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

Über die Wirkung von Serotonin in einem chronisch entzündlichen Schmerzmodell mit komplettem Freund´schen Adjuvans an Mäusen mit einer genetischen Defizienz für den Serotonintransporter.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Florian Palm
aus Fulda

Würzburg, Februar 2008

Referentin: Professor Dr. med. Claudia Sommer

Koreferent: Professor Dr. med. Klaus-Peter Lesch

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung**:** 04.12.2008

Der Promovend ist Arzt.

In Dankbarkeit gewidmet meinen Eltern.

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG

1.1 Physiologie und Pathophysiologie des Schmerzes 1

1.2 Schmerzursachen und Schmerztypen 1

1.3 Chronische Schmerzen 3

1.3.1 Chronifizierter Entzündungsschmerz 3

1.3.2 Neuropathische Schmerzen 4

1.4 Serotonin und seine Bedeutung bei der Schmerzentstehung 5

1.5 Trizyklische Antidepressiva in der Therapie neuropathischer und anderer chronischer Schmerzen 9

1.6 Versuchsmodelle zur Untersuchung chronischer Schmerzen 11

1.7 Fragestellung der Arbeit 12

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere 13

2.2 OP-Techniken 13

2.2.1 Narkose 13

2.2.2 Injektion von CFA und Natrium-Chlorid (NaCl 0,9 %) 14

2.3 Verhaltenstestungen 14

2.3.1 Testung der Hitzehyperalgesie 14

2.3.2 Testung der mechanischen Allodynie 15

2.3.3 Messung der Pfotendicke und Wiegen des Körpergewichtes 17

2.4 Gewebeentnahme 17

2.5 Immunhistochemische Färbungen 18

2.6 High Performance Liquid Chromatography 23

2.7 Mikroskopie 23

2.8 Reagenzien 25

2.9 Auswertung und Statistik 27

3 VERSUCHSAUFBAU 27

4 ERGEBNISSE
4.1 Pfotenschwellung 28
4.2 Hitzehyperalgesie 29
4.3 Mechanische Allodynie 31
4.4 Histologie 31
4.4.1 Immunhistochemische Färbungen von Footpads 31
4.4.1.1 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5) 31
4.4.1.2 Calcitonin gene related peptide (CGRP) 32
4.4.2 Immunhistochemische Färbungen von Spinalganglien 33
4.4.2.1 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) 33
4.4.2.2 Activating transcription factor 3 (ATF-3) 34
4.4.2.3 Spannungsabhängige Natriumkanäle: PAN und Na_v 1.3 35
4.5 High Performance Liquid Chromatography 36
4.5.1 5-HT Gehalt 36
4.5.2 5-HIAA Gehalt 38

5 DISKUSSION
5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse 38
5.2 Unterschiede zwischen dem Genotyp 5-HTT -/- und einer tatsächlichen Behandlung mit SSRI 39
5.3 Genotyp 5-HTT -/- hat keine Auswirkungen auf eine mechanische Allodynie 40
5.4 CFA reduziert die Anzahl epidermaler Nervenfasern und aktiviert ATF-3 in Spinalganglienneuronen 40
5.5 Gegenseitige Regulation von 5-HT und BDNF 42
5.6 BDNF reguliert spannungsabhängige Natriumkanäle 43
5.7 5-HIAA als möglicher eigener intrinsischer Faktor 44

6 ZUSAMMENFASSUNG 45

7 LITERATURVERZEICHNIS 47

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 58

9 ANHANG 60

1 Einleitung

1.1 Physiologie und Pathophysiologie des Schmerzes

Der Schmerz gehört sicherlich zu den häufigsten Symptomen einer Krankheit und führt den Patienten aufgrund des hohen Leidensdrucks am ehesten zum Arzt. Der akute Schmerz kann dabei eine sinnvolle und teils sogar lebenserhaltende Funktion haben, indem er den Patienten zur Schonung anhält bzw. Schutzreflexe auslöst, die somit eine weitere Schädigung des Gewebes verhindern oder sogar zur schnelleren Heilung führen können.
Findet jedoch die Chronifizierung eines Schmerzes statt, ist eine physiologische Schutz- und Heilfunktion nicht mehr nachvollziehbar. Der Schmerz ist nicht mehr nur Symptom, sondern tritt als eigenes quälendes Krankheitsbild in den Vordergrund.

1.2 Schmerzursachen und Schmerztypen

Akute Schmerzen sind meist von begrenzter Dauer und klingen nach Beseitigung der auslösenden Reize in der Regel rasch wieder ab. Bei Ihnen kommt es über eine entsprechende Erregung von intakten Nozizeptoren zur Generierung von Aktionspotentialen im sensiblen Nervensystem und zur Weiterleitung an schmerzverarbeitende Zentren im zentralen Nervensystem (ZNS). Diese Schmerzen stellen in der Behandlung meist keine größeren Probleme dar.
Chronische Schmerzen jedoch, die entweder dauerhaft vorhanden oder ständig wiederkehrend sind, lassen sich oft nicht zufriedenstellend therapieren.

Chronische Schmerzen können in zwei große Gruppen unterteilt werden: Auf der einen Seite steht der pathophysiologische Nozizeptorschmerz. Er entsteht im Rahmen von Gewebeschädigungen. Hierzu gehören insbesondere chronische Entzündungsschmerzen. Es werden dabei intakte Nozizeptoren erregt. Die Schmerzen äußern sich in Ruheschmerz, Hyperalgesie und/oder Allodynie.

Akuter Schmerz Abb. 1

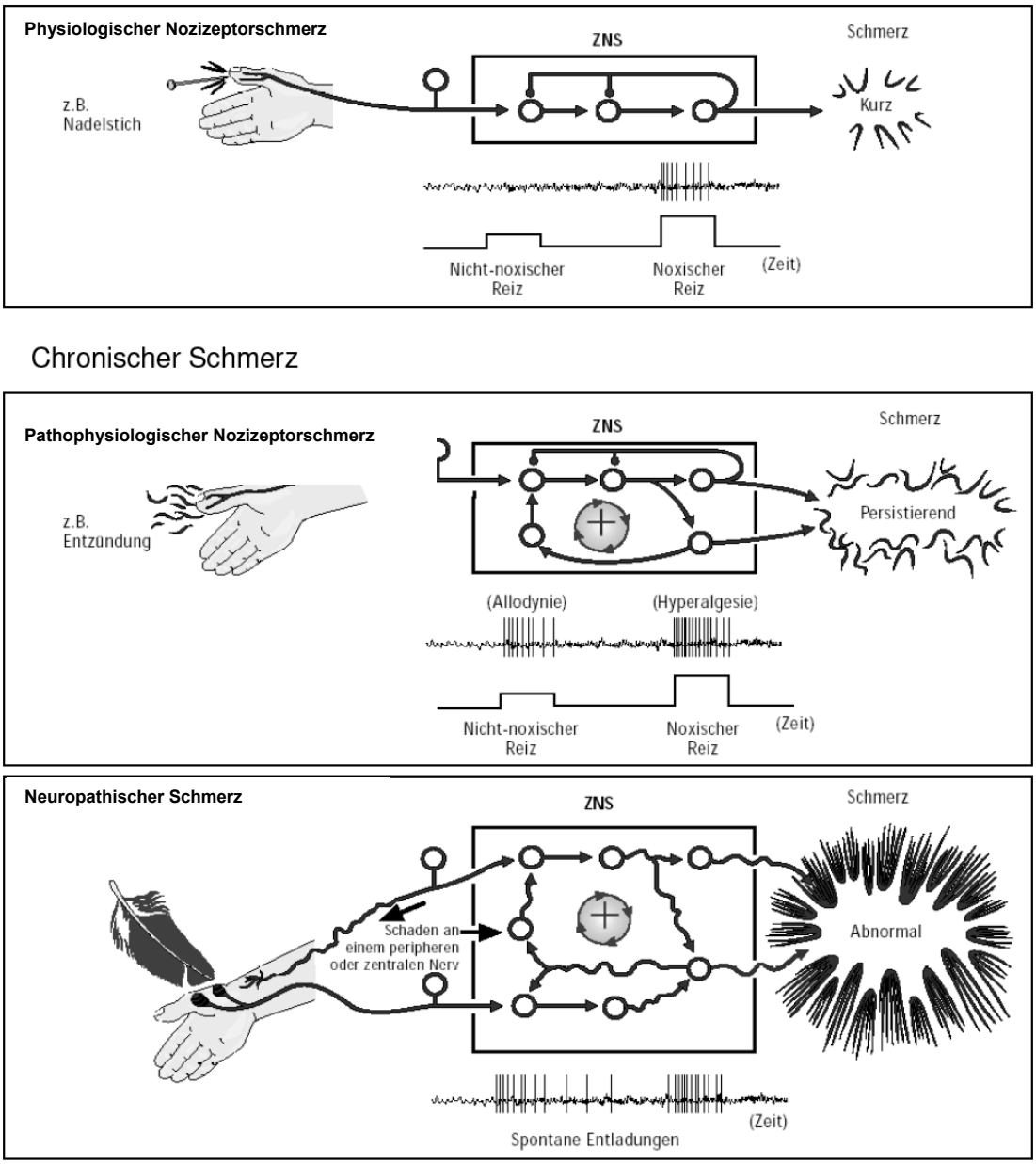


Abbildung 1: *Schmerztypen nach ihrer Ätiologie und Pathogenese. Physiologischer Nozizeptorschmerz: Aktionspotentiale treten erst nach einem noxischen Reiz auf. Pathophysiologischer Nozizeptorschmerz: Bereits nicht-noxische Reize lösen Aktionspotentiale aus (Allodynie), noxische Reize führen zu mehr Aktionspotentialen (Hyperalgesie) und/oder Ruheschmerz. Neuropathischer Schmerz: spontane Entladungen nach Nervenläsion, sowie Allodynie und Hyperalgesie (nach Mutschler et al. 2001).*

Ist jedoch der sensible nozizeptive Nerv selbst geschädigt, kann es unabhängig von der Erregung eines Rezeptors am Endorgan zur Generierung von Aktionspotentialen kommen, was als neuropathischer Schmerz bezeichnet wird (siehe Abbildung 1).

