfrequenz, zum anderen durch synaptische Transmission erregender Transmitterstoffe wie z.B. Glutamat und Substanz P, wozu sie mit jetzt verändertem Phänotyp (ähnlich dem der nozizeptiven Neurone) in der Lage sind (Neumann et al. 1996; Xu und Zhao 2001). Die normalerweise Berührungsreize leitenden A-Faser-Neurone können so dazu beitragen, dass es bei peripherer Nervenverletzung zu einer erhöhten zentralen Erregbarkeit und damit schmerzhaften Wahrnehmung eigentlich nicht-schmerzhafter Reize oder verstärktem Schmerzempfinden, also Allodynie und Hyperalgesie kommen kann (Day et al. 2001; Garcia-Nicas et al. 2001).

Welche Bedeutung TNF- α bei der Persistenz und Chronifizierung neuropathischer Schmerzen hat, kann mit den Ergebnissen dieses Versuchs nicht ermittelt werden, da die Daten nur für einen Zeitpunkt, nämlich vier Tage nach CCI, erhoben wurden.

5.3.3. Frage nach der Lokalisation und dem zeitlichen Verlauf der TNF- α Synthese

Die TNF- α Immunreaktivität, die in den Spinalganglien gefunden wurde, ist zum überwiegenden Teil im Zytoplasma der Neurone lokalisiert und nicht in extraneuronalen Strukturen, wie etwa Makrophagen oder Satellitenzellen. Der Beweis hierfür ist einerseits die Kolo-kalisation der TNF- α Immunreaktivität mit der PGP 9.5, was bekanntermaßen nur in neuronalen Zellen exprimiert wird (vgl. Abschnitt 2.4.1.). Zum Zweiten sind zahlreiche TNF- α exprimierende Neurone auch mit FG angefärbt, einem neuronalen Farbstoff, welcher nach retrogradem Transport im Axon schließlich im Zellkörper des entsprechenden Neurons akkumuliert (vgl. Abbildung 4).

Nachdem die Lokalisation des TNF- α Proteins mittels Immunfluoreszenzfärbungen zweifelsfrei geklärt ist, stellt sich nun die Frage nach der Herkunft, bzw. dem Produktionsort dieses Zytokins. Hierbei sind vor allem zwei Möglichkeiten zu diskutieren:

Erstens ist es möglich, dass die vermehrte TNF- α Expression durch eine höhere Syntheseleistung der Spinalganglienneurone zustande kommt. In diesem Fall würde die nachgewiesene Immunreaktivität von neuronalem TNF- α , also von Neuronen selbst synthetisierten Proteinen stammen. Der Produktionsort des Zytokins und die Stelle seines Nachweises wären identisch. Es ist bekannt, dass Spinalganglienneurone in der Lage sind, nach einer peripheren Nervenverletzung die Synthese von Zytokinen zu erhöhen. Dies konnte am Beispiel von Interleukin 6 gezeigt werden: mit Hilfe von PCR (Polymerase chain reaction) und in-situ Hybridisierung wurde nach Axotomie eine vermehrte Produktion dieses Zytokins in mittelgroßen und großen Spinalganglien neuronen entdeckt (Murphy et al. 1995). In der gleichen Studie fand man auch eine Induktion der mRNA Synthese von TNF- α und IL-1 β im Spinalganglion, der genaue zelluläre Ursprung dieser erhöhten Produktion konnte aber nicht identifiziert werden.

Die zweite Möglichkeit wäre eine vermehrte periphere Aufnahme von extraneural synthetisiertem TNF- α und dessen Transport zu Spinalganglienzellen. Wie in Abschnitt 2.6.2. schon erläutert, sind bei Nervenverletzung verschiedene nicht-neuronale Zellen im perineuralen Gewebe (v.a. Makrophagen und Schwann-Zellen) fähig, ihre Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen (v.a. TNF- α und IL-1 β) zu steigern (Wagner und Myers 1996; Ma und Bisby 1998c; Sommer und Schäfers 1998; Shamash et al. 2002; Shubayev und Myers 2002b). Nachdem schon seit längerer Zeit bekannt ist, dass neurotrophe Substanzen im Axon transportiert werden können (wie z.B. der anterograde axonale Transport von BDNF (Tonra et al. 1998; Mannion et al. 1999) oder der retrograde Transport von NGF (Curtis et al. 1998)), konnte kürzlich der axonale Transport von TNF- α nachgewiesen werden (Shubayev und Myers 2001; Schäfers et al. 2002a; Shubayev und Myers 2002a). So könnte nicht-neuronaler TNF- α von peripher oder zentral gelegenen Produktionsorten aufgenommen und zum Zellkörper der Spinalganglien neurone transportiert werden.

Die endgültige Lösung dieser Frage kann nur der positive oder negative Nachweis einer gesteigerten neuronalen Synthese von TNF- α in der Spinalganglionzelle erbringen. Dies ist allerdings nur mit Hilfe weiterer Versuchstechniken möglich, die Transskriptions-

bzw. Translationsvorgänge auf mRNA-Ebene nachweisen, wie die in-situ Hybridisierung oder die single-cell-PCR.

Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen kann spezifisch das Vorhandensein von Antigenen in bestimmten Gewebsstrukturen nachgewiesen werden. Es wird eine quantitativ messbare Expression dieser Proteine zu einem definierten Zeitpunkt bestimmt. Allerdings können mit dieser Methode andere interessante Parameter nicht bestimmt werden. So kann bei einer einmaligen Messung, wie sie hier durchgeführt wurde, keine Aussage über den Zeitverlauf der Expression der Antigene gemacht werden. Hierzu wären weitere Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten mit zusätzlichen Versuchsgruppen und einem Vielfachen an zeitlichem Aufwand nötig, was im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich war.

5.3.4. Nicht nur geschädigte, sondern auch intakte Afferenzen zeigen eine erhöhte Expression von TNF- α

Durch die Applikation von FG und FR konnte die Veränderung der Expression von TNF- α auch spezifisch in der Population der gesunden und geschädigten Neurone ermittelt werden. Hierbei zeigt sich ein statistisch signifikanter Anstieg der TNF- α Immunreaktivität in den mittelgroßen und großen Neuronen sowohl bei intakten, als auch bei geschädigten Spinalganglienzellen (vgl. Diagramm 11 und 13, sowie Tabelle 5).

In Abschnitt 2.2. wurde bereits erwähnt, dass nach peripherer Nervenverletzung geschädigte wie auch intakte Nervenzellen Spontanaktivität entwickeln, die dann zur Entstehung von Allodynie und Hyperalgesie beitragen kann. In weiteren Studien wurde auch das Zustandekommen phänotypischer Veränderungen bei unverletzten und beschädigten Spinalganglienzellen nachgewiesen. So steigt beispielsweise bei geschädigten Neuronen die Expression von Galanin (Villar et al. 1989), bestimmten Natriumkanälen (Waxman et al. 1994) und NF-kappaB, einem Transkriptionsfaktor, der durch Zytokine und neurotrophe Faktoren aktiviert werden kann (Ma und Bisby 1998c). Bei intakten Spinalganglien-neuronen wurde nach Nervenläsion ein Anstieg von Neuropeptid Y (Ma und Bisby 1998d), BDNF (Fukuoka et al. 2001), α_2 Adrenorezeptor (Xie et al. 1995; Xie et al. 2000) und Substanz P (Ma und Bisby 1998b) nachgewiesen. Die Veränderungen in intakten Neuronen könnten durch den Einfluss erhöhter Konzentrationen

von Zytokinen und neurotrophen Faktoren erklärbar sein, denen unbeschädigte Axone in Reaktion auf eine Verletzung des Nerven ausgesetzt sind.

Die verstärkte Expression von TNF- α in den ungeschädigten Afferenzen kann somit auch bei den erwähnten Prozessen ursächlich beteiligt sein. Ein weiterer Hinweis für die möglicherweise schmerzinduzierende Wirkung des hochregulierten TNF- α in intakten Afferenzen ist die Beobachtung, dass verletzte aber auch benachbarte intakte Neurone eine erhöhte Ansprechrate auf exogenes TNF- α aufweisen (Schäfers et al. 2002b; Schäfers et al. 2003). Doch auch ohne jegliche Nervenläsion entwickeln Spinalganglienneurone Spontanaktivität mit konsekutiver Allodynie und Hyperalgesie, wenn exogenes TNF- α auf das Spinalganglion appliziert wird (Homma et al. 2002; Liu et al. 2002; Schäfers et al. 2002c).

Zusammenfassend kann behauptet werden, dass ungeschädigte Spinalganglienneurone mit intakt gebliebenen Axonen und sensorischen Funktionen durch eine erhöhte Konzentration von TNF- α an der Entstehung neuropathischer Schmerzen nach peripherer Nervenläsion beteiligt sein können. Für diese Entwicklung scheint vor allem die Population der mittelgroßen und großen Spinalganglienneurone mit niedriger Reizschwelle und veränderten phänotypischen Eigenschaften eine große Bedeutung zu haben.

