

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

SCHMERZHAFTE MONONEUROPATHIE AN C57BL/6 MÄUSEN:  
  
STUDIEN MIT NEUTRALISIERENDEN ANTIKÖRPERN GEGEN  
TUMOR-NEKROSE-FAKTOR ALPHA AN ZWEI VERSCHIEDENEN  
LÄSIONSMODELLEN.

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Philipp Wilhelm Friedemann Teuteberg  
aus  
Trier

Würzburg, im April 2003

Referentin: Professor Dr. med. Claudia Sommer  
Koreferentin: Professor Dr. rer.nat. Marlen Petersen  
Dekan: Professor Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 16.04.2003

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern in liebevoller Dankbarkeit gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Neuropathischer Schmerz	1
1.2	Tiermodelle	3
1.3	Zytokine und ihre Bedeutung bei einer Nervenläsion	5
1.3.1	TNF	5
1.3.2	IL-1 $\beta$	6
1.3.3	Zytokine bei neuropathischem Schmerz	7
1.4	Degeneration und Regeneration des geschädigten peripheren Nerven (Wallersche Degeneration)	9
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>12</b>
2.1	Tiere	12
2.2	Narkose und Operationsverfahren	12
2.2.1	CCI	13
2.2.2	PST	15
2.2.3	Verabreichung von TNF-AK	16
2.2.3.1	Perioperative Gabe	16
2.2.3.2	Postoperative Gabe	17
2.3	Verhaltenstestung	17
2.3.1	Test auf Hitzehyperalgesie durch thermische Stimulation	18
2.3.2	Test auf taktile Allodynie durch mechanische Stimulation	19
2.3.2.1	Up-and-down-Methode nach Dixon	21
2.4	Gewebeentnahme	22
2.5	Histologie	23
2.5.1	Immunhistochemie	23
2.5.2	Semidünnschnitte in Toluidinblaufärbung	26
2.5.3	Morphometrie	27
2.5.3.1	Immunhistochemie	27
2.5.3.2	Semidünnschnitte	28
2.6	Auswertung und statistische Tests	29
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>30</b>
3.1	Verhaltenstestung	30
3.1.1	Schmerz-assoziiertes Verhalten von Mäusen mit CCI mit und ohne perioperativer Behandlung mit TNF-AK	30
3.1.1.1	Pfotenrückzugslatenz auf Hitzereize	30
3.1.1.2	Testung der Pfotenrückzugsschwelle auf taktile Stimulation (von Frey-Haare)	31
3.1.2	Vergleich des Schmerz-assoziierten Verhaltens von Mäusen mit CCI mit peri- oder postoperativer (Tag 4) Behandlung mit TNF-AK, Beobachtung über 44 Tage	33
3.1.2.1	Pfotenrückzugslatenz auf Hitzereize	33
3.1.2.2	Pfotenrückzugsschwelle auf taktile Stimulation (von Frey-Haare)	35
3.1.3	Schmerz-assoziiertes Verhalten von Mäusen mit PST mit TNF-AK-Behandlung perioperativ oder an Tag 4 postoperativ	36
3.1.3.1	Pfotenrückzugslatenz auf Hitzereize	37
3.1.3.2	Pfotenrückzugsschwelle auf taktile Stimulation (von Frey-Haare)	38

3.1.4	Schmerz-assoziiertes Verhalten von Mäusen mit PST und CCI im Vergleich .....	39
3.1.4.1	Pfotenrückzugslatenz auf Hitzereize .....	40
3.1.4.2	Pfotenrückzugsschwelle auf taktile Stimulation (von Frey-Haare)....	41
3.2	Histologie .....	43
3.2.1	Immunhistochemie.....	43
3.2.1.1	Makrophagendichte und Zytokinexpression beim CCI-Modell mit und ohne perioperativer Gabe von TNF-AK.....	43
3.2.2	Semidünnschnitte .....	51
3.2.2.1	Vergleich des Ausmaßes der Wallerschen Degeneration an Tag 7 bei PST und CCI mit perioperativer TNF-AK-Behandlung .....	51
3.2.2.2	Vergleich des Regenerationserfolgs bei CCI mit und ohne TNF-AK-Behandlung nach 45 Tagen .....	56
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	61
4.2	Methodik der Tierhaltung und Verhaltenstests.....	61
4.3	Methodik der Histologie .....	64
4.3.1	Methodik der immunhistochemischen Zytokinbestimmung.....	64
4.3.2	Methodik der Histomorphologie und -metrie an Semidünnschnitten.....	65
4.4	Hitzehyperalgesie und taktile Allodynie und deren Beeinflussung durch neutralisierende AK gegen TNF bei CCI.....	66
4.5	Vergleich zwischen dem CCI- und dem PST-Modell .....	68
4.6	Histologie .....	69
4.6.1	Immunhistochemie.....	69
4.6.2	Semidünnschnitte .....	70
4.7	Zytokinhemmung zur Schmerzbehandlung.....	72
4.8	Wirkungsweise von TNF in der Verursachung von Schmerz .....	73
4.9	Übertragung auf humane schmerzhafte Neuropathien .....	74
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN.....</b>	<b>76</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>78</b>
<b>7</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>90</b>

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Neuropathischer Schmerz

Nervenverletzungen führen häufig zu schwer behandelbaren Schmerzen. Zu unterscheiden sind neuropathische Schmerzen aufgrund von Läsionen des peripheren und des zentralen Nervensystems. Die Ursachen sind vielfältig: zerebrale Insulte, Amputationen, Polyneuropathien unterschiedlichster Genese oder Mononeuropathien, wie zum Beispiel bei Engpaßsyndromen.

Ein wichtiges Beispiel für neuropathische Schmerzen ist die Einengung der aus dem Rückenmark austretenden Spinalnerven im Spinalkanal etwa durch den Prolaps eines Diskus intervertebralis. Meist ist der lumbale Wirbelsäulenabschnitt betroffen und hier insbesondere die den Nervus (N.) ischiadicus versorgenden Wurzeln. Die Symptomatik besteht aus teilweise scharf einschießenden, aber auch dumpfen, lange andauernden Schmerzen, die im gesamten Versorgungsgebiet auftreten können. Als weiteres Beispiel sei die Einengung des N. medianus im Karpaltunnel genannt. Das volle klinische Bild äußert sich bei den Patienten als sogenanntes Karpaltunnelsyndrom durch Sensibilitätsstörungen, Muskelatrophie und Schmerzen im Bereich des durch den N. medianus versorgten radialen Teils der Hand und der Finger 1 bis 3 sowie der Radialseite des vierten Fingers.

*Neuropathischer* Schmerz unterscheidet sich im Charakter von physiologischem Schmerz. Die Patienten leiden typischerweise unter Spontanschmerzen, dazu kann eine Hyperalgesie (vermehrtes Schmerzempfinden auf schmerzhaft Reize) und eine Allodynie (Schmerzempfindung bei Applikation normalerweise nicht schmerzhafter Reize) kommen. Der Schmerz ist oft durch eine Kombination aus mehreren Sensationen charakterisiert, mit Brennen, Kribbeln, Elektrisieren und ähnlichen Mißempfindungen, er ist zudem medikamentös häufig schlecht beeinflussbar.

Die genauen Mechanismen, die zu neuropathischem Schmerz führen, sind nur zum Teil bekannt. Diskutiert werden verschiedene Pathomechanismen. Pathologisch aktive oder sensibilisierte Nozizeptoren können zu veränderter Erregbarkeit sekundärer sensibler Neurone im Rückenmark führen, wodurch in der Folge auch Signale mechanorezeptiver A-beta-Fasern als Schmerz empfunden werden können (Cervero und Laird 1996). Postuliert wird auch eine durch Degeneration von C-Fasern verursachte anatomische Reorganisation synaptischer Verbindungen im Hinterhorn (Woolf 2001). Bei Bandscheibenvorfällen haben spontan- und Dauerschmerzen eine Hauptursache in einer persistierenden Entzündungsreaktion im Bereich der Nervenwurzel, die ihrerseits ektopische Aktivität nozizeptiver Neurone induziert. Eine wesentliche Rolle spielt hier das unter anderem von Makrophagen produzierte Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF) (Olmarker und Rydevik 2001). Überdies wird das sympathische Nervensystem in die Überlegungen mit einbezogen: über den Transmitter Noradrenalin soll es bei Nervenläsionen die Aktivität in sensibilisierten afferenten Neuronen verstärken und somit Schmerz und Allodynie weiter steigern. All diese Mechanismen können bei einem Patienten mit neuropathischem Schmerz gleichzeitig auftreten (Baron 2000). Uneinigkeit herrscht bisher beim Vergleich von Schmerzhaftigkeit und der histologischen Untersuchung des Nerven. Neuropathien können bei ähnlichem mikroskopischem Bild sowohl schmerzhaft als auch schmerzlos sein (Dyck et al. 1976, Thomas 1982, Llewlyn et al. 1991). Es erscheint daher sinnvoll, die Entstehungsmechanismen von neuropathischem Schmerz weiter zu untersuchen, um letztendlich neue Ansätze für dessen gezielte Therapie zu finden.

Die wichtigsten Formen der sensiblen Mißempfindungen bei Verletzungen und oder Entzündungen peripherer Nerven - in der vorliegenden Arbeit die des N. ischiadicus - sind *Hyperalgesie* und *Allodynie*. Häufig gesellt sich ein Spontanschmerz dazu, der oft Ausdruck in einer Schonhaltung findet. Hyperalgesie ist definiert als ein vermehrtes Schmerzempfinden auf *noxische*, zum Beispiel thermische Reize, häufig ist hierbei auch die Schmerzschwelle für noxische Reize erniedrigt. Unter Allodynie versteht man durch *nichtnoxische* Reizung verursachte Schmerzen, zum Beispiel durch taktile Reize (Schmidt und Thews 1995).

## 1.2 Tiermodelle

Um die Mechanismen, die bei solchen Nervenkompressionssyndromen und auch Nervenläsionen zu Schmerzen führen, zu untersuchen, wurden in den letzten Jahren verschiedene Tiermodelle etabliert. Ratten mit einer künstlich verursachten peripheren Mononeuropathie zeigen ein dem Menschen durchaus vergleichbares Schmerzverhalten. Dazu etablierte sich ein reproduzierbares Modell, welches als **Chronic Constriction Injury**, (CCI) bezeichnet wurde (Bennett und Xie 1988). Hierbei wird der N. ischiadicus einer Seite auf mittlerer Oberschenkelhöhe präpariert und mit vier Ligaturen mit jeweils etwa einem Millimeter Abstand versehen. Bei vierzigfacher Vergrößerung sollte jeweils eine leichte Nerveneinengung sichtbar werden. Die Ratten zeigten Sensibilitätsstörungen ab dem 2. postoperativen Tag über eine Zeit von 2 Monaten.

Weitere Untersuchungen erhärteten die Hypothese, in dem CCI-Modell an Ratten ein reproduzierbares, dem Menschen mit chronischen neuropathischen Schmerzen vergleichbares Modell gefunden zu haben (Myers und Sommer 1994, Myers 1995). Neben Hyperalgesie und Allodynie zeigte sich häufig zusätzlich eine veränderte Grundhaltung der betroffenen Extremität, als Schonhaltung bezeichnet (Attal et al. 1990). Bei Untersuchungen auf histopathologische Veränderungen am nach dem CCI-Modell behandelten Nerven wurde bereits am ersten postoperativen Tag eine Reduktion der myelinisierten Axone festgestellt, die sich bis zum 14. postoperativen Tag noch deutlich verstärkte. Beschrieben wurden peri- und intraneurale Ödeme, Lücken des Perineuriums sowie Wallersche Degeneration an Tag 1 postoperativ, Makrophagen im Endoneurium als auch eine Proliferation von endoneuralen Zellen während der ersten Woche (Attal et al. 1990, Sommer et al. 1993). Zusätzlich kommt es bei CCI durch Schwann-Zell-Aktivierung und Makrophageneinstrom zu einem Anstieg von Zytokinen, insbesondere TNF und Interleukin-1 (IL-1), somit zu einer Proliferation von Endothelzellen und einer allgemeinen Entzündungsreaktion (Cotran 1987; Sommer et al. 1995; Sommer und Myers 1996).

In anderen Studien ist das Rückenmark von Ratten mit CCI bezüglich der Konzentrationen von **Calcitonin-Gen-Related-Peptide** (CGRP) und Met-Enkephalin untersucht worden. CGRP ist ein aus der Nervenendigung freigesetztes exzitatorisches Neuropeptid, welches zusammen mit Substanz P, einem anderen Neuropeptid, die Entladungsraten nozizeptiver Neurone erhöht. Met-Enkephalin hingegen ist ein Neuropeptid mit hemmender Wirkung. Es gehört zur Gruppe der Opioidpeptide und ist Bestandteil des endogenen analgetischen Systems. Man verglich die Modelle CCI, das heißt schmerzhafte Mononeuropathie, versus nicht-schmerzhafte Mononeuropathie durch Nervenquetschung. Beim CCI-Modell stieg der Gehalt des Opioid-Peptides Met-Enkephalin an, nicht so bei der Nervenquetschung. Ein Abfall des CGRP und der Substanz P wurde bei beiden Modellen beobachtet (Sommer und Myers 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurden die Modelle der CCI und der „**Partial Sciatic Transection**“ (PST, eine Modifikation des Seltzer-Modells; Seltzer et al. 1990) am N. ischiadicus der Maus unter besonderer Berücksichtigung der Rolle der Zytokine verglichen. Beim PST-Modell wird nach anatomisch korrekter Darstellung aus dem N. ischiadicus auf Höhe des mittleren Oberschenkels mittels einer Irisschere etwa ein Drittel herausgeschnitten. Daraufhin wird die Operationswunde wieder verschlossen. Im Gegensatz zur CCI ist das neue Modell der PST eine Form der Nervenläsion *ohne* verbleibende Fremdkörper am oder in der unmittelbaren Nähe des Nerven. Das macht den Vergleich zum CCI-Modell interessant, da hier der Ligaturfaden und die daraus entstehende epineurale Entzündung einen nicht unerheblichen Anteil an der pathologischen Reaktion des Nerven sowie am Schmerzverhalten des Tieres haben könnte.

## 1.3 Zytokine und ihre Bedeutung bei einer Nervenläsion

### 1.3.1 TNF

Nach Spaltung des membrangebundenen Pro-Proteins mit einem Molekulargewicht von 26 **Kilodalton** (kDa) zu seiner reifen Form durch eine Metalloprotease ist TNF ein immunmodulierendes Peptid mit einem Molekulargewicht von 17 kDa. TNF wird von Fibroblasten, Endothelzellen, Astrozyten, Makrophagen, Schwannzellen und Mikroglia produziert. Es ist bereits in sehr kleiner Konzentration biologisch wirksam. TNF entfaltet seine Wirkung durch Quervernetzung von drei Molekülen membranständiger Rezeptoren, die mit Ausnahme von Erythrozyten auf allen Zellen vorhanden sein sollen (Vandenabeele et al. 1995). Neben einem allgemeinen reifungs- und differenzierungsmodulierenden Einfluß auf Zellen ist es insbesondere ein potenter parakriner und endokriner Mediator von Entzündungs- und Immunfunktionen und beim Endotoxinschock. Als für den Organismus vorteilhaft sind die anti-infektiöse sowie die gegen Tumorzytokine gerichtete Wirkung zu nennen, als nachteilhaft die Auswirkung auf die systemische Entzündungsreaktion **Systemic Inflammatory Response Syndrome** (SIRS) (Vandenabeele et al. 1995). TNF stimuliert die T-Zellen, insbesondere die CD4-T-Lymphozyten (T4-Zellen, „Helferzellen“) unter anderem zur Produktion von IL-2 und Interferon- $\gamma$ ; die B-Lymphozyten werden durch TNF zur Antikörperbildung und die übrigen Monozyten zur Sezernierung von IL-1, IL-6 und TNF angeregt. In der Leber fördert TNF die Bildung von akute-Phase-Proteinen.

Im ZNS fungiert TNF als Mediator der Sollwertverstellung zur Erhöhung der Körperkerntemperatur bei Fieber. Hier zeigen sich Gemeinsamkeiten zum IL-1, welches ebenfalls über Rezeptoren eine hypothalamische Stimulierung der **Prostaglandin E<sub>2</sub>** (PGE<sub>2</sub>)-Synthese und somit Fieber verursacht. Studien schreiben dem TNF desweiteren eine neuromodulatorische Rolle im ZNS zu: Immunreaktivität zeigt sich vor allem in folgenden anatomischen zentralnervösen Strukturen:

Hypothalamus, Stria terminalis, Nucleus raphe caudalis, Pons sowie Medulla (Breder et al. 1993). TNF führt im ZNS zur Demyelinisierung von Nervenfasern. Am peripheren Nerven dominiert bei Anwesenheit von rekombinantem TNF eine axonale Degeneration der Faser (Selmaj und Raine 1988). Belegt ist die Tatsache, daß nach Schädigung des peripheren Nerven ein erhöhter Spiegel dieses Zytokins im Blut vorhanden ist (Wells et al. 1992). Die Vermutung, daß es nach Nervenläsion durch erhöhte Zytokinspiegel direkt oder indirekt peri- sowie endoneural zu strukturellen Veränderungen kommt, liegt nahe (Menendez und Cubas 1990). Auch die Tatsachen, daß TNF in Endothelzellen die Expressierung von Adhäsionsmolekülen und die Stickstoffmonoxidsynthese fördert sowie zu einer verstärkten Kapillarpermeabilität führt, stützen diese These (Aggarwal und Natarajan 1996, Endres et al. 1995).

### 1.3.2 IL-1 $\beta$

IL-1 steht für zwei Polypeptide (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), welche die gleichen biologischen Aktivitäten haben. Die beiden Unterformen  $\alpha$  und  $\beta$  des IL-1 unterscheiden sich im wesentlichen in ihrem Wirkungsort: IL-1 $\alpha$  findet sich hauptsächlich als Oberflächenmolekül in der Zellmembran verankert, IL-1 $\beta$  ist vornehmlich ein von stimulierten Makrophagen sezerniertes Zytokin. Produzenten dieses Mediators sind außer Makrophagen Blutmonozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten, Epithelzellen sowie Zellen des zentralen Nervensystems, um hier nur einige zu nennen. Der wichtigste Stimulator zur IL-1-Bildung sind Endotoxine und ähnliche mikrobielle Produkte. Jedoch auch grampositive Organismen wie Staphylokokken und Streptokokken führen zu einer gesteigerten Zytokinproduktion.

Die Auswirkungen des Zellmediators IL-1 sind mannigfaltig. Sie bestehen im wesentlichen in einer proinflammatorischen Wirkung, indem IL-1 unter anderem die Zytokinkaskade durch Stimulation von IL-2 ins Rollen bringt und außerdem die Prostaglandinsynthese fördert. Weiterhin bewirkt IL-1 die Proliferation von B-Lymphozyten und führt zu Chemotaxis, also der zielgerichteten Zellbeweglichkeit von

Phagozyten entlang eines Gradienten aus chemotaktischen Faktoren in das Gebiet mit deren höchster Konzentration. Das wiederum führt zu Leukozytenrekrutierung, Leukozytenadhäsion und Extravasation. Darüber hinaus führt IL-1 zur Degranulation und Freisetzung von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark und beeinflusst über Stimulation von Wachstumsfaktoren die Blutbildung. Proliferation glatter Muskelzellen und Metastasierung sind weitere Folgen der Interleukinwirkung (Mantovani und Dejana 1989). IL-1 $\beta$  im engeren Sinne induziert im Verlauf der proinflammatorischen Vorgänge die Bildung weiterer Mediatoren, so zum Beispiel stimuliert es die Transkription des IL-6-Gens in Makrophagen, Fibroblasten und Endothelialzellen (Creange et al. 1997), außerdem aktiviert es T-Lymphozyten zur Produktion von IL-2.

### 1.3.3 Zytokine bei neuropathischem Schmerz

Erhöhte Blutspiegel von Zytokinen nach Nervenläsionen und nachfolgende Stoffwechselveränderungen im Nerven lassen in ihnen eine Schlüsselposition bei Entstehung des neuropathischen Schmerzes vermuten. Festgestellt wurde ein Anstieg der Zytokine IL-1 $\alpha$  und - $\beta$ , IL-2, IL-6 und TNF im Serum nach einer Nervenläsion (Wells et al. 1992). TNF als auch IL-1 $\beta$  scheinen an der Schmerzentstehung nach Nervenläsion und hier insbesondere bei der Hyperalgesie und Allodynie eine wesentliche Rolle zu spielen. Herbert und Holzer (1994) postulierten die Sensibilisierung afferenter Nervenendigungen als Folge der Wirkung der Zytokine. Nach Injektion von TNF in den N. ischiadicus zeigte sich im Tiermodell ein Verhalten und eine Histopathologie ähnlich der nach experimenteller Nervenläsion, es bildeten sich eine Hitzehyperalgesie und eine taktile Allodynie aus (Wagner und Myers 1996). Die subkutane (s.c.) Injektion von TNF im Versorgungsgebiet des N. suralis der Ratte steigerte innerhalb 30 Minuten die Aktivität der nozizeptiven C-Fasern (Junger und Sorkin 2000). Die Applikation von TNF-Inhibitoren in die Hinterpfote von Ratten erbrachte eine Minderung der durch Bradykinin verursachten Hyperalgesie (Ferreira et al. 1993).

Allerdings ist die genaue Funktion dieser Zytokine noch nicht in allen Einzelheiten erforscht, was noch viel Interpretationsspielraum zuläßt. So sind von den Zytokinen TNF und IL-1 $\beta$  auch *analgetische* Wirkungen bekannt, nachdem sie beispielsweise intraventrikulär (i.c.v.) oder unmittelbar in die Hinterpfote verabreicht wurden. Diskutiert wird eine zytokinvermittelte Ausschüttung von den endogenen Opioiden Endorphin und Enkephalin (Bianchi et al. 1992, Czlonkowski et al. 1993).

Die Wirkung von TNF auf Zellen, die über Schädigung derselben bis hin zur Apoptose geht, wird über Kooperation von Oberflächenrezeptoren vermittelt, insbesondere sind hier TNF-R p55 (auch TNFR1, TNFR55, oder TNFR $\beta$  genannt) und TNF-R p75 (TNF-R75, TNFR2) zu nennen (Vandenabeele et al. 1995). TNF-R p55 spielt die Hauptrolle im Rahmen der zytotoxischen Wirkung von TNF (Declercq et al. 1998). In vorherigen Arbeiten wurde bereits auf Zytokine und deren Hemmung im Zusammenhang mit neuropathischem Schmerz eingegangen. Auch die Interaktionen von TNF am Rezeptor der befallenen Zellen wurden hier untersucht. Es zeigte sich, daß im CCI-Modell insbesondere der TNFR1 für die Hitzehyperalgesie und die taktile Allodynie verantwortlich ist. Nach Hemmung dieses Rezeptors durch entsprechende **Antikörper** (AK) wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe eine deutliche Reduktion von Hitzehyperalgesie und taktiler Allodynie nach CCI festgestellt (Sommer et al. 1998 a). Untersuchungen an TNFR1-„Knockout-Tieren“, denen das zur Expressierung von TNFR1 verantwortliche Gen bereits in der Entwicklung fehlt, bestätigten diese These. Sie entwickelten im Unterschied zu Wildtyp-Mäusen nach CCI keine Hitzehyperalgesie (Vogel et al. 2000). Zudem war bei den Knockout-Mäusen die Hochregulation der Cyclooxygenase (COX)-2, der Stickoxyd-Synthase (NOS) und des intrazellulären Adhäsionsmoleküls (ICAM)-1 vermindert (Marziniak und Sommer 2000; Schäfers und Sommer 1999). Die **intraplantare** (i.pl.) Injektion von 100 **Pikogramm** (pg) TNF rief an Wildtyp-Mäusen und an TNFR2-defizienten Mäusen eine taktile Allodynie hervor, nicht jedoch an TNFR1-Knockouts (Vogel und Sommer 2001, unveröffentlicht).

Da bei all diesen Arbeiten das Modell der CCI verwendet worden war, welches, wie oben beschrieben, mit einer deutlichen epineuralen Entzündung in Kombination mit Wallerscher Degeneration einhergeht, konnte zwischen dem Effekt der Zytokinhemmung im *Endoneurium* und im *Epineurium* nicht unterschieden werden.

Es war daher notwendig, ähnliche Experimente an einem Modell durchzuführen, bei dem kein epineuraler Fremdkörper eingebracht wird. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit die Modelle CCI, also eine Nervenläsion *mit* verbleibendem Fremdkörper, und PST, eine Läsion *ohne* verbleibendem Fremdkörper, bezüglich Hitzehyperalgesie, taktiler Allodynie sowie der feingeweblichen Untersuchung des Nerven verglichen werden. Somit konnte der beeinflussende Effekt einer epineuralen Entzündung bewertet und von der Reaktion auf eine Nervenläsion mit reiner Wallerscher Degeneration abgegrenzt werden.

#### **1.4 Degeneration und Regeneration des geschädigten peripheren Nerven (Wallerische Degeneration)**

Zerstörung eines peripheren Nerven oder einzelner Fasern desselben, wie sie im Bezug auf die vorliegende Arbeit insbesondere bei den Modellen der CCI und der PST auftritt, führen zu unterschiedlichen Reaktionen des distalen und des proximalen Faserendes, genannt Wallersche Degeneration. Während das distale Axonende regelmäßig zu Grunde geht, finden im proximalen Stumpf ein Großteil der Regenerationsvorgänge statt. Über eine Auflösung des Zytoskeletts und des Axoplasmas kommt es im peripheren Nervenende schließlich nach und nach zu einem vollständigen Verlust der Funktion der Nervenfaser und somit zum Verlust der Auslösung und oder Weiterleitung eines über Ionenströme fortgeleiteten Aktionspotentials. Als wesentliche Ursache für diese Vorgänge werden erhöhte Kalziumwerte, als auch die Zerstörung von Ionenkanälen, -pumpen und -transportern diskutiert (Schlaepfer 1971, 1977, Schlaepfer et al. 1984, Lopachin et al. 1990, Johnson et al. 1991). Axon und Markscheide zerfallen im Verlauf des Degenerationsprozesses, wohingegen es zu einer Proliferation von Schwann-Zellen, Kapillarendothelzellen und endoneuralen Fibroblasten kommt. Außerdem folgt nach Nervendurchtrennung eine Einwanderung von Makrophagen, die zum größten Teil mit dem Blutkreislauf an den Ort ihrer Bestimmung gelangen. Die Aufgabe der Makrophagen im Zusammenhang mit der Wallerschen Degeneration ist die Phagozytose von Markscheiden und die Produktion von Mediatoren (Beuche und Friede 1984, Scheidt und Friede 1987, Griffin et al.1993).

Der proximale Nervenstumpf ist der Hauptort der Regenerationsvorgänge des durchtrennten Nerven. Der blind auswachsende Axonstumpf benötigt als sogenannte *Büngnersche Bänder* bezeichnete, vom distalen Stumpf aussprossende Schwann-Zellen, die ihm als Leitschiene dienen. Außerdem kann während der Regenerationsphase ein erhöhter Spiegel des Neurotrophins **Nerve Growth Factor** (NGF) nachgewiesen werden (Richardson und Ebendal 1982). Produzenten sind insbesondere Schwann-Zellen und Fibroblasten. Zytokine haben hier eine wesentliche steuernde Funktion. Studien zeigten einen Anstieg von NGF in den oben genannten Zellen nach Stimulation derselben mit IL-1 $\beta$  (Lindholm et al. 1987, Safieh-Garabedian et al. 1995). In der Produktion von IL-1 $\beta$  bei der Nervenregeneration scheinen neben den Schwann-Zellen als Hauptproduzent auch die Makrophagen eine Rolle zu spielen (Bergsteinsdottir et al. 1991, Griffin et al. 1993, Lindholm et al. 1987). Nach ihrer Aktivierung produzieren sie außerdem IL-1 $\alpha$ , TNF und diverse andere Mediatoren.

Nach erfolgter Regeneration findet sich häufig eine verminderte Leitgeschwindigkeit des peripheren Nerven. Der Grund hierfür ist die Tatsache, daß es bei einer Remyelinisierung durch Schwannzellen häufig zur Ausbildung einer bedeutend dünneren und somit langsamer leitenden Markscheide kommt. Desweiteren sind Fehlinnervationen des verheilten Nerven keine Seltenheit. Es kommt zu Fehleinsprossung der aus dem proximalen Nervenstumpf auswachsenden Axonbündel durch falschgerichtete Leitschienen. Ein bekanntes Beispiel ist das *Krokodilstränenphänomen* nach peripherer N. facialis-Lähmung, der bei Regeneration seiner Fasern Anschluß an die Glandula lacrimalis anstatt an die Glandula parotis findet.