1.3 Chronische Schmerzen

1.3.1 Chronifizierter Entzündungsschmerz

Der Schmerz (= dolor) im Rahmen von Entzündungsreaktionen gehört zu den fünf Kardinalsymptomen einer Entzündung: Rötung (= rubor), Schwellung (= tumor), Überwärmung (= calor) und gestörte Funktion (= functio laesa). Im Rahmen von Entzündungsreaktionen werden unter anderem aus Mastzellen, Leukozyten, Thrombozyten, Gefäßendothelzellen sowie Zellen des peripheren Nervensystems Entzündungsmediatoren freigesetzt. Zu diesen gehören Bradykinin, Histamin, Prostaglandine und auch Serotonin. Es wird dadurch sowohl eine Ansäuerung des Gewebes erreicht, als auch ein entzündliches Exsudat induziert.

Über die Aktivierung von Nozizeptoren kommt es zur Generierung von Aktionspotentialen. Unter den Bedingungen einer Entzündung sind die Reizschwellen jedoch erniedrigt, so dass es dann leichter zu einer Depolarisation kommen kann. Zusätzlich können vorangegangene Schmerzimpulse die Verarbeitung nachfolgender Reize im Sinne einer Sensibilisierung oder Bahnung verstärken (Schmidt et al. 2000). Diese Sensibilisierungsphänomene können sich durch die Zunahme von neuronaler Spontanaktivität in Ruheschmerzen oder durch stärkere bzw. inadäquate Reizantworten im Sinne einer Hyperalgesie bzw. Allodynie äußern.

Zur Behandlung von Entzündungsschmerzen haben sich nicht-steroidale Antiphlogistika (NSARs) bewährt. Als Cyclooxygenase-Inhibitoren führen sie zu

einer geringeren Prostaglandinproduktion und verringern somit die Menge an schmerzunterhaltenden Mediatoren.
Kommt es jedoch zur Chronifizierung von entzündlichen Schmerzen ist die analgetische Wirkung von NSARs oft nicht mehr ausreichend, sodass man zusätzliche Pathomechanismen vermuten muss. Es scheint dann ein fließender Übergang zwischen einem chronifizierten Entzündungsschmerz und einem durch Entzündung induzierten neuropathischen Schmerz vorhanden zu sein.

1.3.2 Neuropathische Schmerzen

Der neuropathische Schmerz lässt sich durch verschiedene Eigenschaften vom nozizeptiven Schmerz abgrenzen. Im Gegensatz zum rezeptorvermittelten Mechanismus beim nozizeptiven Schmerz ist beim neuropathischen Schmerz der sensible nozizeptive Nerv selbst geschädigt, so dass es unabhängig von der Erregung eines Rezeptors zur Schmerzwahrnehmung kommt.

Die Schädigung des Nerven kann unter anderem mechanische, entzündliche, metabolische, immunologische oder toxische Ursachen haben. Es kommt in Folge dessen zu biochemischen, morphologischen und physiologischen Veränderungen am Nerven (Merskey und Bogduk 1994, Wessely 2001).
Betroffen von solch einer Schädigung können sowohl das periphere als auch das zentrale Nervensystem sein. Dementsprechend spricht man auch vom peripheren oder zentralen neuropathischen Schmerz. Beispiele für Erkrankungen mit peripheren neuropathischen Schmerzen sind Polyneuropathien, Engpasssyndrome, Wurzel- und Nervenverletzungen. Zentrale Schmerzen kommen unter anderem bei Multipler Sklerose, Hirninfarkten oder Querschnittsläsionen vor.

Die Patienten berichten über sehr unterschiedliche Schmerzphänomene, die man in spontane und evozierte Schmerzen einteilen kann. Zu den spontanen Schmerzen gehören z.B. neuralgiform einschießende Schmerzen brennenden

oder stechenden Charakters, zu den evozierten Schmerzen die mechanische und thermische Hyperalgesie bzw. Allodynie (Freynhagen und Baron 2003).

Aufgrund der unterschiedlichen Ursachen, dem schwierig zu bestimmenden Entstehungsort und der komplexen Pathophysiologie des neuropathischen sowie des chronifizierten Schmerzes fällt die effektive Behandlung solcher Schmerzen schwer. Denn allein die Blockade von peripheren Nozizeptoren oder die Unterbrechung von weitergeleiteten zentralen Impulsen, welches beim nozizeptiven Schmerz hilfreich ist, zeigt hier nur begrenzte Wirksamkeit.
Meistens muss auf sogenannte Koanalgetika zurückgegriffen werden, und selbst dann bleibt dem Therapeuten oft nichts anderes übrig, als nach dem Prinzip „Trial and Error“ zu verfahren. Selbst bei gleicher zugrunde liegender Erkrankung kann bei einem Patienten ein Medikament wirksam sein und bei einem anderen ohne Erfolg bleiben.
Im Prinzip stehen drei große Wirkstoffgruppen zur Therapie zur Verfügung: Antidepressiva, insbesondere Trizyklika wie Amitriptylin und kombinierte Serotonin- und Noradrenalin- Wiederaufnahmehemmer wie Duloxetin, Antiepileptika wie Carbamazepin, Gabapentin und Lamotrigin und als dritte Gruppe die Opioide (Weesely 2001).

Aufgrund dessen, dass schätzungsweise bis zu 40% aller Patienten in Schmerzambulanzen und –kliniken chronische Schmerzen haben, aber nur wenige von Ihnen bisher ausreichend behandelt werden können, soll diese Arbeit einen kleinen Beitrag zum besseren Verständnis des Pathomechanismus von chronischen Schmerzen leisten und helfen, effektivere Therapien zu finden.

1.4 Serotonin und seine Bedeutung bei der Schmerzentstehung

Serotonin (5-HT) ist ein Monoamin, das sowohl als Gewebshormon als auch als Neurotransmitter fungiert. Es wird aus der Aminosäure L-Tryptophan hauptsächlich in den enterochromaffinen Zellen des Dünndarms, aber auch in

der Lunge, der Milz und im Zentralnervensystem, dort vorrangig in den Raphe Kernen, synthetisiert (siehe Abbildung 2).

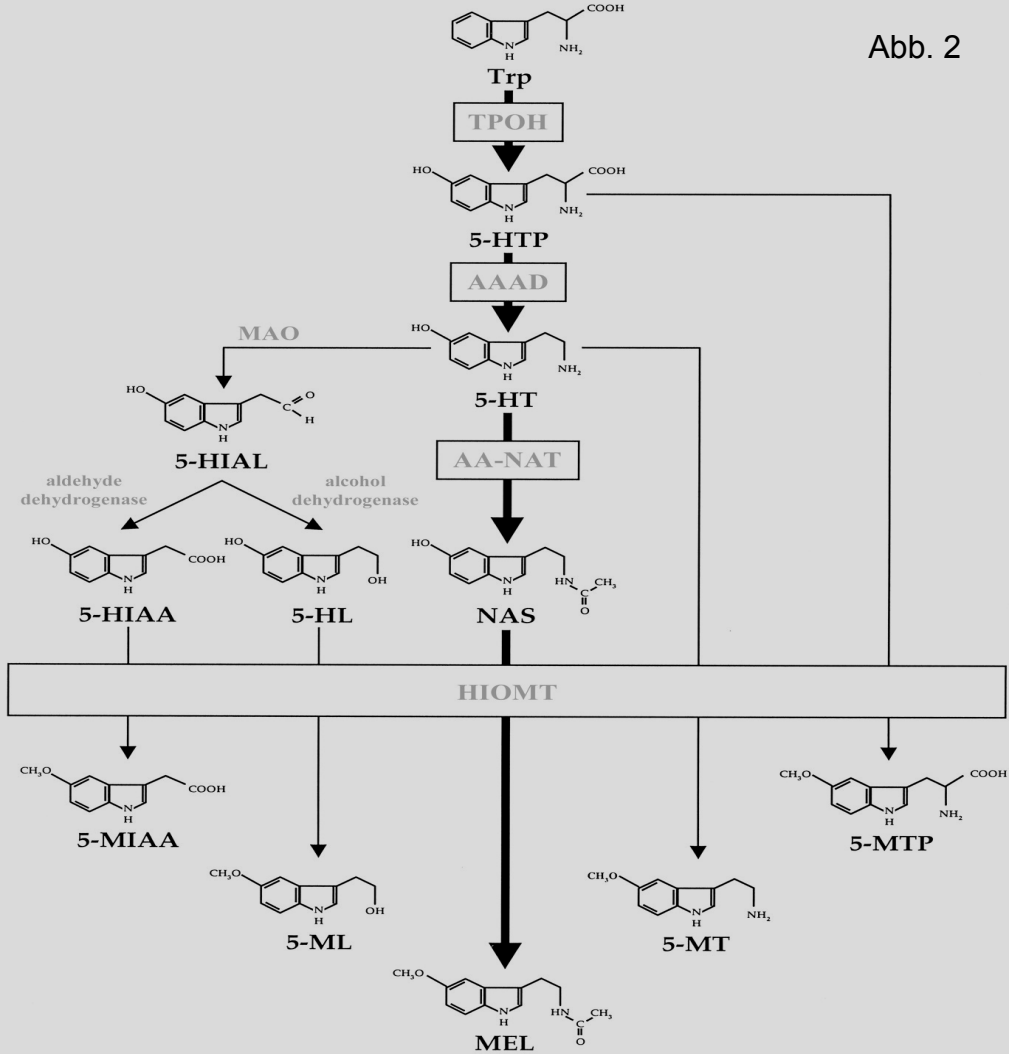


Abbildung 2: *Metabolismus von L-Tryptophan (Trp) in der Zirbeldrüse: 5-hydroxy Trp (5-HTP), 5-hydroxyindole-Acetaldehyd (5-HIAL), 5-Hydroxytryptophol (5-HL), N-Acetylserotonin (NAS), 5-methoxyindole Essigsäure (5-MIAA), 5-Methoxytryptophol (5-ML), Melatonin (MEL), 5-Methoxytryptamine (5-MT), 5-Methoxytryptophan (5-MTP), hydroxyindole-O-Methyltransferase (HIOMT), Trp-Hydroxylase (TPOH), arylalkylamine-N-Acetyltransferase (AA-NAT), aromatische Aminosäuren Decarboxylase (AAAD) (modifiziert nach Simonneaux und Ribelayga 2003).*

Es kommt unter anderem in Blutplättchen und Mastzellen vor. Neuronal wird es in den präsynaptischen Vesikeln gespeichert und bei entsprechenden Stimuli synaptisch freigesetzt. Nach Gewebsschädigung wird 5-HT aus Blutplättchen und Mastzellen freigesetzt (Dray 1995). Dabei unterhält es besonders die Startphase der Entzündung (Capasso et al. 1975). Ebenfalls steigt der Gehalt an 5-HT nach peripherer Nervenläsion im betroffenen Nerven an (Vogel et al. 2003).