5.3.5. TNF- α in Muskel- und Hautafferenzen

In zwei weiteren Versuchsgruppen wurden durch intradermale (Dermatom L4) und intramuskuläre (M. gastrocnemius) Injektion von FG die Zellkörper der entsprechenden dermalen und muskulären Afferenzen identifiziert und die Veränderung der TNF- α Expression nach CCI in diesen Neuronen untersucht. Hierbei zeigt sich bei beiden Gruppen eine statistisch signifikante Erhöhung der TNF- α Immunreaktivität in intakten mittelgroßen Spinalganglienzellen (FG i.m.: Anstieg von 18% auf 54% aller FG pos. Neurone; FG i.d.: Anstieg von 15% auf 38% aller FG pos. Neurone; vgl. Tabelle 6), wobei dieser Anstieg bei der i.m. Gruppe deutlicher und auch in den einzelnen Untergruppen signifikant nachweisbar ist (vgl. Diagramm 15 und 16).

Dieses Ergebnis beweist, dass die hochregulierte TNF- α Expression im Spinalganglion nicht einer bestimmten Art afferenter Neurone zuzuordnen ist, sondern dass sowohl Haut-, als auch Muskelafferenzen bei diesem Prozess beteiligt sind. Das vermag auch

die nach CCI auftretende taktile Allodynie erklären, nachdem gezeigt wurde, dass exogen appliziertes TNF- α zu Schmerzen führt, wenn es intraplantar (Perkins und Kelly 1994; Junger und Sorkin 2000) und intramuskulär (Schäfers et al. 2002d) injiziert wird. So könnte im Spinalganglion vermehrt produziertes TNF- α anterograd in die Peripherie zu den entsprechenden Nervenendigungen transportiert werden (Schäfers et al. 2002a; Shubayev und Myers 2002a) und dort die beschriebenen Schmerzempfindungen induzieren.

5.3.6. Koexpression von TNF- α mit anderen histochemischen Markern

Um die Neurone, die nach CCI eine erhöhte TNF- α Expression aufweisen, genauer zu charakterisieren, wurden diese auf Immunreaktivität für andere zytochemische Marker-substanzen überprüft (vgl. Abbildung 13 bei den folgenden Aussagen).

Wie oben schon erwähnt, enthalten die mittelgroßen und großen TNF- α positiven Neurone Neurofilament 200 und exprimieren den BDNF Rezeptor trkB. Diese Substanzen sind eindeutige Marker für schnell leitende A-Faser Neurone mit myelinisierten Axonen und niedriger Reizschwelle. Einige der großen TNF- α positiven Neurone weisen auch eine geringe Immunreaktivität für VR1 auf. Die beginnende Expression dieses exzitatorisch und hyperalgesierend wirksamen Kationenkanals (vgl. Abschnitt 2.5.) ist ein weiterer Hinweis für phänotypische Veränderungen der großen Spinalganglienneurone nach CCI mit neuer Bedeutung bei der nozizeptiven Transmission.

Dagegen verändert sich die TNF- α Immunreaktivität der kleinen, primär nozizeptiven Spinalganglienzellen nur wenig (vgl. Diagramm 4). Erwartungsgemäß besitzen viele dieser Neurone die Bindungsfähigkeit für IB4, was diese Zellen als nicht-peptiderge nozizeptive Neurone identifiziert, die zur inneren Lamina II des Hinterhorns projizieren. Viele dieser kleinen Neurone exprimieren auch den Rezeptor für GDNF, den sogenannten RET Rezeptor und auch in dieser Arbeit kann eine gemeinsame Immunreaktivität für TNF- α und RET beobachtet werden. Dasselbe gilt für die VR1 Immunreaktivität in kleinen Neuronen, wobei ja bekannt ist, dass die Produktion von VR1 ebenfalls von der Anwesenheit des GDNF abhängen kann und diese Zellen deswegen eine gemeinsame Expression mit RET aufweisen (vgl. Abschnitt 2.5.).

Interessanterweise zeigen nur wenige TNF- α exprimierende Neurone eine positive Immunfluoreszenz für trkA, dem Rezeptor für NGF und Marker für die peptiderge Popula-

tion der kleinen Spinalganglienzellen. Das deutet darauf hin, dass nach CCI nur wenige TNF- α positive Neurone in der Lamina I und äußeren Lamina II des Hinterhorns enden. Zusammen mit der zuvor beschriebenen Beobachtung kann dies die Vermutung bestätigen, dass die Gruppe der nicht-peptidergen Spinalganglienneurone eine größere Bedeutung bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen besitzt, wogegen die peptiderge Population mehr bei inflammatorischen Reaktionen eine Rolle spielt (Snider und McMahon 1998; Ogun-Muyiwa et al. 1999).

5.4. Verminderte Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in Spinalganglienneuronen nach CCI

Im intakten Spinalganglion weisen 46% der Neurone Immunreaktivität für IL-10 auf, die sich fast ausschließlich aus kleinen Zellen mit weniger als 600 μm^2 Querschnittsfläche zusammensetzen. Nach CCI kommt es zu einer statistisch signifikanten Abnahme der IL-10 Expression auf einen Anteil von 27% der Spinalganglienneurone, wobei das Größenspektrum unverändert bleibt (vgl. Diagramm 5 und Tabelle 4). Mit den hier gewonnenen Ergebnissen lässt sich die Abnahme der IL-10 Immunreaktivität weder der intakten, noch der geschädigten Population der Spinalganglienneurone zuordnen (vgl. Diagramm 12 und 14 und Tabelle 5).

Die geringere IL-10 Expression im Spinalganglion vier Tage nach CCI stimmt mit der Beobachtung überein, dass nach CCI im peripheren Nerven mittels ELISA eine verringerte Konzentration von IL-10 Protein festgestellt wurde (George et al. 2004). Im gleichen Zeitraum nach Nervenschädigung ist jedoch die IL-10 mRNA hochreguliert (Jander et al. 1996; Taskinen et al. 2000; Winkelstein et al. 2001; Kleinschnitz et al. 2004). Die scheinbar widersprüchlichen Aussagen über die Expression der IL-10 mRNA und des IL-10 Proteins kann möglicherweise über ein vermehrtes „turnover“ des Zytokins in den ersten Tagen nach CCI induzierter Nervenläsion erklärt werden (George et al. 2004). Vermutlicherweise kommt es zu späteren Zeitpunkten auch zu einer erhöhten IL-10 Konzentration in den Spinalganglienzellen, was aber in dieser Arbeit nicht gezeigt werden konnte, da ein Zeitverlauf aus genannten Gründen nicht untersucht wurde.

Aufgrund der schmerzreduzierenden Wirkung von IL-10 und der Fähigkeit zur Suppression der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α (Bogdan et al.

1991; Fiorentino et al. 1991; Poole et al. 1995; Wagner et al. 1998), scheint der vermehrte Nachweis der TNF- α Expression und die starke Schmerzentwicklung in den ersten vier Tagen nach CCI auch für eine verminderte Konzentration und damit Wirksamkeit anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-10 im frühen Stadium nach Nervenläsion zu sprechen.

5.5. Verminderte Expression des Capsaicinrezeptors VR1 in kleinen Spinalganglienneuronen nach CCI

Bei der Analyse der VR1 Immunreaktivität ist festzustellen, dass dieser Rezeptor vorwiegend in kleinen und mittelgroßen Neuronen exprimiert wird und dass es nach CCI zu einer deutlichen Reduktion der VR1 Immunreaktivität von 44% auf 28% aller Spinalganglienneurone kommt (vgl. Tabelle 4 und Diagramm 6).

Die Größenverteilung VR1 positiver Neurone ist übereinstimmend mit früheren Beschreibungen der VR1 Expression in IB4 oder CGRP immunreaktiven kleinen und mittelgroßen Neuronen (Ahluwalia et al. 2002; Ma 2002).

Die verminderte VR1 Expression im Spinalganglion nach peripherer Nervenverletzung wird auch von anderen Forschungsgruppen beobachtet, beispielsweise beim Chung-Modell oder bei inkompletter Durchtrennung des peripheren Nerven (Hudson et al. 2001; Rasband et al. 2001). Nach Axotomie wird ebenfalls eine verminderte Konzentration der VR1 mRNA beschrieben (Michael und Priestley 1999). Im Zusammenhang mit diesen Ergebnissen scheint eine frühe Reduktion der VR1 Expression im Spinalganglion auch beim CCI-Modell sehr glaubhaft. Wie schon in Abschnitt 2.5. dargestellt, unterliegt die Expression und Sensitivität des Vanilloid-Rezeptors der Anwesenheit bestimmter neurotropher Faktoren, wie NGF (Shu und Mendell 1999a; Shu und Mendell 1999b; Winston et al. 2001) und GDNF (Ahluwalia et al. 2002). Bei dem hier verwendeten Nervenläsionsmodell der CCI kommt es zu einer teilweisen Unterbrechung des axonalen Transports dieser neurotrophen Faktoren mit folglich verminderter Anreicherung in den entsprechenden Zellkörpern. Es konnte gezeigt werden, dass verminderte Konzentrationen an neurotrophen Faktoren auch zu einer Reduktion der VR1 Synthese (Ogun-Muyiwa et al. 1999) und der Sensitivität für Capsaicin (Winter et al. 1988; Winter et al. 1995; Hu-Tsai et al. 1996) führen. Die geringere Anwesenheit von neurotrophen Faktoren im Zusammenhang mit einer verminderten Synthese von VR1 im

Spinalganglion könnte somit die Reduktion der VR1 Immunreaktivität nach CCI erklären.

