

Aus der Klinik für
Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf
Direktor Univ. Prof. Dr. med. J. Tarnow
und aus dem
Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung
der Technischen Universität München
Direktor Univ. Prof. Dr. med. B. Gänsbacher

Angefertigt unter Leitung von
Dr. med. U. Muth-Selbach und
Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt

vorgelegt über das Institut für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl

**Untersuchungen zur (spinalen) Desinhibition
von GlyT2-EGFP-Mäusen unter Neuropathie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Stella Bettina Li-Hsia Go
aus Lich
München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. J. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. B. Aigner
Priv.-Doz. Dr. A. Fischer

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Meiner Mutter gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
2 LITERATURÜBERSICHT	2
2.1 Neuropathischer Schmerz	2
2.2 Chronic Constriction Injury (CCI) des Nervus ischiadicus	8
2.3 Mechanische Allodynie und thermale Hyperalgesie	12
2.4 N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren	14
2.5 EGFP-GlyT2-Mäuse	16
3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN	24
3.1 Zielsetzung	24
3.2 Material und Methoden	25
3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	25
3.2.2 Versuchsplan	26
3.2.2.1 Vorversuch	26
3.2.2.2 Hauptversuch	29
3.2.3 Messgeräte und Medikamente	31
3.2.3.1 Medikamente	31
3.2.3.2 Messgeräte	31
3.2.4 Probenentnahme und -aufbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie	33
3.2.4.1 Probenentnahme	33
3.2.4.2 Probenaufbereitung	33
3.3 Rechnerische Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse	34
3.4 Ergebnisse	35
3.4.1 Ergebnisse der Vorversuche	35
3.4.1.1 Thermale Hyperalgesie	35
3.4.1.2 Mechanische Allodynie	37
3.4.2 Ergebnisse der Hauptversuche	39
3.4.2.1 Thermale Hyperalgesie	39
3.4.2.2 Mechanische Allodynie	42
3.4.2.3 Auszählung der Rückenmarkschnitte	45
4 DISKUSSION	52
4.1 Ziel der Arbeit	52
4.2 Ergebnisse	54
4.3 Interpretation der Ergebnisse	58

4.4 Schlussbetrachtung	61
5 ZUSAMMENFASSUNG	62
6 SUMMARY	64
7 LITERATURVERZEICHNIS	65
8 TABELLENVERZEICHNIS	75
9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS	76
10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77
11 DANKSAGUNG	78
12 LEBENSLAUF	79

1 EINLEITUNG

Neuropathische Schmerzen entstehen, wenn das Nervensystem geschädigt wird. Dies kann durch Verletzung des Nerven geschehen oder wenn der Nerv einem länger andauernden Reiz ausgesetzt ist. Der Nerv und das „nachgeschaltete“ zentrale Nervensystem werden überempfindlich und reagieren schon bei normalerweise unterschwelligen Reizen oder spontan mit Schmerzempfindung. Dadurch geht die Schutzfunktion verloren und der Schmerz verselbstständigt sich.

Nach der Definition der Internationalen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (IASP) wird von neuropathischem Schmerz dann gesprochen, wenn eine Läsion oder Dysfunktion des zentralen oder peripheren Nervensystems die Ursache der Schmerzen darstellt. Klinisch sind neuropathische Schmerzen, d.h. chronische Schmerzen nach Läsionen des Nervensystems, durch brennende Spontanschmerzen, einschließende Schmerzattacken und evozierte Schmerzen charakterisiert (TÖLLE und BARON 2002).

Die ihnen zugrunde liegenden Mechanismen sind komplex und noch immer nicht ausreichend geklärt. Damit bleibt die Therapie neuropathischer Schmerzen weiterhin schwierig und für die betroffenen Patienten oft unzureichend.

In der vorliegenden Studie soll anhand eines Neuropathiemodells, bei dem der N. ischiadicus geschädigt wird (chronic constriction injury-Modell (CCI)) an bacterial artificial chromosome (BAC)-transgenen Mäusen untersucht werden, ob für die Entstehung neuropathischer Schmerzen eine Desinhibition normalerweise schmerzenhemmender spinaler Neuronen die Ursache sein könnte. Dazu werden die mechanische Allodynie und die thermale Hyperalgesie *in vivo* und *ex vivo* sowie lumbale und thorakale Rückenmarksschnitte histologisch untersucht. Die Untersuchungen fallen in das Gebiet der Grundlagenforschung.

2 LITERATURÜBERSICHT

2.1 Neuropathischer Schmerz

Akute Schmerzen sind wichtige Warnsignale bei drohenden oder bereits bestehenden Gewebeschädigungen. Diese Signale werden durch die Stimulierung von spezialisierten somatosensorischen Nervenzellen oder Nozizeptoren (von noxius (lat.) = schädlich, verletzend) durch starke Hitze und Kälte, mechanische oder chemische Reize ausgelöst. Nozizeptoren gehören zu den langsam leitenden Afferenzen der Gruppen III (A δ) und IV (C-Fasern) und werden funktionell nach ihren Antworteigenschaften klassifiziert. Nozizeptoren übertragen die Schmerzsignale zum superfizialen Hinterhorn (KARSAK et al. 2002).

<i>Typ</i>	<i>Dicke</i>	<i>Stimulation</i>	<i>Geschwindigkeit</i>	<i>Charakter</i>
Aδ	myelinisiert < 3 μ m	thermisch, mechanisch	schnell 5-30 m/s	scharfer Erstscherz, Schutzreflex, gut lokalisierbar, kurz
C	unmyelinisiert 1 μ m	polymodal: chemisch, thermisch, mechanisch	langsam 0,5- 2 m/s	dumpfer, brennender Zweitscherz, schlecht lokalisierbar, anhaltend
Aβ	myelinisiert 8 μ m	taktile Reize (Druck, Berührung)	schnell 50 m/s	Vibration, Kitzeln, Stechen, Prickeln

Abb. 2-1: Klassifizierung der Nervenfasern (nach HENKE und ERHARDT 2001)

Nach SANDKÜHLER (2001) sind Nozizeptoren spezielle Sinnesfühler für Schmerz, die einen drohenden oder bestehenden Gewebeschaden erkennen. Nozizeptoren sind freie Nervenendigungen von dünnen afferenten A δ - oder C-Nervenfasern, die in allen Organen mit Ausnahme des Zentralnervensystems vorkommen. Sie werden unter anderem durch starke physikalische (z.B. hohe Druckreize bzw. durch hohe oder niedrige Temperaturen) oder chemische (z.B. bei Entzündungen oder Traumata) Reize erregt. Die nozizeptiven A δ - und C-Fasern enden im Hinterhorn des Rückenmarks. Dort schütten sie bei Erregung den Neurotransmitter Glutamat aus (erster Botenstoff). Glutamat bindet an spezielle Glutamat-rezeptoren vom Subtyp der α -amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionsäure (AMPA)-Rezeptoren. Dies führt zur synaptischen Erregung von Hinterhornneuronen, die die Information dann direkt oder über Zwischenneuronen unter anderem zum Thalamus und zum Kortex weiterleiten, wodurch schließlich der Sinneseindruck „Schmerz“ entsteht (SANDKÜHLER 2001).

A δ - und C-Fasern sind, genauso wie B-Fasern (vom vegetativen Nervensystem), bekannt als „kleine“, dünne oder nicht myelinisierte Nervenfasern der langsamen Leitfähigkeit. Mehr als 80% der Nervenfasermasse der peripheren somatischen Nerven zählt zu den kleinen Fasern; außerdem bilden die dünnen Fasern das periphere vegetative Nervensystem (STRIAN 1990).

Die A δ -Fasern gelangen über die Hinterwurzel in das Rückenmark und steigen im Hinterstrang auf. Sie enden entweder ohne vorherige Umschaltung an den Zellen der Hinterstrangkernkerne oder gelangen über den Lemniscus medialis zum Thalamus, oder zum Gyrus postcentralis. Auch die C-Fasern treten über die Hinterwurzel in das Rückenmark ein, enden aber in der Substantia gelatinosa (Lamina II/III) mit Umschaltung auf ein zweites Neuron, dessen Fortsätze in der Commissura alba auf die Gegenseite kreuzen. Diese steigen im Vorderseitenstrang auf bevor sie über Neuronen zum Gyrus postcentralis gelangen.

Nach der Definition der internationalen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (IASP) wird von neuropathischem Schmerz dann gesprochen, wenn eine Läsion oder Dysfunktion des zentralen oder peripheren Nervensystems die Ursache der Schmerzen darstellt. In den letzten Jahren ist durch die Analyse von Tiermodellen, humanexperimentellen und klinischen Untersuchungen eine wesentliche Erweiterung unseres Verständnisses neuropathischer Schmerzen entstanden (TÖLLE und BARON 2002).

Der neuropathische Schmerz entwickelt sich infolge von Beschädigung entweder des peripheren oder des zentralen Nervensystems. Anders als der normale Schmerz dient er nicht dem Dienst der Gefahrenerkennung. Er ist charakterisiert durch brennenden Spontanschmerz und/oder evozierten Schmerz verbunden mit Hyperalgesie und Allodynie (COLLINS und CHESSELL 2005). Anders als physiologischer Schmerz (nozizeptiver Schmerz) ist der neuropathische Schmerz nicht selbstlimitierend und damit nicht einfach zu behandeln. Die ätiologischen Ursachen für den neuropathischen Schmerz sind vielfältig und variieren im Auftreten. Auch klinisch besteht ein hoher Grad an Variabilität zwischen den Patienten in ihrer Reaktion auf die Behandlung. Die Pathophysiologie des neuropathischen Schmerz-Syndroms ist entsprechend komplex (PASERO 2004).

Gewebeverletzungen verursachen gewöhnlich einen Anstieg der Schmerzsensibilität, so dass normal schmerzhafte Reize schmerzhafter werden (Hyperalgesie) und dies tritt meist gemeinsam mit Schmerzen auf, die durch Nicht-noxische-Reize hervorgerufen werden (Allodynie) (ANDREW und GREENSPAN 1999).

Feinste, ubiquitär vorhandene Nervenendigungen, die normalerweise durch Temperatur und Berührungsreize kaum aktivierbar sind, werden nach einer Traumatisierung des Gewebes überempfindlich und reagieren schon auf geringste Reize (BRUNE und ZEILHOFER 2004).

Klinisch äußert sich dies als krankhaft gesteigerte Schmerzempfindlichkeit (Hyperalgesie), als Schmerzauslösung durch normalerweise harmlose, nicht schmerzhafte Reize (Allodynie) oder als spontane Schmerzen (SANDKÜHLER 2001).

Obwohl für entzündliche Schmerzen meist eine effektive Therapie besteht, ist die gegenwärtige Therapie für neuropathische Schmerzen noch immer ungenügend. Selbst der stärkste „Schmerzkiller“, Morphin, ist in der Klinik bei neuropathischen Schmerzen oft nicht oder unzureichend effektiv. Ein Verständnis der zugrunde liegenden Mechanismen des neuropathischen Schmerzes würde sicherlich Hoffnung für die zukünftige Entwicklung effektiver Therapien dieser schwer zu behandelnden Schmerzen liefern (UEDA und RASHID 2003).

Lang anhaltende Veränderungen der synaptischen Übertragungsstärke, Sensibilisierung von nozizeptiven Hinterhornneuronen und Umstrukturierung der synaptischen Verbindungen im Rückenmark führen zu Verstärkung und Chronifizierung von Schmerzen (SANDKÜHLER 2000).

Nach einer Nervenläsion kommt es nicht selten zu degenerativen Prozessen im nozizeptiven System. Nach BARON (2000) kann eine Degeneration nozizeptiver Strukturen eine Schmerzchronifizierung bewirken. Durch den Untergang nozizeptiver Neuronen kann eine anatomische Umorganisation synaptischer Strukturen im Hinterhorn ausgelöst werden, so dass intakte Berührungsaferenzen anatomisch neue Verbindungen mit zentralen nozizeptiven Neuronen ausbauen. Durch diese Fehlschaltung wird Aktivität in Berührungsaferenzen zu Schmerz (Allodynie). Völlig artfremde Neuronen sind unter diesen Bedingungen in der Lage, Schmerzreize zu vermitteln.

In den vergangenen Jahren ergaben vielfältige elektrophysiologische und molekularbiologische Untersuchungen Hinweise auf die Beteiligung peripherer und zentralnervöser Strukturen an der Entwicklung und Aufrechterhaltung von Sensitivierungsvorgängen, die in der Folge zu neuropathischem Schmerz führen können. Zu den heute diskutierten Mechanismen gehören: Änderung der Expression und Kinetik von Ionenkanälen primärer Afferenzen, verstärkte Wechselwirkungen des somatischen mit dem sympathischen Nervensystems, Spontanaktivität und verlängerte Entladungen spinaler Neuronen, zum Beispiel durch gesteigerte Kooperativität glutamaterger und peptiderger Neurotransmission und Phosphorylierung von Membranrezeptoren, anatomische Reorganisation der spinalen und

supraspinalen Verschaltung, Änderung der supraspinalen deszendierenden Kontrolle und Verlust der zentralen Inhibition durch niederschwellige Afferenzen (TÖLLE und BARON 2002).

Das nozizeptive System im Rückenmark steht physiologischerweise unter einer ständigen inhibitorischen Kontrolle, um eine nozizeptive Überaktivität zu vermeiden. Absteigende Bahnen aus dem Hirnstamm (z.B. dem periaquäduktalen Grau) hemmen mit den Transmittern Noradrenalin und Serotonin die Aktivität in nozizeptiven Hinterhornneuronen. Darüber hinaus üben GABAerge Interneuronen eine tonische Inhibition auf das Hinterhorn aus. Chronische nozizeptive Aktivität kann einen Funktionsverlust und sogar eine Degeneration dieser inhibitorischen Systeme bewirken, was zu einer unbeeinträchtigten Transmission nozizeptiver Impulse führt und so die Schmerzchronifizierung fördert (BARON 2003).

Nach IBUKI et al. (1997) kann abnormes schmerzverwandtes Verhalten, das periphere Nervenverletzungen begleitet, das Ergebnis von veränderter spinaler neuronaler Funktion sein. Der Langzeitverlust der inhibitorischen Funktion von GABA-Neuronen im Besonderen kann ein Mechanismus sein, der abnorme neuronale Hyperaktivität hervorruft, der zu übertriebenen sensorischen Reaktionen nach Nervenverletzungen führt.

Ein unmittelbares Ereignis im beschädigten Nerv ist die Aufrechterhaltung der spontanen afferenten Aktivität, die im Weiteren verstärkt zur Aufrechterhaltung der Schmerzen beiträgt. (XIE et al. 2005). XIE et al. (2005) zeigten in zwei Ratten-Modellen für neuropathischen Schmerz chronic constriction injury (CCI) und spared nerve injury (SNI), dass eine lokale temporäre Nervenblockade dieser afferenten Aktivität permanent die nachfolgende Entwicklung von thermaler Hyperalgesie und mechanischer Allodynie hemmt. Allerdings ist hier der Zeitpunkt wichtig. Die Nervenblockade muss wenigstens drei bis fünf Tage andauern und ist nur wirksam, wenn sie unmittelbar nach der Nervenschädigung einsetzt und nicht erst, wenn der neuropathische Schmerz sich entwickelt hat. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die frühe spontane afferente Faseraktivität der Schlüsselauslöser für die Entwicklung von Schmerzen ist und legen nahe, dass die spontane afferente Aktivität möglicherweise gebraucht wird für viele der späteren Veränderungen im sensorischen Neuron, Rückenmark und im Hirn, die bei neuropathischen Schmerz-Modellen beobachtet werden.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch SUNG und AMBRON (2004). Sie erklären den chronisch neuropathischen Schmerz nach Nervenverletzung oder Entzündung mit transkriptionsabhängigen Veränderungen von Neuronen. Während dieser Veränderungen entsteht oft eine Langzeit-Übererregbarkeit (long-term hyperexcitability = LTH) in primären Nozizeptoren, die noch lange nach Heilung der Läsion besteht. LTH ist gekennzeichnet durch

eine Herabsetzung der Schmerzschwelle und einer erhöhten Tendenz zur Freigabe von Aktionspotentialen.

Auch RO und CHANG (2005) sehen spezifische zelluläre und molekulare Veränderungen, die die Membranerregbarkeit betreffen und eine neue Genexpression nach Nervenverletzung bewirken, und damit eine erhöhte Reaktion auf künftige Stimulationen erlauben, als Ursache für den neuropathischen Schmerz.

HOGAN et al. (2000) untersuchten Veränderungen der Funktion im Ca^{++} -Kanal von sensorischen Neuronen infolge von Verletzung. Sie verglichen Ca^{++} -Ströme in 101 isolierten Wurzelganglien-Neuronen von 31 Ratten mit neuropathischem Schmerz mit Zellen von 25 Ratten mit normalen sensorischen Funktionen nach erfolgter Sham-Operation und kamen zu dem Schluss, dass eine veränderte Ca^{++} -vermittelte Signalübertragung in den verletzten sensorischen Neuronen zur Übererregbarkeit beitragen kann, die wiederum zum neuropathischen Schmerz führt.

SHIR und SELTZER (1990) erzeugten durch einseitige feste Ligatur des N. ischiadicus sympathisch abhängigen, neuropathischen Schmerz, der viele Monate anhielt und grundsätzlich denen beim Menschen ähnelte. Die an der Plantarseite der Hinterpfoten auftretenden sensorischen Abnormalitäten umfassten:

- 1) nozifensive Reaktionen auf wiederholte leichte Berührung (Allodynie);
- 2) bilaterale Reduktion der Rückzugs-Schwellen auf wiederholte Von-Frey-Haar-Stimulation (mechanische Hyperästhesie);
- 3) bilaterale Reduktion der Rückzugs-Schwellen auf CO_2 -Laser-Pulse; und
- 4) unilaterale Steigerung der Reaktionsdauer auf einen starken Laser-Hitze-Puls (thermale Hyperalgesie).

Sie bestimmten durch neonatale Capsaicin-Behandlung den Typ der verbliebenen afferenten Fasern im partiell beschädigten Nerven, der diese Störungen vermittelte. Capsaicin, das die meisten C- und einige $A\delta$ -Fasern im peripheren Nerven zerstört, hatte keinen Effekt auf die durch Berührung hervorgerufene Allodynie und mechanische Hyperästhesie, die durch die partielle Nervenverletzung entsteht. Daraus kann man schließen, dass die Störungen der Reizübertragung durch myelinisierte Fasern vermittelt werden. Im Gegensatz dazu blieb die Entwicklung thermaler Hyperalgesie bei den Capsaicin-behandelten Ratten nach partieller Nervenverletzung aus, was vermuten lässt, dass thermale Hyperalgesie durch partielle Nervenverletzung über Hitze-nozizeptive C-Fasern vermittelt wird.

FURUE et al. (2004) beschäftigten sich mit der sensorischen Verarbeitung und funktionaler Reorganisation sensorischer Transmission im spinalen Dorsalhorn. Das Dorsalhorn, beson-

ders die Substantia gelatinosa im Rückenmark, bekommt Input von dünnen primären Afferenzen, die überwiegend noxische Empfindungen übertragen. Schon hier wird die sensorische Information verarbeitet und verändert weitergeleitet.

ZIMMERMANN (2001) beschäftigte sich mit den physiologischen und biologischen Mechanismen des neuropathischen Schmerzes, der durch Verletzung oder Erkrankung des Nervensystems induziert wird. Tiermodelle für neuropathischen Schmerz verwenden meist eine Verletzung eines peripheren Nerven, deshalb lag der Fokus der Untersuchungen von ZIMMERMANN (2001) auf den Ergebnissen von Nervenverletzungsmodellen. Um sicherzustellen, dass Nervenverletzungsmodelle mit Schmerz verwandt sind, wurde das Verhalten der Tiere nach Nervenverletzung, zum Beispiel partielle/totale Nerventranssektion/Ligatur oder CCI, beurteilt. Das folgende beobachtete Verhalten bei solchen Tieren wird als Anzeichen für Schmerzen gesehen:

- a) Autotomie (beurteilt durch Zählen der zugefügten Wunden);
- b) Hyperalgesie (wie stark sind Rückzugsreaktionen auf moderate Hitzereize);
- c) Allodynie (zum Beispiel Rückzug als Reaktion auf nicht-noxische taktile oder Kältereize).

Diese Verhaltensweisen wurden genutzt um die Pharmakologie und Modulation von neuropathischem Schmerz zu studieren. Nervenfasern entwickeln abnorme ektopische Erregbarkeit an oder nahe der Stelle der Nervenverletzung. Zugrunde liegende Mechanismen sind z.B. Veränderungen der Verteilung von Na^+ -Kanälen oder abnorme Reaktionen auf endogenen Schmerz durch Cytokine wie $\text{TNF-}\alpha$.

Jede Veränderung der Reizübertragung durch eine lokale Nervenverletzung neigt dazu, sich sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem auszubreiten. Die Ausbreitung wird über unterschiedlichste Mechanismen vermittelt. Unter anderem sind beschrieben: Eine „upregulation“ (Hochregulierung) von nitric oxide synthase (NOS) in autotonisierten Neuronen, deafferente Hypersensibilität spinaler Neuronen nach afferentem Zelltod, Langzeit-Potenzierung spinaler synaptischer Transmission und Abschwächung zentraler schmerzinhibitorischer Systeme. Obwohl diese Prozesse der gesteigerten Erregbarkeit des Nervensystems als Strategie zur Kompensation funktionaler Defizite nach Nervenverletzung angesehen werden können, ist ihr Nebenprodukt eine ausgedehnte Sensibilisierung des Nervensystems. Die Folge sind Schmerz und Hyperalgesie. Nervenverletzungen und Nervensystemerkrankungen, z. B. im Rahmen von Viruserkrankungen, haben Apoptose von Neuronen im peripheren und zentralen Nervensystem zur Folge. Apoptose scheint neuronale

Sensibilisierung und Verlust des inhibitorischen Systems hervorzurufen und konsekutiv neuropathischen Schmerz (ZIMMERMANN 2001).

Nach SOMMER und SCHAFERS (1998) ist die Wallersche Degeneration mit Makrophagen-Einwanderung und Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen ein weiterer kritischer Faktor bei der Entstehung von Hyperalgesie im Tiermodell für neuropathischen Schmerz. Sie untersuchten einen Mäuse-Stamm mit verzögerter Wallerscher Degeneration im Vergleich zu C75/BL/Wld-Mäusen auf den zeitlichen Verlauf von mechanischer Allodynie und thermaler Hyperalgesie sowie das zeitliche Profil der Cytokin-Expression nach Nervenverletzung bei CCI. Ihre Ergebnisse weisen daraufhin, dass Makrophagen-Einwanderung und TNF-Produktion die Entwicklung thermaler Hyperalgesie und die regenerative Aktivität, die wiederum mechanische Allodynie hervorruft, bei peripherer Mononeuropathie beeinflussen.

Diese Ergebnisse unterstützen BENNETTs Aussage (2000), dass bei nahezu allen neuropathischen Schmerzzuständen durch periphere Nervenschädigung Strukturzerstörung und entzündliche Antwort die Pathogenese unterhalten.

Mittlerweile ist erwiesen, dass Schmerzen bei allen Säugetieren und Vögeln ähnlich wie beim Menschen verarbeitet werden (HENKE und ERHARDT 2001). Somit können Erfahrungen und Ergebnisse aus der Veterinärmedizin und aus Tierexperimenten weitgehend auf das Krankheitsgeschehen bei Menschen übertragen werden.

Die meisten Tests zur Ermittlung von Schmerzreizschwellen beim Tier sind nicht invasiv und sehr gut reproduzierbar. Aus jahrelangen Erfahrungen weiß man, dass mit diesen Tests Medikamentenwirkungen sehr gut evaluiert werden können und die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Auch aus ethischer Sicht sind diese Tests vertretbar, da die tatsächliche Belastung für die Versuchstiere niedrig ist, besonders auch im Vergleich zu den Standarduntersuchungen in anderen biomedizinischen Forschungsgebieten. Einfache Testsysteme, wie z.B. der Wärmeplattentest, sind für Hochdurchsatz-Screeningverfahren gut geeignet und werden von der pharmazeutischen Industrie zu diesem Zweck routinemäßig verwendet (KARSAK et al. 2002).

2.2 Chronic Constriction Injury (CCI) des Nervus ischiadicus

Das eingesetzte Schmerzmodell der chronic constriction injury (CCI) wurde von BENNETT und XIE (1988) etabliert und erzeugt neben einer Entzündung auch eine vaskuläre Kompression mit intraneuralem Ödem. Dabei setzt man vier lockere Ligaturen mit 4-0 cat-gut um den N. ischiadicus von Ratten, eng genug um den Nerv zu berühren, aber ohne die Blutzufuhr

zu unterbrechen. (In der vorliegenden Studie mit Mäusen werden drei Ligaturen mit in Alkohol eingelegter Seide (5-0) auf Höhe der Trifurkation gelegt.) Durch die Ligaturen wird der Nerv selbst nicht eingeschnürt, aber sie induzieren durch die Behinderung der Blutversorgung ein Ödem, das in seiner Ausbreitung durch die Ligaturen behindert wird. Damit erfolgt durch die Schwellung eine Selbststrangulation/Einengung des Nerven und ein fast gänzlicher Verlust der dicken myelinisierten Axone distal der CCI, aber weniger der dünnen myelinisierten und unmyelinisierten Fasern. Hyperalgesie und Allodynie entwickeln sich in 10 bis 14 Tagen zu einem Maximum (HOGAN 2002).

Es degenerieren hauptsächlich myelinisierte A δ -Fasern und zu geringen Teilen auch unmyelinisierte C-Fasern. Als Folge zeigen die Tiere postoperativ Hyperalgesie, Allodynie und möglicherweise spontanen Schmerz (BENNETT und XIE 1988).

Die CCI zählt nach KIM et al. (1997) mit der partial sciatic nerve ligation (PSL) und der spinal nerve ligation (SNL) zu den drei schon früh für Ratten entwickelten Schmerzmodellen. Sie verglichen in ihrer Studie den Zeitverlauf der Verhaltensmerkmale verschiedener Komponenten des neuropathischen Schmerzes und konnten zeigen, dass alle drei Modelle der peripheren Nervenverletzung anhaltenden und sich entwickelnden Schmerz mit ähnlichem Zeitverlauf erzeugen. Sie kamen zu dem Schluss, dass alle drei Modelle nützliche neuropathische Schmerzmodelle sind und möglicherweise verschiedene Gruppen humaner neuropathischer Schmerzpatienten repräsentieren.

An dem neuen tierexperimentellen sterilen Neuritismodell (CCI- Modell) konnten BENNETT und XIE (1988) zeigen, dass neben Axonschäden auch Entzündungsprozesse am peripheren Nerven bei schmerzhaften peripheren Neuropathien eine Rolle spielen. Nach Nervenläsionen kommt es zum Ödem, unter anderem in Folge endoneuraler Infiltration durch Immunzellen wie Granulozyten und Lymphozyten.

BENNETT und XIE (1988) riefen mit einer locker gesetzten Ligatur um den N. ischiadicus eine periphere Neuropathie hervor. Das postoperative Verhalten der Ratten zeigte Hyperalgesie, Allodynie und spontanen Schmerz. Hyperalgetische Reaktionen auf noxische Hitze waren am zweiten Tag nach der Operation eindeutig und hielten für zwei Monate an. Spontaner Schmerz zeigte sich durch verminderten Appetit und häufige spontane nozifensiven Reaktionen. Der betroffene Hinterfuß war bei einem Drittel der Ratten abnormal warm oder kalt und die Hälfte der Ratten entwickelte überlange Krallen auf der betroffenen Seite, was auf eine Schonung dieser Gliedmaße schließen ließ.

Anatomische und physiologische Studien zeigen, dass das hervorstechendste pathologische Merkmal ein Verlust der dicken myelinisierten Fasern distal der Ligatur mit vielen feinen

Veränderungen der dünnen myelinisierten Fasern ist. BASBAUM et al. (1991) führten, mit Blick auf die Beurteilung möglicher Veränderungen in unmyelinisierten Fasern, eine elektronenmikroskopische Analyse des N. ischiadicus zwei Wochen nach Setzen der Ligatur durch. Zu dieser Zeit zeigten die Tiere deutliche Hyperalgesie und mechanische und thermale Allodynie. Es wurden Gewebsquerschnitte der Region proximal und distal der Ligaturen untersucht. Übereinstimmend mit lichtmikroskopischen und elektrophysiologischen Studien fanden sie einen nahezu völligen Verlust der dicken myelinisierten Fasern distal der Ligaturen. Eine Phagozytose der großen Fasern war allgemein vertreten. Es gab auch deutliche Varianten im Schadensgrad der dünnen myelinisierten Fasern. In einigen Faszikeln verblieben viele dünne myelinisierte Axone, in anderen Faszikeln konnten keine gefunden werden. Wichtig war, dass sie auch signifikante Veränderungen im unmyelinisierten Faserspektrum fanden. Danach ergab sich eine Abnahme der unmyelinisierten Axone um 34% am distalen Nerven und um 71% am proximalen.