Auf den peripheren Endigungen von C-Fasern sind für die Bindung von Serotonin 5-HT_3 und 5-HT_{2A} Rezeptoren exprimiert (Fozard 1984, Davis et al. 1993). Der von 5-HT ausgelöste bzw. verstärkte Schmerz kann somit an das Rückenmark weitergeleitet werden (Moalem et al. 2005). Auf Schwann-Zellen wurden ebenfalls 5-HT Rezeptoren nachgewiesen (Yoder et al. 1997), so dass hier ein Ursprungsort bzw. Wirkort für 5-HT beim neuropathischen Schmerzgeschehen angenommen werden kann. Die schmerzauslösende Wirkung von 5-HT allein wird kontrovers diskutiert; es scheint, dass 5-HT vielmehr bereits vorhandene Schmerzen an vorher lädierten Nerven verstärken kann, bzw. nur in Verbindung mit anderen Mediatoren wie Bradykinin algetisch wirksam ist (Sommer 2004).

Rezeptor	5-HT_1						5-HT_2			5-HT_3	5-HT_4	5-HT_5		5-HT_6	5-HT_7
Effektor	AZ						PLC			IonK	AZ	AZ	?	AZ	AZ
	/	/	/	\	\	\	/	|	\			/	\		
Subtyp	5-HT_{1A}	5-HT_{1B}	5-HT_{1C}	5-HT_{1D}	5-HT_{1E}	5-HT_{1F}	5-HT_{2A}	5-HT_{2B}	5-HT_{2C}				5-HT_{5A}	5-HT_{5B}	

Tabelle 1: *7 Rezeptorfamilien von 5-HT Rezeptoren. Mit Ausnahme des 5-HT3-Rezeptors, der ein ligandengesteuerter Ionenkanal ist, gehören alle Rezeptoren zur Superfamilie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren mit 7-Transmembran-Domänen. AZ: Adenylatzyklase, PLC: Phospholipase C, IonK: Ionenkanal (modifiziert nach Hoyer et al. 1994).*

Zur Zeit sind sieben 5-HT Rezeptorfamilien bekannt (siehe Tabelle 1), an denen 5-HT nach der Freisetzung binden kann und den verschiedenen Wirkorten entsprechend unterschiedliche Effekte erzielt (Eide et al. 1993). Über 5-HT_{1B}-

Rezeptoren werden zum Beispiel große Gefäße im Muskelgewebe dilatiert. An Meningealgefäßen und an den Koronarien führt die Freisetzung von 5-HT jedoch über den gleichen Rezeptor zur Vasokonstriktion (Mutschler et al. 2005).

Ähnliches lässt sich auf neuronaler Ebene beobachten. Je nach Rezeptor und Wirkort kann 5-HT hier Analgesie oder Hyperalgesie bewirken (Sommer 2004). Im Besonderen fällt hier eine Verteilung zwischen zentralem und peripherem Nervensystem auf. Es konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass intrathekal (= in den Spinalkanal, somit zentral) appliziertes 5-HT analgetische Wirkung hat (Bardin et al. 2000, Yaksh und Wilson 1979), aber intraplantar (= peripher) injiziertes 5-HT eine Hitze-Hyperalgesie verursacht (Tokunaga et al. 1998). Taiwo und Levine (1992) konnten sogar eine direkte Korrelation zwischen der Menge des peripher injizierten 5-HT und dem Grad der Hyperalgesie auf Druck feststellen.

5-HT wird schließlich nach der Bindung an seine Rezeptoren über die Monoaminooxidase Typ A zu 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) abgebaut und größtenteils über die Niere ausgeschieden bzw. über den 5-HT-Transporter (5-HTT) und einige unspezifische Transporter wieder in das präsynaptische Neuron aufgenommen (Kreutzig 2006, Benninghoff und Drenckhahn 2004).

Der 5-HTT gehört zu der Gruppe der Na^+/Cl^- -abhängigen Transporter. Die Expression und Aktivität dieses Transporters bestimmt durch die Menge an wiederaufgenommenem 5-HT in die Praesynapse die Dauer und Intensität der Erregung durch 5-HT (Lesch 1997, Blakely et al. 1994). Demnach spielt er eine zentrale Rolle bei der Regulierung der Übertragung von neuronalen Impulsen durch 5-HT (siehe Abbildung 3).

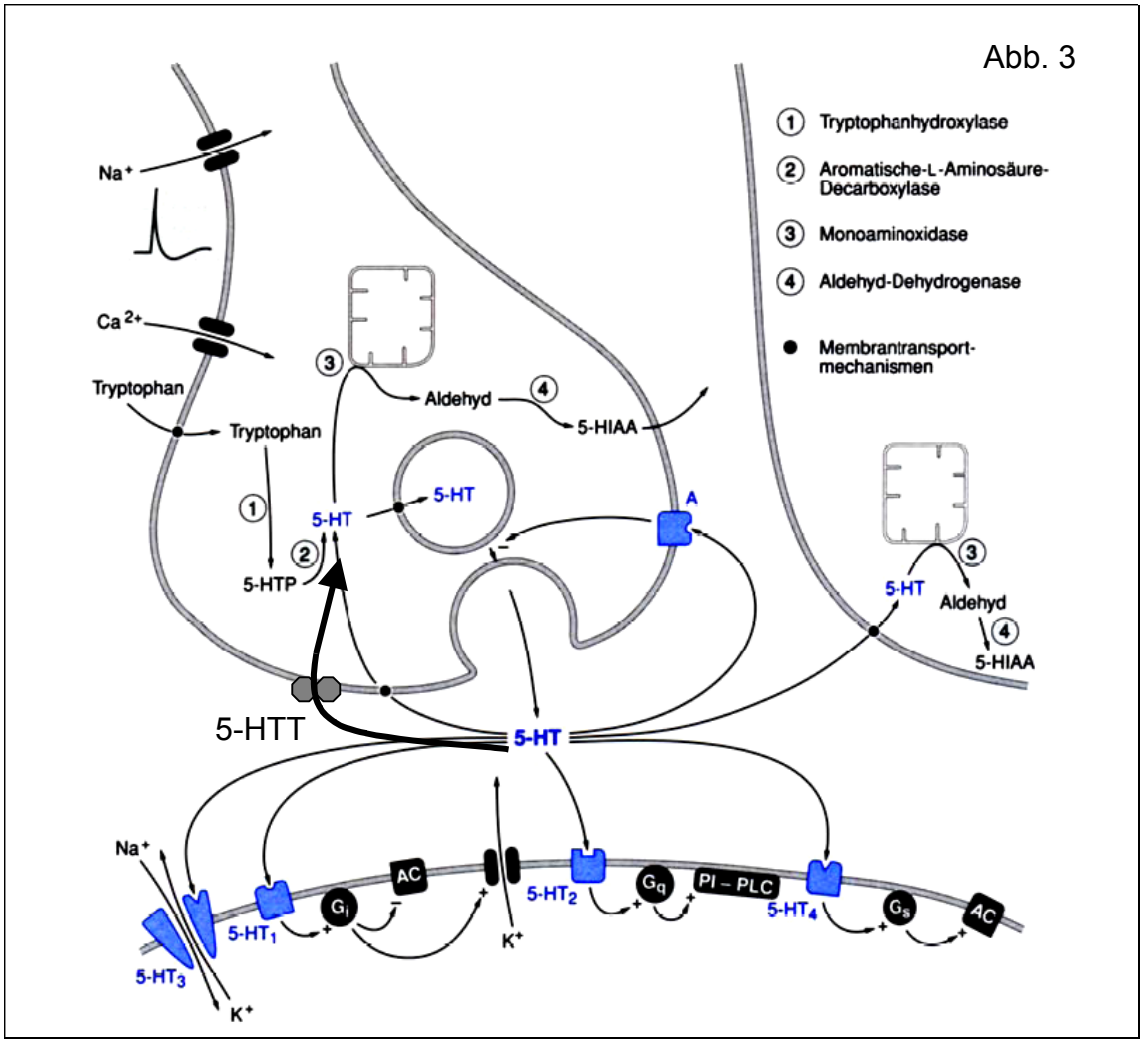


Abbildung 3: *Serotonerge Synapse modifiziert nach Forth et al. (2001)*

1.5 Trizyklische Antidepressiva in der Therapie neuropathischer und anderer chronischer Schmerzen

Den zentralen analgetischen Effekt von Serotonin versucht man sich in der Therapie neuropathischer und anderer chronischer Schmerzen zu Nutze zu machen, indem man Trizyklische Antidepressiva (TZA) einsetzt. Durch ihre Eigenschaft als nicht selektive Noradrenalin- und Serotonin-Wiederaufnahmehemmer erhöhen sie im Synapsenbereich des ZNS den Gehalt der inhibitorischen Transmitter Noradrenalin und Serotonin; dieses führt zur Anhebung der Schmerzschwelle (Eschalier et al. 1994, McQuay et al. 1996, Ansari 2000). Weitere Wirkungen von TZA im Synapsenbereich sind die

Blockade bzw. Regulierung der Expression von Natriumkanälen und NDMA-Rezeptoren, sowie in geringem Ausmaß auch die Bindung an Endorphinrezeptoren (Eschalier et al. 1994, Gerner et al. 2001, Wessely 2001). Amitriptylin ist einer der wichtigsten Vertreter dieser Gruppe (Freynhagen und Baron 2003).

TZA haben leider viele unerwünschte Nebenwirkungen: Anticholinerge Nebenwirkungen sind u.a. Mundtrockenheit, Obstipation, Sinustachykardie, Miktionsbeschwerden und Akkomodationsstörungen. Der antiadrenerge Effekt führt u.a. zu Symptomen wie Hypotonie, Arrhythmien und Schwitzen. Auch das histaminerge System wird beeinflusst, so dass es zu Müdigkeit und Gewichtszunahme kommen kann. Weiterhin treten vereinzelt auch Allergien oder Leberfunktionsstörungen auf (Brunnhuber 2005). Diese Nebenwirkungen führen dazu, dass häufig die Behandlung mit TZA vorzeitig abgebrochen werden muss oder unzureichend bleibt, da die notwendige Dosis im Rahmen der Aufsättigungsphase aufgrund von Unverträglichkeit nicht erreicht wird.