Andere Studien beschreiben nach Nervenläsion bei dem Chung-Modell eine erhöhte Expression von VR1 in der Population der ungeschädigten Spinalganglienneurone (Hudson et al. 2001; Rasband et al. 2001; Fukuoka et al. 2002). Diese Beobachtung kann mit den hier gewonnenen Ergebnissen nicht unterstützt werden, da sich bei der Analyse der VR1 Immunreaktivität der ungeschädigten, also FG positiven Neurone, sogar ein leichter Rückgang der VR1 Expression von 36% auf 29% der FG positiven Neurone zeigt, der allerdings statistisch nicht signifikant ist (vgl. Diagramm 12 und Tabelle 5). Dieser Widerspruch könnte einmal durch die verschiedenen verwendeten Läsionsmodelle erklärbar sein. So ist nicht unbedingt davon auszugehen, dass nach der distalen, inkompletten Nervenläsion im CCI Modell dieselben pathologischen Prozesse im Spinalganglion eintreten wie bei der kompletten Unterbindung des Spinalnervens, was beim Chung-Modell der Fall ist. Weiterhin gibt es Unterschiede in der Art der morphologischen Auswertung: während hier eine definierte Grenze für die Farbdichte der immunreaktiven Neurone festgelegt wurde und die Querschnittsfläche nur der Neurone, die eine höherer Dichte aufwiesen, ausgewertet wurde, bestimmte man in der Studie von Hudson et al. die Farbdichte der Neurone und schloss von erhöhten Dichtewerten auf eine vermehrte Expression des Rezeptors. Dabei besteht die Gefahr, dass diese Werte durch die gleichzeitige Überlagerung mit einem retrograd transportierten Farbstoff (Verwendung von Fast Blue zur Identifizierung ungeschädigter Afferenzen) verfälscht werden und diese Ungenauigkeit auch in die Analyse mit einfließt. Außerdem bleibt anzumerken, dass in beiden Fällen verschiedene neuronale Tracer (Fluorogold und Fast Blue) verwendet wurden, die auch unterschiedliche Eigenschaften in ihrem Färbeverhalten aufweisen (Richmond et al. 1994; Puigdellivol-Sanchez et al. 1998).

Aufgrund der hier gewonnenen Ergebnisse kann nicht bestätigt werden, dass der im Spinalganglion exprimierte VR1 einen wesentlichen Beitrag zur Allodynie- und Hyperalgesieentstehung im CCI Modell der Ratte leistet.

5.6. Analyse der Ergebnisse der IB4 und CGRP Immunreaktivität

Die Analyse der Immunreaktivität von IB4 und CGRP brachte keine neuen Ergebnisse und bestätigte Beobachtungen aus vorangegangenen Studien.

Die IB4 Immunreaktivität war im Spinalganglion vorwiegend in den kleinen Neuronen auszumachen (vgl. Diagramm 7) und zeigt nach CCI eine deutliche Reduktion von 51% auf 36% aller Spinalganglienneurone (vgl. Tabelle 4).

Diese Reduktion der IB4 Bindungsfähigkeit der Spinalganglienneurone zu einem frühen Zeitpunkt nach CCI stimmt gut mit der festgestellten verminderten IB4 Immunreaktivität im Spinalganglion nach Durchtrennung des Spinalnervens (Li und Zhou 2001) und nach Axotomie des Nervus ischiadicus (Bennett et al. 1998) überein. Der verminderten IB4 Bindungsfähigkeit scheint eine Veränderung in der Glykoproteinstruktur der betroffenen verletzten Neurone zugrunde zu liegen (Peyronnard et al. 1989). Diese Veränderung in der Gruppe der nicht-peptidergen Spinalganglienneurone könnte ebenso wie bei der Reduktion der VR1 Expression durch eine erniedrigte Konzentration eines neurotrophen Faktors bedingt sein, denn eine erhöhte Zufuhr von GDNF verhinderte die läSIONSbedingten Veränderungen der IB4 Bindungsfähigkeit der Spinalganglienzellen (Bennett et al. 1998).

Die CGRP Immunreaktivität kann vor allem in kleinen und mittelgroßen Spinalganglienzellen mit Querschnittsflächen bis $1200 \mu\text{m}^2$ nachgewiesen werden, wobei etwa in der Kontrollgruppe etwa 40% der Neurone CGRP positiv sind (vgl. Diagramm 8 und Tabelle 4). Bei der CCI Gruppe weisen 43% der Neurone CGRP Immunfluoreszenz auf und es kommt nach CCI weder zu einer Veränderung des Größenspektrums, noch der Anzahl CGRP positiver Neurone. Auch in den Populationen der geschädigten und intakten Neurone ist kein Unterschied der CGRP Immunfluoreszenz zwischen Kontrollgruppe und CCI Gruppe auszumachen (vgl. Tabelle 5).

Das Größenspektrum der hier ermittelten CGRP positiven Neurone steht in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen in zuvor veröffentlichten Studien (Wiesenfeld-Hallin et al. 1984; Ma und Bisby 1998a). Auch kann der Nachweis über unveränderte Expression von CGRP in der peptidergen Population der Spinalganglienneurone nach CCI, der schon beschrieben wurde (Ma und Bisby 1998a), hier bestätigt werden.

So konnten im Fall der IB4 Bindungsfähigkeit der Spinalganglienneurone und der Expression von CGRP keine neuen Erkenntnisse gewonnen werden, aber die Konkordanz der Ergebnisse mit denen anderer Studien spricht für die Validität und korrekte Auswertung der Spinalganglienschnitte im Rahmen dieser Arbeit.

5.7. Schlussfolgerungen und Ausblick

Das pro-inflammatorische Zytokin TNF- α ist schon in vorherigen Arbeiten als ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen identifiziert worden. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass TNF- α nach partieller Nervenläsion im Tiermodell der CCI selektiv in mittelgroßen und großen Spinalganglienneuronen hochreguliert wird. Da neben verletzten insbesondere auch intakte Neurone eine vermehrte Konzentration von TNF- α zeigen, muss nun auch die Population der nicht lädierten afferenten Neurone berücksichtigt werden, wenn der Mechanismus der Allodynie- und Hyperalgesieentwicklung bei neuropathischen Schmerzen diskutiert wird.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergeben sich auch Ansatzpunkte für neue Untersuchungen: So wäre es sicherlich interessant, den Zeitverlauf der TNF- α Expression im Spinalganglion nach einer peripheren Nervenverletzung zu bestimmen. Dies könnte die Frage klären, ob TNF- α auch bei der Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen involviert ist. Eine weitere offene Frage ist die Herkunft des vermehrt exprimierten TNF- α . Ob es von den Neuronen selbst produziertes Protein ist, oder ob es von extraneuralem Gewebe aufgenommen und dann in die Somata der Spinalganglienneurone transportiert wird, wäre durch Untersuchungen wie der in-situ Hybridisierung oder single-cell PCR zu klären.

Bei anderen Krankheitsbildern wurde TNF- α bereits als wichtiges Effektormolekül für die Schmerzentstehung identifiziert und entsprechende Therapien wurden entwickelt. Als bekanntestes Beispiel sollen hier die neuen Therapieansätze bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis erwähnt werden. Seit einigen Jahren ist hier der Einsatz von TNF- α Fusionsproteinen (Etanercept) oder monoklonalen TNF- α Antikörpern (Infliximab und das neuere, rein humane Adalimumab) mit großem Erfolg etabliert (Hochberg et al. 2003; Mikuls und Weaver 2003; Schuerwegh et al. 2003).

Der schmerzreduzierende Effekt einer TNF-Hemmung wurde bei Tiermodellen mit peripherer Nervenläsion mehrfach bestätigt (Watkins et al. 1997; Sommer et al. 2001; Sweitzer et al. 2001; Schäfers et al. 2003). Erste Berichte über eine positive Wirkung von TNF-hemmenden Substanzen bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen sind ebenfalls schon veröffentlicht worden (Ching et al. 2003; Tobinick und Britschgi-Davoodifar 2003; Genevay et al. 2004). Somit könnte in Zukunft der Einsatz TNF- α hemmender Medikamente eine sinnvolle Behandlungsalternative oder -Ergänzung bei Patienten mit therapieresistenten neuropathischen Schmerzen werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Am Tiermodell einer experimentellen Mononeuropathie (chronic constriction injury, CCI) wurde bei Ratten die Expression von Zytokinen (TNF- α , IL-10), Vanilloidrezeptor 1 (VR1) und Neuropeptiden in Spinalganglienneuronen immunhistochemisch analysiert. Durch retrograde Anfärbung mit den Tracern Fluorogold (FG) und Fluoruby (FR) konnten intakte von geschädigten Neuronen unterschieden und Muskel- und Hautafferenzen getrennt untersucht werden. Nach CCI fand sich ein selektiver Anstieg der TNF- α Immunreaktivität in mittelgroßen und großen Spinalganglienneuronen, welche durch Vergleich mit anderen neuronalen Markern als A-Faser Neurone identifiziert werden konnten. Nicht nur geschädigte, sondern auch intakte Spinalganglienneurone wiesen eine erhöhte TNF- α Immunreaktivität auf und sowohl Muskel- als auch Hautafferenzen trugen zur vermehrten TNF- α Expression bei.

IL-10, VR1 und IB4 Immunreaktivität fand sich vor allem in kleinen Neuronen und war nach CCI deutlich reduziert, während die Expression von CGRP in kleinen und mittelgroßen Spinalganglienneuronen nachzuweisen war und keine Veränderung zeigte.

Die Ergebnisse zeigen, dass intakt gebliebene A-Faser Neurone pathophysiologische Veränderungen im Sinne einer vermehrten Expression des pro-inflammatorischen Zytokins TNF- α erfahren. Dieser phänotypische Switch ist möglicherweise mit einer neuen Funktion dieser Neurone im nozizeptiven System verbunden.