SHIMOYAMA et al. (2002) beschreiben in ihren licht- und elektronenmikroskopischen Untersuchungen ebenfalls schwere Schäden der myelinisierten Fasern und geringe Schäden der unmyelinisierten Fasern bei CCI-Mäusen.

Auch MUNGER et al. (1992) verursachten durch eine einschnürende Verletzung des N. ischiadicus bei Ratten eine schmerzhafte periphere Neuropathie, die derjenigen beim Menschen ähnelte. Der N. ischiadicus dieser Tiere wurde zehn Tage postoperativ untersucht, als die abnormalen Schmerzempfindungen fast maximale Stärke aufwiesen. Die Nerven der betroffenen Tiere wurden an mehreren Stellen untersucht. Einen Zentimeter proximal der Einschnürung und darüber hinaus waren sowohl myelinisierte als auch unmyelinisierte Axone unverändert. Näher an der Einschnürung war jedoch eine ausgedehnte Degeneration der myelinisierten Axone die Regel, ein Zeichen des endoneuronalen Ödems. Distal der Konstriktion war der Nerv einheitlich ödematös und zeigte eine vollständige Degeneration des Myelins sowie einen deutlichen Verlust dünner myelinisierter und unmyelinisierter Axone.

Die Ergebnisse von DAEMEN et al. (1998) zeigten, dass lockere Ligatur des N. ischiadicus eine entzündliche Reaktion in der ipsilateralen Hinterpfote auslöst, was höchstwahrscheinlich durch Freisetzung von Neuropeptiden der peripheren Endigungen von antidrom arbeitenden nozizeptiven C-Fasern vermittelt wurde.

Nach GABAY und TAL (2004) zeigte sich experimentelle schmerzhafte periphere Neuropathie, hervorgerufen durch CCI, in kutaner thermaler und mechanischer Allodynie des betroffenen Hinterbeins. Ihre histologischen Studien zeigten, dass die gravierendste pathologische Veränderung im CCI-Modell ein Verlust der dicken myelinisierten Fasern

distal der Verletzung ist. Sie verglichen elektrophysiologische Aufnahmen von Axonen im Zentrum der Läsion mit einer Kontrollgruppe und deren Verhältnis vom Vorkommen der A- und C-Axonen. Die Schlussfolgerung lässt vermuten, dass im CCI-Modell eine gleiche Reduktion der Anzahl von A- und C-Axonen stattfindet und ein gleich bleibendes Verhältnis beider Fasertypen erhalten bleibt.

NAKAMURA und MYERS (1999) untersuchten die Folgen von CCI am Nerven, indem sie das Verhältnis zwischen der Ausbildung von mechanischer Allodynie und der Reorganisation primär afferenter Endigungen in den sensorischen Laminae des spinalen Dorsalhorns bei Ratten untersuchten. Nach CCI entwickelte sich mechanische Allodynie im entsprechenden Fuß innerhalb von zwei Wochen und blieb während des Experiments für weitere zwei Wochen bestehen. Die Neuropathie der Nervenverletzung verursachte eine ausgedehnte Wallersch-ähnliche Degeneration der myelinisierten Fasern, aber verhältnismäßig wenige der unmyelinisierten Fasern.

JOU et al. (2004) untersuchten den Langzeiteffekt von CCI durch Analyse der elektrophysiologischen Veränderung, der Funktion des N. ischiadicus und dem Schmerzverhalten. Sie untersuchten 12 Ratten, die alle am fünften Tag thermale Hyperalgesie entwickelten und diesen Effekt bis zum 89. Tag zeigten. Die Veränderungen hielten an und zeigten statistisch keine weitere signifikante Verschlechterung oder Besserung. Damit konnten JOU et al. (2004) zeigen, dass die hervorstechendste elektrophysiologische Veränderung nach CCI ein Verlust der Leitfähigkeit über der verletzten Stelle zu den schnell leitenden Fasern ist, während die Leitfähigkeit der langsam leitenden Fasern erhalten blieb.

Ratten mit experimentell hervorgerufener schmerzhafter peripherer Neuropathie, verursacht durch Anlegen lockerer, einschnürender Ligaturen um den N. ischiadicus (CCI-Modell), zeigen Hitze-Hyperalgesie an der betroffenen Gliedmaße. Mit Hilfe elektrophysiologischer Aufnahmen von myelinisierten primären afferenten Axonen fanden TAL und ELIAV (1996) dabei spontane Impulsaktivität, die an der Stelle der Nerveneinschnürung entstand. Axone, die an der verletzten Stelle entnommen wurden (einige mit und einige ohne spontane Aktivität) wurden auf mechanische Reize übererregbar. Die Lage der mechanosensitiven Stellen veränderte sich fortschreitend über einen Zeitraum von 2 bis 14 Tagen vom proximalen zum distalen Teil der verletzten Stelle. Sie kamen zu dem Schluss, dass die spontanen Entladungen der verletzten primären afferenten Fasern zur abnormen Empfindung dieser Tiere beitragen können.

Somit zeigten elektrophysiologische Untersuchungen, dass nach der Läsion Spontanaktivität in den betroffenen Nervenfasern auftritt (XIE und XIAO 1990, KAJANDER und BENNETT

1992). Die spontane Nervenaktivität scheint wie bei erhöhtem nozizeptiven Input bei Entzündungen eine Sensibilisierung von spinalen Neuronen zu induzieren und aufrecht zu erhalten.

Nach SUNG et al. (2003) ist das zentrale glutamaterge System ein zentrales Element in der Pathogenese des neuropathischen Schmerzes. Dabei reguliert ein hoch aktives Glutamat-Transporter-System die Aufnahme endogenen Glutamats. Sie zeigten, dass sich beides, die Freisetzung und die Aufnahme-Aktivität von spinalem Glutamat nach CCI verändert und zum neuropathischen Schmerzverhalten bei Ratten beiträgt. CCI verursachte eine initiale Glutamat-Hochregulierung bis zu fünf Tage nach dem Eingriff, hauptsächlich innerhalb des ipsilateralen Dorsalhorns, gefolgt von einer Glutamat-Herabregulierung bei Untersuchungen am siebten und vierzehnten Tag mit Western-Blot und Immunhistochemie. Diese Ergebnisse zeigen, dass Veränderungen in der Freisetzungs- und Wiederaufnahme-Aktivität von spinalem Glutamat (d.h. durch die Regulation regionaler Glutamat-Homöostase) eine entscheidende Rolle bei der Auslösung und Aufrechterhaltung neuropathischen Schmerzen nach Nervenverletzung spielt.

2.3 mechanische Allodynie und thermale Hyperalgesie

Unter physiologischen Bedingungen blockieren die afferenten Impulse der dickeren, schneller leitenden Fasern die zentralen Schaltstellen für die später eintreffenden Impulse der dünneren, langsamer leitenden C-Fasern. Fällt bei einer partiellen Nervenschädigung die physiologische Hemmung aus, so entsteht eine Hyperalgesie, nämlich dann, wenn das Faserspektrum zugunsten der C-Fasern verschoben ist und ein selektiver Ausfall der A δ -Fasern vorliegt (KAESER 1972).

Nach ZEILHOFER (2005a) besitzen alle Organismen ein Sinnessystem zum Schutz vor potentieller Gewebeschädigung. Die Funktionstüchtigkeit dieses Systems ist lebenswichtig zum Schutz des Körpers. Allerdings kann unter pathologischen Umständen, nach schwerer Gewebeschädigung und bei entzündlichen oder neuropathischen Krankheiten, dieses System sensibilisiert werden und der Schmerz kann sich zur Krankheit entwickeln. So eine übertriebene Schmerzwahrnehmung (Hyperalgesie) kann in verschiedenen Stufen auftreten.

Allodynie wird durch Erregung empfindlicher Mechanosensoren hervorgerufen, deren Reizung normalerweise nur Berührungsempfindungen hervorrufen (HANDWERKER 2005).

Zur Feststellung von Hyperalgesie bildet die Anwendung thermaler noxischer Reize die Basis für einige weit verbreitete Tests. Beim klassischen Hot-plate-Test reagieren die Mäuse mit

Belecken der Pfote oder Wegspringen. Seit in den letzten Jahren unilaterale Veränderungen in der nozizeptiven Sensibilität festgestellt wurden sind Tests, denen eine unilaterale Applikation thermischer Hitzestrahlen auf die Plantarseite der Hinterpfoten zugrunde liegt, entwickelt worden (MENENDEZ et al. 2002).

Durch die Latenzverkürzung bis zum Wegziehen der Pfote infolge der CCI wird die thermische Hyperalgesie quantifiziert (BENNETT und XIE 1988).

PITCHER und HENRY (2000) versuchten ebenfalls eine Erklärung für mechanische Allodynie und spontanen Schmerz im Tiermodell für Neuropathie zu finden. Sie wollten in ihrer Studie untersuchen, ob es eine spinale neuronale Wechselbeziehung zwischen spontanem Schmerz und mechanischer Allodynie gibt. Die mechanische Allodynie wurde hierbei mit dem Von-Frey-Haar-Test überprüft und elektrophysiologische Experimente mit den Nervenfasern dieser Tiere durchgeführt. Ihre Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass CCI und Entzündungen vorwiegend zu phänotypischen Veränderungen in den myelinisierten Afferenzen führen.

SIVILOTTI und WOOLF (1994) stellten fest, dass der nozizeptive Pfotenrückzugsreflex unter der Kontrolle segmentaler inhibitorischer Mechanismen durch Glycin- und GABA-Rezeptoren vermittelt wird. Fehlt diese Hemmung, führen schon sehr niedrighschwellige Reize zum Pfotenrückzug.

Bei Säugetieren ist Glycin gemeinsam mit γ -Amino-Buttersäure (GABA) der hauptsächlich inhibitorische (hemmende) Transmitter im zentralen Nervensystem. Allerdings findet man GABA ubiquitär vor, während Glycin überwiegend in Rückenmark und Gehirn zu finden ist. Für die Entstehung neuropathischer Schmerzen werden neben funktionellen auch strukturelle Veränderungen im Sinne eines Verlustes GABAerger und/oder glycinerger spinaler Neuronen kontrovers diskutiert (siehe unten).

GABA und Glycin sind inhibitorische Neurotransmitter, die in vielen Neuronen im spinalen Dorsalhorn vorhanden sind. Die (intrathekale) Gabe von GABA- und Glycin-Rezeptor-Antagonisten erzeugt Allodynie. Zahlreiche Studien zeigten eine deutliche Reduktion GABA-immunreaktiver Neuronen im Dorsalhorn nach Nervenläsionen. Es wurde angenommen, dass dies mit einer Desinhibition verbunden ist und wesentlich zur Pathogenese des neuropathischen Schmerzes beiträgt (POLGÁR et al. 2003). Sie untersuchten über quantitative stereologische Analyse bei Ratten nach Nervenligatur (CCI) das Verhältnis von Neuronen in Lamina I, II und III im kontralateralen Dorsalhorn zum ipsilateralen Dorsalhorn. Die operierten Tiere zeigten alle deutliche thermale Hyperalgesie. Es wurde jedoch keine Veränderung der Anzahl der Neuronen mit GABA- oder Glycin-Immunreaktivität in Lamina

I-III des ipsilateralen Dorsalhorns im Vergleich zur kontralateralen Seite dieser Tiere beobachtet.

2.4 N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptoren

Der synaptische Überträgerstoff an allen afferenten A δ - und C-Fasern ist die erregende Aminosäure Glutamat. Dieser Neurotransmitter aktiviert (öffnet) Liganden-gesteuerte Ionenkanäle vom Typ der α -amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolepropionsäure (AMPA)-Rezeptoren. Dies führt zu einem Einstrom von Natriumionen und damit zur Erregung der postsynaptischen Zelle. Bei nicht oder nur schwach erregten Nervenzellen ist der ebenfalls Glutamat-gesteuerte NMDA-Rezeptorkanal durch Mg²⁺ blockiert und daher durch den Liganden Glutamat nicht aktivierbar. Nur wenn der Mg²⁺-Block durch starke Erregung der Membran aufgehoben wird, kommt es zu einem Einstrom von Ca²⁺ durch NMDA-Rezeptorkanäle in die Zelle. Der NMDA-Rezeptorkanal ist also sowohl liganden-, als auch spannungsgesteuert (SANDKÜHLER 2001).

Bei starken Schmerzreizen wird Glutamat in großen Mengen im Rückenmark freigesetzt und führt dann nicht nur zu einer kurz andauernden Erregung der Hinterhornneuronen, sondern kann auch lang anhaltende Veränderungen im Nervensystem induzieren. An diesen durch Glutamat ausgelösten Langzeitveränderungen ist die Aktivierung der Glutamatrezeptoren vom Subtyp der NMDA- Rezeptoren beteiligt. Die besonderen Eigenschaften des NMDA-Rezeptorkanals sind klinisch sehr bedeutsam (YAMAKURA und SHIMOJI 1999): Der NMDA-Rezeptorkanal ist ein für Calcium permeabler Ionenkanal. Calcium ist ein wichtiger Botenstoff, der eine Reihe von Zellfunktionen steuert und auch für die zentrale Sensibilisierung verantwortlich gemacht wird. Calciumionen strömen jedoch nur dann durch NMDA-Rezeptorkanäle in die Hinterhornneuronen, wenn zwei Bedingungen gleichzeitig erfüllt sind:

- 1) Glutamat muss an den NMDA- Rezeptor binden und
- 2) Die Nervenzelle, in deren Membran sich der NMDA-Rezeptorkanal befindet, muss stark erregt (depolarisiert) sein, um den Mg²⁺-Block des Kanals aufzuheben.

Bei starken Schmerzen sind in der Regel beide Bedingungen erfüllt, denn Glutamat wird aus den nozizeptiven Nervenfasern freigesetzt und führt zusammen mit der ebenfalls freigesetzten Substanz P zu einer starken Erregung der Neuronen (SANDKÜHLER 2001).

Glutamat-Rezeptoren sind an Vorgängen beteiligt, die mit Langzeitveränderungen der Signalverarbeitung im zentralen Nervensystem einhergehen, wie z.B. chronischer Schmerz

oder Toleranz und Abhängigkeit gegenüber Opioiden (DICKENSON 1997). Glutamat ist ein endogener Ligand sowohl für metabotrope als auch für ionotrope Rezeptoren, wobei im Folgenden der Schwerpunkt bei den NMDA-Rezeptoren liegen soll.

Es liegen eine Reihe von experimentellen und präklinischen Befunden vor, nach denen Hyperalgesie und Allodynie nach einem Gewebetrauma nicht nur durch Sensibilisierung der primären Afferenzen vor Ort der Schädigung verursacht werden, sondern auch durch eine NMDA-Rezeptor-vermittelte Änderung der synaptischen Erregbarkeit, vor allem auf Rückenmarksebene (DICKENSON 1990, 1997, SANDKÜHLER und LIU 1998).

Eine Inhibierung der NMDA-Rezeptoren wirkt dementsprechend antihyperalgetisch. Allerdings ist eine komplette Blockade der NMDA-Rezeptoren aufgrund ihrer vielfältigen physiologischen Aufgaben mit erheblichen Nebenwirkungen behaftet (psychosomatische Effekte, Beeinträchtigung des Erinnerungsvermögens, Ataxie und Beeinträchtigung der motorischen Koordination), so dass komplette Antagonisten zur Therapie und Prophylaxe von Hyperalgesie nicht in Frage kommen.

Der NMDA-Rezeptor ist ein tetramerer, transmembranöser Rezeptor mit multiplen Bindungsstellen für Kofaktoren und physiologischen Agonisten und Antagonisten. Der Kanal öffnet sich nach Bindung seines Liganden Glutamat, jedoch nur, wenn zusätzliche, endogene Kofaktoren wie Glycin (WALLACE und YAKSH 2000) und/oder D-Serin (MOHET et al. 2000), die beide an der Glycin-Bindungsstelle des NMDA-Rezeptors angreifen, vorhanden sind. Wird z.B. die Konzentration von D-Serin enzymatisch vermindert, ist die Neurotransmission am NMDA-Rezeptor deutlich reduziert (MOHET et al. 2000). Eine Blockierung dieser Glycin-Bindungsstelle könnte also antihyperalgetisch wirken (LODGE und JOHNSON 1990), ebenso eine Reduktion des Glycins im synaptischen Spalt bzw. in unmittelbarer Nähe der NMDA-Rezeptoren.

Der ionotrope Glutamaterezeptor NMDA wird allosterisch durch Glycin, einem Co-Agonisten, dessen Präsenz obligatorisch für die Rezeptoraktivität ist, moduliert. Der Transport von Glycin in glutamaterge Synapsen wird vom Glycintransporter1 (GlyT1), einem Na^+/Cl^- -abhängigen Carrier-Molekül ausgeführt. Die primäre Aufgabe von GlyT1 ist es, eine Glycin-Konzentration unter Sättigungslevel am postsynaptischen NMDA-Rezeptor zu erhalten (LUQUE et al. 1995, HARSING et al. 2006).

2.5 EGFP-GlyT2- Mäuse

Mit den EGFP-GlyT2-Mäusen soll die Frage, ob eine strukturelle Desinhibition im Sinne eines Verlustes GABAerger oder glycinerge Neuronen stattfindet, untersucht werden.

Enhanced green fluorescent protein (EGFP) wird unter der Kontrolle vom Promoter für das Glycintransporter (GlyT2)-Gen expremiert, der ein zuverlässiger Marker für glycinerge Neuronen ist (ZEILHOFER et al. 2005). Das EGFP wird unter Kontrolle vom Promotor des Glycin-Transporter 2 (GlyT2)-Gens bei bacterial artificial chromosome (BAC) transgenen Mäusen eingeschleust und kann so als zuverlässiger Marker für glycinerge Neuronen genutzt werden (POYATOS et al. 1997, ZEILHOFER et al. 2005). Der eingesetzte BAC Klon 365E4 ist 179,508 bp lang und enthält das vollständige GlyT2-Gen für GlyT2a und GlyT2b sowie zusätzlich 105kb und 21kb der DNA, die das 5'Ende von Exon 1, bzw. das 3'Ende vom letzten Exon einschließen. Das Vorhandensein der vollständigen GlyT2-codierenden Sequenz in BAC 365E4-Mäusen wurde mit polymerase chain reaction (PCR) und Subsequenzanalyse von Exon1 und 16 bestätigt. GlyT2 wird im ZNS in zwei Varianten expremiert: GlyT2a und GlyT2b, die sich in ihren N-Termini als Folge durch das Einsetzen des alternativen ersten Exons (1a oder 1b) unterscheiden. Um die EGFP-Expriemierung unabhängig von Exon 1a oder 1b zu machen, platzierten ZEILHOFER et al. (2005) EGFPcDNA in das Gerüst das Anfangs von Exon 2 des GlyT2-Gens und entfernten Exon 2 des GlyT2-Gens mit einer 2-stufigen homologen Rekombinationsprozedur.

Die Genotypisierung dieser Mäuse wurde mit PCR durchgeführt. In dieser Maus-Linie wird das Transgen in Mendel'scher Weise vererbt und die Mäuse gebären und entwickeln sich normal.

ZEILHOFER et al. (2005) konnten zeigen, dass die EGFP-Expriemierung weitgehend mit der GlyT2-Immunoreaktivität in Axonendigungen und Glycin-Immunoreaktivität in neuronalen Somata übereinstimmt. Das EGFP fluoresziert bei diesen Neuronen vom Somata bis zu den Dendriten und entfernten Axonendigungen. In bisherigen Studien mit peripheren Nervenläsionen wurden glycinerge Neuronen erst beim Aufbereiten des Gewebes markiert, wobei mit GlyT2-Antisera durch Immunreaktivität nur Axone sicher ausfindig gemacht werden konnten. So findet man in der Literatur auf diesem Gebiet gegensätzliche Ergebnisse. Obwohl Glycin als einer der wichtigsten inhibitorischen Transmitter im zentralen Nervensystem der Säugetiere angesehen wird, ist die Rolle der glycinergen Neuronen in den neuronalen Kreisläufen immer noch schlecht geklärt (ZEILHOFER et al. 2005). Dies ist auf die Schwierigkeit bei der Identifizierung dieser lebenden Zellen in Schnittpräparaten, bei

elektrophysikalischen Aufnahmen und Abbildungen ihrer axonalen Projektionen, zurückzuführen. Um die morphologische und funktionelle Analyse der glycinergen Neuronen zu erleichtern, haben ZEILHOFER et al. (2005) die in dieser Studie eingesetzten bacterial artificial chromosome (BAC) transgene Mäuse gezüchtet. Neuronen, die GlyT2-EGFP trugen waren demnach stark fluoreszent und ihre Dendriten und Axone konnten im genauen Detail betrachtet werden. Es wurden zahlreiche positive Neuronen im Rückenmark, Hirnstamm und Kleinhirn gefunden. Des Weiteren konnte in den Schnittpräparaten des Rückenmarks kein Unterschied in den funktionellen Möglichkeiten zwischen den EGFP-positiven und -negativen Neuronen festgestellt werden, was den Nutzen der visuellen Erkennung glycinergener Neuronen bestätigt, um ihre funktionelle Rolle in elektrophysiologischen Studien zu untersuchen.

Für einen neuen Ansatz zur Behandlung, bzw. Prophylaxe von neuropathischem Schmerz oder Hyperalgesie wird eine Verminderung der Glycinkonzentration durch Applikation eines selektiven Inhibitors des Glycintransporters diskutiert. Grundlage dafür ist, dass Glycintransporter durch Aufnahme bzw. Abgabe von Glycin die Aktivität des NMDA-Rezeptors modulieren. Glycin bindet dabei an ionotrope Glycinrezeptoren in der postsynaptischen Membran (ZAFRA et al. 1997).

Glycin-Rezeptoren sitzen in der Zellmembran von Neuronen, wo sie porenartige Ionenkanäle ausbilden. Nach Bindung des Transmitters Glycin öffnet sich der Kanal und Chlorid-Ionen strömen in die Zelle ein. Dieser Ionenfluss hemmt die Nervenreizleitung und dämpft das „Feuern“ der Neuronen (HARVEY et al. 2004). Glycin führt über bestimmte Glycinrezeptoren zum Chlorideinstrom und damit zur Hyperpolarisation und verminderten Erregbarkeit des zweiten Neurons. Genau diese Inhibition wird durch die Bildung von Prostaglandin-E2 (PGE2) im Rückenmark vermindert - es kommt zur Disinhibition (BRUNE und ZEILHOFER 2004).

Glycin ist ein Aminosäure-Transmitter, der vorwiegend im Rückenmark vorhanden ist und eng mit Interneuronen, die afferente Aktivität modulieren, verbunden ist. So haben SIMPSON und HAUNG (1998) schon früh gezeigt, dass niedrige regionale Glycinkonzentrationen (oder die Blockade normaler Glycinaktivität) die Schmerzschwelle erniedrigt. Eine intrathekale Glycininfusion steigert die Schmerzschwelle für neuropathischen Schmerz im Tiermodell. Sie wiesen auch über Immunhistochemie nach, dass bei CCI die Glycin-Rezeptoren bilateral im Dorsalhorn reduziert sind. Damit sind Glycin und verwandte Verbindungen potentiell effektive Wirkstoffe für die Behandlung chronischer Schmerzen beim Menschen.

Die Wirkung freigesetzten Glycins wird durch die Wiederaufnahme durch hochaffine Glycintransportermoleküle beendet. Die Glycintransportermoleküle sind in neuronalen und glialen Plasmamembranen lokalisiert (NEAL und PICKLES 1969). Die Glycin-Wiederaufnahme ist ein aktiver Prozess, der an den elektrochemischen Gradienten von Natriumionen gekoppelt ist, wodurch die Konzentration von Neurotransmittern im synaptischen Spalt kontrolliert wird (KUHAR und ZARBIN 1978). Bei Depolarisation der synaptischen Membran und Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration wird der Effekt des Glycintransporters quasi umgedreht, d.h. Neurotransmitter werden durch einen Calciumionen-unabhängigen Mechanismus aus der Zelle hinaus transportiert (ARAGON et al. 1988, ADAM VIZI 1992, ATTWELL et al. 1993, CHAUDHRY et al. 1998). Glycintransporter können durch Aufnahme bzw. Abgabe von Glycin die Aktivität des NMDA-Rezeptors modulieren (ZAFRA et al. 1997, ARAGON und LOPEZ-CORCUERA 2003).

Glycin und beta-Alanin werden aktiv über zentralnervöse synaptische Plasmamembranvesikel durch klassische Depolarisation (Freisetzung hoher K^+ -Konzentrationen und Veratridin) in das externe Medium freigesetzt. Diese Freisetzung wird durch Ca^{2+} -abhängige Prozesse ausgelöst. Messungen der Membrandepolarisation mit Tetraphenylphosphor-Aufnahmen zeigten eine Verbindung zwischen Veränderungen im Membranpotential und Stimulation des Efflux-Prozesses (ARAGON et al. 1988).

Glycin übt im zentralen Nervensystem, nach ARAGON und LOPEZ-CORCUERA (2003), viele Funktionen aus, als inhibitorischer Neurotransmitter (durch Aktivierung spezieller chloridpermeabler, ligandengesteuerter ionotrophischer Rezeptoren) ebenso als obligatorischer Co-Agonist mit Glutamat bei der Aktivierung von NMDA-Rezeptoren. In einigen Bereichen des zentralen Nervensystems wird Glycin gemeinsam mit GABA, dem vorherrschenden inhibitorischen Aminosäure-Neurotransmitter, freigesetzt. Die synaptische Wirkung von Glycin wird aktiv durch Natrium- und Chlorid-gekoppelte Glycin-Transporter beendet. Diese sind in glialen und neuronalen Plasmamembranen lokalisiert (ARAGON und LOPEZ-CORCUERA 2003).

Nach AHMADI et al. (2003) benötigen NMDA-Rezeptoren für die vollständige Aktivierung die Bindung von Glycin. Allerdings ist nicht bekannt, ob für die Modulation synaptischer NMDA-Reaktionen im Hirn Veränderungen des extrazellulären Glycins nötig sind. NMDA-Rezeptoren erfüllen eine wichtige Aufgabe bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen, einschließlich der Schmerztransmission. AHMADI et al. (2003) zeigten, dass mit synaptisch freigesetztem Glycin NMDA-Rezeptor-Ströme im superfizialen Dorsalhorn, einem Bereich der stark in den Schmerzprozess involviert ist, geöffnet werden.

Der GlyT2 ist überall im Rückenmark in axonalen Boutons vorhanden und seine laminare Verteilung gleicht denen Glycin-angereicherter Axone, die als glycinerg angesehen werden (SPIKE et al. 1997). Die immunhistochemischen Untersuchungen von SPIKE et al. (1997) bestätigten, dass der GlyT2 mit Glycin-angereicherten axonalen Boutons im superfizialen Dorsalhorn gleichzeitig auftritt.

Der Glycintransporter GlyT2 wird in glycinergen Neuronen exprimiert und ist am Abbruch inhibitorischer Neurotransmission an Strychnin-sensitiven glycinergen Synapsen beteiligt (EBIHARA et al. 2004).