Auf der Suche nach Medikamenten, die weniger Nebenwirkungen haben, wurden selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer (SSRI) entwickelt. Über die selektive Hemmung des 5-HTT kommt es zum Anstieg von Serotonin im synaptischen Spalt. Aufgrund der geringeren Nebenwirkungen werden SSRI inzwischen häufig als Medikamente der ersten Wahl bei depressiven Erkrankungen eingesetzt. Die Hauptsymptome Übelkeit und Unruhe bestehen meist nur zu Beginn der Therapie (Brunnhuber 2005).
Im Gegensatz zur guten Wirksamkeit bei Depressionen sind SSRI in der Behandlung neuropathischer Schmerzen den TZA jedoch deutlich unterlegen. Es konnte lediglich für einige wenige Medikamente eine eingeschränkte Wirksamkeit nachgewiesen werden. Sindrup et al. wiesen 1990 in klinischen Tests für Paroxetin und 1992 für Citalopram eine Effizienz versus Placebo nach. Max et al. (1992) fanden allerdings zur gleichen Zeit keinen Unterschied in der Wirkung zwischen Fluoxetin und Placebo. Im Tierversuch jedoch konnten Sawynok et al. (1999) durch Fluoxetin im Formalintest die Hyperalgesie

signifikant reduzieren. Ebenso konnten Wang et al. (1999) durch Fenfluramin die mechanische Allodynie deutlich mindern. Fenfluramin aus der Gruppe der Appetitzügler wirkt nicht nur als Wiederaufnahmehemmer, sondern auch als Serotoninreleaser. Es erhöht somit im Gegensatz zu den SSRI auf einem zusätzlichen Wege den extrazellulären Serotoninspiegel.

Aufgrund des theoretischen Potentials der SSRI als zukünftige Medikamente in der Therapie chronischer Schmerzen und den bisher kontroversen Ergebnissen soll diese Arbeit einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Vorgänge am 5-HTT leisten.

1.6 Versuchsmodelle zur Untersuchung chronischer Schmerzen

Für die Untersuchung der Vorgänge am 5-HTT eignen sich besonders Mäuse mit einer genetischen Defizienz für diesen Transporter (5-HTT knock-out (KO)-Mäuse). Sie gelten als Modell für eine lebenslange Behandlung mit SSRI (Bengel et al. 1998, Lesch und Heils 2000). Folglich konnte nachgewiesen werden, dass diese Mäuse extrazellulär im ZNS eine erhöhte Menge an 5-HT besitzen, der Gesamtgehalt an 5-HT im Gehirn jedoch vermindert ist (Fabre et al. 2000). Weiterhin sind in verschiedenen Bereichen des Gehirns die Rezeptoren 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} und 5-HT_{2A} weniger zahlreich exprimiert als bei Wildtypen (WT-Mäuse) (Fabre et al. 2000, Rioux et al. 1999). Diese Veränderungen machen die KO-Mäuse zu interessanten Studienmodellen für die Rolle von 5-HT im Schmerzgeschehen.

Von Vogel et al. (2003) wurden diese Mäuse für ein Modell einer experimentellen Mononeuropathie, der chronischen Konstriktionsläsion (chronic constriction injury, CCI) genutzt (Bennett und Xie 1988). Die Mäuse wurden sowohl vor, als auch nach einer inkompletten Läsion des Nervus ischiadicus auf Hitzehyperalgesie und mechanische Allodynie getestet. Dabei stellte sich heraus, dass KO-Mäuse im Gegensatz zu WT-Mäusen keine Hitzehyperalgesie

entwickeln, jedoch auf taktile Reize mit von Frey Haaren eine mechanische Allodynie zeigen. Die Allodynie bestand bemerkenswerterweise bei den KO-Mäusen bilateral, im Gegensatz zur ipsilateralen Allodynie in Wildtypen. Gleichzeitig wurde der Gehalt an 5-HT im N. ischiadicus bestimmt. Es bestand eine Zunahme von 5-HT im Gewebe der WT-Mäuse, welche bei den KO-Mäusen nicht zu verzeichnen war. Daraus wurde geschlossen, dass 5-HT im peripheren Nerven notwendig ist, um eine Hitzehyperalgesie zu entwickeln (Vogel et al. 2003).

1.7 Fragestellung der Arbeit

Nachdem sich 5-HTT-KO-Mäuse in einem Modell für neuropathische Schmerzen von WT-Mäusen unterschieden (siehe 1.6), stellte sich die Frage, ob dies auch in einem entzündlichen Schmerzmodell der Fall sei. Von besonderem Interesse war dabei auch die vermutete Rolle von 5-HT als unmittelbarer Schmerzmediator in der Peripherie.

Es wurde mit der Hilfe von komplettem Freund´schen Adjuvans (CFA) ein chronisches Entzündungsmodell generiert (Butler et al. 1992). Dabei wurden KO-Mäuse im Vergleich mit WT-Mäusen vor und nach der intraplantaren Injektion von CFA auf Hitzehyperalgesie und mechanische Allodynie getestet. Zusätzlich wurde in verschiedenen Gewebeproben der Gehalt an 5-HT gemessen und es wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden an insgesamt 16 Mäusen mit einem C57Bl/6J Hintergrund durchgeführt. Davon waren 8 Tiere Wildtypen (5-HTT +/+, WT-Mäuse) und 8 Tiere homozygote Knock-out Mäuse (5-HTT -/-, KO-Mäuse). Der Genotyp wurde entsprechend Bengels et al. (1998) bestimmt. Die Tiere waren weiblich, im Alter von 10 - 13 Monaten und wogen 23,5 - 36,7 g.

Die Züchtung der Tiere erfolgte im Auftrag der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie/Universität Würzburg durch geschultes Tierpflegepersonal in den Räumen der Neurologischen Klinik und Poliklinik/Universität Würzburg. Die Tiere wurden während der Versuchsdauer unter standardisiert kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit bei einem Licht-Dunkel Rhythmus von 14:10 Stunden einzeln oder in Gruppen bis zu fünf Tieren in Kunststoffkäfigen (15 x 21 x 32 cm) gehalten. Sie erhielten Trockenpressfutter und Wasser ad libitum. Alle Versuche waren durch die Regierung von Unterfranken/Bayern genehmigt.

2.2 OP-Techniken

2.2.1 Narkose

Die i.pl. Injektionen erfolgten mit 0,3 x 13 mm großen Kanülen der Firma Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) unter einem Binokular der Firma Leica (Solms, Deutschland) bei fünf- bis zehnfacher Vergrößerung und einer kurzen Betäubung mit Diethylether. Bei der Gewebeentnahme wurden die Tiere mit 11 ml pro kg Körpergewicht Narcoren® (1:40 mit physiologischer Natriumchlorid Lösung (NaCl 0,9 %) verdünnt) narkotisiert. Dabei wurde das Narkotikum in einem möglichst stumpfen Winkel i.p. injiziert, um eine Verletzung innerer Organe zu vermeiden.

2.2.2 Injektion von CFA und Natrium-Chlorid (NaCl 0,9 %)

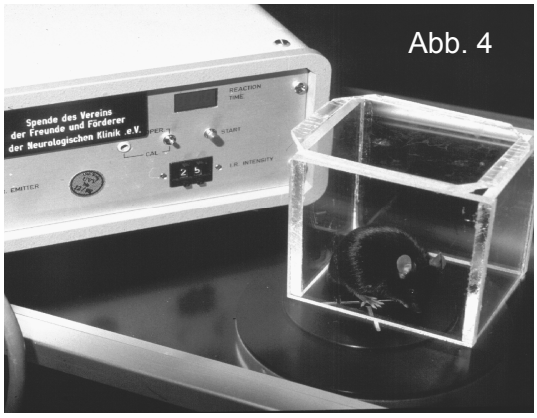
CFA wurde jeweils einen Tag vor der Verwendung angesetzt und bei 4 °C gelagert. Dazu wurde Mycobacterium tuberculosis H37 Ra im Verhältnis 4:1 in Adjuvant Incomplete Freund gelöst und dann mit Phosphatpuffer (PBS) im Verhältnis 1:1 emulgiert. Für die Herstellung von PBS wurden 16 g NaCl, 0,4 g Kaliumchlorid, 2,84 g di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat und 2,76 g Natriumdihydrogen-phosphat-Dihydrat in 200 ml Aqua dest. gelöst und der pH dann durch Titrieren (siehe 2.5) auf 6,7 eingestellt. Direkt vor der Verwendung wurde die Lösung erneut mit Aqua dest. 1:10 verdünnt und steril filtriert. Gewichtsunabhängig injizierten wir dann je 10 µl CFA (das entspricht 20 µg M. tuberculosis H37 Ra) in die plantare Seite der rechten Hinterpfote. Kontrolltiere erhielten entsprechend 10 µl NaCl 0,9 %.

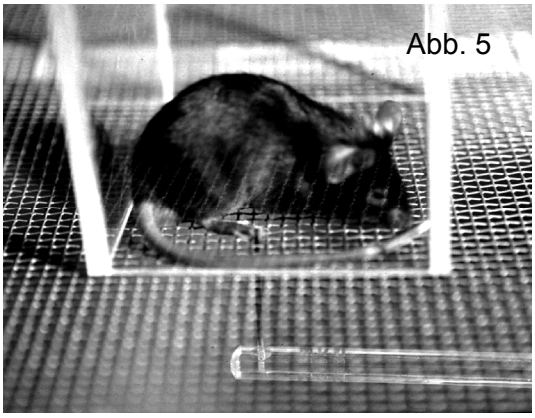
2.3 Verhaltenstestungen

2.3.1 Testung der Hitzehyperalgesie

Zur Testung der Hyperalgesie durch thermische Reize wurde ein Gerät der Firma Ugo Basile (Comerio-Varese, Italien) mit Einstellung der Infrarot Intensität von 25 Einheiten verwendet (Hargreaves et al. 1988). Jede Maus saß dabei in einem separaten, bodenlosen Plexiglasquader (7 x 9 x 10 cm) auf einer Glasplatte. Die punktförmige Wärmequelle konnte unter der Glasplatte von der Testperson unmittelbar unter der rechten oder linken Hinterpfote der Maus platziert werden. Durch Starten des Gerätes wurde dann gezielt die plantare Seite der entsprechende Pfote erwärmt. Sobald die Schmerzschwelle der Maus für diesen Reiz überschritten war, zog sie die Pfote abrupt weg, so dass auf eine integrierte Photozelle des Gerätes Licht fiel und dadurch sowohl die Wärmequelle abgeschaltet, als auch die seit Beginn der Testung automatisch laufende Stoppuhr angehalten wurde. Die gemessene Zeit in Sekunden und Zehntelsekunden galt als Latenzzeit für die Messung der Hitzehyperalgesie.