Die verminderte Expression des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 vier Tage nach CCI korrespondiert mit der frühen Schmerzentstehung nach peripherer Nervenläsion und der noch fehlenden Suppression der pro-inflammatorischen Zytokine zu diesem Zeitpunkt. Dagegen ist der Rückgang der VR1 und IB4 Konzentrationen im Spinalganglion am ehesten durch einen läsionsbedingten Mangel an neurotrophen Faktoren zu erklären.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die These, dass pro-inflammatorischen Zytokinen, insbesondere TNF- α , eine besondere Bedeutung bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen zukommt. Dies könnte ein Ansatzpunkt für weitere Studien sein, die Wirksamkeit TNF- α hemmender Medikamente bei neuropathischen Schmerzmodellen im Tierversuch und eventuell später klinisch zu untersuchen.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Ahluwalia J, Urban L, Bevan S, Capogna M, Nagy I (2002). Cannabinoid 1 receptors are expressed by nerve growth factor- and glial cell-derived neurotrophic factor-responsive primary sensory neurones. *Neuroscience* 110: 747-53.
- Ali Z, Ringkamp M, Hartke TV, Chien HF, Flavahan NA, Campbell JN, Meyer RA (1999). Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and alpha-adrenergic sensitivity following L6 spinal nerve ligation in monkey. *J Neurophysiol* 81: 455-66.
- Ambalavanar R, Moritani M, Haines A, Hilton T, Dessem D (2003). Chemical phenotypes of muscle and cutaneous afferent neurons in the rat trigeminal ganglion. *J Comp Neurol* 460: 167-79.
- Attal N (2000). Chronic neuropathic pain: mechanisms and treatment. *Clin J Pain* 16: S118-30.
- Baker SJ, Reddy EP (1998). Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* 17: 3261-70.
- Baranowski AP, Anand U, McMahon SB (1992). Retrograde labelling of dorsal root ganglion cells in the rat: a quantitative and morphological comparison of Fluoro-Gold with horseradish peroxidase labelling. *Neurosci Lett* 141: 53-6.
- Baron R, Janig W (1991). Afferent and sympathetic neurons projecting into lumbar visceral nerves of the male rat. *J Comp Neurol* 314: 429-36.
- Bartfai T, Schultzberg M (1993). Cytokines in neuronal cell types. *Neurochem Int* 22: 435-44.
- Bennett DL, Boucher TJ, Armanini MP, Poulsen KT, Michael GJ, Priestley JV, Phillips HS, McMahon SB, Shelton DL (2000). The glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor components are differentially regulated within sensory neurons after nerve injury. *J Neurosci* 20: 427-37.
- Bennett DL, Dmietrieva N, Priestley JV, Clary D, McMahon SB (1996). trkA, CGRP and IB4 expression in retrogradely labelled cutaneous and visceral primary sensory neurones in the rat. *Neurosci Lett* 206: 33-6.
- Bennett DL, Michael GJ, Ramachandran N, Munson JB, Averill S, Yan Q, McMahon SB, Priestley JV (1998). A distinct subgroup of small DRG cells express GDNF receptor components and GDNF is protective for these neurons after nerve injury. *J Neurosci* 18: 3059-72.

- Bennett GJ, Xie YK (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87-107.
- Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A (1985). Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 161: 984-95.
- Bevan S, Szolcsanyi J (1990). Sensory neuron-specific actions of capsaicin: mechanisms and applications. *Trends Pharmacol Sci* 11: 330-3.
- Boeshore KL, Luckey CN, Zigmond RE, Large TH (1999). TrkB isoforms with distinct neurotrophin specificities are expressed in predominantly nonoverlapping populations of avian dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci* 19: 4739-47.
- Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, Nathan C (1992). Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem* 267: 23301-8.
- Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C (1991). Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174: 1549-55.
- Burger D (2000). Cell contact interactions in rheumatology, The Kennedy Institute for Rheumatology, London, UK, 1-2 June 2000. *Arthritis Res* 2: 472-6.
- Calzada B, Naves FJ, Del Valle ME, Vega JA (1994). Distribution of protein gene product 9.5 (PGP 9.5) immunoreactivity in the dorsal root ganglia of adult rat. *Anat Anz* 176: 437-41.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389: 816-24.
- Cesare P, Moriondo A, Vellani V, McNaughton PA (1999). Ion channels gated by heat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7658-63.
- Ching DWT, McClintock A, Beswick F (2003). Successful treatment with low-dose thalidomide in a patient with both Behcet's disease and complex regional pain syndrome type I. *J Clin Rheumatology* 9: 96-98.
- Chopra B, Giblett S, Little JG, Donaldson LF, Tate S, Evans RJ, Grubb BD (2000). Cyclooxygenase-1 is a marker for a subpopulation of putative nociceptive neurons in rat dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* 12: 911-20.
- Chul Han H, Hyun Lee D, Mo Chung J (2000). Characteristics of ectopic discharges in a rat neuropathic pain model. *Pain* 84: 253-61.
- Chung KF (2001). Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J Suppl* 34: 50s-59s.

- Copray JC, Mantingh I, Brouwer N, Biber K, Kust BM, Liem RS, Huitinga I, Tilders FJ, Van Dam AM, Boddeke HW (2001). Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. *J Neuroimmunol* 118: 203-11.
- Cordell GA, Araujo OE (1993). Capsaicin: identification, nomenclature, and pharmacotherapy. *Ann Pharmacother* 27: 330-6.
- Cunha FQ, Poole S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1992). The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol* 107: 660-4.
- Curtis R, Tonra JR, Stark JL, Adryan KM, Park JS, Cliffer KD, Lindsay RM, DiStefano PS (1998). Neuronal injury increases retrograde axonal transport of the neurotrophins to spinal sensory neurons and motor neurons via multiple receptor mechanisms. *Mol Cell Neurosci* 12: 105-18.
- Czaja K (2000). Distribution of primary afferent neurons innervating the porcine oviduct and their immunohistochemical characterization. *Cells Tissues Organs* 166: 275-82.
- Dado RJ, Burstein R, Cliffer KD, Giesler GJ, Jr. (1990). Evidence that Fluoro-Gold can be transported avidly through fibers of passage. *Brain Res* 533: 329-33.
- Davidson J, Abul HT, Milton AS, Rotondo D (2001). Cytokines and cytokine inducers stimulate prostaglandin E2 entry into the brain. *Pflugers Arch* 442: 526-33.
- Day AS, Lue JH, Sun WZ, Shieh JY, Wen CY (2001). A beta-fiber intensity stimulation of chronically constricted median nerve induces c-fos expression in thalamic projection neurons of the cuneate nucleus in rats with behavioral signs of neuropathic pain. *Brain Res* 895: 194-203.
- Devor M, Seltzer Z (1999). Pathophysiology of damaged peripheral nerves in relation to chronic pain. *Textbook of pain*. PD W and M R. Edinburgh, Churchill Livingstone: 129-164.
- Di Marzo V, Blumberg PM, Szallasi A (2002). Endovanilloid signaling in pain. *Curr Opin Neurobiol* 12: 372-9.
- Empl M, Renaud S, Erne B, Fuhr P, Straube A, Schaeren-Wiemers N, Steck AJ (2001). TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology* 56: 1371-7.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 147: 3815-22.
- Fritsch B, Sonntag R (1991). Sequential double labelling with different fluorescent dyes coupled to dextran amines as a tool to estimate the accuracy of tracer application and of regeneration. *J Neurosci Methods* 39: 9-17.

- Fukuoka T, Kondo E, Dai Y, Hashimoto N, Noguchi K (2001). Brain-derived neurotrophic factor increases in the uninjured dorsal root ganglion neurons in selective spinal nerve ligation model. *J Neurosci* 21: 4891-900.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E, Miki K, Tachibana T, Noguchi K (1998). Change in mRNAs for neuropeptides and the GABA(A) receptor in dorsal root ganglion neurons in a rat experimental neuropathic pain model. *Pain* 78: 13-26.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Kondo E, Noguchi K (2000). The role of neighbouring intact dorsal root ganglion neurons in a rat neuropathic pain model. *Progress in pain research and management*. Devor M, MC Rowbotham and Z Wiesenfeld-Hallin. Seattle, IASP. 16: 137-146.
- Fukuoka T, Tokunaga A, Tachibana T, Dai Y, Yamanaka H, Noguchi K (2002). VR1, but not P2X3 increases in the spared L4 DRG in rats with L5 spinal nerve ligation. *Pain*: in press.
- Garcia-Nicas E, Laird JM, Cervero F (2001). Vasodilatation in hyperalgesic rat skin evoked by stimulation of afferent A beta-fibers: further evidence for a role of dorsal root reflexes in allodynia. *Pain* 94: 283-91.
- Garrett WT, McBride RL, Williams JK, Jr., Feringa ER (1991). Fluoro-Gold's toxicity makes it inferior to True Blue for long-term studies of dorsal root ganglion neurons and motoneurons. *Neurosci Lett* 128: 137-9.
- Genevay S, Stingelin S, Gabay C (2004). Efficacy of etanercept in the treatment of acute and severe sciatica. A pilot study. *Ann Rheum Dis*.
- George A, Kleinschnitz C, Zelenka M, Brinkhoff J, Stoll G, Sommer C (2004). Wallerian degeneration after crush or chronic constriction injury of rodent sciatic nerve is associated with a depletion of endoneurial interleukin-10 protein. *Exp Neurol* 188: 187-91.
- George A, Marziniak M, Schafers M, Toyka KV, Sommer C (2000). 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* 88: 267-75.
- George A, Schmidt C, Weishaupt A, Toyka KV, Sommer C (1999). Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol* 160: 124-32.
- Gimenez F, Barraud De Lagerie S, Fernandez C, Pino P, Mazier D (2003). Tumor necrosis factor alpha in the pathogenesis of cerebral malaria. *Cell Mol Life Sci* 60: 1623-35.
- Glover JC, Petursdottir G, Jansen JK (1986). Fluorescent dextran-amines used as axonal tracers in the nervous system of the chicken embryo. *J Neurosci Methods* 18: 243-54.