In vorangegangenen Studien wurden Glycintransporter durch GlyT2-Antisera und deren Immunreaktivität nachgewiesen. Doch diese Untersuchungen brachten sehr unterschiedliche Ergebnisse hervor. So berichten SUGIMOTO et al. (1990) und HAMA et al. (1994) von einem Auftreten dunkler Neuronen nach induzierter Neuropathie, hervorgerufen durch einseitige CCI. Neuronen mit Anzeichen von Degeneration (Pyknose und Hyperchromatose; „dunkle Zellen“) waren deutlich vermehrt im lumbalen Dorsalhorn beider Seiten vorhanden. Das lumbal verstärkte Vorkommen dieser Zellen war ipsilateral deutlich größer als kontralateral. Die Meisten der dunklen Neuronen wurden im Bereich des N. ischiadicus in Lamina I-II gefunden (SUGIMOTO et al. 1990). HAMA et al. (1994) fanden bei Ratten zwei Wochen nach Ligatur des N. ischiadicus in spinalen Dorsalhornneuronen auf der ipsilateralen Seite der Nervenverletzung Anzeichen transsynaptischer Veränderungen („dunkle Neuronen“). Auch im kontralateralen Dorsalhorn wurden einige veränderte Neuronen gefunden. Die Verteilung dunkler Neuronen war im lumbalen Dorsalhorn auf die superfizialen Laminae I-III beschränkt. Ähnliche Ergebnisse zeigten KAWAMURA et al. (1997) sowie WHITESIDE und MUNGLANI (1998, 2001), die in ihren Studien apoptotische Zellen nachweisen konnten. KAWAMURA et al. (1997) erzeugten bei Ratten durch CCI des N. ischiadicus eine neuronale Degeneration im Dorsalhorn des lumbalen Rückenmarks. Die morphologische Veränderung zeigte das Auftreten von dunklen Neuronen, dargestellt durch Toluidinblau-Färbung. WHITESIDE und MUNGLANI (2001) zeigten, dass Zellen infolge von CCI, simultan zu dem Auftreten von Hyperalgesie, einer Apoptose unterliegen. Eine große Anzahl apoptotischer Zellen wurde acht bis zehn Tage nach CCI im ipsilateralen Dorsalhorn im Vergleich zur kontralateralen Seite, sowie bei Sham- und Kontrolltieren gefunden. Im Gegensatz dazu zeigen Studien von POLGÁR et al. (2003, 2004) keinen Beweis für einen Neuronenverlust nach erfolgter CCI. Sie führten eine quantitative stereologische Analyse des Verhältnisses von Neuronen in Lamina I, II und III bei Ratten im Dorsalhorn aus und konnten keine Veränderung der Neuronen in Lamina I-III des ipsilateralen Dorsalhorns

im Vergleich zur kontralateralen Seite dieser Tiere beobachten. Dieses Ergebnis unterschied sich nicht wesentlich von den Ergebnissen bei Sham- oder unoperierten Tieren. Das Resultat dieser Studie deutet an, dass für neuropathische Schmerzen im CCI-Modell kein wesentlicher Verlust von GABAergen oder glycinergen Neuronen in der Entstehung thermaler Hyperalgesie notwendig ist. In der Studie von POLGÁR et al. (2004) wurde ein Beweis für den neuronalen Tod mit Hilfe einer stereologischen Methode und NeuN-immun-Färbung gesucht. Hierzu wurde das Rückenmark von Tieren mit CCI- oder Sham-Operation sowie Tieren ohne Intervention untersucht. Die Anzahl der Neuronen in den Laminae I-III des ipsilateralen Dorsalhorns der Tiere mit CCI unterschied sich nicht wesentlich von denen der kontralateralen Seite, bzw. der Tiere mit Sham-Eingriff und nativer Tiere. Somit geben diese Ergebnisse keinen Beweis für das Auftreten eines signifikanten Neuronentods im Dorsalhorn bei diesem Modell.

Mittlerweile weiß man, dass glycinerge Synapsen sich nicht nur auf das Rückenmark und das Stammhirn beschränken. Es wurden präsynaptische Abläufe bei der Glycinfreisetzung und –aufnahme, sowie die Struktur und Funktion postsynaptischer Rezeptoren ebenso untersucht wie Faktoren (prä- und postsynaptisch), die die Stärke der glycinergen Inhibition kontrollieren. Es ist mittlerweile bewiesen, dass im unreifen Hirn glycinerge Synapsen exzitatorisch vorkommen können und dass einige inhibitorische Synapsen GABA und Glycin gemeinschaftlich freisetzen können. Außerdem wird vermutet, dass Glycin auch als Neuromodulator dienen kann. Das Vorkommen verschiedener Subtypen postsynaptischer Glycinrezeptoren mit unterschiedlichen funktionellen Möglichkeiten wurde in umfassenden molekularen Studien gezeigt (LEGENDRE 2001).

Auch BERGERON et al. (1998) gingen davon aus, dass aufgrund der Entdeckung von Glycintransportern in ZNS und Peripherie, der Glycintransport für die NMDA-Rezeptorfunktion durch die Kontrolle der Glycinkonzentration an den NMDA-Rezeptor-modulierten Glycinstellen von Bedeutung ist.

Glycin übernimmt wichtige Neurotransmitter-Funktionen auf inhibitorische und exzitatorische Synapsen im vertebrealen Zentralnervensystem. Die effektiv synaptische Konzentration von Glycin wird von Glycintransportern (GlyTs) reguliert, die die Wiederaufnahme in Nervenendigungen benachbarter Gliazellen vermitteln. Glycintransporter gehören zu der Familie der Na^+/Cl^- -abhängigen Transporter, deren Aktivität und subzellulären Verteilung durch Phosphorylierung und Interaktionen mit anderen Proteinen reguliert wird (EULENBURG et al. 2005).

Glycintransporter werden gegenwärtig in zwei verschiedene Klassen (mit sechs Subtypen) eingeteilt, den Glycintransporter 1 (GlyT1a-d) und den Glycintransporter 2 (GlyT2a+b). Biochemisch unterscheiden sich die beiden Moleküle durch Affinität zu Sacrosin, das ein Substrat von GlyT1 ist (ein schwacher selektiver Inhibitor), aber nicht mit GlyT2 interagiert (GUASTELLA et al. 1990). GlyT1 findet sich meist in Astrozyten-ähnlichen Perikarya in der grauen und weißen Substanz, während GlyT2 in präsynaptischen Terminalen und in der Glia vorkommt (ARAGON und LOPEZ-CORCUERA 2003). Topografisch kann GlyT2 im Hirnstamm und im Rückenmark nachgewiesen werden, GlyT1 dagegen eher im Großhirn (MALLORGA et al. 2003). Auffälligerweise findet sich GlyT1 in Arealen ohne Strychnin-sensitive Glycinrezeptoren (BOROWSKY et al. 1993, KIM et al. 1994, ZAFRA et al. 1995). Damit wird seine potentielle Bedeutung für die Kontrolle der lokalen Glycinkonzentration in der Nähe von NMDA-Rezeptoren unterstrichen (ARAGON und LOPEZ-CORCUERA 2003). Neben dem selektiven GlyT1-Hemmer Sacrosin ist kürzlich auch dessen Abkömmling ALX 5407 beschrieben worden (AUBREY und VANDENBERG 2001, ATKINSON et al. 2001, MALLORGA et al. 2003). ALX 5407 inhibiert selektiv und offensichtlich lang anhaltend den Glycintransporter durch GlyT1. Die Substanz ist ein nicht-kompetitiver Hemmer von GlyT1b (AUBREY und VANDENBERG 2001). ALX 1405 und ALX 1393 sind Hemmer des GlyT2 (LECHNER et al. 2000, XU et al. 2005).

Es ist unklar, ob die durch Einsatz von Glycintransporter-Hemmern regulierte Glycinkonzentration eher pronozizeptiv (z.B. über Aktivierung exzitatorischer NMDA-Rezeptoren) oder eher antinozizeptiv (z.B. über inhibitorische Strychnin-sensitive Glycin-Rezeptoren) wirkt. Vermutlich hängt der Effekt wie beim Nocistatin von der applizierten Dosis ab. Eine erste Veröffentlichung (= Kongressmitteilung), in der von einem Hemmer des GlyT2 (nämlich ALX 1405 oder ALX 1393) nach intrathekaler Gabe beim Tier berichtet wurde, lässt eher auf eine antinozizeptive Wirkung schließen (LECHNER et al. 2000).

So gehen XU et al. (2005) davon aus, dass die Hemmung des GlyT1 durch Sacrosin überall das Auftreten geringer inhibitorischer postsynaptischer Ströme durch die Aktivierung präsynaptischer Glycin-Rezeptoren steigert. Dagegen verändert eine Hemmung des GlyT2 durch ALX 1393, durch Verschiebung der Balance zwischen inhibitorischen Transmittern in Vesikeln gegen GABA, das Verhältnis von glycinergen, gemischten und GABAergen geringen inhibitorischen postsynaptischen Strömen. Für die Schmerzforschung könnten beide Transporter von Interesse sein: GlyT1 (bzw. dessen Hemmung), da dieser Transporter die Glycinkonzentration am NMDA-Rezeptor beeinflusst; GlyT2 (bzw. dessen Hemmung), da er

mit dem inhibitorischen glycinergen System interagiert, das Hyperalgesie und Allodynie bei experimentellem Schmerz im Tiermodell beeinflusst.

Um die Beladung von Speichervesikeln mit Neurotransmitter für nachfolgende Übertragungsvorgänge zu sichern, wird der neuronale Glycintransporter GlyT2 essentiell für die Wiederaufnahme von Glycin in die vorgeschaltete Nervenendigung benötigt. Der in Gliazellen exprimierte GlyT1 hingegen entfernt das bei Erregung in den synaptischen Spalt freigesetzte Glycin und beendet so den Übertragungsvorgang.

GlyT2 unterscheidet sich von GlyT1 sowohl in der molekularen Struktur und Gewebespezifität, als auch in pharmakologischen Eigenschaften. LIU et al. (1993), JURSKY und NELSON (1995) sowie ZAFRA et al. (1995) konnten GlyT2 speziell im Rückenmark, Stammhirn und in geringerem Ausmaß im Zerebellum nachweisen. Ihre Untersuchungsergebnisse wiesen darauf hin, dass GlyT2 eine Hauptrolle beim Abbruch des inhibitorischen Effekts von Glycin im Stammhirn und Rückenmark von Wirbeltieren übernimmt.

BETZ et al. (2006) zeigten mit ihren genetischen Untersuchungen, dass beide, GlyT1 und GlyT2, für ZNS-Funktionen essentiell sind. Sie konnten dies mit dem letalen Phänotyp der jeweiligen Knockout-Mäuse zeigen. So sind Mäuse, die nur ein einzelnes GlyT1-Allel exprimieren, phänotypisch normal, aber können erhöhte NMDA-Rezeptorfunktion aufweisen. GlyT2 ist an glycinergen Nervenendigungen stark angereichert und die Anzahl der GlyT2 in der präsynaptischen Plasmamembran wird vermutlich durch Ca^{++} -getriggerte Exocytose und Internalisation reguliert.

Dass die glycinergen Rezeptoren möglicherweise eine wichtige Rolle spielen, haben AHMADI et al. (2002) schon vorher vermutet. Sie untersuchten die Effekte von Prostaglandin E2 (PGE2) auf die schnelle synaptische Transmission von Neuronen bei Ratten im Dorsalhorn des Rückenmarks und konnten den inhibitorischen Glycinrezeptor als ein spezifisches Ziel von PGE2 identifizieren. Sie zeigten, dass PGE2 in geringen nanomolaren Konzentrationen die inhibitorische glycinerge synaptische Transmission reduzierte, während die GABA-, AMPA- und NMDA-Rezeptor-vermittelte Transmission unverändert blieb. Durch diesen Mechanismus kann PGE2 die Transmission der nozizeptiven Eingabe über das Dorsalhorn im Rückenmark zu den höheren Hirngebieten, wo der Schmerz bewusst wird, erleichtern.

Veränderungen der synaptischen Transmission innerhalb des spinalen Dorsalhorns spielen auch nach ZEILHOFER (2005b) eine Schlüsselrolle in der Entwicklung von neuropathischem Schmerz. Nach ZEILHOFER (2005b) haben spezifische Funktionen der inhibitorischen gly-

cinergen und GABAergen Neurotransmission in der Entstehung von entzündlichen und neuropathischen Schmerzen Bedeutung. Der zentrale Bestandteil der entzündlichen Schmerzen entsteht durch eine Desinhibition in Neuronen des Dorsalhorns, die von der glycinergen Neurotransmission durch den Entzündungsmediator PGE₂ unterstützt wird. PGE₂ aktiviert Prostaglandin E-Rezeptoren des EP₂-Subtyps und führt zu einer Proteinkinase-A-abhängigen Phosphorylierung sowie einer Inhibition des Glycin-Rezeptors mit $\alpha 3$ -Subeinheit. Dieser wird deutlich im superfizialen Dorsalhorn exprimiert, wo nozizeptive Afferenzen enden. Andere, wahrscheinlich sehr ähnliche, desinhibitorische Mechanismen mögen ebenso zum abnormalen Schmerzaufreten nach peripherer Nervenverletzung beitragen (ZEILHOFER 2005b).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1 Zielsetzung

Ziel der Arbeit ist es, zu beantworten, ob es in Folge von induzierter Neuropathie durch chronic constriction injury (CCI) zu einem Verlust glycinerg spinaler Neuronen kommt.

In der vorliegenden Studie soll bei bacterial artificial chromosome (BAC)-transgenen Mäusen, die enhanced green fluorescent protein (EGFP) unter der Kontrolle des Glycin-Transporter 2 (GlyT2)-Promotors spezifisch in glycinergen Neuronen exprimieren und nach Neuropathieinduktion untersucht werden, ob sich die Anzahl glycinerg Neuronen im Vergleich zu Kontrolltieren verändert.

Mithilfe der eingesetzten GlyT2-EGFP-Mäuse mit endogener Fluoreszenz soll es möglich sein eine genauere quantitative Auswertung zu erhalten. Bei diesen endogen markierten Tieren sind nicht nur die Somata der Nervenzellen, sondern auch die Dendriten und entfernten Axone leicht zu erkennen.

Bei den GFP_{GlyT2}-Mäusen handelt es sich um Individuen, die gentechnisch so modifiziert wurden, dass das eingeschleuste Gen für EGFP den selben Promotor trägt wie das Gen welches GlyT2 exprimiert. Das heißt, bei diesen Tieren sind die Neuronen, die den GlyT2 tragen, mit EGFP markiert.

In den Versuchen werden Tiere die älter als 4 Monate sind bewusst nicht eingesetzt, da sie möglicherweise eine Eigenfluoreszenz entwickeln und damit eine genaue Auswertung der Ergebnisse nicht gewährleistet werden kann.

Für die vorliegende Studie soll eine signifikante Schmerzschwellenerniedrigung nach CCI-Intervention bei GlyT2_{GFP}-Mäusen erreicht werden. Nach einer Perfusionsfixation der getesteten und operierten Tiere werden mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung Rückenmarksschnitte aus der lumbalen Region L4/L5 von einer Dicke von 16 µm mit dem Kryostaten bei -20° Celsius angefertigt. Danach erfolgt eine Untersuchung der angefertigten Schnitte mit dem Fluoreszenzmikroskop. Die Schnitte werden digital gespeichert und die jeweils letzten zehn Rückenmarksschnitte der einzelnen Tiere ausgedruckt und die darin vorhandenen fluoreszierenden Neuronen ausgezählt. Anschließend wird analysiert, ob quantitative Unterschiede zwischen Tieren mit CCI im Vergleich zu Kontrolltieren (Tiere ohne Intervention) bzw. Sham-operierten Tieren sichtbar sind.

Das Tierversuchsvorhaben wird gemäß §8 des Deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i.d.F. vom 25.05.1998) durch die Regierung von Nordrhein-Westfalen genehmigt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Vorversuche werden je eine männliche und eine weibliche C57BL/6-Maus (Tierversuchsanlage Düsseldorf) sowie drei weibliche und zwei männliche Wildtyp(wt)-Mäuse vom Stamm 3010, wie sie in den Hauptversuchen verwendet werden, mit Körpergewichten zwischen 24 und 30g, ca. 4 Monate alt, untersucht.

In den darauf folgenden Hauptversuchen werden 32 GFP^{GlyT2}-Mäuse (3010-Stamm) mit Körpergewichten zwischen 22 und 32 g (ebenfalls ca. 4 Monate alt) eingesetzt.

Die GlyT2-EGFP-Mäuse werden in der Tierversuchsanstalt Düsseldorf gezüchtet. Die ersten Zuchtpaare hierfür wurden im Rahmen einer Kooperation mit Herrn Prof. H.U. Zeilhofer, vom Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Universität Erlangen-Nürnberg, zur Verfügung gestellt. Ebenso erfolgte die Genotypisierung dieser Tiere dort.

Die Tiere werden in der Tierversuchsanlage Düsseldorf in Makrolonkäfigen Typ 2 (kurz) auf entstaubtem Fichten-Weichholzgranulat (Fa. Rettenmaier & Söhne GmbH u. CoKG, Resenberg), das zweimal wöchentlich gewechselt wurde, in Gruppen mit bis zu vier Tieren bei einer geregelten Raumtemperatur von 22°C (+/- 2°C) und einer Luftfeuchte von 55 % (+/-10%) gehalten. Die Kunstlichtbeleuchtung gibt bei ~ 300 Lux in 1 m Höhe einen Tag-Nacht-rhythmus im Wechsel von jeweils 12 Stunden vor.

Futter steht den Tieren in pelletierter Form (Alleinfutterpellets für Ratten und Mäuse, 10mm, der Fa. Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und entkeimtes Trinkwasser (ozonisiert, mit HCl angesäuert mit pH 2,6 - 3,0) ad libitum zur Verfügung.

Die transgenen Tiere werden in Räumen gehalten, getestet und operiert, die den S1-Voraussetzungen entsprechen.

3.2.2 Versuchsplan

3.2.2.1 Vorversuch

In den Vorversuchen werden 2 C57BL/6- und 5 wt-Mäuse des 3010-Stammes einer chronic constriction injury (CCI)-Operation (siehe unten) unterzogen, wobei eine Testung der mechanischen Allodynie (Von-Frey-Haar-Test) und thermalen Hyperalgesie (Plantartest^R) präoperativ und dann jeweils am 7., 10. und 14. Tag und bei vier von den hier eingesetzten Tieren nochmals am 21. Tag nach dem Eingriff (CCI oder Sham, siehe S.28) vorgenommen wird. Diese postoperativen Testungen werden in den Vorversuchen mehrmals durchgeführt, um festzustellen, zu welchem Zeitpunkt die Allodynie und die Hyperalgesie am ausgeprägtesten sind. Damit kann ein genauer Zeitpunkt für die Testung der Hauptversuche festgelegt werden.

Zudem dient die Testung zur Bestätigung, dass diese hier untersuchten transgenen Mäuse eine ähnlich ausgeprägte Neuropathie wie die „gewöhnlichen“ C57BL/6-Mäuse, die in zahlreichen Studien beschrieben werden, entwickeln.

Zur Testung der mechanischen Allodynie werden die Tiere in Plexiglastischen (31,5cm x 31,5cm x 31cm) mit einem Boden aus Drahtgeflecht (Maschenweite 5mm x 5mm) gesetzt, in denen sie sich ein bis zwei Stunden eingewöhnen konnten, bevor die Testung vorgenommen wird. (Diese lange Eingewöhnungszeit ist bei diesen Versuchen nötig, da die Tiere in einem anderen Raum getestet als gehalten werden und vorher nicht mit den Kästen vertraut sind.) Nachdem die Tiere ruhig in den Kästen sitzen, kann die mechanische Allodynie mit Hilfe der Von-Frey-Monofilamenten getestet werden. Hierbei handelt es sich um eine Reihe von Nylon-Monofilamenten mit zunehmender Stärke und Durchmesser, die mit einer definierten Kraft auf den angesetzten Druckpunkt wirken. In den Testungen kommt ein standardisiertes Semmes-Weinstein-Von-Frey-Haar-Set (Stoelting, Wood Dale, IL, USA) zum Einsatz. Die Von-Frey-Haare werden von unten langsam durch die Öffnungen des Drahtmaschengeflechts an die Hinterpfote herangeführt. Man übt mit ihnen einen Druck auf die plantare Oberfläche der Hinterpfoten aus, wobei sich das Monofilament nicht biegen darf. Die mechanische Reizung erfolgt in der Mitte der Hinterpfote an einer Stelle zwischen den Ballen, da der Mittelfuß durch den N. ischiadicus innerviert wird. Die Testung erfolgt in aufsteigender Stärke der Haare, wobei jedes Haar dreimal in Abständen von zehn bis dreißig Sekunden abwechselnd an beiden Hinterpfoten getestet wird. Dabei gibt es keine feste Regel, ob man rechts oder links zuerst testet. Die Ergebnisse werden daraufhin nach folgendem Score notiert:

0 = keine Reaktion

1 = langsame Reaktion

2 = schnelle Reaktion

Als positive Reaktion werden Wegspringen, Schütteln, Beknabbern oder Belecken der Hinterpfote, sowie Wegziehen der Pfote gewertet. Verhaltensreaktionen wie Putzen, auf die Hinterbeine stellen und Weglaufen werden nicht als positiv gewertet.

Die thermische Hyperalgesie wird anhand der modifizierten Methode nach HARGREAVES et al. (1988), mit einem Wärmereiz-Test, Plantartest^R (Biological Research Apparatus, Ugo Basile, Comerio VA, Italy), überprüft. Auch hier sitzen die Tiere in Plexiglaskisten (21,5cm x 17cm x 14,5cm), allerdings auf einer transparenten Plexiglasplatte, unter der sich eine bewegliche Infrarotlichtquelle befindet. Diese kann mit definierter Stärke (hier: IR Intensität 35) auf die entsprechende laterale Fußsohle der jeweiligen Hinterpfote gerichtet werden. Die I.R.-Intensität wird in Watt/sek. oder Joule angegeben und entspricht der Energie, die der I.R.-Generator nach Betätigung des Startknopfes freisetzt.

Für die genaue Positionierung des Infrarotlichtstrahls befindet sich ein Fadenkreuz über der Lichtquelle. Eine Photoelektrode detektiert das Wegziehen der Pfote und gibt die Zeit vom Einschalten der Quelle bis zum Wegziehen mit einer Genauigkeit von 0,1 Sekunden an. Der digital angezeigte Wert wird dokumentiert. Das Gerät schaltet sich automatisch nach einer Hitzeapplikation von zwanzig Sekunden ab, um eine mögliche Gewebeschädigung zu verhindern. Auch hier werden rechte und linke Pfote im Wechsel getestet, wobei zwischen den einzelnen Testungen fünf bis zehn Minuten vergehen. Es werden jeweils sieben Werte von jeder Pfote bei den einzelnen Testungen festgehalten.

Nach der ersten Testung (baseline) erhalten die Tiere, unter sterilen Kautelen, eine CCI-Intervention, entsprechend BENNETT und XIE (1988).

Hierfür werden die Mäuse mit Pentobarbital (Nembutal^R 60 mg/kg) intraperitoneal narkotisiert. Nach Eintreten der chirurgischen Toleranz, die mit Flexions- und Schwanzspitzentests überprüft wird, rasiert und desinfiziert man die Tiere am linken Schenkel. Dann erfolgt in Seitenlage ein ungefähr 1,5cm langer Hautschnitt ca. 5mm kaudal des linken Hüfthöckers nach ventral und eine Immobilisation der Haut mit der Metzenbaum-Schere. Der M. quadrizeps major wird, so atraumatisch wie möglich, im Verlauf der weißen Linie getrennt und der darunter liegende N. ischiadicus vorsichtig von den umgebenden Strukturen freipräpariert. Dabei sollen die Blutgefäße, die den Nerven versorgen, nicht verletzt werden.

Um den Nerv werden dann vorsichtig proximal der Trifurkation drei lockere Ligaturen im Abstand von etwa 1 mm mit 5-0 Seide, die in Ethanol eingelegt war, gelegt. Der Nerv soll dabei nur insoweit konstringiert werden, dass der Blutstrom der oberflächlichen Gefäße reduziert, jedoch nicht komplett unterbunden wird. Hierzu wird der Faden nur soweit mit dem Nerv in Kontakt gebracht, dass der Fuß des Tieres leicht beim Anlegen der Ligatur zuckt. Danach werden die Enden der Ligaturen soweit wie möglich gekürzt, um eine unnötige zusätzliche Reizung des umliegenden Gewebes zu vermeiden. (Diese locker angelegten Ligaturen verursachen ein intraneurales Ödem, dass eine Selbststrangulation des Nerven zur Folge hat (BENNETT und XIE 1988).) Danach fügt man den Muskel mit einer Knopfnah wieder zusammen und legt eine Hautnaht mit 4-0 Vicryl^R an.

Die Tiere der „Sham“-Gruppe erhalten eine Sham-Operation (sozusagen eine „Schein“-Operation). Da diese als Kontrolle dient, wird bei den betroffenen Tieren wie für eine CCI-Intervention mit derselben Narkose der N. ischiadicus freipräpariert und mobilisiert, aber es werden keine Ligaturen angelegt. Der Nerv wird ohne Intervention belassen und Muskel und Haut wie bei den anderen Tieren wieder adaptiert.

Während der Operation und in der Aufwachphase werden die Tiere auf einer Wärmflasche warm gehalten, um eine Hypothermie zu vermeiden. Die Einstreu des Käfigbodens ist zum Schutz der Operationswunde vor Irritationen mit Zellstoff ausgelegt.

Wasser und Futter stehen den Tieren nach dem Eingriff ad libitum zur Verfügung. Des Weiteren werden am Folgetag das Verhalten und der Allgemeinzustand der Tiere überprüft um sicher zu gehen, dass die Tiere die Operation und Narkose gut überstanden haben.

Nach der Operation soll zu den obengenannten Zeitpunkten geprüft werden, ob sich die Schmerzschwellen im Vergleich zu den vor der Operation ermittelten Werten verändert haben, bzw. zu welchem Zeitpunkt die Schmerzschwellen signifikant erniedrigt sind.

Tab. 3-1: Übersicht über die Versuche

Versuchsordnung	Eingriff	Testung	Anzahl der getesteten Tiere				Fixierung & Auszählung	n
			7.d post OP	10.d post OP	14.d post OP	21.d post OP		
Vorversuch	CCI	Plantartest	7	7	7	4	nein	0
		v.Frey	5	5	5	2	nein	0
Hauptversuch	ohne Eingriff	Plantartest	0	0	0	0	ja	12
		v.Frey	0	0	0	0	ja	12
	CCI	Plantartest	0	0	10	0	ja	10
		v.Frey	0	0	10	0	ja	10
	Sham	Plantartest	0	0	10	0	ja	10
		v.Frey	0	0	10	0	ja	10

ohne Eingriff= Kontrollgruppe; Plantartest= thermische Testung; v.Frey= mechanische Testung; d= Tag; n= Anzahl der Tiere mit ausgewerteten Rückenmarksschnitten (alle präoperativ getestet)

3.2.2.2 Hauptversuch

Im Hauptversuch werden ausschließlich GFPGLyT2-Mäuse eingesetzt und in drei Gruppen, mit jeweils 10 bis 12 Tieren unterteilt. Die Einteilung der Mäuse zu den einzelnen Versuchsgruppen erfolgt dabei rein zufällig.

Kontroll-Gruppe: 12 Tiere ohne Intervention als Kontrolle.

CCI-Gruppe: 10 Tiere mit CCI-Operation.

Sham-Gruppe: 10 Tiere mit CCI-Sham.

Ansonsten gleicht das Vorgehen dem in den Vorversuchen. Allerdings werden im Hauptversuch alle Tiere formalinfixiert und von den entnommenen Rückenmarkssträngen werden Schnitte angefertigt, die dann mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer fünffachen Vergrößerung untersucht und digital gespeichert werden.

Bei der CCI-Gruppe werden nur Tiere ausgewertet, die nach der CCI-Intervention auch eine signifikante Schmerzschwellenwerterniedrigung zeigen. Die Tiere werden hierfür zwischen dem 11. und 14. Tag nach der Operation, also nur einmal, getestet (in Tab. 3-1 alle unter 14d post OP aufgeführt). Tiere, bei denen eine Schwellenwerterniedrigung festgestellt wird, perfundiert man zur Fixation am Tag nach der erfolgten Testung mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung, um im Anschluss Rückenmarksschnitte von 16µm anzufertigen.

Die Fixierung wird direkt am nächsten Tag durchgeführt, um den Zeitpunkt der Testung, die eine thermale Hyperalgesie und mechanische Allodynie bestätigt, festzuhalten. Hierbei interessiert der lumbale Bereich, der der Austrittsstelle des N. ischiadicus zugeschrieben wird (L4/ L5). Die Schnitte werden in VECTASHIELD^R Mounting Medium eingebettet und eingefroren.

Die Tiere der Kontrollgruppe werden ohne vorherige Testungen fixiert und vom Rückenmark dieser Tiere Schnitte angefertigt. Sie werden deshalb vor der Fixierung nicht getestet, um zu sehen, ob allein die Schmerztestung (bei der Sham-Gruppe) einen Effekt hat.

Die Schnitte untersucht man im Fluoreszenzmikroskop mit dem Grünfilter.

Die Schnitte werden bei einer fünffachen Vergrößerung betrachtet, wobei der gesamte Querschnitt der grauen Substanz in seiner charakteristischen H-Form sichtbar ist und digital (tif-Format) gespeichert wird.

Für die Auszählung der einzelnen Neuronen werden die abgespeicherten Querschnitte ausgedruckt und in Quadranten unterteilt, wobei der Zentralkanal als Mittelpunkt dient. Die Neuronen werden in den einzelnen Quadranten und im gesamten Schnitt gezählt und die so erhaltenen Mittelwerte verglichen.

Mit den Tieren der Sham-Gruppe wird ebenso verfahren.