Hatte die Maus nach 12 Sekunden noch nicht reagiert, wurde die Stimulation manuell abgebrochen, um Gewebeschädigungen zu verhindern (siehe Abb. 4).





Abbildungen 4 und 5: *Versuchsaufbau für die Testung auf Hitzehyperalgesie und für die Testung der mechanischen Allodynie mit von Frey Haaren.*

Jeder Messwert repräsentiert einen Mittelwert aus drei einzelnen Testungen im Abstand von mindestens einer Minute, wobei vor der ersten Testung dem Tier eine Eingewöhnungsphase von mindestens 2 Minuten gelassen wurde. Zur Ermittlung des Ausgangswertes (V) vor den jeweiligen Interventionen wurde jede Maus an zwei Tagen vorgetestet, sodass jedes V einem Mittelwert aus sechs einzelnen Testungen entspricht.

2.3.2 Testung der mechanischen Allodynie

Zur Testung der mechanischen Allodynie wurde den plantaren Seiten der jeweiligen Hinterpfoten taktile Stimuli mittels kalibrierter von Frey Haare der Firma Stoelting (Chicago, Il, USA) dargeboten. Die Haare wurden auf der Basis der up-and-down Methode von Dixon (1965) und in Anlehnung an Chaplan et al. (1994), modifiziert für Mäuse von Sommer und Schäfers (1998), mindestens sechs Mal der jeweiligen Hinterpfote dargeboten, wobei immer alternierend die rechte und linke Seite getestet wurde und zwischen den einzelnen Reizdarbietungen auf der gleichen Seite mindestens eine Minute und zur anderen Seite mindestens 30 Sekunden Pause eingehalten wurde.

Zur Bestimmung des Schwellenwertes wurden Haare der Stärke 1,65 bis 4,17 verwendet. Das Haar mit dem Wert 4,31 wurde nicht mehr dargeboten, da sich mit dieser Stärke eher die Pfote der Maus anheben ließ, als dass sich ein adäquater Reiz hätte darbieten lassen. Ein adäquater Reiz lag dann vor, wenn das Haar mit einem entsprechenden Druck so dargeboten werden konnte, dass es sich gerade zu biegen anfing. Begonnen wurde die Reizdarbietung bei jeder Pfote mit dem Haar der Stärke 3,84. Die Reizdauer betrug jeweils drei Sekunden. Als positive Reaktion wurde ein schnelles Anheben der Pfote innerhalb der drei Sekunden bzw. auch direkt nach Reizentzug gewertet. Begann die Maus umherzulaufen bzw. war die Antwort nicht eindeutig, wurde der Reiz nach einer Minute wiederholt. Die Mäuse saßen hierbei auf einem Metallgitter in den gleichen Glasquadern wie bei dem Test auf Hitzehyperalgesie, so dass die Stimuli durch das Gitter hindurch dargeboten werden konnten. Vor dem ersten Stimulus wurde der Maus eine Eingewöhnungszeit von mindestens 2 Minuten gelassen (siehe Abbildung 5).

Die Haarstärken entsprachen dem Zehnerlogarithmus der entsprechenden Kraft in mg, die als Reiz auf die Hinterpfote der Maus einwirkte, hier der getestete Bereich von 0,004 g bis 1,479 g. Sollte die Maus im hyposensiblen Bereich bei einer Haarstärke von 4,17 noch nicht reagiert haben, wurde ein Schwellenwert von 1,6 g angenommen. Sollte die Maus im hypersensiblen Bereich bei einer Haarstärke von 1,65 immer noch reagieren, wurde ein Schwellenwert von 0,004 g angenommen.

Zur Ermittlung der 50 %igen Rückzugsschwelle, d.h. die Reizschwelle bei der ein Tier in 50 % der Testdurchgänge die Pfote zurückzieht, wurde das erzielte Muster von genau 6 Testungen mittels der Gleichung: *50 %ige Rückzugsschwelle in g* = $(10^{(Xf + \kappa\delta)})/10.000$ in einen Schwellenwert überführt. Xf entspricht hierbei dem Stärkewert des zuletzt benutzten Haares, κ entspricht dem Tabellenwert für das entsprechende Muster positiver und negativer Reizantworten nach Dixon (1965) und δ der mittleren Differenz der dargebotenen Haarstärken. Die für das Muster zählenden 6 Testungen ergaben

sich aus jenen beiden Testungen, bei denen zum ersten Mal einer positiven Reaktion eine negative folgte, bzw. umgekehrt und den folgenden vier Testungen.

2.3.3 Messung der Pfotendicke und Wiegen des Körpergewichtes

Die Pfotendicke wurde mittels einer handelsüblichen Schieblehre gemessen, wobei die beiden Messschnäbel die Haut der Pfote gerade noch berührten. Das Körpergewicht wurde auf einer Waage der Firma Kern (Albstadt, Deutschland) ermittelt.
Die Zunahme der Pfotendicke galt als Indikator für die durch CFA-Injektion induzierte Entzündungsreaktion (siehe Abbildung 6).



Abbildung 6: *Pfotenschwellung nach i.pl. Injektion von CFA.*

2.4 Gewebeentnahme

Für die Immunhistochemie (IHC) wurden an Tag 7 nach CFA-Injektion die Spinalganglien (dorsal root ganglia, DRG) L4 und L5 sowohl rechts als auch links und je Hinterpfote drei Footpads (FP) entnommen. Für die High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC) wurde ein Teil des Nervus Ischiadicus (N. ischiadicus) sowohl rechts als auch links, das Rückenmark (RM) zwischen L4 und L5 und beide Nebennieren entnommen.

Die Gewebeentnahme erfolgte in tiefer Narkose (siehe 2.2.1). Mit Hilfe von Binokular (siehe 2.2.1), Skalpell, feiner Augenschere und feiner Pinzette wurde

zunächst nach bilateraler Darstellung des N. ischiadicus am mittleren Oberschenkeldrittel ein 1 cm langes Stück des Nerven am lebenden Tier entnommen. Danach wurde das Tier durch Decapitation getötet, und erst dann erfolgte die Entnahme des restlichen Gewebes. Die DRG L4 und L5 wurden vom N. ischiadicus her nach proximal sorgfältig mit Skalpell und feiner Knochenzange freipräpariert und dann beidseitig entnommen, ebenso wurde das RM proximal von der L4- bis distal der L5-Wurzel dargestellt und dieses Stück entnommen. Anschließend folgte von retroperitoneal her die Darstellung und Entnahme der beiden Nebennieren. Zum Schluss wurden an beiden Hinterpfoten je drei FP abgetrennt.

Für die HPLC wurde das Gewebe nach der Entnahme auf der Analysenwaage (siehe 2.2.2) gewogen und dann in Aluminiumfolie bei –70 °C eingefroren. Für die IHC wurde das Gewebe in mit Tissue Tek® gefüllte Cryomoldschälchen®, beides von Sakura Finetek (Zoeterwoude, Niederlande), eingebettet und dann in mit flüssigem Stickstoff gekühlten 2-Methylbutan für einige Sekunden schockgefroren. Es konnte dann bei –70 °C aufbewahrt werden. Die FP wurden für die IHC nach der Entnahme in 4 %igem Paraformaldehyd (PFA) in 0,15 M PBS ca. 3 hr bei 4 °C fixiert, anschließend mit PBS ausgewaschen und dann zur Kryoprotection ca. 12 hr in 10 %iger D(+)-Saccharose in PBS bei 4 °C gelagert. Danach wurden die FP auf bereits beschriebene Weise eingefroren.

Für die Herstellung von 0,15 M PBS wurden 800 ml 0,2 M di-Natrium-hydrogenphosphat-Dihydrat in Aqua dest. und 160 ml 0,2 M Natriumdi-hydrogenphosphat-Dihydrat in Aqua dest. gemischt und mit Aqua dest. auf 2 Liter aufgefüllt. Der pH wurde durch Titrieren (siehe 2.5) auf 7,4 eingestellt.

2.5 Immunhistochemische Färbungen

Für die Färbungen wurde von dem gefrorenen Gewebe zunächst auf einem Kryostaten (CM 3050 S) der Firma Leica (Bensheim, Deutschland) 10 bzw. für

die FP 20 µm und für die Fluoreszenzfärbungen 40 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese konnten dann auf Super Frost®-Objektträgern der Firma Langenbrinck (Emmerdingen, Deutschland) bei –20 °C gelagert werden.

Vor dem eigentlichen Färbevorgang wurden die Objektträger mit den Schnitten bei Raumtemperatur (RT) mindestens 20 Minuten (min) lang aufgetaut und getrocknet. Anschließend wurden sie in 100 % Aceton für 10 min bei –20 °C fixiert. Bei der PAN-Na_v- (Darstellung aller Na-Kanäle) und Na_v 1.3-Färbung wurden die Objektträger ohne Auftauen direkt im Acetonbad fixiert und anschließend mit 0,1 M PBS dreimal gewaschen. Die Herstellung von 0,1 M PBS erfolgte wie in 2.4 angegeben, hier und zur weiteren Verwendung mit dem Zusatz von 60 ml 5 M NaCl. Alle Schnitte wurden dann ca. 5 min bei 42 - 45 °C auf einer Heizplatte der Firma Reichert-Jung (Bensheim, Deutschland) getrocknet und mit einem PapPen® der Firma Science Services (München, Deutschland) umrandet. Restliches Tissue Tek® wurde entfernt.