- Gold MS (2000). Spinal nerve ligation: what to blame for the pain and why. *Pain* 84: 117-120.
- Goldstein ME, House SB, Gainer H (1991). NF-L and peripherin immunoreactivities define distinct classes of rat sensory ganglion cells. *J Neurosci Res* 30: 92-104.
- Gomez-Ramirez AM, Villegas-Perez MP, Miralles de Imperial J, Salvador-Silva M, Vidal-Sanz M (1999). Effects of intramuscular injection of botulinum toxin and doxorubicin on the survival of abducens motoneurons. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40: 414-24.
- Griffin JW, George R, Ho T (1993). Macrophage systems in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 553-60.
- Gruss HJ, Dower SK (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85: 3378-404.
- Guo A, Simone DA, Stone LS, Fairbanks CA, Wang J, Elde R (2001). Developmental shift of vanilloid receptor 1 (VR1) terminals into deeper regions of the superficial dorsal horn: correlation with a shift from TrkA to Ret expression by dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* 14: 293-304.
- Hartung M, Leah J, Zimmerman M (1989). The excitation of cutaneous nerve endings in a neuroma by capsaicin. *Brain Res* 499: 363-6.
- Helliwell RJ, McLatchie LM, Clarke M, Winter J, Bevan S, McIntyre P (1998). Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci Lett* 250: 177-80.
- Herdegen T, Leah JD (1998). Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 28: 370-490.
- Hochberg MC, Tracy JK, Hawkins-Holt M, Flores RH (2003). Comparison of the efficacy of the tumour necrosis factor alpha blocking agents adalimumab, etanercept, and infliximab when added to methotrexate in patients with active rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62 Suppl 2: II13-II16.
- Hollifield RD, Harbige LS, Pham-Dinh D, Sharief MK (2003). Evidence for cytokine dysregulation in multiple sclerosis: peripheral blood mononuclear cell production of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines during relapse and remission. *Autoimmunity* 36: 133-41.
- Homma Y, Brull SJ, Zhang JM (2002). A comparison of chronic pain behavior following local application of tumor necrosis factor alpha to the normal and mechanically compressed lumbar ganglia in the rat. *Pain* 95: 239-46.

- Honda T, Takahashi M, Sugiura Y (1999). Co-localization of the glial cell-line derived neurotrophic factor and its functional receptor c-RET in a subpopulation of rat dorsal root ganglion neurons. *Neurosci Lett* 275: 45-8.
- Hu SJ, Xing JL (1998). An experimental model for chronic compression of dorsal root ganglion produced by intervertebral foramen stenosis in the rat. *Pain* 77: 15-23.
- Hudson LJ, Bevan S, Wotherspoon G, Gentry C, Fox A, Winter J (2001). VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur J Neurosci* 13: 2105-14.
- Hu-Tsai M, Woolf C, Winter J (1996). Influence of inflammation or disconnection from peripheral target tissue on the capsaicin sensitivity of rat dorsal root ganglion sensory neurones. *Neurosci Lett* 203: 119-22.
- IASP (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage. Recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain* 6: 249.
- Ichikawa H, Sugimoto T (2000). Vanilloid receptor 1-like receptor-immunoreactive primary sensory neurons in the rat trigeminal nervous system. *Neuroscience* 101: 719-25.
- Jancso G, Kiraly E, Jancso-Gabor A (1977). Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* 270: 741-3.
- Jander S, Pohl J, Gillen C, Stoll G (1996). Differential expression of interleukin-10 mRNA in Wallerian degeneration and immune-mediated inflammation of the rat peripheral nervous system. *J Neurosci Res* 43: 254-9.
- Junger H, Sorkin LS (2000). Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha. *Pain* 85: 145-51.
- Kanaan SA, Poole S, Saade NE, Jabbur S, Safieh-Garabedian B (1998). Interleukin-10 reduces the endotoxin-induced hyperalgesia in mice. *J Neuroimmunol* 86: 142-50.
- Kashiba H, Noguchi K, Ueda Y, Senba E (1995). Coexpression of trk family members and low-affinity neurotrophin receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res Mol Brain Res* 30: 158-64.
- Kashiba H, Uchida Y, Senba E (2001). Difference in binding by isolectin B4 to trkA and c-ret mRNA-expressing neurons in rat sensory ganglia. *Brain Res Mol Brain Res* 95: 18-26.
- Kashiba H, Uchida Y, Senba E (2003). Distribution and colocalization of NGF and GDNF family ligand receptor mRNAs in dorsal root and nodose ganglion neurons of adult rats. *Brain Res Mol Brain Res* 110: 52-62.

- Kerekes N, Landry M, Lundmark K, Hökfelt T (2000). Effect of NGF, BDNF, bFGF, aFGF and cell density on NPY expression in cultured rat dorsal root ganglion neurones. *J Auton Nerv Syst* 81: 128-38.
- Kim KY, Kim MY, Choi HS, Jin BK, Kim SU, Lee YB (2002). Thrombin induces IL-10 production in microglia as a negative feedback regulator of TNF-alpha release. *Neuroreport* 13: 849-52.
- Kim SH, Chung JM (1992). An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* 50: 355-63.
- Kitamura S, Richmond FJ (1994). Distribution of motoneurons supplying dorsal and ventral suboccipital muscles in the feline neck. *J Comp Neurol* 347: 25-35.
- Kleinschnitz C, Brinkhoff J, Zelenka M, Sommer C, Stoll G (2004). The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling. *J Neuroimmunol* 149: 77-83.
- Lai J, Hunter JC, Porreca F (2003). The role of voltage-gated sodium channels in neuropathic pain. *Curr Opin Neurobiol* 13: 291-7.
- Lawson SN (2002). Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres. *Exp Physiol* 87: 239-44.
- Li L, Zhou XF (2001). Pericellular Griffonia simplicifolia I isolectin B4-binding ring structures in the dorsal root ganglia following peripheral nerve injury in rats. *J Comp Neurol* 439: 259-74.
- Li Y, Dorsi MJ, Meyer RA, Belzberg AJ (2000). Mechanical hyperalgesia after an L5 spinal nerve lesion in the rat is not dependent on input from injured nerve fibers. *Pain* 85: 493-502.
- Lindenlaub T, Sommer C (2002). Epidermal innervation density after partial sciatic nerve lesion and pain-related behavior in the rat. *Acta Neuropathol (Berl)* 104: 137-43.
- Liu B, Li H, Brull SJ, Zhang JM (2002). Increased sensitivity of sensory neurons to tumor necrosis factor alpha in rats with chronic compression of the lumbar ganglia. *J Neurophysiol* 88: 1393-9.
- Liu B-G, Hastings SL, Li H, Y.-P. J, Brull SJ, Zhang JM (2000a). Tumor necrosis factor-alpha enhances the excitability of dorsal root ganglion cells with unmyelinated axons. *Soc Neurosci Abstr* 26: 1695.
- Liu CN, Michaelis M, Amir R, Devor M (2000b). Spinal nerve injury enhances subthreshold membrane potential oscillations in DRG neurons: relation to neuropathic pain. *J Neurophysiol* 84: 205-15.

- Liu CN, Wall PD, Ben-Dor E, Michaelis M, Amir R, Devor M (2000c). Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* 85: 503-21.
- Liu X, Eschenfelder S, Blenk KH, Janig W, Habler H (2000d). Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats. *Pain* 84: 309-18.
- Lu CR, Hwang SJ, Phend KD, Rustioni A, Valtchanoff JG (2003). Primary afferent terminals that express presynaptic NR1 in rats are mainly from myelinated, mechanosensitive fibers. *J Comp Neurol* 460: 191-202.
- Ma QP (2002). Expression of capsaicin receptor (VR1) by myelinated primary afferent neurons in rats. *Neurosci Lett* 319: 87-90.
- Ma W, Bisby MA (1998a). Increase of calcitonin gene-related peptide immunoreactivity in the axonal fibers of the gracile nuclei of adult and aged rats after complete and partial sciatic nerve injuries. *Exp Neurol* 152: 137-49.
- Ma W, Bisby MA (1998b). Increase of preprotachykinin mRNA and substance P immunoreactivity in spared dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injury. *Eur J Neurosci* 10: 2388-99.
- Ma W, Bisby MA (1998c). Increased activation of nuclear factor kappa B in rat lumbar dorsal root ganglion neurons following partial sciatic nerve injuries. *Brain Res* 797: 243-54.
- Ma W, Bisby MA (1998d). Partial and complete sciatic nerve injuries induce similar increases of neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide immunoreactivities in primary sensory neurons and their central projections. *Neuroscience* 86: 1217-34.
- Ma W, Bisby MA (2000). Calcitonin gene-related peptide, substance P and protein gene product 9.5 immunoreactive axonal fibers in the rat footpad skin following partial sciatic nerve injuries. *J Neurocytol* 29: 249-62.
- MacEwan DJ (2002a). TNF ligands and receptors--a matter of life and death. *Br J Pharmacol* 135: 855-75.
- MacEwan DJ (2002b). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal* 14: 477-92.
- Mannion RJ, Costigan M, Decosterd I, Amaya F, Ma QP, Holstege JC, Ji RR, Acheson A, Lindsay RM, Wilkinson GA, Woolf CJ (1999). Neurotrophins: peripherally and centrally acting modulators of tactile stimulus-induced inflammatory pain hypersensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 9385-90.
- Marie C, Pitton C, Fitting C, Cavaillon JM (1996). IL-10 and IL-4 synergize with TNF-alpha to induce IL-1ra production by human neutrophils. *Cytokine* 8: 147-51.