Wichtig erscheint die Tatsache, daß eine Hitzehyperalgesie und eine taktile Allodynie nach einer Nervenläsion *nur dann* auftraten, wenn auch die histopathologischen Korrelate einer Wallerschen Degeneration vorhanden waren (Myers und Sommer 1993, Myers et al. 1993). Interessant ist hier vor allem die Frage, welche Rolle die Zytokine bei den Umbauprozessen im geschädigten Nerven spielen und darüber hinaus, ob durch Zytokinhemmung die daraus resultierenden Schmerzen somit effektiv behandelt werden können.

In der vorliegenden Arbeit sollten folgende Fragestellungen experimentell angegangen werden:

- Die Neutralisierung von TNF reduziert Hyperalgesie und Allodynie beim Modell der CCI, welches eine Kombination aus Wallerscher Degeneration und epineuraler Entzündung darstellt (Lindenlaub et al. 2000). Hier sollte untersucht werden, ob die Neutralisierung von TNF auch bei einem Modell reiner Wallerscher Degeneration, also ohne epineurale Entzündung, Schmerz-assoziiertes Verhalten der Tiere reduziert. Hierzu wurde das PST-Modell verwendet.
- Im Vergleich der beiden Modelle CCI und PST sollte untersucht werden, ob die Neutralisierung von TNF durch Verabreichung von AK nur präventiv (also bei präoperativer Gabe) oder auch therapeutisch (also bei Gabe, nachdem Schmerz-assoziiertes Verhalten schon eingesetzt hatte) wirksam war.
- Immunhistochemisch zeigt sich beim Modell der CCI eine Zunahme des endoneuralen Gehaltes an TNF, IL-1 und Makrophagen. Interessant war hier die Frage, ob sich Änderungen bei präventiver und/oder therapeutischer TNF-Neutralisierung durch AK-Gabe nachweisen lassen. Außerdem wurde untersucht, ob die TNF-Hemmung einen Einfluß auf die Morphologie myelinisierter Axone nach Läsion hat. Hierzu wurden das CCI-Modell und das PST-Modell verglichen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Tiere

Es wurden 87 weibliche Mäuse der Gattung C57BL/6 verwendet. Die Tiere waren bei ihrer Ankunft 8 Wochen alt, das Gewicht betrug durchschnittlich 17-22 g. Züchtung und Lieferung erfolgte durch *Harlan Winkelmann*, Borchon, Deutschland. Unmittelbar nach Lieferung erfolgte eine etwa 3-wöchige Eingewöhnungsphase an die neue Umgebung in speziell für die experimentelle Haltung von Nagetieren vorgesehenen Räumlichkeiten in der Forschungsabteilung der neurologischen Universitätsklinik Würzburg. Die Tiere wurden in Käfigen gehalten, die mit Sägespänen ausgelegt waren. Die Käfige hatten eine Fläche von etwa 120 cm<sup>2</sup> und eine Höhe von etwa 20 cm. In einem Käfig befanden sich maximal 6 Tiere. Die Tiere erhielten regelmäßig Trockenpreßfutter sowie Wasser ad libitum, außerdem ausreichend Frischluft durch Belüftungsanlagen. Es erfolgte eine regelmäßige Reinigung der Käfige durch geschultes Personal des Tierstalles.

Alle Versuche waren durch die Regierung von Unterfranken/Bayern genehmigt.

### 2.2 Narkose und Operationsverfahren

Alle C57BL/6-Mäuse wurden vor dem Eingriff anästhesiert. Zur Narkose erhielten sie eine intraperitoneale Injektion Narcoren® (Genericum: Pentobarbital, *Rhone-Merieux*, Laupheim, Deutschland) in einer Dosis von 60 mg/kg Körpergewicht. Die Substanz wurde dazu in einem möglichst stumpfen Winkel in die Bauchhöhle injiziert, um einer Verletzungsgefahr innerer Organe entgegenzuwirken. Jede Maus wurde unmittelbar vor dem Eingriff anästhesiert. In der angegebenen Konzentration hielt die Betäubung im Mittel zwischen 30 und 45 Minuten an. Diese Zeit war ausreichend,

den Eingriff durchzuführen. Zunächst wurde nach Anlegen eines Hautschnittes und Befreiung vom Muskel und umliegendem Gewebe der N. ischiadicus auf mittlerer Oberschenkelhöhe bilateral dargestellt.

### 2.2.1 CCI

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Variation des von Bennett und Xie 1988 entwickelten Modells der CCI angewendet, welches reproduzierbar eine periphere Mononeuropathie erzeugt. Unter lichtmikroskopischer Sicht mit einem Mikroskop der Firma *Leica*, Modell *Wild M3 Z* wurde folgende Prozedur durchgeführt:

Der N. ischiadicus wurde auf mittlerer Höhe des Oberschenkels nach stumpfer Dissektion durch den **M**uskulus (M.) biceps femoris von umgebenden Strukturen freipräpariert. Proximal der Aufteilung in den N. peroneus communis und in den N. tibialis wurde der Nerv unilateral mit 3 leicht die Struktur einschnürenden Ligaturen im Abstand von 1 mm versehen (*siehe Abb. 1*). Verwendet wurde hierfür das nichtresorbierbare chirurgische Nahtmaterial Prolene blau 7/0 (0,5 metric). Entscheidend hierbei war, den Nerv nur insoweit zu konstringieren, als der Blutstrom der oberflächlichen Gefäße reduziert, jedoch nicht komplett unterbunden wird.



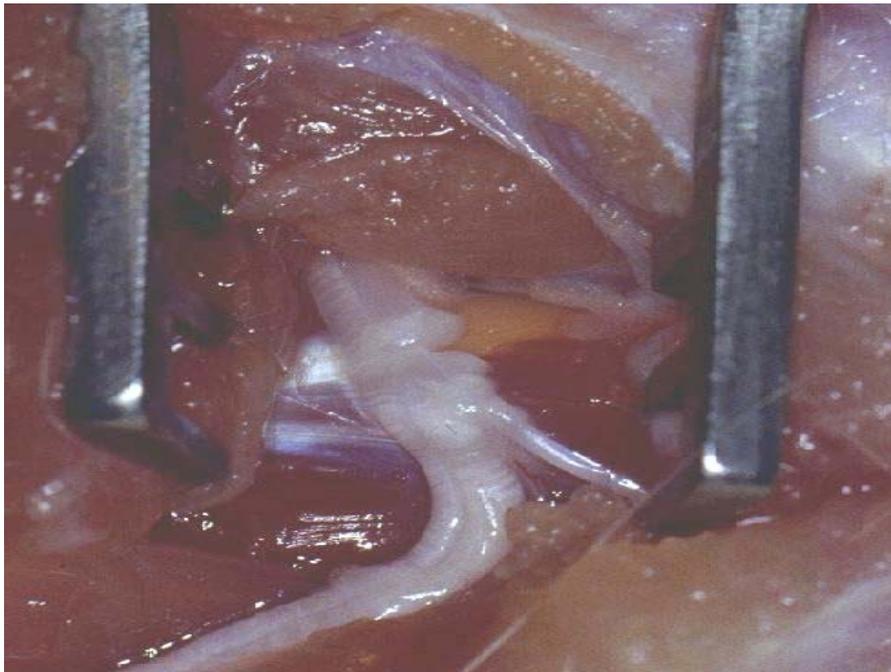
**Abb. 1. Operationssitus des N. ischiadicus einer Maus mit CCI.** Die 3 Ligaturen wurden um den N. ischiadicus unmittelbar proximal dessen Aufteilung in den N. peroneus communis und in den N. tibialis geschlungen.

Als Hinweis auf die korrekte Konstriktion konnte meist ein kurzes Zucken der zugehörigen Muskulatur beobachtet werden. Man konnte davon ausgehen, daß dann eine etwa 50 %ige Blutflußreduzierung der perineuralen Gefäße erfolgt war (Myers et al. 1991). Anschließend wurde die durchtrennte Faszie über dem Nerven mit Perma-Hand-Seide 6/0 USP (0,7 metric) zugenäht und die Wunde daraufhin in anatomischen Schichten und schließlich Dermis und Epidermis mit Vicryl 3/0 USP (2 metric) verschlossen. Um Öffnungsversuchen der Wunde seitens der Mäuse entgegenzuwirken und die damit störenden Einflüssen durch verzögerte Wundheilung minimal zu halten, wurden schließlich noch 2-3 Metallklammern (Michelklammern 7,5 mm) pro Seite über der Hautnaht eingebracht.

Auf der kontralateralen Seite wurde der N. ischiadicus ebenfalls dargestellt, die Wunde dann jedoch ohne weitere Maßnahmen nach dem oben genannten Muster verschlossen (Schein-OP). Bis zum vollständigen Wiedererlangen des Bewußtseins wurden die Mäuse unter ständiger Beobachtung auf einer Wärmeplatte mit 37° C plaziert.

### 2.2.2 PST

Zur Durchführung der PST in einer Modifikation nach dem Seltzer-Modell (Seltzer et al. 1990) wurde der N. ischiadicus wiederum unter lichtmikroskopischer Kontrolle auf Höhe des mittleren Oberschenkels in seinem Verlauf durch den M. biceps femoris von umgebenden Strukturen durch stumpfe Dissektion freipräpariert und dargestellt. Deutlich proximal der Aufteilung des Ischiasnerven in den N. peroneus communis und den N. tibialis und gerade kranial des durch den M. biceps femoris laufenden Astes wurde eine Prolene 7/0 Ligatur genau durch die Mitte des Nerven geführt. Die Hälfte des Durchmessers des Nerven wurde in ventrokranialer Richtung mittels einer Irisschere bis zur Ligatur durchtrennt, welche daraufhin entfernt wurde (siehe Abb. 2).



**Abb. 2. Operationssitus des N. ischiadicus einer Maus mit PST.** Die partielle Transektion des N. ischiadicus wurde unmittelbar proximal dessen Aufteilung in den N. peroneus communis und in den N. tibialis durchgeführt.

War eine Verabreichung von neutralisierenden AK gegen TNF oder von Scheinantikörpern (SAK) perioperativ vorgesehen, wurde es nun sowohl beim CCI-

als auch beim PST-Modell direkt in die Wundhöhle der Seite mit ligiertem beziehungsweise angeschnittenem Nerven appliziert. Der anschließende Wundverschluß erfolgte wie bereits oben beschrieben.

In jeder Gruppe wurden etwa gleich viele Tiere auf der rechten wie auf der linken Seite mit Nervenligaturen versehen beziehungsweise Transektionen durchgeführt, um mögliche Meßfehler durch Seitenunterschiede in der Empfindungsstärke zu vermeiden.

### 2.2.3 Verabreichung von TNF-AK

#### 2.2.3.1 Perioperative Gabe

In der vorliegenden Arbeit wurde ein polyklonaler, hochgereinigter Schaf-anti-Maus-TNF-AK (*Dr. Thomas Hartung*, Konstanz, Deutschland) verwendet. Appliziert wurden perioperativ 50 Mikroliter ( $\mu\text{l}$ ) des Antikörpers in einer Konzentration von 25 **Milligramm** pro ml ( $\text{mg/ml}$ ) mittels einer Pipette in die unmittelbare Umgebung des Nerven.

Die Vergleichstiergruppen erhielten 50  $\mu\text{l}$  eines hochgereinigten polyvalenten Schaf-AK, dem SAK, (*Serotec Ltd.*, Oxford, England) in einer Konzentration von 10  $\text{mg/ml}$  und wurden in der vorliegenden Arbeit als scheinbehandelte Mäuse bezeichnet. Diese sind abzugrenzen gegen die scheinoperierten *Seiten*. Das waren die kontralateralen Seiten nach dem CCI- oder PST-Modell operierter Mäuse. Darüber hinaus sind sie gegen die Kontrolltiere abzugrenzen, die ohne jeglichen Eingriff als Negativkontrolle auf Hitzehyperalgesie und Allodynie mitgetestet wurden.

### 2.2.3.2 Postoperative Gabe

Untersucht wurde ebenfalls, inwieweit der Zeitpunkt der Verabreichung des Mediatorhemmstoffes eine Rolle spielt. Dafür wurden Tiergruppen, die TNF-AK perioperativ erhielten, verglichen mit Vergleichsgruppen, die den Inhibitor am vierten postoperativen Tag bekamen.

Der Eingriff fand jeweils *nach* den Verhaltenstests des vierten postoperativen Tages am späten Vormittag statt. Dazu wurden die Tiere in eine wenigen Minuten anhaltende Äther-Inhalationsnarkose versetzt. Daraufhin wurde, von ventrokranial nach dorsokaudal verlaufend, eine 20 Gauge (G)-Kanüle durch die Haut vorsichtig in Richtung des N. ischiadicus vorgeschoben. Ein Nachlassen des Widerstandes zeigte an, daß sich die Spitze der Kanüle nun im epineuralen Gewebe befand. Der AK wurde daraufhin injiziert. Menge (50 µl) und Konzentration (25 mg/ml) waren identisch mit denen der perioperativen Gabe. Der Eingriff dauerte inklusive Narkose etwa 10 Minuten pro Tier.

## 2.3 Verhaltenstestung

Um einen Ausgangswert zu ermitteln und die Tiere an die Apparatur und das Testverfahren zu gewöhnen, wurde bereits präoperativ an 2 aufeinanderfolgenden Tagen eine Verhaltenstestung durchgeführt. Nach dem operativen Eingriff folgte grundsätzlich eine Regenerationszeit von 3 Tagen. Am 3. postoperativen Tag wurde mit der Testphase begonnen. Gemessen wurden Reaktionen auf *thermische* und auf *taktile* Reize, um eine Information über eine bestehende *Hitzehyperalgesie* und oder eine *taktile Allodynie* zu erhalten. Diese Parameter haben sich bereits in früheren Studien dieser Art als verlässlich und reproduzierbar erwiesen.

### 2.3.1 Test auf Hitzehyperalgesie durch thermische Stimulation

Bei der thermischen Stimulation wurde ein Gerät der Firma *Ugo Basile* (Comerio, Italien) verwendet (Hargreaves et al. 1988). Jede Maus wurde zum Testen in einem kleinen durchsichtigen bodenlosen Plexiglaswürfel auf eine Glasplatte gesetzt. Unter der Glasplatte konnte die testende Person die auf einer glatten Metallfläche gleitende Lichtquelle unmittelbar unter der rechten oder linken Hinterpfote plazieren. Nach Starten des Gerätes leuchtete ein nach oben gegen die Pfote gerichteter Lichtstrahl auf, dessen Wärmeabstrahlung zur kontinuierlichen Erwärmung der Pfote führte (siehe Abb. 3). Mit Beginn der Messung wurde automatisch eine Zeituhr gestartet. Zog die Maus nun aufgrund des Schmerzreizes die Pfote weg, fiel Licht auf die Wärmequelle. Über eine Photozelle, die diesen Lichteinfall maß, wurde die Zeituhr automatisch angehalten. Somit erhielt man die Latenzzeit bis zur Wegzugsschwelle der getesteten Pfote, die am Gerät in **Sekunden** (Sek) und Zehntelsekunden angezeigt wurde.

Jedes Tier wurde 5 mal an jeder Hinterpfote getestet, das waren insgesamt 10 Hitzestimuli pro Tier und Tag. Die Tests auf Hitzehyperalgesie erfolgten abwechselnd an beiden Hinterpfoten der Maus. Zwischen jedem Stimulus wurde außerdem eine Pause von etwa 5 Sek eingelegt, um eine Überstimulation und damit verzerrte Meßergebnisse auszuschließen.



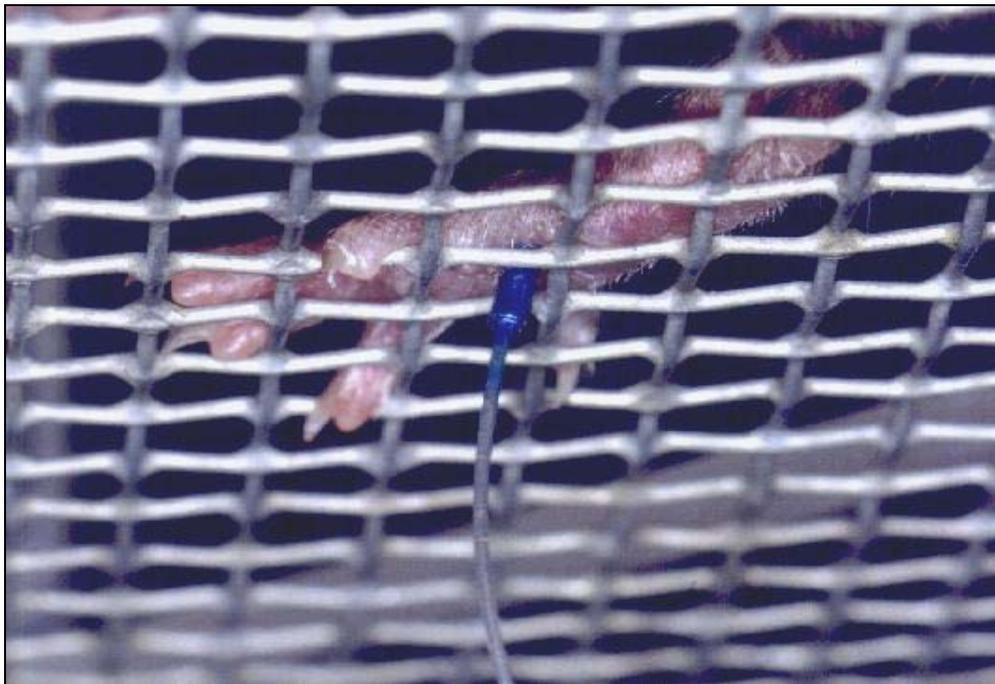
**Abb. 3. Hitzestimulationsgerät mit einer Maus im Plexiglaswürfel auf einer Glasplatte. Die mobile Wärmequelle ist unter der rechten Hinterpfote plaziert.**

Getestet wurden jeweils beide Hinterläufe einer Maus. Die Latenzzeiten der scheinoperierten Seite *ohne* Nervenläsion wurden von den Werten der Operationsseite *mit* Nervenläsion subtrahiert. Der so gewonnenen Wert wurde **Difference Score (DS)** genannt. Er galt als Maß für die Hitzehyperalgesie (Hargreaves et al. 1988). Die erhaltenen DS wurden festgehalten und nach Ermittlung von Mittelwerten und Standardabweichungen für die entsprechenden Gruppen graphisch gegen die Zeit aufgetragen.

### 2.3.2 Test auf taktile Allodynie durch mechanische Stimulation

Zur Messung auf taktile Allodynie wurden die Mäuse in die gleichen Plexiglaswürfel, allerdings diesmal auf ein circa 50x50x50 cm großes tischähnliches Instrument gesetzt, dessen „Tischplatte“ ein grobmaschiger Gitterrost war. Von unten kommend konnten durch das Gitter taktile Reize an den Hinterpfoten gesetzt werden. Zur

Stimulierung wurden „von Frey-Haare“ (Firma *Stoelting*, USA) verwandt, so benannt nach dem Würzburger Physiologen Max von Frey (1852-1932), welche auch beim Menschen zur Prüfung der Hautsensibilität angewendet werden. In der vorliegenden Arbeit kamen von Frey-Haare in der Stärke von 0,25 bis 20 g zur Anwendung. Derartige Reize sind regulär nicht schmerzhaft. Daher kann eine Schmerzreaktion auf diese Stimuli als analog zur menschlichen taktilen Allodynie angesehen werden (siehe *Abb. 4*).



**Abb. 4. Test auf taktile Allodynie mit Maus im Plexiglaswürfel auf Gitterrost sitzend. Die plantare Fläche der Hinterpfote wird mit von Frey-Haaren verschiedener Stärken stimuliert.**

Die Durchführungstechnik und Quantifizierung der erhaltenen Werte entsprach der sogenannten „Up-and-down-Methode“ nach Dixon (1965), auf die unten noch näher eingegangen wird. Von einer Grundstärke ausgehend, welche hier dem Wert 3,84 entsprach, wurden schrittweise je nach Reaktion höhere oder niedrigere von Frey-Haarstärken an den Ballen der Hinterpfote so angesetzt, daß es nach ursprünglich senkrechter Position zu einer deutlichen Abbiegung der von Frey-Haare kam. Der Kontakt mit der Fußsohle bestand etwa 2 bis 3 Sek. Als positiv gewertet wurde, wenn die Maus mit schnellem Wegziehen der Pfote reagierte. Entfernen der Pfote mit

gleichzeitig offensichtlich unruhigem Verhalten des Tieres (Hinundhergehen, Putzen, auf-die-Hinterbeine-Stellen) wurde nicht gewertet und der Stimulus mußte wiederholt werden. Als negativ galt, wenn auf ausreichenden Stimulus keine offensichtliche Reaktion seitens der Maus erfolgte.

Getestet wurden stets beide Seiten streng abwechselnd. So wurde eine einseitige Überreizung eines Hinterlaufes vermieden, welches die Meßergebnisse verzerrt hätte. Zwischen jedem Stimulus wurde zusätzlich etwa 5 Sek abgewartet, um eine generelle Überempfindlichkeit des Tieres gegen den Stimulus unabhängig von der Vorbehandlung auszuschließen. An einem Testtag erfolgten 6 Messungen pro Pfote und Maus auf Allodynie, also insgesamt 12 Durchgänge pro Maus und Testtag.

#### 2.3.2.1 Up-and-down-Methode nach Dixon

In Anlehnung an Dixon (1965, 1980) wurde zur Quantifizierung der Ergebnisse nach mechanischer Stimulation die sogenannte Up-and-down-Methode angewendet. Grundprinzip der Auswertung ist hierbei die Alles-oder-nichts-Regel, die besagt, daß entweder eine Reaktion erfolgt oder nicht. Das von Dixon mit in logarithmischen Stufen ansteigenden Medikamentenkonzentrationen an Tieren angewendete Verfahren wurde in der vorliegenden Arbeit mit in logarithmischen Stufen an- und absteigenden von-Frey-Haar-Stärken durchgeführt. Daraus wurde die 50% Pfotenrückzugsschwelle (RS) ermittelt. Hierbei handelt es sich um die Schwelle, bei der ein Tier in 50% der Testdurchgänge die Pfote zurückzieht. Erfolgte nun bei einer bestimmten Stärke, beginnend mit dem aufgedruckten Haarstärkewert 3,84, eine positive Reaktion, wurde mit der nächstniedrigeren Stärke fortgefahren. Bei negativer Reaktion orientierte man sich entsprechend am nächsthöheren Wert. So entstanden sequenzartige auf- und absteigenden Kurven. Jeder aufgedruckte Haarstärkewert entspricht dem Zehnerlogarithmus der jeweiligen Kraft in g. Nennt man positive Reaktionen „X“ und negative Reaktionen „0“, könnte ein Ergebnis zum Beispiel so aussehen: XXX0X0.

Daraus errechnet sich die RS nach folgender Formel:

$$50\% \text{ Rückzugsschwelle in g} = 10^{\frac{Xf + \kappa\delta}{10.000}}$$

Hierbei ist

- $Xf$  = Stärkewert des zuletzt benutzten von-Frey-Haares
- $\kappa$  = Tabellenwert nach Dixon (1980) für das entsprechende Muster positiver und negativer Werte
- $\delta$  = mittlere Differenz zwischen Haarstärkewerten

Im oben genannten Beispiel ergibt sich somit ein Wert von 0,09 g.

Die auf diese Weise für jede Maus ermittelten Werte wurden niedergeschrieben und daraus die Mittelwerte sowie die Standardabweichung errechnet. Die Ergebnisse sind graphisch gegen den Zeitverlauf aufgetragen worden.

## 2.4 Gewebeentnahme

In einer weiteren Operation der Mäuse wurden nach Abschluß der Testphase jeweils die Nn. ischiadici entnommen und die Tiere daraufhin geopfert. Nach bilateraler Freilegung der Ischiasnerven auf Höhe des mittleren Oberschenkelbereiches wurden die Nerven der behandelten und die korrespondierenden Segmente der unbehandelten Seiten entnommen. Das Gewebe wurde in 3 mm-Segmente aufgetrennt, wovon zwei direkt eingefroren wurden: ein *medialer*, in dem die CCI- bzw. PST-Läsion lag und ein *distaler*, entsprechend den 3 mm distal davon angrenzend. Letzteres Segment wurde in der vorliegenden Arbeit für immunhistochemische Analysen verwendet. Zur Konservierung des Präparates wurden die proximalen Nervenenden in eines mit Tissue-tek® gefüllten kleinen

Plastikschälchen gegeben und untergetaucht, senkrecht mit dem distalen Ende nach oben ausgerichtet, schließlich in mit flüssigem Stickstoff gekühlten 2-Methylbutan ( $C_5H_{12}$ ) schockgefroren und bei  $-80\text{ °C}$  bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Das dritte, am weitesten distal gelegene 3 mm-Segment wurde für die spätere Verarbeitung zu Semidünnschnitten in 2,5% Glutaraldehyd fixiert.

## 2.5 Histologie

### 2.5.1 Immunhistochemie

Im Verlauf der immunhistochemischen Aufbereitung der *distalen* Nervenabschnitte wurden von den tiefgefrorenen Nervensegmenten zunächst mittels eines Kryostaten (*Leitz* Kryostat 1720) Schnitte in einer Dicke von  $10\text{ }\mu\text{m}$  angefertigt.

Im Anschluß an den Schneidevorgang wurden die Nervensegmente, nach Auftragung auf mit Poly-L beschichtete Objektträger, bei Raumtemperatur für etwa 20 bis 30 Min getrocknet. Nach Fixierung der Präparate mit 100 % Aceton bei  $-20\text{ °C}$  für die Dauer von 10 Min erfolgte eine erneute Trocknung über etwa 5 Min bei  $40\text{ bis }45\text{ °C}$ . Schließlich wurden die Präparate mittels eines Pap Pen® mit einem Kreis markiert und bei Raumtemperatur mit 10 % Albumin Fraktion V (BSA, *Carl Roth* GmbH & Co., Karlsruhe) über 30 Minuten geblockt. Danach wurde das BSA entfernt. Schließlich wurde der erste AK aufgetragen und bei Raumtemperatur über eine Stunde inkubiert. Im Anschluß daran wurde mit **Tris**hydroxyaminomethan (Tris)-Waschpuffer gewaschen.

Tris-Waschpuffer entspricht 100 ml Tris-Stammlösung (60,5 g Tris + 500 ml Aqua dest. + 400 ml in HCL, bei einem pH-Wert von 7,35) + 40 g NaCl in 2 Litern Aqua dest. bei einem pH-Wert von 7,4.

Die Präparate wurden 5 mal mit dieser Substanz gewaschen. Danach wurde Methanol + 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zugefügt, wonach eine erneute 5-malige Waschung mit Tris-Waschpuffer erfolgte. Der 2. AK (20 µl vorinkubierter AK + 1 ml 1 % BSA) wurde zugefügt, diesmal jedoch nur 30 Min bei Raumtemperatur inkubiert, danach schloß sich ein abermaliger 5-maliger Waschgang mit Tris-Waschpuffer an.

Die Präparate wurden danach mit den Reagenzien des Vectastain Peroxidase-Kit weiterbehandelt. Zunächst wurde eine Mischung aus den Reagenzien A und B hergestellt:

10 µl Reagenz A + 10 µl Reagenz B + 1 ml 1 % BSA.

Mit dieser Lösung wurden die Präparate behandelt und anschließend 30 Min bei Raumtemperatur beziehungsweise 10 Min bei 37 °C inkubiert. Es schloß sich ein weiterer 5-maliger Waschgang an. Schließlich erfolgte noch eine Inkubation mit 3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid (DAB) als Chromogen-Substrat. Chromogen-Substrat wird, wie im folgenden dargestellt, als Mischung zubereitet:

5 ml DAB-Stammlösung (24,1 g Tris in 1 l Aqua dest.) + 7,7 ml 0,1 HCl + 7,3 ml Aqua dest.; bei einem pH-Wert von 7,6 Zugabe von 2 Stück 10 mg-DAB-Tabletten (*Kem En Tec*, Dänemark) + 15 µl 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Zum Abstoppen der Färbung wurde Aqua dest. zugegeben, anschließend erfolgte eine Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Abschließend wurden die Präparate in Xylol über einen Zeitraum von 5 Min aufbewahrt und schließlich mit Eukitt eingedeckt.

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung war ein Avidin-Biotin-Detektionssystem (*Vector Laboratories*, Burlingame, CA, USA). Hier wird die Immunglobulin G (IgG)-Kette eines unmarkierten Primär-AK als Anheftungspunkt für einen affinitätschromatographisch gereinigten biotylinierten Zweit-AK eingesetzt. Dieser wiederum bildet das Bindeglied zwischen Primär-AK und Nachweissystem. Das Nachweissystem ist ein Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex, bei dem sich dessen Avidin-Bindungsstellen mit den Biotin-Bindungsstellen des Zweit-AK verbinden.

Die in der vorliegenden Arbeit für immunhistochemische Verfahren verwendeten AK waren die folgenden (*siehe Tabelle 1*):

**Anti-TNF:** polyklonaler Kaninchen-anti-Maus/Ratte TNF- $\alpha$ -AK der Firma *Serotec Ltd*, Oxford, UK. Dieser AK hatte eine Proteinkonzentration von 1,0 mg/ml und wurde in einer Verdünnung von 1:100 als Erstantikörper angewendet. Der Zweitantikörper ist das Bindeglied zwischen Primärantikörper und Nachweissystem und war hier ein biotylinierter anti-Kaninchen IgG der Firma *Vector*, Burlingame, CA, USA.