Bei der Auszählung erhalten die Quadranten folgende Nummerierung:

1. Quadrant: oben links = linkes Dorsalhorn
2. Quadrant: oben rechts = rechtes Dorsalhorn
3. Quadrant: unten rechts = rechtes Ventralhorn
4. Quadrant: unten links = linkes Ventralhorn

Querschnitt durch das Rückenmark

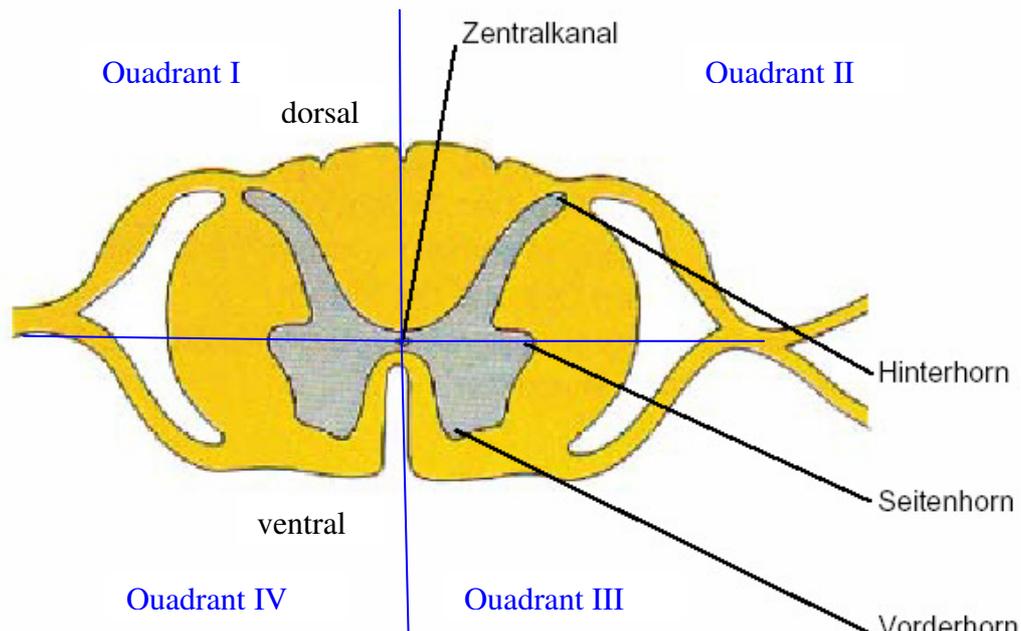


Abb. 3-1: Einteilung der Quadranten im Rückenmarksquerschnitt

3.2.3 Messgeräte und Medikamente

3.2.3.1 Medikamente

Für die Narkose wird in den Versuchen mit CCI-, bzw. CCI-Sham-Intervention Pentobarbital (Nembutal[®]) in der Dosis 60 mg/kg intraperitoneal verwendet. (Für die Nervenligatur wird bewusst Pentobarbital eingesetzt, da Ketamin antineuropathisch wirkt und die Ausbildung einer Hyperalgesie nach CCI erheblich vermindern kann.) Beim Akutversuch, der Formalinfixierung, wird Ketamin (Ketanest[®]) in der Dosis 60 mg/kg in Kombination mit Xylazin (Rompun[®]) in der Dosis 10 mg/kg i.p. eingesetzt. (Die Narkoseführung ist einfacher und das Risiko getestete und operierte Tiere zu verlieren wird minimiert.)

3.2.3.2 Messgeräte

Zur Messung der mechanischen Allodynie werden Plexiglas-Kisten (31,5 cm x 31,5 cm x 31 cm) mit Gitterdrahtböden (Maschenweite 5 x 5 mm) in Verbindung mit Von-Frey-Monofila-

menten benutzt. Dazu werden die Hinterpfoten der Mäuse durch die Öffnungen des Drahtmaschen-Geflechtes mit Von-Frey-Haaren mechanisch gereizt. Dabei handelt es sich um eine Reihe von Nylonfilamenten mit zunehmender Stärke/Steifheit, welche durch einen zunehmenden Durchmesser erreicht wird. (Diese Testhaare werden nach dem Würzburger Physiologen Max von Frey (1852-1932) benannt und werden beim Menschen zur Prüfung der Hautsensibilität eingesetzt.) Für die angestrebten Verhaltensversuche wird ein standardisiertes Semmes-Weinstein-Von-Frey-Haar-Set verwendet. Der Hersteller gibt hier den log 10 der Kraft in Milligramm an.

Die thermale Hyperalgesie wird mit dem Plantartest^R (7371 Plantar Test von FMI Föhr Medical Instruments GmbH) mit definiertem thermischen Reiz (I.R.-Intensität 35) mit modifizierter Methode nach Hargreaves (HARGREAVES et al., 1988) getestet, wofür die Tiere in transparenten Plexiglas-Kisten mit den Maße 21,5 cm x 17 cm x 14,5 cm gesetzt und die Latenzzeiten aufgezeichnet werden. Bei dem Plantartest^R handelt es sich um eine Lichtquelle, die halogeniertes Licht durch ein Linsensystem gebündelt auf die darüber liegende transparente Plexiglasscheibe wirft. Je nach Dauer erreicht diese Lichtquelle eine Temperatur von 45 bis 50°C. Ein Sensor in der Lichtquelle schaltet diese ab, sobald das Tier die Pfote hebt und der Kontakt unterbrochen wird, was bei typischen Schmerzverhalten, wie es beim Wegspringen oder Wegziehen der Pfote, Beknabbern oder Lecken an dieser, geschieht. Gleichzeitig misst eine automatische Zeituhr mit dem Starten der Lichtquelle die Zeit bis zum Abschalten mit einer Genauigkeit von Zehntelsekunden.

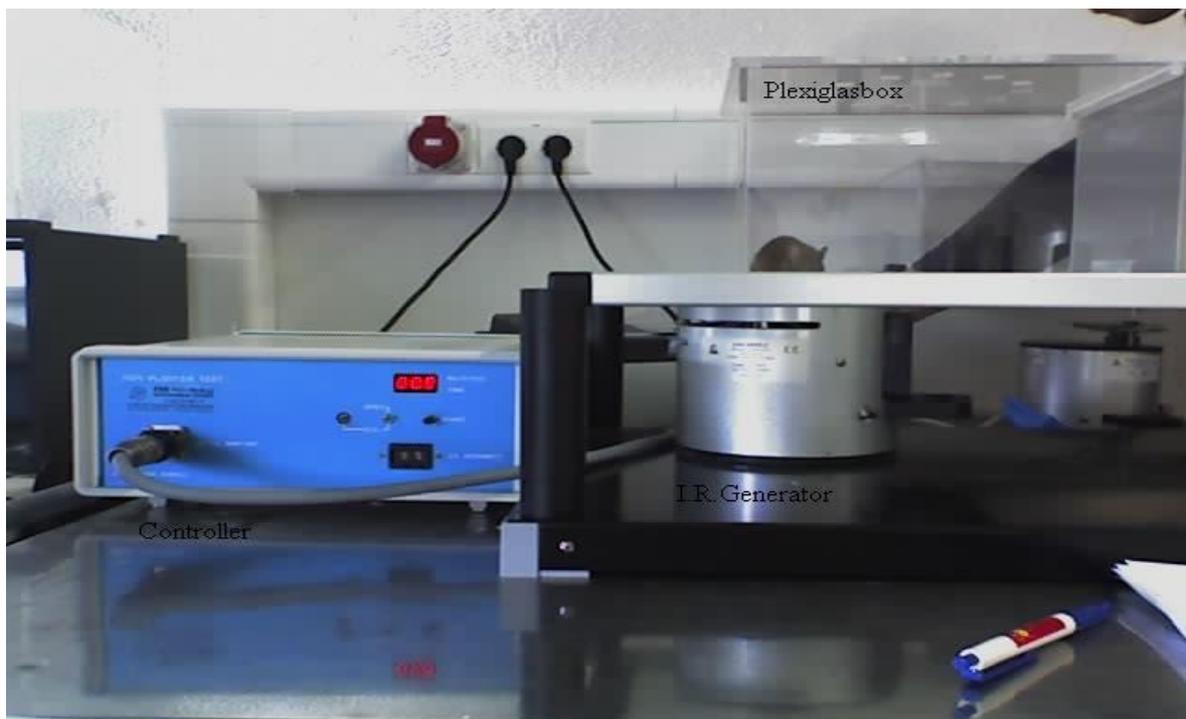


Abb. 3-2: Versuchsaufbau Plantartest

3.2.4 Probenentnahme und -aufbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie

3.2.4.1 Probenentnahme

Die Tiere werden zur Probenentnahme mit Ketamin (60 mg/kg) in Kombination mit Xylazin (10 mg/kg) intraperitoneal narkotisiert und nach Eintreten der chirurgischen Toleranz (überprüft mit Hilfe des Zwischenzehen-Reflexes) mit einer 4%-igen, eisgekühlten Paraformaldehyd-Lösung (für 250 ml wurden 10 g Paraformaldehyd in 125 ml Aqua dest. bei 60°C gelöst und mit weiteren 125 ml 0,4M Phosphatpuffer verdünnt und dann der pH-Wert auf 7,4 überprüft) perfusionsfixiert. Hierfür bringt man die Tiere in Rückenlage und setzt über dem Brustbein ein großzügiger Hautschnitt mit Pinzette und Schere. Als nächstes wird der Thorax eröffnet indem man beidseits die Rippen im Verlauf der knorpeligen Verbindung zertrennt, diese gemeinsam mit dem Brustbein nach dorsal klappt und mit einer Klemme fixiert. Danach erfolgt eine Kanülierung des linken Ventrikels mit einer Venenverweilkanüle (Braunüle^R, 0,9 x 25mm) die vorsichtig bis in die Aorta vorgeschoben wird. Das rechte Herzohr eröffnet man für die folgende Perfusion durch einen kleinen Schnitt. Danach werden zuerst mit einer eisgekühlten phosphate buffered saline (PBS) die Blutgefäße für die folgende Formalinperfusion gespült und dann mit der gekühlten 4%igen PFA-Lösung (etwa 50 ml pro Tier) über eine aufgesetzte Spritze langsam perfundiert.

Daraufhin wird den Tieren das entsprechende Stück Wirbelsäule (Segment L4/L5, welches sich ungefähr auf Höhe der letzten Rippe befindet) entnommen. Nach einem Hautschnitt über der gesamten Wirbelsäule entnimmt man das lumbale sowie zum späteren Vergleich bei den folgenden Auszählungen der Neuronen ein thorakales Stück der Wirbelsäule vorsichtig mit einer kleinen Knochenzange und befreit diese so gut wie möglich von den umliegenden Muskeln. Die entnommenen Wirbelsäulensegmente werden dann komplett mit dem Wirbelkörper über Nacht in der 4%igen PFA-Lösung (bei ca. 8°C) lichtgeschützt immersionsfixiert.

3.2.4.2 Probenaufbereitung

Im nächsten Schritt wird das Rückenmark vorsichtig aus den Wirbelsäulensegmenten entnommen, zuerst in PBS gespült und dann in 20%-iger Saccharose-Lösung (20g Saccharose gelöst in 100 ml PBS) zur Kryoprotektion eingelegt. (Ansonsten können sich beim Einfrieren der Präparate durch die im Gewebe enthaltene Flüssigkeit Kristalle bilden, die das Präparat

zerstören.) Nachdem die Probe auf den Boden des Gefäßes abgesunken ist, wird sie mit flüssigem Stickstoff eingefroren und kann so für die weitere Untersuchung, wiederum lichtgeschützt, kurzfristig gelagert werden.

Die so verbliebenen Rückenmarksstränge werden mit dem Kryostat (Leica CM3050) bei einer Temperatur von -20°C auf $16\ \mu\text{m}$ Dicke geschnitten. Hierbei wird nur jeder 3. Schnitt auf einen Objektträger aufgezogen und die restlichen Schnitte verworfen. Man platziert jeweils 10 Schnitte pro Objektträger, deckelt dann mit VECTASHIELD^R Mounting Medium luftdicht ein und versiegelt die Präparate, um ein Austrocknen zu vermeiden, zusätzlich mit Nagellack. (VECTASHIELD^R ist eine Lösung, die die Fluoreszenz des Präparates gegen ein vorzeitiges Ausbleichen schützt und selbst keine Eigenfluoreszenz besitzt.) Die Schnitte können dann bei -20°C , lichtgeschützt, eingefroren werden, um unter dem Fluoreszenzmikroskop weiter untersucht zu werden.

Die Untersuchungen mit dem Fluoreszenzmikroskop werden möglichst bald in den darauf folgenden Tagen vorgenommen, da nicht genau bekannt ist, wie lang die Eigenfluoreszenz der Präparate vorhält und von einer Abschwächung bei längerer Lagerung ausgegangen werden kann.

3.3 Rechnerische Auswertung und Dokumentation der Ergebnisse

Die gemessenen Parameter der thermischen Hyperalgesie (Pfortenrückzuglatenz/Schmerzschwellen), bzw. ihre arithmetischen Mittelwerte (mean) und die dazugehörigen Standardabweichungen (sd) werden berechnet und durchlaufen den Paired t-Test (vorher-nachher-Testung).

Die Ergebnisse der mechanischen Allodynie (von-Frey-Haar-Testung) werden nicht statistisch ausgewertet.

Die Bilder der Rückenmarksschnitte werden im tif-Format gespeichert und können so später ausgedruckt werden. Für eine leichtere Auswertung druckt man die Bilder als Kontraste aus, so dass die hellgrün leuchtenden Neuronen im Ausdruck dunkellila und der schwarze Hintergrund weiß sind. Die Ausdrücke werden in jeweils vier Quadranten unterteilt, in denen man die leuchtenden Neuronen ausschließlich per Hand auszählt. Diese Werte und die Summe der einzelnen vier Quadranten werden dann gemittelt und dokumentiert.

Es folgt eine statistische Auswertung der Daten mit Hilfe einer Varianzanalyse Analysis of Variance between groups (ANOVA) und Post-Hoc-Mehrfachvergleichen.

Die Ergebnisse der Auszählung werden in einer Matrix aufgeführt, wobei Gruppenmittelwerte auf einem Alpha-Niveau von $p < 0,05$ als signifikant durch Sternchen (*) markiert werden.

3.4 Ergebnisse

3.4.1 Ergebnisse der Vorversuche

3.4.1.1 Thermale Hyperalgesie

Bei allen sieben in den Vorversuchen eingesetzten Tieren werden vor der experimentell hervorgerufenen Neuropathie die Nullwerte (baseline) der thermalen Schmerzschwellen bestimmt. Um den besten Zeitpunkt für die Testung der thermalen Hyperalgesie nach erfolgreicher CCI festzulegen, werden die Tiere am 7., 10. und 14. Tag, sowie vier der Tiere auch noch einmal am 21. Tag nach dem Eingriff wiederholt getestet. Die Messungen der Verhaltensversuche werden immer vormittags, d.h. zur selben Tageszeit durchgeführt, um etwaige Tagesschwankungen soweit wie möglich ausschließen zu können.

Die Tiere werden für die Messung der thermalen Hyperalgesie, nach einer Gewöhnungszeit an die Plexiglastischen, einzeln getestet. Nachdem der Nullwert bestimmt ist, werden die Tiere der oben beschriebenen CCI-Operation unterzogen und dann an den oben genannten Tagen wieder getestet. Zwischen der Operation und den einzelnen Testungen werden die Tiere nicht manipuliert und nur am Tag nach der Operation auf ihren Allgemeinzustand und ihr Verhalten kontrolliert, um gegebenenfalls Tiere mit großen Schmerzen oder Ausfallserscheinungen zu euthanasieren. Dieser Fall kommt in den hier dokumentierten Versuchen nicht vor.

Die Tiere entwickeln nach dieser provozierten peripheren Nervenschädigung alle eine thermische Hyperalgesie (siehe Tab. 3-2) sowie eine mechanische Allodynie und zeigen zudem meist noch eine Schonhaltung der betroffenen Gliedmaße. Eine Automutilation, wie sie in anderen Studien beschrieben wurde, kommt bei keinem der für diesen Versuch eingesetzten und operierten Tiere vor.

Bei den mehrmaligen Testungen kann festgestellt werden, dass bei allen Tieren linksseitig eine Schmerzschwellenverschiebung im Vergleich der rechten, unmanipulierten Pfote auftritt. Die operierten Mäuse entwickeln alle eine deutliche thermale Hyperalgesie an der linken Hintergliedmaße. Die Schmerzschwellenverschiebung an der rechten Hinterpfote ist weniger deutlich, aber die Nullwerte vor jeglicher Manipulation liegen bei allen Tieren im Zeitraum bis zwei Wochen nach dem Eingriff höher als nach der CCI-Operation. Die Tiere zeigen

zudem alle eine Schonhaltung der linken Hintergliedmaße und heben diese beim Laufen auch übermäßig an.

Tab. 3-2: Ergebnisse der thermischen Testung beim Vorversuch

Thermische Testung (Plantartest)						
Tag der Testung	rechte Pfote			linke Pfote		
	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>
prä-OP	4,6	2,06	7	4,3	1,18	7
7d post CCI	4,1	1,15	7	2,5	0,63	7
10d post CCI	3,3	0,87	7	2,8	0,84	7
14d post CCI	3,9	0,92	7	2,4	1,41	7
21d post CCI	5,1	0,51	4	3,7	0,46	4

mean= Mittelwert; sd= Standardabweichung; n= Anzahl der verwendeten Tiere

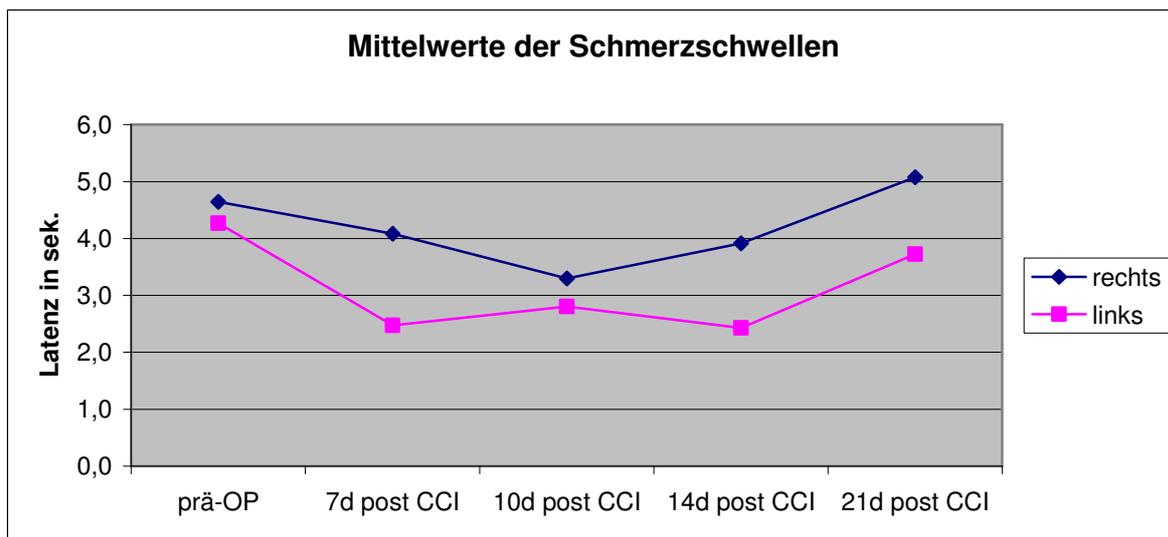


Abb. 3-3: Schmerzschwellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der CCI- Operation

Da die Schmerzschwellenerniedrigung in den Vorversuchen vom siebten bis vierzehnten Tag nach der CCI-Operation am größten war (Abb. 3-3 und Tab. 3-2), entscheidet man sich für die weiteren Untersuchungen für eine einzige postoperative Testung zwischen dem zehnten und vierzehnten Tag. Zu diesem Zeitpunkt ist eine thermale Hyperalgesie immer ausgebildet und die Schwellen liegen alle signifikant unter dem präoperativen Ausgangswert. Nach Ablauf von 14 Tagen nimmt die Ausprägung der thermalen Hyperalgesie wieder ab und der steigende Verlauf in der grafischen Darstellung lässt eine Regeneration vermuten.

Zusammenfassend zeigen die Vorversuche, dass mit der CCI eine deutliche Schmerzschwellenerniedrigung hervorgerufen werden kann. Zudem kann man mit den wiederholten Testungen den günstigsten Zeitraum für die Testung der folgenden Hauptversuche festlegen.

Zudem bestätigen die gewonnenen Ergebnisse, dass die Tiere des transgenen Mäuse-Stammes ein kongruentes Schmerzverhalten, wie die bereits untersuchten C75BL/6-Tiere zeigen.

Mit den Tieren der Vorversuche erfolgen auch erste Formalinfixierungen und Anfertigungen von Rückenmarksschnitten. Das Herstellen und Schneiden dieser Präparate dient lediglich der Übung, da bei den C57BL/6- und wt-Mäusen keine Fluoreszenz zu erwarten ist. Zur Überprüfung werden einige Aufnahmen der Schnitte von den wt-Mäusen ebenfalls gespeichert.

3.4.1.2 Mechanische Allodynie

In den Vorversuchen kommen für die von-Frey-Haar-Testung fünf Tiere zum Einsatz. Bei der Testung am 21. Tag nach CCI nur zwei. Man kann nach der CCI bei den wiederholten Von-Frey-Haar-Testungen keine signifikante mechanische Allodynie feststellen.

Tab. 3-3: mechanische Allodynie nach CCI (v.F.H.) an verschiedenen Tagen rechts

Rechte Pfote															
v.F.H.- Stärke	präoperative Testung			postoperative Testung											
				am 7.d post CCI			am 10.d post CCI			am 14.d post CCI			am 21.d post CCI		
	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>
1,65	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	2
2,36	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	2
2,44	0,13	0,34	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,07	0,25	5	0,00	0,00	2
2,83	0,07	0,25	5	0,00	0,00	5	0,07	0,25	5	0,00	0,00	5	0,17	0,37	2
3,22	0,00	0,00	5	0,20	0,40	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	2
3,61	0,13	0,50	5	0,13	0,34	5	0,33	0,70	5	0,00	0,00	5	0,17	0,37	2
3,84	0,20	0,40	5	0,07	0,25	5	0,33	0,70	5	0,07	0,25	5	0,17	0,37	2
4,08	0,40	0,61	5	0,20	0,54	5	0,53	0,81	5	0,13	0,34	5	0,50	0,50	2
4,17	0,40	0,61	5	0,53	0,62	5	0,33	0,60	5	0,20	0,40	5	0,67	0,75	2
4,31	0,80	0,91	5	0,73	0,85	5	0,40	0,71	5	0,40	0,61	5	1,33	0,47	2
4,56	0,93	0,85	5	0,80	0,75	5	0,53	0,72	5	0,60	0,61	5	1,50	0,50	2
4,74	0,80	0,91	5	0,73	0,68	5	0,60	0,61	5	0,73	0,68	5	0,83	0,69	2
4,93	1,00	0,82	5	1,13	0,81	5	0,67	0,60	5	0,73	0,77	5	1,50	0,50	2
5,07	0,80	0,83	5	1,20	0,40	5	0,80	0,65	5	0,53	0,72	5	1,50	0,50	2
5,18	0,87	0,88	5	1,47	0,62	5	0,73	0,68	5	1,00	0,73	5	1,17	0,69	2
5,46	1,07	0,77	5	1,13	0,81	5	1,07	0,77	5	0,87	0,72	5	1,17	0,69	2
5,88	0,53	0,72	5	1,20	0,75	5	1,20	0,65	5	0,87	0,72	5	1,17	0,90	2
6,1	0,67	0,79	5	0,93	0,77	5	0,87	0,88	5	0,80	0,83	5	1,17	0,69	2
6,45	0,87	0,81	5	0,93	0,68	5	0,73	0,77	5	0,67	0,79	5	1,17	0,69	2
6,65	0,67	0,79	5	0,87	0,72	5	0,93	0,77	5	0,80	0,83	5	1,17	0,69	2

mean= Mittelwert; sd= Standardabweichung; n= Anzahl der Versuchstiere

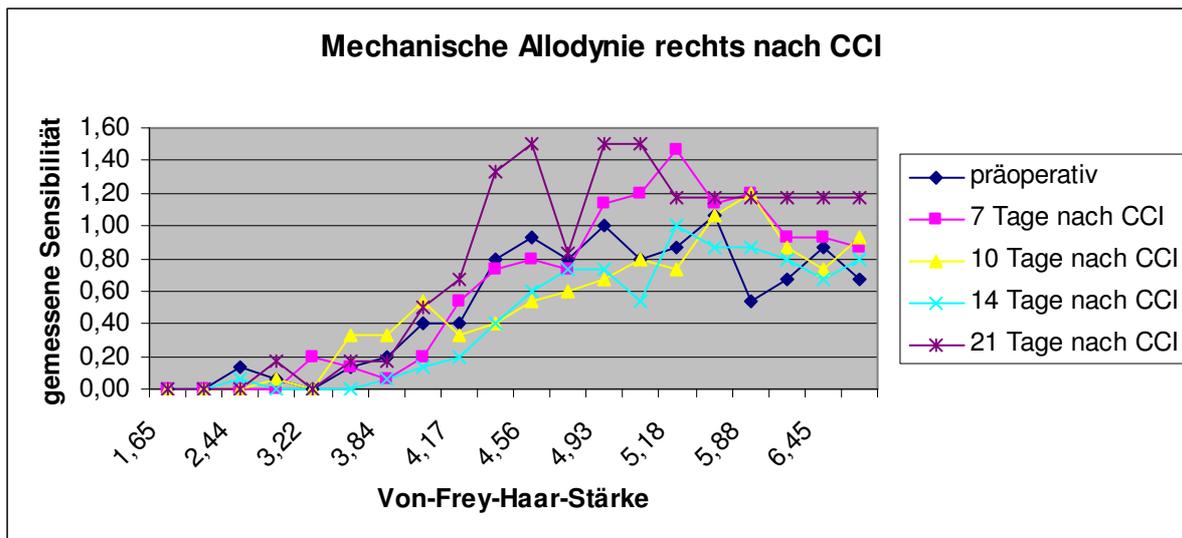


Abb. 3-4: gemessene Sensibilität rechts nach Score (siehe S.26)

Allerdings ist auch bei dieser Testung eine erhöhte Sensibilität auf der linken, operierten Seite sichtbar (Abb. 3-5). Dies ist auf der kontralateralen Seite nicht feststellbar (Abb. 3-4).