- Marvizon JC, McRoberts JA, Ennes HS, Song B, Wang X, Jinton L, Corneliussen B, Mayer EA (2002). Two N-methyl-D-aspartate receptors in rat dorsal root ganglia with different subunit composition and localization. *J Comp Neurol* 446: 325-41.
- Marx A (2002). *Grundlagen der Schmerztherapie. Spezielle Schmerztherapie.* Schockenhoff. München: 3-21.
- McMahon SB, Bennett, D. L. H. (1999). Trophic factors and pain. *Textbook of pain.* Patrick D. Wall RM. Edinburgh, Churchill Livingstone: 105-128.
- Michael GJ, Averill S, Shortland PJ, Yan Q, Priestley JV (1999). Axotomy results in major changes in BDNF expression by dorsal root ganglion cells: BDNF expression in large trkB and trkC cells, in pericellular baskets, and in projections to deep dorsal horn and dorsal column nuclei. *Eur J Neurosci* 11: 3539-51.
- Michael GJ, Priestley JV (1999). Differential expression of the mRNA for the vanilloid receptor subtype 1 in cells of the adult rat dorsal root and nodose ganglia and its downregulation by axotomy. *J Neurosci* 19: 1844-54.
- Michaelis M, Vogel C, Blenk KH, Arnarson A, Janig W (1998). Inflammatory mediators sensitize acutely axotomized nerve fibers to mechanical stimulation in the rat. *J Neurosci* 18: 7581-7.
- Mikuls TR, Weaver AL (2003). Lessons learned in the use of tumor necrosis factor- α inhibitors in the treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 5: 270-7.
- Moore KW, Vieira P, Fiorentino DF, Trounstein ML, Khan TA, Mosmann TR (1990). Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248: 1230-4.
- Munger BL, Bennett GJ, Kajander KC (1992). An experimental painful peripheral neuropathy due to nerve constriction. I. Axonal pathology in the sciatic nerve. *Exp Neurol* 118: 204-14.
- Murphy PG, Grondin J, Altares M, Richardson PM (1995). Induction of interleukin-6 in axotomized sensory neurons. *J Neurosci* 15: 5130-8.
- Myers RR, Heckman HM, Galbraith JA, Powell HC (1991). Subperineurial demyelination associated with reduced nerve blood flow and oxygen tension after epineurial vascular stripping. *Lab Invest* 65: 41-50.
- Nance DM, Burns J (1990). Fluorescent dextrans as sensitive anterograde neuroanatomical tracers: applications and pitfalls. *Brain Res Bull* 25: 139-45.
- Neumann S, Doubell TP, Leslie T, Woolf CJ (1996). Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic switch in myelinated primary sensory neurons. *Nature* 384: 360-4.

- Noguchi K, Kawai Y, Fukuoka T, Senba E, Miki K (1995). Substance P induced by peripheral nerve injury in primary afferent sensory neurons and its effect on dorsal column nucleus neurons. *J Neurosci* 15: 7633-43.
- Ogilvy CS, Borges LF (1988). A quantitative analysis of the retrograde axonal transport of 4 different fluorescent dyes in peripheral sensory and motor neurons and lack of anterograde transport in the corticospinal system. *Brain Res* 475: 244-53.
- Ogun-Muyiwa P, Helliwell R, McIntyre P, Winter J (1999). Glial cell line derived neurotrophic factor (GDNF) regulates VR1 and substance P in cultured sensory neurons. *Neuroreport* 10: 2107-11.
- Ohtori S, Takahashi K, Chiba T, Yamagata M, Sameda H, Moriya H (2001). Brain-derived neurotrophic factor and vanilloid receptor subtype 1 immunoreactive sensory DRG neurons innervating the lumbar facet joints in rats. *Auton Neurosci* 94: 132-5.
- Okamoto K, Martin DP, Schmelzer JD, Mitsui Y, Low PA (2001). Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Exp Neurol* 169: 386-91.
- Otto M, Bak S, Bach FW, Jensen TS, Sindrup SH (2003). Pain phenomena and possible mechanisms in patients with painful polyneuropathy. *Pain* 101: 187-92.
- Perkins MN, Kelly D (1994). Interleukin-1 beta induced-desArg⁹bradykinin-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neuropharmacology* 33: 657-60.
- Perlmutter DH, Dinarello CA, Punsal PI, Colten HR (1986). Cachectin/tumor necrosis factor regulates hepatic acute-phase gene expression. *J Clin Invest* 78: 1349-54.
- Perry MJ, Lawson SN, Robertson J (1991). Neurofilament immunoreactivity in populations of rat primary afferent neurons: a quantitative study of phosphorylated and non-phosphorylated subunits. *J Neurocytol* 20: 746-58.
- Persson JK, Lindh B, Elde R, Robertson B, Rivero-Melian C, Eriksson NP, Hokfelt T, Aldskogius H (1995). The expression of different cytochemical markers in normal and axotomised dorsal root ganglion cells projecting to the nucleus gracilis in the adult rat. *Exp Brain Res* 105: 331-44.
- Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Cooper BY (2002). Chemical responsiveness and histochemical phenotype of electrophysiologically classified cells of the adult rat dorsal root ganglion. *Neuroscience* 115: 15-30.
- Petruska JC, Napaporn J, Johnson RD, Gu JG, Cooper BY (2000). Subclassified acutely dissociated cells of rat DRG: histochemistry and patterns of capsaicin-, proton-, and ATP-activated currents. *J Neurophysiol* 84: 2365-79.
- Peyronnard JM, Charron L, Messier JP, Lavoie J, Leger C, Faraco-Cantin F (1989). Changes in lectin binding of lumbar dorsal root ganglia neurons and peripheral

- axons after sciatic and spinal nerve injury in the rat. *Cell Tissue Res* 257: 379-88.
- Pieribone VA, Aston-Jones G (1988). The iontophoretic application of Fluoro-Gold for the study of afferents to deep brain nuclei. *Brain Res* 475: 259-71.
- Plunkett JA, Yu CG, Easton JM, Bethea JR, Yeziarski RP (2001). Effects of interleukin-10 (IL-10) on pain behavior and gene expression following excitotoxic spinal cord injury in the rat. *Exp Neurol* 168: 144-54.
- Poole S, Cunha FQ, Selkirk S, Lorenzetti BB, Ferreira SH (1995). Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10. *Br J Pharmacol* 115: 684-8.
- Porreca F, Lai J, Bian D, Wegert S, Ossipov MH, Eglen RM, Kassotakis L, Novakovic S, Rabert DK, Sangameswaran L, Hunter JC (1999). A comparison of the potential role of the tetrodotoxin-insensitive sodium channels, PN3/SNS and NaN/SNS2, in rat models of chronic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7640-4.
- Prats-Galino A, Puigdemiviol-Sanchez A, Ruano-Gil D, Molander C (1999). Representations of hindlimb digits in rat dorsal root ganglia. *J Comp Neurol* 408: 137-45.
- Puigdemiviol-Sanchez A, Prats-Galino A, Ruano-Gil D, Molander C (1998). Efficacy of the fluorescent dyes Fast Blue, Fluoro-Gold, and Diamidino Yellow for retrograde tracing to dorsal root ganglia after subcutaneous injection. *J Neurosci Methods* 86: 7-16.
- Puigdemiviol-Sanchez A, Valero-Cabre A, Prats-Galino A, Navarro X, Molander C (2002). On the use of fast blue, fluoro-gold and diamidino yellow for retrograde tracing after peripheral nerve injury: uptake, fading, dye interactions, and toxicity. *J Neurosci Methods* 115: 115-27.
- Qiao L, Vizzard MA (2002). Up-regulation of tyrosine kinase (Trka, Trkb) receptor expression and phosphorylation in lumbosacral dorsal root ganglia after chronic spinal cord (T8-T10) injury. *J Comp Neurol* 449: 217-30.
- Rasband MN, Park EW, Vanderah TW, Lai J, Porreca F, Trimmer JS (2001). Distinct potassium channels on pain-sensing neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 13373-8.
- Richmond FJ, Gladdy R, Creasy JL, Kitamura S, Smits E, Thomson DB (1994). Efficacy of seven retrograde tracers, compared in multiple-labelling studies of feline motoneurons. *J Neurosci Methods* 53: 35-46.
- Rivera L, Gallar J, Pozo MA, Belmonte C (2000). Responses of nerve fibres of the rat saphenous nerve neuroma to mechanical and chemical stimulation: an in vitro study. *J Physiol* 527 Pt 2: 305-13.