Dosierung: 10  $\mu$ l in Verbindung mit 1 ml 1 % BSA.

**MAC1:** monoklonaler AK Ratte-anti-Maus-Makrophagen. Hersteller ist die Firma *Serotec Ltd*, Oxford, UK. Die Proteinkonzentration betrug 7,8 mg/ml. Der AK wurde in einer Verdünnung von 1:100 angewendet. Zweitantikörper ist ein biotylinierter AK gegen Ratten-IgG der Firma *Vector*, Burlingame, CA, USA.

Dosierung: 10  $\mu$ l in Verbindung mit 1 ml 1 % BSA.

**Anti-IL 1 $\beta$ :** dies ist ein polyklonaler AK Ratte gegen humanes IL-1 $\beta$ . Produzent ist die Firma *Genzyme Diagnostics*; Cambridge, MA, USA. Der AK mit einer Proteinkonzentration von 2,0 mg/ml wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Der Zweitantikörper war ein biotylinierter AK gegen Kaninchen-IgG von *Vector*, Burlingame, CA, USA.

Dosierung: 10  $\mu$ l in Verbindung mit 1 ml 1 % BSA.

Einen Überblick über die Färbungen und die angewendeten AK gibt die folgende Tabelle:

Färbung	Erstantikörper	Zweitantikörper
TNF- $\alpha$	Polyclonal Rabbit Anti Mouse/Rat TNF- $\alpha$ <i>Serotec Ltd; Oxford, UK</i> Proteinkonzentration 1,0 mg/ml Verdünnung 1:100	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) ( <i>Vector; Burlingame, Ca, USA</i> ) 10 $\mu$ l AK (1:1 mit Mäuseserum) + 1 ml 1% BSA
Mac-1	Rat monoclonal antibody to mouse macrophages <i>Serotec Ltd; Oxford, UK</i> Proteinkonzentration 7,8 mg/ml Verdünnung 1:100	Biotinylated Anti-Rat IgG (H+L) ( <i>Vector; Burlingame, Ca, USA</i> ) 10 $\mu$ l AK (1:1 mit Mäuseserum) + 1 ml 1% BSA
IL-1 $\beta$	Polyclonal rabbit anti-human IL-1 $\beta$ <i>Genzyme; Cambridge, MA; USA</i> Proteinkonzentration: 2,0 mg/ml Verdünnung 1:100	Biotinylated Anti-Rabbit IgG (H+L) ( <i>Vector; Burlingame, Ca, USA</i> ) 10 $\mu$ l AK (1:1 mit Mäuseserum) + 1 ml 1% BSA

**Tabelle 1:** Übersicht der immunhistochemischen Färbemethoden und die dazu verwendeten Erst- und Zweitantikörper.

### 2.5.2 Semidünnschnitte in Toluidinblaufärbung

Desweiteren wurden toluidinblaugefärbte Semidünnschnitte der entnommenen und in Glutaraldehyd eingebetteten distalen Nervensegmente angefertigt. Nach der Fixierung der entnommenen Nerven mit 2,5% Glutaraldehyd in 0,1 M Phosphatpuffer erfolgte eine Einbettung über 24 Stunden in Araldit. Daraufhin wurden mittels eines Kryostaten Schnitte in einer Dicke von 1  $\mu$ m angefertigt, die dann mit Toluidinblau bei einem pH-Wert von 9,5 gefärbt wurden. Dies führte zu einer intensiven Blaufärbung

der Myelinscheiden der myelinisierten Axone sowie von zusätzlichen Zellen, wie zum Beispiel Schwann-Zellen oder Makrophagen.

### 2.5.3 Morphometrie

#### 2.5.3.1 Immunhistochemie

Die Morphometrie der immunhistochemisch gefärbten Präparate wurde an Gewebe von 13 Mäusen durchgeführt. Zur Bearbeitung der Präparate wurde ein Mikroskop, Modell *Zeiss Axiophot 2* der Firma *Zeiss*, Deutschland, in Verbindung mit einem vollständig servounterstützten Objektträgtisch von *Märzhäuser*, Deutschland, verwendet. Diese Einheit war über eine am Mikroskop installierte Videokamera (*Sony DXC 151*) mit einem Personal Computer konnektiert. Zusammen mit der Software *Image Pro Plus 4.0* konnte somit eine digitale Aufnahme, Bearbeitung und Speicherung der Präparate erfolgen.

Zur anschließenden morphometrischen Dichtemessung wurde das computerunterstützte Bildbearbeitungssystem *NIH Image 6.0* angewendet. Damit konnten die im digitalisierten Präparat immunhistochemisch angefärbten Abschnitte erfaßt, deren Fläche bestimmt und im Bezug auf die Gesamtfläche prozentual bestimmt werden. Untersucht wurden die entnommenen Nervensegmente, die durch die jeweiligen verwendeten AK unterschiedliche Färbeintensitäten aufwiesen, auf das Vorhandensein von TNF, IL-1 $\beta$  und Makrophagen. Zunächst erfolgte bei einer 4fachen Vergrößerung eine Übersichtsaufnahme sowie eine Bestimmung der Gesamtfläche des gesamten Nervenpräparates. Die Licht- und Filterverhältnisse wurden für jedes Präparat mit Hilfe von Helligkeits- und Kontrasteinstellungen individuell angepaßt. Somit konnten die stärker gefärbten immunreaktiven Flächen von den schwächer angefärbten Hintergrundflächen abgegrenzt werden. Im Anschluß daran wurde das Präparat unter den selben Licht- und Kontrastverhältnissen mit 40facher Vergrößerung mit Hilfe des

computerunterstützten Bildbearbeitungssystem in Form von Teilbildern aufgenommen und gespeichert. Im Mittel ergab dies eine Menge von etwa 10 Einzelbildern. Die immunreaktiven Flächen der Einzelbilder wurden nun bestimmt und in Bezug zur Gesamtfläche in Prozent angegeben.

### 2.5.3.2 Semidünnschnitte

Die Untersuchung der Semidünnschnitte erfolgte an Gewebe von 39 Mäusen. Wie bereits oben beschrieben wurden die histologischen Präparate digital gespeichert und bearbeitet. Das gesamte Präparat wurde in einer 63fachen Vergrößerung in Einzelbildern aufgenommen und zu einem Gesamtbild zusammengesetzt. Zunächst erfolgte die Berechnung der Gesamtfläche des Endoneuriums. Danach wurde mittels einer Rastereinblendung die morphometrische Untersuchung durchgeführt. Hierbei wurde jeweils die unter einem Kreuzungspunkt des quadratischen Rasters liegende Struktur bestimmt. Diese Rasterkreuzungspunkte befanden sich in einem konstanten Abstand von 25  $\mu\text{m}$ .

Die Klassifikationskriterien für die morphometrische Auswertung der Semidünnschnitte waren:

- intakte myelinisierte Fasern
- degenerierte myelinisierte Fasern
- endoneurale Zellen
- Ödem

Quantifiziert wurde die absolute Anzahl der oben genannten Strukturen, die sich jeweils unter einem Kreuzungspunkt des Rastergitters befanden. Diese Zahl wurde in Bezug zur Anzahl der gesamten Rasterkreuzungspunkte gesetzt und in Prozentwerten angegeben.

Darüber hinaus wurde von der Gesamtfläche des Präparates eine repräsentative Fläche von 20% selektiert. Somit ergaben sich für jedes Nervenpräparat etwa 3-6 Gesichtsfelder. In diesen wurden die Gesamtzahl intakter myelinisierter Fasern bestimmt. Die Fläche wurde vermessen und die Faseranzahl auf 1000  $\mu\text{m}^2$  Endoneuralfäche bezogen.

## 2.6 Auswertung und statistische Tests

Um Gruppenunterschiede bei den Hitzetests festzustellen, wurde der **ANalysis Of VAriance** (ANOVA) verwendet. Es folgte eine Analyse der Testgruppen an den einzelnen Testtagen mittels post-hoc-Tests. Dies wurde bei den Hitzetestungen durch den LSD-Test bewerkstelligt. Die Daten der Tests auf mechanische Stimulation wurden wegen deren non-parametrischer Verteilung durch den Friedman-Test analysiert, als post-hoc-Test fungierte der Newman-Keuls-Test (*Statistica Software 4.1 für Macintosh*). Bei den morphometrischen Untersuchungen wurde für Gruppenunterschiede ebenfalls der ANOVA verwendet, für die Analyse der einzelnen Gruppen folgte der Scheffé-Test (*Statistica software 4.1*).

Die Grenze der Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit 5% festgelegt, als statistisch signifikant galten alle darunter liegenden Werte ( $p < 0,05$ ).

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 Verhaltenstestung

#### 3.1.1 Schmerz-assoziiertes Verhalten von Mäusen mit CCI mit und ohne perioperativer Behandlung mit TNF-AK

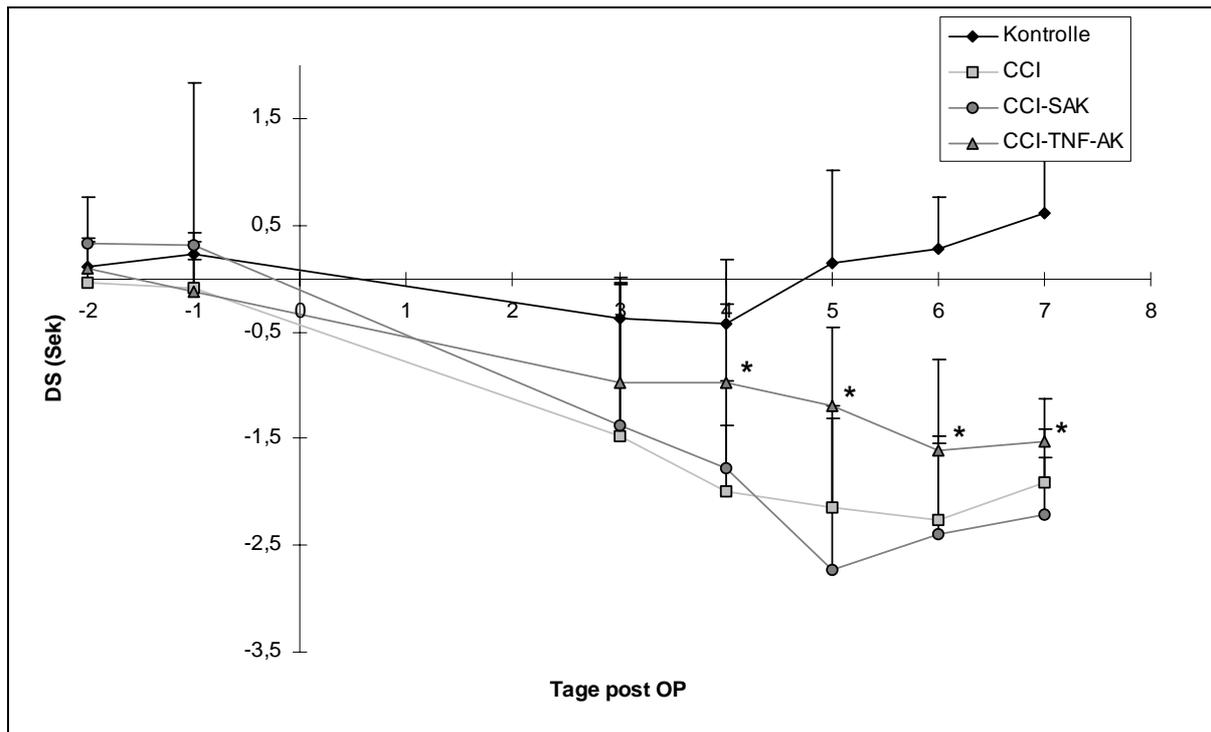
In diese Studie wurden 14 C57BL/6-Mäuse eingeschlossen. Nach Lieferung und Eingewöhnung erfolgte die Gruppeneinteilung nach folgendem Schema.

12 Tiere wurden nach dem CCI-Modell operiert. Davon wurden jeweils 4 Tiere mit TNF-AK behandelt, weitere 4 mit SAK. Die Verabreichung erfolgte jeweils einmalig perioperativ. 4 Mäuse erhielten keine weitere Behandlung. Außerdem wurden 2 weitere Tiere als unoperierte und unbehandelte Negativkontrollen mitgetestet. Die Testung erfolgte ab dem 3. postoperativen Tag täglich bis zum 7. postoperativen Tag inklusive. Die Tiere wurden unmittelbar nach der Gewebeentnahme geopfert.

##### 3.1.1.1 Pfotenrückzuglatenz auf Hitzereize

Nicht operierte Kontrollmäuse zeigten Seitendifferenzen zwischen  $-0,43 \pm 0,6$  Sek (Tag 4) und  $0,62 \pm 0,6$  Sek (Tag 7). Alle 12 nach dem CCI-Modell behandelten Mäuse zeigten ab dem 3. postoperativen Tag eine deutliche Hitzehyperalgesie, entsprechend DS zwischen  $-0,9 \pm 0,3$  und  $-2,7 \pm 1,5$  Sek. Das Maximum des DS, das heißt der am meisten negative Wert und somit die höchste Schmerzempfindlichkeit, lag am 5. postoperativen Tag. Die nur CCI-behandelten Mäuse zeigten DS von  $-1,5 \pm 1,1$  bis  $-2,3 \pm 0,8$  Sek mit einem Maximalwert am 6. postoperativen Tag. Bei den mit CCI und SAK behandelten Mäusen ergaben sich ähnliche DS von  $-1,4 \pm 1,3$  bis -

2,7±1,5 Sek mit einem Maximum an Tag 5. Sie unterschieden sich somit nicht von den rein CCI-behandelten Tieren (siehe Abb. 5). Die mit CCI und TNF-AK behandelten Mäuse zeigten im Vergleich dazu von Tag 4-7 geringere Hitzehyperalgesie mit DS zwischen -0,9±0,7 und -1,6±0,9 Sek (\* p<0,05). Das Maximum lag hier an Tag 6.



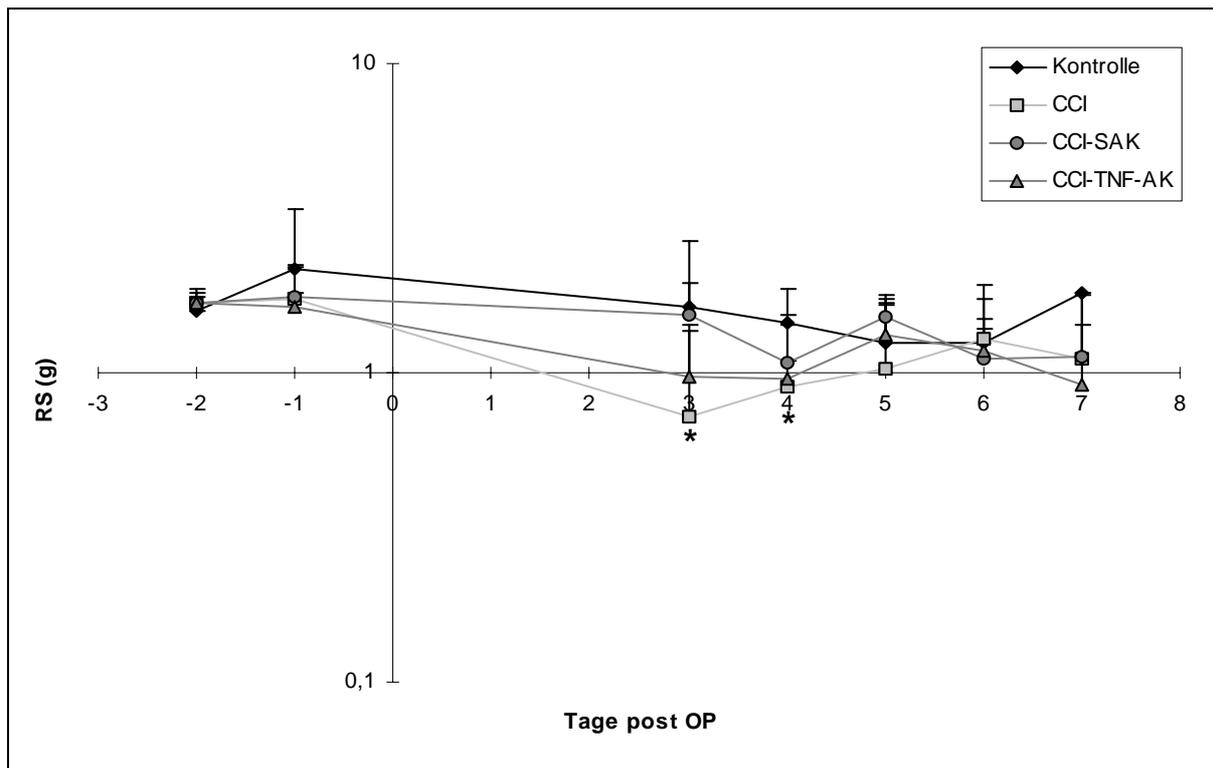
**Abb. 5. Hitzehyperalgesie bei Mäusen mit CCI und mit CCI und SAK- oder TNF-AK-Behandlung.** Hitzehyperalgesie bei allen CCI-Tieren post-OP. Signifikant reduzierte Hitzehyperalgesie bei TNF-AK - Mäusen gegenüber SAK und unbehandelten CCI-Tieren an den Tagen 4-7 (\* p<0,05).

### 3.1.1.2 Testung der Pfotenrückzugsschwelle auf taktile Stimulation (von Frey-Haare)

Nicht operierte Kontrollmäuse hatten in diesem Test RS zwischen 2,16±1,24 g (Tag - 1) und 1,25±0,48 g (Tage 5+6). Alle nach dem CCI-Modell behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zu den Kontrollmäusen eine Hypersensibilität auf taktile Reize mit RS zwischen 0,72±0,71 bis 1,5±0,4 g. Der Unterschied zwischen CCI- und

Kontrolltieren war insgesamt weniger deutlich ausgeprägt als bei der Hitzehyperalgesie und war am 3. und 4. Tag statistisch signifikant (\*  $p < 0,03$ ).

Die rein CCI-operierten Mäuse zeigten eine RS von  $0,72 \pm 0,71$  bis  $1,3 \pm 0,65$  g mit maximal ausgeprägter taktiler Allodynie am 3. postoperativen Tag. Bei den CCI-Mäusen mit SAK-Behandlung ergaben sich RS von  $1,0 \pm 0,3$  bis  $1,5 \pm 0,4$  g mit höchster Empfindlichkeit auf mechanische Reize an Tag 5. Die mit CCI und TNF-AK behandelten Mäuse zeigten eine RS zwischen  $0,9 \pm 0,5$  und  $1,3 \pm 0,5$  g. Das Minimum der ermittelten Werte lag hier an Tag 7. Es fand sich somit bei insgesamt gering ausgeprägter taktiler Allodynie kein signifikanter Unterschied zwischen den TNF-AK-behandelten und den SAK-behandelten Versuchstieren (siehe Abb. 6).



**Abb. 6. Taktile Allodynie bei Mäusen mit CCI und mit CCI und SAK- oder TNF-AK-Behandlung.** Signifikante taktile Allodynie der CCI-Mäuse an Tag 3 und 4 gegenüber Kontrollen (\*  $p < 0,05$ ). Keine signifikanten Unterschiede der taktilen Allodynie zwischen den Gruppen CCI mit SAK und CCI mit TNF-AK.

### 3.1.2 Vergleich des Schmerz-assoziierten Verhaltens von Mäusen mit CCI mit peri- oder postoperativer (Tag 4) Behandlung mit TNF-AK, Beobachtung über 44 Tage

In dieser Langzeitstudie wurden 15 C57BL/6-Mäuse verwendet. Die Fragestellung war, ob nicht nur eine präventive, sondern auch eine therapeutische Verabreichung des AK Auswirkungen auf das Schmerzverhalten der CCI-Mäuse hat.

13 Mäuse erhielten eine CCI. Davon wurden jeweils 5 Mäusen 50 µl TNF-AK (25 mg/ml) einmal perioperativ in die offene Wunde oder einmal 4 Tage nach der Operation perkutan perineural appliziert. 3 CCI-Tiere erhielten keine weitere Behandlung. 2 weitere Tiere wurden als unoperierte und unbehandelte Negativkontrollen mitgetestet. Die Testphase dauerte an bis zum 44. postoperativen Tag einschließlich. Danach erfolgte nach Entnahme des behandelten N. ischiadicus-Abschnittes die Opferung der Mäuse.

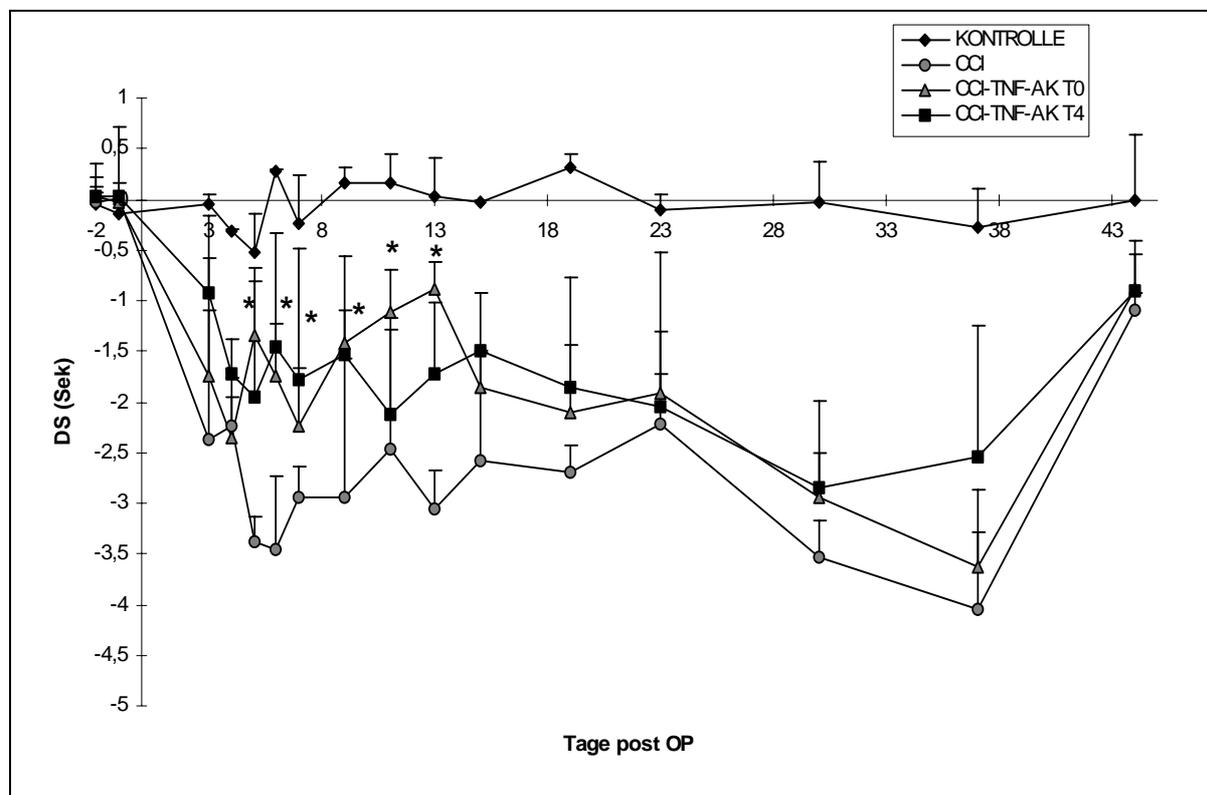
#### 3.1.2.1 Pfotenrückzuglatenz auf Hitzereize

Die Kontrolltiere hatten DS von  $-0,53 \pm 0,38$  Sek (Tag 5) bis  $0,32 \pm 0,12$  Sek (Tag 19). Alle nach der CCI-Methode behandelten Mäuse zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollmäusen eine deutliche Schmerzreaktion auf Hitzereize vom 3. postoperativen Tag an, die bis zum 44. Tag nachweisbar blieb. DS *aller* CCI-behandelten Tiere schwankten zwischen Werten von  $-0,9 \pm 0,3$  bis  $-4,0 \pm 1,2$  Sek. Die unbehandelten CCI-Mäuse zeigten DS von  $-1,1 \pm 0,2$  bis  $-4,0 \pm 1,2$  Sek mit einem Maximalwert am 37. postoperativen Tag. Unter perioperativer Gabe von TNF-AK waren die DS an den Tagen 5-13 signifikant reduziert (DS von  $-0,9 \pm 0,3$  bis  $-1,4 \pm 0,6$  Sek). Auch bei postoperativer Gabe von TNF-AK an Tag 4 war die Hitzehyperalgesie signifikant reduziert (DS von  $-1,5 \pm 1,1$  bis  $-2,1 \pm 0,8$  Sek) (*siehe Abb. 7*).

Der Vergleich der Gruppe mit perioperativer Verabreichung des AK zur Gruppe mit AK-Applikation am 4. postoperativen Tag ergab keine wesentlichen Unterschiede. Ab dem 5. Tag bewegten sich die DS beider Tiergruppen im wesentlichen gleichförmig

mit einer deutlich herabgesetzten Hitzehyperalgesie im Vergleich zur unbehandelten CCI-Gruppe bis zum Tag 19. Ab dann erfolgte ein gleichförmiger Verlauf beider mit TNF-AK behandelten (peri- und postoperativ) CCI-Gruppen und den Werten der unbehandelten CCI-Mäuse. Zum 44. und letzten postoperativen Testtag erfolgte in *sämtlichen* CCI-behandelten Tieren eine Abnahme der Hitzehyperalgesie auf DS von ca. -1.

Somit konnte nachgewiesen werden, daß TNF-AK zur Reduktion der Hitzehyperalgesie bei CCI nicht nur präventiv, sondern auch therapeutisch wirksam ist. Die Wirkdauer betrug bei beiden Applikationsformen etwa 2 Wochen.

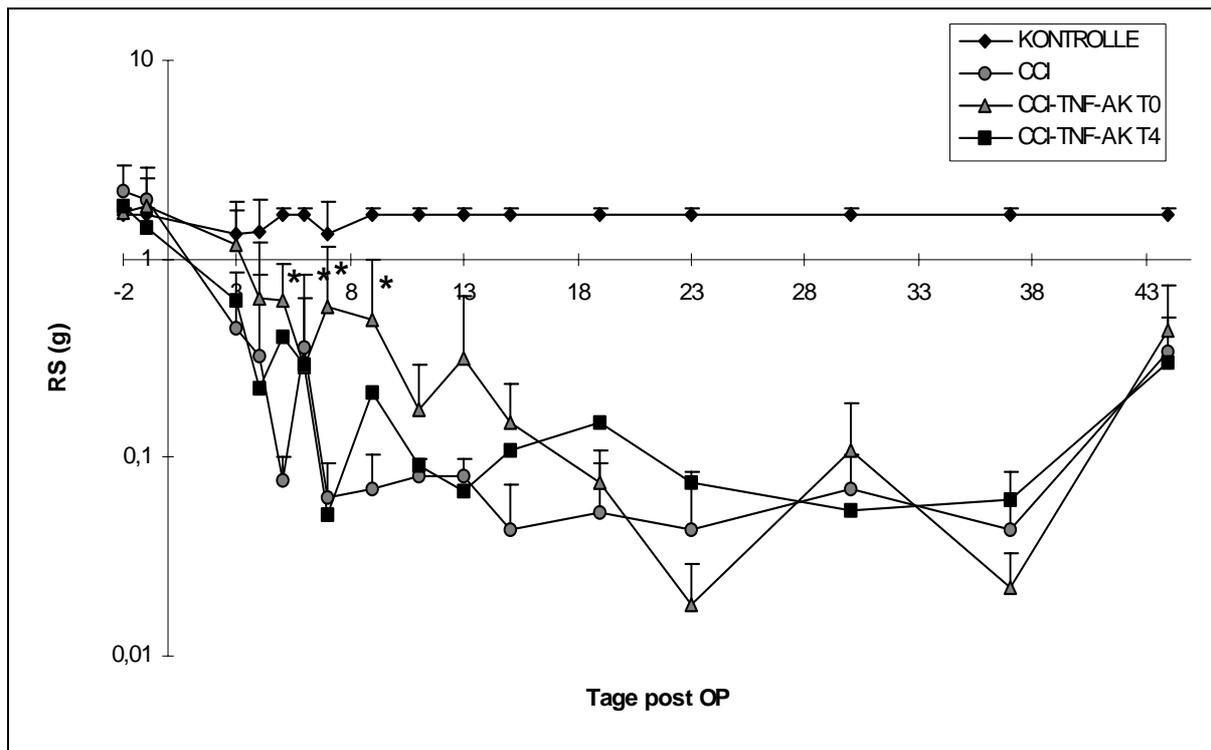


**Abb. 7. Hitzehyperalgesie bei Mäusen mit CCI und TNF-AK peri- (T0) oder postoperativ (T4).** Signifikante Unterschiede zwischen TNF-AK- und unbehandelten CCI-Gruppen zwischen 5. und 13. Tag. Signifikant reduzierte Hitzehyperalgesie auch bei therapeutischer Gabe von TNF-AK (\*  $p < 0,05$ ). Angleichung aller CCI-Gruppen ab Tag 23.