Tab. 3-4: mechanische Allodynie (v.F.H.) nach CCI an verschiedenen Tagen links

Linke Pfote															
v.F.H.- Stärke	präoperative Testung			postoperative Testung											
				am 7.d post CCI			am 10.d post CCI			am 14.d post CCI			am 21.d post CCI		
	mean	sd	n	mean	sd	n	mean	sd	n	mean	sd	n	mean	sd	n
1,65	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	2
2,36	0,00	0,00	5	0,00	0,00	5	0	0,00	5	0,00	0,00	5	0,00	0,00	2
2,44	0,07	0,25	5	0,07	0,25	5	0,13	0,50	5	0,20	0,40	5	0,00	0,00	2
2,83	0,00	0,00	5	0,07	0,25	5	0,4	0,71	5	0,13	0,34	5	0,17	0,37	2
3,22	0,07	0,25	5	0,47	0,50	5	0,47	0,62	5	0,33	0,60	5	0,50	0,76	2
3,61	0,13	0,34	5	0,73	0,68	5	0,53	0,81	5	0,20	0,40	5	0,50	0,76	2
3,84	0,07	0,25	5	0,47	0,62	5	0,53	0,81	5	0,47	0,72	5	0,50	0,76	2
4,08	0,27	0,57	5	1,00	0,73	5	0,87	0,88	5	0,80	0,83	5	0,67	0,94	2
4,17	0,87	0,88	5	1,27	0,68	5	1,07	0,68	5	0,80	0,75	5	0,67	0,75	2
4,31	0,87	0,88	5	1,07	0,85	5	0,93	0,77	5	0,87	0,81	5	1,33	0,75	2
4,56	0,93	0,85	5	1,47	0,50	5	0,67	0,79	5	1,00	0,77	5	1,17	0,75	2
4,74	1,07	0,77	5	1,13	0,72	5	1,13	0,50	5	0,80	0,75	5	1,67	0,47	2
4,93	1,13	0,50	5	1,47	0,81	5	1,33	0,70	5	1,20	0,75	5	1,50	0,47	2
5,07	1,13	0,72	5	1,73	0,44	5	1,07	0,68	5	1,00	0,82	5	1,50	0,50	2
5,18	1,20	0,75	5	1,60	0,61	5	1,07	0,85	5	1,13	0,72	5	1,67	0,47	2
5,46	1,00	0,63	5	1,53	0,62	5	1,2	0,83	5	1,07	0,68	5	1,50	0,50	2
5,88	0,87	0,81	5	1,40	0,80	5	1,13	0,72	5	0,80	0,75	5	1,50	0,50	2
6,1	0,40	0,71	5	1,13	0,81	5	1,13	0,81	5	0,87	0,81	5	1,17	0,69	2
6,45	0,87	0,81	5	1,00	0,73	5	1,07	0,85	5	1,00	0,82	5	1,33	0,75	2
6,65	0,67	0,79	5	0,93	0,77	5	0,8	0,91	5	0,87	0,81	5	1,33	0,75	2

mean= Mittelwert; sd= Standardabweichung; n= Anzahl der Versuchstiere

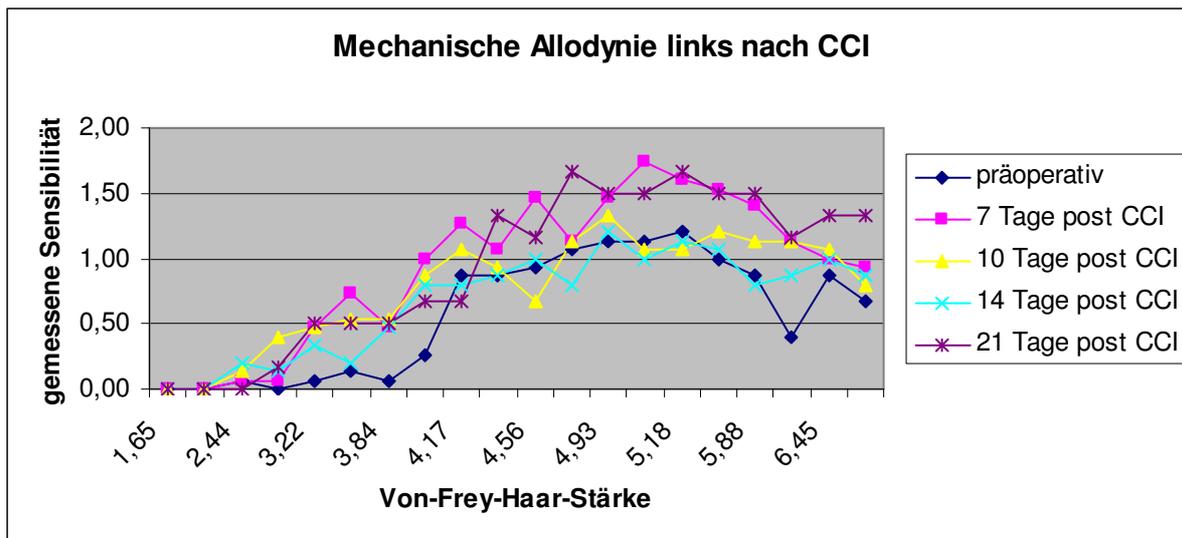


Abb. 3-5: gemessene Sensibilität links nach Score (s. S.26)

3.4.2 Ergebnisse der Hauptversuche

In den Versuchen wird gezeigt, dass eine thermale Hyperalgesie bei Tieren des 3010-Stammes durch die CCI-Operation erfolgreich induziert werden kann. Auf dieser Basis werden die Hauptversuche durchgeführt. Es wird bei zwanzig Tieren der Nullwert mit Hilfe des Plantartest^R bestimmt sowie die Hälfte dieser Tiere einer CCI-Intervention unterzogen, während die anderen Mäuse eine Sham-Operation durchlaufen. Die zwölf weiteren Tiere der Kontrollgruppe, ohne Intervention, werden weder getestet, noch anderweitig manipuliert, sondern lediglich Formaldehyd-perfundiert.

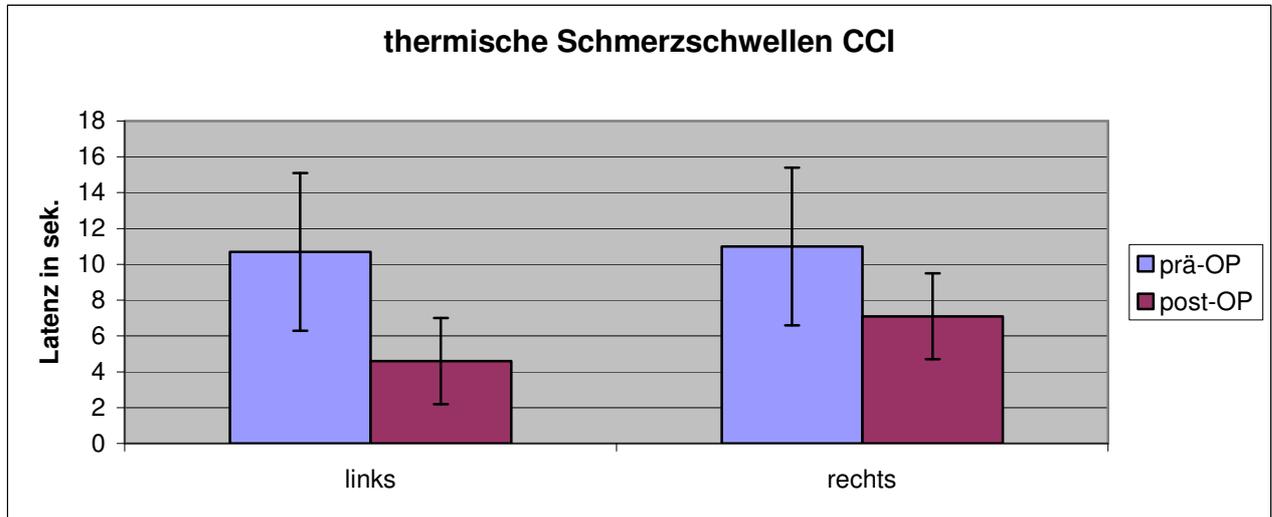
3.4.2.1 Thermale Hyperalgesie

Die Tiere der Gruppen CCI und Sham werden wie in den Vorversuchen, auch wieder zur selben Tageszeit, vormittags, an die Kisten des Plantartest^R gewöhnt und dann an jeder Hinterpfote jeweils sieben mal, im Abstand von mindesten fünf Minuten, abwechselnd getestet. Nach Erfassen der Nullwerte werden die Tiere narkotisiert und erhalten entweder eine CCI-Operation, oder die entsprechende Sham-Operation am linken N. ischiadicus. Am zwölften oder vierzehnten Tag nach der Operation wird wiederum vormittags kontrolliert, ob sich eine thermale Hyperalgesie entwickelt hat.

Die CCI-operierten Tiere zeigen alle deutliche Anzeichen der thermalen Hyperalgesie. Die Schmerzschwellen (Pfotenrückzugslatenzen) liegen alle links aber auch rechts niedriger als

präoperativ. Sie zeigen auch ein stärker ausgeprägtes allgemeines Schmerzverhalten mit Wegspringen sowie Beißen und Belecken der getesteten Pfoten.

Die Schwellenerniedrigung ist auf der linken, operierten Seite deutlicher, aber auch auf der rechten Seite vorhanden (Abb. 3-6 und Tab. 3-5).

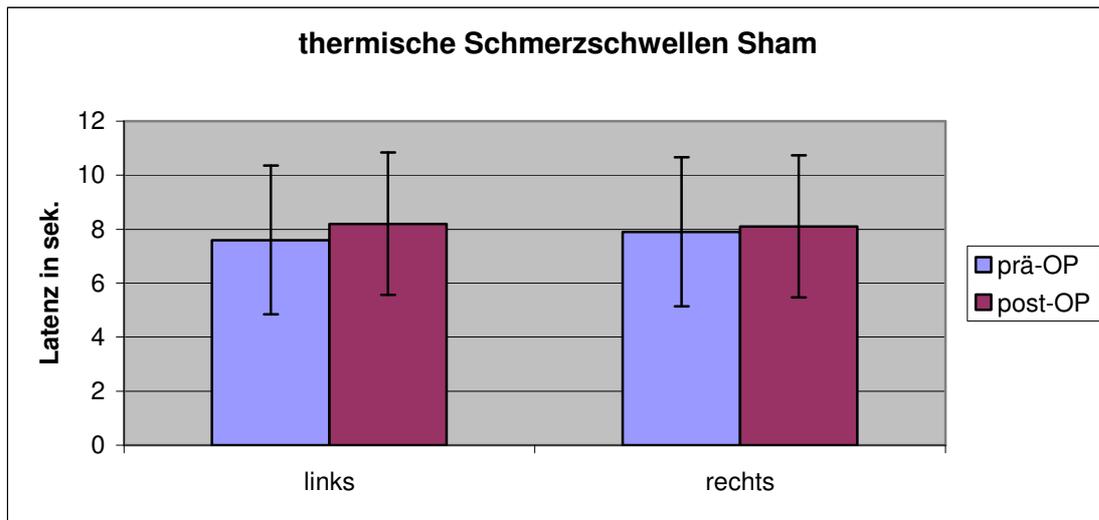


post-OP= Testung 12 oder 14 Tage nach CCI

Abb. 3-6: Mittelwerte der Schmerzschwellen der linken und rechten Hinterpfote nach CCI

Auf der linken Seite sind die Mittelwerte der Pfotenrückzugszeiten nach dem Paired t-Test in der post operativen Testung signifikant ($p= 0,003$) erniedrigt, ebenso sind die Latenzen auch auf der rechten Seite deutlich herabgesetzt. Allerdings liegen die Werte der rechten Seite ($0,051$) knapp über der Signifikanzgrenze ($p< 0,05$). Die Tiere entwickeln demnach sowohl ipsi- als auch kontralateral eine thermale Hyperalgesie infolge der induzierten Mono-neuropathie. Allerdings ist bei der peripher induzierten Neuropathie, CCI, eine signifikante Schmerzschwellenerniedrigung auf der kontralateralen Seite nicht unbedingt zu erwarten. Für eine „erfolgreich“ durchgeführte CCI ist die gefundene Veränderung auf der ipsilateralen Seite ausreichend.

Die Schmerzschwellen der Sham-Tiere zeigen dagegen nur leichte Unterschiede. So zeigt eines der Tiere fast überhaupt keine Veränderung zu den Nullwerten (baseline) vor der Operation. Bei einem Teil der Tiere sind die Schmerzschwellen in der Kontrolle erhöht und bei einigen Tieren sind sie leicht erniedrigt. Die restlichen Tiere zeigen eine leichte Steigerung der einen und eine leichte Erniedrigung der anderen Seite bei der wiederholten Testung, jeweils umgekehrt. Nach der statistischen Auswertung (Paired t-Test) zeigen die Werte der Sham-Tiere nach dem Eingriff weder links ($p= 0,745$), noch rechts ($p= 0,819$) eine signifikante Veränderung (siehe Tab. 3-5 und Abb. 3-7).



post-OP= Testung 12 oder 14 Tage nach OP

Abb. 3-7: Mittelwerte der Schmerzschwellen der linken und rechten Pfote nach Sham-OP

Die Mittelwerte aus den Gruppenuntersuchungen bestätigen bei der CCI-Gruppe eine deutliche Schmerzschwellenerniedrigung auf der linken, operierten Seite (von $10,7 \pm 4,4$ auf $4,6 \pm 2,4$ Sekunden) und auch auf der rechten Seite ist eine deutliche Schmerzschwellen-erniedrigung erkennbar (von $11 \pm 4,4$ auf $7,1 \pm 2,3$ Sekunden).

Tab. 3-5: Vergleich der Schmerzschwellen in sek. der CCI- und Sham-Gruppe

	CCI- Tiere			sham- Tiere		
	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>	<i>mean</i>	<i>sd</i>	<i>n</i>
rechts						
prä- OP	11	4,4	10	8,5	3,01	10
post OP	7,1	2,3	10	8,5	2,97	10
links						
prä- OP	10,7	4,4	10	8,1	2,70	10
post OP	4,6*	2,4	10	8,6	2,56	10

mean= Mittelwert; sd= Standardabweichung; n= Anzahl der Versuchstiere; *= signifikanter Unterschied bei vorher-nachher-Testung auf einer Stufe von $p < 0,05$

Bei den Tieren der Sham-Gruppe zeigen die Werte auf beiden Seiten, wenn überhaupt, eher eine leichte Schmerzschwellenerhöhung. Auf der linken, manipulierten Seite besteht eine leichte (nicht signifikante) Steigerung (von $8,1 \pm 2,7$ auf $8,6 \pm 2,6$ Sekunden), auf der rechten Seite ist keine Veränderung zu erkennen.

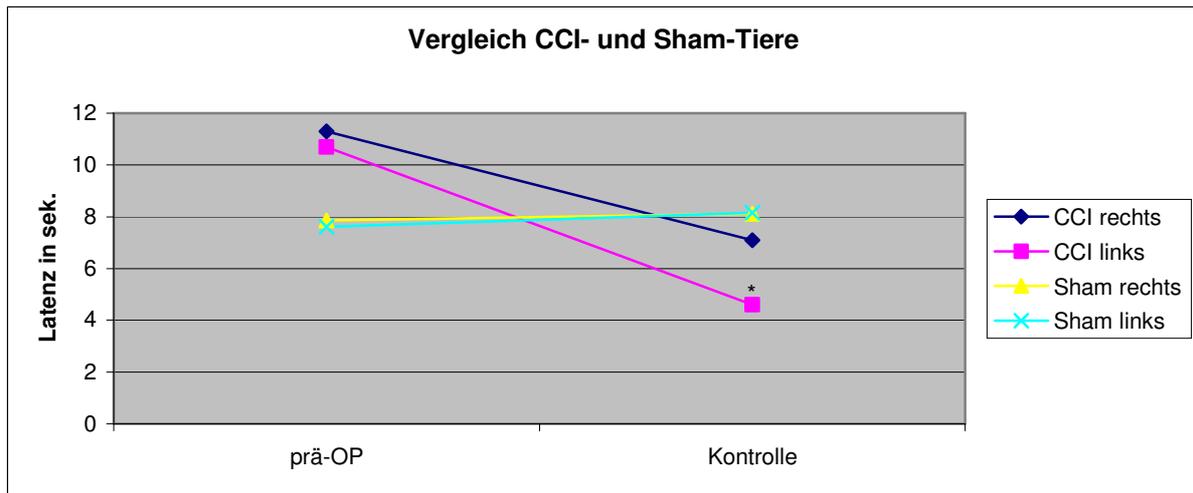


Abb. 3-8: Vergleich der Schwellenwerte von CCI- und Sham-Tieren; *= signifikante Veränderung im Vergleich prä-OP/ Kontrolle (post OP)

Die Versuche zeigen, dass die Tiere, welche mit CCI eine induzierte Neuropathie erhielten, eine deutliche thermische Hyperalgesie sowohl ipsi- als kontralateral entwickeln.

Die Messungen der Sham-Tiere dagegen zeigen kein neuropathisches Schmerzverhalten bei der Testung mit dem Plantartest^R.

3.4.2.2 Mechanische Allodynie

Die Messungen der mechanischen Allodynie mit den Von-Frey-Filamenten zeigen bei CCI- und Sham-Gruppe nur eine leichte Verschiebung der Schmerzschwellen. In dem unteren Bereich, bzw. bei den feineren Filamenten kann überhaupt keine Veränderung festgestellt werden. Erst ab den Filamenten > 3,22 (log 10 der Kraft in mg) kann eine geringgradige Schmerzschwellenverschiebung dokumentiert werden. Die Verschiebung ist bei den Tieren der Sham-Gruppe, wenn auch hier nur gering, fast deutlicher zu erkennen als bei den CCI-Tieren.

Tab. 3-6: mechanische Allodynie nach CCI (Von-Frey-Haar-Test), gemessene Sensibilität

v.Frey-Haar-Stärke	rechte Pfote						linke Pfote					
	prä-OP			post-OP			prä-OP			post-OP		
	mean	sd	n	mean	sd	n	mean	sd	n	mean	sd	n
1,65	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10
2,36	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10
2,44	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10
2,83	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10
3,22	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10
3,61	0,17	0,37	10	0,00	0,00	10	0,00	0,00	10	0,00	0,00	10
3,84	0,33	0,47	10	0,17	0,37	10	0,67	0,75	10	0,67	0,75	10
4,08	0,17	0,37	10	0,67	0,75	10	0,33	0,47	10	1,67	1,11	10
4,17	0,33	0,47	10	1,17	2,19	10	0,50	0,76	10	2,00	2,00	10
4,31	1,33	1,11	10	1,33	2,13	10	1,33	1,11	10	1,83	2,03	10
4,56	1,50	1,26	10	2,17	1,86	10	1,50	1,26	10	2,83	1,77	10
4,74	1,83	2,19	10	3,00	1,15	10	2,67	1,89	10	3,50	1,50	10
4,93	2,00	1,29	10	3,17	1,86	10	2,33	1,60	10	3,83	1,34	10
5,07	3,67	1,37	10	4,50	1,50	10	3,17	1,77	10	4,83	1,07	10
5,18	3,33	1,37	10	4,33	1,70	10	3,00	1,53	10	4,83	1,34	10
5,46	3,83	1,57	10	3,67	1,70	10	3,67	1,70	10	4,00	1,53	10
5,88	2,17	1,95	10	3,83	2,34	10	2,50	1,80	10	3,67	2,21	10
6,10	2,17	2,03	10	3,83	2,11	10	2,17	2,03	10	3,83	1,95	10
6,45	3,17	1,46	10	4,17	2,19	10	3,17	1,46	10	4,17	2,19	10
6,65	3,33	1,25	10	3,33	2,69	10	3,00	1,73	10	3,83	2,34	10

mean= Mittelwert; sd= Standardabweichung; n= Anzahl der Versuchstiere

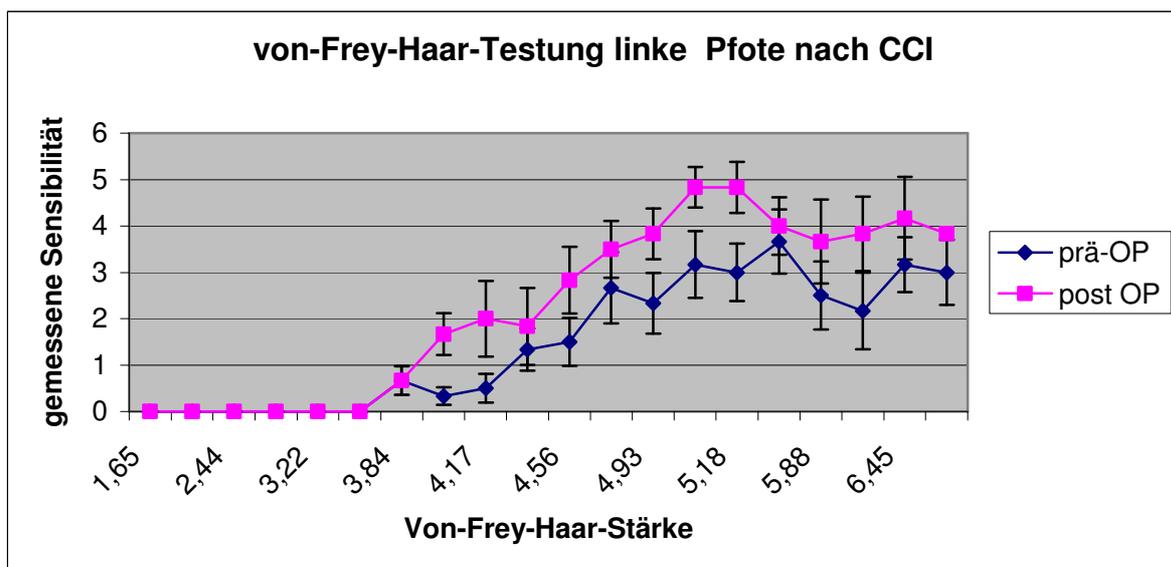


Abb. 3-9: mechanische Allodynie links nach CCI

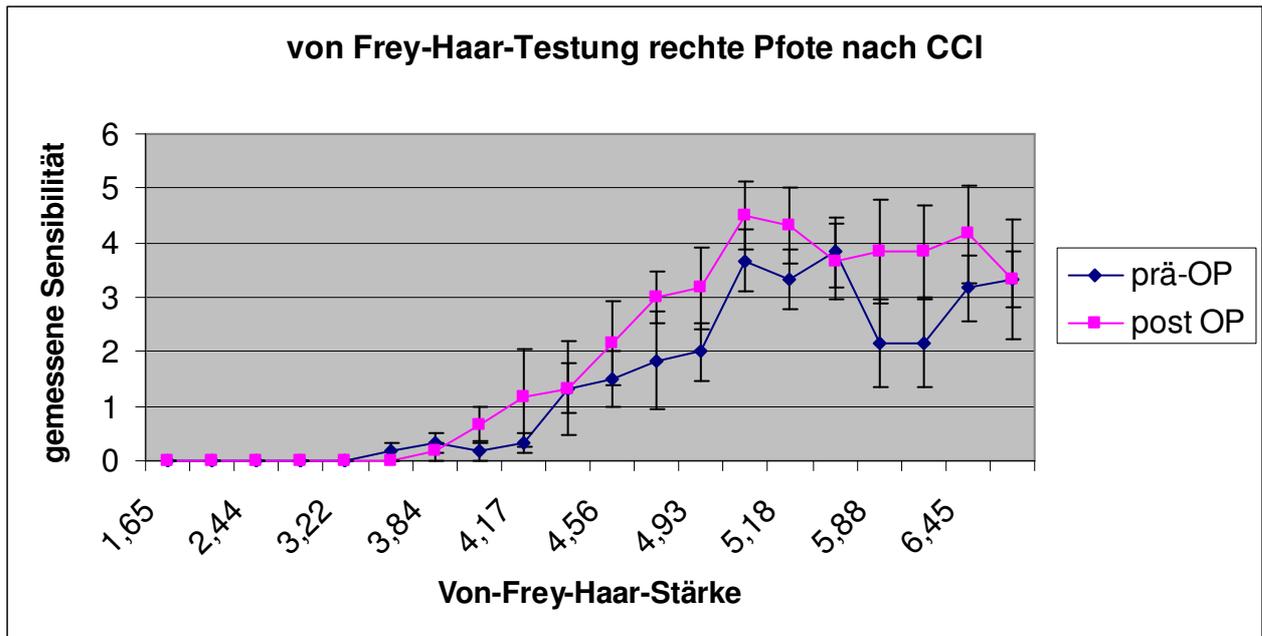


Abb. 3-10: mechanische Allodynie rechts nach CCI

Tab. 3-7: mechanische Allodynie nach Sham-OP (Von-Frey-Haar-Test)

v.Frey-Haar-Größe	rechte Pfote						linke Pfote					
	prä-OP			post-OP			prä-OP			post-OP		
	mean	sd	n	mean	sd	n	mean	sd	n	mean	sd	n
1,65	0	0	7	0	0	7	0	0	7	0	0	7
2,36	0	0	7	0	0	7	0	0	7	0	0	7
2,44	0	0	7	0	0	7	0	0	7	0	0	7
2,83	0	0	7	0,14	0,35	7	0	0	7	0	0	7
3,22	0,14	0,35	7	0,57	1,05	7	0,29	0,70	7	0,14	0,35	7
3,61	0,71	1,75	7	1,57	2,50	7	0,57	1,40	7	1,57	2,50	7
3,84	1,14	1,64	7	1,86	2,64	7	1,43	1,99	7	1,86	2,64	7
4,08	1,00	2,07	7	1,71	2,71	7	1,14	2,03	7	1,86	2,64	7
4,17	1,14	2,10	7	1,86	2,64	7	1,14	2,03	7	2,00	2,56	7
4,31	1,29	1,98	7	1,86	2,64	7	1,29	2,05	7	1,71	2,71	7
4,56	1,00	2,07	7	3,00	1,93	7	1,43	1,99	7	2,57	2,32	7
4,74	1,71	1,83	7	3,43	1,84	7	1,57	1,99	7	3,71	1,91	7
4,93	2,57	1,68	7	3,71	1,75	7	1,71	1,98	7	4,14	1,46	7
5,07	3,00	1,41	7	4,29	1,58	7	3,00	1,51	7	4,43	1,40	7
5,18	3,29	1,16	7	3,29	1,83	7	3,14	1,25	7	4,14	1,81	7
5,46	3,43	1,18	7	3,86	1,73	7	3,14	1,25	7	4,14	1,36	7
5,88	3,14	1,46	7	4,00	1,41	7	3,29	1,39	7	4,14	1,25	7
6,10	2,86	1,73	7	3,71	1,58	7	2,86	1,73	7	3,86	1,81	7
6,45	2,29	1,75	7	3,29	1,98	7	2,43	1,68	7	3,29	2,12	7
6,65	2,00	2,07	7	2,57	2,38	7	1,86	2,10	7	2,71	2,31	7

mean= Mittelwert; sd= Standardabweichung; n= Anzahl der Versuchstiere

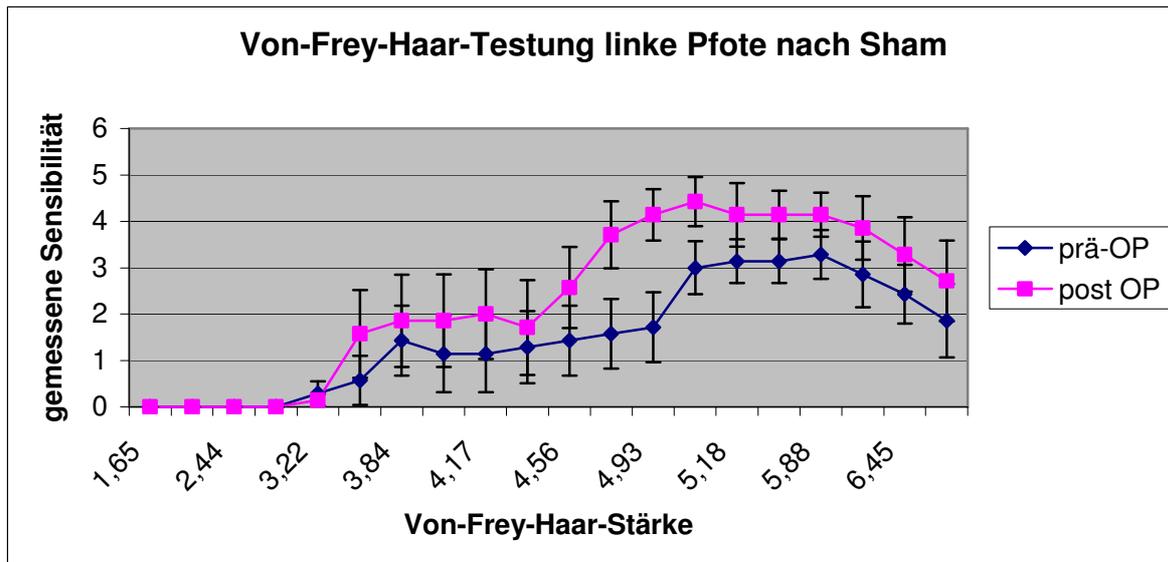


Abb. 3-11: mechanische Allodynie links nach Sham

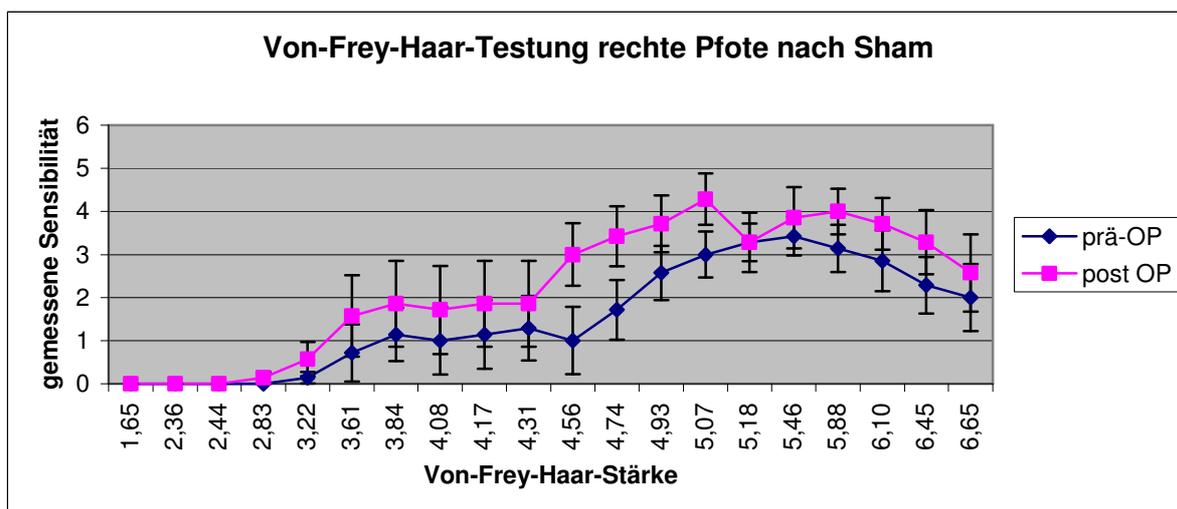


Abb. 3-12: mechanische Allodynie rechts nach Sham

3.4.2.3 Auszählung der Rückenmarksschnitte

Für die Auszählung der Rückenmarksschnitte werden die digital gespeicherten Bilder, wie oben beschrieben (Kap. 3.3, S.34), ausgedruckt und geblindet (ohne Zuordnung zu den Versuchsgruppen) ausgezählt.

