

**Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg  
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. Norbert Roewer**

# **Untersuchungen zur Neurotoxizität bei Öffnung der Blut-Nerven-Schranke**

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

**vorgelegt von  
Benedikt Felix Niedermirtl  
aus Lauf an der Pegnitz**

**Würzburg, Juni 2015**

**Referentin:** Prof. Dr. med. Heike Rittner

**Koreferentin:** Prof. Dr. med. Claudia Sommer

**Dekan:** Prof. Dr. med. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 30.06.2016

**Der Promovend ist Arzt.**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Neurotoxizität .....	1
1.1.1 Entzündung und CD68-Färbung .....	4
1.1.2 Fasermorphologie und Richardson-Färbung.....	5
1.1.3 Schmerz und Verhaltensversuche .....	6
1.2 Vorübergehende Öffnung der Blut-Nerven-Schranke zur lokalen Applikation von Pharmaka.....	8
1.2.1 Aufbau der Blut-Nerven-Schranke .....	8
1.2.2 Öffnung durch Anwendung hypertoner Substanzen .....	13
1.2.3 Das C1C2-Peptid .....	15
1.2.4 Der Gewebefibrinolytischer Plasminogenaktivator tPA .....	17
1.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe .....	19
1.4 Fragestellung .....	23
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.1 Tiere.....	24
2.2 Histologie .....	24
2.2.1 Injektion, Operation und Probenentnahme.....	24
2.2.2 Immunhistochemie.....	25
2.2.3 Kunstharzeinbettung und Richardson-Färbung.....	26
2.3 Mikroskopie.....	27
2.4 CD68-Index.....	27
2.5 Histomorphometrie.....	28
2.6 Software.....	30
2.7 Statistische Auswertung.....	30
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>31</b>

3.1	Einwanderung von CD68+ Makrophagen als Maß für eine Entzündungsreaktion bei Nervenschädigung .....	31
3.2	Morphologische Darstellung der Nerven nach Richardson .....	36
3.2.1	Morphologische Alteration der Nervenfasern .....	38
3.2.2	Verhältnis von Myelinschicht und Faserdurchmesser als Maß für Demyelinisierung und axoplasmatisches Ödem .....	39
3.2.3	Unterschiede in der Faserdichte als Maß für Faseruntergänge .....	40
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>41</b>
4.1	Diskussion der Methoden.....	41
4.1.1	Zeitpunkt der Probenentnahme.....	41
4.1.2	CD68-Färbung .....	41
4.1.3	Histomorphometrie.....	42
4.2	Diskussion der Ergebnisse.....	44
4.2.1	Entzündung und Makrophagenanzahl .....	44
4.2.2	Histomorphometrie.....	45
4.3	Schlussfolgerungen und Ausblick .....	49
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>52</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>54</b>
<b>7.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>69</b>
<b>8.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>71</b>

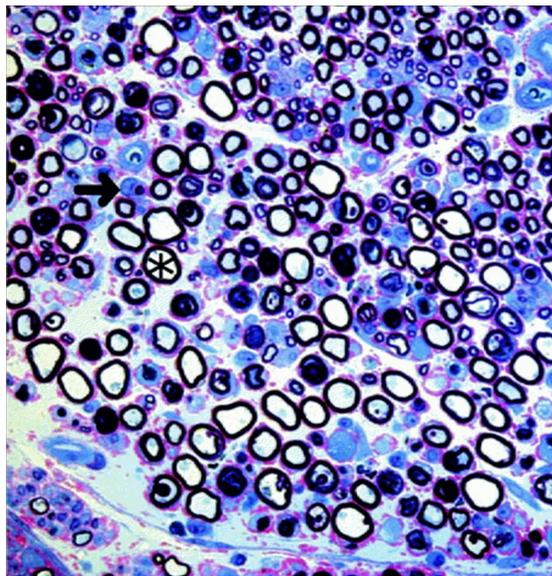
# 1. Einleitung

## 1.1 Neurotoxizität

Die intraneurale Homöostase ist für das Funktionieren des Nervensystems von essentieller Bedeutung. Die Blut-Nerven-Schranke stellt einen funktionierenden Mechanismus dar, das Innere des Nerven vor äußeren Einflüssen weitestgehend abzuschirmen. Mehrere Krankheiten, deren Ätiologie noch nicht vollständig geklärt ist, werden mit dem Zusammenbruch der Blut-Nerven-Schranke in Verbindung gebracht. So zum Beispiel die chronisch-entzündliche demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP), die durch multifokale Demyelinisierungen charakterisiert ist. Diese können den Nerven im gesamten Verlauf von der Nervenwurzel bis hin zu den Nervenendigungen betreffen [1]. Ähnliches gilt für das Guillain-Barré-Syndrom, eine IgG-vermittelte, demyelinisierende Autoimmunkrankheit. Hier kann ein Zusammenhang zwischen dem Ort des Auftretens der Demyelinisierungen und Orten der relativen Schwäche der Blut-Nervenschranke festgestellt werden [2]. Folglich wird angenommen, dass der Durchtritt von pathologischen T-Zellen, Zytokinen und Immunglobulinen aus dem Blut in den Nerven durch eine unvollständige Schrankenfunktion begünstigt wird [3]. Auf der anderen Seite scheint aber auch das Krankheitsgeschehen selbst am Niedergang der Barriere beteiligt zu sein [4]. Im Rahmen der Erkrankung führen die Demyelinisierungen zu einer Störung der Reizweiterleitung, was sich vor allem an den stark myelinisierten Fasern des motorischen Systems durch Ausfälle und Abschwächung der Eigenreflexe äußert [5].

Neben den genannten Krankheiten sind auch zahlreiche Medikamente bekannt, die bei systemischer Anwendung neurotoxisches Potential besitzen und damit im Stande sind, periphere Neuropathien auszulösen. Allen voran finden sich Chemotherapeutika - wie Platinderivate oder Vincaalkaloide - die zur Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt werden [6]. Mit der Anwendung chemotherapeutischer Substanzen gehen funktionelle und strukturelle Veränderungen der Nerven einher. Am häufigsten betroffen sind myelinisierte sensible Fasern im Sinne einer Axonopathie (Untergang des

Axons bei erhaltener Myelinscheide). Weiterhin finden sich auch Verluste ganzer Nervenfasern und Demyelinisierungen geschädigter bzw. gesunder Axone [7]. Auch die lokale Anwendung von Substanzen direkt am Nerven birgt das Risiko einer Schädigung desselben. Bei Tierversuchen mit Amitriptylin, einem trizyklischen Antidepressivum, zeigt sich ein dosisabhängiger Schaden im Sinne einer Wallerschen Degeneration [8]. Hierunter versteht man Fragmentation und Abbau der Myelinschicht und des Axons distal des schädigenden Prozesses. Proximal der Läsion beginnt die Regeneration [9]. Bei direkter Anwendung von Amitriptylin auf neuronale Zellkulturen aus Spinalganglien von Ratten (DRG: Dorsal root ganglia) lässt sich ein dosisabhängiger Untergang der Neurone feststellen [10]. Abbildung 1 zeigt beispielhaft die Veränderungen nach perineuraler Anwendung von Amitriptylin.



**Abb. 1: Neurotoxizität von Amitriptylin**

Nervenpräparat entnommen 3 d nach perineuraler Injektion von 1,25 mg Amitriptylin

Färbung nach Richardson, aufgenommen mit 20er Objektiv.

Dunkelfärbungen des Axoplasmas deuten auf einen axonalen Schaden hin

\*: Ödematöses Axon

→: Aktivierte Schwann-Zelle

*Entnommen und modifiziert aus: Estebe, Jean-Pierre; Myers, Robert – Amitriptyline Neurotoxicity: Dose-related Pathology after Topical Application to Rat Sciatic Nerve. Anesthesiology 2004; 6: 1522, Abbildung 1*

Die Substanzgruppe, die am häufigsten lokal am Nerven angewendet wird, ist die Gruppe der Lokalanästhetika. Sie findet breite Anwendung bei regionalen Verfahren der Anästhesie, wie Epiduralanästhesien im Rahmen einer Sectio caesarea, Spinalanästhesien bei Eingriffen an der unteren Extremität, Plexusblockaden, z.B. der interskalenären Blockade des Plexus brachialis, aber auch bei peripheren Nervenblockaden wie z.B. in der Zahnheilkunde [11].

Ihre Wirkung entfalten Lokalanästhetika durch Interaktion mit Natriumkanälen in der Membran von Nervenfasern. Durch reversible Blockade der Kanäle kann ein analgetischer Effekt erzielt werden. Strukturell weisen alle Substanzen einen aromatischen Ring auf, welcher entweder durch eine Amid- oder Esterbindung mit dem restlichen Molekül verbunden ist. Die Art der Bindung charakterisiert sie als Ester- bzw. Amid-Lokalanästhetika [12].

Lokalanästhetika weisen ein charakteristisches Nebenwirkungsprofil auf. Neben den bekannten, wenn auch seltenen systemischen Nebenwirkungen der Kardio- und ZNS-Toxizität [13] kann auch ein lokaler Effekt an peripheren Nerven nach der Anwendung von Lokalanästhetika beobachtet werden. So wird von einer Veränderung der Permeabilität des Perineuriums mit einhergehendem Ödem, Demyelinisierungen und Axonschädigungen sowie von abnormen Mastzellproliferationen nach Anwendung von Ester-Lokalanästhetika berichtet [14]. Auch bei Anwendung von Amid-Lokalanästhetika lässt sich dieser Effekt, wenn auch in geringerem Maße, feststellen [15].

Ein heutzutage gängiges Lokalanästhetikum stellt Ropivacain, ein Vertreter des Amidtyps, dar. Trotz seiner vergleichsweise schwach ausgeprägten lipophilen Eigenschaften, vermag es die Blut-Nerven-Schranke zu penetrieren und eine potente analgetische Wirkung zu erzielen [16]. Bei direkter Langzeitanwendung am Rückenmark, welches von Ratten entnommen wurde, kann eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Apoptose-Rate beobachtet werden [17]. Zu einem gleichlautenden Ergebnis kommen Williams et al. bei Anwendung von Ropivacain an isolierten sensiblen Neuronen von Ratten [18]. Die genannten Beispiele verdeutlichen, dass mit der Penetration der Blut-Nerven-Schranke auch das Risiko einer Schädigung der Nerven einhergeht.

Im Zusammenhang der beschriebenen Krankheiten geschieht die Schädigung durch die Wirkung der Bestandteile des Immunsystems. Im Falle der genannten Pharmaka entfalten diese selbst eine neurotoxische Wirkung.

In dieser Arbeit werden verschiedene Möglichkeiten vorgestellt, die Blut-Nerven-Schranke durch pharmakologische Interventionen zu öffnen. Auch diese Öffnung kommt einem Verlust der Schutzfunktion gleich. Durch geeignete Untersuchungen, die in den folgenden Kapiteln vorgestellt werden, soll eine mögliche Schädigung der Nerven durch die Öffnung der Blut-Nerven-Schranke untersucht werden.

### **1.1.1 Entzündung und CD68-Färbung**

Die Entzündungsreaktion stellt einen Schutzmechanismus des Körpers dar, welcher gegen physikalische (Hitze, Kälte, Trauma, Bestrahlung) und chemische Noxen (Säuren, Laugen, Reizstoffe) aus der Umwelt sowie mikrobielle Erreger gerichtet ist. Ausdruck findet die Entzündung durch die Leitsymptome Dolor (Schmerz), Calor (Überwärmung), Tumor (Schwellung), Rubor (Rötung) und Functio laesa (gestörte Funktion). Je nach Persistenz der Gewebsschädigung entwickelt sich eine akute oder eine chronische Entzündung. Durch die Freisetzung von Entzündungsmediatoren (Histamin, Prostaglandine, Leukotriene und Zytokine) kommt es zu einer lokalen Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung des Endothels in umliegenden Kapillaren [19]. Weiterhin findet eine Margination von Leukozyten aus dem strömenden Blut hin zur Wand der Kapillare statt und schließlich - durch Chemotaxis mediiert - ihre Emigration aus den Gefäßen in das Gewebe [20]. Dort können sie phagozytotisch bzw. als Effektorzellen der Entzündungsreaktion wirken. Bereits 15 min nach der Gewebsschädigung beginnt die Emigration (vor allem durch neutrophile Granulozyten) und erreicht nach etwa sechs bis 24 h ihr Maximum [19]. Nach 24 bis 48 h werden die neutrophilen Granulozyten, bedingt durch ihre geringe Halbwertszeit im Gewebe, durch unspezifische Monozyten ersetzt. Diese differenzieren sich zu gewebständigen Makrophagen und stellen vor allem bei chronischen Entzündungen die dominante Leukozytenpopulation dar. Abweichungen von diesem Muster existieren z. B. bei viraler bzw. immunologisch-hypersensitiver

Genese. In deren Rahmen stellen Lymphozyten bzw. eosinophile Granulozyten den Hauptanteil der Leukozyten dar [21].

Die Halbwertszeit von Monozyten im Blut beträgt etwa einen Tag, wohingegen gewebständige, extravaskuläre Makrophagen eine Halbwertszeit von Monaten bis hin zu mehreren Jahren aufweisen. Im Gegensatz zur akuten Entzündung, im Rahmen derer die Makrophagen wieder verschwinden, persistieren sie bei einer chronischen Entzündung im Gewebe aufgrund kontinuierlich anhaltender Emigration aus den Gefäßen und lokaler Proliferation [22]. Die Migration und die phagozytotische Aktivität der Makrophagen kann auch im Rahmen von experimentell induzierten Schädigungen peripherer Nerven beobachtet werden. Hier sind sie an der Phagozytose des zellulären Debris und des Myelins beteiligt [23]. Angesichts dieser Tatsache sowie der langen Halbwertszeit, stellt die Makrophagenpopulation einen geeigneten Parameter dar, eine Entzündungsreaktion zu visualisieren. Zur Detektion von Makrophagen findet der Nachweis von CD68 heute weit verbreitete Anwendung [24, 25]. CD68 lässt sich in der Plasmamembran als auch in zytoplasmatischen Granula in myeloiden Zellen (vor allem in Monozyten und deren Abkömmlingen) nachweisen. In geringem Ausmaß kann es auch in Granula in neutrophilen Granulozyten beobachtet werden [26]. Funktionell wird CD68 der Gruppe der Scavenger-Rezeptoren zugeordnet. Diese binden als integrale Membranproteine ein breites Spektrum an Liganden, z.B. LDL, apoptotische Zellen und Pathogene und sind somit an deren Phagozytose beteiligt [27]. Eine verstärkte Expression von Scavenger-Rezeptoren inklusive CD68 kann auch bei der multiplen Sklerose (Encephalomyelitis disseminata) und der damit verbundenen Demyelinisierung des ZNS festgestellt werden [28]. Hinsichtlich der Expression von CD68 besteht eine positive Korrelation zur phagozytotischen Aktivität der Zelle. Weiterhin lässt sich auch eine CD68-Expression in Fibroblasten feststellen, die allerdings zu gering ausgeprägt ist, als dass sie immunhistochemisch darstellbar wäre [29].

### **1.1.2 Fasermorphologie und Richardson-Färbung**

Verletzungen oder Noxen können einen Nerven schädigen, was sich in einem Verlust von motorischen, sensorischen oder autonomen Funktionen äußern

kann [30]. Die Endstrecke dieser Schädigung ist die bereits beschriebene Wallersche Degeneration. Distal des schädigenden Prozesses werden sowohl Axon als auch Myelin mittels einer Entzündungsreaktion fragmentiert und abgebaut, während proximal der Läsion die Regeneration beginnt [9]. Bei dieser Reaktion werden die Schwann-Zellen aktiviert und zur Proliferation angeregt. Weiterhin werden ortsständige Makrophagen rekrutiert sowie weitere aus der Peripherie angelockt, um den zellulären Debris beseitigen zu können [31]. Bereits zwei Tage nach der Schädigung der Nerven lassen sich vermehrt Makrophagen nachweisen. In diesem Zeitraum lässt sich auch die Degeneration des Myelins beobachten. Die Kontinuität dieser wird unterbrochen und es bilden sich kleine Fragmente von eiförmiger Gestalt, die auch im Zytoplasma von Schwann-Zellen neben eingelagerten Lipidtröpfchen zu finden sind [23].

In dieser Arbeit erfolgte die morphologische Darstellung der Nervenfasern und ihrer Myelinscheiden nach Einbettung der Präparate in Kunstharz durch eine Färbung mit Azur-Methylenblau nach Richardson [32]. Die Färbung der histologischen Schnitte mit Azur-Methylenblau und Bearbeitung mit Osmiumlösung bewirkt eine deutliche Färbung der Myelinscheiden sichtbar. Osmium fungiert als starkes Oxidationsmittel und lagert sich deshalb in besonderem Maße an intramolekulare Doppelbindungen von Lipiden an, welche im Myelin zahlreich vorhanden sind. Neben dem gewünschten Effekt der Fixierung bewirkt dies einen schwarzen Farbumschlag, der den Effekt der eigentlichen Färbung verstärkt. Die Behandlung mit dem Polymer-Gemisch, dem sog. Kunstharz, dient der langfristigen Fixierung [33].

### **1.1.3 Schmerz und Verhaltensversuche**

Die International Association for the Study of Pain (IASP) definiert Schmerz als ein unangenehmes sensorisches und emotionales Erlebnis, welches mit einem tatsächlichen oder potentiellen Gewebsschaden einhergeht oder im Hinblick auf solch eine Schädigung beschrieben wird [34]. Schmerz (Dolor) stellt ein Leitsymptom der Entzündungsreaktion dar [19]. Er kann deshalb neben den potentiellen morphologischen Veränderungen ebenfalls als Indikator einer Entzündung betrachtet werden.

Darüber hinaus kann bei Entzündung, wie bereits erwähnt, die Blut-Nerven-Schranke geöffnet werden. Hierdurch kommt es auch zu einer Beteiligung des Nerveninneren am Entzündungsgeschehen.

Als Folge dieser Beteiligung kann es zur Ausbildung neuropathischer Schmerzen kommen, mediiert durch proinflammatorische Zytokine, wie z.B. Interleukin-1 $\beta$ , aber auch durch direkte mechanische Schädigung des Nerven selbst. Neuropathische Schmerzen können sich dann in Form von Hyperalgesie, Spontanschmerzen und Allodynie äußern [35]. Unter Allodynie versteht man die Auslösung von Schmerzen durch einen Stimulus, welcher unter normalen Bedingungen kein schmerzauslösendes Potential besitzt [34]. Auch die Einwanderung von Makrophagen im Rahmen von Entzündungsreaktionen des Nerven scheint durch die Sekretion eigener inflammatorischer Proteine (MIP: Macrophage Inflammatory Protein) die Entstehung von neuropathischen Schmerzen im Tiermodell zu begünstigen [36]. Lim et al. zeigten, dass auch VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und Fibrinogen - zwei Proteine, die ebenfalls im Rahmen der Entzündungsreaktion vermehrt auftreten – die Entstehung neuropathischer Schmerzen bei gestörter Blut-Nerven-Schranke begünstigen können [37].

Im Falle einer Entzündung wird der Schmerz durch lokale Sensibilisierung der Nervenendigungen durch Entzündungsmediatoren ausgelöst, was durch den Niedergang der Schrankenfunktion begünstigt wird. Ob jedoch die Unterbrechung der Schrankenfunktion selbst einen Stimulus zur Entstehung von Schmerzen darstellt, wurde bis dato nicht untersucht.

An der Entstehung des Entzündungsschmerzes sind neben den Entzündungsmediatoren auch Änderungen des lokalen Milieus beteiligt. Bereits 1929 konnte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Kalium und Protonen (also dem pH-Wert) und der Schmerzintensität festgestellt werden [38, 39]. Da die Blut-Nerven-Schranke eine Diffusionsbarriere für Elektrolyte darstellt [40], besteht die Möglichkeit, dass durch deren Zusammenbruch eine Ionen-Verschiebung und damit einhergehend auch eine Nozizeptor-Sensibilisierung und Schmerzempfindung ausgelöst werden können.

Weiterhin erscheint es denkbar, dass Flüssigkeit ungehindert in das Nerveninnere diffundiert. Das dadurch entstehende intraneurale Ödem kann auf Nervenfasern und Blutgefäße komprimierend einwirken, was letztendlich zu einer Neuropathie führt [41].

In Anbetracht dieser Überlegungen entschieden wir uns, geeignete Verhaltensexperimente in die Versuchsreihen aufzunehmen, um die Entstehung einer Hyperalgesie zu untersuchen. Randall und Selitto entwickelten 1957 eine Methode, den Entzündungsschmerz zu untersuchen und Effekte von Testsubstanzen auf mechanische nozizeptive Schwellen im Verhaltensversuch aufzuzeigen. Im Rahmen dieses Versuchsaufbaus wird mechanischer Druck als nozizeptiver Stimulus genutzt [42]. Die von Hargreaves et al. im Jahre 1988 entwickelte Versuchsanordnung nutzt thermische Energie als nozizeptiven Stimulus, um thermische nozizeptive Schwellen zu messen [43].

Im folgenden Kapitel wird die Funktionsweise der Blut-Nerven-Schranke vorgestellt. Weiterhin wird auf die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pharmaka eingegangen, welche eine kurzzeitige Öffnung der Schranke auslösen können.