Daraufhin folgte die Blockung mit der jeweiligen Blocklösung. Die PAN-Na_v- und Na_v 1.3-Färbungen wurden 1 Stunde lang bei RT mit 0,3 % Triton® X-100 (Triton), 4 % Normal Goat Serum (NGS) und 4 % Foetal Bovine Serum (FCS) in PBS geblockt. Die übrigen Färbungen wurden 30 min lang bei RT mit 10 % Albumin, Bovine Fraktion V (BSA) in TRIS-Puffer (TRIS) bzw. bei den übrigen Fluoreszenzfärbungen in PBS geblockt. Für den TRIS wurden 40 g NaCl in 100 ml Tris-Stammlösung gelöst und dann mit Aqua dest. auf 2 l aufgefüllt. Der pH wurde auf 7,4 eingestellt. Für die Tris-Stammlösung wurden 60,57 g Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) in 500 ml Aqua dest. und 400 ml 1 M Salzsäure gelöst. Der pH wurde auf 7,35 eingestellt und es wurde mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

Nach Abkippen der jeweiligen Blocklösung wurden die Schnitte mit dem ersten Antikörper inkubiert (siehe Tabelle 2). Die Inkubationen erfolgten zum Schutz vor Austrocknung in einem mit nassen Papiertüchern ausgelegten und verschlossenen Kunststoffbehälter. Nach der Inkubation mit dem jeweiligen

Antikörper wurden alle Fluoreszenzfärbungen mit PBS und die übrigen Färbungen mit TRIS dreimal gewaschen. Vor der Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurden alle Färbungen außer den Fluoreszenzfärbungen für 20 min in 200 ml Methanol mit 3,5 ml 30 %igen Wasserstoffperoxid bei RT geblockt und anschließend dreimal mit TRIS gewaschen. Die Fluoreszenzfärbungen wurden nach dem zweiten Antikörper mit DABCO eingedeckt und konnten nun bei 4 °C bis zur Auswertung gelagert werden. Zur Herstellung von DABCO wurden 2,5 g 1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (Dabco) und 75 ml Glycerol in 25 ml PBS gelöst. Die übrigen Färbungen wurden nach dem zweiten Antikörper mit Vectastain®-ABC-Kit weiterbehandelt. Dazu wurden zunächst 10 µl Reagenz A (Avidin-Lösung) mit 10 µl Reagenz B (biotinylierte Meerrettich-Peroxidase) und 1 ml 1 %iges BSA gemischt und dann bei RT 30 min lang vorinkubiert, anschließend wurden die Schnitte damit für 30 min bei RT inkubiert.

Vor der eigentlichen Anfärbung mit 3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid-Dihydrat (DAB) wurden die Schnitte dreimal mit TRIS ausgewaschen. Für die DAB-Färbung wurde dann eine 10 mg Tablette DAB 15 min vor Verwendung in 10 ml Aqua dest. bei RT gelöst. Kurz vor der Verwendung wurden dann 10 ml 30 %iges Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte 10 min lang bei RT und wurde schließlich durch ein Bad in Aqua dest. abgestoppt. An dieser Stelle erfolgte bei der MAC-1- und der BDNF-Färbung zur besseren Auswertung eine 30 sekündige Gegenfärbung mit Hämalaun nach Meyer mit anschließender 10 minütiger Wässerung. Für die Hämalaun-Färbung nach Meyer wurden 1 g Hämatoxylin, 0,2 g Natriumjodat, 50 g Kaliumaluminium-sulfat-Dodecahydrat, 50 g Chloralhydrat und 1 g Citronensäure in 1000 ml Aqua dest. gelöst und anschließend gefiltert. Die Schnitte wurden schließlich in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und 10 min in einem Xylol-Bad belassen. Die Eindeckung erfolgte mit Vitro-Clud® und handelsüblichem Nagellack. Die Schnitte konnten nun bis zur Auswertung bei RT gelagert werden.

Für die Hämalaun-Eosin-Färbungen (HE-Färbung) wurden die aufgetauten Schnitte 10 min lang in einem Hämalaun-Bad nach Meyer und dann 25 sek in einem 1 %igen Eosin-Bad gefärbt. Anschließend wurden die Schnitte wie oben beschrieben entwässert und mit Vitro-Clud® eingedeckt. Für das Eosin-Bad wurden 10 g Eosin in 1 l 70 Vol.-%igen Ethanol gelöst. Danach wurde die Lösung filtriert und schließlich 3 Tropfen 100 %ige Essigsäure zugegeben.
Die pH–Einstellungen erfolgten je nach pH-Messung mittels einer Sonde der Wissenschaftlich Technischen Werkstätten (Weilheim, Deutschland) durch 1 M Natronlauge bzw. 1 M Salzsäure.

Färbung	**Erstantikörper**	**Zweitantikörper**
ATF-3	ATF-3 (C-19) sc-188 von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Ca, USA), Verdünnung 1:200 mit 1 % BSA in TRIS, Inkubation ca. 12 hr bei 4 °C	Biotinylated Anti-Rabbit IgG von Vector Laboratories (Burlingame, Ca, USA) mit Mäuseserum im Verhältnis 1:1, Inkubation 1 hr bei 37 °C
BDNF	BDNF (N-20) sc-546 von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Ca, USA), Verdünnung 1:10 mit 1 % BSA in TRIS, Inkubation ca. 12 hr bei RT	Biotinylated Anti-Rabbit IgG von Vector Laboratories (Burlingame, Ca, USA) mit Mäuseserum im Verhältnis 1:1, Inkubation 1 hr bei 37 °C
CGRP (Fluoreszenz)	Rabbit Anti-alpha-CGRP (Rat) von Peninsula Laboratories (San Carlos, Ca, USA), Verdünnung 1:500 mit 1 % BSA in PBS und 0,3 % Triton, Inkubation ca. 12 hr bei RT	Cy™3-conjugated*AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Cy3) von Jackson Immuno Research (West Grove, Pa, USA), Verdünnung 1:50 mit 1 % BSA in PBS, Inkubation 2 hr bei RT

Na_v 1.3 (Fluoreszenz)	Anti-Na_v 1.3 (Brain Type III Na^+ Channel, Scn3a, BIII) von Alamone labs (Jerusalem, Israel),Verdünnung 1:200 mit entsprechender Blocklösung (siehe oben), Inkubation ca. 12 hr bei RT	Cy^{TM}3-conjugated*AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (minimal cross-reaction to Human, Mouse and Rat Serum Proteins) (Cy3) von Jackson Immuno Research (West Grove, Pa, USA), Verdünnung 1:50 mit entsprechender Blocklösung (siehe oben), Inkubation 1 hr bei RT
PAN-Na_v (Fluoreszenz)	Monoclonal Anti-Pan Sodium Channel – mouse IgG 1 isotype (PAN) von Sigma (Saint Louis, Mo, USA), Verdünnung 1:500 mit entsprechender Blocklösung (siehe oben), Inkubation ca. 12 hr bei RT	Cy^{TM}2-conjugated*AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Cy2) von Jackson Immuno Research (West Grove, Pa, USA), Verdünnung 1:50 mit entsprechender Blocklösung (siehe oben), Inkubation 1 hr bei RT
PGP 9.5 (Fluoreszenz)	Anti-Human PGP 9.5 von Ultra Clone (Wellow, Groß Britannien), Verdünnung 1:500 mit 1 % BSA in PBS und 0,3 % Triton, Inkubation ca. 12 hr bei RT	Cy^{TM}3-conjugated*AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Cy3) von Jackson Immuno Research (West Grove, Pa, USA), Verdünnung 1:50 mit 1 % BSA in PBS, Inkubation 2 hr bei RT
MAC-1	Rat monoclonal antibody to mouse macrophages (MAC-1) von Camon (Wiesbaden, Deutschland), Verdünnung 1:100 mit 1 % BSA in TRIS, Inkubation ca. 12 hr bei 4 °C	Biotinylated Anti-Rat IgG (H+L) von Vector Laboratories (Burlingame, Ca, USA) mit Mäuseserum im Verhältnis 1:1, Inkubation 1 hr bei 37 °C

Tabelle 2: *Verwendete Antikörper bei den Immunhistochemischen Färbungen.*

2.6. High Pressure Liquid Chromatographie

Für die High Pressure Liquid Chromatographie (HPLC) wurden die Gewebeproben mit Ultraschall unter Argon in eisgekühlter 150 mM Phosphorsäure und 500 µM Diethylentriamin P behandelt. Anschließend wurde dann mit 35.000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann durch einen Filter (Ultrafree-MC filter cup) von der Fima Millipore (Bedford, Ma, USA) mit 9.000 g bei 4 °C für 1 - 2 Stunden gefiltert. Für die Analyse von 5-HT und 5-HIAA wurden jeweils 50 µl des Überstandes direkt in das HPLC-System gegeben und mit einem Gerät der Firma Gynkotek (Gemering, Deutschland) die Konzentration bestimmt.
Die Konzentrationen sind in ng pro mg Gewebsprotein angegeben. Die Werte aus den einzelnen Gewebeproben wurden hierbei in der Gruppe gemittelt. Bei den Gewebeproben der Nebennieren wurden die Werte der rechten und linke Seite gemittelt. Für die Standards der untersuchten Substanzen wurden Proben der Firma Sigma Aldrich Laborchemikalien (Steinheim, Deutschland) verwendet. Der Untersucher war bezüglich des Genotyps der Tiere verblindet.

2.7 Mikroskopie

Die Auswertungen der DAB-Färbungen erfolgten an einem Mikroskop (BH-2) der Firma Olympus (Tokyo, Japan) bei 40-facher Vergrößerung.

Die Auswertung der Fluoreszenzfärbungen erfolgte an einem Mikroskop (Axiophot 2) der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) mit einem vollständig servounterstützten Objektträgertisch der Firma Märzhäuser (Bonn, Deutschland). Zur Bildübermittlung an den Computer diente eine installierte Videokamera (DXC 003P) der Firma Sony (Tokyo, Japan). Mittels der Software Image Pro Plus 4.0 für Windows 98 von der Firma Microsoft Deutschland GmbH (Unterschleißheim, Deutschland) und der Software Axio Control für Windows 98 von der Firma Zeiss (Jena, Deutschland) konnten die Schnitte

entweder visuell ausgezählt oder auch mittels Photometrie eine bestimmte angefärbte Fläche in Bezug zur Gesamtfläche gesetzt werden (siehe unten). Dazu wurden Aufnahmen mit 2,5- und 40-facher Vergrößerung gemacht. Die Aufnahmen der DAB-Färbungen erfolgten ebenfalls hier.