-
- Ryffel B, Mihatsch MJ (1993). TNF receptor distribution in human tissues. *Int Rev Exp Pathol* 34 Pt B: 149-56.
- Saade NE, Massaad CA, Ochoa-Chaar CI, Jabbur SJ, Safieh-Garabedian B, Atweh SF (2002). Upregulation of proinflammatory cytokines and nerve growth factor by intraplantar injection of capsaicin in rats. *J Physiol* 545: 241-53.
- Sasaki H, Kihara M, Zollman PJ, Nickander KK, Smithson IL, Schmelzer JD, Willner CL, Benarroch EE, Low PA (1997). Chronic constriction model of rat sciatic nerve: nerve blood flow, morphologic and biochemical alterations. *Acta Neuropathol (Berl)* 93: 62-70.
- Sauer SK, Reeh PW, Bove GM (2001). Noxious heat-induced CGRP release from rat sciatic nerve axons in vitro. *Eur J Neurosci* 14: 1203-8.
- Schäfers M, Brinkhoff J, Neukirchen S, Marziniak M, Sommer C (2001). Combined epineurial therapy with neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 receptor has an additive effect in reducing neuropathic pain in mice. *Neurosci Lett* 310: 113-6.
- Schäfers M, Geis C, Brors D, Yaksh TL, Sommer C (2002a). Anterograde transport of tumor necrosis factor-alpha in the intact and injured rat sciatic nerve. *J Neurosci* 22: 536-45.
- Schäfers M, Geis C, Svensson CI, Luo ZD, Sommer C (2003a). Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci* 17: 791-804.
- Schäfers M, Lee D, Sorkin LS (2002b). Injured but also adjacent uninjured dorsal root ganglion neurons are sensitized to tumor necrosis factor-alpha. *J Pain* 3: 26.
- Schäfers M, Lee DH, Brors D, Yaksh TL, Sorkin LS (2003b). Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 23: 3028-38.
- Schäfers M, Maruyama K, Sorkin LS (2002c). Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after injection into a lumbar dorsal root ganglion. *J Pain* 3: 26.
- Schäfers M, Marziniak M, Sorkin LS, Yaksh TL, Sommer C (2004). Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat. *Exp Neurol* 185: 160-8.
- Schäfers M, Sorkin LS, Geis C, Shubayev VI (2003c). 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* 347: 179-82.
- Schäfers M, Sorkin LS, Sommer C (2002d). Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia. *J Pain* 3: 34.

- Schmalbruch H (1987). The number of neurons in dorsal root ganglia L4-L6 of the rat. *Anat Rec* 219: 315-22.
- Schmued LC, Fallon JH (1986). Fluoro-Gold: a new fluorescent retrograde axonal tracer with numerous unique properties. *Brain Res* 377: 147-54.
- Schuerwegh AJ, Van Offel JF, Stevens WJ, Bridts CH, De Clerck LS (2003). Influence of therapy with chimeric monoclonal tumour necrosis factor-alpha antibodies on intracellular cytokine profiles of T lymphocytes and monocytes in rheumatoid arthritis patients. *Rheumatology (Oxford)* 42: 541-8.
- Segond von Banchet G, Pastor A, Biskup C, Schlegel C, Benndorf K, Schaible HG (2002). Localization of functional calcitonin gene-related peptide binding sites in a subpopulation of cultured dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience* 110: 131-45.
- Shamash S, Reichert F, Rotshenker S (2002). The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta. *J Neurosci* 22: 3052-60.
- Sharief MK, McLean B, Thompson EJ (1993). Elevated serum levels of tumor necrosis factor-alpha in Guillain-Barre syndrome. *Ann Neurol* 33: 591-6.
- Sheen K, Chung JM (1993). Signs of neuropathic pain depend on signals from injured nerve fibers in a rat model. *Brain Res* 610: 62-8.
- Shu X, Mendell LM (1999a). Nerve growth factor acutely sensitizes the response of adult rat sensory neurons to capsaicin. *Neurosci Lett* 274: 159-62.
- Shu XQ, Llinas A, Mendell LM (1999). Effects of trkB and trkC neurotrophin receptor agonists on thermal nociception: a behavioral and electrophysiological study. *Pain* 80: 463-70.
- Shu XQ, Mendell LM (1999b). Neurotrophins and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7693-6.
- Shubayev VI, Myers RR (2001). Axonal transport of TNF-alpha in painful neuropathy: distribution of ligand tracer and TNF receptors. *J Neuroimmunol* 114: 48-56.
- Shubayev VI, Myers RR (2002a). Anterograde TNF alpha transport from rat dorsal root ganglion to spinal cord and injured sciatic nerve. *Neurosci Lett* 320: 99-101.
- Shubayev VI, Myers RR (2002b). Endoneurial remodeling by TNFalpha- and TNFalpha-releasing proteases. A spatial and temporal co-localization study in painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 7: 28-36.
- Simone DA, Ngeow JY, Putterman GJ, LaMotte RH (1987). Hyperalgesia to heat after intradermal injection of capsaicin. *Brain Res* 418: 201-3.

- Simone DA, Sorkin LS, Oh U, Chung JM, Owens C, LaMotte RH, Willis WD (1991). Neurogenic hyperalgesia: central neural correlates in responses of spinothalamic tract neurons. *J Neurophysiol* 66: 228-46.
- Snider WD, McMahon SB (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron* 20: 629-32.
- Sommer C, Galbraith JA, Heckman HM, Myers RR (1993). Pathology of experimental compression neuropathy producing hyperesthesia. *J Neuropathol Exp Neurol* 52: 223-33.
- Sommer C, Lindenlaub T, Teuteberg P, Schafers M, Hartung T, Toyka KV (2001). Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain Res* 913: 86-9.
- Sommer C, Marziniak M, Myers RR (1998a). The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. *Pain* 74: 83-91.
- Sommer C, Schäfers M (1998). 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* 784: 154-62.
- Sommer C, Schmidt C, George A (1998b). Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Exp Neurol* 151: 138-42.
- Sorkin LS, Xiao WH, Wagner R, Myers RR (1997). Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience* 81: 255-62.
- Stucky CL, Lewin GR (1999). Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. *J Neurosci* 19: 6497-505.
- Suzuki G, Ochi M, Shu N, Uchio Y, Matsuura Y (1998). Sensory neurons regenerate more dominantly than motoneurons during the initial stage of the regenerating process after peripheral axotomy. *Neuroreport* 9: 3487-92.
- Sweitzer S, Martin D, DeLeo JA (2001). Intrathecal interleukin-1 receptor antagonist in combination with soluble tumor necrosis factor receptor exhibits an anti-allodynic action in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience* 103: 529-39.
- Swett JE, Torigoe Y, Elie VR, Bourassa CM, Miller PG (1991). Sensory neurons of the rat sciatic nerve. *Exp Neurol* 114: 82-103.
- Szallasi A, Blumberg PM (1996). Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain* 68: 195-208.
- Szallasi A, Blumberg PM (1999). Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 51: 159-212.

- Tang FR, Tan CK, Ling EA (1995). A light-microscopic study of the intermediolateral nucleus following injection of CB-HRP and fluorogold into the superior cervical ganglion of the rat. *J Auton Nerv Syst* 50: 333-8.
- Taskinen HS, Olsson T, Bucht A, Khademi M, Svelander L, Roytta M (2000). Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN-gamma, IL-10 and TNF-alpha mRNA. *J Neuroimmunol* 102: 17-25.
- Tobinick EL, Britschgi-Davoodifar S (2003). Perispinal TNF-alpha inhibition for discogenic pain. *Swiss Med Wkly* 133: 170-7.
- Tognetto M, Amadesi S, Harrison S, Creminon C, Trevisani M, Carreras M, Matera M, Geppetti P, Bianchi A (2001). Anandamide excites central terminals of dorsal root ganglion neurons via vanilloid receptor-1 activation. *J Neurosci* 21: 1104-9.
- Tonra JR, Curtis R, Wong V, Cliffer KD, Park JS, Timmes A, Nguyen T, Lindsay RM, Acheson A, DiStefano PS (1998). Axotomy upregulates the anterograde transport and expression of brain-derived neurotrophic factor by sensory neurons. *J Neurosci* 18: 4374-83.
- Tsuzuki K, Kondo E, Fukuoka T, Yi D, Tsujino H, Sakagami M, Noguchi K (2001). Differential regulation of P2X(3) mRNA expression by peripheral nerve injury in intact and injured neurons in the rat sensory ganglia. *Pain* 91: 351-60.
- Verge VM, Xu Z, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T (1992). Marked increase in nitric oxide synthase mRNA in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy: in situ hybridization and functional studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 11617-21.
- Villar MJ, Cortes R, Theodorsson E, Wiesenfeld-Hallin Z, Schalling M, Fahrenkrug J, Emson PC, Hokfelt T (1989). Neuropeptide expression in rat dorsal root ganglion cells and spinal cord after peripheral nerve injury with special reference to galanin. *Neuroscience* 33: 587-604.
- Vizzard MA, Erdman SL, de Groat WC (1995). Increased expression of neuronal nitric oxide synthase (NOS) in visceral neurons after nerve injury. *J Neurosci* 15: 4033-45.
- Wagner R, Janjigian M, Myers RR (1998). Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression. *Pain* 74: 35-42.
- Wagner R, Myers RR (1996a). Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain behaviors. *Neuroreport* 7: 2897-901.
- Wagner R, Myers RR (1996b). Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression in injured and non-injured nerves. *Neuroscience* 73: 625-9.