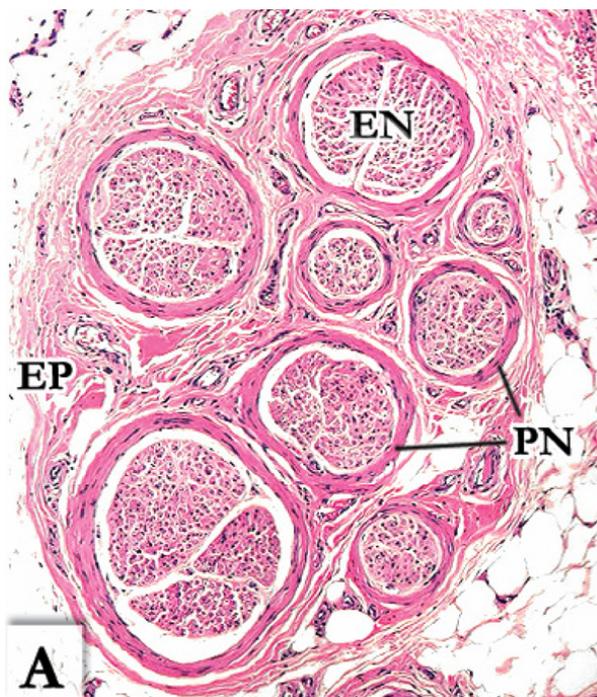
## **1.2 Vorübergehende Öffnung der Blut-Nerven-Schranke zur lokalen Applikation von Pharmaka**

### **1.2.1 Aufbau der Blut-Nerven-Schranke**

Der periphere Nerv lässt sich in drei Zellschichten einteilen: Endo-, Peri-, und Epineurium (gezeigt in Abbildung 2). Entwicklungsgeschichtlich entsteht das Endoneurium aus dem Neuroektoderm, das Peri- und Epineurium hingegen, gehen aus Fibroblasten, also aus dem Mesenchym hervor, angeregt durch die Aussprossung der Nerven [44, 45].

Das Endoneurium beinhaltet größtenteils Axone sowie die umgebenden Schwann-Zellen. Das Epineurium, welches sich beim Übergang des zentralen auf das periphere Nervensystem aus der Dura mater fortsetzt, ist ein dichtes faser- und fetthaltiges Bindegewebe, welches die einzelnen Nervenfaszikel umgibt und letztlich zum makroskopisch erkennbaren Nerven zusammenfasst.

Das Perineurium stellt das Korrelat von Pia und Arachnoidea im peripheren Nervensystem dar. Es besteht aus abgeflachten Zellen mit spindelförmigen Kernen, welche in konzentrischen Schichten um die Nervenfaszikel angeordnet sind und von einer Basalmembran und Kollagenfasern umringt sind. Zusammen mit den Endothelien der endoneuralen Blutgefäße bildet das Perineurium die Blut-Nerven-Schranke [46].



**Abb. 2: Querschnitt eines menschlichen peripheren Nerven**

Darstellung der drei Kompartimente in HE-Färbung und 100-facher Vergrößerung

- EN:** Endoneurium
- EP:** Epineurium
- PN:** Perineurium

*Entnommen aus: Pina-Oviedo, S., Ortiz-Hidalgo, C. - The normal and neoplastic perineurium: a review. Advances in anatomic pathology 2008: 3: 148, Abbildung 1A*

Die Dicke des Perineuriums und die Anzahl der Zellen, welche die Nervenfaszikel konzentrisch umgeben, sind variabel. Die Anzahl der Perineuralzellen steigt, je mehr Faszikel der Nerv beinhaltet und ist abhängig von der Lokalisation am Nerven (nahe am Abgang des Astes und nahe an der peripheren Nervenendigung sind mehr Zellen zu finden) [47].

Das Perineurium kann außerdem morphologisch in verschiedene Schichten unterteilt werden. In der innersten Schicht, also an der dem Endoneurium zugewandten Seite, findet sich eine Lage von interdigitierenden Zellen, die durch Tight Junctions miteinander verbunden sind. Die intermediäre Schicht besteht aus konzentrischen Zelllagen, deren Anzahl variiert, meist zwischen

drei und 15 Lagen. In der äußeren Schicht verliert sich die konzentrische Anordnung der Perineuralzellen und geht über in das Epineurium [47].

Für eine physiologische Nervenfunktion ist die Aufrechterhaltung der Homöostase des endoneuralen Raums notwendig, welche durch zwei Mechanismen erreicht wird. Dies ist zum einen die Basalmembran, welche durch ihre negative Ladung eine Funktion als „Molekularsieb“ [48] erfüllt und mehrere Schichten der Perineuralzellen umhüllt. Zum anderen ist es die Limitation des parazellulären Stoffaustauschs durch die Bildung eines dichten Netzwerks von Tight Junctions zwischen den Perineuralzellen. Damit einhergehend sind gezielte, aktive, transzelluläre Transportmechanismen für Stoffe [48].

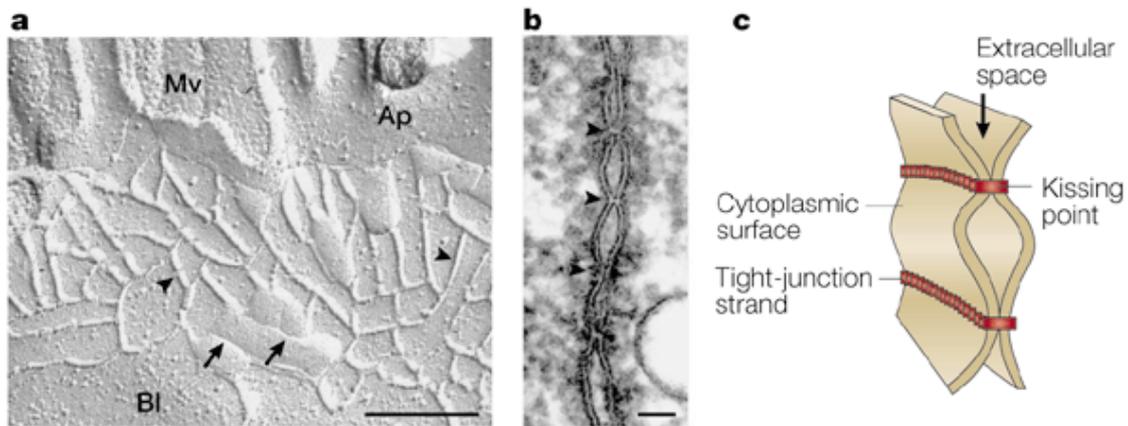
Makromoleküle, wie Proteintracer (Albumin, Hämoglobin und Meerrettichperoxidase) können bei intakter Schrankenfunktion nicht in das Endoneurium gelangen [49, 50]. Eine Schrankenfunktion kann zudem nachgewiesen werden, wenn Lanthansalze als Tracersubstanz verwendet werden. Sie können das Endoneurium nur bei Vorhandensein von zytopathologischen Veränderungen in der äußersten Schicht des Perineuriums erreichen [51].

Das Netzwerk von interzellulären Tight Junctions scheint für die Funktion der Blut-Nerven-Schranke von herausragender Bedeutung zu sein [52]. Den Tight Junctions werden zwei Hauptfunktionen zugeschrieben: die sogenannten „Fence“- und „Gate“-Funktionen [40]. Unter „Fence“ versteht man die Limitation der Diffusion von Membranlipiden und -proteinen, sodass ihre Lokalisierung in der basolateral-apikalen Achse erhalten bleibt. Eine Dislokation von einem Membrankompartiment in das jeweils andere wird somit unterbunden. Die „Gate“-Funktion beschreibt die Limitation der parazellulären Diffusion von Ionen und Nicht-Elektrolyten [40]. Am Aufbau der Tight junctions sind vier Proteingruppen beteiligt: Gerüst-, Signal-, Steuerungs- und Transmembranproteine. Letztere stellen aufgrund ihrer Ultrastruktur die wahrscheinlichsten Kandidaten für die Ausbildung der Schrankenfunktion dar.

Bis dato können drei Vertreter unterschieden werden: Junction adhesion molecule (JAM), Occludin und die Claudine [52].

Occludin (vom Lateinischen *occludere* (schließen) abgeleitet) ist ein 64 kD schweres Protein mit vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen [53]. Bei den Claudinen (vom Lateinischen *claudere* (schließen) abgeleitet), handelt es sich um ca. 23 kD schwere Proteine mit ebenfalls vier Transmembrandomänen und zwei extrazellulären Schleifen, welche allerdings keine homologen Elemente der Aminosäuresequenz mit Occludin aufweisen [54]. Heute sind 24 Vertreter dieser Familie bekannt [55]. Es zeigte sich, dass die Claudine an jeweils benachbarten Zellmembranen durch ihre extrazellulären Schleifen interagieren [56]. Durch die Entfernung von Claudinen aus Tight Junctions mittels Clostridium perfringens-Toxin kann in MDCK I-Zellkulturen eine signifikante Abnahme der Schrankenfunktion nachgewiesen werden [57]. Abbildung 3 zeigt die Ultrastruktur von Tight Junctions als elektronenmikroskopische Aufnahmen, sowie als schematisierte Darstellung.

Letztlich wird durch das Vorhandensein einer Schranke zwischen dem Nerveninneren und der Außenwelt, also dem umgebenden Bindegewebe sowie Lymph- und Blutgefäßen, die endoneurale Homöostase gewährleistet. Das Elektrolytverhältnis sowie der kolloidosmotische Druck können dadurch in engen Grenzen konstant gehalten werden [58]. Dies schützt das Nerveninnere vor den Einflüssen schädlicher Agenzien. Andererseits wird aber auch eine pharmakologische Penetration dieses Raumes hinreichend erschwert.



**Abb. 3: Ultrastruktur von Tight Junctions (dargestellt am Darmepithel)**

**a:** Elektronenmikroskopische Aufnahme in Gefrierbruchtechnik: Tight Junctions demarkieren sich an der protoplasmatischen Seite des Bruchspalts als kontinuierliche intramembranöse Fäden bzw. Fasern, welche miteinander anastomosieren (Pfeilspitzen) und als unbesetzte komplementäre Stellen an der extrazytoplasmatischen Seite des Bruchspalts (Pfeile), Mv: Mikrovilli, Ap: Apikale Membran, Bl: Basolaterale Membran, Maßstabsbalken entspricht 200 nm

**b:** Ultradünnschnittaufnahme der Tight Junctions: Der parazelluläre Spalt ist an den sog. Kissing-points obliteriert (Pfeilspitzen), Maßstabsbalken: 50 nm

**c:** Schematisierte dreidimensionale Darstellung der Tight Junction-Struktur: Tight Junction-Fäden innerhalb der benachbarten Zellmembranen lagern sich einander an und verschließen den parazellulären Spalt an den Kissing points.

[Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: \[Nature Reviews Molecular Cell Biology\] \(Shoichiro Tsukita, Mikio Furuse, Masahiko Itoh - Multifunctional strands in tight junctions\), copyright 2001](#)

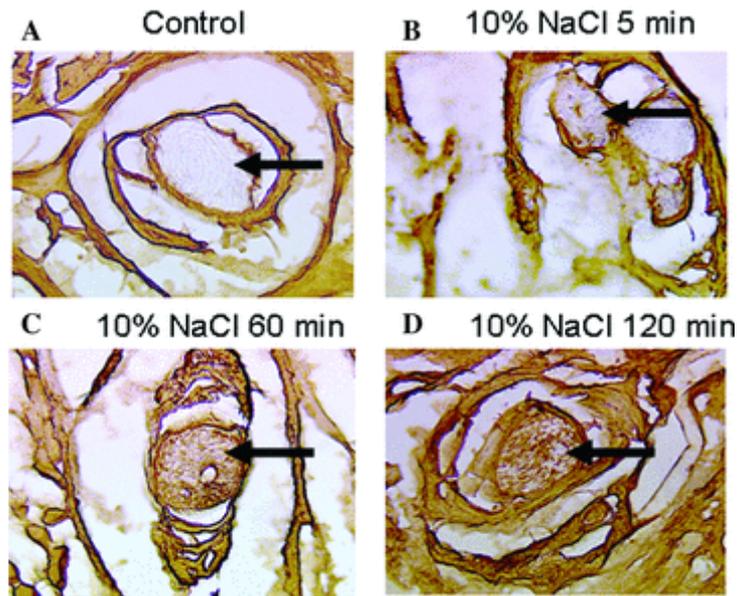
Die lokale Anwendung von Pharmaka am Nerven beschränkt sich bis dato weitestgehend auf den Einsatz lipophiler, analgetisch wirkender Substanzen, wie z.B. Lokalanästhetika [59]. Bei intakter Schrankenfunktion erweist sich die periphere Applikation von Opioiden zur Analgesie als unwirksam. Dies kann sowohl in experimentellen als auch in klinischen Studien gezeigt werden [60, 61]. Im Verlauf von lokalen Entzündungsreaktionen sowie nach Nervenverletzungen lässt sich hingegen ein Zusammenbruch der perineuralen Schrankenfunktion beobachten. Bei peripherer Applikation von Opioiden (DAMGO, einem selektiven  $\mu$ -Agonisten, DPDPE, einem selektiven  $\delta$ -Agonisten

und U50,488H, einem selektiven  $\kappa$ -Agonisten) lässt sich ein analgetischer Effekt in Versuchstieren erzeugen [62, 63].

Die Nachahmung dieses Prinzips durch eine gezielte Öffnung der perineuralen Schranke, welche möglichst nebenwirkungsarm sein sollte, wäre im klinischen Umfeld sowohl im perioperativen Bereich, als auch in der Behandlung von Patienten mit chronischen Schmerzen ein wünschenswertes Ziel. In mehreren Publikationen werden Möglichkeiten beschrieben und erörtert, die Blut-Nerven-Schranke durch verschiedene Verfahren für den Durchtritt von Pharmaka und Makromolekülen zu öffnen [59, 64-66]. In dieser Arbeit werden die lokalen Effekte der folgenden Verfahren untersucht: Öffnung der Blut-Nerven-Schranke durch a) hypertone Substanzen, b) durch das Peptid C1C2, sowie c) durch den Gewebeplasminogen-Aktivator tPA. Die Hintergründe zur Wirksamkeit und Wirkweise dieser Methoden werden in den folgenden Abschnitten behandelt.

### **1.2.2 Öffnung durch Anwendung hypertoner Substanzen**

Bei Versuchstieren kann durch perineurale Applikation von Mannitol- oder hypertoner Natriumchlorid-Lösung (HTS) an einem peripheren Nerven eine Permeabilitätssteigerung für normalerweise impermeable Tracer-Substanzen wie Meerrettichperoxidase erreicht werden [62, 67]. Dies ist in Abbildung 4 dargestellt. Die braun angefärbte Meerrettichperoxidase beweist durch ihr Vorhandensein im Endoneurium HTS-behandelter Nerven im Vergleich zur Kontrollgruppe die Öffnung der Blut-Nerven-Schranke.



**Abb. 4: Visualisierung der Schrankenöffnung durch Verwendung von Meerrettichperoxidase als Tracer.**

Die entsprechenden Nervenproben aus der Pfote von Wistar-Ratten wurden im Zeitverlauf von 5, 60 und 120 min nach intraplantarer Injektion von hypertoner NaCl-Lösung entnommen. Im Vergleich zur Kontrolle zeigt sich ein deutliches Eindringen des Enzyms und damit eine Anfärbung des Endoneuriums. (Pfeile deuten auf das Endoneurium).

*Entnommen und modifiziert aus: Rittner, H.L., Hackel, D., Yamdeu, R.-S., S.A. Mousa, C. Stein, M. Schäfer, A. Brack – Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue – Role of hypertonicity and the perineurium. Brain, Behavior, and Immunity 2009: 4: 552, Abbildung 3*

Dies kann in ähnlicher Weise auch an der Blut-Hirnschranke beobachtet werden. Durch die intravasale Injektion von Arabinose- bzw. Mannitol-Lösung kann eine Öffnung der Schranke für wasserlösliche Stoffe, Peptide und Antikörper festgestellt werden. Morphologisches Korrelat hierfür sind Vasodilatation und Schrumpfung der Endothelzellen von Kapillaren. Dies führt letztlich zur einer Erweiterung der interendothelialen Tight Junctions [68].

Bei näherer Betrachtung der Tight Junction-Proteine in diesem Versuchsaufbau (Occludin, JAM-1, Claudin-5 und ZO-1) zeigt sich, dass deren Expression bereits 5 min nach intravasaler Gabe von Arabinose signifikant reduziert ist [69]. Nach Anwendung von HTS am peripheren Nerven vergehen etwa 8 h von der

messbaren Öffnung der Blut-Nerven-Schranke bis zur funktionellen Wiederherstellung. Bei perineuraler Injektion von Pro-Tx-II, einem selektiven Inhibitor von  $\text{Na}_v1.7$ -Ionenkanälen oder TTX, einem unspezifischen Inhibitor spannungsaktivierter Natrium-Ionenkanäle, zeigt sich bei Wistar-Ratten bei Verhaltensversuchen im modifizierten Randall-Selitto-Test eine signifikante Steigerung der mechanischen nozizeptiven Schwellen. Dies ist erkennbar an einer Zunahme der Pfotendruckschwelle, sofern der Injektion eine Anwendung von HTS vorausging. Verwendete man anstatt HTS, 0,9-prozentige Natriumchloridlösung, kann keine signifikante Änderung des Verhaltens beobachtet werden. Bei elektrophysiologischen Untersuchungen stellt sich eine Suppression von Summenaktionspotentialen in C- und A-Fasern am isolierten N. ischiadicus-Präparat dar, wenn der Nerv mit HTS und TTX/ Pro-Tx-II, DAMGO oder DPDPE behandelt wurde. Auch hier bleibt der Effekt ohne HTS-Applikation aus. Immunhistochemisch lässt sich eine signifikante Suppression von Claudin-1 für 4 h beobachten. Die Expression von Claudin-5 und Occludin bleibt weitgehend unverändert. Eine morphologische Veränderung der Zellen, wie Schrumpfung oder Berstung kann nicht beobachtet werden [64, 66].

Eine direkte Abhängigkeit des zugrundeliegenden Mechanismus der Schrankenöffnung von den hypertonen Bedingungen im perineuralen Gewebe scheint aufgrund des bereits nach 15 min normalisierten Milieus und der langanhaltenden Schrankenöffnung unwahrscheinlich [59].

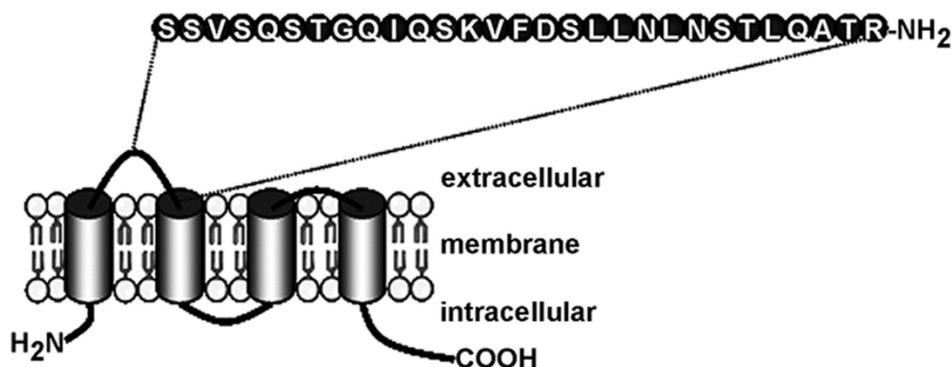
Der Wirkmechanismus auf die perineuralen Tight Junctions wurde durch weitere Versuche unserer Arbeitsgruppe wie folgt beschrieben. HTS verursacht eine Bindung von Matrixmetalloprotease 9 (MMP9) – genauer gesagt ihrer Hemopexin-Domäne - an das Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP-1). Dies hat wiederum die Phosphorylierung der Extracellular-signal Regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) zur Folge. Deren Signalweg führt letztendlich zur Herunterregulierung der Claudin-1-Expression und damit einer Zunahme der parazellulären Permeabilität [66].

### **1.2.3 Das C1C2-Peptid**

Eine weitere Möglichkeit der Beeinflussung der Schrankenfunktion stellen synthetische Peptide dar. Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich

Schrankenfunktionen von Epithelien durch deren Interaktion mit Tight Junction-Molekülen herunter regulieren lassen. Dies gilt beispielsweise für Occludin an der Blut-Testis-Schranke von Ratten sowie an Zellkulturen von Nierenzellepithelien von *Xenopus* [70, 71].

Im Bestreben, ein Peptid zu entwickeln, welches selektiv und nur vorübergehend mit Claudin-1 interagiert, wurden mehrere Testpeptide durch die Arbeitsgruppe PD I. Blasig vom FMP Berlin entworfen und synthetisiert. Diese leiten sich allesamt von der N-terminalen extrazellulären Schleife des Claudin-1 (ECL) von Ratten ab (siehe Abbildung 5). Die N-terminale Schleife ist maßgeblich für die Eigenschaften der unterschiedlichen Claudine im Hinblick auf Ladungsselektivität und parazelluläre Permeabilität verantwortlich [72].