Bei der Zählung der epidermalen Nervenfasern (PGP 9.5- und CGRP-Färbung) im FP wurde pro Tier ein kompletter Schnitt gezählt und in Beziehung zu der Länge des ausgewerteten Epidermisabschnittes gesetzt. Die Ergebnisse wurden für die jeweilige Gruppe gemittelt. Aufgrund der unterschiedlichen Farbintensität der Cy2- und Cy3-Färbung (siehe 2.5) mussten die Parameter in Image Pro Plus 4.0 für jede Färbung so eingestellt werden, dass die Schnitte gut zu bewerten waren. Innerhalb der Auswertung einer Färbung wurden die Parameter dann allerdings nicht mehr verändert. Bei der Auswertung der PGP 9.5-Färbung wurde folgende Einstellung verwendet: Helligkeit (H) 108 Einheiten, Kontrast (K) 130 Einheiten und Verschlusszeit (LZI) 0,08 Sekunden (sek) bei 40-facher Vergrößerung und 1,36 sek bei 2,5-facher Vergrößerung. Bei der Auswertung der CGRP-Färbung wurden die Einstellungen H 120, K 90, LZI 0,08 sek bei 40-facher Vergrößerung und 1,32 sek bei 2,5-facher Vergrößerung verwendet.

Die Auswertung der DRG erfolgte in einer 40-fachen Vergrößerung. Es wurde ein repräsentativer Teil der DRG ausgewählt und dann mittels Photometrie ausgewertet. Bei der Na_v 1.3-Färbung wurden dazu die Einstellungen H 121, K 250 und LZI 0,36 sek gewählt. Unter der Programmoption „Histogram Based tab dialog“ wurde im roten Farbspektrum der zu messende Bereich mit 186 - 255 Einheiten angegeben. Bei der PAN-Färbung waren die Einstellungen H 124, K 250 und LZI 0,08 sek. Der zu messende Bereich wurde im grünen Farbspektrum mit 56 - 120 Einheiten angegeben.

2.8 Reagenzien

1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan (Dabco) von Merck, Hohenbrunn, Deutschland
2-Methylbutan von Roth, Karlsruhe, Deutschland
3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid-Dihydrat (DAB) von Kem En Tec, Kopenhagen, Dänemark
3,4-Dihydroxyphenylessigsäure (DOPAC) von Sigma Aldrich Labor-chemikalien, Steinheim, Deutschland
3-Methoxy-4-hydroxy-phenylglykol (MHPG) von Sigma Aldrich Labor-chemikalien, Steinheim, Deutschland
5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA) von Sigma Aldrich Laborchemikalien, Steinheim, Deutschland
5-Hydroxytryptamin (5-HT) von Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aceton von Baker, Deventer, Niederlande
Adjuvant Incomplete Freund von Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA
Albumin, Bovine Fraktion V (BSA) von Sigma, Steinheim, Deutschland
Aqua ad iniectabilia von Delta Select, Pfullingen, Deutschland
Aqua dest. aus einem Wasservollentsalzer der Firma Behr, Düsseldorf, Deutschland
Chloralhydrat von Merck, Darmstadt, Deutschland
Citronensäure von Merck, Darmstadt, Deutschland
D(+)-Saccharose von Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diethylentriamin pentaessigsäure von Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diethylether von Sigma Aldrich Laborchemikalien, Steinheim, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat von Merck, Darmstadt, Deutschland
Dopamin (DA) von Sigma Aldrich Laborchemikalien, Steinheim, Deutschland
Eosin von Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure von Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol von Baker, Deventer, Niederlande
Foetal Bovine Serum (FCS) von Gibco, Auckland, Neuseeland
Glycerol von Merck, Darmstadt, Deutschland

Hämatoxylin von Sigma, Steinheim, Deutschland
Homovanillinsäure (HVA) von Sigma Aldrich Laborchemikalien, Steinheim, Deutschland
Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat von Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid von Merck, Darmstadt, Deutschland
Mäuseserum zentrifugiert in der Neurologischen Klinik und Poliklinik/Universität Würzburg
Methanol von Baker, Deventer, Niederlande
Mycobacterium tuberculosis H37 Ra von Difco Laboratories, Detroit, Mi, USA
Narcoren® (100 ml enthalten 16 g Pentobarbital Natrium und 3 g Benzylalkohol in wässriger Lösung) von Merial, Hallbergmoos, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) von Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat von Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumjodat von Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Natriummetabisulfit von Sigma Aldrich Laborchemikalien, Steinheim, Deutschland
Natronlauge von Merck, Darmstadt, Deutschland
Noradrenalin von Sigma Aldrich Laborchemikalien, Steinheim, Deutschland
Normal Goat Serum von Dako Cytomation D. A/S, Glostrup, Dänemark,
Paraformaldehyd (PFA) von Merck, Darmstadt
Phosphorsäure von Merck, Darmstadt, Deutschland
Physiologische Kochsalzlösung von Braun, Melsungen, Deutschland
Salzsäure von Merck, Darmstadt, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethane von Serva, Heidelberg, Deutschland
Triton® X-100 (Triton) von Fluka Chemie, Buchs, Schweiz
Vectastain®-ABC-Kit (Peroxidase Standard PK-4000) von Vector Laboratories, Burlingame, Ca, USA
Vitro-Clud® von Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Wasserstoffperoxid von Merck, Darmstadt, Deutschland
Xylol von Baker, Deventer, Niederlande

Tabelle 3: *Verwendete Reagenzien.*

2.9 Auswertung und Statistik

Für die statistischen Tests wurde das Softwareprogramm SPSS (Version 10.0) genutzt. Die Daten sind als Mittelwert ± Standardfehler angegeben. Um die Ergebnisse aus den Verhaltenstests zwischen den Gruppen und den unterschiedlichen Testzeitpunkten zu vergleichen, wurden für die parametrische Analyse sowohl eine Zwei-Wege ANOVA Varianzanalyse als auch ein Student-t-Test angewendet. Für die nicht-parametrische Analyse der Testung auf mechanische Allodynie wurde der Mann-whitney-U-Test zum Vergleich der beiden Gruppen benutzt. Die ANOVA und der Student-t-Test wurden auch für den Vergleich der HPLC-Daten und der immunhistochemischen Färbungen benutzt. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner als 5 % ($p<0,05$) wurde als statistisch signifikant angesehen.

3 Versuchsaufbau

Bei dem Versuch wurden 16 Tiere (siehe 2.1) entsprechend der beiden Genotypen 5-HTT +/+ und 5-HTT -/- in je zwei Gruppen zu 4 Tieren aufgeteilt. Alle Tiere wurden an zwei Tagen vorgetestet (siehe 2.3). An Tag 0 wurde morgens je eine Gruppe pro Genotyp mit CFA und die beiden anderen Gruppen mit NaCl 0,9 % als Kontrollgruppen behandelt (siehe 2.2.2). Nach vier Stunden wurden alle Tiere das erste Mal getestet und die Pfotendicke bestimmt (siehe 2.3). Weitere Testungen erfolgten alle 24 Stunden bis zum Tag 7 nach Injektion. Nach der Testung an Tag 7 erfolgte die Gewebeentnahme (siehe 2.4).

4 Ergebnisse

4.1 Pfotenschwellung

Entsprechend der durch die Injektion von CFA verursachten Entzündungsreaktion konnte bei beiden Genotypen im Vergleich zu den mit NaCl 0,9 % behandelten Kontrollgruppen sowie den kontralateralen Seiten (in der Abbildung 7 nicht dargestellt) eine signifikante Schwellung der Hinterpfoten beobachtet werden. Diese Schwellung hielt bei beiden Gruppen gleichermaßen bis zum Tag 6 an (Abbildung 7). Interessanterweise schwollen die Pfoten der KO-Mäuse schneller an (Maximum nach 4 h) als die Pfoten der WT-Mäuse (Maximum nach 24 h). Dies mag an den höheren extrazellulären Spiegeln von 5-HT in den KO-Mäusen liegen. Denn wie bereits beschrieben, unterhält Serotonin vor allem den Start der Entzündungsreaktion (siehe 1.2 und 1.4).

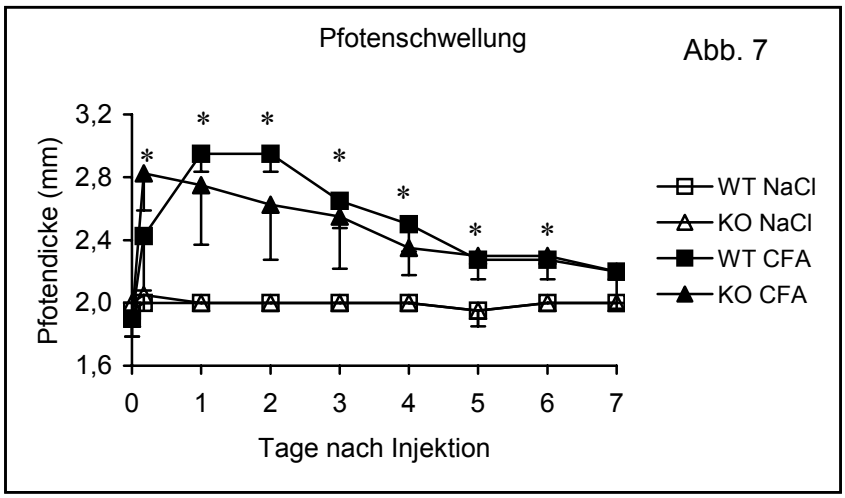


Abbildung 7: *Pfotendicke in mm von WT-Mäusen und KO-Mäusen (n = 4 pro Genotyp und Intervention) nach Injektion von CFA bzw. NaCl 0,9 % i.pl. an Tag 0, nur ipsilaterale Seiten. Ausgangswert (Zeitpunkt 0), nach 4 h an Tag 0, dann täglich bis Tag 7 nach Injektion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der jeweiligen Gruppen im Vergleich zu den Basiswerten der Kontrollgruppen (* = p<0,05). Bei beiden Genotypen war von 4 h bis Tag 6 eine signifikante Pfotenschwellung festzustellen.*

4.2 Hitzehyperalgesie

Beide Genotypen zeigten bereits vier Stunden nach Injektion von CFA auf der ipsilateralen Seite im Gegensatz zu den mit NaCl 0,9 % behandelten Kontrollgruppen sowie den kontralateralen Seiten (in der Abbildung 8 nicht dargestellt) eine signifikante Erniedrigung der Rückzugsschwelle auf den Hitzereiz. An Tag 1 erreichten die Wildtypen ihr Minimum und blieben bis zum Tag 5 signifikant hyperalgetisch, wohingegen die KO-Mäuse schon an Tag 1 mit den Rückzugslatenzen wieder anstiegen und an Tag 2 zu dem Ausgangswert zurückgekehrt waren (Abbildung 8).