- Walker KM, Urban L, Medhurst SJ, Patel S, Panesar M, Fox AJ, McIntyre P (2003). The VR1 antagonist capsazepine reverses mechanical hyperalgesia in models of inflammatory and neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 304: 56-62.
- Watkins LR, Martin D, Ulrich P, Tracey KJ, Maier SF (1997). Evidence for the involvement of spinal cord glia in subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Pain* 71: 225-35.
- Waxman SG, Kocsis JD, Black JA (1994). Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J Neurophysiol* 72: 466-70.
- Welk E, Leah JD, Zimmermann M (1990). Characteristics of A- and C-fibers ending in a sensory nerve neuroma in the rat. *J Neurophysiol* 63: 759-66.
- Wells MR, Racis SP, Jr., Vaidya U (1992). Changes in plasma cytokines associated with peripheral nerve injury. *J Neuroimmunol* 39: 261-8.
- Wessendorf MW, Elde RP (1985). Characterization of an immunofluorescence technique for the demonstration of coexisting neurotransmitters within nerve fibers and terminals. *J Histochem Cytochem* 33: 984-94.
- Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T, Lundberg JM, Forssmann WG, Reinecke M, Tschopp FA, Fischer JA (1984). Immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P coexist in sensory neurons to the spinal cord and interact in spinal behavioral responses of the rat. *Neurosci Lett* 52: 199-204.
- Winkelstein BA, Rutkowski MD, Sweitzer SM, Pahl JL, DeLeo JA (2001). Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment. *J Comp Neurol* 439: 127-39.
- Winston J, Toma H, Shenoy M, Pasricha PJ (2001). Nerve growth factor regulates VR-1 mRNA levels in cultures of adult dorsal root ganglion neurons. *Pain* 89: 181-6.
- Winter J, Bevan S, Campbell EA (1995). Capsaicin and pain mechanisms. *Br J Anaesth* 75: 157-68.
- Winter J, Forbes CA, Sternberg J, Lindsay RM (1988). Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to the excitotoxin capsaicin. *Neuron* 1: 973-81.
- Won MH, Park HS, Jeong YG, Park HJ (1998). Afferent innervation of the rat pancreas: retrograde tracing and immunohistochemistry in the dorsal root ganglia. *Pancreas* 16: 80-7.
- Woolf CJ (1992). Excitability changes in central neurons following peripheral damage. *Hyperalgesia and Allodynia*. Willis WD. New York, Raven: 221-243.

- Wu G, Ringkamp M, Hartke TV, Murinson BB, Campbell JN, Griffin JW, Meyer RA (2001). Early onset of spontaneous activity in uninjured C-fiber nociceptors after injury to neighboring nerve fibers. *J Neurosci* 21: RC140.
- Xie J, Chung JM, Chung K (2000). Differential expression of subtypes of alpha- α A adrenoreceptor mRNA in sensory neurons after spinal nerve ligation. *Soc Neurosci Abstr* 26: 945.
- Xie Y, Zhang J, Petersen M, LaMotte RH (1995). Functional changes in dorsal root ganglion cells after chronic nerve constriction in the rat. *J Neurophysiol* 73: 1811-20.
- Xu GY, Zhao ZQ (2001). Change in excitability and phenotype of substance P and its receptor in cat A β sensory neurons following peripheral inflammation. *Brain Res* 923: 112-9.
- Yoon YW, Na HS, Chung JM (1996). Contributions of injured and intact afferents to neuropathic pain in an experimental rat model. *Pain* 64: 27-36.
- Yoshimura N, Erdman SL, Snider MW, de Groat WC (1998). Effects of spinal cord injury on neurofilament immunoreactivity and capsaicin sensitivity in rat dorsal root ganglion neurons innervating the urinary bladder. *Neuroscience* 83: 633-43.
- Zhang JM, Li H, Liu B, Brull SJ (2002). Acute topical application of tumor necrosis factor alpha evokes protein kinase A-dependent responses in rat sensory neurons. *J Neurophysiol* 88: 1387-92.
- Zhang X, Verge V, Wiesenfeld-Hallin Z, Ju G, Brecht D, Synder SH, Hokfelt T (1993). Nitric oxide synthase-like immunoreactivity in lumbar dorsal root ganglia and spinal cord of rat and monkey and effect of peripheral axotomy. *J Comp Neurol* 335: 563-75.
- Zhou XF, Chie ET, Deng YS, Zhong JH, Xue Q, Rush RA, Xian CJ (1999). Injured primary sensory neurons switch phenotype for brain-derived neurotrophic factor in the rat. *Neuroscience* 92: 841-53.
- Zimmermann M (2001). Pathobiology of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol* 429: 23-37.
- Zwick M, Davis BM, Woodbury CJ, Burkett JN, Koerber HR, Simpson JF, Albers KM (2002). Glial cell line-derived neurotrophic factor is a survival factor for isolectin B4-positive, but not vanilloid receptor 1-positive, neurons in the mouse. *J Neurosci* 22: 4057-65.

DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meiner Betreuerin, Frau Professor Dr. med. Claudia Sommer für die interessante Themenstellung und die sehr intensive Betreuung der vorliegenden Arbeit meinen besonderen Dank aussprechen. Die Unterstützung zu jedem Zeitpunkt des Projektes und die äußerst schnelle Hilfestellung bei auftretenden Problemen möchte ich besonders hervorheben. Außerdem bedanke ich mich, dass sie mir die Gelegenheit gab, die interessante Arbeit auf dem Gebiet der Neurowissenschaften in Ihrer Arbeitsgruppe fortführen zu können.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Dr. med. Maria Schäfers für die ständige Mitbetreuung und die vielen Anregungen und Ideen im Verlauf des Projektes bedanken. Weiterhin war es für mich eine besonders lehrreiche Erfahrung, unter Ihrer Leitung im Forschungslabor für Anästhesie von Frau Professor Linda Sorkin an der University of California San Diego mitarbeiten zu können.

Herrn Professor Dr. med. Wolfgang Roggendorf, Leiter der Abteilung für Neuropathologie der Universität Würzburg, danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats und für das Interesse, das er dieser Arbeit entgegengebracht hat.

Bei Frau Lydia Biko möchte ich mich herzlich für die Hilfe und die wertvollen Ratschläge beim Umgang mit den Versuchstieren und bei der Gewebeentnahme bedanken. Frau Barbara Dekant danke ich besonders für die aufwendige Unterstützung beim Anfertigen der Spinalganglienschnitte und der Immunfluoreszenzfärbungen.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Christian Geis
Adresse	Buhlleite 16 97236 Randersacker Tel.: 0931/3049686; 0175/7162108
Geburtsdatum/-ort	16.09.1976 in Würzburg
Familienstand	ledig

SCHULBILDUNG

1983 – 1987	Grundschule
1987 – 1996	Riemenschneider-Gymnasium Würzburg
1996	Abitur

ZIVILDIENTST

1996 – 1997	Theresienklinik Würzburg
-------------	--------------------------

UNIVERSITÄTSSTUDIUM

11/1997 – 05/2004	Medizinstudium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
08/1999	Ärztliche Vorprüfung
08/2000	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

KLINISCHE AUSBILDUNG

Famulaturen

04/2000	Chirurgische Abteilung des Kreiskrankenhauses Kitzingen
03/2001	National Society for Epilepsy, Chalfont St. Peter; Institute of Neurology, Queen Square, London, UK
04-05/2002	Praxis für Allgemeinmedizin, Dr. med Dieter Geis
06-07/2002	Abteilung für Innere Medizin der Universität Sevilla, Spanien

Medizinisch-praktisches Jahr

04-08/2003 (1. Tertial)	Abteilung für Innere Medizin der Missionsärztlichen Klinik, Würzburg
08-10/2003	Abteilung für Chirurgie der Missionsärztlichen Klinik, Würzburg
10-11/2003 (2. Tertial)	Neurochirurgische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg
12/2003-01/2004	Neurochirurgische Abteilung, Universitätsklinik Basel
02-03/2004 (3. Tertial)	Chirurgische Abteilung, Universitätsklinik Basel

Arzt im Praktikum

Seit 07/2004	Neurologische Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg
--------------	---

WISSENSCHAFTLICHE AUSBILDUNG

Seit 09/2000	Promotionsarbeit in der neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg
08-09/2002	Laboraaufenthalt an der University of California San Diego, USA, Forschungsabteilung für Anästhesie
09/2002	2. Preis des Förderpreis für Schmerzforschung durch Mitarbeit bei der Arbeit: "Anterograde transport of tumor necrosis factor-alpha in the intact and injured rat sciatic nerve." (Schäfers, M., C. Geis, et al. (2002), J Neurosci 22(2): 536-45)

VERÖFFENTLICHUNGEN

Poster

Schäfers, M., Geis, C., Toyka K.V., Sommer, C., 2001 „Tumor necrosis factor-alpha is increased in spared DRG neurons following chronic constrictive injury of rat sciatic nerve”. Meeting of the Society for Neuroscience 2001, San Diego, USA

Originalarbeiten

Schäfers M, Geis C, Brors D, Yaksh TL, Sommer C (2002). Anterograde transport of tumor necrosis factor-alpha in the intact and injured rat sciatic nerve. J Neurosci 22: 536-45.

Schäfers M, Geis C, Svensson CI, Luo ZD, Sommer C (2003). Selective increase of tumour necrosis factor-alpha in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. Eur J Neurosci 17: 791-804.

Schäfers M, Sorkin LS, Geis C, Shubayev VI (2003). 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 347: 179-82.

Würzburg, 22. November 2004