**Abb. 5: Darstellung von Claudin-1 und seiner N-terminalen extrazellulären Schleife**

*Entnommen und modifiziert aus: Zwanziger, D., Hackel, D., Staat, C., Bocker, A., Brack, A., Beyermann, M., Rittner, H., Blasig, I. E. - A Peptidomimetic Tight Junction Modulator To Improve Regional Analgesia. Molecular Pharmaceutics 2012; 6: 1787, Abbildung 1a*

Zur Quantifizierung der Wirksamkeit der unterschiedlichen Peptide in Bezug auf die Fähigkeit, die parazelluläre Permeabilität zu erhöhen, wurden Monolayers von Caco-2-Zellkulturen (Kolorektale Karzinomzellen) verwendet und der relative transzelluläre elektrische Widerstand der Zellschicht gemessen [65]. Bei der Behandlung mit einigen Testpeptiden ergab sich eine signifikante, reversible Reduktion des Widerstands im Vergleich zur Kontrollgruppe. Als besonders wirksam stellt sich dabei das Peptid C1C2 heraus, welches aus 29 Aminosäuren besteht. Als Bauplan für die Synthese dieses Proteins wurden die Positionen 53 bis 81 der ECL-Schleife verwendet und weiter modifiziert, indem

die Cysteine an Position 54 und 64 durch Serin ausgetauscht und das C-terminale Arginin amidiert wurden. Bei *in vivo*-Versuchen an Wistar-Ratten wurden perineurale Injektionen am N. ischiadicus durchgeführt. Hierbei kamen DAMGO bzw. TTX zum Einsatz. In den Versuchsgruppen wurde C1C2 24 bis 48 h zuvor injiziert. In der Kontrollgruppe erfolgte keine Vorbehandlung mit C1C2. Bei den vorbehandelten Tieren zeigte sich die Pfotendruckschwelle als Zeichen eines antinozizeptiven Effektes signifikant erhöht. Dies konnte bei den Tieren ohne Vorbehandlung nicht beobachtet werden. Bei Fluoreszenz-Immunhistochemischen Versuchen an HEK-293-Zellkulturen konnte im Zeitverlauf eine Internalisierung von Claudin-1 von der Membran ins Innere der Zelle beobachtet werden, wo es zumeist co-lokalisiert mit C1C2 vorliegt. Durch Western-Blot konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Expression von Claudin-1 an der Zelloberfläche vermindert war. Die Translokation von Claudin-1 in den Intrazellulärraum scheint für die Funktionsweise von C1C2 von übergeordneter Bedeutung zu sein. Zudem wird diskutiert, ob ein etwaiger Austausch von Claudin-1 durch C1C2 innerhalb der Tight Junctions bedeutsam sei [65].

#### **1.2.4 Der Gewebefibrinolyseaktivator tPA**

Der Gewebefibrinolyseaktivator tPA (tissue plasminogen activator) stellt eine Serinprotease dar, welche vorwiegend in Endothelzellen produziert wird. Hauptaufgabe des Proteins ist die Spaltung von Plasminogen in das proteolytisch wirksame Plasmin [73]. Neben dieser Funktion im Rahmen der physiologischen Fibrinolyse wird auch eine Assoziation des Plasminogenaktivatorsystems mit anderen Funktionssystemen angenommen. So kann die Expression von uPA, einem Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ im Gehirn von adulten Mäusen nachgewiesen werden, vor allem im Subiculum des limbischen Systems und in einigen Anteilen des Neocortex. Eine mögliche Involvierung in dortige Funktionsabläufe erscheint möglich [74]. Während der Embryogenese von Mäusen zeigt sich eine vermehrte Expression von tPA in Bereichen gesteigerter Zellmigration und -proliferation [75]. Weiterhin wird eine starke Expression ebenfalls im Ependym der Ventrikel, in den Meningen und an Blutgefäßen beobachtet, welche allesamt Grenzflächen

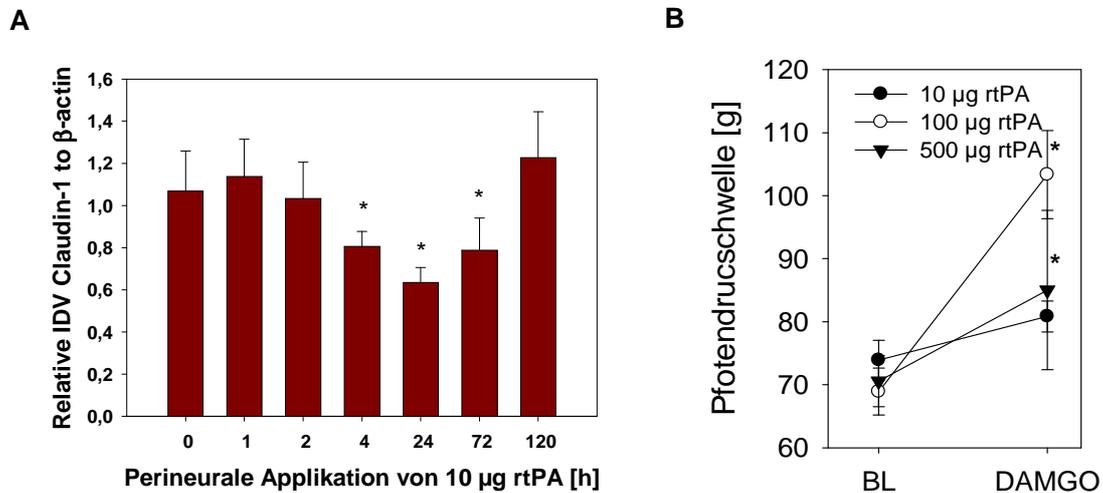
zwischen verschiedenen Kompartimenten darstellen [76]. Diesen Gedanken weiterführend, kommen mehrere Studien zu dem Schluss, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von tPA und der Funktion der Blut-Hirn-Schranke bestehen könnte. In Zellkulturen zeigt sich, dass der Aufbau einer funktionierenden Schranke mit der Herabregulierung der tPA-Expression in Anwesenheit von Astrozyten einhergeht [77, 78].

Bei *in vivo*-Versuchen an Mäusen mit fokaler zerebraler Ischämie konnte eine gestörte Regeneration der Expression der Tight Junction-Proteine (Claudin-5, Occludin und ZO-1) durch die Anwendung von tPA gezeigt werden [79]. Eine dosisabhängige Zunahme von Gewebsödemen sowie eine Extravasation von azellulären Blutbestandteilen (Hämoglobin) waren ebenfalls feststellbar. Diese Ergebnisse korrelierten zudem mit dem Anstieg von MMP-9 [80]. Die Fähigkeit der Plasminogenaktivatoren, Matrixmetalloproteasen zu induzieren, wurde bereits im Vorfeld beschrieben [81]. Im Zusammenhang mit der Induktion von tPA wurde auch die Aktivierung des Erk-Signalwegs beobachtet [82]. Mehrere Studien legen nahe, dass die Induktion von Matrixmetalloproteasen auch für den Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke im Rahmen eines ischämischen Geschehens verantwortlich ist [83, 84].

Bis dato liegen keine publizierten Daten vor, ob sich das Konzept der Schrankenöffnung von der Blut-Hirn-Schranke auch auf die Blut-Nerven-Schranke und damit auf die Barriere zum Gewebe hin übertragen lässt. Bei Verletzungen peripherer Nerven führt die zusätzliche Applikation von tPA zu einer Zunahme der Schrankenfunktion, erkennbar an verminderten intraneuralen IgG-Spiegeln [85].

Allerdings zeigen eigene Vorarbeiten der Arbeitsgruppe an Ratten, dass sich durch die perineurale Applikation von rekombinantem tPA (rtPA) und DAMGO dosisabhängig signifikante Anstiege der Pfortendruckschwellen und damit ein analgetischer Effekt erzielen ließen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6 dargestellt. Im Western Blot konnte zudem im Zeitraum zwischen 4 und 72 h nach der perineuralen Injektion von tPA eine signifikante Reduktion von Claudin-1 in der Membranfraktion beobachtet werden. Folglich darf

angenommen werden, dass auch tPA die Permeabilität der Blut-Nerven-Schranke im Sinne einer Öffnung zu beeinflussen vermag.



**Abb. 6: Herunterregulierung der Blut-Nerven-Schranke durch perineurale Applikation von rtPA**

**A:** Im Western Blot gemessene relative Dichte (IDV) von Claudin-1 in der Membranfraktion nach perineuraler Injektion von rtPA (10  $\mu$ g). Es zeigt sich eine signifikante Abnahme im Bereich von 4 bis 72 h nach Applikation (n = 6, \*: p < 0,05, One Way ANOVA Analysis of Variance)

**B:** Messung der Pfotendruckschwellen: Die Baseline-Messung wurde eine Stunde nach perineuraler Injektion von rtPA vorgenommen. Anschließend erfolgte die Applikation von 30  $\mu$ g DAMGO und nach 10 min die erneute Messung der mechanischen Schmerzschwellen. Es zeigt sich eine dosisabhängige antinozizeptive Wirkung im Vergleich zwischen der Anwendung von 10 und 100  $\mu$ g rtPA (n = 6, \*: p < 0,05, Two Way ANOVA Analysis of Variance)

*Bisher unveröffentlichte Daten der AG Rittner, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Shaobing Yang*

### 1.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Im Rahmen der Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zu diesem Thema wurde bereits untersucht, ob die perineurale Gabe von C1C2 oder HTS mechanische und thermische nozizeptive Schwellen innerhalb von sieben Tagen verändert. Zunächst wurden die Versuchstiere (Wistar-Ratten) für vier Tage an die

Versuchsbedingungen gewöhnt. Anschließend erfolgte die Behandlung der Tiere durch perineurale Injektion von HTS bzw. C1C2 sowie NaCl 0,9% in die Peripherie des N. ischiadicus, wobei die kontralaterale Extremität unbehandelt blieb.

Die nozizeptiven Schwellen wurden vor (Tag 0) und an den sieben folgenden Tagen nach Injektion gemessen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Stimulationsmodalitäten angewandt: Messung der Pfortendrucksschwellen [42] und der thermischen Pfortenwegzugslatenzen [43].

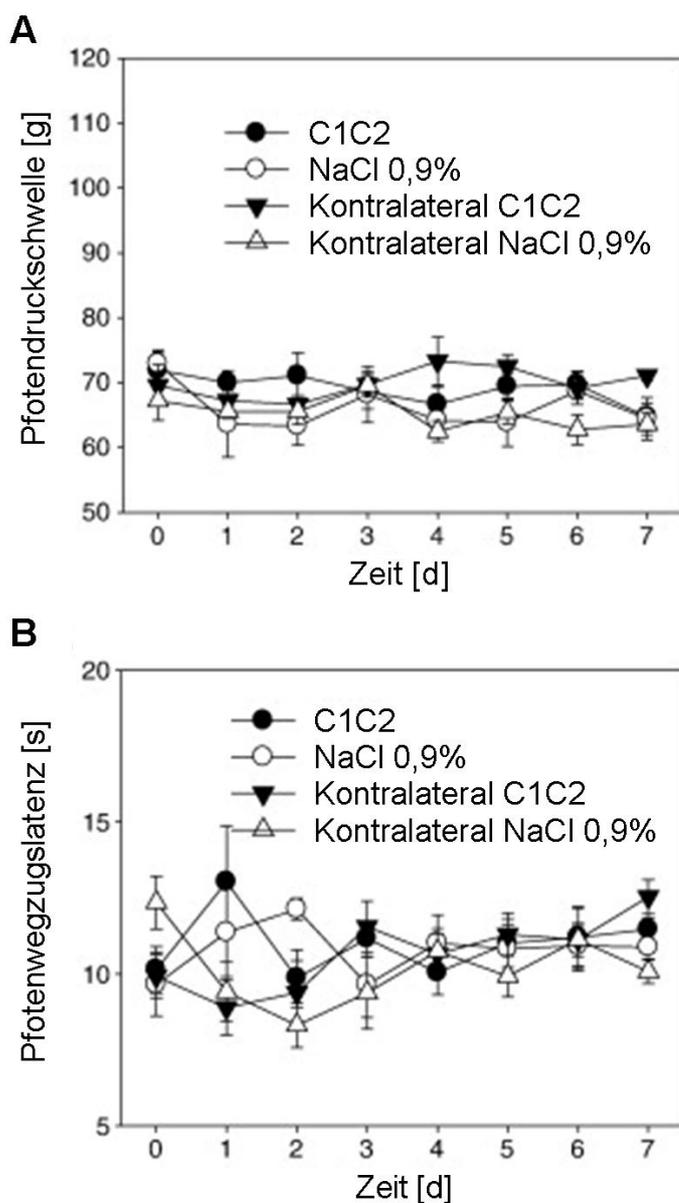
Zunächst wurden die jeweiligen Werte von Pfortendrucksschwelle und Pfortenwegzugslatenz mit der Baseline-Messung der jeweiligen Extremität verglichen. Hierbei ergaben sich weder bei HTS-, noch bei C1C2-Injektion signifikante Unterschiede (Daten nicht gezeigt,  $p > 0,05$ , One Way Repeated Measures Analysis of Variance).

Im Zeitverlauf von 7 d zeigte sich für keine Stimulationsmodalität nach Anwendung von C1C2 ein signifikanter Unterschied zur kontralateralen (unbehandelten) Pforte und zu den mit NaCl 0,9% behandelten Tieren.

Die Vergleiche der Pfortenwegzugslatenzmessungen von mit HTS-behandelter und unbehandelter Extremität an den jeweiligen Zeitpunkten zeigten keine signifikanten Unterschiede. Die Messung der Pfortendrucksschwellen ergab einen signifikanten Unterschied nach 4 d (Abbildung 8), welcher im Wesentlichen auf einen Anstieg der Schwelle an der unbehandelten Pforte verursacht wurde.

Die Abbildungen 7 (C1C2) und 8 (HTS) geben jeweils eine Übersicht über die Verläufe der Messwerte.

**Abb. 7: Verlauf der Messungen zur Pfotenwegzugslatenz und Pfotendruckschwelle an sieben Tagen nach Injektion von C1C2 oder NaCl 0,9%**



Die Messungen wurden vor (Tag 0) und nach (Tage 1 bis 7) der Injektion von C1C2 (schwarze Punkte) bzw. NaCl 0,9% (weisse Punkte) gemessen. Die kontralaterale Extremität blieb unbehandelt (schwarze bzw. weisse Dreiecke).

**A:** Hinsichtlich der Pfotendruckschwellen ergaben sich im Vergleich der untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede über den Zeitraum von 7 d.

**B:** Im Vergleich der Messwerte bezüglich der Pfotenwegzugslatenz zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

(Alle: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler, n=6, p > 0,05, Two Way Repeated Measurements ANOVA)

Entnommen und modifiziert aus: Sauer RS, Krug SM, Hackel D, Staat C, Konasin N, Yang S, Niedermirtl B, Bosten J, Günther R, Dabrowski S, Doppler K, Sommer C, Blasig IE, Brack A, Rittner HL - Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. *J Control Release*. 2014 Jul 10;185:88-98, Abbildung 8

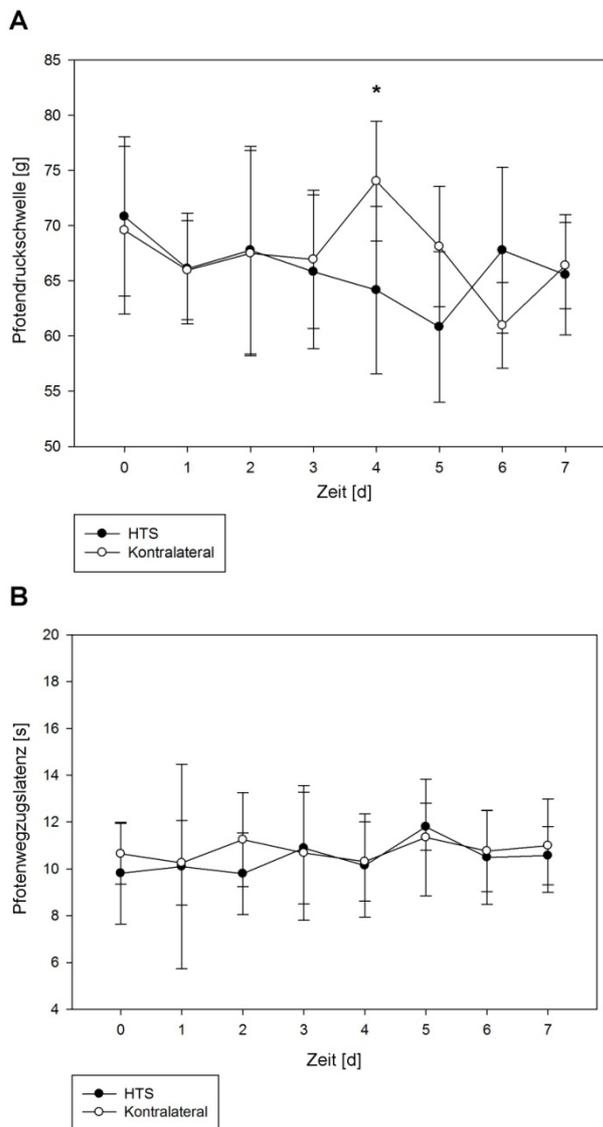
**Abb. 8: Pfortendruckschwelle und Pfortenwegzugslatenz nach Behandlung mit HTS**

Sowohl vor (Tag 0), als auch sieben Tage nach der Injektion von HTS wurde die Pfortendruckschwelle und die Pfortenwegzugslatenz von behandelter (schwarze Punkte) und unbehandelter Pforte (weiße Punkte) bestimmt.

**A:** Im Vergleich der Pfortendruckschwellen zeigte sich am vierten Tag nach Injektion ein signifikanter Unterschied, der im Wesentlichen durch einen Anstieg der Pfortendruckschwelle der unbehandelten Extremität bedingt war.

**B:** Hinsichtlich der Pfortenwegzugslatenz ergaben sich im untersuchten Zeitraum keine signifikanten Unterschiede zwischen den Pforten.

(Alle: Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=6, \*: p < 0,05, Two Way Repeated Measurements ANOVA, Holm-Sidak Post-hoc Test)



Daten teilweise publiziert in: Hackel D, Krug SM, Sauer RS, Mousa SA, Böcker A, Pflücke D, Wrede EJ, Kistner K, Hoffmann T, Niedermirtl B, Sommer C, Bloch L, Huber O, Blasig IE, Amasheh S, Reeh PW, Fromm M, Brack A, Rittner HL – Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jul 17;109(29):E2018-27.

## 1.4 Fragestellung

Es wurden Möglichkeiten der Öffnung der Blut-Nerven-Schranke vorgestellt. Mit der Öffnung der Schranke geht auch der Verlust der physiologischen Schutzfunktion für die endoneurale Homöostase einher. Unter Verwendung der oben beschriebenen Methoden sollen in dieser Arbeit die folgenden Fragen geklärt werden:

- Zeigt sich nach Anwendung der Pharmaka HTS, C1C2 und tPA eine Nervenschädigung mit Entzündungsreaktion im Sinne einer Einwanderung von Makrophagen?
- Ergeben sich durch die Anwendung Schädigungen der Nerven, welche mit morphologischen Veränderungen einhergehen?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Tiere**

Für die Experimente wurden adulte, männliche Wistar-Ratten (Harlan Laboratories) mit einem Gewicht von 150 bis 220 g verwendet. Die Versuche und Behandlung der Versuchstiere (Protokollnummern G 04/09 und G 03/13) fanden in Übereinstimmung mit den Richtlinien der International Association for the Study of Pain sowie den Auflagen des Tierschutzgesetzes, vertreten durch die Bezirksregierung von Unterfranken (Antrag Reg 55.2-2531.01-3/13), statt. Alle Anstrengungen wurden unternommen, um die benötigte Anzahl an Versuchstieren zu begrenzen und ihr Leiden so gering wie möglich zu halten.

### **2.2 Histologie**

#### **2.2.1 Injektion, Operation und Probenentnahme**

Die Injektion der zu untersuchenden Reagenzien fand in Gasnarkose mit 3,5% Isofluran statt. Der N. ischiadicus wurde mit einer 22 Gauge Nadel unter Zuhilfenahme eines Elektrostimulationsgerätes (Stimuplex Dig RC, Braun, Melsungen, Deutschland) aufgesucht. Die Nadel wurde am Punkt des maximalen Pfotenausschlags bei 0,2 mA platziert. Anschließend wurden 300 µl der jeweiligen Lösung perineural injiziert.

Die Tiere wurden randomisiert folgenden Untersuchungsgruppen zugeteilt: Unbehandelte (ohne jegliche Injektion), Kontrollgruppe (0,9% NaCl), HTS (10% NaCl, 10g/100ml), C1C2-Peptid (400 µM gelöst in 0,9% NaCl), tPA (100 µg gelöst in 0,9% NaCl) und Ropivacain (7,5 mg/ml, AstraZeneca, London, Großbritannien). Hierfür wurde sowohl die ipsi-, als auch die kontralaterale Extremität genutzt.

7d nach Injektion wurden die Tiere unter Gasnarkose mit 5% Isofluran mittels intrakardialer Injektion von 300 µl T61 (MSD Tiergesundheit, Unterschleißheim, Deutschland), einer Kombination aus Embutramid, Mebezonium und Tetracain getötet. Im Anschluss erfolgte die Entnahme der Nerven.