Auf den Ausdrucken der Schnitte sollten das weiße und das graue Rückenmark erkennbar und das Vorder- und Hinterhorn klar zu definieren sein.

Die vorgenommene Auszählung erfolgt ausschließlich per Hand (gezählte Neuronen werden markiert).

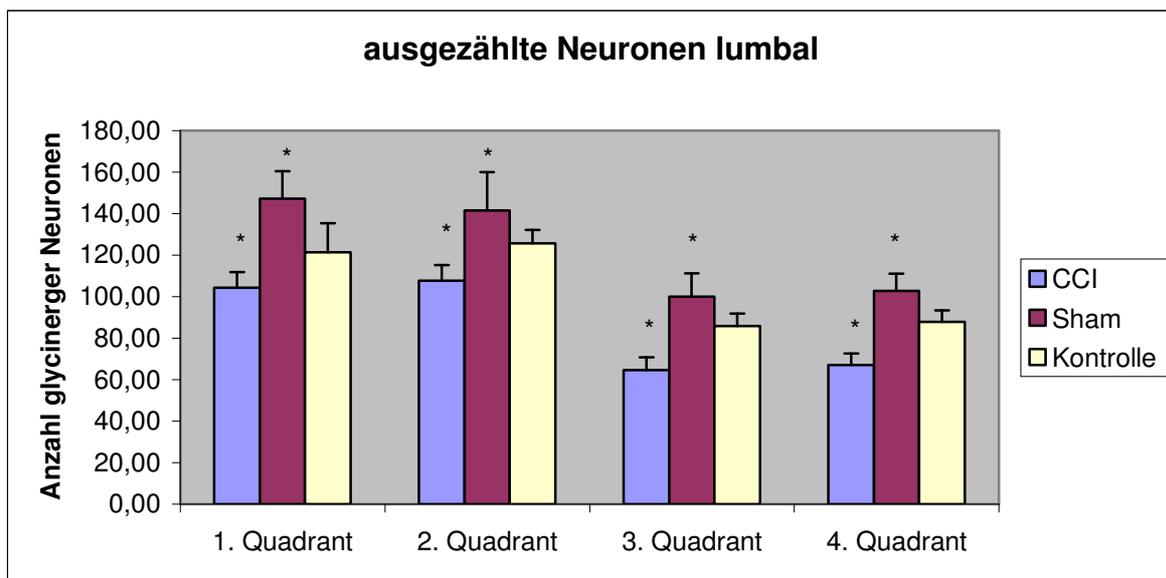
Die Auszählung ergibt allgemein, dass der 1. und 2. Quadrant im lumbalen Bereich bei allen drei Gruppen immer mehr leuchtende, markierte (glycinerge) Neuronen enthalten als der 3. und 4. Quadrant, das heißt die Hinterhörner enthalten mehr markierte Neuronen als die Vorderhörner.

Dagegen ist die Anzahl der Neuronen im ausgezählten thorakalen Bereich in allen vier Quadranten relativ gleich, außer bei den Sham-Tieren. Hier liegt die Zahl der Neuronen des dritten und vierten Quadranten etwas unter der im ersten und zweiten Quadranten.

Die Zahl der ausgezählten markierten Neuronen im lumbalen Bereich liegt bei den Kontrolltieren, Tiere ohne Intervention, im 1. Quadranten gemittelt bei $121,49 \pm 13,88$, im 2. Quadranten bei $125,79 \pm 6,36$ und im 3. Quadranten bei $85,7 \pm 6,09$, sowie im 4. Quadranten bei $87,76 \pm 5,61$. Die gemittelte Gesamtzahl aller vier Quadranten ergibt $420,73 \pm 27,74$.

Die Auszählung bei den Sham-Tieren ergibt im Mittelwert $147,26 \pm 13,29$ im 1. Quadranten, $141,54 \pm 18,46$ im 2. Quadranten, $100,04 \pm 11,22$ im 3. Quadranten und $102,86 \pm 8,22$ im 4. Quadranten, sowie eine Gesamtzahl von $491,69 \pm 45,39$ ermittelt.

In der Gruppe der CCI-Tiere liegt der Durchschnitt der gezählten Neuronen etwas darunter und beträgt im Mittel $104,33 \pm 7,64$ im 1. Quadranten, $107,68 \pm 7,58$ im 2. Quadranten, $64,55 \pm 6,21$ im 3. Quadranten und $67,08 \pm 5,54$ im 4. Quadranten. Die Gesamtzahl der hier gezählten Neuronen ergibt $343,65 \pm 22,87$.



* = die mittlere Differenz zu der Kontrollgruppe ist auf der Stufe $p < 0,05$ signifikant

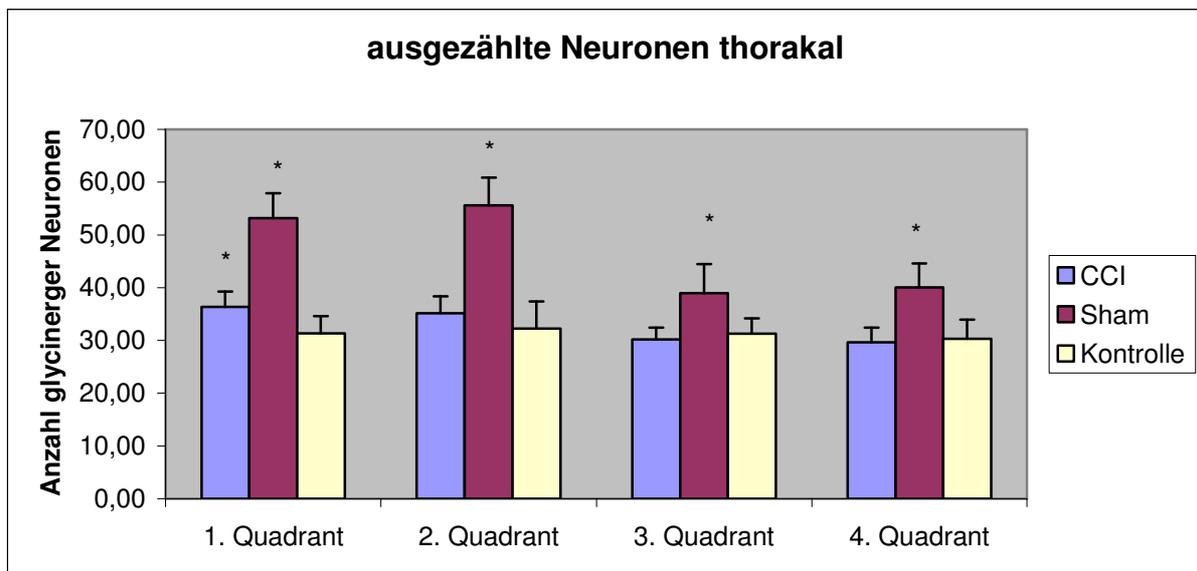
Abb. 3-13: Mittelwerte der ausgezählten markierten Neuronen im lumbalen Rückenmark

Damit ist die Anzahl der ausgezählten Neuronen in der CCI-Gruppe am geringsten und bei den Sham-Tieren am höchsten.

Außerdem ist festzustellen, dass die Anzahl der ausgezählten Neuronen in den dorsalen Quadranten (1. und 2.) ungefähr gleich ist, was auch für die ventralen (3. und 4.) Quadranten gilt. Somit kann in den Versuchen kein gravierender Unterschied für die Anzahl der Neuronen auf der linken und rechten Seite ausgemacht werden.

Die Zahl der glycinergen Neuronen ist insgesamt, sowohl ipsi- als auch kontralateral, bei den CCI-Mäusen erniedrigt (siehe Tab. 3-8 und Abb. 3-13).

Nach einer weiteren Auswertung der ermittelten Daten mit ANOVA post Hoc zeigt sich beim Vergleich der mittleren Differenzen der einzelnen Gruppen (CCI-Gruppe, Kontrollgruppe und Sham-Gruppe), dass die Werte der CCI-Gruppe in allen vier Quadranten signifikant erniedrigt sind. Dieser signifikante Unterschied zwischen den Ergebnissen der Gruppen bestätigt die Vermutung einer Veränderung in der Morphologie in Form einer Abnahme der Zahl der glycinergen Neuronen in der Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen. Im Gegensatz dazu ergibt die Auszählung der markierten Neuronen im thorakalen Rückenmark und der Mehrfachvergleich der Mittelwerte der Versuchsgruppen nur signifikante Unterschiede im I. und II. Quadranten der Sham-Gruppe. Zudem liegt die Gesamtzahl der glycinergen Neuronen im thorakalen Bereich bei den Sham-Tieren immer signifikant über der der anderen Gruppen (siehe Tab. 3-9 und Abb. 3-14).



* = die mittlere Differenz zu der Kontrollgruppe ist auf der Stufe $p < 0,05$ signifikant

Abb. 3-14: Mittelwerte der ausgezählten markierten Neuronen im thorakalen Rückenmark

Tab. 3-8: Ausgezählte markierte Neuronen im lumbalen Rückenmark bei den Versuchsgruppen

Ausgezählte markierte Neuronen im lumbalen Rückenmark							
		mean	sd	Max	Min	n	p
CCI-Gruppe	1. Quadrant	104,33	7,64	114,83	90,33	10	*
	2. Quadrant	107,68	7,58	114,83	97,67	10	*
	3. Quadrant	64,55	6,21	73,83	57,33	10	*
	4. Quadrant	67,08	5,54	74,83	59,83	10	*
	gesamt	343,65	22,87	386,33	317,34	10	*
Kontroll-Gruppe	1. Quadrant	121,49	13,88	145,45	106,71	12	*
	2. Quadrant	125,79	6,36	132,71	112,57	12	*
	3. Quadrant	85,7	6,09	94,43	77,71	12	*
	4. Quadrant	87,76	5,61	96	79	12	*
	gesamt	420,73	27,74	463,86	378,01	12	*
Sham-Gruppe	1. Quadrant	147,26	13,29	176,2	139	10	*
	2. Quadrant	141,54	18,46	178,4	114,8	10	*
	3. Quadrant	100,04	11,22	122,8	88,2	10	*
	4. Quadrant	102,86	8,22	112	89,2	10	*
	gesamt	491,69	45,39	579,8	452,5	10	*

mean = Mittelwert der ausgezählten Neuronen; sd = Standardabweichung; Max = Maximalwert; Min = Minimalwert; n = Anzahl der Versuchstiere; p* = signifikanter Gruppenunterschied auf einer Stufe von 0,05 gegenüber den anderen Gruppen

Tab.3-9:Ausgezählte markierte Neuronen im thorakalen Rückenmark bei den Versuchsgruppen

Ausgezählte markierte Neuronen im thorakalen Rückenmark							
		mean	sd	Max	Min	n	p
CCI-Gruppe	1. Quadrant	36,33	2,69	40,75	31,25	10	*
	2. Quadrant	35,12	3,27	41,75	28,5	10	
	3. Quadrant	30,18	2,22	34,5	28	10	
	4. Quadrant	29,6	2,8	34,67	25,32	10	
	gesamt	131,23	9,49	134,5	120,33	10	
Kontroll-Gruppe	1. Quadrant	31,33	3,23	35,5	27,75	12	*
	2. Quadrant	32,23	5,18	38	23	12	
	3. Quadrant	31,28	2,89	34	25	12	
	4. Quadrant	30,27	3,65	38,67	25	12	
	gesamt	125,1	9,74	136,8	108,75	12	
Sham-Gruppe	1. Quadrant	53,2	4,69	61,75	45	10	*
	2. Quadrant	55,6	5,26	64,75	47,5	10	*
	3. Quadrant	38,98	5,54	46,25	31,25	10	*
	4. Quadrant	40,1	4,51	47,75	35,5	10	*
	gesamt	187,88	17,45	216,25	158,5	10	*

mean = Mittelwert der ausgezählten Neuronen; sd = Standardabweichung; Max = Maximalwert; Min = Minimalwert; n = Anzahl der Versuchstiere; p* = signifikanter Gruppenunterschied auf einer Stufe von 0,05 gegenüber den anderen Gruppen

Abbildungen Rückenmarksschnitte von Tieren der Kontrollgruppe (ohne Intervention)

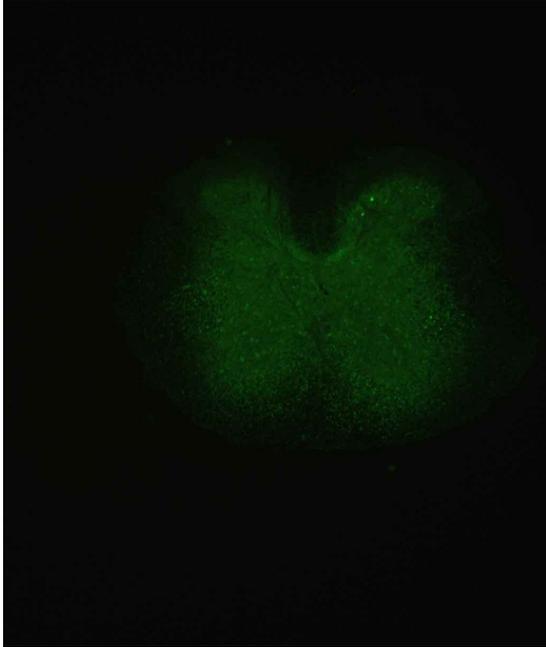


Abb. 3-15: thorakaler Schnitt: gleichmäßige Verteilung der glycinergen Neuronen



Abb. 3-16: thorakaler Schnitt wie Abb. 3-15

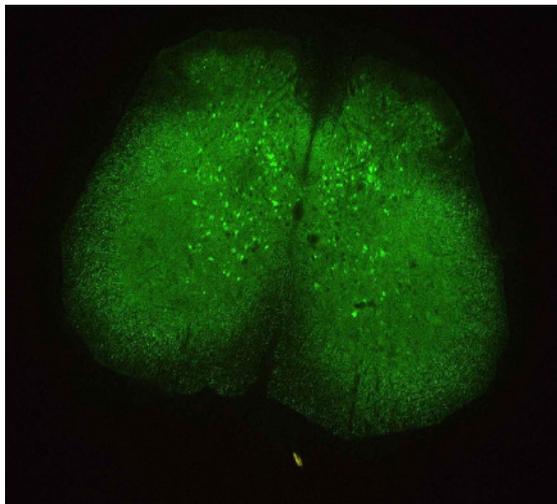


Abb. 3-17: lumbaler Schnitt: deutlich sichtbare glycinerge (leuchtende) Neuronen

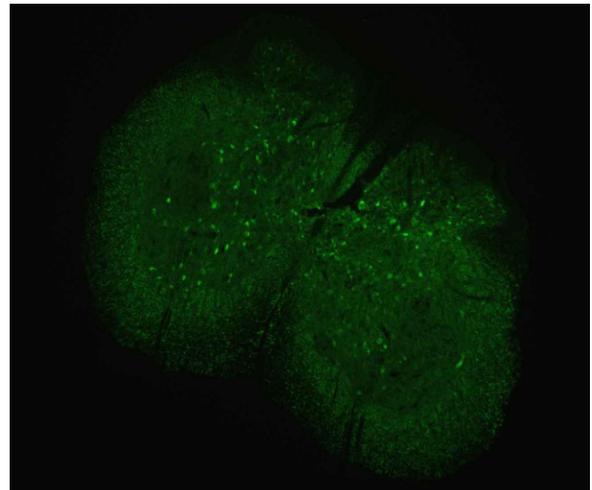


Abb. 3-18: lumbaler Schnitt: siehe links

Abbildungen Rückenmarksschnitte von Tieren der CCI-Gruppe

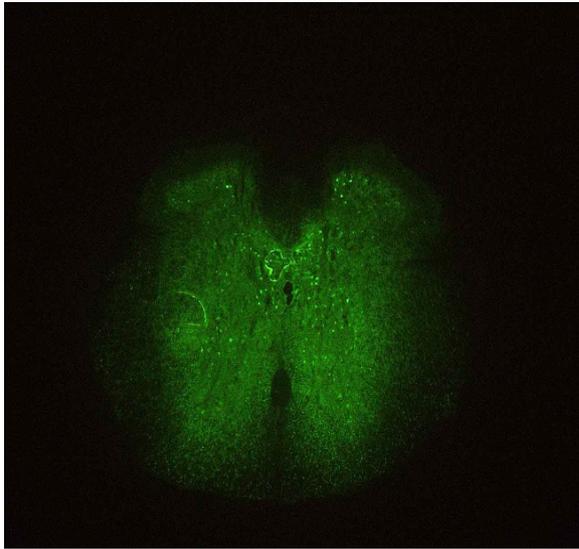


Abb. 3-19: thorakaler Schnitt: gleichmäßige Verteilung der glycinergen Neuronen

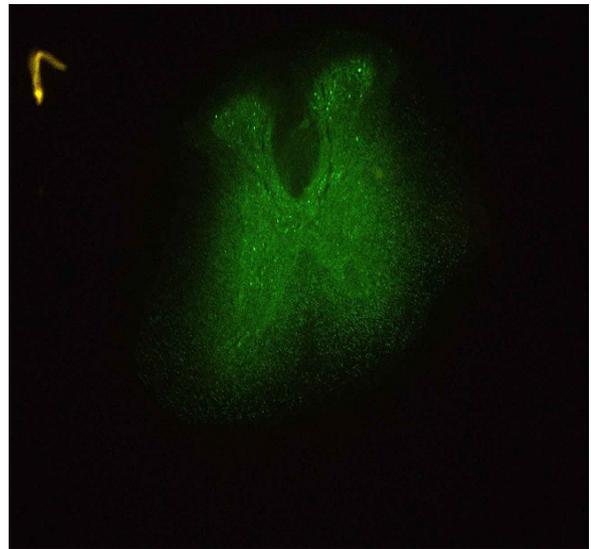


Abb. 3-20: thorakaler Schnitt: auch hier ist eine gleichmäßige Verteilung sichtbar

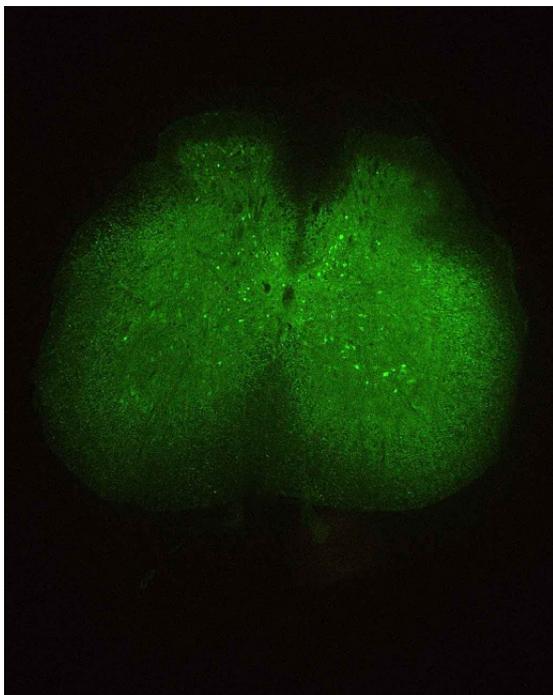


Abb.: 3-21: lumbaler Schnitt: auf der linken Seite ist eine deutlich geringere Fluoreszenz zu sehen

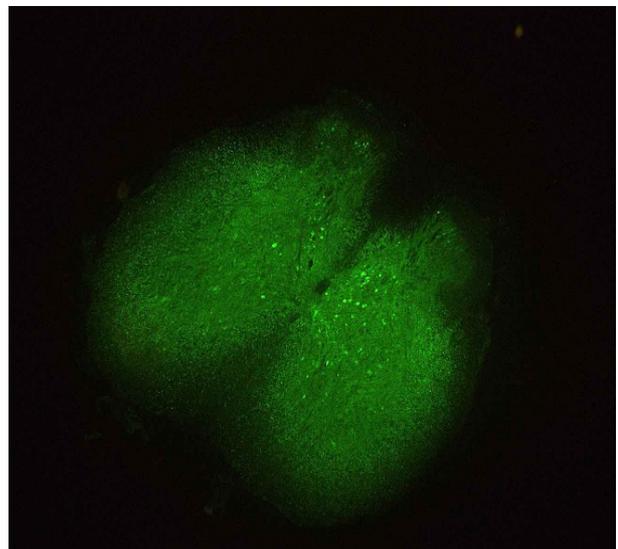


Abb. 3-22: lumbaler Schnitt: auch hier links weniger markierte Neuronen

Abbildungen Rückenmarksschnitte von Tieren der Sham-Gruppe

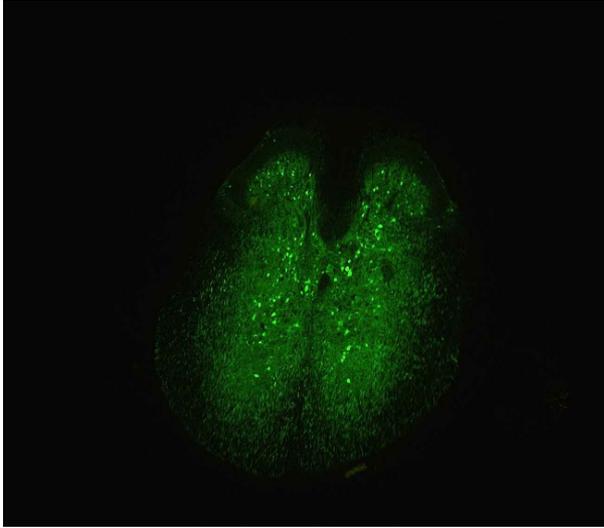


Abb. 3-23: thorakaler Schnitt: gleichmäßige Verteilung der markierten Neuronen

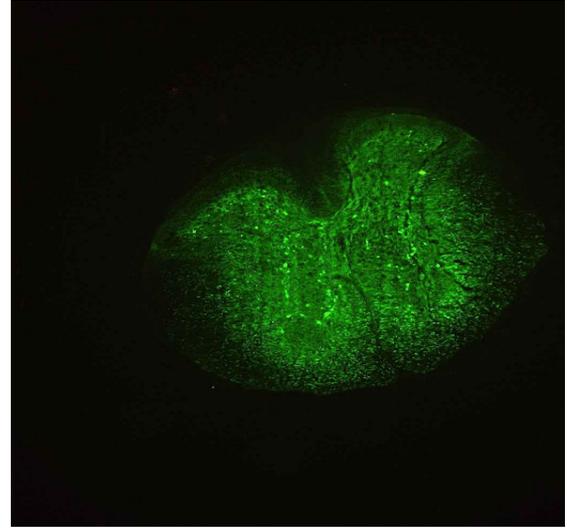


Abb. 3-24: thorakaler Schnitt: siehe Abb. 3-23

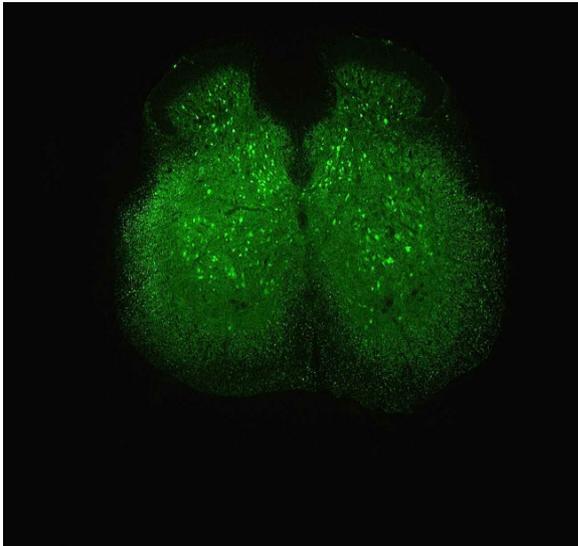


Abb. 3-25: lumbaler Schnitt: gleichmäßige Verteilung, wie im thorakalen Bereich

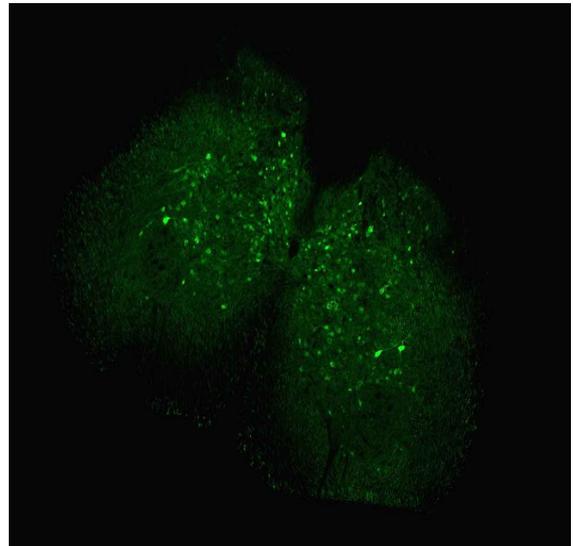


Abb. 3-26: lumbaler Schnitt: auch hier keine sichtbare Veränderung linke/rechte Seite

4 DISKUSSION

4.1 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob für die Entstehung neuropathischer Schmerzen eine Desinhibition auf spinaler Ebene, speziell ein Verlust glyciniger Neurotransmission beteiligt sein könnte.

Dafür wurde die Anzahl glyciniger Neuronen bei Mäusen nach experimentell provozierteschmerzhafter peripherer Mononeuropathie mit derjenigen bei Kontrolltieren sowie bei Tieren mit einer Sham-Operation verglichen. Der Einsatz von GFP-Mäusen, deren GlyT2 mit EGFP markiert ist, ermöglichte hier eine genaue Auszählung der glycinergen Neuronen.

Nach BIRKLEIN (2002) gehört die Desinhibition der Schmerzempfindung auf Rückenmarksebene neben der Akkumulation von spannungsabhängigen Na⁺-Kanälen im verletzten Nerv, der pathologischen Kopplung zwischen sympathischen und nozizeptiven Axonen sowie der zentralen (spinalen) und der peripheren nozizeptiven Sensibilisierung, zu den wichtigsten molekularen Mechanismen des neuropathischen Schmerzes.

Hintergrund dieser Untersuchungen ist die immer noch bestehende Behandlungsresistenz neuropathischer Schmerzen vieler Patienten und die Suche nach den Ursachen der Entstehung dieses Krankheitsgeschehens, sowie die dazuführende Entwicklung und Aufrechterhaltung.

So leiden ca. 20% aller Patienten, die wegen Schmerzen eine schmerztherapeutische Spezialeinrichtung aufsuchen, unter ungenügend therapierten neuropathischen Schmerzen. Studien belegen, dass etwa ein Fünftel aller Patienten, die operiert wurden, lang anhaltend, zum Teil lebenslang, unter Nervenschmerzen leiden. Dabei können diese Schmerzen nach einem „leichten“ Eingriff genauso chronifizieren wie nach einem „schweren“. Auch Phantom-schmerzen zählen zu den neuropathischen Schmerzen. 60% aller Menschen, denen Gliedmaßen amputiert wurden, sind davon betroffen (TÖLLE und BARON 2002).

Mit der Untersuchung von Ursache und Entstehung der neuropathischen Schmerzen mit dem Ansatz einer möglicherweise reduzierten glycinergen Neurotransmission könnten neue, verbesserte Behandlungsmethoden weiter auf den Weg gebracht werden.

Der hier gewählte Ansatz der Untersuchungen zielt auf die glycinergen Neuronen, bzw. den Glycintransporter2 (GlyT2) und deren Auszählung bei gesunden, nativen Tieren im Vergleich zu Tieren mit experimentell induzierten neuropathischen Schmerzen.

Hoch affine Transporter regulieren die Wiederaufnahme von freigesetzten Neurotransmittern an Synapsen und begrenzen damit deren synaptische Aktivität (LUQUE et al. 1995).

Für den hemmenden Neurotransmitter Glycin kennt man heute zwei verschiedene Transporter. Der eine (GlyT1) kommt in den die Nervenzellen umgebenden Stütz- oder Gliazellen vor, der andere (GlyT2) wird hochspezifisch in Hemmung-vermittelnden Interneuronen des Rückenmarks und des Hirnstamms exprimiert (JURSKY und NELSON 1995, LUQUE et al. 1995). GlyT2 unterscheidet sich von GlyT1 in der molekularen Struktur, Gewebespezifität und pharmakologischen Eigenschaften (LIU et al. 1993).