### 3.1.2.2 Pfotenrückzugsschwelle auf taktile Stimulation (von Frey-Haare)

Die Kontrollmäuse zeigten bei Untersuchungen auf Pfotenrückzugslatenzen Werte von  $1,33 \pm 0,59$  bis  $1,67 \pm 0,11$  g. Alle mit CCI behandelten Mäuse wiesen eine deutliche taktile Allodynie ab dem 3. postoperativen Tag auf. Die RS lagen mit Werten zwischen  $0,04 \pm 0,03$  und  $1,2 \pm 0,6$  g deutlich unter denen der unbehandelten Kontrollmäuse, hinweisend auf eine gesteigerte Empfindlichkeit auf taktile Stimuli. Die unbehandelten CCI-Mäuse zeigten eine durchschnittliche RS von  $0,04 \pm 0,03$  bis  $0,44 \pm 0,41$  g. Die Minimalwerte schwankten und fanden sich am 15. ( $0,04 \pm 0,03$  g) und 37. ( $0,04 \pm 0,04$  g) postoperativen Tag. Bei den CCI-Mäusen mit perioperativer TNF-AK-Behandlung ließen sich an den Tagen 5-9 Anzeichen für eine gegenüber der unbehandelten CCI-Gruppe signifikant verminderte taktile Allodynie erkennen (siehe Abb. 8). Im Mittel  $0,6 \pm 0,2$  g bei CCI und perioperativer TNF-AK-Gabe standen  $0,06 \pm 0,01$  g bei unbehandelten CCI-Mäusen gegenüber ( $p < 0,05$ ). Die CCI-Mäuse mit postoperativer TNF-AK-Gabe (Tag 4) zeigten an den Tagen 5-9 keinen Vorteil gegenüber unbehandelten CCI-Tieren. Die Rückzugsschwellen lagen im Mittel bei  $0,2 \pm 0,2$  g. Im Zeitraum vom 5. bis etwa zum 23. Tag schwankten die ermittelten RS der reinen CCI-Gruppen zwischen  $0,08 \pm 0,02$  g (Tag 5) und  $0,04 \pm 0,04$  g (Tag 23). Die CCI-Tiergruppe mit TNF-AK-Gabe an Tag 4 lag zwischen den Werten der übrigen CCI-Gruppen mit RS um  $0,1 \pm 0,08$  g (Tag 15).

Somit zeigte sich bei diesem Versuch eine Wirkung von TNF-AK auf die taktile Allodynie bei CCI mit präventiver TNF-AK-Gabe. Die therapeutische Verabreichung dieser Substanz, also zu einem Zeitpunkt, als die taktile Allodynie bereits nachweisbar war, erzielte keinen Effekt.



**Abb. 8. Taktile Allodynie bei Mäusen mit CCI und TNF-AK peri- (T0) oder postoperativ (T4).** Signifikant verminderte taktile Allodynie der Gruppe mit perioperativ verabreichtem Antikörper an den Tagen 5-9 (\*  $p < 0,05$ ). Ab Tag 19 nahezu gleichförmiger Verlauf der Gruppen.

### 3.1.3 Schmerz-assoziiertes Verhalten von Mäusen mit PST mit TNF-AK-Behandlung perioperativ oder an Tag 4 postoperativ

Die Fragestellung war, inwieweit Hitzehyperalgesie und taktile Allodynie bei PST auslösbar sind und darüber hinaus, ob, analog zum CCI-Modell, eine Reduktion dieser Symptome durch Gabe von TNF-AK nachzuweisen ist.

In diese Studie wurden 31 C57BL/6-Mäuse eingeschlossen, davon erhielten 27 Tiere eine PST, zusätzlich wurden 4 unoperierte und unbehandelte Tiere als Negativkontrollen mitgetestet. Die Tiere teilte man in 2 Gruppen auf, von denen eine Gruppe 14, die andere 17 Mäuse enthielt. In der *ersten Gruppe* erhielten 12 Mäuse eine PST-Operation. Man applizierte davon je 4 Tieren 50  $\mu$ l TNF-AK (25 mg/ml) perioperativ in die offene Wundhöhle, oder 50  $\mu$ l TNF-AK in gleicher Konzentration

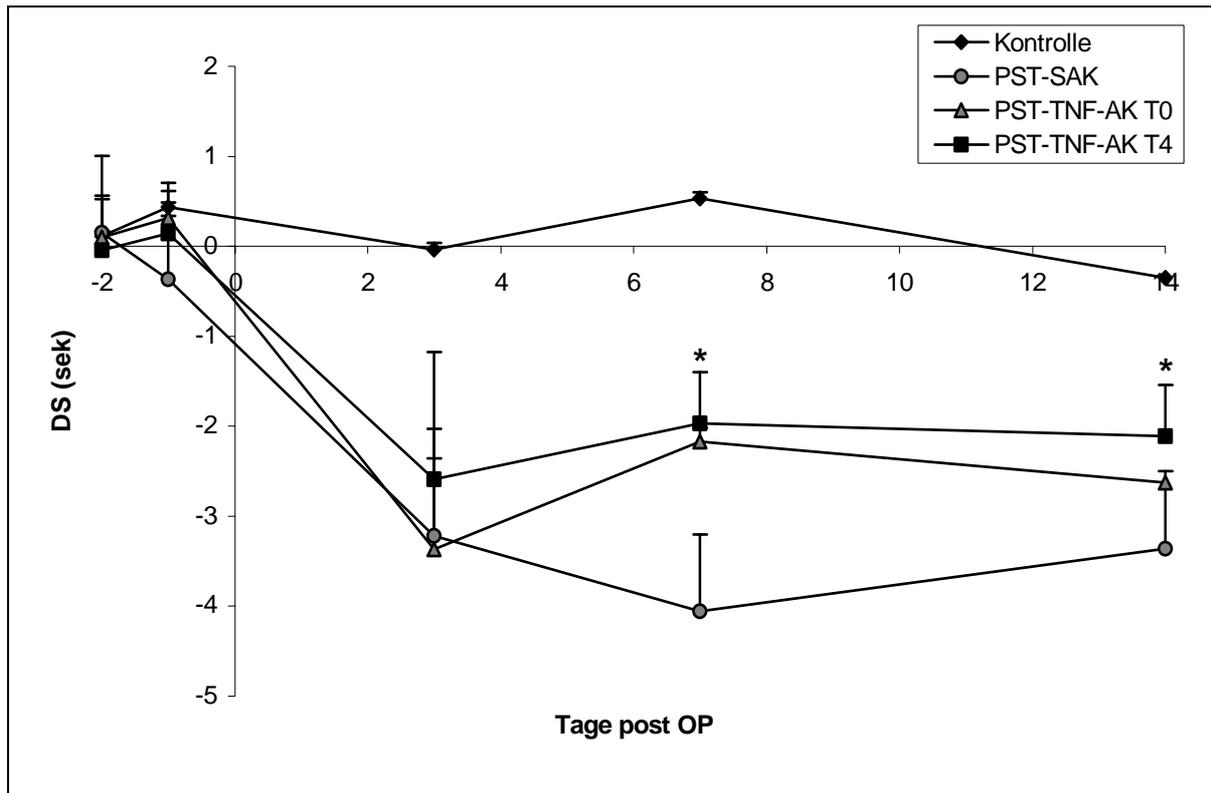
am postoperativen Tag 4 perineural, oder 50 µl SAK (10 mg/ml) perioperativ. Als Negativkontrollen wurden 2 unoperierte und unbehandelte Mäuse mitgetestet. In der *zweiten Gruppe* wurden 15 Tiere nach dem PST-Modell operiert. Davon wurden 3 mal 4 Tiere nach dem gleichen Behandlungsregime wie in der ersten Gruppe behandelt, 2 Mäuse wurden als unoperierte und unbehandelte Kontrollen mitgetestet.

### 3.1.3.1 Pfotenrückzuglatenz auf Hitzereize

Die erste Gruppe wurde auf Hitzehyperalgesie untersucht. Alle drei mit PST behandelten Tiergruppen (TNF-AK perioperativ, TNF-AK an Tag 4, SAK perioperativ) zeigten im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen eine deutliche Hitzehyperalgesie ab dem 3. postoperativen Tag bis zum Ende der Testphase am 14. postoperativen Tag.

Die Kontrollmäuse zeigten Ergebnisse von  $-0,38 \pm 0$  bis  $0,66 \pm 0$ . SAK-behandelte Mäuse lagen bei DS von  $-4,0 \pm 0,9$  und  $-3,4 \pm 1,1$ , hinweisend auf eine höhere Schmerzempfindlichkeit. Es zeigte sich eine reduzierte Hitzehyperalgesie an den Tagen 7 und 14 bei Mäusen, die perioperativ TNF-AK bekamen (*siehe Abb. 9*). Hier ergaben sich DS von  $-2,2 \pm 2,1$  und  $-2,6 \pm 0,2$ . Das Maximum, also die höchste Empfindlichkeit gegenüber thermischen Reizen, lag an Tag 3. Ähnlich reagierten die Mäuse, denen TNF-AK an Tag 4 injiziert wurde. Hier wurden DS von  $-2,0 \pm 3,0$  und  $-2,1 \pm 0,8$  gemessen mit einem Maximum an Tag 3.

Es ließen sich *keine* gravierenden Unterschiede in den DS der mit präventiver oder therapeutischer TNF-AK -Gabe behandelten PST-Tiergruppen untereinander erkennen, jedoch hoben sich diese beiden Gruppen signifikant von den Werten der SAK-Gruppe ab.

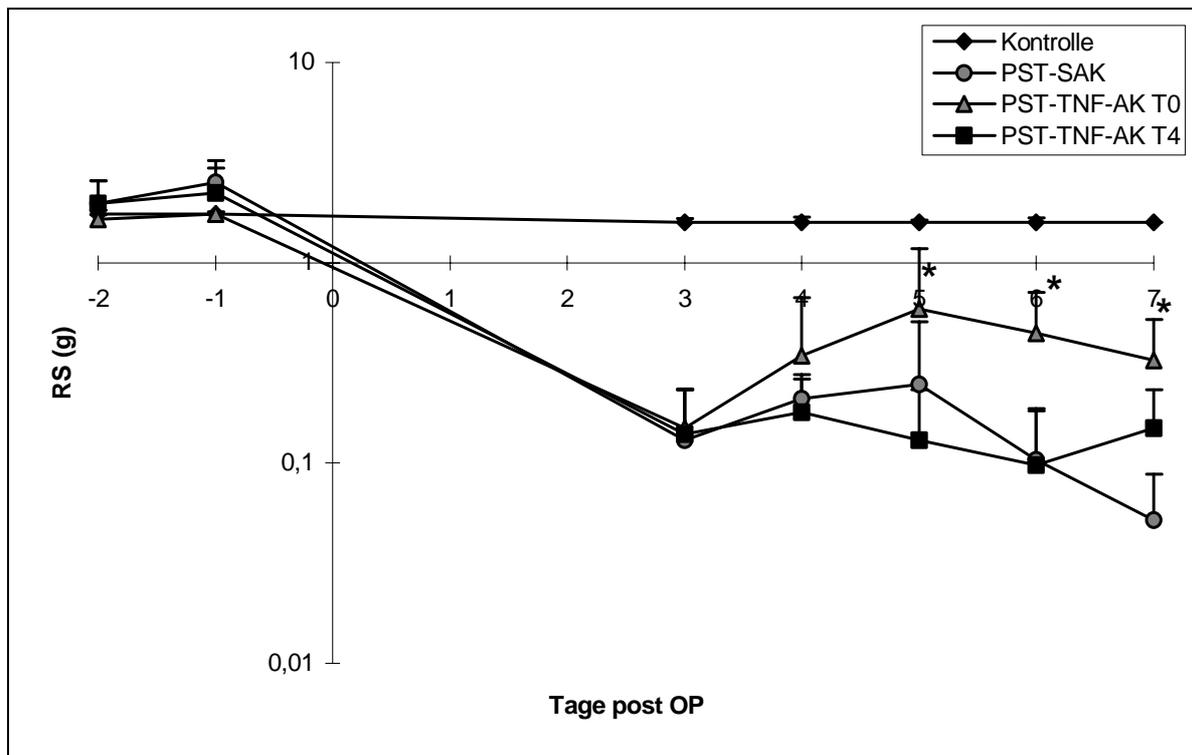


**Abb. 9. Hitzehyperalgesie bei Mäusen mit PST mit und ohne TNF-AK.** Deutliche Hitzehyperalgesie bei allen behandelten Tiergruppen an den Tagen 3-14, signifikant reduziertes Schmerzempfinden der TNF-AK-Gruppen im Vergleich zur SAK-Gruppe an den Tagen 5-7 (\*  $p < 0,05$ ). Wirkung von präventiver (T0) wie auch von therapeutischer (T4) TNF-AK-Gabe.

### 3.1.3.2 Pfotenrückzugsschwelle auf taktile Stimulation (von Frey-Haare)

Bei der zweiten Gruppe wurden die Pfotenrückzugsschwellen auf von Frey-Haare getestet. Die unbehandelten und unoperierten Negativkontrollen bewegten sich konstant in Bereichen zwischen  $1,59 \pm 0$  und  $1,75 \pm 0$  g. Bei allen PST-operierten Tieren war ab dem 3. Tag bis zum Ende der Testphase am 7. Tag taktile Allodynie nachweisbar. Die SAK-behandelten PST-Mäuse zeigten eine mittlere RS von  $0,13 \pm 0,01$  g. Die Minimalwerte fanden sich am 7. postoperativen Tag. Die Unterschiede der Werte zwischen TNF-AK und SAK waren an den Tagen 5-7 signifikant ( $p < 0,05$ ) (siehe Abb. 10). Die PST-Mäuse mit perioperativer Gabe von TNF-AK zeigten eine RS, die im Mittel mit  $0,45 \pm 0,02$  g insbesondere an den Tagen

5-7 für eine Minderung der taktilen Allodynie sprach. Nicht beeinflusst wurde die RS bei der Gruppe mit TNF-AK an Tag 4. Hier ergaben sich - ähnlich den PST-Tieren mit SAK-Behandlung - Werte von im Mittel  $0,13 \pm 0,01$  g. Das Minimum der taktilen Allodynie lag hier an Tag 3.



**Abb. 10. Taktile Allodynie bei Mäusen mit PST mit und ohne TNF-AK.** An den Tagen 5-7 signifikant geringere Empfindlichkeit der Tiere mit perioperativer TNF-AK-Gabe (T0) gegenüber SAK (\*  $p < 0,05$ ). Kein Effekt auf taktile Allodynie bei Gabe von TNF-AK an Tag 4 (T4).

### 3.1.4 Schmerz-assoziiertes Verhalten von Mäusen mit PST und CCI im Vergleich

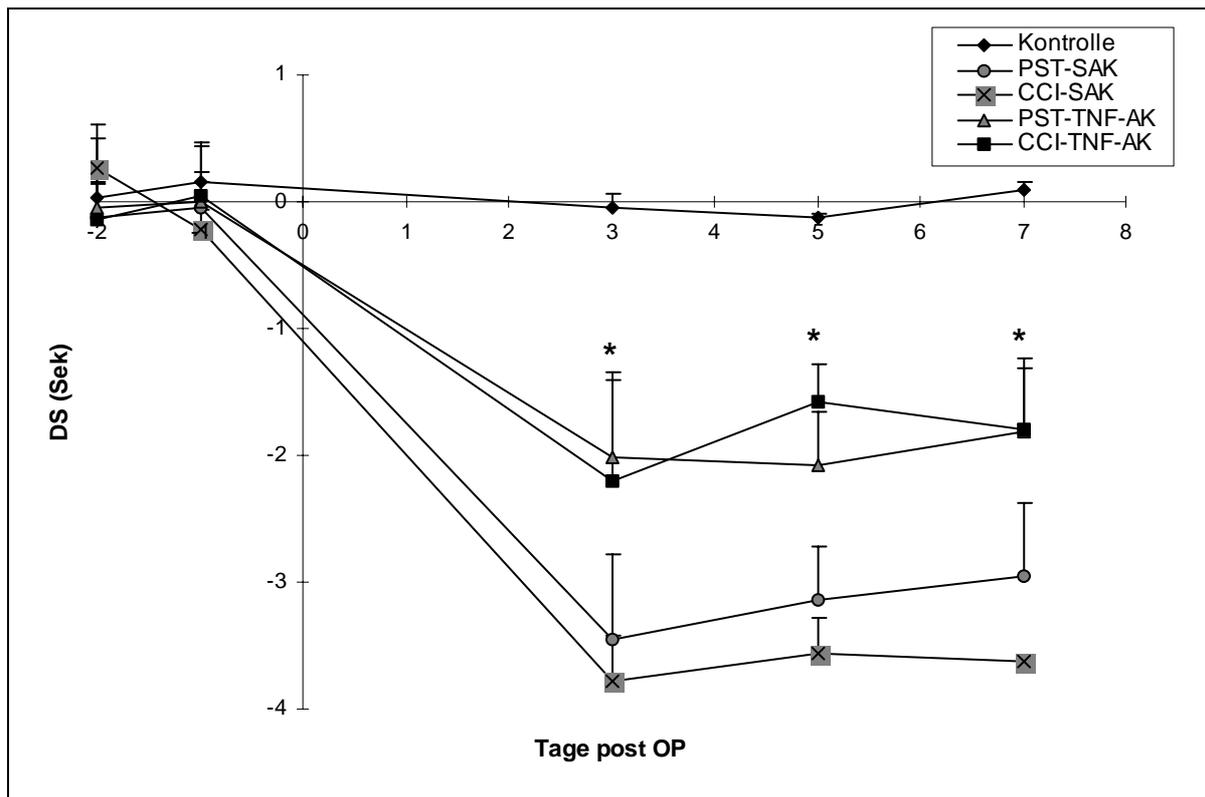
Hier sollte der *direkte* Vergleich der beiden in der vorliegenden Arbeit angewendeten Modelle, also CCI und PST, dargestellt werden. Dazu wurden aus 19 C57BL/6-Mäusen 5 Gruppen gebildet: 4 Tiere wurden nach der CCI-Methode operiert und erhielten perioperativ  $50 \mu\text{l}$  TNF-AK (25 mg/ml) in die offene Wundhöhle appliziert, weitere 4 erhielten CCI und perioperativ SAK. 4 Mäuse erhielten eine PST mit

perioperativer TNF-AK-Gabe in gleicher Menge und Konzentration, weitere 4 PST und perioperativ SAK. Die verbleibenden 3 Tiere wurden als unoperierte und unbehandelte Negativkontrollen auf Hitzehyperalgesie und taktile Allodynie mitgetestet. Gewebeentnahme und Opferung der Mäuse erfolgte nach Ende der Testphase am 14. postoperativen Tag.

#### 3.1.4.1 Pfotenrückzuglatenz auf Hitzereize

Die Kontrolltiere schwankten bei dieser Studie in DS-Bereichen zwischen  $0,03 \pm 0,58$  und  $-0,13 \pm 0,04$  s. Bei beiden operierten Gruppen, also sowohl beim CCI-Modell als auch beim PST-Modell zeigte sich ab dem 3. Tag bis zum Ende der Testphase, dem 7. postoperativen Tag, eine deutliche Hitzehyperalgesie als Folge der operativen Nervenläsion. Die mit PST und TNF-AK behandelten Mäuse zeigten DS von  $-1,8 \pm 0,2$  bis  $-2,1 \pm 0,5$  s mit einem Maximalwert am 5. postoperativen Tag. Sehr ähnliche Verhaltensergebnisse boten die Mäuse mit CCI und TNF-AK mit DS von  $-1,6 \pm 0,3$  s (Tag 5) bis  $-2,2 \pm 0,8$  s (Tag 3).

Verglichen mit den SAK-Gruppen beider Modelle (DS zwischen  $-3,6 \pm 0,3$  und  $-3,8 \pm 0,4$  s bei CCI und zwischen  $-3,0 \pm 0,6$  und  $-3,5 \pm 0,7$  s bei PST) bewirkte die perioperative TNF-AK-Behandlung somit bei CCI und PST während der gesamten Testphase eine verminderte Hitzehyperalgesie (*siehe Abb. 11*).



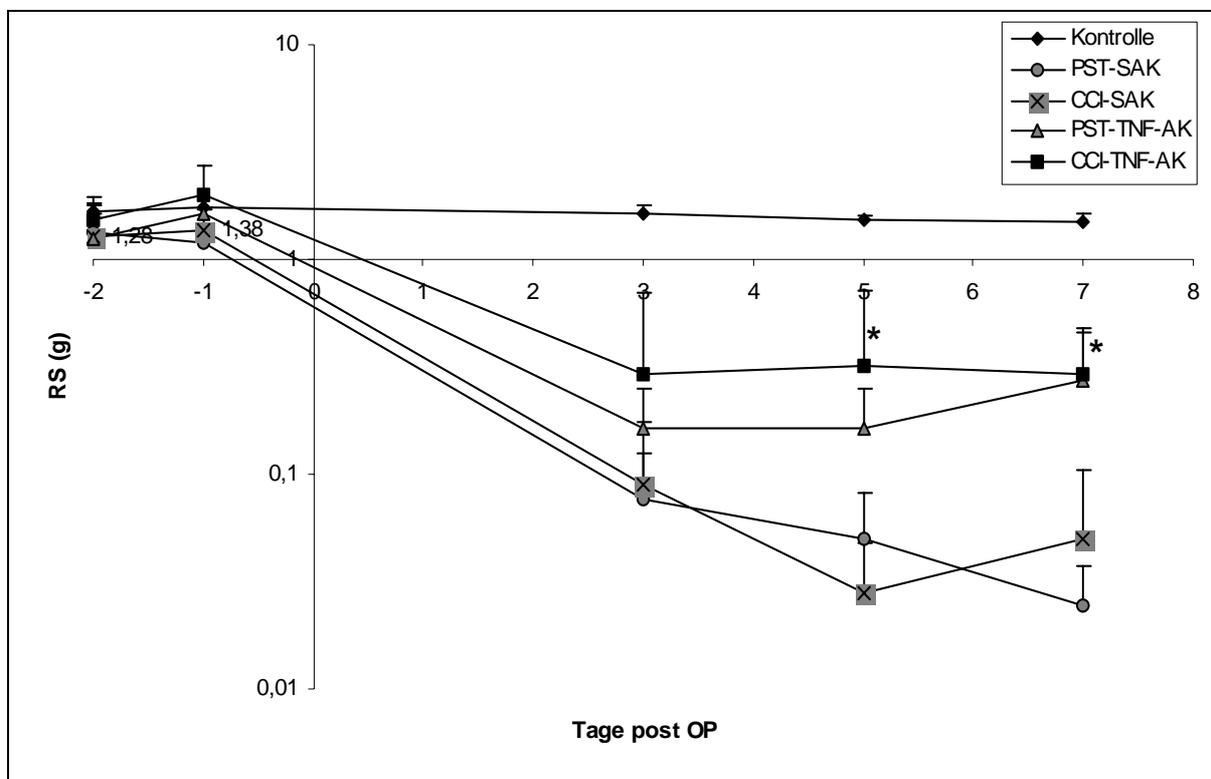
**Abb. 11. Hitzehyperalgesie bei Mäusen mit CCI oder PST mit TNF-AK oder SAK.** Deutlich nachweisbare Hitzehyperalgesie bei beiden Tiermodellen. Signifikant verminderte Hitzehyperalgesie bei CCI und PST mit TNF-AK perioperativ im Vergleich zu SAK (\*  $p < 0,05$ ).

### 3.1.4.2 Pfotenrückzugsschwelle auf taktile Stimulation (von Frey-Haare)

Die unbehandelten Negativkontrollen bewegten sich bei den Untersuchungen auf RS nach taktile Stimulation in Bereichen zwischen  $1,49 \pm 0,15$  und  $1,75 \pm 0$  g. Beim PST- und beim CCI-Modell fand sich reproduzierbares Allodynie-Verhalten ab dem 3. postoperativen Tag. Die SAK-behandelten PST-Mäuse pendelten zwischen Werten von  $0,02 \pm 0,01$  bis  $0,08 \pm 0,05$  g, die SAK-behandelten CCI-Mäuse von  $0,03 \pm 0,02$  bis  $0,09 \pm 0,09$  g. Die mit TNF-AK behandelten PST-Mäuse zeigten eine durchschnittliche RS von  $0,17 \pm 0,09$  bis  $0,28 \pm 0,18$  g. Die Minimalwerte waren konstant vom 3. bis zum 5. postoperativen Tag vorhanden. Bei den CCI-Mäusen mit Gabe von TNF-AK ließ sich ein dazu nahezu gleichförmiges Verhalten erkennen: die RS lagen zwischen

0,29±0,18 bis 0,32±0,4 g. Somit zeigte sich bei beiden Modellen eine Wirkung von perioperativer TNF-AK-Gabe (siehe Abb. 12).

Auffallend ist auch hier der gleichförmige Kurvenverlauf bei CCI und PST. Am 7. postoperativen und gleichzeitig letztem Testtag fand sich eine noch stärkere Angleichung der Mittelwerte der Rückzugslatenzen beider Gruppen auf 0,28±0,18 g (PST) und 0,29±0,18 g (CCI). Das spricht für gleiche Auswirkung von PST wie auch CCI auf die taktile Allodynie.



**Abb. 12. Taktile Allodynie bei Mäusen mit CCI oder PST mit TNF-AK oder SAK.** Signifikant reduzierte taktile Allodynie bei CCI- und PST-Tieren mit TNF-AK gegenüber SAK an den Tagen 5-7 (\* p<0,05). Gleichförmiger Kurvenverlauf von PST und CCI.

## 3.2 Histologie

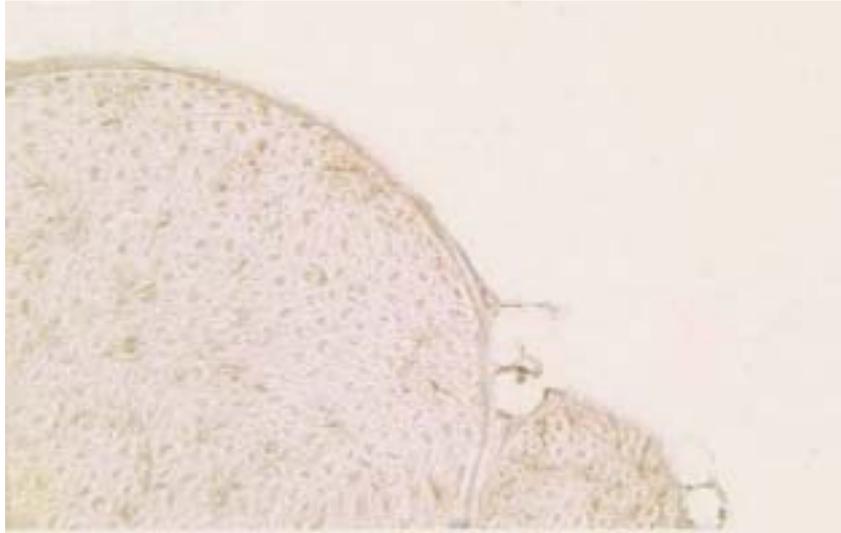
### 3.2.1 Immunhistochemie

#### 3.2.1.1 Makrophagendichte und Zytokinexpression beim CCI-Modell mit und ohne perioperativer Gabe von TNF-AK

Die Versuchsprotokoll hierzu ist unter Punkt 3.1.1 nachzulesen.

#### **Makrophagen (Mac-1)**

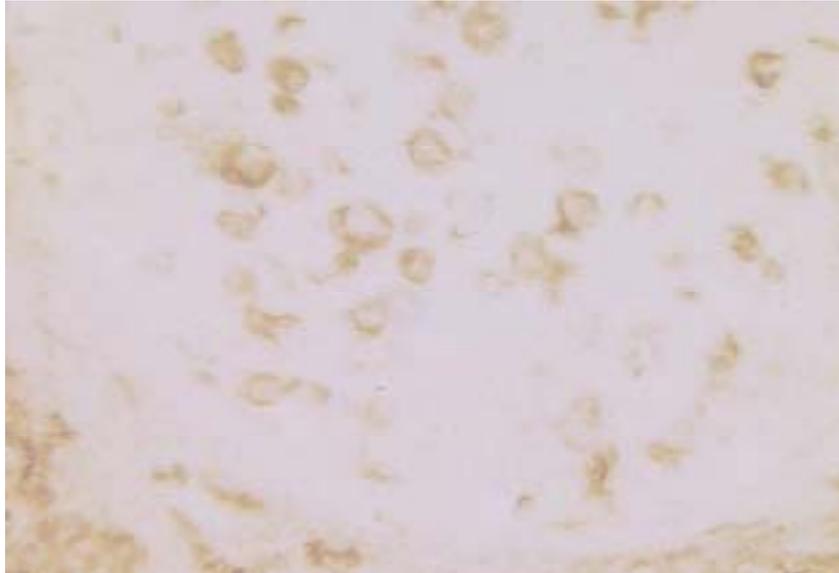
Die unoperierten und unbehandelten Negativkontrollen zeigten erwartungsgemäß eine sehr geringe Anfärbung durch den Mac-1-AK, hinweisend auf nur wenige Mac-1-immunreaktive Makrophagen im Kontrollnerven. Bei den reinen CCI-Mäusen ohne weitere Behandlung fand sich eine für Mac-1 immunreaktive Fläche von  $4,9 \pm 0,6\%$ . Die CCI-Mäuse mit SAK hatten mit einer Makrophagendichte von etwa  $6,1 \pm 0,6\%$  der Gesamtfläche ein ähnliches Ergebnis wie die CCI-Mäuse mit TNF-AK mit  $7,9 \pm 1,2\%$  (n.s., siehe Abb. 13+16).