Die chronic constriction injury - Nervenproben (CCI) wurden durch die Neurologische Klinik des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt.

Hierfür wurden die Tiere durch intraperitoneale Barbituratinjektionen betäubt und der N. ischiadicus auf der mittleren Höhe des Schenkels freigelegt. Anschließend wurden im Abstand von je einem Millimeter drei Ligaturen (10-0 Prolene) plaziert, welche angezogen wurden bis ein kurzes Zucken des entsprechenden Beines feststellbar war. Die Wunde wurde abschließend schichtweise verschlossen. Die Tiere wurden 12 d nach Ligatur der Nerven getötet und die Nervenproben unmittelbar distal der Ligaturen entnommen.

Zur weiteren Aufarbeitung aller Proben im Rahmen der histologischen CD68-Färbung wurden die Präparate sofort in Tissue-Tek (O.C.T., Sakura inc., Tokio, Japan) eingebettet und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80° C. Die Nervenproben, die für die Färbung nach Richardson aufgearbeitet wurden, wurden unmittelbar nach Entnahme in 2,5 prozentiger Glutaraldehyd-Lösung eingelegt und bis zur Aufarbeitung bei +4° C aufbewahrt.

### **2.2.2 Immunhistochemie**

Im verwendeten Tiermodell wurden die Makrophagennachweise unter Verwendung eines CD68-Antikörpers (LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, Deutschland) durchgeführt. Bei diesem Antikörper handelt es sich um einen monoklonalen Maus-Anti-Ratte-IgG-Antikörper, der das Antigen CD68 (eine spezifische Glykoproteinkette von 90 – 110 kD) erkennt [86].

Aus den gefrorenen Probenblöcken wurden 10 µm dicke Schnitte auf Objektträgern angefertigt, die zunächst für mindestens 30 min auf Raumtemperatur gebracht wurden. Nach 10-minütiger Fixierung in Aceton bei -20° C erfolgte die Trocknung auf einer Heizplatte für ca. 5 min bei maximal 42° C. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden, wurden die Schnitte für weitere 30 min mit 10% Bovinem Serumalbumin (BSA) in TRIS-Puffer bei Raumtemperatur inkubiert. Für die folgende Inkubation mit dem Primärantikörper Anti-CD68 (Verdünnung 1:100 in 1% BSA/TRIS), wurden die Schnitte mit jeweils 50-100 µl Lösung beschichtet und über Nacht bei 4° C

gelagert. Nach dreimaligem Waschen mit TRIS-Puffer wurden die Probeträger in 200 ml Methanol und 3,5 ml 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 20 min bei Raumtemperatur behandelt, um die endogene Peroxidaseaktivität zu inhibieren und erneut drei Mal in TRIS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden jeweils 50-100 µl mit Meerrettichperoxidase-gebundenem Sekundär-Antikörper (Verdünnung 1:200 in 1% BSA/TRIS) aufgetragen und 30 min inkubiert, gefolgt von dreimaligem Waschen mit TRIS-Puffer. Das bereits 30 min vorinkubierte ABC-Kit, ein Komplex aus Avidin und Biotin (Vector Laboratories Ltd., Peterborough, Großbritannien) wurde aufgetragen und erneut für 30 min inkubiert. Nachdem die Proben wiederum dreimalig mit TRIS-Puffer gewaschen wurden, erfolgte die Applikation von jeweils 50-100 µl Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB), dem Substrat der Meerrettichperoxidase (Kem-En-Tec Diagnostics inc., Taastrup, Dänemark), von dem bereits vorher eine Tablette in 10 ml destilliertem Wasser unter Zugabe von 10 µl 30%-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst worden war. Nach der anschließenden 10-minütigen Inkubationszeit wurden die Proben 2x in destilliertem Wasser gewaschen, 30 s in Hämalun-Lösung nach Mayer gegengefärbt und 10 min unter fließendem Leitungswasser gewässert. Es schloss sich die Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe (4 min in 70%, 2 min in 90%, 6 min in 95% und 6 min in 100% Ethanol) an, sowie ein 20-minütiges Bad in Xylol. Schließlich wurden die Objektträger unter Verwendung von Vitro-clud (R.Langensbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) gedeckelt. Als Negativkontrolle dienten von gleichen Tieren entnommene Nervenproben des N. ischiadicus. Die Primärbehandlung bestand lediglich aus der Applikation von BSA/TRIS ohne Zugabe des CD68-Antikörpers. Als Positivkontrolle dienten die CCI-Nerven.

### **2.2.3 Kunstharzeinbettung und Richardson-Färbung**

Zunächst wurde die Glutaraldehyd-Lösung 3x, jeweils 10 min, mit 0,1 M Phosphatpuffer von den Gewebeproben abgewaschen. Anschließend erfolgte die Nachfixierung in Osmiumlösung (4% Osmiumlösung in Daltonpuffer mit einem Mischverhältnis von 1:1) für 90 min, woraufhin die Osmiumlösung dreimalig mit 0,1 M Phosphatpuffer für jeweils 15 min ausgewaschen wurde und schließlich über Nacht in Phosphatpuffer bei 4° C gelagert wurde. Im nächsten

Schritt wurde mittels aufsteigender Acetonreihe jeweils 15 min in 30%, 40%, 50% und 60% Aceton dehydriert und in deren Verlauf 2x in jeweils 100 ml 70%-iger Acetonlösung mit 1 g Phosphorwolframsäure und 0,5 g Uranylacetat für jeweils 30 min vorkontrastiert. Anschließend erfolgte die weitere Dehydrierung (je 15 min in 80% und 90%, sowie 30 min in 100% Aceton). Nun wurden die Proben in das bereits 30 min vorher präparierte Polymergemisch, bestehend aus 10 ml ERL<sup>®</sup>-4206, 5 ml D.E.R.<sup>®</sup>-736, 25 ml NASA, 1 ml DMAE (S-1) (Alle: Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingelegt. Das Einbettgemisch bestand in der ersten Stunde aus einem Teil Polymer und einem Teil Aceton mit einer Konzentration von 100%, danach für eine weitere Stunde aus drei Teilen Polymer und einem Teil 100-prozentigem Aceton und schließlich aus reinem Polymer, in welchem die Proben über Nacht bei 4° C ruhten. Am nächsten Tag wurde das reine Polymergemisch gewechselt und nach dem Ausgießen der Gewebeproben mitsamt des Polymers in geeigneten Formen für 8 h bei 70° C ausgehärtet. Danach konnten die ausgehärteten Blöcke unter ständigem Anfeuchten in 6 µm dicke Schnitte auf Objektträger überführt werden, welche nach dem Trocknen auf einer Heizplatte bei 80° C eine Minute in Azur-Methylenblau-Lösung angefärbt und erneut bei 80° C getrocknet wurden. Abschließend wurden die Schnitte 5 min im Xylolbad fixiert und mit Vitro-clud (R. Langenbrinck Labor- und Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland) versiegelt.

## **2.3 Mikroskopie**

Die mikroskopische Sichtung der Präparate erfolgte an einem Axioskop 2 mot plus (Zeiss, Jena, Deutschland). Als Kamera diente ein Model #7.3 Three Shot Color (Diagnostic instruments inc., Burroughs, USA).

## **2.4 CD68-Index**

Von jedem Nervenpräparat wurden jeweils zwei repräsentative histologische Schnitte betrachtet. Unter Zuhilfenahme der Software wurden jeweils Bilder mit den Objektiven 10, 20 und 40x aufgenommen. Die weiteren Messungen erfolgten in hundertfacher Vergrößerung. Nach einheitlicher Kalibrierung der Messdistanzen wurde die Fläche des Endoneuriums des jeweiligen

Schnittpräparates ausgemessen. In einem zweiten Schritt erfolgte die Zählung der Zellen, welche CD68-positiv, also braun angefärbt waren. Zum einen zählten hierzu vollständig angefärbte Zellen. Zum anderen wurden punktförmige Anfärbungen, welche allesamt einer Zelle zuzuordnen waren als eine positive Zelle gewertet. Bei unsicherem Färbebefund erfolgte eine Kontrolle in zweihundertfacher Vergrößerung. Bei der Auswertung der CCI-Schnitte wurden in hundertfacher Vergrößerung je zwei randomisiert ausgewählte Ausschnitte von 250 x 250 Pixeln (in hundertfacher Vergrößerung entsprechend 34225  $\mu\text{m}^2$ ) pro Schnitt betrachtet und sowohl die CD68-positiven Regionen, als auch die Flächen addiert.

Durch Division wurden die jeweiligen Werte von positiven Regionen und Fläche miteinander in Verbindung gebracht, sodass ein Index gebildet werden konnte: CD68-positive Regionen/ $\text{mm}^2$ . Aus den Indizes der beiden ausgewerteten Areale des jeweiligen Nervenpräparats wurde der Mittelwert gebildet, welcher in die statistische Auswertung einging.

## **2.5 Histomorphometrie**

Jeweils ein repräsentativer Schnitt des Nerven wurde begutachtet. Es wurden Bilder der Vergrößerungen 100, 200 und 400x aufgenommen. Die weitere Auswertung erfolgte in vierhundertfacher Vergrößerung. Zunächst wurde eine einheitliche Kalibrierung der Messdistanzen durchgeführt. Nun wurden zwei quadratische Bildausschnitte von je 250 x 250 Pixeln (entsprechend 2139,06  $\mu\text{m}^2$ ) jeweils aus der äußeren und der zentralen Hälfte des Nerven per Zufall ausgewählt. Nur Nervenfasern, deren Inneres sich vollständig innerhalb des definierten Ausschnitts befand, wurden für die Auswertung herangezogen und beurteilt. Von vornherein wurden Artefakte, sowie Nicht-Nervenzellen inkl. Gefäße für die Auszählung eliminiert.

Morphologisch wurden die Nervenfasern unterteilt in unauffällige und auffällige Fasern. Als unauffällig klassifiziert wurden solche Fasern, deren Myelinscheide ringsherum homogen ausgeprägt und glatt begrenzt war. Als auffällig wurden Fasern klassifiziert, deren Myelinscheide inhomogen, d.h. knotig oder ausgefranst erschienen oder eine Zwiebelschalenformation aufwiesen. Ranvier'sche Schnürringe, welche angeschnitten waren, wurden der Gruppe

der Unauffälligen zugeordnet. Abbildung 9 zeigt Beispiele für die Differenzierung in die einzelnen Gruppen. Anschließend erfolgte die Auszählung. Die Ergebnisse wurden miteinander in Relation gesetzt, sodass ein dimensionsloser Index die Folge war: morphologisch auffällige Fasern/Alle Fasern.

**Abb. 9: Morphologische Einteilung**

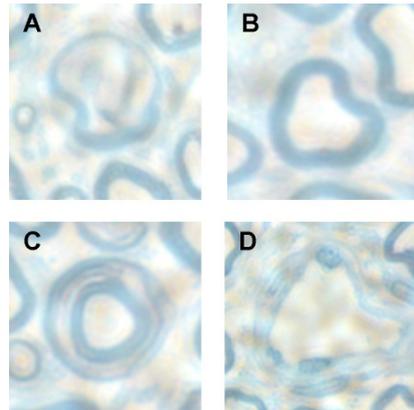
Gezeigt ist jeweils ein Beispiel für die Einteilung in die verschiedenen Auswertungsgruppen

**A:** Auffällige Faser

**B:** Unauffällige Faser

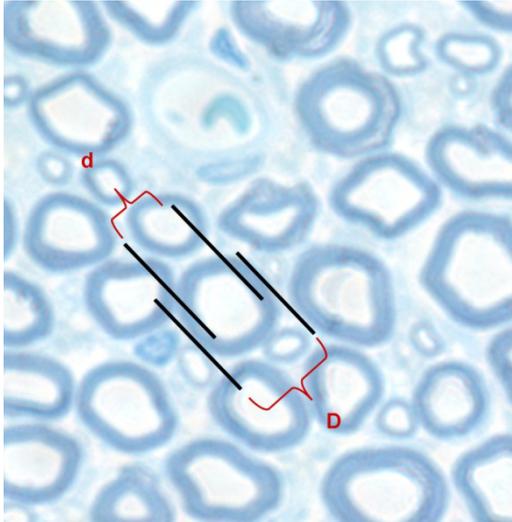
**C:** Ranvier'scher Schnürring

**D:** Gefäß



Zur Bestimmung der Dichte der Nervenfasern wurde ihre Anzahl, d.h. die Anzahl morphologisch auffälliger, wie auch unauffälliger Fasern und Ranvier'scher Schnürringe durch die Fläche des definierten Bildausschnitts dividiert.

Um die Dicke der Myelinschicht mit dem Inneren des Axons in Relation zu bringen, wurde die *g*-Ratio der Nervenfasern in den definierten quadratischen Bildausschnitten bestimmt. Dieser berechnet sich durch Division aus dem Innendurchmesser und dem Außendurchmesser des Axons, der auch die Myelinscheiden mit einschließt, was in Abbildung 10 dargestellt ist [87]. Hierfür wurden nur jene Nervenfasern beachtet, welche nach morphologischen Gesichtspunkten unauffällig erschienen. Bei asymmetrischer Fasermorphologie wurden die Entfernungen am Ort des augenscheinlich kleinsten Durchmessers bestimmt.



**Abb. 10: Berechnung der g-Ratio**

Entsprechend der Schilderung im Text gilt:

$$g\text{-Ratio} = \frac{d}{D}$$

## 2.6 Software

Die histologischen Bilder wurden mithilfe von MetaVue Version 6.2r6 (Universal Imaging Corp., Bedford Hills, USA) aufgenommen und ausgewertet. Die Erfassung der Daten geschah in Microsoft Excel 2007 (Microsoft Cooperation, Redmond, USA). Zur statistischen Auswertung und Erstellung von Grafiken diente SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., San Jose, USA). Als Textverarbeitungsprogramm wurde Microsoft Word 2007 (Microsoft Cooperation, Redmond, USA) verwendet. Zur Verwaltung der Literatur fand EndNote X6 (Thomson Reuters, New York, USA) Anwendung.

## 2.7 Statistische Auswertung

Die Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Sie wurden auf Normalverteilung und gleiche Varianz hin untersucht. Wurden zwei Gruppen miteinander verglichen, fand der Student's t-Test Anwendung. Bei nicht-normal-verteilten Daten, bzw. ungleicher Varianz, wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test genutzt. Statistische Vergleiche mehrerer Gruppen wurden unter Verwendung des One Way ANOVA Analysis of Variance Tests durchgeführt. Bei auffälligen Ergebnissen wurden die Gruppen mittels des Holm-Sidak Post-hoc-Tests verglichen. Bei ungleichen Stichprobenmengen wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test durchgeführt.

Als statistisch signifikant wurde ein p-Wert  $< 0,05$  angesehen. Ein p-Wert  $< 0,01$  wurde als hoch signifikant bewertet.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Einwanderung von CD68+ Makrophagen als Maß für eine Entzündungsreaktion bei Nervenschädigung**

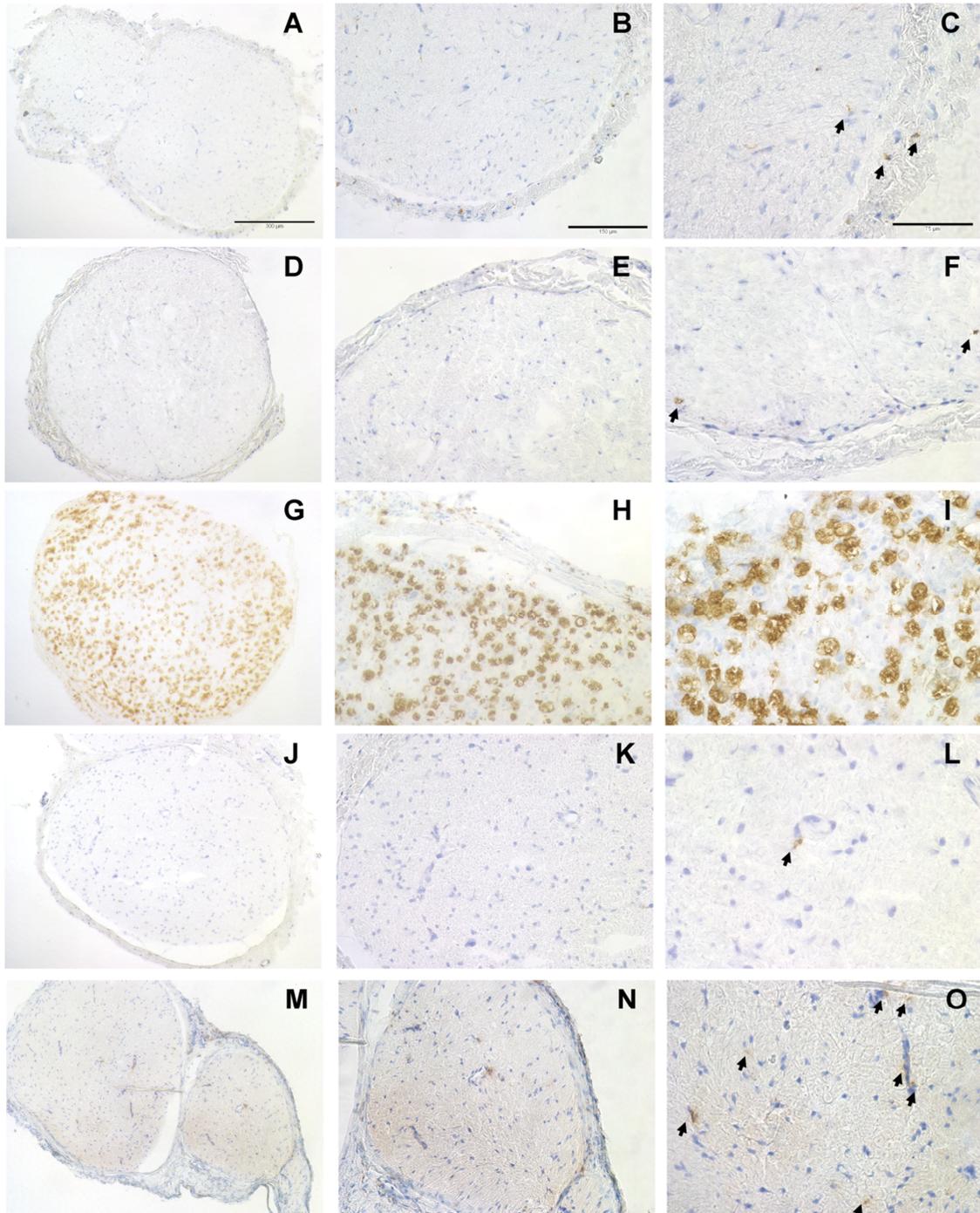
Die zu untersuchenden Substanzen wurden perineural um den N. ischiadicus injiziert. Nach sieben Tagen erfolgte die Entnahme der Nerven mit anschließender histologischer Aufarbeitung. Zudem wurden Nerven unbehauelter Tiere und durch CCI geschädigte Nerven verwendet. Die Makrophagenpopulation wurde durch Behandlung mit dem CD68-Antikörper markiert und im Rahmen der immunhistochemischen Aufarbeitung durch einen Farbumschlag visualisiert. Große Makrophagenpopulationen deuteten auf ein Entzündungsgeschehen und damit eine Schädigung des Nerven hin.

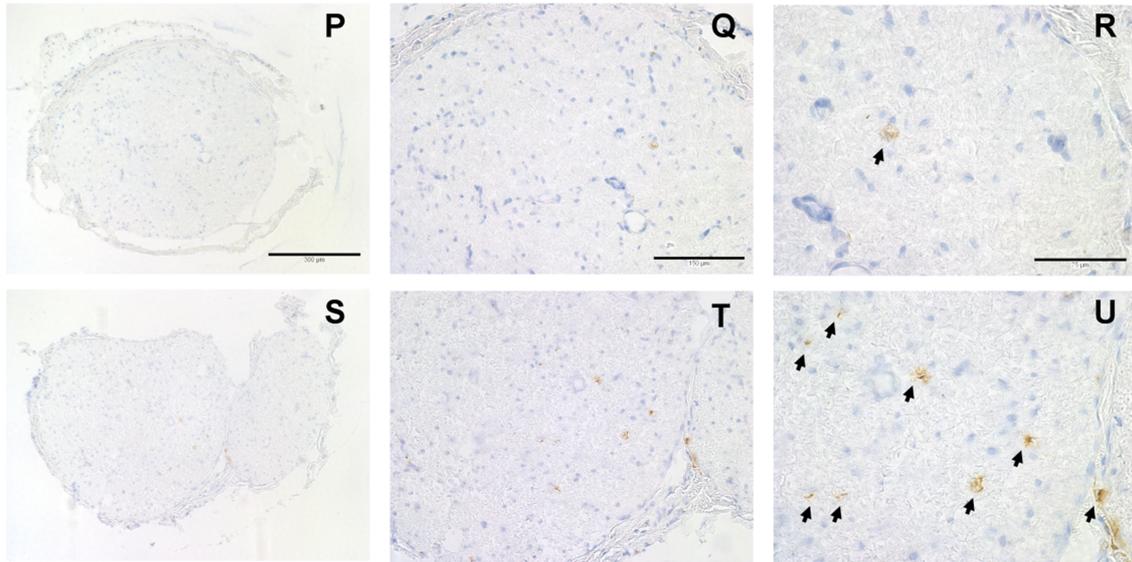
Abbildung 11 zeigt repräsentative Originalfärbungen. Hierbei handelt es sich im Einzelnen um die mit 0,9% NaCl-Lösung behandelten Nerven der Kontrollgruppe (A-C), unbehauelte Nerven (D-F) und durch Ligatur geschädigte CCI-Nerven (G-I). Weiterhin werden die Nerven von Tieren gezeigt, welche durch perineurale Injektion von 7,5% Ropivacain (J-L), 10% NaCl (HTS) (M-O), C1C2 (P-R) und tPA (S-U) behandelt wurden. Dargestellt sind Querschnitte der Nervenpräparate unterschiedlichen Vergrößerungen in Hämatoxylin-Färbung nach Mayer.