Der GlyT2 wird in glycinergen Neuronen exprimiert und ist beteiligt am Abbruch inhibitorischer Neurotransmission an Strychnin-sensitiven glycinergen Synapsen (EBIHARA et al. 2004, GOMEZA et al. 2006). Glycinerge Neurotransmission wird durch die Aufnahme von Glycin in glycinerge Nervenendigungen und benachbarte Gliazellen beendet (BETZ et al. 2006).

Dem glialen GlyT1 werden dagegen hauptsächlich Funktionen bei der Regulation des sogenannten NMDA-Rezeptors an erregenden Synapsen zugeschrieben (GOMEZA et al. 2003a, 2003b, 2006, BETZ et al. 2006).

Somit kann man sagen, dass GlyT2 die tragende Rolle beim Glycinaufnahme-Mechanismus an inhibitorischen Synapsen liefert.

Glycintransporter gehören zu der Na^+/Cl^- -abhängigen Transporterfamilie, deren Aktivitäten und subzellulären Verteilungen durch Phosphorylierung und Interaktion mit anderen Proteinen reguliert wird (EULENBURG et al. 2005).

Zudem konnten POYATOS et al. (1997) mit Untersuchungen von GlyT2 und Glycin-immunreaktivität bei In-vitro-Neuronen zeigen, dass GlyT2 als verlässlicher Marker zur Identifizierung von Glycin-angereicherten Neuronen genutzt werden kann.

Es wurden für diese Untersuchungen GlyT2-Mäuse verwendet, da bei diesen Tieren durch Einschleusen eines Gens für EGFP, welches denselben Promoter wie GlyT2 hat, eine sichere Identifizierung der glycinergen Neuronen gewährleistet ist. Das enhanced green fluorescent protein (EGFP) wird bei diesen Tieren unter Kontrolle des Promoters für das Glycintransporter-2-gen exprimiert und ermöglicht durch Eigenfluoreszenz eine einfache Identifizierung der GlyT2. ZEILHOFER et al. (2005) haben EGFP-Expression bei Mäusen mit Immunfluoreszenz gegen GlyT2 und Glycin verglichen. Sie kamen zu dem Schluss, dass eine GlyT2-Immunfluoreszenz für eine Zellzählung nicht geeignet ist, da es fast ausschließlich das Neuropil färbt. Ebenso färben Antiseren gegen Glycin zwar Somata, aber die Färbungen sind sehr variabel und u.a. auch sehr von der Fixation abhängig. So zeigen

solche Färbungen schon im selben Tier Unterschiede zwischen der linken und rechten Seite des Rückenmarks.

Aufgrund dieser Erkenntnisse sind die GlyT2-EGFP-Mäuse für die geplanten Untersuchungen die beste zur Zeit verfügbare Lösung, da die Erkennung und Auszählung der markierten Neuronen durch die klar abgegrenzten Strukturen in den Präparaten dieser Tiere erleichtert wird und keine Fehler in der Aufbereitung, in Bezug auf die Färbung und andere mögliche Artefakte, auftreten können.

Ferner haben Mäuse als Versuchstiere bereits einen festen Platz in der Schmerzforschung und Schmerzmodelle für experimentell induzierte periphere Mononeuropathie sind bei ihnen bereits etabliert, so dass umfangreiche Studien auf diesem Gebiet die Ergebnisse der Untersuchungen stützen können. Ebenso verwendet die eigene Arbeitsgruppe mit der CCI-Operationstechnik von 3 Ligaturen zur Induktion einer solchen Mononeuropathie eine Methode, die schon in einer vorhergehenden Studie (SOMMER 2004) erfolgreich eingesetzt wurde.

Zudem konnte man in den Vorversuchen übereinstimmend mit MALMBERG und BASBAUM (1998) zeigen, dass traditionelle Modelle für chronischen Schmerz, die hauptsächlich in Studien über Ratten entwickelt wurden, auch bei transgenen Mäusen angewandt werden können.

Man verwandte mit dem Plantartest (Fa. UGO Basile 2002) ein seit 1988 in der Schmerzforschung eingesetztes (HARGREAVES et al. 1988) und etabliertes wissenschaftliches Messverfahren. Es ermöglicht eine sekundengenaue Messung bei einfach durchführbarer Handhabung.

4.2 Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die anfängliche Annahme, dass es bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen zu einem Verlust von glycinergen Neuronen kommt.

Die glycinergen Neuronen spielen eine wichtige Rolle in der Inhibition neuropathischer Schmerzen. So hat Glycin wichtige Neurotransmitterfunktionen auf inhibitorische und exzitatorische Synapsen im vertebralen ZNS. Glycintransporter regulieren die synaptische Konzentration von Glycin durch die Vermittlung der Wiederaufnahme in Nervenendigungen benachbarter Gliazellen (EULENBURG et al. 2005).

Den Effekt von mit Glycin behandelten Ratten konnten BEYER et al. (1985) zeigen. Sie verabreichten Glycin perispinal und untersuchten die nozizeptive Antwort auf Stimulierung

verschiedener kutaner Rezeptoren. Sie konnten dabei zeigen, dass mit Glycin die sichtbare Schwelle beim Schwanzspitzen-Test signifikant reduziert wurde. Ihre Ergebnisse deuten darauf hin, dass glycinerge Neuronen zur tonischen Regulation des nozizeptiven Inputs am Rückenmark beitragen.

Zu Beginn der Versuche machte man sich Gedanken, wie auftretende Fehlerquellen in der Planung, Durchführung und der Auswertung ausgeschlossen, bzw. auf ein Minimum reduziert werden können.

Die möglichen Fehler in den Messungen wurden weitestgehend ausgeschlossen, da man nur Tiere einer bestimmten Altersstufe für die Versuche einsetzte. So hatten die untersuchten Tiere gute Voraussetzungen, um eine sich eventuell später entwickelnde Eigenfluoreszenz, die eine genaue Auszählung deutlich erschweren bzw. verhindern würde, so weit wie möglich ausschließen zu können.

Um etwaige Tagesschwankungen der einzelnen Versuchstiere zu reduzieren, da das Schmerzverhalten zu verschiedenen Tageszeiten unterschiedlich ausgeprägt sein kann, wurden die Verhaltensversuche immer im selben Raum und zur gleichen Tageszeit nach einer angemessenen Eingewöhnungszeit durchgeführt.

Ebenso wurden Messfehler bei den Verhaltensversuchen durch subjektive Wertung, die zum Beispiel über die individuelle Art des Auslösens des Startknopfes und Variationen der Beobachtung durch unterschiedliche Untersucher entstehen können, minimiert, indem nur ein und dieselbe Person die gesamte Versuchsreihe durchführte und wertete. Die Untersuchungen wurden geblindet durchgeführt, um eine subjektive Wertung durch Voreingenommenheit zu erschweren. Es ist auch anzunehmen, dass nicht immer die selbe Stelle der Hinterpfote gereizt wird, da zwar durch das Fadenkreuz über der Lichtquelle eine genaue Positionierung erleichtert wird, aber schon minimale Verschiebungen eine Veränderung in der Reaktion bewirken können. Dadurch können einmal mehr oder weniger empfindliche Stellen (unterschiedliche Dicke der Hornhaut) gereizt werden, so dass die Tiere selbst am gleichen Versuchstag bei mehrmaligen Messungen verschiedene Ergebnisse zeigen. Um diese Ungenauigkeit beim Positionieren der Lichtquelle so gering wie möglich zu halten, wurde jede Hinterpfote zum gleichen Zeitpunkt insgesamt siebenmal hintereinander getestet. Auch die Auszählung der markierten Neuronen der Rückenmarksschnitte wurde geblindet durchgeführt. Gerade hier würde das Wissen, welche Bilder zu den einzelnen Versuchsgruppen gehören, die Objektivität des Experimentators erheblich beeinflussen.

Es war wichtig in den Vorversuchen zu zeigen, dass bei den Tieren des in den Hauptversuchen einzusetzenden 3010-Stammes, eine periphere Mononeuropathie mit ausgeprägter thermaler Hyperalgesie durch CCI hervorgerufen werden kann. Frühere Studien, wie z.B. von XU et al. (2001), haben nämlich gezeigt, dass allein genetische Faktoren die Entwicklung neuropathischen Schmerzverhaltens beeinflussen können. In ihrer Studie untersuchten sie dabei verschiedene Ratten-Stämme. Die Reaktionen auf mechanische, Hitze- und Kältereize beider Hinterpfoten wurden dabei vor und regelmäßig nach der Verletzung gemessen. Zudem wurden in dieser Studie elektronenmikroskopische Untersuchungen durchgeführt, die enthüllten, dass in diesem Modell beide, myelinisierte und unmyelinisierte Fasern, beschädigt wurden. Es zeigte sich aber auch, dass die physiologische Sensibilität und Entwicklung von schmerzähnlichem Verhalten nach partieller Nervenverletzung zwischen den Rattenstämmen stark variiert, was als genetischen Faktoren der Schmerzsensibilität nach Nervenverletzungen interpretiert wird.

In den eigenen Vorversuchen konnte dagegen eindeutig gezeigt werden, dass die hier eingesetzten Mäuse das gleiche Schmerzverhalten zeigen wie ihre nicht genmodifizierten Verwandten, bzw. eine periphere Neuropathie nach der CCI entwickeln. Bei allen Tieren dieser Versuche war eine deutliche thermale Hyperalgesie nach der Intervention zu verzeichnen.

Zudem konnte in den Vorversuchen ein Zeitraum für die spätere postoperative Testung festgelegt werden, da vor diesen Untersuchungen auch nicht bekannt war, ob sich das Schmerzverhalten im gleichen Zeitrahmen entwickelt wie bei den bisher untersuchten C57BL/6-Mäusen. Auch hier bestätigte sich ein ähnlicher Zeitverlauf beim neuropathischen Geschehen.

In den Hauptversuchen konnte bei den Tieren der CCI-Gruppe nach ca. 2 Wochen durch Messung der thermalen Schmerzschwellen eine deutlich ausgeprägte thermale Hyperalgesie gezeigt werden. Im Vergleich zu den präoperativen Werten waren die Pfortenrückzuglatenzen sowohl ipsi- als auch kontralateral stark verkürzt und die Tiere zeigten auch schon ohne Auslösung jeglicher Reize eine Schonhaltung der operierten Gliedmaße. Sie zeigten damit die typischen Verhaltensweisen für eine periphere Mononeuropathie. Nach der statistischen Auswertung waren zumindest die Werte der ipsilateralen Seite signifikant ($p= 0,003$) erniedrigt. Die Werte der kontralateralen Seite ($p= 0,051$) waren bei einer Signifikanz von $p < 0,05$ nur knapp nicht signifikant.

Bei den Tieren der Sham-Gruppe konnten dagegen weder auf der rechten, noch auf der linken Seite signifikante Veränderungen der thermalen Schmerzschwellen festgestellt werden. Der Vergleich der postoperativen Werte zu den präoperativen zeigte nur leichte Schwankungen, durch leicht erhöhte und leicht erniedrigte Werte für die Pfotenrückzuglatenzen.

Die hier gefundenen geringgradigen Veränderungen lassen deshalb eher auf Tagesschwankungen, oder Stimulierung unterschiedlicher Reizpunkte durch leicht variierende Positionierung der Lichtquelle schließen.

Auch im Vergleich der postoperativen Werte von den Sham- und den CCI-Tieren lagen die Werte der CCI-Gruppe beidseits deutlich niedriger.

Die Testung der mechanischen Allodynie brachten dagegen keine signifikant veränderten Ergebnisse. Die nicht eindeutigen Resultate dieser Testung lassen die Grenzen der hier eingesetzten Technik erkennen. Es sollte auch hier nur eine Person die Versuchsreihe durchführen, um diese Fehlerquellen zu minimieren. Zudem wird nicht bei jeder Testung der gleiche Punkt der Pfotenunterseite gereizt. Schon minimale Veränderungen in der Platzierung der Filamente bedeuten eine andere Reaktion, da die Haut unterschiedlich dick ist und damit die Empfindlichkeit variiert. Da alle Filamente an jeder Pfote durchgetestet werden, wird die Testung zusätzlich durch die Gewöhnung der Tiere an diese Prozedur erschwert. Damit wird ein genaues Platzieren der Filamente langwierig und schwierig, weil ein unauffälliges Heranführen der Filamente an die Pfote fast unmöglich ist. Da die große Streuung dieser Methodik aber bekannt ist, wurden mittlerweile andere Systeme zur Messung der mechanischen Allodynie entwickelt (Anaesthesiometer), um dieser Problematik entgegen zu wirken. Dieses Gerät misst den ausgeübten Druck bis zum Pfotenrückzug automatisch. Es kann direkt der genaue Druck festgehalten werden und eine Gewöhnung der Tiere durch langwierige Testungen kann vermindert werden.

Da die hier erhalten Ergebnisse eine große Streuung zeigen, erscheinen sie ziemlich vage, weil eine eindeutige Steigerung, bzw. Absenkung der Schmerzschwellen nicht erkennbar ist.

Bei der Betrachtung der ersten histologischen Bilder des Rückenmarks von den transgenen Tieren konnten mit bloßem Auge schon Unterschiede zwischen der CCI-Gruppe und der Kontrollgruppe (ohne Intervention) erkannt werden. Natürlich konnte daraus kein Schluss auf die Ergebnisse der folgenden Auszählung gezogen werden, da diese erste Betrachtung sicherlich als subjektiv gewertet werden kann.

Die quantitativen Unterschiede bei den lumbalen Schnitten zwischen CCI- und Kontroll-Tieren zeigen eine signifikante Reduzierung der EGFP-markierten Neuronen in der CCI-Gruppe an.

Das Ergebnis wird durch die Auszählung der thorakalen Schnitte unterstützt, da hier beim Vergleich der Kontroll- und CCI-Gruppe keine signifikante Veränderung auszumachen ist.

Die Auszählung der thorakalen Schnitte dient sozusagen als Kontrolle, da hier ein Abschnitt untersucht wird, der durch die experimentell hervorgerufenen Neuropathie (CCI betrifft die Austrittsstelle des N. ischiadicus, L4/5) nicht verändert wird. Dies wird durch die Auszählung der thorakalen Schnitte bei allen Gruppen durch ziemlich ähnliche Ergebnisse bestätigt.

Lediglich die Tiere der Sham-Gruppe zeigen im thorakalen Bereich in zwei Quadranten eine signifikant erhöhte Anzahl glycinergener Neuronen. Aufgrund dieser Ergebnisse im thorakalen Bereich, in dem sich die Anzahl der glycinergen Neuronen bei CCI- und Kontrolltieren auf gleichem Niveau befindet, kann man davon ausgehen, dass die Veränderung im lumbalen Bereich auf die experimentell hervorgerufene Mononeuropathie zurückzuführen ist.

Mit der Auszählung der markierten glycinergen Neuronen im lumbalen Bereich konnte eine signifikante Veränderung bei Tieren der CCI-Gruppe im Vergleich zu Tieren der Kontroll- und Sham-Gruppe gezeigt werden.

Die hier gewonnenen Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass es bei einer peripheren Mononeuropathie zu einer Verminderung der inhibitorischen Neurotransmission, in Form einer Reduzierung der glycinergen Neuronen, kommt.

Bei den ausgezählten markierten Neuronen handelt es sich ausschließlich um GlyT2. Wie POYATOS et al. (1997) zeigten, kann GlyT2 als verlässlicher Marker zur Identifizierung glycinangereicherter Neuronen genutzt werden. Was es auch erlaubt die Anzahl der ausgezählten fluoreszierenden GlyT2 mit den vorhandenen glycinergen Neuronen gleichzusetzen.

4.3 Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Sham-operierten Tiere überraschen, da die ausgezählten Fluoreszenzen in den lumbalen Rückenmarksschnitten immer deutlich signifikant sowohl über denen der CCI-, als auch denen der Kontroll-Tieren lagen. Hier stellt sich die Frage, ob dieser Anstieg auf eine Vermehrung der Neuronen deutet. Sind möglicherweise glycinerge Neuronen neu entstanden? Oder handelt es sich ausschließlich um Glycin2-Transporter?

Die Kontrolltiere durchliefen in diesen Versuchen weder eine Neuropathie (CCI), noch eine Schmerzauslösung (thermale Testung). Wohingegen die Sham-Tiere zwar keine Neuropathie,

aber eine Schmerzauslösung erfahren. Möglicherweise induziert die alleinige Schmerzauslösung eine Vermehrung der markierten Neuronen, sowohl im lumbalen als auch thorakalen Bereich. Es könnte somit Zeichen einer Gegenregulation in Form einer Vermehrung der inhibitorischen glycinergen Neuronen sein, da eine gezielte Reizauslösung sonst möglicherweise eine Chronifizierung, oder Verstärkung der Schmerzen bewirken würde. Es lässt sich zwar nicht ausschließen, dass die vermehrte Fluoreszenz auf die Sham-OP allein zurückzuführen ist, aber anhand der vorhandenen Literatur (siehe unten) erscheint es plausibel, dass dieses Phänomen durch eine Hochregulation des antinozizeptiven Systems als Gegenregulation zum nozizeptiven Input entsteht. Dieses Phänomen könnte also eine Art Schutzmechanismus der körperlichen Schmerzabwehr sein.

Die körpereigene Schmerzabwehr ist dauernd aktiv und kann z.B. durch akuten Stress oder Schmerzreize zusätzlich aktiviert werden.

So kann nach SANDKÜHLER (2001) ein Eingriff in die Signaltransduktionswege und Umkehr der Sensibilisierung unter Umständen durch den Einsatz von so genannten Gegenirritationsverfahren (hierbei werden sensible Nervenfasern therapeutisch erregt) erreicht werden. Hierbei werden sensible Nervenfasern therapeutisch erregt, z.B. durch die transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS), mit physikalischen Formen der Schmerztherapie (Wärme oder Kälteanwendungen) oder mit bestimmten Formen der Akupunktur. Diese Aussage unterstützt die Vermutung einer möglichen Gegenregulation durch Vermehrung inhibitorischer Neuronen nach einer vorausgehenden Schmerzreizung, wie es in den vorliegenden Versuchen der Fall war.

Eine weitere Frage, die sich nach den hier gefundenen Ergebnissen stellt, ist, warum vorherige, andere Studien abweichende Ergebnisse bei den Auszählungen der markierten Neuronen liefern. Hier spielt sicherlich wieder die Aufbereitung der jeweiligen untersuchten Präparate eine Rolle.

So konnten SUGIMOTO et al. (1990) mit ihren Untersuchungen der spinalen Dorsalhörner auf transsynaptische Degeneration (Pyknose und Hyperchromatose; „dunkle Zellen“) ähnliche Ergebnisse vorweisen. Auch hier waren Zeichen der Degeneration im lumbalen Dorsalhorn beider Seiten nach einseitiger CCI vorhanden. Allerdings konnten sie diese Degeneration auf der ipsilateralen Seite deutlich stärker feststellen, als es bei der vorliegenden Studie der Fall war. Andererseits werden ihre Ergebnisse wie die eigenen durch den Vergleich der Untersuchungen im thorakalen Dorsalhorn derselben Tiere unterstützt. So zeigen die Tiere

wie in den eigenen Untersuchungen im thorakalen Bereich keine Veränderungen in den CCI-Gruppen.

Elektronenmikroskopische Untersuchungen von HAMA et al. (1994) brachten ebensolche Ergebnisse hervor. Auch hier wurden Zeichen transsynaptischer Veränderungen (dunkle Neuronen) auf der ipsilateralen Seite der Nervenverletzung im spinalen Dorsalhorn, sowie einige veränderte Neuronen im kontralateralen Dorsalhorn gefunden.

KAWAMURA et al. (1997) konnten auch in den mit TUNEL-Färbung und Elektrophorese aufbereiteten Rückenmarkspräparaten von CCI-Tieren neuronale Apoptose nachweisen. Sie zeigten morphologische Veränderungen („dunkle Neuronen“) mit Hilfe von Toluidinblau-Färbung.

Die in der eigenen Studie ermittelten Ergebnisse werden auch von WHITESIDE und MUNGLANI (2001) unterstützt. Sie beschrieben ihre Untersuchung zum Vorkommen apoptotischen Zelltods im Dorsalhorn nach CCI bei Ratten. Wie bei KAWAMURA et al. (1997) kam auch hier eine TUNEL-Färbung und zusätzlich HOECHST-double-labelling zum Einsatz. Sie konnten damit eine bedeutende Anzahl apoptotischer Zellen im ipsilateralen Dorsalhorn im Vergleich zur kontralateralen Seite und Sham- und Kontrolltieren nachweisen. Widersprüchliche Ergebnisse stellen dagegen POLGÁR et al. (2003) dar, die sich mit dem selektiven Verlust GABAerger oder glycinерger Neuronen bei der Entwicklung thermaler Hyperalgesie, auch beim Schmerzmodell CCI beschäftigten. Hier könnte der Grund für die abweichenden Ergebnisse, wie bereits oben und von den Autoren selbst erwähnt, in der technischen Schwierigkeit verbunden mit der Immunfärbung oder der Qualität der Fixierung liegen. Laut POLGÁR et al. (2003) könnte eine mögliche Erklärung für den Unterschied ihrer Ergebnisse zu anderen, wie IBUKI et al. (1997) und EATON et al. (1998) sein, dass es zwar in den anderen Versuchen einen geringgradigen Verlust von GABA und GABAergen inhibitorischen Neuronen gab, der aber für ihre höher sensitive Methode nicht ausreichend war. Auch in ihren späteren Studien aus den Jahren 2004 und 2005 konnten POLGÁR et al. keinen dramatischen Verlust von Neuronen im spinalen Dorsalhorn zeigen. Allerdings erwähnen sie die Hauptprobleme bei der Auswertung solcher Ergebnisse, nämlich die Schwierigkeiten bei der Bestimmung totalen Zellverlusts oder Veränderungen in Form abnormer, degenerierter Zellen und der Frage, ob die TUNEL-positiv gefärbten Nuclei zu den Neuronen oder zur Glia gehören.

Damit wird die Schwierigkeit der Auszählung bestimmter Neuronen bei den bisherigen Studien bestätigt.

Andererseits unterstützen die Ergebnisse von MOORE et al. (2002), dass die glycinerge Transmission nach CCI weitgehend intakt bleibt, die Aussagen von POLGÁR et al. (2003-2005).

Der in der vorliegenden Studie verwendete Mäusestamm erleichtert die morphologische und funktionale Analyse. ZEILHOFER et al. (2005) sehen den Hauptgrund für die unterschiedlichen Ergebnisse in bisherigen Studien in der Identifizierung der Zellen in Schnittpräparaten zur Beurteilung elektrophysiologischer Parameter und ihrer axonalen Projektionen. Neuronen, die GlyT2-EGFP tragen, sind stark fluoreszent und ihre Dendriten und Axone können im genauen Detail betrachtet werden, was den Hauptvorteil des gewählten Tiermodells darstellt.

4.4 Schlussbetrachtung

Mit der vorliegenden Studie konnte eine Desinhibition bei GlyT2-Mäuse mit induzierter Neuropathie (CCI) durch eine geringere Anzahl markierter Neuronen im Vergleich zu nicht intervenierten Tieren (Kontrollgruppe) gezeigt werden. Die Anzahl der glycinergen Neuronen lag bei den Tieren der CCI-Gruppe signifikant unter denen der Sham- und Kontrollgruppe. Gleichzeitig konnte man feststellen, dass die Tiere der Sham-Gruppe gegenüber den beiden anderen Gruppen eine erhöhte Anzahl glycinerner Neuronen aufweisen.

Es wird angenommen, dass die Sham-Tiere infolge der Schmerzauslösung (mit dem Plantar-test) eine Art Schutzmechanismus in Form einer Vermehrung der glycinergen Neuronen entwickeln. Hierzu scheint keine Neuropathie-Auslösung durch CCI erforderlich zu sein.

Dabei kann man nicht ausschließen, dass die gefundene vermehrte Fluoreszenz auf die erfolgte Sham-Operation zurückzuführen ist, aber aufgrund der vorhandenen Literatur erscheint es plausibel, dass dieses Phänomen durch eine Hochregulierung des antinozizeptiven Systems als Gegenregulation zum nozizeptiven Input entsteht.

Zur genaueren Abklärung dieses Phänomens werden sicherlich weitere Untersuchungen folgen in denen eine vermehrte Fluoreszenz infolge der Sham-Intervention ausgeschlossen werden kann. Dazu sollten dann auch die Kontrolltiere in vivo thermal stimuliert und getestet werden.

Außerdem sollte auch die Testung der mechanischen Allodynie in weiterführenden Untersuchungen durch andere Systeme (z.B. Anaesthesiometer) ergänzt werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zu untersuchen, ob eine Desinhibition auf spinaler Ebene für neuropathische Schmerzen ursächlich sein könnte. Besondere Berücksichtigung sollte hier eine Desinhibition in Form einer Reduzierung der glycinergen Neuronen finden.

In einer experimentellen Studie wurden 32 GFP^{GlyT2}-Mäuse eingesetzt. Hierbei handelt es sich um genetisch modifizierte Tiere bei denen Neuronen, die den Promoter für den Glycintransporter 2 (GlyT2) exprimieren, mit enhanced green fluorescent protein (EGFP) markiert sind. Bei einer Gruppe induzierte man eine periphere Neuropathie, bzw. eine entsprechende Schein-Operation (Sham-OP) und die dritte unoperierte Gruppe diente als Kontrolle. Man verwendete hier für die experimentell induzierte periphere Mononeuropathie das chronic constriction injury (CCI)-Modell am N. ischiadicus. Zur Überprüfung der hervorgerufenen Neuropathie wurden die thermale Hyperalgesie, mittels Plantartest^R, und die mechanische Allodynie, gemessen mit Von-Frey-Haar-Monofilamenten, vor und nach den Operationen dokumentiert.

Zur weiteren Untersuchung wurden alle Tiere mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung perfundiert und vom lumbalen (L4/L5) und thorakalen Rückenmark mit dem Kryostaten Schnitte von 16 µm Dicke angefertigt.

Um zu überprüfen, ob eine Reduzierung der glycinergen Neuronen auftrat, erfolgte eine quantitative Untersuchung der Schnitte bei einer fünffachen Vergrößerung mit dem Fluoreszenzmikroskop und durch Vergleiche der einzelnen Gruppen untereinander.

Die Ergebnisse zeigen, dass man bei den transgenen Tieren durch CCI eine deutliche thermale Hyperalgesie hervorrufen kann.

Zudem zeigt die Auszählung der glycinergen Neuronen im thorakalen Bereich bei CCI- und Kontrolltieren keine Veränderung. Die Anzahl der markierten Neuronen lagen bei beiden Gruppen auf gleichem Niveau. Es hat also keine Verluste glycinerner Neurotransmission in diesem Bereich.

Dagegen können in der Auswertung der untersuchten lumbalen Rückenmarksschnitte signifikante Veränderungen bei den Tieren der CCI-Gruppe festgestellt werden. Die hier ausgezählte Anzahl markierter Neuronen liegt signifikant unter denen der anderen beiden Gruppen.

Man kann davon ausgehen, dass es im Zuge einer experimentell induzierten peripheren Neuropathie zu einem Verlust glycinerner Neuronen im Lumbalbereich kommt.

Des Weiteren fällt bei der Auszählung des lumbalen und des thorakalen Rückenmarksbereichs der Sham-operierten Mäuse auf, dass diese Werte immer über denen der anderen Gruppen liegen. Möglicherweise induziert die Schmerzauslösung ohne Neuropathie eine Vermehrung der glycinergen Neuronen. Vielleicht handelt es sich dabei aber auch nur um eine Vermehrung der GlyT2. Eine genauere Abklärung durch weitere Untersuchungen dieses hier gefundenen Phänomens ist nötig.

6 SUMMARY

Investigations of spinal disinhibition by GlyT2-EGFP-mice under neuropathic pain.

We investigated whether a spinal disinhibition, especially a reduction in the quantity of glycinergic neurons or glycinergic neurotransmission, causes neuropathic pain.

In an experimental study we used 32 GFP^{GlyT2}-mice. These are transgenic mice, which specifically express enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of the promoter of the glycine transporter (GlyT) 2 gene, which is a reliable marker for glycinergic neurons. Neurons expressing GlyT2-EGFP are intensely fluorescent.

To evaluate neuropathic pain after CCI we tested thermal hyperalgesia with the Plantar test® and mechanical allodynia with v.Frey monofilaments before and after operation. After testing the mice were perfused with 4% Paraformaldehyde. Afterwards the lumbar and thoracic spinal cord were dissected (slices of 16µm) and investigated by means of fluorescence microscopy.

All mice with CCI developed thermal hyperalgesia. In contrast mice which were sham operated did not develop thermal hyperalgesia.