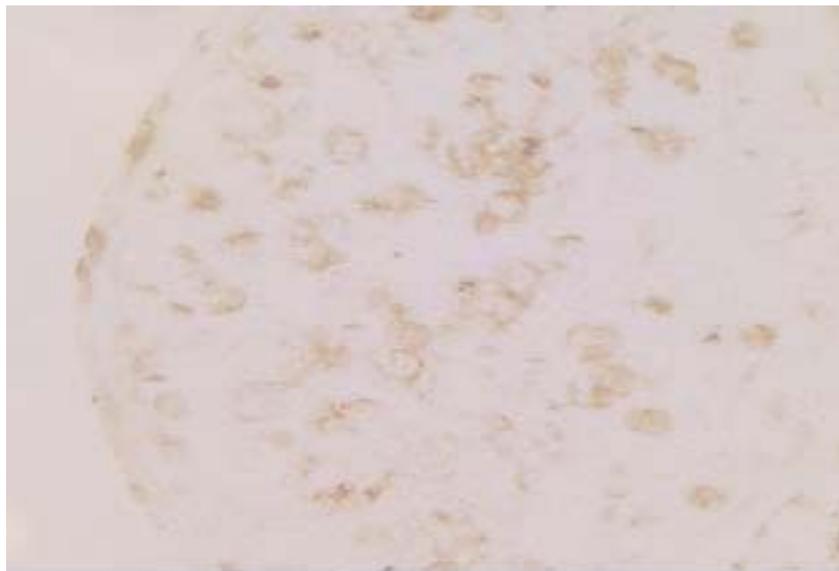
**A**



**B**



**C**

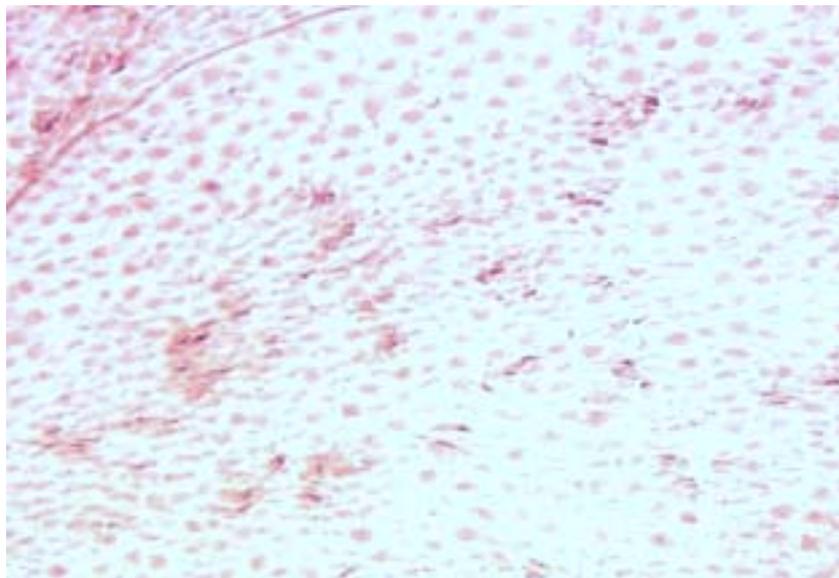


**D**

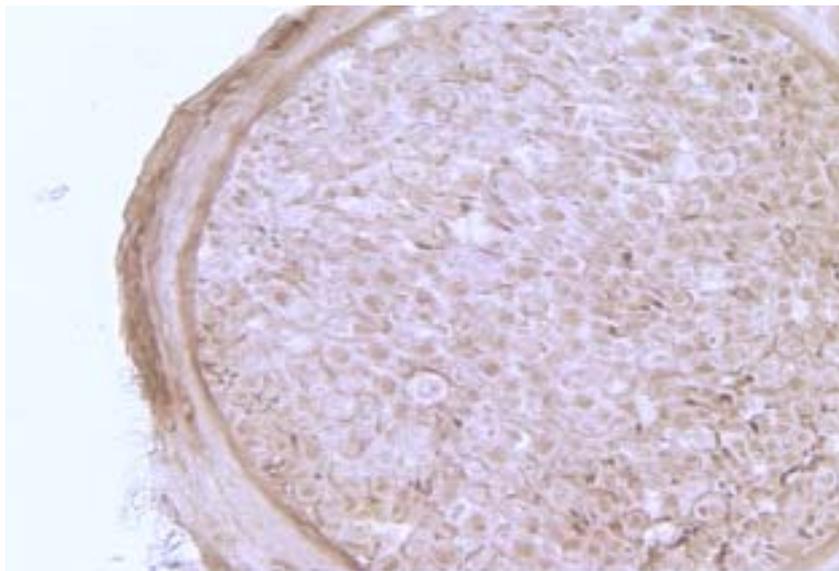
**Abb. 13 A-D. Repräsentative Gefrierschnitte des N. ischiadicus einer Kontrollmaus (A), einer Maus mit CCI ohne Behandlung (B), einer Maus mit CCI und SAK perioperativ (C) und einer Maus mit CCI und TNF-AK perioperativ (D). Die Gewebeentnahme und anschließende Immunhistochemie für Makrophagen mittels **Mac-1-AK-Färbung** erfolgte an **Tag 7**. Man sieht 7 Tage nach CCI eine gegenüber dem Kontrollnerven hohe Makrophagendichte. Es finden sich *keine* signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten CCI-Gruppen und den CCI und SAK- oder CCI und TNF-AK-behandelten Gruppen (Vergrößerung A: x300, B-D: x400).**

## TNF

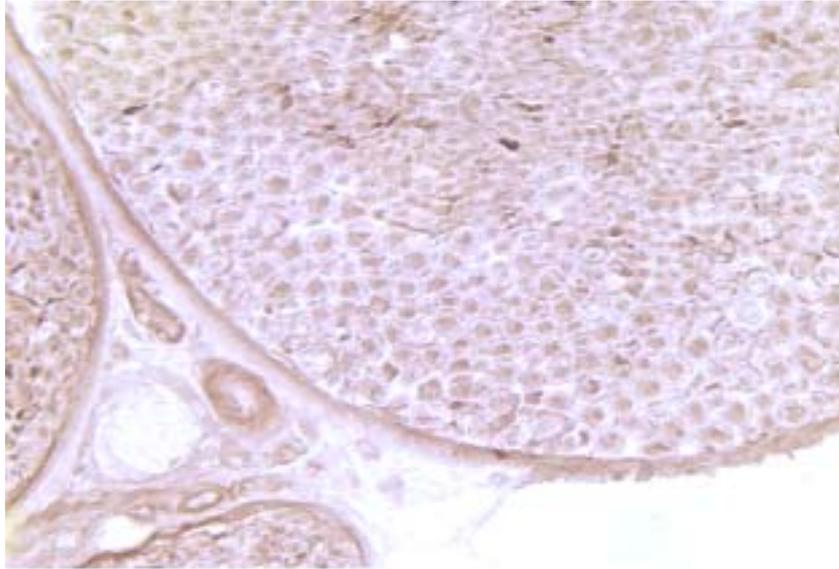
Die gänzlich unbehandelten Negativkontrollen zeigten eine Anfärbung durch den TNF-AK von nur  $0,2 \pm 0,16\%$  im Bezug zur Gesamtfläche. Die immunreaktive Fläche der unbehandelten CCI-Mäuse färbte eine Fläche von  $1,53 \pm 0,2\%$  der Gesamtfläche an. Bei den CCI-Mäusen mit perioperativer TNF-AK-Behandlung fand sich eine ähnliche Immunreaktivität von  $1,6 \pm 0,4\%$ . Die CCI-Mäuse mit SAK hatten ebenso eine TNF-Dichte von etwa  $1,6 \pm 0,5\%$  der endoneuralen Gesamtfläche (siehe Abb. 14+16).



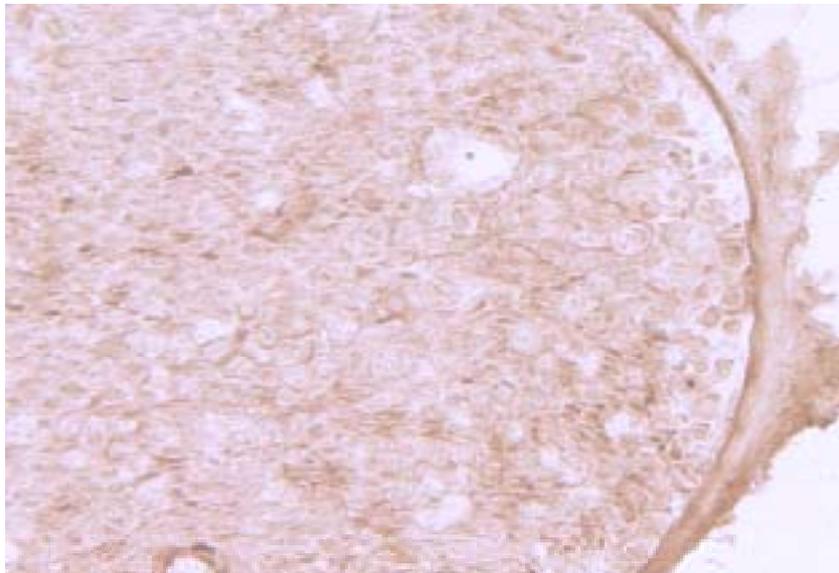
**A**



**B**



**C**



**D**

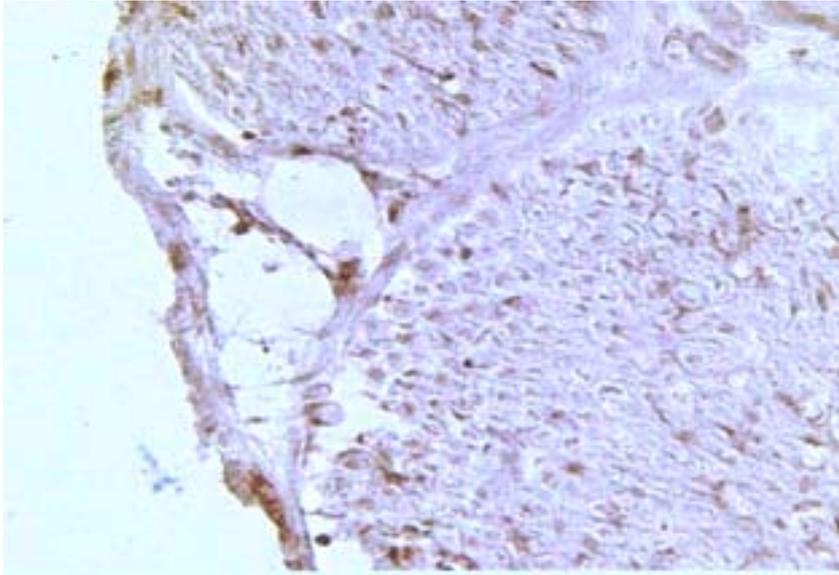
**Abb. 14 A-D. Repräsentative Gefrierschnitte des N. ischiadicus einer unbehandelten Kontrollmaus (A), einer unbehandelten Maus mit CCI (B), einer Maus mit CCI und SAK-Behandlung perioperativ (C) und einer Maus mit CCI und TNF-AK-Behandlung perioperativ (D).** Die Gewebeentnahme und anschließende Immunhistochemie für TNF mittels **TNF-AK Färbung** erfolgte an **Tag 7**. Man sieht gegenüber der Negativkontrolle eine deutlich stärkere Anfärbung bei allen CCI-Mäusen, allerdings finden sich *keine* signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten CCI-Gruppen und den CCI und SAK- oder CCI und TNF-AK-behandelten Gruppen (Vergrößerung A-D: x400).

## IL-1 $\beta$

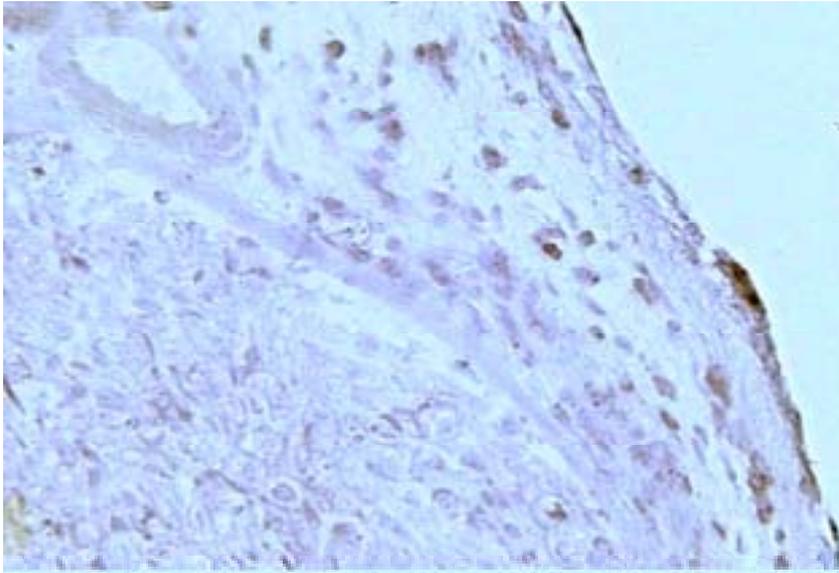
Nach 7 Tagen fand sich bei den unoperierten und unbehandelten Negativkontrollen eine Anfärbung durch den IL-1 $\beta$ -AK von lediglich 0,2 $\pm$ 0%. Die immunreaktiv angefärbte Fläche der unbehandelten CCI-Mäuse nahm 0,6 $\pm$ 0% der Gesamtfläche ein. Die CCI-Mäuse mit SAK hatten eine ähnliche IL-1 $\beta$ -Dichte von etwa 0,8 $\pm$ 0,4% der Gesamtfläche. Bei CCI-Mäusen mit TNF-AK zeigte sich eine Immunreaktivität von 1,2 $\pm$ 0,3% (siehe Abb. 15+16). Dieses Ergebnis spricht dafür, daß beim CCI-Modell gegenüber den Negativkontrollen ein Anstieg des Mediators IL-1 $\beta$  stattgefunden hat. (\* p<0,05, s. Abb. 16).



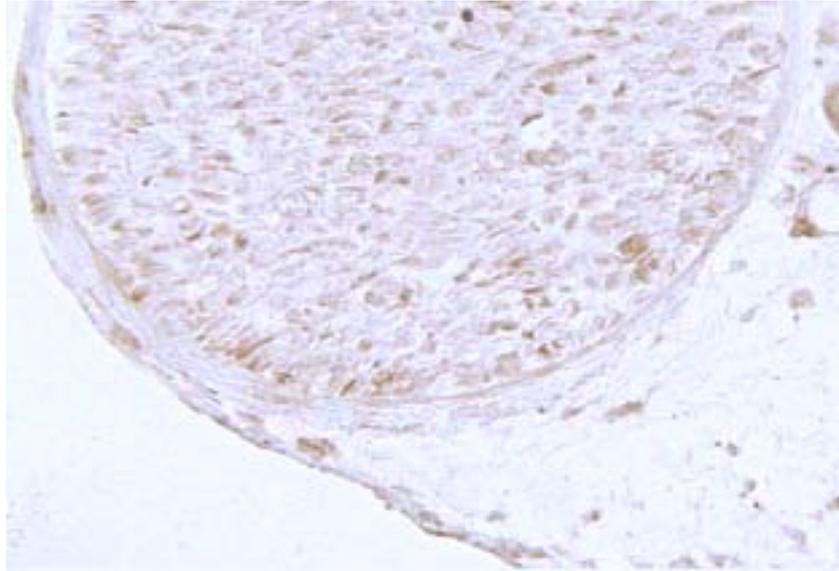
A



**B**

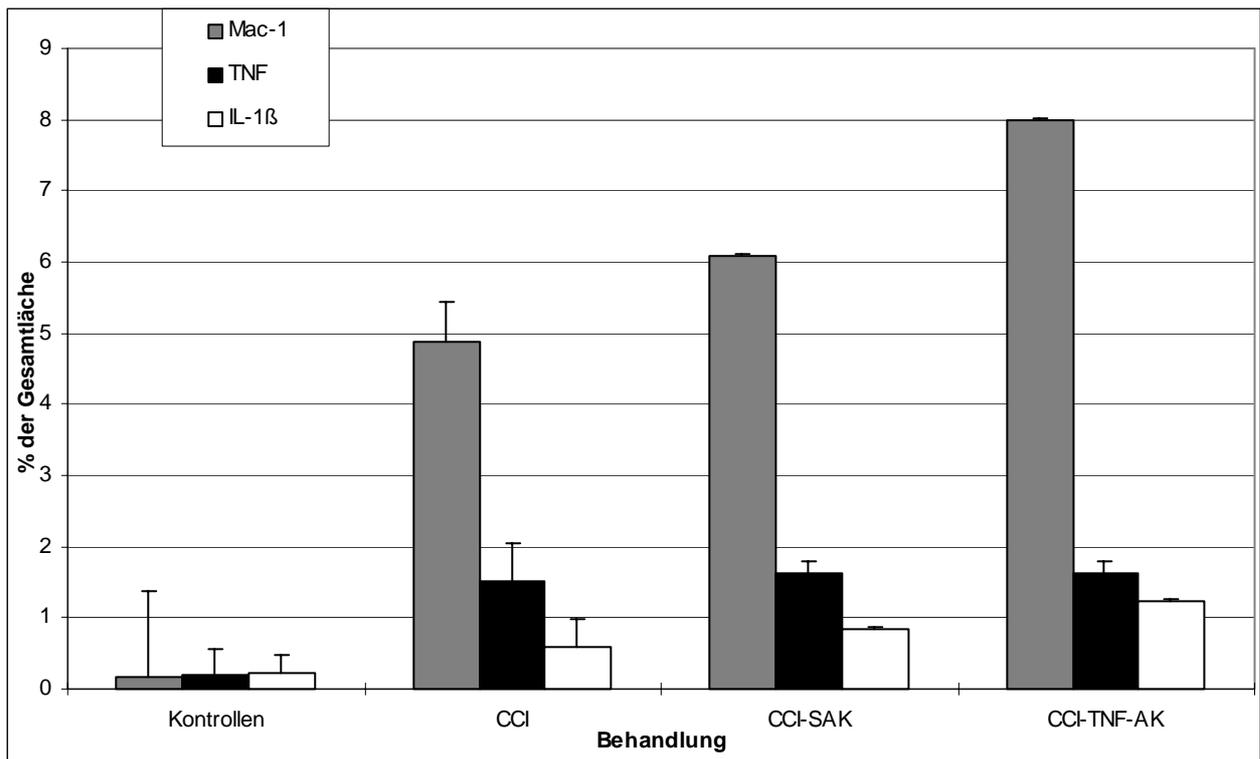


**C**



**D**

**Abb. 15 A-D. Repräsentative Gefrierschnitte des N. ischiadicus einer unbehandelten Kontrollmaus (A), einer unbehandelten Maus mit CCI (B), einer Maus mit CCI und SAK-Behandlung perioperativ (C) und einer Maus mit CCI und TNF-AK-Behandlung perioperativ (D).** Die Gewebeentnahme und anschließende Immunhistochemie für IL-1 $\beta$  mittels **IL-1 $\beta$ -AK-Färbung** erfolgte an **Tag 7**. Man sieht eine gegenüber dem Kontrollnerven bei allen CCI-Mäusen nur unwesentlich stärker angefärbte Fläche. Es finden sich *keine* signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten CCI-Gruppen und den CCI und SAK- oder CCI und TNF-AK-behandelten Gruppen (Vergrößerung A-D: x400).



**Abb. 16. Morphometrische Auswertung der Immunhistochemie des N. ischiadicus unbehandelter Kontrollmäuse, von unbehandelten Mäusen mit CCI, von Mäusen mit CCI und SAK-Behandlung perioperativ sowie von Mäusen mit CCI und TNF-AK-Behandlung perioperativ für Makrophagen, TNF und IL-1 $\beta$ .** Die Gewebeentnahme erfolgte am 7. postoperativen Tag. Man sieht eine gegenüber den Kontrollen hohe Makrophagendichte bei allen behandelten und unbehandelten CCI-Gruppen und einen entsprechend gesteigerten TNF- und IL-1 $\beta$ -Gehalt. Es finden sich *keine* signifikanten Unterschiede zwischen den unbehandelten CCI-Gruppen und den CCI und SAK- oder CCI und TNF-AK-behandelten Gruppen.

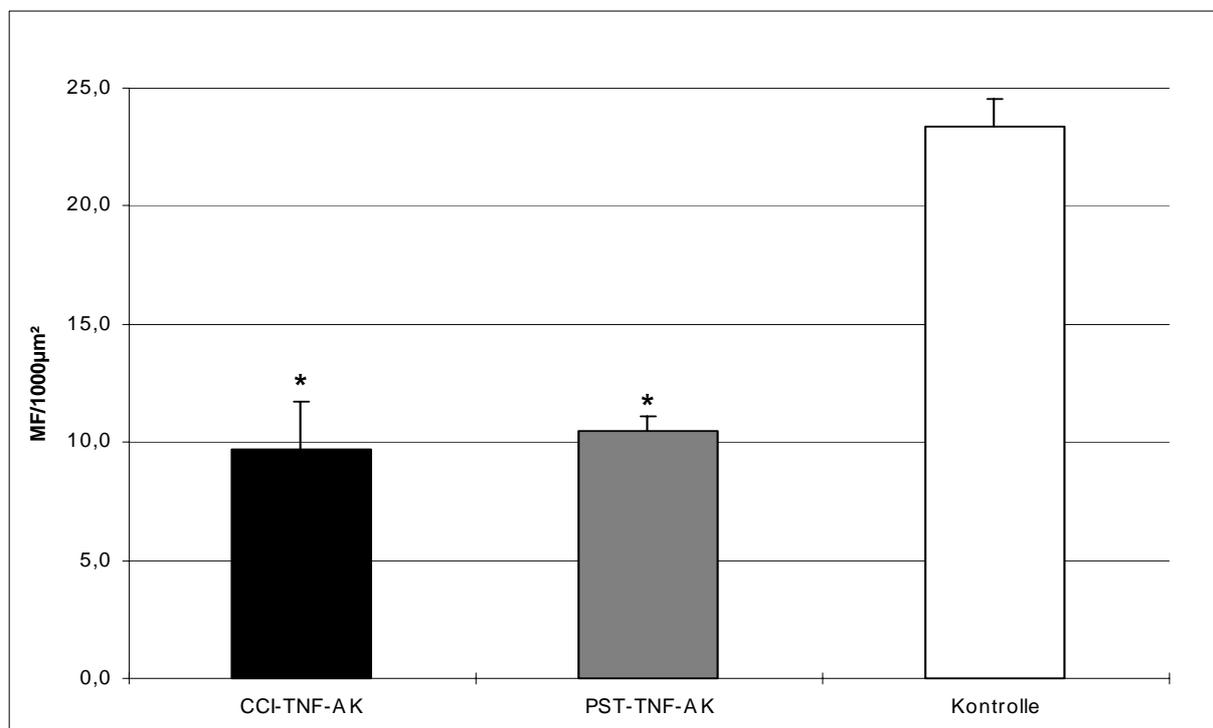
In Ermangelung eines Behandlungseffektes beim CCI-Modell wurde das PST-Modell bei diesem Versuch nicht angewendet.

### 3.2.2 Semidünnschnitte

#### 3.2.2.1 Vergleich des Ausmaßes der Wallerschen Degeneration an Tag 7 bei PST und CCI mit perioperativer TNF-AK-Behandlung

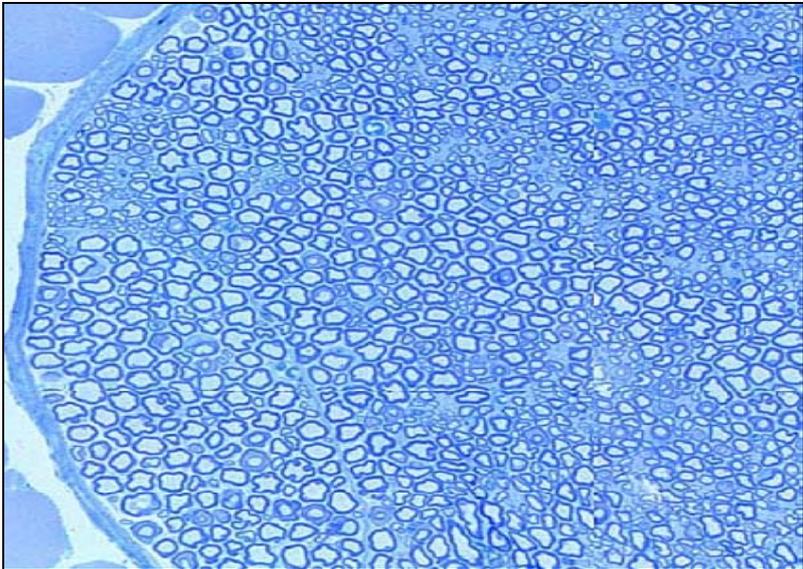
Der Versuchsaufbau dieser 7-Tage-Studie ist unter Punkt 3.1.4 nachzulesen. Hier sollte untersucht werden, ob sich die Modelle der CCI und der PST bezüglich des Ausmaßes der Nervendegeneration unterscheiden.

Die Anzahl intakter myelinisierter Nervenfasern betrug bei den Kontrolltieren  $23 \pm 1,1/1000 \mu\text{m}^2$ . Die Scheinseiten der operierten Tiere unterschieden sich hiervon nicht (CCI:  $23 \pm 1,5/1000 \mu\text{m}^2$ ; PST:  $22 \pm 0,8/1000 \mu\text{m}^2$ ). Bei der CCI- als auch bei der PST-Gruppe fand sich 7 Tage nach der Operation eine signifikante Reduktion myelinisierter Nervenfasern im Vergleich zu den Scheinseiten: die operierten Seiten zeigten Werte von  $10 \pm 2/1000 \mu\text{m}^2$  bei den CCI-Tieren mit perioperativer TNF-AK-Gabe und  $11 \pm 0,6/1000 \mu\text{m}^2$  bei den PST-Tieren mit perioperativer TNF-AK-Gabe. Es waren somit keine Unterschiede in der Nervenfaserdichte dieser beiden Modelle unter Behandlung mit TNF-AK zu erkennen (siehe Abb. 17+18).

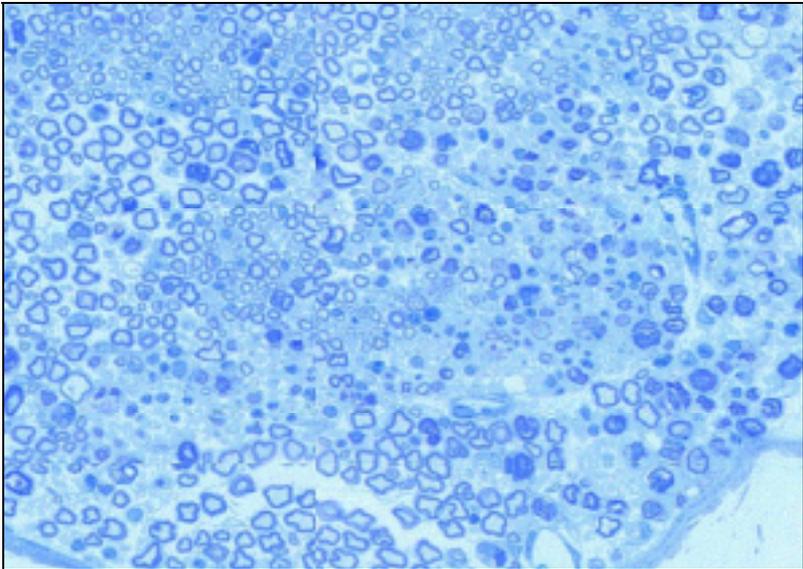


**Abb. 17. Semidünnschnittauswertung bei Mäusen mit CCI oder PST nach 7 Tagen bezüglich Faserdichte.** Man sieht eine signifikant erniedrigte Faserdichte bei CCI- und PST-Tieren im Vergleich

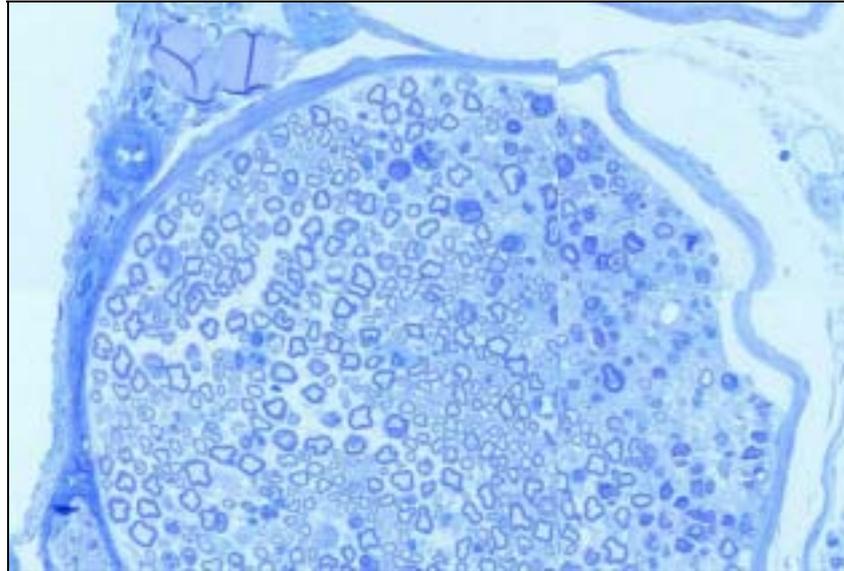
zu den unbehandelten Kontrolltieren (\*  $p < 0,05$ ). Es besteht *kein* signifikanter Unterschied zwischen CCI und PST.