Das Peri- und Endoneurium des N. ischiadicus ließen sich differenzieren. Die Zellkerne zeichneten sich durch eine starke bläuliche Färbung aus. Weiterhin waren Makrophagen durch einen bräunlichen Farbumschlag, welcher durch die immunhistochemische Behandlung bedingt war, erkennbar. Bereits durch lichtmikroskopische Betrachtung ließ sich ein Unterschied zwischen den Nerven, welche durch Ligation geschädigt wurden und den restlichen Gruppen erkennen.

Im Anschluss erfolgte die standardisierte Auswertung der Schnittpräparate. Hierfür wurden die Regionen, die durch den braunen Farbumschlag markiert waren, ausgezählt. Neben vollständig angefärbten Zellen zeigten sich auch punktförmige Anfärbungen, welche durch ihre relative Nähe zu einander am ehesten einer einzelnen Zelle zuzuordnen waren. Aufgrund dessen wurde im

Folgenden die Bezeichnung ‚positive Regionen‘ anstatt ‚positive Zellen‘ verwendet.





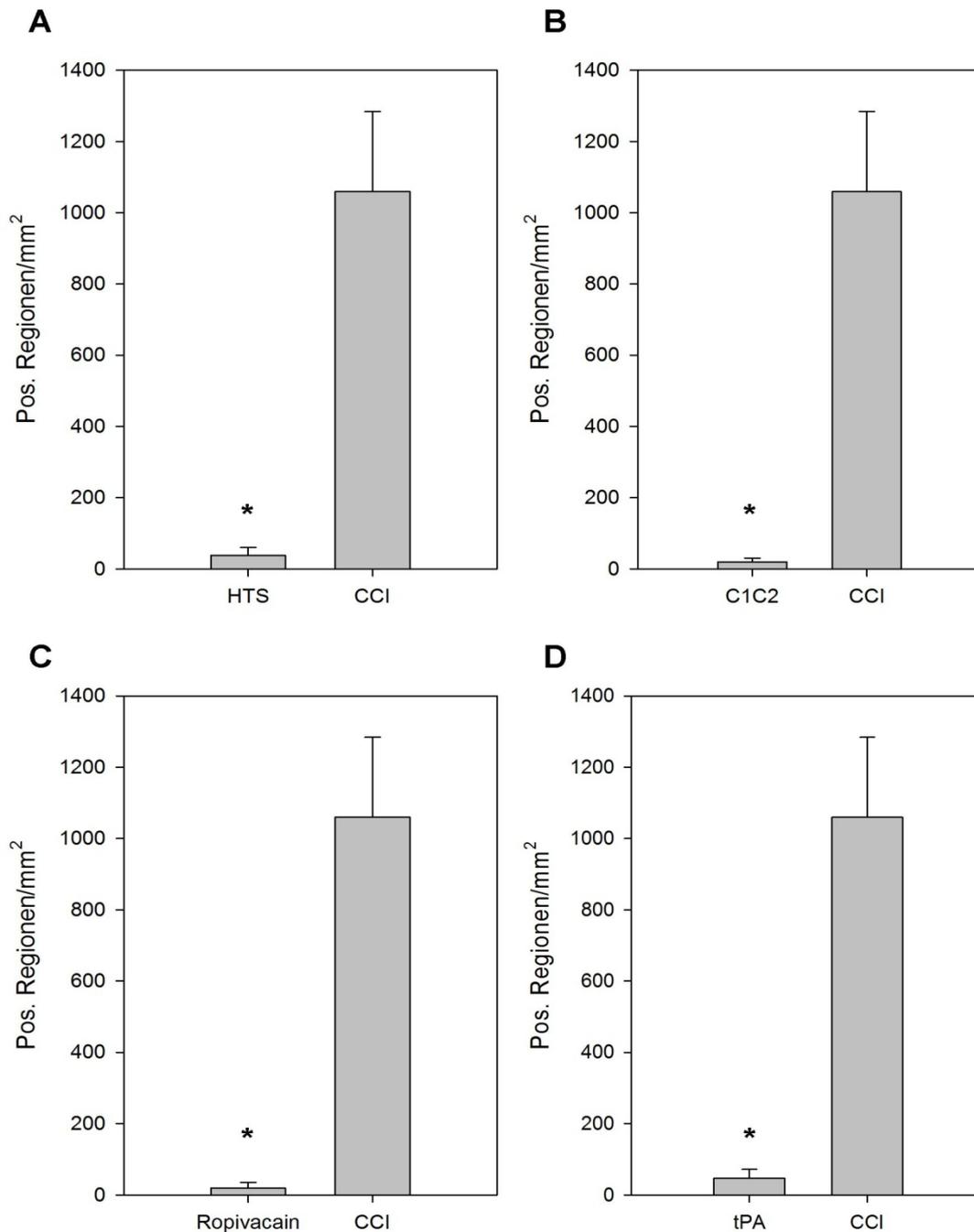
**Abb. 11: Infiltration von CD68+ Makrophagen in den N. ischiadicus nach unterschiedlichen Behandlungen**

Der N. ischiadicus wurde 7 d nach Behandlung entnommen und die Schnitte mit Anti-CD68 inkubiert (braun). Die Präparate wurden mittels Hämatoxylin nach Mayer gefärbt, welches Zellkerne blau anfärbt.

**A-C:** Injektion von 0,9% NaCl-Lösung, **D-F:** unbehandelte Nerven, **G-I:** CCI-Nerv; **J-L:** Anwendung von 7,5% Ropivacain, **M-O:** Applikation von HTS (NaCl 10%), **P-R:** C1C2-Behandlung (400 µM), **S-U:** Injektion von tPA (100 µM).

Pfeile markieren CD68-positive Zellen. Zunehmende Vergrößerung von links nach rechts. Maßstabsbalken entsprechend von links nach rechts: 300, 150 und 75 µm, n=6, repräsentative Beispiele gezeigt.

Zuletzt wurden die positiven Regionen in Relation zur Fläche des Endoneuriums gesetzt, wodurch sich der Index CD68+ Regionen/mm<sup>2</sup> ergab. Abbildung 12 vergleicht die CD68-Indizes von HTS (A), C1C2 (B), Ropivacain (C) und tPA (D) jeweils mit dem CD68-Index von Nerven, welche durch Ligatur 12 d vor der Probenentnahme geschädigt worden waren. Es zeigten sich jeweils signifikante Unterschiede.



**Abb. 12: CD68-Index in Relation zur CCI-Gruppe**

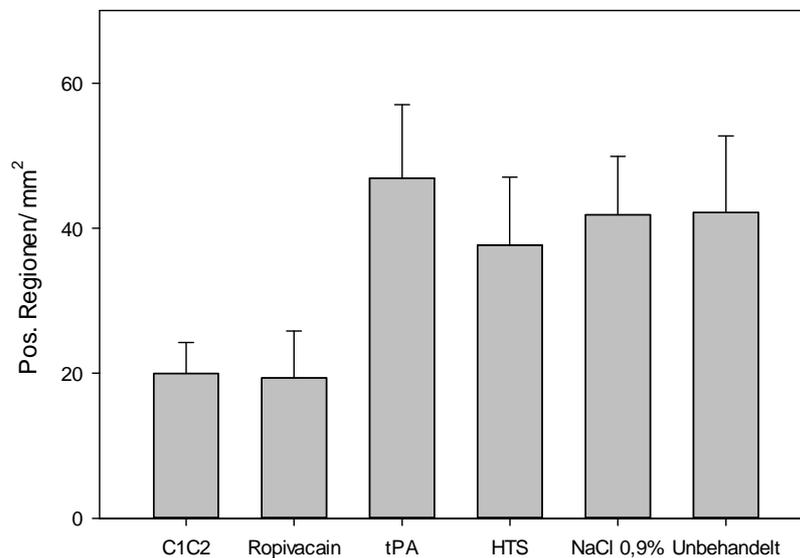
Eine Woche nachdem der N. ischiadicus mit den getesteten Substanzen behandelt worden war, zeigten sich signifikante Unterschiede in der Anzahl CD68-positiver Regionen in Relation zur Fläche des Endoneuriums (CD68-Index) im Verhältnis zur CCI-Gruppe (12 d nach Ligatur).

Vergleich der CD68-Indizes der CCI-Gruppe mit **A**: HTS, **B**: C1C2, **C**: Ropivacain und **D**: tPA (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, n=6 für C1C2, Ropivacain, tPA und HTS, n = 3 für CCI,

\*: p < 0,05, Mann-Whitney Rank Sum Test)

Im Vergleich der untersuchten Gruppen exklusive der CCI-Gruppe (Abbildung 13) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der CD68-Indizes. Einzig die mit tPA behandelten Tiere wiesen einen um 12% höheren CD68-Index als die mit 0,9% NaCl-Lösung behandelten Tiere auf.

Um einen eventuellen Einfluss der Injektion aufzuzeigen, wurde eine Gruppe unbehandelter Tiere untersucht, deren CD68-Index auf dem Niveau der Kontrollgruppe angesiedelt war.



**Abb. 13: CD68-Index (CD68+ Regionen/mm<sup>2</sup>) in Relation zur Kontrollgruppe**

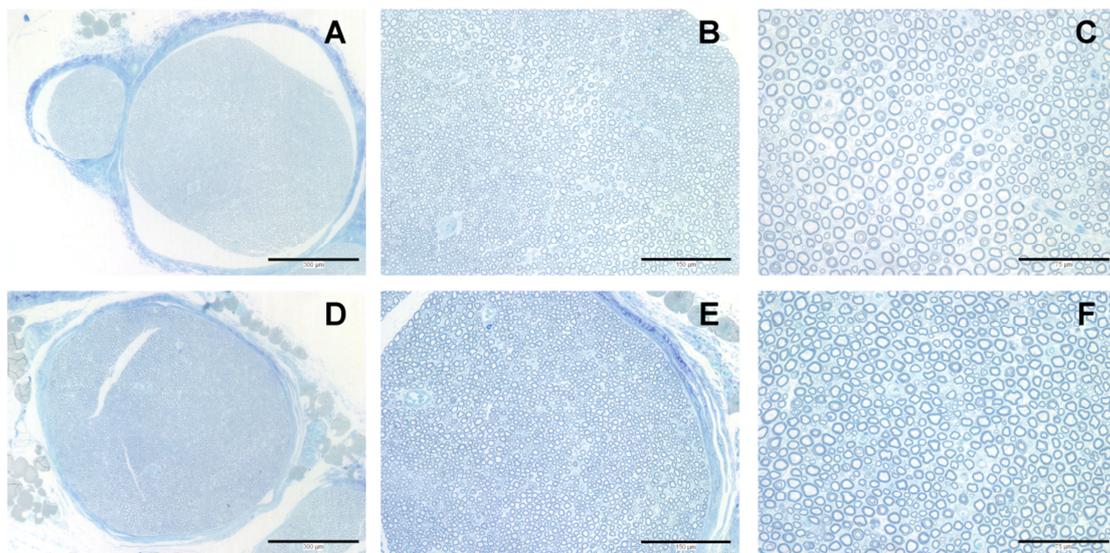
Die Substanzen C1C2, 7,5% Ropivacain, 0,9% NaCl-Lösung, HTS (10% NaCl-Lösung) und tPA wurden perineural des N. ischiadicus injiziert. Nach 7 d wurden die Nerven entnommen. Weiterhin wurden auch Nerven unbehandelter Tiere entnommen. Durch immunhistochemische Färbungen mit Anti-CD68 wurden Makrophagen durch einen Farbumschlag dargestellt. Die Anzahl der so angefärbten Regionen wurde mit der Fläche des Endoneuriums in Relation gesetzt (CD68-Index).

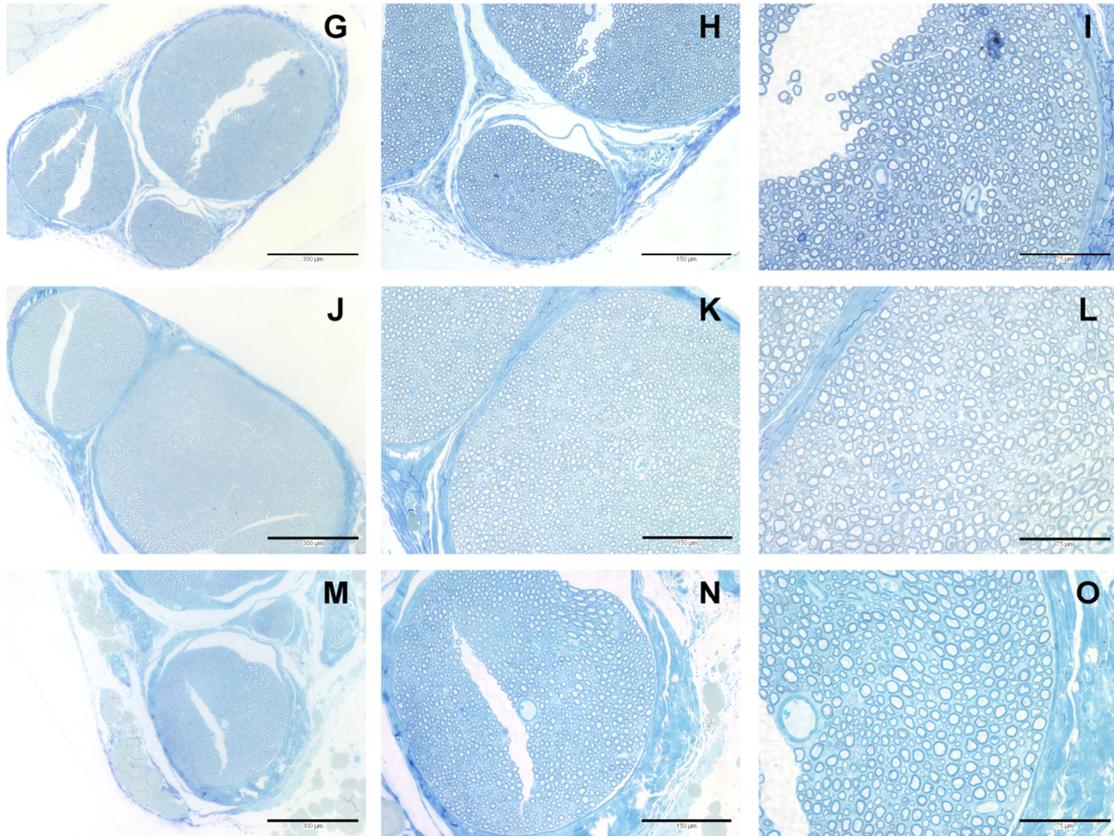
Es zeigten sich im Vergleich der Gruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der CD68-Indizes.

(Mittelwert ± Standardabweichung, n = 6, p > 0,05, One Way ANOVA Analysis of Variance)

### 3.2 Morphologische Darstellung der Nerven nach Richardson

Für die Untersuchungen der Fasermorphologie der einzelnen Nervenfasern wurde die Färbemethode nach Richardson gewählt. Zunächst wurden die Testsubstanzen perineural an den N. ischiadicus injiziert. Nach 7 d wurden die Nerven entnommen und weiter aufbereitet. Abbildung 14 zeigt repräsentative Originalbilder der Nervenpräparate nach Behandlung mit C1C2 (A-C), 7,5% Ropivacain (D-F), HTS (10% NaCl) (G-I), 0,9% NaCl-Lösung (J-L) und tPA (M-O). Peri- und Endoneurium ließen sich deutlich unterscheiden. Im Bereich des Endoneuriums zeichneten sich die Myelinscheiden durch eine starke Anfärbung aus, wohingegen die Axone kaum angefärbt waren. Weiterhin wurden auch Blutgefäße mit den beinhaltenden Zellen gefärbt. Bei den Rissen innerhalb der Präparate handelte es sich um Artefakte, die durch den Aufarbeitungsprozess bedingt waren. Beim Vergleich der Originalpräparate ließen sich keine Unterschiede, welche auf pathologische Veränderungen hindeuten, erkennen. Es schlossen sich daraufhin weitere Untersuchungen im Rahmen einer histomorphometrischen Begutachtung an.





**Abb. 14: Morphologie der Kunstharzschnitte in Methylenblau-Färbung nach Richardson**

Nerven wurden 7 d nachdem der N. ischiadicus mit den Testsubstanzen behandelt worden war, entnommen und anschließend durch die Färbemethode nach Richardson aufgearbeitet. Durch die resultierende Blaufärbung ließen sich Peri- und Endoneurium sowie Zellen und Blutgefäße im Endoneurium unterscheiden. Die Myelinscheiden zeichneten sich durch eine starke Blaufärbung aus, wohingegen das Innere der einzelnen Axone kaum angefärbt wurde.

**A-C:** Behandlung mit 400  $\mu$ M C1C2-Peptid, **D-F:** Behandlung mit 7,5% Ropivacain, **G-I:** Behandlung mit HTS (10% NaCl), **J-L:** Behandlung mit 0,9% NaCl-Lösung, **M-O:** Behandlung mit 100  $\mu$ g tPA.

Von links nach rechts in zunehmender Vergrößerung. Maßstabsbalken entsprechend von links nach rechts: 300, 150 und 75  $\mu$ m. n = 6, repräsentative Beispiele gezeigt.

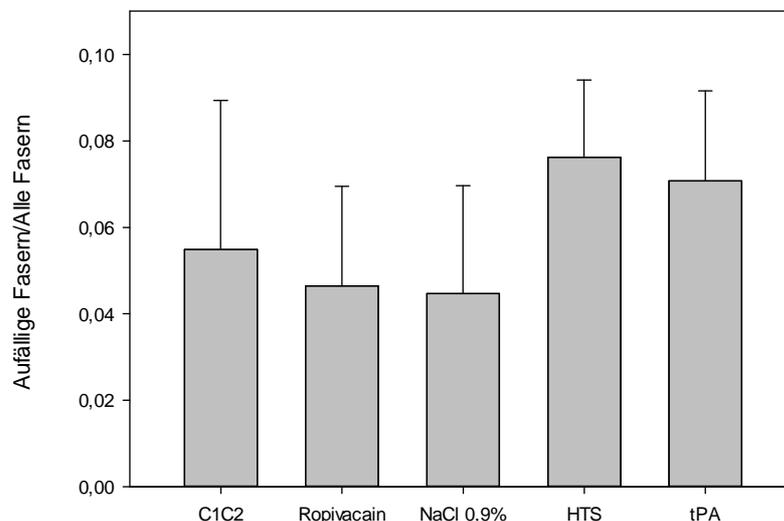
### 3.2.1 Morphologische Alteration der Nervenfasern

An die Aufarbeitung der Nervenproben schlossen sich die histomorphometrischen Untersuchungen an. Durch die unterschiedlichen Färbereigenschaften von Myelinscheide und dem Inneren des Axons, dem Axoplasma, war eine gute Unterscheidbarkeit gegeben.

Anhand vordefinierter Kriterien wurden alle Fasern in zwei zufällig ausgewählten Stichprobengebieten vorgegebener Größe auf ihre Morphologie hin als ‚auffällig‘ oder ‚unauffällig‘ eingestuft. Zuletzt wurde der Quotient aus den auffälligen Fasern und allen erfassten Fasern gebildet.

Im Vergleich der Gruppen HTS, 0,9% NaCl-Lösung, C1C2, tPA und 7,5% Ropivacain ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 15).

Erwähnenswert war, dass alle anderen untersuchten Gruppen im Vergleich zur mit 0,9% NaCl behandelten Gruppe einen höheren – allerdings nicht signifikanten - Anteil auffälliger Fasern aufwiesen. Die Unterschiede bewegten sich im Bereich von 4% für Ropivacain und 41% für HTS.