In thoracic slices no difference in the number of glycinergic neurons between CCI group and control group was found (interestingly sham operated mice had more glycinergic neurons than both CCI and control group). In contrast lumbar slices of CCI mice had significantly less glycinergic neurons than mice of the control group (i.e. without intervention) and sham operated mice had more glycinergic neurons than both CCI mice and mice of the control group.

These results indicate a loss of glycinergic neurons in the lumbar section after induction of neuropathic pain (control versus CCI group). Surprisingly, sham operated mice had more glycinergic neurons in both sections, lumbar and thoracic, than mice of the control group. Possibly pain testing without induced neuropathy per se induces an upregulation of the number of glycinergic neurons or an isolated upregulation of GlyT2. Further investigations are needed.

7 LITERATURVERZEICHNIS

ADAM VIZI, V. (1992)

External Ca²⁺- independent release of neurotransmitters.
J Neurochem. 58(2):395-405

AHMADI, S., LIPPROSS, S., NEUHUBER, W.L. u. ZEILHOFER, H.U. (2002)

PGE₂ selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons.
Nat Neurosci. 5(1):34-40

AHMADI, S., MUTH-SELBACH, U., LAUTERBACH, A., LIPFERT, P., NEUHUBER, W.L. u. ZEILHOFER, H.U. (2003)

Fascilitation of spinal NMDA receptor currents by spillover of synaptically released glycine.
Science. 300(5628):2094-7

ANDREW, D. u. GREENSPAN, J.D. (1999)

Mechanical and heat sensitization of cutaneous nociceptors after peripheral inflammation in the rat.
J Neurophysiol. 82(5):2649-56

ARAGON, C, AGULLO, L. u. GIMENEZ, C. (1988)

Depolarization-induced release of glycine and beta- alanine from plasma membrane vesicles derived from rat brain synaptosomes.
Biochim Biophys Acta. 941(2): 209-16

ARAGON, C. u. LOPEZ-CORCUERA, B. (2003)

Structure, function and regulation of glycine neurotransporters.
Eur J Pharmacol. 479(1-3):249-62

ATKINSON, B.N., BELL, S.C., DE VIVO, M., KOWALSKI, L.R., LECHNER, S.M., OGNJANOV, V.I., THAM, C.S., TSAI, C., JIA, J., ASHTON, D. u. KLITENICK, M.A. (2001)

ALX 5407: a potent, selectiv inhibitor of the hGlyT1 glycine transporter.
Molec Pharmacol. 60(6):1414-20

ATTWELL, D., BARBOUR, B. u. SZATKOWSKI, M. (1993)

Nonvesicular release of neurotransmitter.
Neuron. 11(3):401-7

AUBREY, K.R. u. VANDENBERG, R.J. (2001)

N[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'-phenylphenoxy)propyl]sacrosine (NFPS) is a selective persistent inhibitor of glycine transport.
Br J Pharmacol. 134(7):1429-36

BASBAUM, A.I., GAUTRON, M., JAZAT, F., MAYES, M. u. GUILBAUD, G. (1991)

The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study.
Pain.47(3):359-67

BARON, R. (2000)

Peripheral neuropathic pain: from mechanisms to symptoms.
Clin J Pain. 16 (Suppl.):12-20

BENNETT, G.J. u. XIE, Y.K. (1988)

A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man.
Pain. 33(1): 87-107

BENNETT, G.J. (2000)

A neuroimmune interaction in painful peripheral neuropathy.
Clin J Pain. 16(3 Suppl):139-43

BERGERON, R., MEYER, T.M., COYLE, J.T. u. GREENE, R.W. (1998)

Modulation of N-methyl-D-aspartate receptor function by glycine transport.
Proc Natl Acad Sci USA 95(26):15730-4

BETZ, H., GOMEZA, J., ARMSEN, W., SCHOLZE, P. u. EULENBURG, V. (2006)

Glycine transporters: essential regulators of synaptic transmission.
Biochem Soc Trans. 34(Pt 1):55-8

BEYER, C., ROBERTS, L.A. u. KOMISARUK, B.R. (1985)

Hyperalgesia induced by altered glycinergic activity at the spinal cord.
Life Sci. 37(9):875-82

BIRKLEIN, F. (2002)

Neuropathische Schmerzen- Mechanismen und Therapie
Fortschr Neurol Psychiatr 70(2):88-94

BOROWSKY, B., MEZEY, E. u. HOFFMANN, B.J. (1993)

Two glycine transporter variants with distinct localization in the CNS and peripheral tissues are encoded by a common gene.
Neuron. 10(5):851-63

BRUNE, K. u. ZEILHOFER, H.U. (2004)

Neues zur Entstehung von Schmerzen
BIOspektrum 1/04: 36-38

CHAUDHRY, F.A., REIMER, R.J., BELLOCCHIO, E.E., DANBOLT, N.C., OSEN, K.K., EDWARDS, R.H. u. STORM MATHISEN, J. (1988)

The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons.
J Neurosci. 18(23): 9733-50

COLLINS, S.D. u. CHESSELL, I.P. (2005)

Emerging therapies for neuropathic pain.
Expert Opin Emerg Drugs. 10(1): 95-108

DAEMEN, M.A., KURVERS, H.A., KITSLAAR, P.J., SLAAF, D.W., BULLENS, P.H. u. VAN DEN WILDENBERG, F.A. (1998)

Neurogenic inflammation in an animal model of neuropathic pain.

Neurol Res. 20(1):41-5

DICKENSON, AH (1990)

A cure for wind up: NMDA receptor antagonists as potential analgesics.

Trends Pharmacol Sci. 11(8): 307-9

DICKENSON, AH (1997)

NMDA receptor antagonists: interactions with opioids.

Acta Anaesthesiol Scand. 41(1 Pt 2): 122-5

EATON, M.J., PLUNKETT, J.A., KARMALLY, S., MARTINEZ, M.A. u. MONTANEZ, K. (1998)

Changes in GAD- and GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplants of immortalized serotonergic precursors.

J Chem Neuroanat 16(1):57-72

EBIHARA, S., YAMAMOTO, T., OBATA, K. u. YANAGAWA, Y. (2004)

Gene structure and alternative splicing of the mouse glycine transporter type-2.

Biochem Biophys Res Commun. 317(3):857-864

EULENBURG, V., ARMSEN, W., BETZ, H. u. GOMEZA, J. (2005)

Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission.

Trends Biochem Sci. 30(6):325-333

FURUE, H., KATAFUCHI, T. u. YOSHIMURA, M. (2004)

Sensory processing and functional reorganization of sensory transmission under pathological conditions in the spinal dorsal horn.

Neurosci Res. 48(4):361-368

GABAY, E. u. TAL, M. (2004)

Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain.

Pain. 110(1-2):354-60

GOMEZA, J., HÜLSMANN, S., OHNO, K., EULENBURG, V., SZÖKE, K., RICHTER, D. u. BETZ, H. (2003a)

Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition.

Neuron. 40(4): 785-796

GOMEZA, J., OHNO, K., HÜLSMANN, S., ARMSEN, W., EULENBURG, V., RICHTER, D., LAUBE, B. u. BETZ, B. (2003b)

Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality.

Neuron. 40(4): 797-806

GOMEZA, J., ARMSEN, W., BETZ, H. u. EULENBURG, V. (2006)
Lessons from the knocked –out glycine transporters.
Handb Exp Pharmacol. (175):457-83

GUASTELLA, J., NELSON, N., CZYZYK, L., KEYNAN, S., MIEDEL, M.C., DAVIDSON, N., LESTER, H.A. u. KANNER, B.I. (1990)
Cloning and expression of a rat brain GABA transporter.
Science. 249(4974):1303-6

HAMA, AT., SAGEN, J. u. PAPPAS, GD. (1994)
Morphological characterization of dorsal horn spinal neurons in rats with unilateral constriction nerve injury: a preliminary study.
Neurol Res. 16(4): 297-304

HANDWERKER, H.O. (2005)
Allgemeine Sinnesphysiologie.
In: R.F. SCHMIDT, F. LANG, G. THEWS (Hrsg.): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie
29. Aufl.
Verlag Springer, New York, Stuttgart, S:27

HARGREAVES, K., DUBNER, R., BROWN, F., FLORES, C. u. JORIS, J. (1988)
A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia.
Pain. 32(1):77-88

HARSING, L.G., JURANYI, Z., GACSALYI, I., TAPOLCSANYI, P., CZOMPA, A. u. MATYUS, P. (2006)
Glycine transporter type-1 and its inhibitors.
Curr Med Chem. 13(9):1017-44

HARVEY, R.J., DEPNER, U.B., WÄSSLE, H., AHMADI, S., HEINDL, C., REINOLD, H., SMART, T.G., HARVEY, K., SCHÜTZ, B., ABO-SALEM, O.M., ZIMMER, A., POISBEAU, P., WELZL, H., WOLFER, D.P., BETZ, H., ZEILHOFER, H.U. u. MÜLLER, U. (2004)
GlyR $\alpha 3$: an essential target for spinal PGE₂-mediated inflammatory pain sensitization.
Science. 304(5672):884-7

HENKE, J. u. ERHARDT, W. (2001)
Wie entsteht Schmerz?
In: Schmerzmanagement bei Klein- u. Heimtieren.
Verlag Enke, Stuttgart, S:11-21

HOGAN, Q. (2002)
Animal pain models.
Reg Anesth Pain Med. 27(4):385-401

HOGAN, Q.H., McCALLUM, J.B., SARANTOPOULOS, C., AASON, M., MYNLIEFF, M., KWOK, W.M. u. BOSNJAK, Z.J. (2000)
Painful neuropathy decreases membrane calcium current in mammalian primary afferent neurons.
Pain. 86(1-2):43-53

IBUKI, T., HAMA, A.T., WANG, X.T., PAPPAS, G.D. u. SAGEN, J. (1997)
Loss of GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal of rats with peripheral nerve injury and promotion of recovery by adrenal medullary grafts.
Neuroscience. 76(3):845-58

JOU, I.M., CHANG, P.J., WU, H.H., WANG, P.J., CHU, K.S., LIN, R.M. u. TSAI, Y.C. (2004)
A long- term analysis of the spinal somatosensory evoked potential of rats with sciatic constriction injury.
Acta Anaesth Taiwan. 42(2):69-76

JURSKY, F. u. NELSON, N. (1995)
Localization of glycine neurotransmitter transporter (GLYT2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor.
J Neurochem. 64(3):1026-33

KAESER, H.E. (1972)
Schmerz, Allgemeine Pathophysiologie
In: SIEGENTHALER (Hrsg.):Klinische Pathophysiologie.
2.Aufl.
Verlag Georg Thieme, Stuttgart, S:960-61

KAJANDER, K.C. u. BENNETT, G.J. (1992)
Onset of a painful peripheral neuropathy in rat: a partial and differential deafferentation and spontaneous discharge in A beta and A delta primary afferent neurons.
J Neurophysiol. 68(3):734-44

KARSAK, M., HRABÉ DE ANGELIS, M. u. ZIMMER, A. (2002)
Mausmutanten in der Schmerzforschung: Neue Erkenntnisse durch Genmutation
BIOspektrum 1/02 (abstarct):17-21

KAWAMURA, T., AKIRA, T., WATANABE, M. u. KAGITANI, Y. (1997)
Prostaglandin E1 prevents apoptotic cell death in superficial dorsal horn of rat spinal cord.
Neuropharmacology. 36(8): 1023-30

KIM, K.M., KINGSMORE, S.F., HAN, H., YANG FENG, T.L., GODINOT, N., SELDIN, M.F., CARON, M.G. u. GIROS, B. (1994)
Cloning of the human glycine transporter type 1: molecular and pharmacological characterization of novel isoform variants and chromosomal localization of the gene in the human and mouse genomes.
Mol Pharmacol. 45(4):608-17

KIM, K.J., YOON, Y.W. u. CHUNG, J.M. (1997)
Comparison of three rodent neuropathic pain models.
Exp Brain Res. 113(2):200-6

KUHAR, M.J. u. ZARBIN, M.A. (1978)
Synaptosomal transport: a chloride dependence for choline, GABA, glycine and several other compounds.
J Neurochem. 31(1): 251-6

- LECHNER, S.M., NOMURA, N., TURCHIN, P., THAM, C.S., WANG, Z.Q., BELL, S.C., ATKINSON, B.N. u. KLITENICK, M.A. (2000)
Novel glycine transporter 2 inhibitors are analgesic in a rat model of inflammatory pain.
Soc Neurosci Abs. 26(1-2): (abstract)150.18
- LEGENDRE, P. (2001)
The glycinergic inhibitory synapse.
Cell Mol Life Sci. 58(5-6):760-93
- LIU, Q.R., LOPEZ-CORCUERA, B., MANDIYAN, S., NELSON, H. u. NELSON, N. (1993)
Cloning and expression of a spinal cord- and brain- specific glycine transporter with novel structural features.
J Biol Chem. 268(30):22802-8
- LODGE, D. u. JOHNSON, K.M. (1990)
Noncompetitive excitatory amino acid receptor antagonists.
Trends Pharmacol Sci. 11(2): 81-6
- LUQUE, J.M., NELSON, N. u. RICHARDS, J.G. (1995)
Cellular expression of glycine transporter 2 messenger RNA exclusively in rat hindbrain and spinal cord.
Neuroscience. 64(2):525-35
- MALLORGA, P.J., WILLIAMS, J.B., JACOBSON, M., MARQUES, R., CHAUDHARY, A., CONN, P.J., PETTIBONE, D.J. u. SUR, C. (2003)
Pharmacology and expression analysis of glycine transporter GlyT1 with [3H]-(N-[3-(4'-fluorophenyl)-3-(4'phenylphenoxy)propyl]sarcosine.
Neuropharmacology. 45(5):585-93
- MALMBERG, A.B. u. BASBAUM, A.I. (1998)
Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates.
Pain. 76(1-2):215-22
- MENENDEZ, L., LASTRA, A., HILDAGO, A. u. BAAMONDE, A. (2002)
Unilateral hot plate test: a simple and sensitive method for detecting central and peripheral hyperalgesia in mice.
J Neurosci Methods. 113(1):91-7
- MOTHET, J.P., PARENT, A.T., WOLOSKER, H., BRADY, R.O., LINDEN, D.J., FERRIS, C.D., ROGAWSKI, M.A. u. SNYDER, S.H. (2000)
D- serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor.
Proc Natl Acad of Sci U S A. 97(9): 4926-31
- MOORE, K.A., KOHNO, T., KARCHEWSKI, L.A., SCHOLZ, J., BABA, H. u. WOOLF, C.J. (2002)
Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord.
Journal Neurosci. 22(15):6724-6731

- MUNGER, B.L., BENNETT, G.J. u. KAJANDER, K.C. (1992)
An experimental painful peripheral neuropathy due to nerve constriction. I. Axonal pathology in the sciatic nerve.
Exp Neurol. 118(2): 204-14
- NAKAMURA, S. u. MYERS, R.R. (1999)
Myelinated afferents sprout into lamina II of L3-5 dorsal horn following chronic constriction injury in rats.
Brain Res. 818(2):285-90
- NEAL, M.J. u. PICKLES, H.G. (1969)
Uptake of ¹⁴C glycine by spinal cord.
Nature. 222(5194): 679-80
- PASERO, C. (2004)
Pathophysiology of neuropathic pain
Pain Manag Nurs. 5(4 Suppl 1): 3-8
- PITCHER, G.M. u. HENRY, J.L. (2000)
Cellular mechanisms of hyperalgesia and spontaneous pain in a spinalized rat model of peripheral neuropathy: changes in myelinated afferent inputs implicated.
Eur J Neurosci. 12(6):2006-20
- POLGÁR, E., HUGHES, D.I., RIDDELL, J.S., MAXWELL, D.J., PUSKAR, Z. u. TODD, A.J. (2003)
Selective loss of spinal GABAergic or glycinergic neurons is not necessary for development of thermal hyperalgesia in the chronic constriction injury model of neuropathic pain
Pain. 104(1-2): 229-239
- POLGÁR, E., GRAY, S., RIDDELL, J.S. u. TODD, A.J. (2004)
Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I- III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model
Pain. 111(1-2): 144-150
- POLGÁR, E., HUGHES, D.I., ARHAM, A.Z. u. TODD, A.J. (2005)
Loss of neurons from laminae I-III of the spinal dorsal horn is not required for development of tactile allodynia in the spared nerve injury model of neuropathic pain.
J Neurosci. 25(28):6658-66
- POYATOS, I., PONCE, J., ARAGÓN, C., GIMENEZ, C. u. ZAFRA, F. (1997)
The glycine transporter GLYT2 is a reliable marker for glycine-immunoreactive neurons.
Brain Res Mol Brain Res. 49(1-2):63-70
- RO, L.S. u. CHANG, K.H. (2005)
Neuropathic pain: mechanisms and treatments.
Chang Gung Med J. 28(9): 597-605
- SANDKÜHLER, J. u. LIU, X. (1998)
Induction of long- term potentiation at spinal synapses by noxious stimulation or nerve injury.
Eur J Neurosci. 10(7): 2476-80

SANDKÜHLER, J. (2000)

Spinale Pathomechanismen von neuropathischen Schmerzen
Dtsch. Schmerzkongress (Abstr.):

SANDKÜHLER, J. (2001)

Schmerzgedächtnis: Entstehung, Vermeidung und Löschung
Dtsch Ärztebl. 98(42): A-2725/ B-2340/ C-2172

SHIMOYAMA, M., TANAKA, K., HASUE, F. u. SHIMOYAMA, N. (2002)

A mouse model of neuropathic cancer pain.
Pain. 99(1-2):167-74

SHIR, Y. und SELTZER, Z. (1990)

A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C- fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats.
Neurosci Lett. 115(1):62-7

SIVILOTTI, L. u. WOOLF, C.J. (1994)

The contribution of GABA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord.
J Neurophysiol. 72(1):169-79

SIMPSON, R.K. Jr. u. HUANG, W. (1998)

Glycine receptor reduction within segmental gray matter in a rat model in neuropathic pain.
Neurol Res. 20(2):161-8

SOMMER, C. (2004)

Animal studies on neuropathic pain: the role of cytokines and cytokine receptors in pathogenesis and therapy.
Schmerz. 13(5):315-23

SOMMER, C. u. SCHAFERS, M. (1998)

Painful mononeuropathy in C57/BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity.
Brain Res. 784(1-2):154-62

SPIKE, R.C., WATT, C., ZAFRA, F. u. TODD, A.J. (1997)

An ultrastructural study of the glycine transporter GLYT2 and its association with glycine in the superficial laminae of the rat spinal dorsal horn.
Neuroscience. 77(2):543-51

STRIAN, F. (1990)

Diagnostic and clinical aspects of neuropathy of small nerve fibers
Fortschr Neurol Psychiatr. 58(2):51-65

SUGIMOTO, T., BENNETT, GJ. u. KAJANDER, KC. (1990)

Transsynaptic degeneration in the superficial dorsal horn after sciatic nerve injury: effects of a chronic constriction injury, transection, and strychnine.
Pain.42(2): 205-13

- SUNG, B., LIM, G. u. MAO, J. (2003)
Altered expression and uptake activity of spinal glutamate transporters after nerve injury contribute to the pathogenesis of neuropathic pain in rats.
Neuroscience. 23(7):2899-910
- SUNG, Y.J. u. AMBRON, R.T. (2004)
Pathways that elicit long-term changes in gene expression in nociceptive neurons following nerve injury: contributions to neuropathic pain.
Neurol Res. 26(2):195-203
- TAL, M. u. ELIAV, E. (1996)
Abnormal discharge originates at the site of nerve injury in experimental constriction neuropathy (CCI) in the rat.
Pain 64(3):511-518
- TÖLLE, T.R. u. BARON, R. (2002)
Neuropathic pain. Basic principles for successful therapy.
Fortschr Med. 144(21):41-4
- UEDA, H. u. RASHID, M.H. (2003)
Molecular mechanism of neuropathic pain.
Drug News Perspect. 16(9): 605-13
- WALLACE, M. u. YAKSH, T.L. (2000)
Long-term spinal analgesic delivery: a review of the preclinical and clinical literature.
Reg Anesth Pain Med. 25(2):117-57
- WHITESIDE, G.T. u. MUNGLANI, R. (1998)
TUNEL, Hoechst and immunohistochemistry triple- labelling: an improved method for detection of apoptosis in tissue sections – an update.
Brain Res Brain Res Protoc. 3(1): 52-3
- WHITESIDE, G.T. u. MUNGLANI, R. (2001)
Cell death in the superficial dorsal horn in a model of neuropathic pain.
J Neurosci Res. 64(2): 168-173
- XIE, Y.K. u. XIAO, W.H. (1990)
Electrophysiological evidence for hyperalgesia in the peripheral neuropathy.
Sci China B. 33(6):663-72
- XIE, W., STRONG, J.A., MEIJ, J.T., ZHANG, J.M. u. YU, L. (2005)
Neuropathic pain: early spontaneous afferent activity is the trigger.
Pain. 116(3): 243-56
- XU, X.J., PLESAN, A., YU, W., HAO, J.X. u. WIESENFELD-HALLIN, Z. (2001)
Possible impact of genetic differences on the development of neuropathic pain-like behaviors after unilateral sciatic nerve ischemic injury in rats.
Pain. 89(2-3):135-45
- XU, T.X., GONG, N. u. XU, T.L. (2005)
Inhibitors of GlyT1 and Glyt2 differentially modulate inhibitory transmission.

Neuroreport. 16(11): 1227-31

YAMAKURA, T. u. SHIMOJI, K. (1999)
Subunit- and site- specific pharmacology of the NMDA receptor channel.
Prog Neurobiol. 59(3):279-98

ZAFRA, F., ARAGON, C. u. GIMENEZ, C. (1997)
Molecular biology of glycinergic neurotransmission.
Mol Neurobiol. 14(3):117-42

ZAFRA, F., GOMEZA, J., OLIVARES, L., ARAGON, C. u. GIMENEZ, C. (1995)
Regional distribution and developmental variation of the glycine transporters GLYT1 and GLYT2 in the rat CNS.
Eur J Neurosci. 7(6):1342-52

ZEILHOFER, H.U. (2005a)
Synaptic modulation in pain pathways.
Rev Physiol Biochem Pharmacol. 154:73-100

ZEILHOFER, H.U. (2005b)
The glycinergic control of spinal pain processing.
Cell Mol Life Sci. 62(18):2027-35

ZEILHOFER, H.U., STUDLER, B., ARABADZISZ, D., SCHWEIZER, C., AHMADI, S., LAYH, B., BOSL, M.R. u. FRITSCHY, J.M. (2005)
Glycinergic neurons expressing enhanced green fluorescent protein in bacterial artificial chromosome transgenic mice.
J Comp Neurol. 482(2):123-41

ZIMMERMANN, M. (2001)
Pathobiology of neuropathic pain
Eur J Pharmacol. 429(1-3):23-37

8 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 3-1: Übersicht über die Versuche	29
Tab. 3-2: Ergebnisse der thermischen Testung beim Vorversuch	36
Tab. 3-3: mechanische Allodynie nach CCI (Von-Frey-Haar) an verschiedenen Tagen rechts	37
Tab. 3-4: mechanische Allodynie (Von-Frey-Haar) nach CCI an verschiedenen Tagen links	38
Tab. 3-5: Vergleich der Schmerzschwellen in sek. der CCI- und Sham-Gruppe	41
Tab. 3-6: mechanische Allodynie (Von-Frey-Haar-Test) nach CCI, gemessene Sensibilität	43
Tab. 3-7: mechanische Allodynie nach Sham-Operation (Von-Frey-Haar-Test)	44
Tab. 3-8: Ausgezählte markierte Neuronen im lumbalen Rückenmark bei den Versuchs- gruppen	48
Tab. 3-9: Ausgezählte markierte Neuronen im thorakalen Rückenmark bei den Versuchs- gruppen	48

9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 2-1: Klassifizierung der Nervenfasern	2
Abb. 3-1: Einteilung der Quadranten im Rückenmarksquerschnitt	31
Abb. 3-2: Versuchsaufbau Plantartest	32
Abb. 3-3: Schmerzschwellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der CCI-Operation	36
Abb. 3-4: gemessene Sensibilität rechts nach Score	38
Abb. 3-5: gemessene Sensibilität links nach Score	39
Abb. 3-6: Mittelwerte der Schmerzschwellen der linken und rechten Hinterpfote nach CCI	40
Abb. 3-7: Mittelwerte der Schmerzschwellen der linken und rechten Pfote nach Sham-OP	41
Abb. 3-8: Vergleich der Schmerzschwellen von CCI- und Sham-Tieren	42
Abb. 3-9: mechanische Allodynie links nach CCI	43
Abb. 3-10: mechanische Allodynie rechts nach CCI	44
Abb. 3-11: mechanische Allodynie links nach Sham	45
Abb. 3-12: mechanische Allodynie rechts nach Sham	45
Abb. 3-13: Mittelwerte der ausgezählten markierten Neuronen im lumbalen Rückenmark	46
Abb. 3-14: Mittelwerte der ausgezählten markierten Neuronen im thorakalen Rückenmark	47
Abb. 3-15: thorakaler Schnitt Kontrollgruppe	49
Abb. 3-16: thorakaler Schnitt Kontrollgruppe	49
Abb. 3-17: lumbaler Schnitt Kontrollgruppe	49
Abb. 3-18: lumbaler Schnitt Kontrollgruppe	49
Abb. 3-19: thorakaler Schnitt CCI-Gruppe	50
Abb. 3-20: thorakaler Schnitt CCI-Gruppe	50
Abb. 3-21: lumbaler Schnitt CCI-Gruppe	50
Abb. 3-22: lumbaler Schnitt CCI-Gruppe	50
Abb. 3-23: thorakaler Schnitt Sham-Gruppe	51
Abb. 3-24: thorakaler Schnitt Sham-Gruppe	51
Abb. 3-25: lumbaler Schnitt Sham-Gruppe	51
Abb. 3-26: lumbaler Schnitt Sham-Gruppe	51

10 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCI	Chronic Constriction Injury
cm	Zentimeter
dest.	destiliert
EGFP	enhanced green fluorescent protein
et al.	et alii
Fa.	Firma
g	Gramm
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GlyT	Glycintransporter
i.p.	intra peritoneal
lat.	lateinisch
log	Logarithmus
M.	Musculus
m	Meter
mg/kg	Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht
ml	Milliliter
mm	Millimeter
µm	Mikrometer
N.	Nervus
n	Anzahl der Tiere in der Versuchsgruppe
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
p	Signifikanz
sek.	Sekunde
Tab.	Tabelle
u.	und
u.a.	und andere
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

11 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Herrn Dr. Lipfert bedanke ich mich für die Möglichkeit, die vorliegende Arbeit am Institut für Experimentelle Anästhesie der Uni Düsseldorf anfertigen zu können und den Mitarbeitern des Instituts für ihre Hilfsbereitschaft.

Besonders danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die freundliche Unterstützung des Projektes, die sorgfältige Durchsicht des Manuskripts und wertvolle Verbesserungsvorschläge.

Frau Dr. med. U. Muth-Selbach danke ich herzlich für die Überlassung und Wegbereitung des Themas und ihre engagierte Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. H.U. Zeilhofer danke ich sehr herzlich für die Bereitstellung der hier untersuchten GlyT2-EGFP-Mäuse.

Ich möchte allen Mitarbeitern der Tierversuchsanlage der Heinerich-Heine-Universität Düsseldorf, vor allem Frau Dr. A. Treiber und Herrn Dr. M. Sager, sowie Frau Schrey, für Ihre freundliche Unterstützung danken. Besonders danke ich den Mitarbeitern des Tierpflegebereichs, die immer sehr hilfsbereit waren.

Allen Mitarbeitern der Neuraxo danke ich für die freundliche Aufnahme und Ihre nette Unterstützung. Frau S. Duis erklärte und zeigte mir ausführlich die Fixation mittels Perfusion und das Schneiden der Präparate und hatte jederzeit ein offenes Ohr für meine Fragen.

Ein großes Dankeschön geht an meine Mutter, die die zeitaufwendige und anstrengende Durchsicht des Manuskriptes in Angriff genommen hat und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

12 Lebenslauf

Li-Hsia Stella Bettina Go

geboren am 21.04.1976

in Lich (Hessen)

Schullaufbahn

1982-1986 Katholische Grundschule Aachen

1986-1995 Einhard-Gymnasium

Juni 1995 Abitur

Studium

1995-2001 Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Nov. 2001 Abschluss 3.Staatsexamen

Dez. 2001 Tierärztliche Approbation

Jan. 2004 Beginn der experimentellen Studien der Dissertation
in der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums
Düsseldorf

2004- 2007 Doktorandin in der Anästhesiologie der Heinrich-Heine-
Universität Düsseldorf und am Institut für experimentelle Onkologie
und Therapieforschung, Klinikum rechts der Isar der Technischen
Universität München