**A**



**B**



**C**

**Abb. 18 A-C. Repräsentative Semidünnschnitte in Toluidinblaufärbung des N. ischiadicus einer Maus nach 7 Tagen ohne (A: Kontrolle, gesunder Nerv) und mit CCI (B) oder PST (C) mit TNF-AK-Behandlung.** Man sieht gegenüber der Negativkontrolle eine deutlich reduzierte Anzahl myelinisierter Fasern, zahlreiche degenerierte Fasern, eine starke Ödembildung sowie einzelne endoneurale Zellen. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen CCI und PST (Vergrößerung A-C: x400).

Die weitere histomorphologische Auswertung unter Zuhilfenahme des elektronischen Rastergitters untersuchte zusätzlich das Auftreten und die Größe eines endoneuralen Ödems, die Häufigkeit von degenerierten myelinisierten Fasern sowie von endoneuralen Zellen. Es wurden jeweils die operierten Seiten und die unoperierten Scheinseiten morphometrisch untersucht. Beide Modelle CCI und PST zeigten ein sehr ähnliches morphologisches Bild.

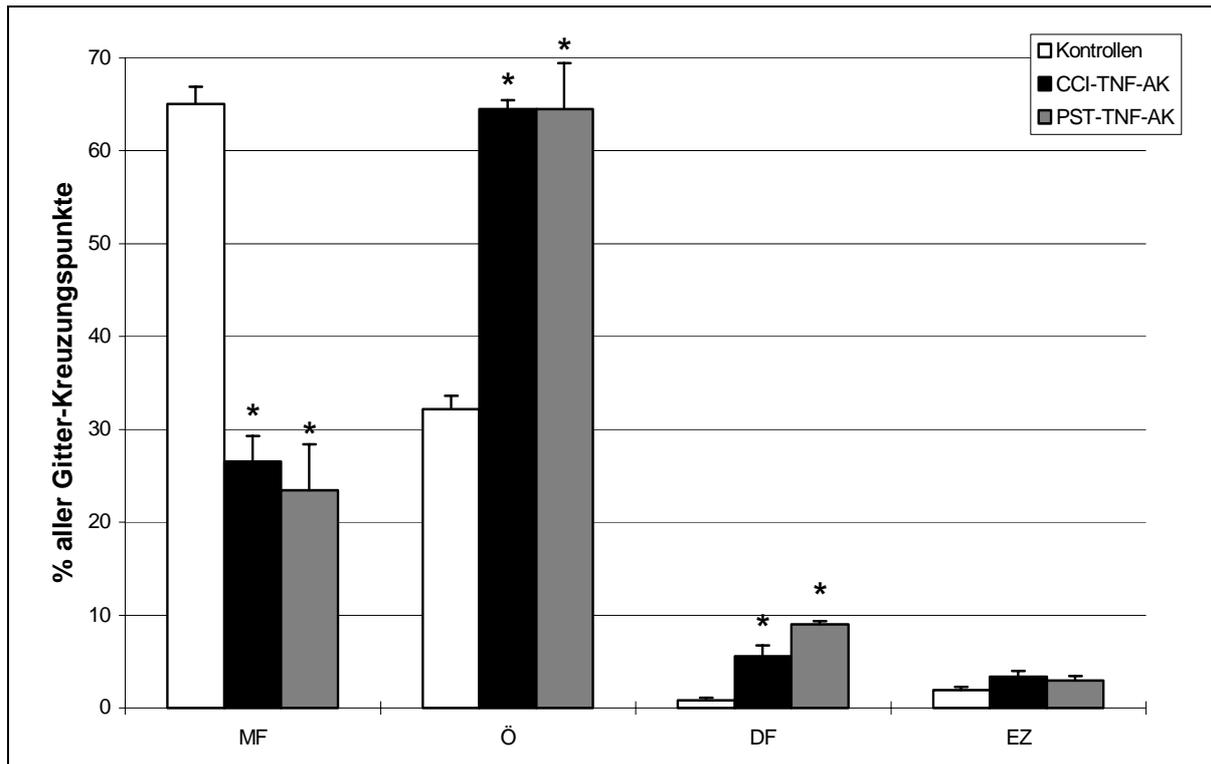
Bei den unbehandelten Kontrolltieren trafen nach 7 Tagen  $66,45 \pm 1,5\%$  der Rasterpunkte auf **myelinisierte Fasern**. Bei CCI unter TNF-AK-Behandlung war dieser Prozentsatz nach Tag 7 auf  $26,6 \pm 2,7\%$ , bei PST auf  $23,5 \pm 4,9\%$  reduziert. Die unoperierten Scheinseiten zeigten den Kontrolltieren ähnliche Werte mit  $63,3 \pm 2,85\%$  (CCI-Tiere) und  $66,9 \pm 2,2\%$  der Gitterpunkte (PST-Tiere). Dies spricht für eine Läsions-bedingte starke Abnahme dieser Strukturen.

Auf **ödematösen Raum** trafen bei den Kontrolltieren  $31,0 \pm 1,5\%$  der Rasterpunkte, bei den CCI-Tieren stieg dieser Wert auf  $64,5 \pm 1,0\%$  und bei den PST-Tieren auf  $64,5 \pm 4,9\%$  erheblich an. Die Scheinseiten zeigten mit Werten von  $33,7 \pm 2,8\%$  (CCI-Tiere) und  $30,5 \pm 2,7\%$  (PST) ebenfalls den Kontrolltieren ähnliche Ergebnisse.

Bezüglich **degenerierter Fasern** ergab sich bei den Kontrolltieren ein Wert von  $0,8 \pm 0,2\%$  der Gitterpunkte. Dieser Wert stieg bei den CCI-Tieren auf  $5,6 \pm 1,2\%$  und bei den PST-Tieren auf  $9,4 \pm 0,3\%$  an ( $p > 0,05$ ). Die Scheinseiten lagen bei  $2,1 \pm 0,1\%$  der Rastergitterpunkte für die CCI-Tiere und bei  $0,6 \pm 0,5\%$  für die PST-Tiere.

Bei den Kontrolltieren trafen  $1,8 \pm 0,2\%$  der Rastergitterpunkte auf **endoneurale Zellen**. Dieser Wert war bei den CCI-Tieren mit  $3,4 \pm 0,6\%$  im Vergleich dazu erhöht, ebenso bei den PST-Tieren mit einem Ergebnis von  $3,0 \pm 0,5\%$ . Die Scheinseiten zeigten demgegenüber den Kontrolltieren ähnliche Werte von  $2,1 \pm 0,1\%$  (CCI) und  $1,9 \pm 0,4\%$  der Gitterpunkte (PST) (*siehe Abb. 19*).

Zusammenfassend fanden sich - jeweils im Vergleich mit den Scheinseiten und den Kontrolltieren - bei *beiden* Tiermodellen eine gleichförmige Abnahme myelinisierter Fasern auf weit über die Hälfte der ursprünglichen Zahl. Die ungefähre Verdoppelung des endoneuralen Leerraumes bei beiden operierten Gruppen ließ auf starke Ödembildung schließen. Die Unterschiede zwischen CCI ( $5,6 \pm 1,2\%$ ) und PST ( $9,4 \pm 0,3\%$ ) hinsichtlich degenerierter Fasern waren statistisch nicht signifikant. Gleichförmig verhielten sich auch die Werte der endoneuralen Zellen: bei beiden Tiermodellen nahmen sie nach 7 Tagen etwa um ein Drittel zu. Somit ergibt sich nach morphologischen Kriterien *kein* Unterschied zwischen den Modellen der CCI und der PST bezüglich des Ausmaßes der Nervendegeneration.



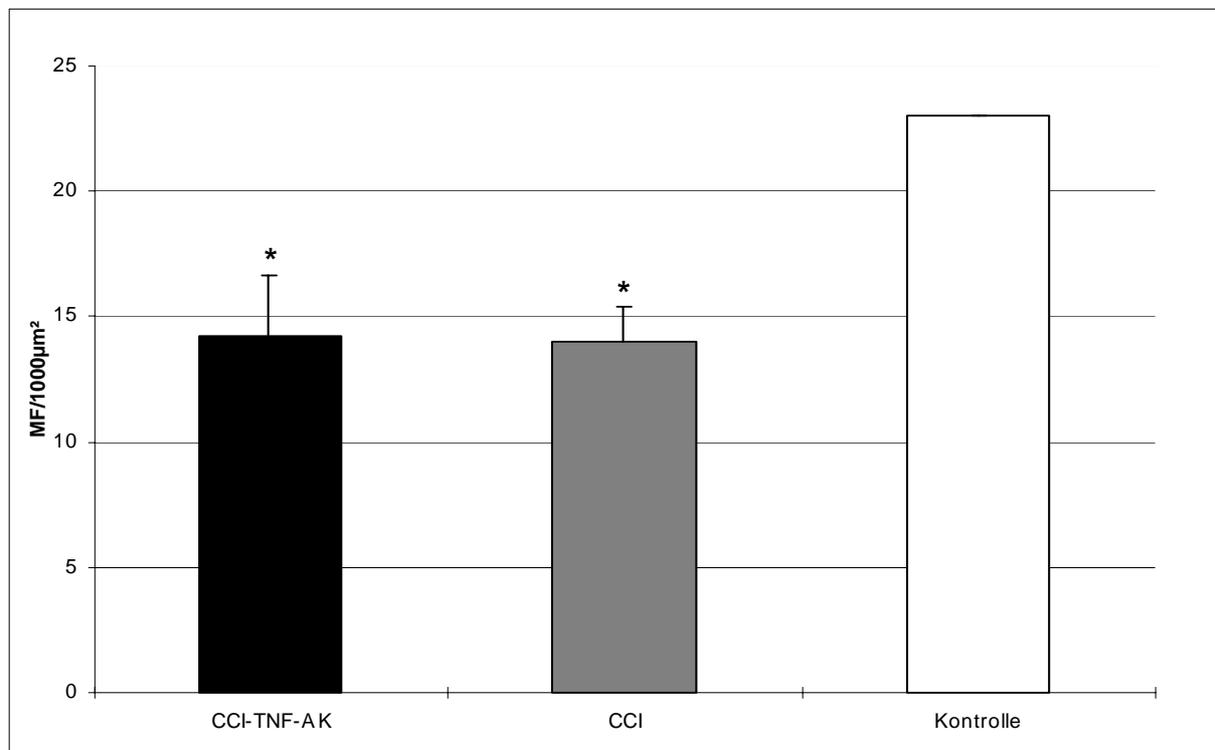
**Abb. 19. Semidünnschnittauswertung mit dem Gitterraster: Morphologie nach 7 Tagen bei Mäusen mit CCI oder PST und TNF-AK-Behandlung.** Im Vergleich zu Scheinseiten fand sich eine signifikante Abnahme von myelinisierten Fasern (MF), eine deutliche Ödementstehung (Ö) sowie eine Zunahme von degenerierten Fasern (DF) und endoneuralen Zellen (EZ). Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen CCI und PST.

### 3.2.2.2 Vergleich des Regenerationserfolgs bei CCI mit und ohne TNF-AK-Behandlung nach 45 Tagen

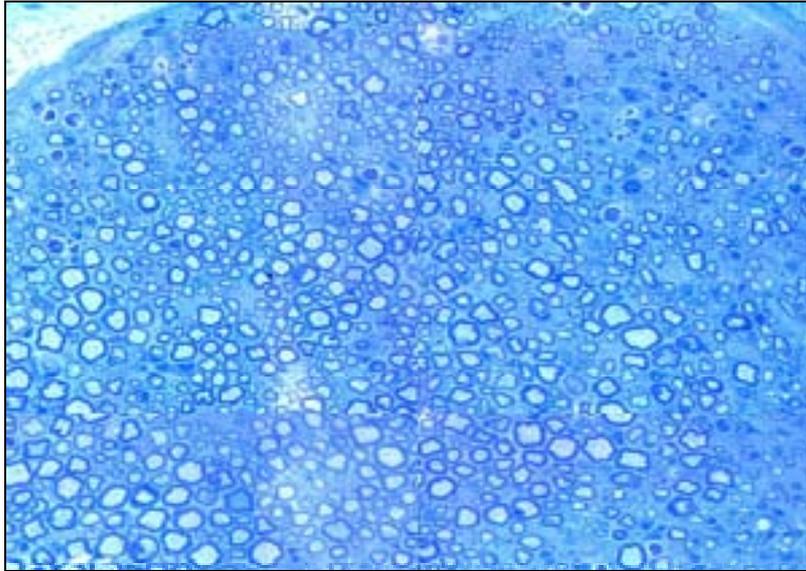
Der Versuchsaufbau dieser Langzeitstudie ist unter Punkt 3.1.2 nachzulesen. Hier sollte untersucht werden, ob die TNF-Hemmung einen (positiven oder negativen) Einfluß auf die Nervenregeneration hatte.

Die mittlere Anzahl myelinisierter Fasern der Kontrolltiere lag nach 45 Tagen bei  $23 \pm 1,3/1000 \mu\text{m}^2$ . Bei *beiden* CCI-behandelten Tiergruppen ergaben sich für die Anzahl myelinisierter Fasern nach 45 Tagen sehr ähnliche Werte. Die unbehandelten CCI-Mäuse zeigten eine Faserdichte von  $14 \pm 1,4/1000 \mu\text{m}^2$ , die unoperierten

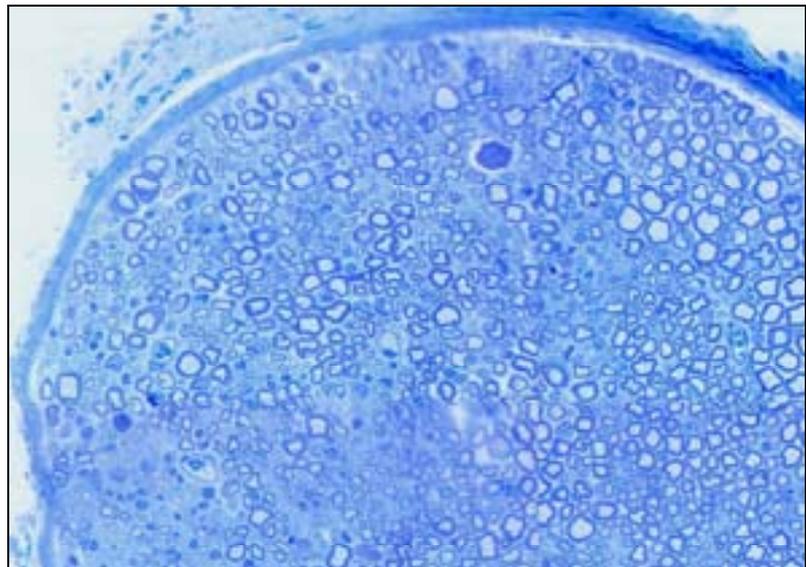
Scheinseiten dieser Tiere hatten den Kontrollen ähnliche Werte von  $20 \pm 2,9 / 1000 \mu\text{m}^2$ . Bei den perioperativ mit TNF-AK behandelten Tieren fand sich eine mittlere Faseranzahl von  $14 \pm 2,4 / 1000 \mu\text{m}^2$  auf der CCI-Seite, dazu differierend fand sich auf den Scheinseiten eine Faserdichte von  $24 \pm 1,3 / 1000 \mu\text{m}^2$ . Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Anzahl myelinisierter Fasern zwischen den scheinoperierten Seiten operierter Tiere und den Kontrolltieren. Überdies ließ sich *kein* signifikanter Unterschied zwischen den behandelten und den unbehandelten CCI-Gruppen nachweisen (*siehe Abb. 20+21*). Das legt den Schluß nahe, daß der verwendete Antikörper langfristig *keinen* positiven oder negativen Einfluß auf die Regeneration myelinisierter Nervenfasern hat.



**Abb. 20. Semidünnschnitt-Auswertung: Faserdichte nach 45 Tagen bei Mäusen mit CCI mit und ohne TNF-AK.** Es fand sich eine signifikante Reduktion der Faserdichte von CCI-Tieren an Tag 45 (\*  $p < 0,05$ ). TNF-AK erzielte keinen Effekt auf die Anzahl myelinisierter Fasern.



**A**



**B**

**Abb. 21 A+B.** Repräsentative Semidünnschnitte in Toluidinblaufärbung des **N. ischiadicus** einer Maus nach 45 Tagen mit CCI ohne (A) und mit (B) TNF-AK. Man sieht auch nach 45 Tagen noch ein deutliches Ödem und eine nur geringe Erholung der myelinisierten Fasern. Es bestand kein Unterschied in der Regeneration zwischen mit TNF-AK behandelten und unbehandelten Mäusen (Vergrößerung A+B: x400).

Bei den unoperierten und unbehandelten Kontrolltieren trafen nach 45 Tagen  $65,5 \pm 2,12\%$  der Rasterpunkte auf **myelinisierte Nervenfasern**. Bei unbehandelten CCI-Tieren war dieser Prozentsatz nach 45 Tagen auf den operierten Seiten auf  $30,5 \pm 12,0\%$ , bei den perioperativ mit TNF-AK behandelten Tieren auf  $31,0 \pm 12,0\%$

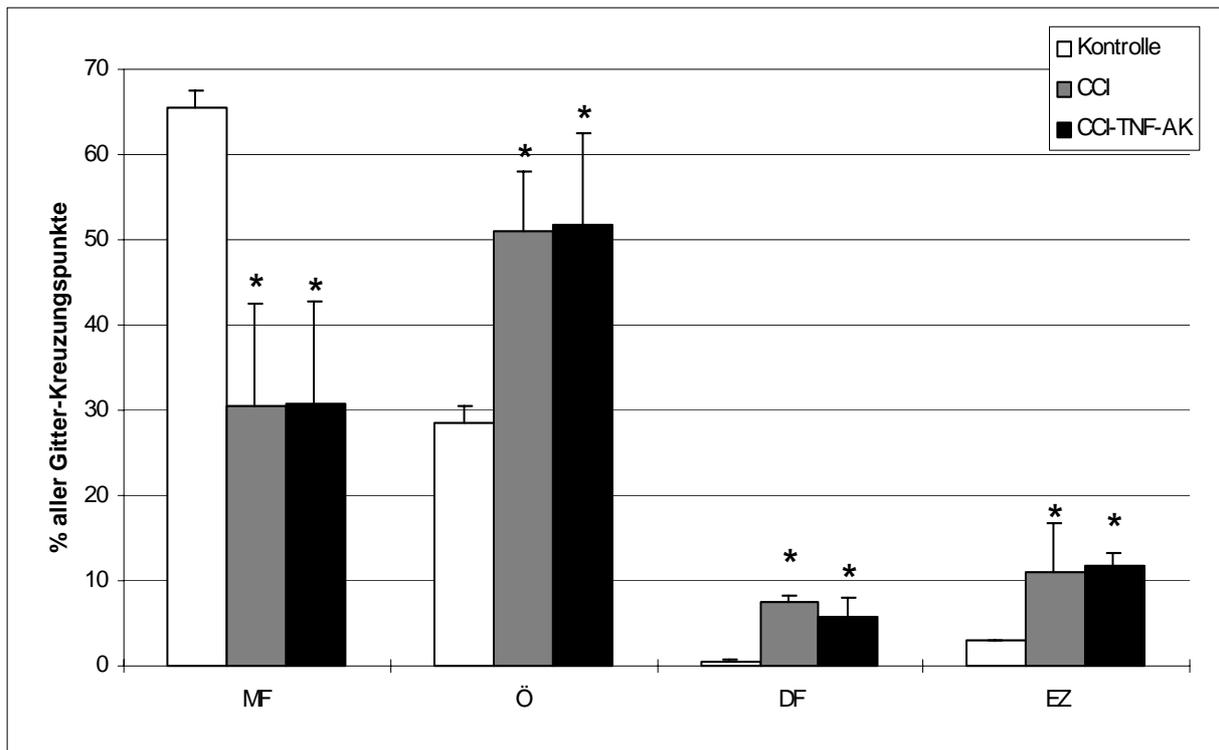
abgefallen. Im Vergleich dazu betrug der Wert der Scheinseiten  $64,0 \pm 3,5\%$  (CCI unbehandelt) sowie  $66,0 \pm 1,5\%$  der Rasterpunkte der Scheinseiten (CCI und TNF-AK).

**Ödematöser Raum** fand sich bei den Kontrolltieren in  $28,5 \pm 2,1\%$  der Gitterpunkte des übergelegten Rasters. Bei den unbehandelten CCI-Tieren war dieser Wert mit  $51,0 \pm 7,1\%$  der Gitterpunkte deutlich höher. TNF-AK-behandelte Tiere zeigten  $52,0 \pm 10,8\%$ . Im Vergleich dazu betrug der Wert der Scheinseiten  $29,7 \pm 3,1\%$  (CCI unbehandelt) sowie  $31,0 \pm 1,5\%$  der Rasterpunkte der Scheinseiten (CCI mit TNF-AK) und war somit den Kontrolltieren sehr ähnlich.

Die Werte der Kontrollnerven hinsichtlich **degenerierter Fasern** betragen nach 45 Tagen  $0,6 \pm 0,1\%$ . Im Vergleich dazu wesentlich höher lagen die Zahlen der operierten Tiere: bei den unbehandelten CCI-Tieren trafen  $7,5 \pm 0,7\%$  der Rasterpunkte auf degenerierte Fasern, ähnlich dazu die TNF-AK-behandelten Tiere mit  $6,0 \pm 2,4\%$  der Rasterpunkte. Die Scheinseiten zeigten wiederum den Kontrolltieren ähnliche Werte mit  $2,9 \pm 2,8\%$  (CCI unbehandelt) und  $1,0 \pm 0,2\%$  (CCI mit TNF-AK) aller Gitterpunkte.

**Endoneurale Zellen** fanden sich bei den Kontrolltieren nach 45 Tagen in  $3 \pm 0\%$  aller Kreuzungspunkte des Rasters. Mit  $11,0 \pm 5,7\%$  deutlich höher waren bezüglich endoneuraler Zellen die Ergebnisse der unbehandelten CCI-Tiere. Ähnlich dazu mit  $12,0 \pm 1,5\%$  aller Rasterkreuzungspunkte lagen die TNF-AK-behandelten Tiere nach 45 Tagen. Die Ergebnisse der Scheinseiten waren auch hier konform zu den Kontrollwerten:  $4,0 \pm 1,0\%$  bei den unbehandelten CCI-Tieren und  $2,0 \pm 1,1\%$  der Gitterpunkte bei den TNF-AK-behandelten Tieren (*siehe Abb. 22*).

Die genaue morphometrische Untersuchung nach 45 Tagen bestätigte somit, daß der verabreichte AK im Modell der CCI *keine* regenerationsfördernde oder -hemmende Funktion besitzt. Aufgrund des fehlenden Effekts bei CCI wurde der Langzeitversuch nicht mit dem Modell der PST wiederholt.



**Abb. 22. Semidünnschnittauswertung: Morphologie bei Mäusen mit CCI mit und ohne TNF-AK nach 45 Tagen.** Es fanden sich signifikante Unterschiede der CCI-Seiten zu den Kontrollen bei myelinisierten Fasern (MF), Ödem (Ö), degenerierten Fasern (DF), und endoneuralen Zellen (EZ) (\*  $p < 0,05$ ). Keine signifikanten Unterschiede zeigten sich zwischen behandelten und unbehandelten CCI-Gruppen.

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß neben dem Modell der CCI auch die PST auf die Maus übertragbar ist. Beide Modelle führten reproduzierbar zu einer schmerzhaften Mononeuropathie, was mit Methoden der Verhaltenstestung sowie mit morphologischen und morphometrischen Methoden nachweisbar war. CCI und PST führten zu einem vergleichbaren Ausmaß der Nervendegeneration. Durch perioperative, also prophylaktische Verabreichung von AK gegen TNF konnten sowohl bei CCI als auch bei PST die Symptome der Mononeuropathie, Hitzehyperalgesie und taktilen Allodynie, reduziert werden. Durch postoperative Gabe an Tag 4 konnte bei beiden Modellen nur die Hitzehyperalgesie reduziert werden. Die Gabe von TNF-AK hatte jedoch keinen morphometrisch meßbaren Einfluß auf die Nervenregeneration bei CCI (Lindenlaub et al. 2000, Sommer et al. 2001).

### 4.2 Methodik der Tierhaltung und Verhaltenstests

Wichtig für die Durchführung von Verhaltenstests bei Versuchstieren ist die Einhaltung standardisierter Bedingungen, um die Variation der die Meßergebnisse beeinflussenden Faktoren möglichst gering zu halten. Die Verhaltenstests wurden durchweg in einem schematisierten Verfahren von derselben Person durchgeführt, so daß störende Einflüsse seitens der testenden Person so gering wie möglich gehalten werden konnten (Chaplan et al. 1994).

Die für die Arbeit verwendeten Tiere waren weibliche Mäuse der Gattung C57BL/6, die ausnahmslos vom gleichen Züchter bezogen wurden. Grund hierfür war das

Bestreben, Beeinflussungen der Resultate durch unterschiedlich gezüchtete und unter ungleichen Lebensbedingungen aufgezogene Mäuse auszuschließen. Grundsätzlich wurde den Tieren eine Eingewöhnungsphase an die neue Umgebung von etwa 2-3 Wochen gewährt, bevor mit dem Testverfahren begonnen wurde. Von der Gewichtsnorm stark abweichende, also deutlich unter- oder übergewichtige Tiere wurden aus den Verhaltenstests von vornherein ausgeschlossen. Die für die Untersuchungen ausgewählten Tiere zeigten unabhängig von ihrer Behandlung keine Anzeichen von Stress oder Schwäche, außerdem ergaben regelmäßig durchgeführte prä- und postoperative Gewichtskontrollen konstante Verhältnisse bei allen für die Studie selektierten Tieren.

Die Verhaltenstests wurden regelmäßig an den 2 Tagen vor dem operativen Eingriff begonnen, um die Mäuse an die Apparatur und das Testverfahren zu gewöhnen. Nach Operation der Mäuse wurde eine Pause von 2 Tagen eingehalten, um am 3. postoperativen Tag mit der Durchführung der Verhaltenstests zu beginnen. Auf einen chronologisch gleichbleibenden Ablauf der einzelnen Testdurchgänge wurde geachtet, im Hinblick auf tageszeitlich bedingte unterschiedliche Wachheitszustände und damit Reaktionsweisen der Tiere. Im Laufe der Testphase eines Vormittages war eine geringfügig wachsende Trägheit der Tiere in ihren Reaktionen festzustellen. Außerdem mehrten sich mit voranschreitender Zeit die Phasen, in denen die Mäuse abwesend bis schläfrig wirkten. Auf der anderen Seite zeigten sich manche Tiere phasenweise sehr unruhig in ihrem Verhalten: häufiges Putzverhalten, Defäkation oder Miktion, Auf-die-Hinterbeine-Stellen oder unruhiges Hin-und-her-Laufen in den Plexiglaswürfeln waren die am häufigsten beobachteten Verhaltensmuster. Dies führte zum Teil zu deutlich verlängerten Reaktionszeiten der Mäuse auf die gesetzten Reize. Diese Störfaktoren erschwerten zuweilen die Messungen und haben rückblickend auch sicherlich zu einigen unrepräsentativen Einzelwerten geführt. Gewertet wurde eine Messung lediglich dann, wenn die Maus *ruhig*, aber trotzdem *wach* und *gespannt* im Plexiglaswürfel saß.