**Abb. 15: Vergleich morphologisch auffälliger Nervenfasern im Bezug zur Gesamtfaseranzahl**

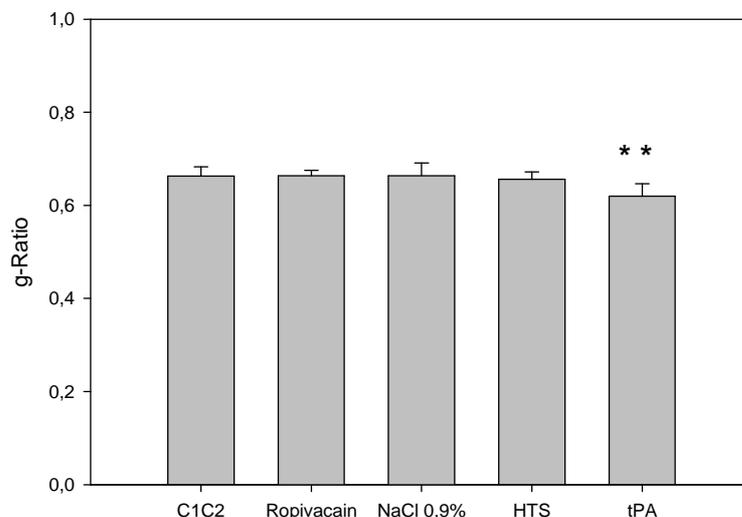
In den Stichprobengebieten wurde die Morphologie der Fasern begutachtet, eine Unterscheidung zwischen unauffälligen und suspekten Fasern getroffen und diese miteinander in ein Verhältnis gebracht. Es ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen feststellen. (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 6$ ,  $p > 0,05$ , One Way ANOVA Analysis of Variance)

### 3.2.2 Verhältnis von Myelinschicht und Faserdurchmesser als Maß für Demyelinisierung und axoplasmatisches Ödem

Die  $g$ -Ratio errechnet sich als Quotient des Radius des Axoplasmas und des Radius der Gesamtfaser (Axoplasma und Myelinschicht). Im Rahmen von Schädigungen der Nervenfasern zeigt sich meist eine Zunahme der  $g$ -Ratio. Diese wird zum einen durch eine Schwellung des Axoplasmas und zum anderen durch eine Ausdünnung der Myelinschicht bedingt. Auch eine Abnahme der  $g$ -Ratio durch Untergang der gesamten Faser ist möglich.

Für unsere Messungen wurden jeweils zwei Stichprobengebiete definierter Größe pro Nervenschnitt gewählt. Innerhalb dieser Gebiete wurden alle morphologisch unauffälligen Fasern berücksichtigt.

Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Im Vergleich der Gruppen untereinander zeigt lediglich die mit tPA behandelte Gruppe eine hoch signifikante Abweichung im Sinne einer Abnahme der  $g$ -Ratio.



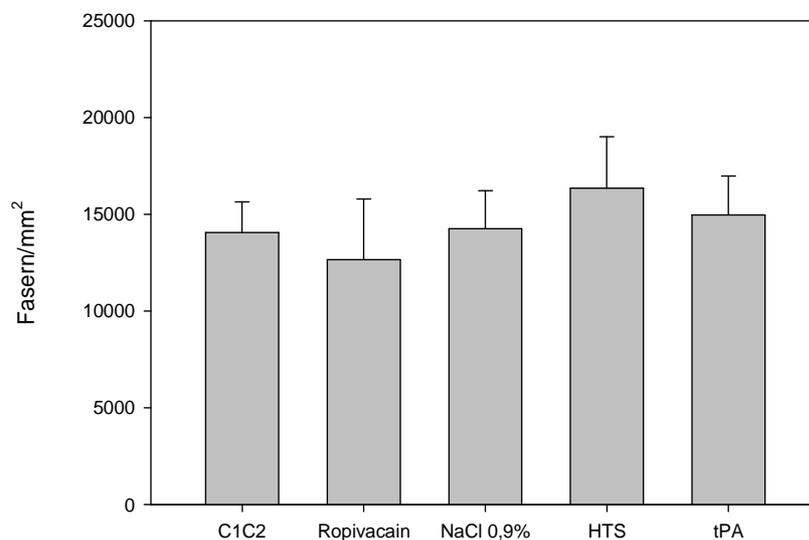
**Abb. 16: Relation zwischen der Dicke der Myelinschicht und dem Faserdurchmesser anhand der  $g$ -Ratio**

Im Vergleich aller Gruppen ergab sich eine hoch signifikante Verminderung der  $g$ -Ratio der mit tPA behandelten Gruppe im Vergleich zu den anderen Gruppen.

(Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $n = 6$ , \* \*:  $p < 0,01$ , One Way ANOVA Analysis of Variance, Holm-Sidak post-hoc Methode gegen NaCl 0,9%-Gruppe)

### 3.2.3 Unterschiede in der Faserdichte als Maß für Faseruntergänge

Durch die Auszählung der Nervenfasern in den Stichprobengebieten und die Bezugnahme auf deren Fläche, ergibt sich die Faserdichte (Fasern/mm<sup>2</sup>). Hierfür wurden sowohl morphologisch auffällige, als auch unauffällige Fasern sowie Schnürringe berücksichtigt. Signifikante Unterschiede konnten hier nicht beobachtet werden. Die mit HTS bzw. tPA behandelten Nerven wiesen allerdings höhere Dichtewerte im Vergleich zur mit 0,9% NaCl behandelten Gruppe auf. Die C1C2-, respektive Ropivacaingruppe wiesen hingegen niedrigere Dichtewerte auf. Abbildung 17 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Gruppen. In einem weiteren Schritt wurden die durchschnittlichen Faserdurchmesser in den Stichprobengebieten der verschiedenen untersuchten Gruppen miteinander verglichen. Auch hierbei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Daten nicht gezeigt, n=6, p > 0,05, One Way ANOVA Analysis of Variance).



**Abb. 17: Keine Änderung der Nervenfaserdichte zwischen den verschiedenen Behandlungen**

Die Faserdichte entspricht der Gesamtzahl aller Fasern, also sowohl morphologisch unauffälliger, als auch auffälliger Fasern und Schnürringen, bezogen auf die Fläche der Stichprobengebiete. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. (Mittelwert ± Standardabweichung, n=6, p > 0,05, One Way ANOVA Analysis of Variance)

## **4. Diskussion**

### **4.1 Diskussion der Methoden**

#### **4.1.1 Zeitpunkt der Probenentnahme**

In der Arbeit wurde ein Zeitpunkt von 7 d gewählt, um morphologische Schäden am Nerven zu untersuchen. Dies entspricht der gängigen Literatur über den zeitlichen Ablauf der Degeneration eines Nerven nach seiner Schädigung. So durchtrennten beispielsweise Gilliatt et al. den N. fibularis communis am Unterschenkel von Pavianen. In der Folge wurden elektrophysiologisch die Summenaktionspotentiale des M. extensor digitorum brevis bei Nervenstimulation distal der Schädigung abgeleitet. Ab dem sechsten Tag zeigt sich ein vollständiges Ausbleiben einer motorischen Reaktion [88]. Neben den funktionellen Einbußen ergeben sich auch morphologische Veränderungen im Verlauf der Zeit. Im Rahmen der Versuche von Basbaum et al. wurde im N. ischiadicus von Katzen durch Hypothermie eine Waller-Degeneration ausgelöst. Hierbei kann bereits 7 h nachdem der Schaden gesetzt wurde, eine beginnende Degeneration beobachtet werden. Nach 3 d zeigen sich zahlreiche Faseruntergänge sowie ein persistierendes intraneurales Ödem. Diese Veränderungen sind nach 7 d weiterhin sichtbar, begleitet durch beginnende Einsprossung von Regeneratknospen [89]. Überdies kann beobachtet werden, dass CD68-markierte Makrophagen ab 2 d nach Schädigung eines Nerven ins Gewebe einwandern [23]. Auch 28 d nachdem ein Nerv durch Ligatur geschädigt wurde, sind noch vermehrt intraneurale Makrophagen nachweisbar [90]. Letztendlich stellt der siebente Tag nach Injektion einen geeigneten Zeitpunkt zur die Entnahme der Proben dar. Zum einen sind morphologische Veränderungen der Nerven einer histomorphometrischen Beurteilung gut zugänglich und zum anderen ist die Makrophagenpopulation im Falle einer Entzündung oder einer Waller-Degeneration ausreichend groß.

#### **4.1.2 CD68-Färbung**

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, stellt die CD68-Färbung einen Parameter für eine Entzündungsreaktion dar. In der Literatur findet diese Methode, also

Quantifizierung der gefärbten Areale und Bezugnahme auf eine Flächeneinheit, breite Anwendung an verschiedensten Organsystemen, inklusive des peripheren Nervensystems [91-93]. Der Antikörper ist spezifisch für das Antigen CD68, welches neben der Zelloberfläche von Zellen des Mononuklären phagozytotischen Systems (MPS) auch in deren Lysosomen beobachtet werden kann [86]. Eine Fehldeutung durch Färbung anderer Zellpopulationen erscheint daher unwahrscheinlich. Das Vorhandensein des Antigens innerhalb der Lysosomen bietet jedoch durch eine vorausgegangene Zelllyse die Möglichkeit, eine vermehrte Färbereaktion und damit eine Überschätzung der Makrophagenpopulation hervorzurufen. Eine Lyse der Zellen kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durch Entnahme der Proben, den Gefrierprozess, das Schneiden oder das Anfärben auftreten.

#### **4.1.3 Histomorphometrie**

Durch morphometrische Vermessung können die histologischen Schnitte anhand standardisierter Kriterien ausgewertet und verglichen werden. Die Untersucherabhängigkeit wird dadurch auf ein Minimum begrenzt.

Die Auswahl der Stichprobengebiete erfolgte hierbei randomisiert. Da physiologische Unterschiede der Verteilung von Nervenfasern unterschiedlichen Kalibers innerhalb des Nerven beobachtet werden können, wurde sowohl eine Stichprobe in der Peripherie als auch im Zentrum des Nerven untersucht. Wie oben beschrieben wiesen die gemessenen Faserdurchmesser im Vergleich der Gruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede auf, sodass eine Vergleichbarkeit der weiteren Messwerte gegeben ist.

Die Bezugnahme vom Inneren des Axons zu seiner Myelinschicht im Sinne der Berechnung der *g*-Ratio ist eine etablierte histomorphometrische Methode in der Diagnostik neuropathologischer Veränderungen des peripheren Nervensystems [94, 95]. Bei Faserschädigungen, z.B. nach Anwendung von Oxaliplatin oder mechanischer Schädigung zeigt sich die *g*-Ratio im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe erhöht. Dies ist zum einen durch ein intraneurales Ödem und zum anderen durch eine Ausdünnung der Myelinschicht bedingt [94, 95]. Die Messung von Innen-/ bzw. Gesamtdurchmesser sowie die Berechnung

der  $g$ -Ratio stellen eine objektive Untersuchungsmethode dar. Die Auswahl des Ortes am Querschnitt des Axons, an dem der Durchmesser bestimmt wird, stellt einen möglichen Faktor dar, der eine Verfälschung der Ergebnisse denkbar erscheinen lässt. Um die Vergleichbarkeit nicht zu beeinträchtigen, wurde hierbei stets der Ort des augenscheinlich geringsten Faserdurchmessers gewählt.

Die Messung der Faserdichte gehört ebenfalls zu den etablierten histomorphometrischen Methoden der Evaluation von Nervenschäden. Nach einer ausgeprägten Schädigung des Nerven, wie sie z.B. nach mechanischer Schädigung auftritt, zeigen sich Faseruntergänge der Axone. In der Folge kommt es zu einer Abnahme der Faserdichte [95, 96]. Bedingt durch die Färbetechnik nach Richardson können nur myelinisierte Fasern berücksichtigt werden. Die Anfärbung kleiner, unmyelinisierter Fasern ist letztlich zu schwach für eine Beurteilung. Daher können etwaig auftretende Untergänge dieser Faserpopulation nicht beurteilt werden.

Die Beurteilung der einzelnen Nervenfasern, um eine Unterscheidung zwischen unauffälligen und auffälligen Fasern zu treffen, stellt einen basalen Schritt der histologischen Begutachtung dar. Unterscheidungen zwischen gesunden und morphologisch auffälligen Fasern stellen eine subjektive Einschätzung dar und gestalten sich auch für den Geübten teils problematisch. Als Beispiel sei der Übergang von Ranvier'schen Schnürringen und den internodalen Abschnitten des Nerven zu nennen, welcher bei ungünstiger Lage innerhalb der Schnittebene mit einem beginnenden Faseruntergang verwechselt werden kann. Im Zweifelsfall wurden die Fasern als auffällig klassifiziert, um eine Gleichbehandlung aller Untersuchungsgruppen zu gewährleisten und morphologische Schäden nicht zu unterschätzen. Nichtsdestotrotz müssen auffällige Ergebnisse aufgrund der Untersucherabhängigkeit kritisch hinterfragt werden.

Morphologische Schäden der Nerven lassen auch Rückschlüsse auf funktionelle Einbußen des Nerven zu. Whitlock et al. zeigen diesen Sachverhalt am Beispiel einer mechanischen Schädigung. Im Rahmen der histomorphometrischen Beurteilung ergibt sich das Bild einer massiven

Schädigung der Nervenfasern. Durch Funktions-Assays an Versuchstieren kann auch eine gleichzeitige funktionelle Beeinträchtigung aufgezeigt werden [96].

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Entzündung und Makrophagenanzahl**

Hinsichtlich der Anzahl der Makrophagen, welche durch die Zahl der CD68-positiven Regionen visualisiert wird und damit Rückschlüsse auf die Entzündungsaktivität erlaubt, ergeben sich für die untersuchten Gruppen Ropivacain, tPA, HTS, C1C2 und die Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede. Um einen etwaigen Einfluss der Injektionsmaßnahme selbst auf die Immunreaktivität der Nervenproben auszuschließen, wurde auch eine Gruppe von unbehandelten Tieren untersucht, deren Ergebnisse sich wiederum nicht unterscheiden. Im Hinblick auf den Vergleich zwischen den Testgruppen und der CCI-Gruppe fällt auf, dass die Werte aller untersuchten Gruppen deutlich unterhalb dessen der CCI-Gruppe liegen. Die Ligatur von Nerven im Sinne einer CCI stellt heute ein gut untersuchtes Modell dar, das sich vergleichbar zu Neuropathien am Menschen verhält [97, 98]. Im Zuge der mit diesem Modell einhergehenden Entzündungsreaktion, wurde bereits von der Invasion von CD68-positiven Makrophagen berichtet [99, 100]. Dies wird durch unsere Ergebnisse bestätigt.

Trotz insgesamt nicht signifikanter Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen, fällt doch ein tendenzieller Unterschied zwischen C1C2 und Ropivacain auf der Einen, sowie HTS und tPA auf der anderen Seite auf.

Die Werte der Letztgenannten befinden sich auf dem Niveau der Kontrollgruppe, wohingegen C1C2 und Ropivacain weniger CD68-positive Regionen aufweisen.

Im Zusammenhang mit der Anwendung von Lokalanästhetika konnte bereits ein inhibitorischer Einfluss bzgl. der Chemotaxis *in vitro* auf Peritonealmakrophagen festgestellt werden. Hierfür wurden u.a. Lidocain und Tetracain, also sowohl Amid-, als auch Ester-Lokalanästhetika untersucht [101, 102]. Eine antiinflammatorische Wirkkomponente bei der Anwendung von

Lokalanästhetika wurde bereits in mehreren Artikeln diskutiert. So zeigt sich beispielsweise, dass Lidocain sowie Bupivacain, im Gegensatz zu Ropivacain, die Funktion von Granulozyten einschränken können [103]. Andere Studien konnten auch bei der Anwendung von Ropivacain im Tiermodell im Rahmen von Endotoxin-vermittelten Lungenerkrankungen sowie bei Peritonitis, antiinflammatorische Effekte aufzeigen [104, 105]. In allen genannten Publikationen wurden die Messungen jedoch in kurzem zeitlichem Abstand zur Applikation des jeweiligen Lokalanästhetikums durchgeführt. Ropivacain besitzt *in vivo* eine Halbwertszeit von wenigen Stunden [106], weswegen ein nachweisbarer antiinflammatorischer Effekt 7 d nach Behandlung unwahrscheinlich erscheint. Für das Peptid C1C2 existieren abseits der Ergebnisse dieser Arbeit noch keine Studien in der Literatur. Für beide Pharmaka lässt sich keine Entzündungsreaktion nachweisen. Eine antiinflammatorische Wirkung lässt sich jedoch aufgrund der nicht ausreichenden Signifikanz der Unterschiede nicht ableiten.

Bezüglich des Verhaltens von Makrophagen in hypertonischem Milieu, kamen bereits andere Studien zu dem Ergebnis, dass hypertonische Bedingungen als chemotaktischer Stimulus für die Immigration von Zellen des mononukleären phagozytotischen Systems (MPS) dienen können [107, 108]. Ebenso wurde bereits beobachtet, dass Plasminogenaktivatoren ein chemotaktisches Potential für Makrophagen aufweisen [109, 110]. An peripheren Nerven von tPA-Knockout-Mäusen zeigt sich nach experimenteller Ligatur neben der niedrigeren Anzahl an Makrophagen, zudem eine eingeschränkte Regenerationskapazität der Nerven [111]. Durch Applikation von tPA in die Peripherie geschädigter Nerven kann eine im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhte Zahl an Makrophagen beobachtet werden [85].

Im Rahmen dieser Arbeit zeigen sich keine Hinweise, dass die Anwendung der untersuchten Pharmaka zur Entstehung einer lokalen Entzündungsreaktion führt.

#### **4.2.2 Histomorphometrie**

Schädigende Noxen, z.B. mechanische Verletzungen, führen zum Untergang von Axonen und damit zu einer Abnahme der Nervenfaserdichte [95, 96, 112].

Im Rahmen unserer Versuche zeigen sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Gruppen. Im Frühstadium der Waller-Degeneration, also meist innerhalb der ersten vier Tage, findet sich eine Schwellung der Axone. Dies wird morphologisch manifest durch einen größeren Durchmesser des Axons, sowie in der Folge, durch ein verschobenes Verhältnis der Dicke der Myelinschicht zum Gesamtdurchmesser der Faser. Das Myelin erscheint deutlich ausgedünnt, was zum einen einer Demyelinisierung, zum anderen einer bloßen Dehnung des Myelins zugeschrieben werden kann. Dies resultiert in einem Anstieg der *g*-Ratio [113]. Auf der anderen Seite kann auch beobachtet werden, dass geschädigte, bzw. im Untergang befindliche Axone schrumpfen, was reaktiv zu einer Zunahme der Dicke der Myelinschicht durch Kontraktion führt. Dies wird ersichtlich durch ein Absinken der *g*-Ratio [114]. Im Rahmen unserer Versuche stellen sich für die Gruppen der Tiere, welche mit HTS, Ropivacain und C1C2 behandelt wurden, keine Auffälligkeiten dar. Lediglich in den Nervenpräparaten der tPA-Gruppe findet sich ein verschobenes Verhältnis im Sinne einer im Vergleich erniedrigten *g*-Ratio.

Eine wachsende Anzahl an Arbeiten zeigt eine potentielle Neurotoxizität von tPA, vor allem im zentralen Nervensystem. Tsirka et al. kommen zu dem Schluss, dass tPA eine entscheidende Rolle beim Untergang von Neuronen im Rahmen eines ischämischen Apoplex im Tiermodell spielt [115]. Goto et al. konnten zudem im Rahmen von *in vivo*-Versuchen einen konzentrationsabhängigen Effekt von tPA auf normales Hirngewebe hinsichtlich der Induktion von Nekrosen feststellen [116].

Hierfür verantwortlich gemacht wird zum einen die vermehrte Aktivierung von NMDA-Rezeptoren, einer Population von Ionenkanälen, welche physiologischerweise durch Glutamat gesteuert wird [117]. Als Folge dieser Aktivierung kommt es zu einem massiven Einstrom von Kalzium-Ionen in die Zellen, welche in hohen Konzentrationen exzitotoxisch wirken. Damit werden verschiedene schädigende Prozesse, von der Bildung freier Radikale, bis hin zum Zelluntergang in Gang gesetzt [118]. Zum anderen wird auch die Interaktion von tPA mit Matrixmetalloproteasen und der einhergehenden

Schrankenstörung, welche in extra- und intrazellulären Ödemen gipfelt, als mögliche Ursache neurotoxischer Effekte diskutiert [119]. Yong et al. zeigen auf, dass die fibrinolytische Aktivität, welche im Zeitverlauf der Waller-Degeneration im peripheren Nervensystem zu beobachten ist, durch plasminogenaktivierende Proteine, u.a. tPA und die Aktivierung von MMP's mediiert wird [120].

Abseits des postulierten neurotoxischen Potentials existieren auch Publikationen, welche tPA eine neuroprotektive Funktion zuordnen. Lee et al. beobachteten bei der Behandlung von corticoneuronalen Zellkulturen mit tPA, dass dieses neurotrophische Effekte aufweist und sich positiv auf Wachstum und Überleben der Zellen auswirkt [121]. Akassoglu et al. zeigten im Rahmen ihrer Versuche, dass bei tPA-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ein höheres Maß an Neurodegeneration nach CCI-Ligatur beobachtet werden kann [122]. Weiterhin zeigen Knock-out-Mäuse für uPA und tPA ein verzögertes Regenerationsverhalten sensorischer sowie motorischer Funktionen im Anschluss an eine Nervenverletzung [123]. In der Literatur können keine Daten, die auf eine Schrumpfung des Axons, bzw. eine Verdickung der Myelinschicht im Rahmen einer beginnenden Waller-Degeneration hindeuten, gefunden werden.

Bei Nervenschäden erweisen sich meist mehrere der untersuchten Kriterien - Faserdichte, *g*-Ratio und Morphologie - als auffällig [8, 89]. Aufgrund der Tatsache, dass sich die weiteren histomorphometrischen Ergebnisse im Vergleich zwischen tPA und den anderen untersuchten Gruppen unauffällig zeigten, darf angenommen werden, dass trotz der verschobenen *g*-Ratio kein pathologisches Geschehen im Sinne einer Waller-Degeneration vorliegt.

Moderne Lokalanästhetika galten lange Zeit als eine Klasse von Pharmaka, die in ihrer Anwendung relativ sicher seien. In den letzten Jahren allerdings gibt es zunehmende Zweifel an dieser Einschätzung, da mehrere Studien Hinweise darauf geben, dass auch Lokalanästhetika ein neurotoxisches Potential aufweisen [17, 18]. Whitlock et al. zeigten, dass die einmalige Injektion von 50 µl 0,75%-igem Ropivacain in die Peripherie des N. ischiadicus von Lewis-Ratten im Verlauf von zwei Wochen mit einer Waller-Degeneration des Nerven

einhergeht. Zudem liegt die resultierende Faserdichte weit unterhalb derer, die in unseren Schnitten vorliegt, bei vergleichbarer Dichte innerhalb der Kontrollgruppe [124]. Cereda et al. hingegen fanden keine signifikanten histopathologischen Veränderungen an Nerven, welche sieben Tage vor Entnahme eine intraneurale Injektion von 100 µl 0,5%-igem Ropivacain erhielten [125]. Die funktionelle Untersuchung mit Verhaltensversuchen durch Iohom et al. im Verlauf von 67 Tagen nach intraneuraler Injektion von 0,2 µl 0,75%-igem Ropivacain ergibt keine Einschränkungen. Am Ende der Testreihe wurden die behandelten Nerven entnommen und hinsichtlich pathologischer Veränderungen untersucht, wobei sich keine signifikanten Veränderungen darstellen. Die Auswertung der histologischen Schnitte geschah allerdings nicht anhand histomorphometrischer Parameter, sondern durch unabhängige Untersucher, deren Einschätzungen teilweise stark von einander abweichen [126]. Unsere Ergebnisse decken sich mit denen der beiden letztgenannten Studien, im Rahmen derer Ropivacain direkt intraneural verabreicht wurde, wenn auch in geringeren Dosen, als in unseren Experimenten.

Für C1C2 existieren keine vergleichbaren Daten. Bei unseren Versuchen ergeben sich keine Hinweise darauf, dass die alleinige Anwendung des Peptids zur Schrankenöffnung einen schädigenden Effekt im Sinne morphologischer Veränderungen auf periphere Nerven hat.

Die Auswirkungen eines hypertonen Milieus auf Zellen, wie z.B. Erythrozyten, im Sinne einer Schrumpfung und darauffolgenden Anpassungsmaßnahmen, die zu einem Anschwellen der Zellen bis hin zu deren Untergang führen können, stellen ein bekanntes Phänomen dar [127]. Finean et al. konnten bei der Behandlung von Nerven mit hypertonen Medien eine Zunahme der Dicke der Myelinschicht beobachten [128]. Bei *in vitro*-Versuchen an Froschnerven, welche für bis zu 2 h in hypertoner Ringer-Lösung eingelegt wurden, ergeben sich keine signifikanten ultrastrukturellen Veränderungen der Nervenfasern und ihrer Myelinschicht [129]. Takenami et al. injizierten u.a. 25%-ige und damit hypertone Glukose-Lösung intrathetokal in den Spinalkanal von Ratten. Bei der 4 d nach Injektion durchgeführten histologischen Begutachtung von Schnitten aus dem Rückenmark können keine pathologischen Veränderungen festgestellt

werden [130]. Unsere Versuche bestätigen die aus dem ZNS gewonnenen Erkenntnisse. Im Rahmen der histomorphometrischen Begutachtung der Nerven finden sich keine nennenswerten Unterschiede im Vergleich zu den anderen untersuchten Gruppen.

### **4.3 Schlussfolgerungen und Ausblick**

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten allesamt daraufhin, dass die einmalige Öffnung der Blut-Nerven-Schranke durch C1C2 bzw. HTS zu keinen messbaren pathologischen Veränderungen führt. Histomorphometrisch ergibt sich kein Anhalt für ein intraneurales Ödem, Demyelinisierungen sowie vermehrte degenerative Veränderungen der Nervenfasern oder Faseruntergänge. Eine vermehrte Invasion von Makrophagen, wie sie im Rahmen einer Entzündungsreaktion vorkommt, kann ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Verhaltensversuche zeigen keine über beide Modalitäten konsistente Hyperalgesie, wie sie im Rahmen einer Entzündung oder auch eines neuropathischen Schmerzes vorkommt.

Hinsichtlich der Toxizität von tPA bei der perineuralen Anwendung zeigt sich lediglich eine Auffälligkeit im Sinne einer Schwellung bzw. Verdickung der Myelinschicht, wie sie im Verlauf der Waller-Degeneration vorkommen kann. Aufgrund der im Vergleich zu den anderen Gruppen unauffälligen Ergebnisse der weiteren histomorphometrischen Analysen entschieden wir uns, diese Abweichung als nicht pathologisch einzustufen. Weiterhin zeigt sich die Anzahl der Makrophagen im Vergleich auch hier nicht signifikant erhöht, was wiederum gegen ein entzündliches Geschehen spricht.

Die bis dato erzielten Ergebnisse bezüglich einer potentiell bestehenden Toxizität der untersuchten Agenzien präsentieren sich vielversprechend. Nichtsdestotrotz sind weitere Untersuchungen unabdingbar.

Die im Rahmen der CD68-Färbung gewonnen Daten deuten nicht auf eine gesteigerte Invasion von Makrophagen hin, welche die dominante Zellpopulation im Rahmen einer Entzündungsreaktion darstellen [21]. Allerdings wurde nicht auf eine Immunreaktion im Sinne einer Aktivierung des spezifischen Immunsystems eingegangen. Um diese auszuschließen, könnten weitere immunhistochemische Färbungen sinnvoll sein, so z.B. für T- (CD3) und B-

Lymphozyten (CD20) [131]. Weiterhin könnte sich die gezielte Untersuchung des infiltrierten Gewebes auf Entzündungsmediatoren, wie z.B. Prostaglandine, anschließen, um ein immunologisches Geschehen in seiner Gänze zu erfassen. Proteine, aber auch Proteinfragmente, wie Peptide besitzen ein immunogenes Potential, speziell dann, wenn sie bioaktiv sind, d.h. mit zellulären Strukturen in Interaktion treten können. Besondere Relevanz kommt diesem Umstand im Bereich der über die Nahrung aufgenommen Eiweiße zu [132]. Nichtsdestotrotz ist auch eine Sensibilisierung durch Peptide, wie C1C2 oder tPA, welche parenteral appliziert werden, denkbar. Hinweise hierfür könnte neben den bereits erwähnten Leukozytenfärbungen auch ein immunhistochemischer Nachweis von Mastzellen durch CD117-Färbungen erbringen [131].

Die Ausweitung der Verhaltensversuche bzgl. einer potentiellen schmerzauslösenden Wirkung, sollte ebenfalls auf Tiere ausgedehnt werden, die mit tPA behandelt wurden. Um mögliche funktionelle Einschränkungen im Nachgang der Behandlung der Nerven zu beleuchten, könnten Messungen der Nervenleitgeschwindigkeit [133] sowie motorische Funktionstests, z.B. mithilfe des Rota-Rod-Versuchs durchgeführt werden [134].

Bisher wurde die einmalige perineurale Anwendung untersucht, wie sie beispielsweise im operativen Umfeld im Rahmen einer Regionalanästhesie durchgeführt würde. Weiterhin ist auch der längerfristige Einsatz denkbar, sei es zur postoperativen Schmerztherapie via Plexuskatheter [135] oder im Rahmen einer eskalierenden invasiven Therapie bei chronischen Schmerzsyndromen [136]. Hierfür sind Untersuchungen im Langzeitversuch mit wiederholter bzw. kontinuierlicher Applikation über mehrere Tage und Wochen notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus zunächst in der Erforschung lokal toxischer Effekte. Um eine sichere Anwendung zu gewährleisten, müssen allerdings auch systemische Effekte hinreichend untersucht werden. Lokalanästhetika besitzen, wie erwähnt, das Potential, systemtoxische Wirkungen, z.B. am Herzmuskel, zu entfalten [13]. Vor allem im Rahmen von intravasalen Fehlinjektionen erlangt diese Wirkung besondere Relevanz.

Da Tight Junctions ebenfalls an der Bildung der Endothelbarriere beteiligt sind [137], würde eine systemische Wirkung der interferierenden Pharmaka mit einer generalisierten Plasmaextravasation eine verheerende Wirkung entfalten, angefangen von der Bildung generalisierter Ödeme über die Entwicklung eines Volumenmangelschocks bis hin zum möglichen Tod des Individuums.

Zur Evaluation dieses Sachverhaltes stellen Dosis-Wirkungs-Versuche bei gezielter systemischer Applikation im Tierversuch einen notwendigen Untersuchungsschritt dar.

## 5. Zusammenfassung

Die Blut-Nerven-Schranke stellt eine Barriere zwischen den Axonen und dem Gewebe, das sie umgibt, dar. Durch verschiedene Mechanismen wird die intraneurale Homöostase aufrecht erhalten, welche für die Funktion der Axone essentiell ist. Auf der einen Seite stellt die Blut-Nerven-Schranke einen Schutzmechanismus für Nerven dar. Auf der anderen Seite erschwert sie die Applikationen von Pharmaka, z.B. Analgetika, sodass bis dato Lokalanästhetika die einzige Substanzklasse darstellen, welche zur gezielten örtlichen, analgetischen Therapie in der breiten Verwendung ist.

Das Netzwerk der Tight junctions im Perineurium ist eine Schlüsselkomponente für die Funktion der Blut-Nerven-Schranke. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass durch pharmakologische Interaktion mit den Tight Junctions eine Schrankenöffnung erzielt werden kann. Dieser Effekt wurde durch unsere Arbeitsgruppe nachgewiesen für das von der N-terminalen Schleife des Claudin-1 abgeleitete Peptid C1C2, hypertone Substanzen, wie HTS und den Gewebefibrinolyseaktivator tPA. Durch Anwendung solcher Wirkstoffvermittler könnte das Axon für andere Substanzklassen erreichbar werden.

Die Fragestellung dieser Arbeit war, ob sich durch die lokale Anwendung dieser Pharmaka am N. ischiadicus von Wistar Ratten toxische Effekte ergeben. Hierzu wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Anti-CD68-Antikörper zur Darstellung von endoneuralen Makrophagen als Zeichen einer lokalen Entzündungsreaktion verwendet. Weiterhin wurden die Nerven mit Hilfe histomorphometrischer Analysen auf morphologische Veränderungen hin untersucht.

Keine der untersuchten Substanzen bewirkte eine Zunahme von endoneuralen Makrophagen im Vergleich zur scheinbehandelten Kontrollgruppe. Die Positivkontrolle eines N. ischiadicus nach chronischer Konstriktionsläsion (CCI) zeigte hingegen eine massive Vermehrung endoneuraler Makrophagen.

Bei der morphometrischen Analyse zeigte sich nur bei der mit tPA behandelten Gruppe eine Abnahme der g-Ratio, welche das Verhältnis von Myelinschicht zu

Faserdurchmesser widerspiegelt. Die anderen Teilaspekte der Untersuchung blieben unauffällig.

Aus dieser Arbeit kann geschlossen werden, dass sich mit den verwendeten Untersuchungsmethoden für keine der untersuchten Substanzen eine lokal toxische Wirkung nachweisen lässt. Um die Aussagekraft bezüglich der Anwendungssicherheit weiter zu erhöhen, wären im weiteren Verlauf Versuchsreihen mit Blick auf mögliche Langzeitwirkungen und etwaige systemtoxische Wirkungen von besonderer Bedeutung.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Kuwabara, S., et al., *Distribution patterns of demyelination correlate with clinical profiles in chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2002. **72**(1): p. 37-42.
2. Brown, W.F. and R. Snow, *Patterns and severity of conduction abnormalities in Guillain-Barre syndrome*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1991. **54**(9): p. 768-74.
3. Kanda, T., *Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2013. **84**(2): p. 208-12.
4. Kanda, T., M. Yamawaki, and H. Mizusawa, *Sera from Guillain-Barre patients enhance leakage in blood-nerve barrier model*. Neurology, 2003. **60**(2): p. 301-6.
5. Fokke, C., et al., *Diagnosis of Guillain-Barre syndrome and validation of Brighton criteria*. Brain, 2013.
6. Kuncl, R.W. and E.B. George, *Toxic neuropathies and myopathies*. Curr Opin Neurol, 1993. **6**(5): p. 695-704.
7. Han, Y. and M.T. Smith, *Pathobiology of cancer chemotherapy-induced peripheral neuropathy (CIPN)*. Front Pharmacol, 2013. **4**: p. 156.
8. Estebe, J.P. and R.R. Myers, *Amitriptyline neurotoxicity: dose-related pathology after topical application to rat sciatic nerve*. Anesthesiology, 2004. **100**(6): p. 1519-25.
9. Chen, Z.L., W.M. Yu, and S. Strickland, *Peripheral regeneration*. Annu Rev Neurosci, 2007. **30**: p. 209-33.

10. Lirk, P., et al., *The neurotoxic effects of amitriptyline are mediated by apoptosis and are effectively blocked by inhibition of caspase activity.* *Anesth Analg*, 2006. **102**(6): p. 1728-33.
11. Schulte am Esch, J.B., Hanswerner; Kochs, Eberhard; Scholz, Jens; Standl, Thomas; Werner, Christian, *Duale Reihe Anästhesie - Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie.* 2011. **4**: p. 186 - 220.
12. Dullenkopf, A. and A. Borgeat, *[Local anesthetics. Differences and similarities in the "-cains"].* *Anaesthesist*, 2003. **52**(4): p. 329-40.
13. Graf, B.M., *The cardiotoxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine.* *Curr Top Med Chem*, 2001. **1**(3): p. 207-14.
14. Myers, R.R., et al., *Neurotoxicity of local anesthetics: altered perineurial permeability, edema, and nerve fiber injury.* *Anesthesiology*, 1986. **64**(1): p. 29-35.
15. Barsa, J., et al., *A comparative in vivo study of local neurotoxicity of lidocaine, bupivacaine, 2-chloroprocaine, and a mixture of 2-chloroprocaine and bupivacaine.* *Anesth Analg*, 1982. **61**(12): p. 961-7.
16. Hansen, T.G., *Ropivacaine: a pharmacological review.* *Expert Rev Neurother*, 2004. **4**(5): p. 781-91.
17. Sun, Z., et al., *In vivo and in vitro evidence of the neurotoxic effects of ropivacaine: the role of the Akt signaling pathway.* *Mol Med Rep*, 2012. **6**(6): p. 1455-9.
18. Williams, B.A., et al., *Neurotoxicity of adjuvants used in perineural anesthesia and analgesia in comparison with ropivacaine.* *Reg Anesth Pain Med*, 2011. **36**(3): p. 225-30.
19. Herbst, H., Niedobitek, G., Müller, Ch., *Entzündung.* Böcker, W., Denk, H., Heitz, Ph. U., Moch, H. - *Pathologie 4. Auflage*, 2008: p. 117 - 124.

20. Muller, W.A., *Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response*. Lab Invest, 2002. **82**(5): p. 521-33.
21. Kumar, V., Abbas A. K., Fausto, N., Aster J. C., *Robbins and Cotran - Pathologic Basis of Disease - Eighth Edition*. 2010: p. 50 f.
22. Kumar, V., Abbas A. K., Fausto, N., Aster J. C., *Robbins and Cotran - Pathologic Basis of Disease - Eighth Edition*. 2010: p. 71.
23. Stoll, G., et al., *Wallerian degeneration in the peripheral nervous system: participation of both Schwann cells and macrophages in myelin degradation*. J Neurocytol, 1989. **18**(5): p. 671-83.
24. Mohamed, M.M., et al., *Cytokines secreted by macrophages isolated from tumor microenvironment of inflammatory breast cancer patients possess chemotactic properties*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **46C**: p. 138-147.
25. Jorns, A., et al., *Islet infiltration, cytokine expression and beta cell death in the NOD mouse, BB rat, Komeda rat, LEW.1AR1-iddm rat and humans with type 1 diabetes*. Diabetologia, 2013.
26. Saito, N., et al., *Ultrastructural localization of the CD68 macrophage-associated antigen in human blood neutrophils and monocytes*. Am J Pathol, 1991. **139**(5): p. 1053-9.
27. Murphy, J.E., et al., *Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors*. Atherosclerosis, 2005. **182**(1): p. 1-15.
28. Hendrickx, D.A., et al., *Selective upregulation of scavenger receptors in and around demyelinating areas in multiple sclerosis*. J Neuropathol Exp Neurol, 2013. **72**(2): p. 106-18.
29. Damoiseaux, J.G., et al., *Rat macrophage lysosomal membrane antigen recognized by monoclonal antibody ED1*. Immunology, 1994. **83**(1): p. 140-7.

30. Navarro, X., M. Vivo, and A. Valero-Cabre, *Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration*. Prog Neurobiol, 2007. **82**(4): p. 163-201.
31. Mueller, M., et al., *Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages*. Lab Invest, 2003. **83**(2): p. 175-85.
32. Richardson, K.C., L. Jarett, and E.H. Finke, *Embedding in epoxy resins for ultrathin sectioning in electron microscopy*. Stain Technol, 1960. **35**: p. 313-23.
33. Di Scipio, F., et al., *A simple protocol for paraffin-embedded myelin sheath staining with osmium tetroxide for light microscope observation*. Microsc Res Tech, 2008. **71**(7): p. 497-502.
34. <http://www.iasp-pain.org/Taxonomy#Pain>, gesehen und heruntergeladen am 22.02. 2015.
35. Kiguchi, N., Y. Kobayashi, and S. Kishioka, *Chemokines and cytokines in neuroinflammation leading to neuropathic pain*. Current Opinion in Pharmacology, 2012. **12**(1): p. 55-61.
36. Saika, F., et al., *CC-chemokine ligand 4/macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  participates in the induction of neuropathic pain after peripheral nerve injury*. European Journal of Pain, 2012. **16**(9): p. 1271-1280.
37. Lim, T.K., et al., *Blood-nerve barrier dysfunction contributes to the generation of neuropathic pain and allows targeting of injured nerves for pain relief*. Pain, 2014. **155**(5): p. 954-67.
38. Häbler, C., *Über den K- und Ca-Gehalt von Eiter und Exsudaten und Seine Beziehungen zum Entzündungsschmerz*. Klinische Wochenschrift, 1929. **8**(34): p. 1569-1572.

39. von Gaza W, B.B., *Beziehung zwischen Wasserstoffionenkonzentration und Schmerzempfindung*. . Klin Wochenschr 5, 1926.
40. Diamond, J.M., *Twenty-first Bowditch lecture. The epithelial junction: bridge, gate, and fence*. Physiologist, 1977. **20**(1): p. 10-8.
41. Kobayashi, S., et al., *Imaging of intraneural edema by using gadolinium-enhanced MR imaging: experimental compression injury*. AJNR Am J Neuroradiol, 2005. **26**(4): p. 973-80.
42. Randall, L.O. and J.J. Selitto, *A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1957. **111**(4): p. 409-19.
43. Hargreaves, K., et al., *A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia*. Pain, 1988. **32**(1): p. 77-88.
44. Bunge, M.B., et al., *Perineurium originates from fibroblasts: demonstration in vitro with a retroviral marker*. Science, 1989. **243**(4888): p. 229-31.
45. Haninec, P., *Study of the origin of connective tissue sheaths of peripheral nerves in the limb of avian embryos*. Anat Embryol (Berl), 1988. **178**(6): p. 553-7.
46. Pina-Oviedo, S. and C. Ortiz-Hidalgo, *The normal and neoplastic perineurium: a review*. Adv Anat Pathol, 2008. **15**(3): p. 147-64.
47. Reina, M.A., et al., *[Morphology of peripheral nerves, their sheaths, and their vascularization]*. Rev Esp Anesthesiol Reanim, 2000. **47**(10): p. 464-75.
48. Pummi, K.P., et al., *Tight junction proteins ZO-1, occludin, and claudins in developing and adult human perineurium*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(8): p. 1037-46.

49. Kristensson, K. and Y. Olsson, *The perineurium as a diffusion barrier to protein tracers. Differences between mature and immature animals.* Acta Neuropathol, 1971. **17**(2): p. 127-38.
50. Farquhar, M.G. and G.E. Palade, *Junctional complexes in various epithelia.* J Cell Biol, 1963. **17**: p. 375-412.
51. Ghabriel, M.N., K.H. Jennings, and G. Allt, *Diffusion barrier properties of the perineurium: an in vivo ionic lanthanum tracer study.* Anat Embryol (Berl), 1989. **180**(3): p. 237-42.
52. Anderson, J.M., *Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport.* News Physiol Sci, 2001. **16**: p. 126-30.
53. Furuse, M., et al., *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions.* J Cell Biol, 1993. **123**(6 Pt 2): p. 1777-88.
54. Furuse, M., et al., *Claudin-1 and -2: Novel Integral Membrane Proteins Localizing at Tight Junctions with No Sequence Similarity to Occludin.* The Journal of Cell Biology, 1998. **141**(7): p. 1539-1550.
55. Krause, G., et al., *Structure and function of claudins.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 631-45.
56. Kubota, K., et al., *Ca(2+)-independent cell-adhesion activity of claudins, a family of integral membrane proteins localized at tight junctions.* Curr Biol, 1999. **9**(18): p. 1035-8.
57. Sonoda, N., et al., *Clostridium perfringens Enterotoxin Fragment Removes Specific Claudins from Tight Junction Strands: Evidence for Direct Involvement of Claudins in Tight Junction Barrier.* The Journal of Cell Biology, 1999. **147**(1): p. 195-204.
58. Rechthand, E., Q.R. Smith, and S.I. Rapoport, *A compartmental analysis of solute transfer and exchange across blood-nerve barrier.* Am J Physiol, 1988. **255**(2 Pt 2): p. R317-25.