Bereits in zahlreichen früheren Studien ist die Reaktion von Versuchstieren auf Hitzereize als Parameter für den Nachweis von neuropathischen Schmerzen angewendet worden (Bennett und Xie 1988, Mao et al. 1992, Yamamoto und Yaksh 1992). Seltzer konnte bereits zeigen, daß der N. ischiadicus 85 % der Hinterpfote

und hier insbesondere die mittlere plantare Fläche sensibel innerviert (Seltzer et al. 1987). Es war deshalb von besonderer Wichtigkeit, die mobile Wärmequelle mit besonderer Sorgfalt unter der mittleren plantaren Fläche der Hinterpfote zu plazieren. Hierbei ergaben sich jedoch ab und zu Schwierigkeiten, da aufgrund der jeweiligen Stellung und damit der veränderten Auflagefläche der Pfote zum Zeitpunkt der Messung nicht immer eine optimale Reizlokalisierung erzielt werden konnte.

Bei der Verwendung der von Frey-Haare zur taktilen Stimulation wurde sorgsam darauf geachtet, die mittlere plantare Fläche der Hinterpfote und nicht die minder sensitiven Zehen- oder Fersenareale zu reizen. Die Erfahrung in dieser Arbeit und auch in den vorhergehenden Arbeiten (Sommer und Marziniak 1996, Sommer et al. 1997, Sommer und Schäfers 1998) hatte gelehrt, daß das schnelle Wegziehen der Pfote als Reaktion auf einen taktilen Reiz derjenigen auf objektiv schmerzhaft Reize, wie zum Beispiel Reizung durch thermische Stimulation, entsprach. Das bedeutete, daß ein ursprünglich unschädlicher Stimulus nun ein unangenehmes, schmerzhaftes Empfinden hervorrief, wodurch das Vorliegen einer taktilen Allodynie definitionsgemäß nachgewiesen wurde.

Die Verhaltenstestung mittels thermischer und mechanischer Stimulation erfüllen die Forderungen zur Schmerzdiskrimination nach Dubner (1994):

- Durch variierbare thermische und mechanische Reizung läßt sich die Grenze zwischen schmerzhaftem und nicht-schmerzhaftem Reiz ermitteln
- Veränderungen dieser Grenzen durch pharmakologische Beeinflussung sind erkennbar
- Die Stimulationen sind so durchzuführen, daß sie keine Sensibilisierung oder gar Gewebeschädigung an der entsprechenden Stelle hervorrufen

Trotz der steten Bemühungen um Objektivität der Verhaltenstests darf jedoch keinesfalls vergessen werden, daß weder Testobjekt noch Untersucher automatisierte und unfehlbare Maschinen sind, sondern als Lebewesen Tagesformen

und Stimmungen unterliegen, die sicher für die Kernaussage der Arbeit nicht gravierend, dennoch in Einzelfällen als Fehlerquelle nicht zu unterschätzen sind.

### **4.3 Methodik der Histologie**

#### 4.3.1 Methodik der immunhistochemischen Zytokinbestimmung

Die immunhistochemische Färbung wurde in der vorliegenden Arbeit angewendet, um nach Gewebeentnahme den endoneuralen Gehalt von IL-1 $\beta$  und TNF zu quantifizieren. Zusätzlich konnte die Menge an Makrophagen bestimmt werden.

Grundsätzlich ist die Immunhistochemie ein Verfahren, welches auf dem folgenden Prinzip beruht: ein AK verbindet sich mit dem dazu passenden Antigen; dieser Vorgang kann schließlich mittels einer Farbreaktion lokalisiert und so die gesuchte Substanz in Zellen und Geweben aufgrund ihrer mehr oder weniger intensiven Anfärbung quantifiziert werden. Probleme der Färbetechnik mit dem Resultat ungenauer morphometrischer Auswertung können sich bei ungenügender Reinheit sowohl des primären als auch des sekundären AK ergeben. Kreuzreaktionen der AK gegen TNF und IL-1 $\beta$  mit anderen Zellbestandteilen konnten mittels vorheriger Durchführung von Absorptionskontrollen mit dem jeweiligen rekombinanten Zytokin ausgeschlossen werden. Die Färbetechnik selbst wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt, um systematische Fehler zu vermeiden.

Die Auswertung der histologisch aufgearbeiteten Nerven erfolgte durch ein computerunterstütztes System. Die in gleich großen Fragmenten digitalisierten Bilder konnten unter Zuhilfenahme eines speziell für diesen Zweck vorgesehenen Computerprogramms bearbeitet und ausgewertet werden. Dieses Programm ermöglichte die flächenbezogene Berechnung der durch den AK angefärbten Areale. Voraussetzung waren die Verwendung möglichst gleichmäßig und korrekt angefärbter Präparate. Ungleichmäßigkeiten der Färbungen einer AK-Reihe konnte man durch Nachbearbeiten der digitalisierten Bilder mittels einer Helligkeits- und Kontrasteinstellung weitgehend ausgleichen. Dadurch hatte man die Gewähr eines relativ konstanten Referenzwertes, um darauf aufbauend die durch den AK

angefärbte Fläche zu bestimmen. Doch gerade in der Einstellung de Referenzwertes lag eine Fehlerquelle dieser Auswertungsmethode: kein Präparat war in seiner Farbtintensität und allgemeinen Qualität dem anderen vollkommen identisch. Deshalb konnten die Referenzwert-Einstellungen am Computer nicht allen Präparaten mit den stärker und weniger stark gefärbten Arealen entsprechen. Das bedeutet, daß kleinere, indifferent angefarbte Flächen entweder gerade noch oder bereits nicht mehr als AK-besetzte Fläche markiert wurden und somit leichte Ungenauigkeiten auftreten konnten.

Es ist unklar, inwieweit sich intrazellulär vorhandene Zytokine immunhistochemisch anfärben. Es ist davon auszugehen, daß sich der membrangebundene Anteil von TNF durch AK leichter darstellen läßt als der in Vesikeln oder Organellen liegende. Das könnte bedeuten, daß der tatsächliche Gehalt dieses Zytokins mit der verwendeten Methode unterschätzt wurde. Allerdings zeigte eine frühere Studie zur Zytokinbestimmung, daß die Werte von TNF im Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) proportional sind zu denen, die durch Immunhistochemie und Morphometrie bestimmt wurden (George et al. 1999).

#### 4.3.2 Methodik der Histomorphologie und -metrie an Semidünnschnitten

Die morphometrische Auswertung der toluidinblaugefärbten Semidünnschnitte erfolgte mit zwei verschiedenen Methoden. Zum einen wurden zur Bestimmung der Nervenfaserdichte die myelinisierten Fasern der Präparate in als repräsentativ betrachteten Arealen, welche etwa 20% der gesamten endoneuralen Fläche ausmachten, ausgezählt und ins Verhältnis zur Gesamtfläche gesetzt. Dieses Verfahren war problemlos durchzuführen, da die Markscheiden sich in der Toluidinblaufärbung besonders intensiv dargestellt haben und diese daher auch von den übrigen Strukturen gut unterschieden werden konnten. Zum anderen wurde in einer weiteren Untersuchung das gesamte Präparat mittels eines über die Aufnahme projizierten digitalen Rastergitters bezüglich myelinisierter Nervenfasern, degenerierter Fasern, Ödem und endoneuraler Zellen ausgezählt. Die endoneuralen Zellen waren hierbei nicht immer eindeutig bestimmbar, da zuweilen eine

Verwechslungsgefahr mit färbebedingten Artefakten im Präparat bestand. Dennoch ermöglichte die Auswertung mit der Rastereinblendung eine gleichmäßige stichprobenartige Analyse über die *gesamte* Nervenfläche, ohne daß bestimmte Areale ausgeklammert werden mußten.

#### **4.4 Hitzehyperalgesie und taktile Allodynie und deren Beeinflussung durch neutralisierende AK gegen TNF bei CCI**

Die Verhaltensdaten zeigten eine Hitzehyperalgesie und eine taktile Allodynie bei CCI ab Tag 3 nach der Operation. Die Hitzehyperalgesie war bis Tag 37 nachweisbar und nahm zum 45. Tag hin deutlich ab, die taktile Allodynie zeigte einen dazu konformen Verlauf (Lindenlaub et al. 2000). Diese Werte sind vergleichbar mit früheren Untersuchungen.

An Ratten mit CCI konnte Hitzehyperalgesie vom 2. bis zum 60. Tag beobachtet werden (Bennett und Xie 1988). Ratten mit einer CCI, die mit von Frey-Haaren getestet wurden, reagierten mit einer taktilen Allodynie an den postoperativen Tagen 2 bis 11 (Ren et al. 1995). Sommer und Schäfers zeigten 1998 bei CCI-Mäusen eine bereits in der ersten postoperativen Woche beginnende Hitzehyperalgesie und eine nach etwa 10 Tagen nachweisbare taktile Allodynie, letztere bildete sich erst nach der 5. postoperativen Woche zurück. Die Unterschiede im Zeitverlauf der taktilen Allodynie und Hitzehyperalgesie bei CCI-bedingter Mononeuropathie können eine Ursache in der Variabilität der Durchführung der CCI-Methode in den verschiedenen Laboren haben. Hier wären unter anderem Operationstechnik, Festigkeit der Ligaturen sowie verwendetes Nahtmaterial zu nennen. Natürlich spielen auch die Art und Durchführung der Verhaltensuntersuchung eine große Rolle.

Perioperative, also präventive Verabreichung von TNF-AK konnte sowohl die Hitzehyperalgesie als auch die taktile Allodynie bei CCI signifikant reduzieren. Obwohl der AK nur einmalig verabreicht wurde, hielt die Wirkung etwa bis zum 15. postoperativen Tag an. Eine mögliche Erklärung für diese lange andauernde Wirkung könnte sein, daß durch die AK die frühe Hochregulation von TNF im Nerven bereits

12 Stunden nach CCI gehemmt wird (George et al. 1999). Hierdurch könnten weitere Folgen der TNF-Hochregulation wie die vermehrte Synthese von IL-1 $\beta$ , IL-6 und eventuell auch NGF reduziert oder sogar verhindert werden

Auch nach Gabe von AK an Tag 4 postoperativ, wenn eine Hitzehyperalgesie schon bestand, konnte an den Tagen 5-13 eine signifikante Reduktion des Schmerz-assoziierten Verhaltens auf Hitzereize festgestellt werden. Bei diesem Test unterschied sich die perioperative in ihrer Wirkung nicht von der postoperativen Gabe des AK. TNF-AK war also bezüglich Hitzehyperalgesie auch therapeutisch wirksam. Warum die TNF-Hemmung auch an Tag 4 wirksam ist, obwohl das Maximum von TNF im Nerven bereits 12 Stunden nach CCI vorliegt, könnte durch die Dynamik der TNF-Rezeptoren erklärt werden: die Wirkung von TNF wird im wesentlichen durch zwei Rezeptoren vermittelt: TNFR1 und TNFR2 (Tartaglia und Goeddel 1992). Wenngleich ein Großteil der Auswirkungen von TNF auf den neuropathischen Schmerz durch lösliches TNF und den TNFR1 bewerkstelligt wird, wurde postuliert, daß gerade zum Zeitpunkt der Induktion des Nervenläsions-bedingten Schmerzes auch der insbesondere durch membrangebundenes TNF stimulierte TNFR2 eine nicht zu unterschätzende Rolle spielt. Diese Vermutung konnte jedoch noch nicht bestätigt werden (Sommer et al. 1998 a). Sicher scheint jedoch die Tatsache, daß die Wirkungskaskade von TNF bezüglich des neuropathischen Schmerzes durchaus komplizierter ist als bisher angenommen, so daß im Rahmen der Hitzehyperalgesie auch eine therapeutische Gabe von AK gegen TNF wirksam ist.

Im Gegensatz zur Hitzehyperalgesie ließ sich die taktile Allodynie bei CCI nur durch prophylaktische, nicht aber durch therapeutische, also postoperative Gabe von AK gegen TNF reduzieren. Dies spricht dafür, daß die verschiedenen Symptome des neuropathischen Schmerzes durch verschiedene Mechanismen verursacht werden. Im Falle der Hitzehyperalgesie scheint insbesondere TNF eine wichtige Rolle zu spielen, wohingegen für die mechanische Allodynie offensichtlich andere Mediatoren von größerer Bedeutung sind. Hier treten jedoch Diskrepanzen zu den Aussagen anderer Studien auf: epineurale Injektion von TNF verursachte bei Mäusen und Ratten eine taktile Allodynie auf von Frey-Haare, bezüglich Hitzehyperalgesie fiel diese Reaktion deutlich geringer aus (Sorkin und Doom 2000, Schäfers und Sommer, unveröffentlicht).

#### 4.5 Vergleich zwischen dem CCI- und dem PST-Modell

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die PST ein der CCI vergleichbares Schmerzverhalten mit Hitzehyperalgesie und taktiler Allodynie an C57BL/6-Mäusen hervorruft. Die präventive und die therapeutische Applikation von neutralisierenden AK gegen TNF führte zu einer Reduktion der Hitzehyperalgesie, die taktile Allodynie wurde nur durch eine prophylaktische Verabreichung gemindert (Sommer et al. 2001). Untersucht werden sollte die Frage, ob und inwieweit die PST-Methode beim Schmerz-assoziierten Verhalten Gemeinsamkeiten zur CCI-Methode hat. Das ist deshalb von besonderer Wichtigkeit, da sich die beiden Methoden in einem wesentlichen Detail unterscheiden: bei der CCI verbleibt ein Fremdkörper in Form von drei losen Ligaturen am Nerven, bei der PST befindet sich dort kein Fremdkörper. Die Einbringung eines Fremdkörpers führt zu einer epineuralen Entzündungsreaktion, die dadurch zu einer Unschärfe zwischen neuropathischem und entzündungsbedingtem Schmerz führen könnte. Insofern ist die PST mit reiner Wallerscher Degeneration eine pure Nervenläsion, die diesen Störfaktor ausschließt.

Die ermittelten Verhaltensdaten zeigten keinen Unterschied zwischen PST und CCI. Sowohl bezüglich des Ausmaßes als auch bezüglich des Zeitverlaufes Neuropathie-assoziierten Schmerzverhaltens glichen sich die Ergebnisse beider Modelle. Hieraus kann geschlossen werden, daß die bei CCI auftretende epineurale Entzündung keinen wesentlichen Einfluß auf das Schmerz-assoziierte Verhalten der Mäuse hatte (Sommer et al. 2001). Dieses Ergebnis stützt das Resultat einer Studie, bei der Ratten mit CCI und PST in ihrem Schmerzverhalten verglichen wurden. Dort war, wie auch in der vorliegenden Arbeit, eine Ähnlichkeit im Schmerzverhalten beider Gruppen beobachtet worden. Eine Abnahme der Schmerzüberempfindlichkeit wurde hier nach etwa 40-60 postoperativen Tagen registriert (Lindenlaub und Sommer 2000 a).

Die Wirkung von TNF-AK bei PST war vergleichbar derer bei CCI. Bei prophylaktischer Verabreichung des AK konnte wie bei CCI eine Reduktion von

Hitzehyperalgesie und taktiler Allodynie festgestellt werden. Die therapeutische Applikation von TNF-AK bei PST zeigte, ebenso wie auch im CCI-Modell einen deutlichen Effekt auf die Hitzehyperalgesie, nicht jedoch - und auch hier besteht eine Analogie zum CCI-Modell - auf die taktile Allodynie. Dies spricht dafür, daß der Mechanismus zur Genese neuropathischen Schmerzes bei beiden Modellen ähnlich ist. Der Einfluß einer neben der Wallerschen Degeneration bestehenden epineuralen Entzündung, wie es beim CCI-Modell der Fall ist, spielt offensichtlich bezogen auf das Schmerz-assoziierte Verhalten nur eine sehr untergeordnete Rolle.

## **4.6 Histologie**

### 4.6.1 Immunhistochemie

Erwartungsgemäß war die Makrophagendichte bei allen CCI-Tieren an Tag 7 postoperativ deutlich erhöht. Ebenso war bei allen CCI-Tieren der endoneurale Gehalt an TNF und IL-1 $\beta$  erhöht. Allerdings zeigte sich kein Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. In Anlehnung an ähnliche Studien zu diesem Thema hätte bei mit TNF-AK behandelten Mäusen eine gegenüber den unbehandelten Mäusen signifikante Reduktion der Immunreaktivität für TNF und IL-1 $\beta$  erwartet werden können (Sommer et al. 1998 b), was die Ergebnisse der Verhaltensdaten immunhistochemisch untermauert hätte.

Dieser Effekt konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es findet sich keinerlei Minderung des TNF-Spiegels bei mit TNF-AK behandelten Tieren im Vergleich mit den anderen Tiergruppen, somit gibt es hier kein immunhistochemisches Korrelat zur offensichtlich verminderten Hitzehyperalgesie, die sich im Verhaltenstest gezeigt hat. Ähnlich wie mit TNF verhält es sich mit dem immunhistochemischen Nachweis von IL-1 $\beta$ , nur auf einem insgesamt niedrigeren Niveau. Die CCI-behandelten Tiergruppen haben allesamt ähnliche Werte, die keine signifikanten Unterschiede der behandelten Tiergruppen untereinander erkennen

lassen. Ein möglicher Grund für die geringe immunhistochemische Aktivität von TNF auch bei den Mäusen, die nicht zusätzlich mit TNF-AK behandelt wurden, könnte der Zeitpunkt der Gewebeentnahme sein. Eventuell ist am Tag der Gewebeentnahme der Höhepunkt der TNF-Produktion bereits überschritten worden. Darüber hinaus ist der AK in der vorliegenden Arbeit einmalig verabreicht worden, in vergleichbaren Untersuchungen wurde der Inhibitor mehrfach appliziert, was die Wirkung auf die Zytokinexpression im Gewebe möglicherweise verstärkte.

#### 4.6.2 Semidünnschnitte

Die morphometrische Auswertung sollte die Fragen beantworten, ob TNF die De- und Regeneration beeinflusst und ob sich CCI und PST bezüglich der Degeneration unterscheiden.

Nach 7 Tagen zeigten sich bei allen CCI-Tieren erwartungsgemäß deutliche degenerative Merkmale wie eine starke Minderung der Anzahl an myelinisierten Fasern, eine Zunahme degenerierter Nervenfasern und eine ödembedingte Verdoppelung des endoneuralen Leerraumes. Nach 45 Tagen waren Regenerationstendenzen erkennbar. Dieses Ergebnis unterschied sich *nicht* von den TNF-AK-behandelten Tieren. Somit hatte bei CCI-bedingter Neuropathie das Zytokin TNF in der vorliegenden Arbeit keinen Einfluß auf die Regeneration von Nervenfasern (Lindenlaub et al. 2000). Aufgrund der Tatsache, das TNF und IL-1 einen synergistischen Effekt auf die verstärkte Bildung des NGF haben, indem sie die Schwann-Zellen des beschädigten Nerven zur Produktion dieser Substanz stimulieren (Hattori et al. 1994, Yoshida und Gage 1992), hätte eine TNF-bedingte Förderung der Regeneration myelinisierter Fasern erwartet werden können. Frühere Untersuchungen stützen diese Vermutung. Hier konnte gezeigt werden, daß eine Vorbehandlung mit TNF einen regenerativen Effekt auf beschädigte Motoneurone hatte (Chen et al. 1996). Die Wirkungen von TNF sind allerdings variabel und nicht zuletzt auch abhängig vom Wirkungsort. So wurde festgestellt, daß TNF das Wachstum der als Kultur angelegten Hinterhornzellen des Rückenmarkes hemmt. Postuliert wurde der Mechanismus einer durch TNF verursachten Hemmung eines

Myelin-assoziierten Glykoproteins (Schneider-Schaulies et al. 1991). Zu nennen ist auch der möglicherweise fördernde Effekt von TNF auf die Neurombildung im beschädigten Nerven und daher die Hemmung funktionaler Regeneration von Nervenfasern durch die Aktivierung einer Mitogen-aktivierten Proteinkinase (Liefner et al. 1998, Lu et al. 1997).

Die Modelle CCI und PST zeigten in der morphometrischen Auswertung am 7. postoperativen Tag keine signifikanten Unterschiede. Beide AK-behandelten Tiergruppen folgten einem ähnlichen degenerativen Verlauf, wie er bereits oben beschrieben wurde. Es bestehen folglich keine gravierenden Unterschiede im Verlauf der Degeneration bei CCI- und PST-bedingter Neuropathie (Sommer et al. 2001). Lediglich die Anzahl degenerierter Nervenfasern war bei der PST (9% der Gesamtfläche) größer als bei der CCI (6% der Gesamtfläche), allerdings ohne statistische Signifikanz. Eine mögliche Erklärung hierfür liegt in der Methode der PST selbst, bei der ja ein Stück des Neuriten durchtrennt wurde und somit ein größerer zellulärer Schaden entstand, der sich folglich in einer deutlich angestiegenen Zahl degenerierter Fasern äußerte. Im Gegensatz dazu führte die CCI lediglich zu einer Nervenkompression und einem nach 7 Tagen entsprechend geringeren Faseruntergang. Angesichts der Ähnlichkeiten zwischen CCI und PST bezüglich Degeneration kann ein vergleichbares Ergebnis auch bezüglich der Regeneration an Mäusen mit PST postuliert werden. Die histopathologischen Untersuchungen einer Studie an Ratten mit einer PST haben dies bereits anschaulich dargestellt: hier zeigte sich eine Rückbildung des Neuropathie-assoziierten Schmerzverhaltens nach etwa 40-60 Tagen postoperativ.

Zusammenfassend ergab die morphometrische Untersuchung, daß der TNF-AK in der hier angewendeten Dosis weder die De- noch die Regeneration, soweit morphometrisch gemessen, beeinflußt hat, obwohl der AK das Schmerz-assoziierte Verhalten reduzierte. Der Effekt des TNF-AK auf das Verhalten ist somit unabhängig von De- und Regenerationsvorgängen des Nerven. Der morphometrische Vergleich beider Läsionsmodelle CCI und PST weist eine direkte Analogie zu den ermittelten Verhaltensdaten auf, bei denen ebenfalls keine signifikanten Differenzen zwischen beiden Modellen erkennbar waren.

## 4.7 Zytokinhemmung zur Schmerzbehandlung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Hemmung von TNF durch neutralisierende Antikörper bei neuropathischem Schmerzverhalten ein vermindertes Schmerz-assoziiertes Verhalten bewirkte. Dies setzt voraus, daß nach Läsion eines peripheren Nerven ein Anstieg von TNF erfolgt. In der Tat steigt die Gen-Expression an Tag 7 postoperativ für die Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-10 und an Tag 14 für TNF im N. ischiadicus nach CCI deutlich an (Okamoto et al. 2001). Auch bereits sehr viel früher, nämlich im 1. Maximum bereits 6 Stunden und im 2. Maximum 5 Tage nach CCI sind erhöhte TNF-Spiegel nachgewiesen worden (Shubayev et al. 2000). Andere fanden ein Maximum der TNF-Produktion mittels ELISA 12 Stunden nach CCI (George et al. 1999). Insgesamt sind die Ergebnisse hier recht uneinheitlich: es wurden Anstiege von mRNAs 3 Stunden bis zu 2 Wochen nach Anwendung verschiedener Läsionsmodellen gemessen (Bizette et al. 1996; Taskinen et al. 2000). Ort dieser Zytokinexpression waren im wesentlichen Schwann-Zellen, Makrophagen sowie gelegentlich Fibroblasten (Bergsteinsdottir et al. 1991; Griffin et al. 1993; Murwani et al. 1998; Stoll et al. 1993).

Ein weiteres Beispiel für die Beeinflussung neuropathischer Schmerzen durch Hemmung von TNF ist die Behandlung mit dem kürzlich entwickelten TNF-Rezeptor-Fusionsprotein Etanercept: auch hier wirkte die Substanz noch bei verspäteter Gabe mit Verminderung der Hyperalgesie (Sommer et al. 2001). Derartige zugelassene Pharmaka, die die TNF-Bioaktivität reduzieren, zu denen neben Etanercept auch Infliximab gehört, sind allerdings noch nicht auf Wirksamkeit bei neuropathischen Schmerzen beim Menschen untersucht worden.

#### 4.8 Wirkungsweise von TNF in der Verursachung von Schmerz

Der Weg, über den TNF und andere Zytokine Schmerz verursachen, ist nicht eindeutig geklärt. Für TNF wie auch für IL-1 $\beta$  ist eine direkte Wirkung auf afferente Neuronen nachgewiesen worden. Die i.pl. Verabreichung von TNF bei der Ratte führte dosisabhängig zu einer mechanischen Allodynie (Cunha et al. 1992), topische Verabreichung von TNF auf den N. ischiadicus bewirkte in bestimmten Dosen nach 1-3 Minuten eine Zunahme der Entladungsfrequenz von C- und geringer auch von A-Fasern (Sorkin et al. 1997). Die s.c. Gabe von TNF führte zu einer Herabsetzung von mechanischen Schwellen (Junger et al. 2000), TNF in sehr geringen Dosen von 0,9-7,7 ng epineural appliziert bewirkte im Verhaltenstest eine taktile Allodynie, in geringerem Maße eine Hitzehyperalgesie (Sorkin et al. 2000). Intrapertoneale (i.p.) Injektion von TNF bei Ratten (Watkins et al. 1995), als auch die i.c.v. Verabreichung dieser Substanz (Oka et al. 1996) verursachte Hitzehyperalgesie. Direkte intraneurale Injektion von TNF in den N. ischiadicus der Ratte rief dosisabhängig Neuropathie-typisches Schmerzverhalten mit Hitzehyperalgesie und taktiler Allodynie hervor (Wagner und Myers 1996).

Die direkte Wirkung auf Axone kann im Falle des TNF auch ohne Rezeptorvermittlung stattfinden. Abhängig vom pH des umgebenden Milieus kann sich das trimere TNF-Molekül in biologischen Membranen einbauen und dort als Ionenkanal fungieren (Kagan et al. 1992; Baldwin et al. 1996). Dieses Ergebnis stützten Untersuchungen, bei denen wenige Minuten nach topischer Applikation von TNF auf den N. ischiadicus der Ratte in vivo eine erhöhte Aktivität afferenter Neurone, insbesondere C-Fasern, festgestellt wurde (Sorkin et al. 1997). Allerdings konnte die Bildung dieser TNF-Ionenkanäle am Axon in vivo noch nicht bewiesen werden. Ein weiteres Beispiel für eine direkte Wirkung von TNF auf afferente Neurone ist die Stimulierung derselben zur Abgabe des Neuropeptides CGRP bei der Ratte. Dies wiederum verstärkte innerhalb weniger Minuten die Hitze-evozierte CGRP-Abgabe der Haut (Opree und Kress 2000). Aufgrund der Schnelligkeit der zuletzt genannten Reaktion konnte, wie es auch bei IL-6 der Fall ist (Opree und Kress 2000), bei TNF und IL-1 $\beta$  von einer direkten Rezeptor-vermittelten direkten Wirkung ausgegangen werden.

Zu den indirekten Wirkungen von TNF auf den neuropathischen Schmerz gehören die über Stimulierung von IL-1 in Monozyten vermittelte Bildung von NGF im verletzten Nerven (Lindholm et al. 1987). NGF selbst bewirkt nach intraneuraler Injektion Hyperalgesie (Lewin et al. 1994). Desweiteren erhöhen TNF und IL-1 gemeinsam unter anderem die Synthese des Eicosanoids PGE<sub>2</sub> (Dayer et al. 1985; Burch et al. 1988; Burch und Tiffany 1989). PGE<sub>2</sub> führt zu einer weiteren Sensibilisierung der Zellen für andere inflammatorische Substanzen wie zum Beispiel Bradykinin (Higgs und Glomset 1994). Durch Hemmung der Prostaglandinproduktion konnte die TNF-bedingte Hitzehyperalgesie im Tiermodell überzeugend vermindert werden (Cunha et al. 1992; Nicol et al. 1997). Überdies induziert TNF unter anderem über IL-1 die Produktion von Substanz P, einem exzitatorischen Neuropeptid, in sympathischen Ganglien (Ding et al. 1995). Dadurch wird auf Rückenmarksebene eine Kaskade mit Aktivierung zahlreicher anderer sensibilisierender Mediatoren in Gang gesetzt (Wiertelak et al. 1994, Kangrga et al. 1990), auf die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegangen werden kann.

Auch endogene Opiode sind bei der Entstehung und Modulation TNF-bedingter neuropathischer Schmerzen von Bedeutung. Untersuchungen diesbezüglich ließen vermuten, daß eine durch die TNF-Inhibitoren Thalidomid (Sommer 1999) oder Pentoxifyllin im CCI-Modell verursachte Minderung der Hyperalgesie mit einer Modulation durch endogene Opiode auf spinaler Ebene einhergeht (Sommer und Marziniak 1996). Bezüglich dieser Frage liegen allerdings noch keine Ergebnisse mit dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten neutralisierenden TNF-AK vor.