59. Hackel, D., et al., *Modulation of tight junction proteins in the perineurium for regional pain control*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1257**: p. 199-206.
60. Grant, G.J., et al., *Perineural antinociceptive effect of opioids in a rat model*. Acta Anaesthesiol Scand, 2001. **45**(7): p. 906-10.
61. Likar, R., et al., *Efficacy of peripheral morphine analgesia in inflamed, non-inflamed and perineural tissue of dental surgery patients*. J Pain Symptom Manage, 2001. **21**(4): p. 330-7.
62. Antonijevic, I., et al., *Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation*. J Neurosci, 1995. **15**(1 Pt 1): p. 165-72.
63. Truong, W., et al., *Mu opioid receptors and analgesia at the site of a peripheral nerve injury*. Ann Neurol, 2003. **53**(3): p. 366-75.
64. Rittner, H.L., et al., *Modulation of tight junction proteins in the perineurium to facilitate peripheral opioid analgesia*. Anesthesiology, 2012. **116**(6): p. 1323-34.
65. Zwanziger, D., et al., *A peptidomimetic tight junction modulator to improve regional analgesia*. Mol Pharm, 2012. **9**(6): p. 1785-94.
66. Hackel, D., et al., *Transient opening of the perineurial barrier for analgesic drug delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(29): p. E2018-27.
67. Weerasuriya, A., S.I. Rapoport, and R.E. Taylor, *Modification of permeability of frog perineurium to [14C]-sucrose by stretch and hypertonicity*. Brain Res, 1979. **173**(3): p. 503-12.
68. Rapoport, S.I., *Osmotic opening of the blood-brain barrier: principles, mechanism, and therapeutic applications*. Cell Mol Neurobiol, 2000. **20**(2): p. 217-30.

69. Dobrogowska, D.H. and A.W. Vorbrodt, *Immunogold localization of tight junctional proteins in normal and osmotically-affected rat blood-brain barrier*. J Mol Histol, 2004. **35**(5): p. 529-39.
70. Chung, N.P., et al., *A 22-amino acid synthetic peptide corresponding to the second extracellular loop of rat occludin perturbs the blood-testis barrier and disrupts spermatogenesis reversibly in vivo*. Biol Reprod, 2001. **65**(5): p. 1340-51.
71. Wong, V. and B.M. Gumbiner, *A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier*. J Cell Biol, 1997. **136**(2): p. 399-409.
72. Colegio, O.R., et al., *Claudin extracellular domains determine paracellular charge selectivity and resistance but not tight junction fibril architecture*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(6): p. C1346-54.
73. Oliver, J.J., D.J. Webb, and D.E. Newby, *Stimulated tissue plasminogen activator release as a marker of endothelial function in humans*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2005. **25**(12): p. 2470-9.
74. Masos, T. and R. Miskin, *Localization of urokinase-type plasminogen activator mRNA in the adult mouse brain*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. **35**(1-2): p. 139-48.
75. Friedman, G.C. and N.W. Seeds, *Tissue plasminogen activator expression in the embryonic nervous system*. Brain Res Dev Brain Res, 1994. **81**(1): p. 41-9.
76. Ware, J.H., A.J. Dibenedetto, and R.N. Pittman, *Localization of tissue plasminogen activator mRNA in adult rat brain*. Brain Res Bull, 1995. **37**(3): p. 275-81.
77. Tran, N.D., S.S. Schreiber, and M. Fisher, *Astrocyte regulation of endothelial tissue plasminogen activator in a blood-brain barrier model*. J Cereb Blood Flow Metab, 1998. **18**(12): p. 1316-24.

78. Yang, F., et al., *Tissue plasminogen activator expression and barrier properties of human brain microvascular endothelial cells*. Cell Physiol Biochem, 2011. **28**(4): p. 631-8.
79. Mishiro, K., et al., *Tissue plasminogen activator prevents restoration of tight junction proteins through upregulation of angiopoietin-2*. Curr Neurovasc Res, 2013. **10**(1): p. 39-48.
80. Burggraf, D., et al., *rt-PA causes a dose-dependent increase in the extravasation of cellular and non-cellular blood elements after focal cerebral ischemia*. Brain Res, 2007. **1164**: p. 55-62.
81. Lee, S.R., et al., *Induction of matrix metalloproteinase, cytokines and chemokines in rat cortical astrocytes exposed to plasminogen activators*. Neurosci Lett, 2007. **417**(1): p. 1-5.
82. Reijerkerk, A., et al., *Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier*. J Immunol, 2008. **181**(5): p. 3567-74.
83. Jin, R., G. Yang, and G. Li, *Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator*. Neurobiol Dis, 2010. **38**(3): p. 376-85.
84. Copin, J.C., et al., *Recombinant tissue plasminogen activator induces blood-brain barrier breakdown by a matrix metalloproteinase-9-independent pathway after transient focal cerebral ischemia in mouse*. Eur J Neurosci, 2011. **34**(7): p. 1085-92.
85. Zou, T., et al., *Exogenous tissue plasminogen activator enhances peripheral nerve regeneration and functional recovery after injury in mice*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(1): p. 78-86.

86. <http://www.linaris.de/datenblatt/DBL-E-MAK0341GA.pdf>, Informationen: *Mouse Anti-Rat CD68, monoclonal, gesehen und heruntergeladen am 12.12.2013.*
87. Michailov, G.V., et al., *Axonal neuregulin-1 regulates myelin sheath thickness.* Science, 2004. **304**(5671): p. 700-3.
88. Gilliatt, R.W. and R.J. Hjorth, *Nerve conduction during Wallerian degeneration in the baloon.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1972. **35**(3): p. 335-41.
89. Basbaum, C.B., *Induced hypothermia in peripheral nerve: Electron microscopic and electrophysiological observations.* Journal of Neurocytology, 1973. **2**(2): p. 171-187.
90. Mueller, M., et al., *Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury.* Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2187-97.
91. Jiang, D., et al., *Exogenous hydrogen sulfide prevents kidney damage following unilateral ureteral obstruction.* Neurourol Urodyn, 2013.
92. Keranen, M.A., et al., *Differential effects of pharmacological HIF preconditioning of donors versus recipients in rat cardiac allografts.* Am J Transplant, 2013. **13**(3): p. 600-10.
93. Yang, H., et al., *Exendin-4 ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in the rat.* J Surg Res, 2013. **185**(2): p. 825-32.
94. Tsutsumi, K., et al., *Oxaliplatin induces hypomyelination and reduced neuregulin 1 expression in the rat sciatic nerve.* Neurosci Res, 2014.
95. Pertici, V., et al., *Functional recovery after repair of peroneal nerve gap using different collagen conduits.* Acta Neurochir (Wien), 2014.

96. Whitlock, E.L., et al., *Pregabalin does not impact peripheral nerve regeneration after crush injury*. J Reconstr Microsurg, 2007. **23**(5): p. 263-8.
97. Bagriyanik, H.A., et al., *The effects of resveratrol on chronic constriction injury of sciatic nerve in rats*. Neuroscience Letters, 2014. **561**(0): p. 123-127.
98. Kim, S.H. and J.M. Chung, *An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat*. Pain, 1992. **50**(3): p. 355-63.
99. Ma, W. and J.C. Eisenach, *Cyclooxygenase 2 in infiltrating inflammatory cells in injured nerve is universally up-regulated following various types of peripheral nerve injury*. Neuroscience, 2003. **121**(3): p. 691-704.
100. Durrenberger, P.F., et al., *Cyclooxygenase-2 (Cox-2) in injured human nerve and a rat model of nerve injury*. J Peripher Nerv Syst, 2004. **9**(1): p. 15-25.
101. Kouno, M., *[Effects of local anesthetics on rat leukocyte functions]*. Nihon Yakurigaku Zasshi, 1999. **113**(6): p. 357-66.
102. Sasagawa, S., *Inhibitory effects of local anesthetics on migration, extracellular release of lysosomal enzyme, and superoxide anion production in human polymorphonuclear leukocytes*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1991. **13**(4): p. 607-22.
103. Kiefer, R.T., et al., *Local anesthetics impair human granulocyte phagocytosis activity, oxidative burst, and CD11b expression in response to Staphylococcus aureus*. Anesthesiology, 2003. **98**(4): p. 842-8.
104. Blumenthal, S., et al., *Ropivacaine decreases inflammation in experimental endotoxin-induced lung injury*. Anesthesiology, 2006. **104**(5): p. 961-9.

105. Brocco, M.C., et al., *Histological features of peritoneal lavage with ropivacaine in rats with fecal peritonitis*. Acta Cir Bras, 2012. **27**(2): p. 193-9.
106. [www.fachinfo.de/pdf/007856](http://www.fachinfo.de/pdf/007856), gesehen und heruntergeladen am 04.05.2015.
107. Wiig, H., et al., *Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure*. The Journal of Clinical Investigation, 2013. **123**(7): p. 2803-2815.
108. Muller, S., et al., *Salt-dependent chemotaxis of macrophages*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73439.
109. Kawao, N., et al., *Urokinase-type plasminogen activator contributes to heterogeneity of macrophages at the border of damaged site during liver repair in mice*. Thromb Haemost, 2011. **105**(5): p. 892-900.
110. Bryer, S.C., et al., *Urokinase-type plasminogen activator plays essential roles in macrophage chemotaxis and skeletal muscle regeneration*. J Immunol, 2008. **180**(2): p. 1179-88.
111. Ling, C., et al., *Disruption of tissue plasminogen activator gene reduces macrophage migration*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006. **349**(3): p. 906-912.
112. Machado, J.A., et al., *Stretch-induced nerve injury: a proposed technique for the study of nerve regeneration and evaluation of the influence of gabapentin on this model*. Braz J Med Biol Res, 2013. **46**(11): p. 929-935.
113. Friede, R.L. and A.J. Martinez, *Analysis of the process of sheath expansion in swollen nerve fibers*. Brain Research, 1970. **19**(2): p. 165-182.

114. Friede, R.L. and A.J. Martinez, *Analysis of axon-sheath relations during early wallerian degeneration*. Brain Research, 1970. **19**(2): p. 199-212.
115. Tsirka, S.E., et al., *Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator*. Nature, 1995. **377**(6547): p. 340-4.
116. Goto, H., et al., *Neurotoxic effects of exogenous recombinant tissue-type plasminogen activator on the normal rat brain*. J Neurotrauma, 2007. **24**(4): p. 745-52.
117. Nicole, O., et al., *The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling*. Nat Med, 2001. **7**(1): p. 59-64.
118. Traynelis, S.F. and S.A. Lipton, *Is tissue plasminogen activator a threat to neurons?* Nat Med, 2001. **7**(1): p. 17-8.
119. Lo, E.H., X. Wang, and M.L. Cuzner, *Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases*. J Neurosci Res, 2002. **69**(1): p. 1-9.
120. Yong, N. and C. Guoping, *The role and mechanism of the up-regulation of fibrinolytic activity in painful peripheral nerve injury*. Neurochem Res, 2009. **34**(3): p. 587-92.
121. Lee, H.Y., et al., *Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons*. J Neurochem, 2007. **101**(5): p. 1236-47.
122. Akassoglou, K., et al., *Tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis protects against axonal degeneration and demyelination after sciatic nerve injury*. J Cell Biol, 2000. **149**(5): p. 1157-66.

123. Siconolfi, L.B. and N.W. Seeds, *Mice lacking tPA, uPA, or plasminogen genes showed delayed functional recovery after sciatic nerve crush*. J Neurosci, 2001. **21**(12): p. 4348-55.
124. Whitlock, E.L., et al., *Ropivacaine-induced peripheral nerve injection injury in the rodent model*. Anesth Analg, 2010. **111**(1): p. 214-20.
125. Cereda, C.M., et al., *Local neurotoxicity and myotoxicity evaluation of cyclodextrin complexes of bupivacaine and ropivacaine*. Anesth Analg, 2012. **115**(5): p. 1234-41.
126. Iohom, G., et al., *Long-term evaluation of motor function following intraneural injection of ropivacaine using walking track analysis in rats*. Br J Anaesth, 2005. **94**(4): p. 524-9.
127. Kregenow, F.M., *The Response of Duck Erythrocytes to Hypertonic Media: Further evidence for a volume-controlling mechanism*. The Journal of General Physiology, 1971. **58**(4): p. 396-412.
128. Finean, J.B. and P.F. Millington, *EFFECTS OF IONIC STRENGTH OF IMMERSION MEDIUM ON THE STRUCTURE OF PERIPHERAL NERVE MYELIN*. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1957. **3**(1): p. 89-94.
129. Robertson, J.D., *Structural Alterations in Nerve Fibers Produced by Hypotonic and Hypertonic Solutions*. The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology, 1958. **4**(4): p. 349-364.
130. Takenami, T., et al., *Neurotoxicity of intrathecally administered bupivacaine involves the posterior roots/posterior white matter and is milder than lidocaine in rats*. Reg Anesth Pain Med, 2005. **30**(5): p. 464-72.
131. Elgert, K., *Immunology: Understanding The Immune System, Second Edition*. 2009: p. 687 ff.

132. Hartmann, R., et al., *Cytotoxic and allergenic potential of bioactive proteins and peptides*. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(9): p. 897-920.
133. Mavor, H. and I. Libman, *Motor nerve conduction velocity measurement as a diagnostic tool*. *Neurology*, 1962. **12**: p. 733-44.
134. Dunham, N.W. and T.S. Miya, *A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice*. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc (Baltim)*, 1957. **46**(3): p. 208-9.
135. Meier, G., C. Bauereis, and C. Heinrich, *Der interskalenäre Plexuskatheter zur Anästhesie und postoperativen Schmerztherapie Erfahrungen mit einer modifizierten Technik*. *Der Anaesthesist*, 1997. **46**(8): p. 715-719.
136. WHO, *Cancer Pain Relief with a Guide to Opioid Availability*. 1996.
137. Reese, T.S. and M.J. Karnovsky, *Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase*. *J Cell Biol*, 1967. **34**(1): p. 207-17.

## 7. Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Mit freundlicher Genehmigung von Lippincott Williams and Wilkins/Wolters Kluwer Healthaus entnommen und modifiziert aus: Estebe, Jean-Pierre; Myers, Robert - Amitriptyline Neurotoxicity: Dose-related Pathology after Topical Application to Rat Sciatic Nerve. *Anesthesiology* 2004: 6: 1522, Abbildung 1
- Abb. 2:** Mit freundlicher Genehmigung von Lippincott Williams and Wilkins/Wolters Kluwer Healthaus entnommen aus: Pina-Oviedo, S., Ortiz-Hidalgo, C. - The normal and neoplastic perineurium: a review. *Advances in anatomic pathology* 2008: 3: 148, Abbildung 1A
- Abb.3:** Mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd. entnommen aus: Tsukita S., Furuse M., Itoh, M. – Multifunctional strands in tight junctions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001: 2: 287, Abbildung 2
- Abb. 4:** Eigenproduktion der Arbeitsgruppe  
Entnommen und modifiziert aus: Rittner, H.L., Hackel, D., Yamdeu, R.-S., S.A. Mousa, C. Stein, M. Schäfer, A. Brack – Antinociception by neutrophil-derived opioid peptides in noninflamed tissue – Role of hypertonicity and the perineurium. *Brain, Behavior, and Immunity* 2009: 4: 552, Abbildung 3

- Abb. 5:** Eigenproduktion der Arbeitsgruppe  
Entnommen und modifiziert aus:  
Zwanziger, D., Hackel, D., Staat, C., Bocker, A., Brack, A., Beyermann, M., Rittner, H., Blasig, I. E. - A Peptidomimetic Tight Junction Modulator To Improve Regional Analgesia. *Molecular Pharmaceutics* 2012; 6: 1787, Abbildung 1a
- Abb. 6:** Eigenproduktion der Arbeitsgruppe
- Abb. 7:** Eigenproduktion der Arbeitsgruppe.  
Entnommen und modifiziert aus:  
Sauer RS, Krug SM, Hackel D, Staat C, Konasin N, Yang S, Niedermirtl B, Bosten J, Günther R, Dabrowski S, Doppler K, Sommer C, Blasig IE, Brack A, Rittner HL - Safety, efficacy, and molecular mechanism of claudin-1-specific peptides to enhance blood-nerve-barrier permeability. *J Control Release*. 2014 Jul 10;185:88-98, Abbildung 8
- Abb. 8- 17** Eigenproduktionen

## 8. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
Caco	Humanes Epitheliales Colorektales Adenokarzinom
CCI	Chronic Constriction Injury
CD	Cluster of Differentiation
DAB	Diaminobenzidintetrahydrochlorid
DAMGO	D-Ala <sup>2</sup> , N-MePhe <sup>4</sup> Gly-ol]-enkephalin
D.E.R. <sup>®</sup> -736	Flüssiges Epoxidharz
DMAE	Dimethylaminoethanol
DPDPE	[D-Pen <sup>2,5</sup> ]-enkephalin
DRG	Dorsal Root Ganglia (Spinale Hinterhorn-Neurone)
ECL	Extracellular Loop (Extrazelluläre Schleife)
ERL <sup>®</sup> -4206	3,4-Epoxycyclohexylmethyl
ERK	Extracellular Signal-regulated Kinase
HEK	Human Embryonic Kidney
HTS	Hypertonic Saline (hypertone Natriumchloridlösung)
IASP	International Association for the Study of Pain
IDV	Integrated Density Value
Ig	Immunglobulin
JAM	Junction Adhesion Molecule
LDL	Low Density Lipoprotein
LRP	Low-Density-Lipoprotein-Receptor-related-Protein
MDCK I	Madin-Darby Canine Kidney (Zellkulturen aus Nierenzellen von Hunden)
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MMP	Matrixmetalloprotease
MPS	Mononukleäres Phagozytotisches System
N.	Nervus
NASA	Nonenylsuccinylsäureanhydrid
Na <sub>v</sub>	Spannungsgesteuerter Natriumkanal
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

Pro-Tx-II	Selektiver Na <sub>v</sub> 1.7-Blocker
rtPA	Rekombinanter (gentechnisch hergestellter) Tissue Plasminogen Activator
tPA	Tissue Plasminogen Activator (Gewebeplasminogenaktivator)
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
TTX	Tetrodotoxin
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula Occludens-Protein-1

## **Danksagung**

Mein Dank gilt zunächst meiner "Doktormutter" Frau Prof. Dr. med. Heike Rittner für die Durchführung meiner Promotion sowie für ihre stets offene und konstruktive Unterstützung meiner Arbeit.

Den wissenschaftlichen Mitarbeiterinnen Frau Dr. rer. nat. Dagmar Hackel, Frau Dr. rer. nat. Reine-Solange Sauer sowie Frau Dr. rer. nat. Ying Wang danke ich für die Betreuung der Tierversuche.

Weiterhin danke ich den Labormitarbeiterinnen der anästhesiologischen und neurologischen Kliniken, v.a. Frau Barbara Dekant und Frau Hiltrud Klüpfel für ihre Unterstützung in der praktischen Durchführung der Versuche.

Meinem Bruder Dr. med. Florian Niedermirtl gilt mein Dank für seine kritisch-anregenden Gedanken sowie das Lektorat meiner Arbeit.

Meinem Studienkollegen und Freund Herrn Christoph Rinne möchte ich für den steten Gedankenaustausch auch abseits des Fachlichen danken.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern, Frau Inge und Herr Kurt Niedermirtl. Ohne ihr Zutun sowie ihre Unterstützung meiner Ausbildung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## **Lebenslauf**

- 26.11.1986**            Geburt als Sohn von Kurt und Inge Niedermirtl
- 1993 - 1997**            Besuch der Volksschule Heuchling
- 1997 – 2006**            Besuch des Christoph-Jacob-Treu-Gymnasiums zu Lauf
- 2006**                    Ablegen der Abiturprüfungen mit der Abschlussnote 1,2
- 2006 – 2007**            Zivildienst bei der Diakonie Lauf an der Pegnitz gGmbH im mobilen sozialen Hilfsdienst
- 2007 – 2009**            Studium der Humanmedizin im vorklinischen Abschnitt an der Friedrich-Alexander Universität zu Erlangen
- 2009**                    Ablegen des 1. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0
- 2009 – 2013**            Studium der Humanmedizin im klinischen Abschnitt an der Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
- 2013**                    Ablegen des 2. Abschnitts der Ärztlichen Prüfung mit der Note 2,0 und Approbation als Arzt
- Seit 01.03.2014**        Tätigkeit als Assistenzarzt zur Weiterbildung im Fach Allgemein- und Viszeralchirurgie am Klinikum Bamberg

Bamberg, den 18.06.2015

---

Benedikt Niedermirtl