#### **4.9 Übertragung auf humane schmerzhaftige Neuropathien**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können hoffen lassen, daß durch frühzeitige TNF-Hemmung auch bei humanen Nervenverletzungen die Therapie des neuropathischen Schmerzes verbessert werden kann. Im menschlichen Nerven zeigen Untersuchungen eine gesteigerte Aktivität von TNF in Schwann-Zellen bei Neuropathien, wobei zwischen schmerzhafter und nicht-schmerzhafter Neuropathie

unterschieden wird. Die TNF-Immunreaktivität bei Nervenbiopsien mit schmerzhafter Neuropathie lag deutlich über denen mit nicht-schmerzhafter Neuropathie. Ein erhöhter Serumspiegel für TNF-Rezeptor 1 fand sich lediglich bei Biopsien von Patienten, die an einer mechanischen Allodynie litten (Empl et al. 2001). Die **Chronisch Inflammatorische Demyelinisierende Polyneuropathie (CIDP)** des Menschen zeigte neben TNF auch eine gesteigerte Expression der Zytokine Interferon gamma (IFN) und IL-2 (Mathey et al. 1999). Biopsien von Neuropathien im Zusammenhang mit schmerzhaften Vaskulitiden waren mit einem erhöhten TNF-Gehalt in Makrophagen (Oka et al. 1998) und gesteigerter IL-6-Produktion im N. suralis vergesellschaftet (Lindenlaub und Sommer 2000 b).

Neben der Polyneuropathie bieten auch andere Krankheiten des Menschen mit erhöhtem Spiegel von TNF wie zum Beispiel Morbus Crohn, die rheumatoide Arthritis und das Erythema Nodosum Leprosum Ansatzpunkte für eine Therapie mit TNF-Hemmstoffen.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSSFOLGERUNGEN

Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit zwei Modellen einer schmerzhaften Mononeuropathie an der C57BL/6-Maus sowie deren Beeinflussung durch neutralisierende AK gegen TNF. Dafür wurden die Nn. ischiadici der Mäuse operativ manipuliert, zum einen in Form der CCI durch drei den Nerven einschnürende Ligaturen und zum anderen in Form der PST durch Heraustrennen eines Drittels des Nervendurchmessers. Beide Operationsmodelle lösten bei den Mäusen eine schmerzhafte Neuropathie aus. Es wurde untersucht, inwieweit zum Zeitpunkt der jeweiligen Operation oder am 4. postoperativen Tag applizierte TNF-AK das Schmerz-assoziierte Verhalten beeinflussen konnten und ob diese Behandlung einen Einfluß auf die Zytokinexpression im Endoneurium, auf den Makrophageneinstrom und auf die Nervenregeneration hatte. Hierzu wurden Verhaltenstests sowie immunhistochemische und morphometrische Methoden verwendet.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

- Die Läsionsmodelle CCI und PST glichen sich in der Entwicklung von Hitzehyperalgesie und taktiler Allodynie sowohl bezüglich des Ausmaßes wie auch des Zeitverlaufes.
- Die nach CCI und PST vorhandene Hitzehyperalgesie und taktile Allodynie konnte durch einmalige präventive, also perioperative Gabe von TNF-AK für eine Dauer von zwei Wochen reduziert werden.
- Die Beeinflussbarkeit des Schmerz-assoziierten Verhaltens durch TNF-AK unterschied sich nicht zwischen den Modellen CCI und PST. Somit scheint die bei CCI, nicht aber bei PST vorhandene epineurale Entzündung nicht der primäre Angriffspunkt von TNF-AK in der Beeinflussung von neuropathischem Schmerz zu sein.
- Beim CCI-Modell korreliert der Regenerationserfolg an Tag 44 gegenüber Tag 7 zeitlich mit der Rückbildung des Schmerz-assoziierten Verhaltens.

- Das Ausmaß an De- und Regeneration wird durch TNF-AK-Behandlung bei CCI nicht beeinflusst.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, daß der bei CCI vermutete Einfluß der epineuralen Entzündung auf das Schmerz-assoziierte Verhalten kleiner ist als ursprünglich angenommen. Die Tatsache, daß zumindest auf einen Parameter (Hitzehyperalgesie) nicht nur die präventive sondern auch die therapeutische TNF-Hemmung wirksam war, läßt auf einen Einsatz von TNF-Hemmern bei bestimmten Formen des neuropathischen Schmerzes zur Therapieergänzung hoffen. Obwohl die TNF-Hemmung in den hier verwendeten Dosen und Applikationsweisen keinen Einfluß auf die endoneurale Zytokinexpression, Makrophagendichte und Regeneration hatte, sollten zukünftige Studien diese Parameter unter variierten Applikationsbedingungen genauer untersuchen.

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Aggarwal B. B., Natarajan K. (1996). Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur Cytokine Netw*, **7**, 93-124.
2. Attal N., Jazat F., Kayser V., Guilbaud G. (1990). Further evidence for „pain-related“ behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain*, **41**, 235-251.
3. Baldwin R. L., Stolowitz M. L., Hood L., Wisnieski B. J. (1996). Structural changes of tumor necrosis factor alpha associated with membrane insertion and channel formation. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 1021-1026.
4. Baron R. (2000). Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms. *Clin J Pain*, **16**, 12-20.
5. Bennett G. J., Xie J. K. (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, **33**, 87-107.
6. Bergsteinsdottir K., Kingston A., Mirsky R., Jessen K. R. (1991). Rat schwann cells produce interleukin-1. *J Neuroimmunol*, **34**, 15-23.
7. Beuche W., Friede R. L. (1984). The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J Neurocytol*, **13**, 767-796.
8. Bianchi M., Sacerdote P., Ricciardi-Castagnoli P., Mantegazza P., Panerai A. (1992). Central effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha on nociceptive thresholds and spontaneous locomotor activity. *Neurosci Lett*, **148**, 76-80.

9. Bizette C., Chan-chi-song P., Fontaine M., Tadie M. (1996) Expression des ARNm de l'interleukine 1 beta, de l'interleukine 6 et de tumor Necrosis Factor alpha au cours de la regeneration du nerf sciatique de rat apres perte de substance. *Chirurgie* **121**, 474-481.
10. Breder C. H., Tsujimoto M., Terano Y., Scott D. W., Saper C. B. (1993). Distribution and characterization of tumor necrosis factor-alpha-like immunoreactivity in the murine central nervous system. *J Comp Neurol*, **337**, 543-567.
11. Burch R. M., Connor J. R., Axelrod J. (1988). Interleukin 1 amplifies receptor-mediated activation of phospholipase A2 in 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 6306-6309.
12. Burch R. M., Tiffany C. W. (1989). Tumor necrosis factor causes amplification of arachidonic acid metabolism in response to interleukin 1, bradykinin and other agonists. *J Cell Physiol*, **141**, 85-89.
13. Cervero F., Laird J. M. (1996) Mechanisms of touch-evoked pain (allodynia): a new model. *Pain*, **68** (1), 13-23.
14. Chaplan S. R., Bach F. W., Pogrel J. W., Chung F. M., Yaksh T. L. (1994). Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, **53**, 55-63.
15. Chen L. E., Seaber A. V., Wong G. H., Urbaniak J. R. (1996). Tumor necrosis factor promotes motor functional recovery in crushed peripheral nerve. *Neurochem Int*, **29**, 197-203.
16. Cotran R. (1987). New roles for the endothelium in inflammatory and immunity. *Am J Pathol*, **129**, 407-413.
17. Creange A, Barlovatz-Meimon G., Gherardi R. K. (1997). Cytokines and peripheral nerve disorders. *Eur Cytokine Netw*, **8**, 145-151.

18. Cunha F., Poole S., Lorenzetti B., Ferreira S. (1992). The pivotal role of tumor necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, **107**, 660-664.
19. Czlankowski A., Stein C., Herz A. (1993). Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines. *Eur J Pharmacol*, **242**, 229-235.
20. Dayer J. M., Beutler B., Cerami A. (1985). Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J Exp Med*, **162**, 2163-2168.
21. Declercq W, Denecker G, Fiers W, Vandenabeele P. (1998). Cooperation of both TNF receptors in inducing apoptosis: involvement of the TNF receptor-associated factor binding domain of the TNF receptor 75. *J Immunol*, **161** (1), 390-399
22. Ding M., Hart R. P., Jonakait G. M. (1995). Tumor necrosis factor-alpha induces substance P in sympathetic ganglia through sequential induction of interleukin-1 and leukemia inhibitory factor. *J Neurobiol*, **28**, 445-454.
23. Dixon W. J. (1980). Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **20**, 441-462.
24. Dixon W. J. (1965). The Up-and-down method for small samples. *J Am Statist Assoc*, **60**, 967-978.
25. Dubner R. (1994). Methods of assessing pain in animals. In *Textbook of pain*, ed. Wall P. and Melzack R. pp 293-302. Edinburgh: Churchill Livingstone
26. Dyck P. J., Lambert E. H., O'Brien P. C. (1976). Pain in peripheral neuropathy related to rate and kind of fibre degeneration. *Neurology*, **26**, 466-471.

27. Empl M., Renaud S., Erne B., Fuhr P., Straube A., Schaeren-Wiemers N., Steck A. J. (2001). TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies. *Neurology*, **22**; 56(10), 1371-1377.
28. Endres, S., Sinha, B., Eigler, A. (1995). Tumor-Nekrose-Faktor. *Dt. Ärzteblatt*, **92**, A-2185-2188.
29. Ferreira SH, Lorenzetti BB, Cunha FQ, Poole S. (1993). Bradykinin release of TNF-alpha plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. *Agents Actions*; **38** Spec No:C7-9
30. George A., Schmidt C., Weishaupt A., Toyka K. V., Sommer C. (1999). Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury. *Exp Neurol*, **160**, 124-132.
31. Griffin J. W., George R., Ho T. (1993). Makrophage system in peripheral nerves. A review. *J Neuropathol Exp Neurol*, **52**, 553-560.
32. Hattori A., Iwasaki S., Murase K., Tsujimoto M., Sato M., Hayashi K., Kohno M. (1994). Tumor necrosis factor is markedly synergistic with interleukin 1 and interferon-gamma in stimulating the production of nerve growth factor in fibroblasts. *Febs Lett*, **340**, 177-180.
33. Hargreaves K., Dubner R., Brown F., Flores C., Joris J. (1988). A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, **32**, 77-88
34. Herbert M. K., Holzer P. (1994). Interleukin-1 $\beta$  enhances capsaicin-induced neurogenic vasodilatation in the rat skin. *Br J Pharmacol*, **111**, 681-686.
35. Higgs H. N., Glomset J. A. (1994). Identification of a phosphatidic acid-preferring phospholipase A1 from bovine brain and testis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 9574-9578.

36. Johnson G. V. W., Greenwood J. A., Costello A. C., Troncosco J. C. (1991). The regulatory role of calmodulin in the proteolysis of individual neurofilament proteins by calpain. *Neurochem Res*, **16**, 869-875.
37. Junger H, Sorkin LS. (2000). Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha. *Pain*, **85** (1-2), 145-151
38. Kagan B. L., Baldwin R. L., Munoz D., Wisnieski B. J. (1992). Formation of ion-permeable channels by tumor necrosis factor-alpha. *Science*, **255**, 1427-1430.
39. Kangrga I. J., Larew S. A., Randic M. (1990). The effects of substance P and calcitonin gene-related peptide on the efflux of endogenous glutamate and aspartate from the rat spinal dorsal horn in vitro. *Neurosci Lett*, **108f**, 155-160.
40. Lewin G., Rueff A., Mendell L. (1994). Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur J Neurosci*, **6**, 1903-1912.
41. Liefner M, Maruschak B., Bruck W. (1998). Concentration-dependent effects of pentoxifylline on migration and myelin phagocytosis by macrophages. *J Neuroimmunol*, **89**, 97-103.
42. Lindenlaub T., Sommer C. (2000) (a). Partial sciatic nerve transection as a model of neuropathic pain: a qualitative and quantitative neuropathological study. *Pain*, **89**, 97-106.
43. Lindenlaub T., Sommer C (2000) (b). Cytokines in sural nerve biopsies. *J Neurol*, **247**, III 152.
44. Lindenlaub T., Teuteberg P., Hartung T., Sommer C. (2000). Effects of neutralizing antibodies to TNF-alpha on pain-related behaviour and nerve regeneration in mice with chronic constriction injury. *Brain Res*, **866**, 15-22.

45. Lindholm D., Heumann R., Meyer M., Thoenen N. (1987). Interleukin-1 regulates synthesis of nerve growth factor in non-neuronal cells of rat sciatic nerve. *Nature*, **330**, 658-659.
46. Llewelyn J. G., Gilbey S., Thomas P., King R. H. M., Muddle J., Watkins P. J. (1991). Sural nerve morphometry in diabetic autonomic and painful sensory neuropathy. *Brain*, **114**, 867-892.
47. LoPachin R. M., LoPachin U. R., Saubermann A. J. (1990). Effects of axotomy on distribution and concentration of elements in rat sciatic nerve. *J Neurochem*, **54**, 320-332.
48. Lu G., Beuerman R. W., Zhao S., Sun G., Nguyen G. H., Ma S., Kline D. G. (1997). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 induce activation of MAP kinase and SAP kinase in human neuroma fibroblasts. *Neurochem Int*, **30**, 401-410.
49. Mao J., Price D. D., Gayes T. L., Lu J., Mayer D. J. (1992). Differential roles of NMDA and non-NMDA receptor activation in induction and maintenance of thermal hyperalgesia in rats with painful peripheral mononeuropathy. *Brain Res*, **598**, 271-278.
50. Mantovani A, Dejana E. (1989). Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today*, **10**, 370-375.
51. Marziniak M., Sommer C. (2000) Upregulation of cyclooxygenase 2 is dependent on tumor necrosis factor receptor 1 and 2 after chronic constriction injury. *J Neurol* **247**, III/125.
52. Mathey E. K., Pollard J. D., Armati P. J. (1999). TNF alpha, IFN gamma and IL-2 mRNA expression in CIDP sural nerve biopsies. *J Neurol Sci*, **163**, 47-52.
53. Menendez J. A., Cubas S. C. (1990). Changes in contralateral protein metabolism following unilateral sciatic nerve section. *J Neurobiol*, **21**, 303-312.

54. Murwani R., Armati P. (1998). Peripheral nerve fibroblasts as a source of IL-6 , TNF alpha and IL-1 and their modulation by IFN gamma. *J Neurol Sci*, **161**, 99-109.
55. Myers R. R., Heckman H. M., Galbraith J. A., Powell H. C. (1991). Subperineural demyelination associated with reduced nerve blood flow and oxygen tension following epineurial vascular stripping. *Lab Invest*, **65**, 41-50.
56. Myers R. R., Sommer C. (1993). Role of Wallerian degeneration in pathogenesis of neuropathic pain. *J Neuropathol Exp Neurol*, **52**, 310.
57. Myers R. R., Yamamoto T., Yaksh T. L., Powell H. C. (1993). The role of focal nerve ischemia and Wallerian degeneration in peripheral nerve injury producing hyperesthesia. *Anaesthesiology*, **78**, 308-316.
58. Myers R. R., Sommer C. (1994). Focal freeze injury of neuropathic pain: a reproducible model of neuropathic pain. *Abstr Soc Neurosci*, **20**, 125.
59. Myers R. R. (1995). The pathogenesis of neuropathic pain. *Reg Anaesth*, **20**, 173-184.
60. Nicol G. D., Lopshire J. C., Pafford C. M. (1997). Tumor necrosis factor enhances the capsaicin sensitivity of rat sensory neurons. *J Neurosci*, **17**, 975-982.
61. Oka T., Wakugawa Y., Hosoi M., Oka K., Hori T. (1996). Intracerebroventricular injection of tumor necrosis factor-alpha induces thermal hyperalgesia in rats. *Neuroimmunomodulation*, **3**, 135-140.
62. Oka N., Akiguchi I., Kawasaki T., Mizutani K., Satoi H., Kumura J. (1998). Tumor necrosis factor-alpha in peripheral nerve lesions. *Acta Neuropathol*, **95**, 57-62.

63. Okamoto K., Martin D. P., Schmelzer J. D., Mitsui Y., Low P. A. (2001). Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Exp Neurol*, **169** (2), 386-391
64. Olmarker K, Rydevik B. (2001). Selective inhibition of tumor necrosis factor-alpha prevents nucleus pulposus-induced thrombus formation, intraneural edema, and reduction of nerve conduction velocity: possible implications for future pharmacologic treatment strategies of sciatica. *Spine*,**26**,(8):863-869
65. Oprea A., Kress M. (2000). Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. *J Neurosci*, **20**, 6289-6293.
66. Ren K., Thomas D. A., Dubner R. (1995). Nerve growth factor alleviates a painful peripheral neuropathy in rats. *Brain Res*, **699**, 286-292.
67. Richardson P. M., Ebendal T. (1982). Nerve growth activation in rat peripheral nerve. *Brain Res*, **246**, 57-64.
68. Safieh-Garabedian B., Poole S., Allchorne A., Winter J., Woolf C. J. (1995) Contribution of interleukin-1 beta to the inflammation-induced increase in nerve growth factor levels and inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, **115**, 1265-1275.
69. Schäfers M., Sommer C. (1999). ICAM and TNF: ICAM regulation in mice with painful mononeuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, **4**, 150.
70. Scheidt P., Friede R. L. (1987). Myelin phagocytosis in Wallerian degeneration: Properties of millipore diffusion chambers and immunohistochemical identification of cell populations. *Acta Neuropathol Berl*, **75**, 77-84.
71. Schlaepfer W. W. (1971). Experimental alterations of neurofilaments and neurotubules by calcium and other ions. *Exp Cell Res*, **67**, 73-80.

72. Schlaepfer W. W. (1977). Structural alterations of peripheral nerve induced by the calcium ionophore A23187. *Brain Res*, **1136**, 1-9.
73. Schlaepfer W. W., Lee C., Trojanowski J. Q., Lee V. M. Y. (1984). Persistence of immunoreactive neurofilament protein breakdown products in transected rat sciatic nerve. *J Neurochem*, **43**, 857-864.
74. Schmidt R. F., Thews G. (Eds.) (1995). *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag, 26. Auflage, 246.
75. Schneider-Schaulies F., Kirchhoff F., Archelos J., Schachner M. (1991). Down-regulation of myelin-associated glycoprotein on Schwann cells by interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha affects neurite outgrowth. *Neuron*, **7**, 995-1005.
76. Selmaj K. W., Raine C. S. (1988). Tumor necrosis factor mediates myelin and Oligodendrocyte damage in vitro. *Ann Neurol*, **23**, 339-346.
77. Seltzer Z., Zeltzer R., Noltzer A., Cher L., Dor V. (1987). Collateral sprouting of nociceptive C-fibers in the rat. *Neur Sci*, **22**, 179.
78. Seltzer Z., Dubner R., Shir Y. (1990). A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, **43**, 205-218.
79. Shubayev V. I., Myers R. R. (2000). Upregulation and interaction of TNF alpha and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury. *Brain Res*, **855**, 83-89.
80. Sommer C., Galbraith J. A., Heckman H. M., Myers R. R. (1993). Pathology of experimental compression neuropathy producing hyperesthesia. *J Neuropathol Exp Neurol*, **52**, 223-233.

81. Sommer C., Lalonde A., Heckman H., Rodriguez M., Myers R. R. (1995). Quantitative Neuropathology of a focal nerve injury causing hyperalgesia. *J Neuropathol Exp Neurol*, **54**, 635-643.
82. Sommer C., Myers R. R. (1995). Neurotransmitters in the spinal cord dorsal horn in a model of painful neuropathy and in nerve crush. *Acta Neuropathol*, **90**, 478-475.
83. Sommer C., Myers R. R. (1996). Vascular changes in a model of painful neuropathy. *Exp Neurol*, **141**, 113-119.
84. Sommer C., Marziniak M. (1996). Experimental painful mononeuropathy: inhibitors of TNF-alpha-production induce a decrease in hyperalgesia and an increase of spinal met-enkephalin. *Soc Neurosci Abs*, **22**, 511.
85. Sommer C., Schmidt C., George A., Toyka K. V. (1997). A metalloprotease-inhibitor reduces pain associated behaviour in mice with experimental neuropathy. *Neurosci Lett*, **237**, 45-48.
86. Sommer C., Schäfers M. (1998) (a). Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity. *Brain Res*, **784**, 154-162.
87. Sommer C., Schmidt C., George A. (1998) (b). Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF-receptor 1. *Exp Neurol*, **151**, 138-142.
88. Sommer C., Marziniak M., Myers R. R. (1998). The effect of thalidomid treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve. *Pain*, **74**, 83-91.
89. Sommer C., Petrusch S., Lindenlaub T., Toyka K. V. (1999). Neutralizing antibodies to Interleukin-1-receptor reduce pain associated behaviour in mice with experimental neuropathy. *Neurosci Lett*, **23**, 25-28.

90. Sommer C., Lindenlaub T., Teuteberg P., Hartung T., Toyka K. V. (2001). Anti-TNF neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two models of painful mononeuropathy. *Brain Res*, **14**, 913 (1), 86-89.
91. Sommer C. (1999). Thalidomide as a blocker of TNF production. *Drugs of the future*, **24** (1), 67-75.
92. Sommer C., Schäfers M., Marziniak M., Toyka K. V. (2001). Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy. *J Peripher Nerv Syst*, **6** (2), 67-72.
93. Sorkin L. S., Xiao W. H., Wagner R., Myers R. R. (1997). Tumor necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres. *Neuroscience*, **81**, 255-262.
94. Sorkin L. S., Doom C. M. (2000). Epineurial application of TNF elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat. *J Peripher Nerv Syst*, **5**, 96-100.
95. Stoll G., Jung S., Jander S., van der Meide P., Hartung H.-P. (1993). Tumor necrosis factor-alpha in immune-mediated demyelination and Wallerian degeneration of the rat peripheral nervous system. *J Neuroimmunol*, **45**, 175-182.
96. Tartaglia L. A., Goeddel D. V. (1992). Two TNF-receptors. *Immunol. Today*, **13**, 151-153.
97. Taskinen H. S., Olsson T., Bucht A., Khademi M., Svelander L., Roytta M. (2000). Peripheral nerve injury induces endoneurial expression of IFN-gamma, IL-10 and TNF-alpha mRNA. *J Neuroimmunol*, **102**, 17-25.
98. Thomas P. K. In: Calp W. J. und Ochoa J. (Eds.). (1982). Pain in peripheral neuropathy: clinical and morphological aspects. *Abnormal Nerves and Muscles as Impulse Generators*. Oxford University Press. London, 553-567.

99. Vandenabeele P., Declercq W., Vanhaesebroeck B., Grooten J., Fiers W. (1995). Both TNF receptors are required for TNF-mediated induction of apoptosis in PC60 cells. *J Immunol*, **154**, 2904-2913.
100. Vogel C., Lindenlaub T., Tiegs G., Toyka K. V., Sommer C. (2000). Pain related behavior in TNF-receptor deficient mice. In: Devor M. Rowbotham M. C., Wiesenfeld-Hallin Z. (eds). *Proceedings of the 9<sup>th</sup> World Congress on Pain, Progress in Pain Research and Management*, vol 16. IASP Press, Seattle, pp 249-257.
101. Watkins L. R., Goehler L. E., Repton J., Brewer M. T., Maier S. F. (1995). Mechanisms of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) hyperalgesia. *Brain Res.*, **692**, 244-250.
102. Wagner R, Myers R. R. (1996). Endoneurial injection of TNF-alpha produces neuropathic pain. *Neuroreport*, 2897-2901.
103. Wells M. R., Racis S. P. jr., Vaidya U. (1992). Changes in plasma cytokines associated with peripheral nerve injury. *J Neuroimmunol*, **39**, 261-268.
104. Wiertelak E. P., Furness L. E., Watkins L. R., Maier S. F. (1994). Illness-induced hyperalgesia is mediated by a spinal NMDA-nitric oxide cascade. *Brain Res*, **664**, 9-16.
105. Woolf C. J. (2001) Patrick D. Wall (1925-2001). *Nature*, **413**, (6854):378
106. Yamamoto T., Yaksh T. L. (1992). Spinal pharmacology of thermal hyperesthesia induced by constriction injury of sciatic nerve. Excitatory amino acids antagonists. *Pain*, **49**, 121-128.
107. Yoshida K., Gage F. H. (1992). Cooperative regulation of nerve growth factor synthesis and secretion in fibroblasts and astrocytes by fibroblast growth factor and other cytokines. *Brain Res*, **569**, 14-25.

## 7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<b>AK</b>	Antikörper
<b>CCI</b>	Chronic Constriction Injury
<b>CD</b>	Cluster of differentiation
<b>CGRP</b>	Calcitonin Gene Related Peptide
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>DAB</b>	3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid
<b>DS</b>	Difference Score
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Monozyten-koloniestimulierende Faktoren
<b>ICAM</b>	Intracellular adhesion molecule
<b>i.c.v.</b>	Intraventrikulär
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin-1beta
<b>i.pl.</b>	Intraplantar
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>M</b>	Molar
<b>N</b>	Nerv
<b>ng</b>	Nanogramm (1 ng=1x10 <sup>-9</sup> g)
<b>NGF</b>	Nerve Growth Factor

<b>NOS</b>	Stickoxyd-Synthase
<b>pg</b>	Pikogramm (1 pg=1x10 <sup>-12</sup> g)
<b>PGE</b>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PST</b>	Partial Sciatic Transection
<b>RS</b>	50%-Rückzugsschwelle
<b>Sek</b>	Sekunde
<b>SAK</b>	Scheinantikörper
<b>TNF</b>	Tumor-Nekrose-Faktor
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
<b>TNF-R</b>	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
<b><math>\mu</math>l</b>	Mikroliter (1 $\mu$ l=1x10 <sup>-6</sup> Liter)

## DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. med. Claudia Sommer für die freundliche Überlassung des Themas und die Einarbeitung in die Thematik und die Methoden desselben. Insbesondere ihre intensive, kontinuierliche und geduldige Betreuung während aller Phasen der Arbeit möchte ich betonen. Ich fand in ihr jederzeit eine freundliche und sehr kompetente Ansprechpartnerin für sämtliche Belange, die auch über den Rahmen dieser Doktorarbeit hinausgingen.

Weiter gilt mein Dank dem Direktor der Neurologischen Klinik und Poliklinik in Würzburg, Professor Dr. med. Klaus V. Toyka, für die Bereitstellung der optimalen Räumlichkeiten zur Durchführung der Experimente und Bearbeitung der Ergebnisse.

Neben allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, namentlich die Damen und Herren Dres. med. Frau Christine Schmidt, Frau Carola Vogel, Frau Maria Schäfers, Frau Annette George, Herr Thies Lindenlaub, Herr Martin Marziniak, denen ich allen für die Unterstützung meiner Arbeit danke, möchte ich besonders Frau Lydia Biko und Frau Barbara Dekant hervorheben, ohne deren prompte, zuverlässige und unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente und der histologischen Aufarbeitung die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name	Philipp Wilhelm Friedemann Teuteberg
geboren	21. April 1974 in Trier
Adresse	Gilbertstraße 51, 54290 Trier
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig
Eltern	Dr. med. Heinrich Teuteberg; verstorben Gisela Teuteberg geb. Emmert, MTA und Hausfrau; verwitwet

---

## Schule

08/80 - 07/84	Franz-Altenhofen-Grundschule Trier
08/84 - 06/93	Max-Planck-Gymnasium Trier Abschluss: Abitur

---

## Universitätsstudium

10/94 - 06/01	<b>Humanmedizin</b> an der Christian-Albrechts-Universität Kiel und an der Julius-Maximilian-Universität Würzburg
09/96	Ärztliche Vorprüfung
09/97	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
04/00	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/01	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

---

## Praktisches Jahr

04/00 - 08/00	<b>Anästhesiologie</b> an der University of Oklahoma City, USA und an der Julius-Maximilian-Universitätsklinik Würzburg
---------------	---

06/00 - 12/00

**Innere Medizin** am Universitätsspital Zürich, Schweiz

12/00 - 03/01

**Chirurgie** an der Julius-Maximilian-Universitätsklinik  
Würzburg

---

## Promotion

01/98 - 04/02

**Experimentelle Doktorarbeit** in der neurologischen Klinik der Julius-Maximilian-Universität Würzburg, Arbeitsgruppe Frau PD Dr. Claudia Sommer:  
Schmerzhafte Mononeuropathie an C57/BL6-Mäusen:  
Studien mit neutralisierenden Antikörpern gegen Tumor-Nekrose-Faktor alpha an zwei verschiedenen Läsionsmodellen.

### Mitarbeit an **Publikationen**:

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

Sommer C., Lindenlaub T., Teuteberg P., Hartung T., Toyka K. V. (2001). Anti-TNF neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two models of painful mononeuropathy. Brain Res, **14**, 913 (1), 86-89.

---

## Beruflicher Werdegang

10/02 - 04/03

**Arzt im Praktikum** in der Abteilung für Plastische und Handchirurgie des evangelischen Elisabeth-Krankenhauses Trier unter Leitung von Chefarzt Dr. med. Klaus Hrynyschyn

---

Trier, im April 2003