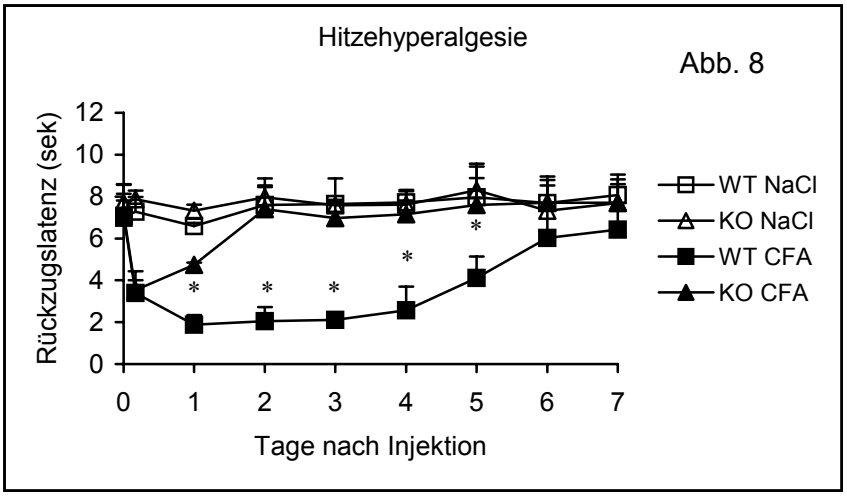
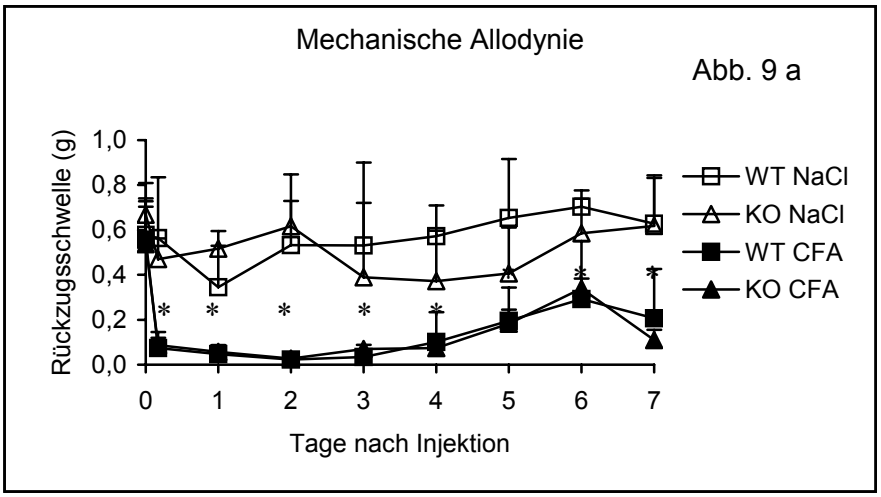
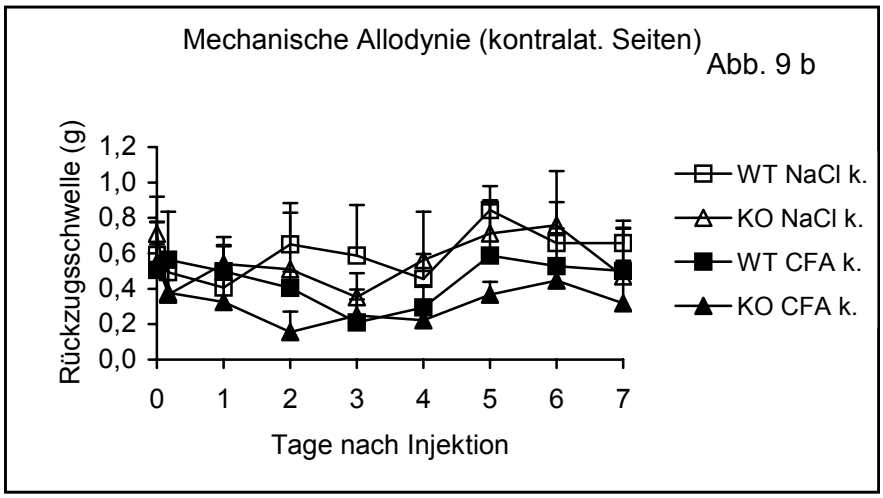


Abbildung 8: *Rückzugsschwelle in sek bei Testung der Hitzehyperalgesie an WT-Mäusen und KO-Mäusen (n = 4 pro Genotyp und Intervention) nach Injektion von CFA bzw. NaCl 0,9 % i.pl. an Tag 0, nur ipsilaterale Seiten. Ausgangswert (Zeitpunkt 0), nach 4 h an Tag 0, dann täglich bis Tag 7 nach Injektion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der jeweiligen Gruppen im Vergleich zu den Basiswerten der Kontrollgruppen (* = p<0,05). Die Rückzugslatenz war bei Wildtypen signifikant erniedrigt von 4 h bis 5 Tage nach Injektion, bei KO-Mäusen lediglich von 4 h bis Tag 1.*





Abbildungen 9 a+b: *50 %-ige Rückzugsschwelle in g bei Testung der mechanischen Allodynie an WT-Mäusen versus KO-Mäusen (n = 4 pro Genotyp und Intervention) nach Injektion von CFA bzw. NaCl 0,9 % i.pl. an Tag 0, ipsilaterale (Abb. 9 a) und kontralaterale (Abb. 9 b) Seiten. Ausgangswert (Zeitpunkt 0), nach 4 h an Tag 0, dann täglich bis Tag 7 nach Injektion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der jeweiligen Gruppen im Vergleich zu den Basiswerten der Kontrollgruppen (* = p<0,05). Die Rückzugsschwelle war bei beiden Genotypen über die gesamte Dauer des Versuches signifikant abgesenkt. Auf der kontralateralen Seite hingegen bestand nur ein Trend zur Absenkung der Rückzugsschwelle.*

4.3 Mechanische Allodynie

Über die gesamte Dauer des Versuches war bei beiden Genotypen auf der ipsilateralen Seite im Vergleich zu den mit NaCl 0,9 % behandelten Kontrollgruppen eine signifikante Absenkung der Rückzugschwelle auf mechanische Reize festzustellen (Abbildung 9 a). Die kontralateralen Seiten zeigten bei beiden Genotypen lediglich einen Trend zur Absenkung im Vergleich zu den Ausgangswerten (Abbildung 9 b).

4.4 Histologie

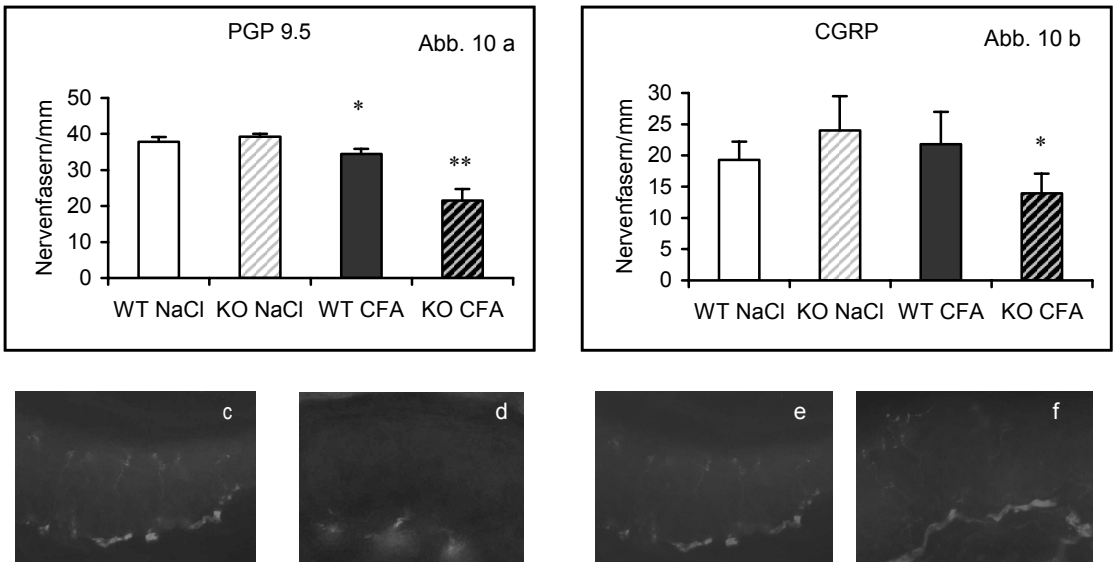
4.4.1 Immunhistochemische Färbungen von Footpads

4.4.1.1 Protein gene product 9.5 (PGP 9.5)

Nachdem im Test auf Hitzehyperalgesie ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Genotypen feststellbar war, sollte mittels verschiedener histologischer Untersuchungen herausgefunden werden, ob diese Unterschiede auch mit lokalen Veränderungen im Footpad einhergehen. HE-Färbungen und immunhistochemische Färbungen für Makrophagen (siehe 2.5) zeigten eine moderate Entzündungsreaktion in den Hautzellen der CFA-injizierten Mäusen ohne Unterschied den Genotyp betreffend (keine Abbildung).

Mittels der PGP 9.5-Färbung kann man die freien epidermalen Nervenendigungen (ENF) von Aδ- und C-Fasern darstellen (Wang et al. 1990). PGP 9.5 stellt dabei den bisher sensitivsten Marker für Nervenfasern dar (Dalsgaard et al. 1989). ENF gelten als besonders wichtig bei der Wahrnehmung von mechanischen, thermischen sowie schmerzhaften Reizen (Mac Iver und Tanelian 1993). Klinisch bedeutsam ist dieses Phänomen dadurch, dass sich einige Neuropathien durch eine selektive Abnahme an ENF auszeichnen (Levy et al. 1992, McCarthy et al. 1995, Wallengren et al. 2002).

In der vorliegenden Studie fiel auf, dass nach Injektion von CFA die Dichte von ENF in WT-Mäusen nur leicht abnahm ($p<0,05$), in KO-Mäusen hingegen eine deutliche Reduktion ($p<0,0005$) zu finden war (siehe Abbildungen 10a, c und d).



Abbildungen 10 a-f: *PGP 9.5 bzw. CGRP immunreaktive epidermale Nervenfasern pro mm in FP von WT-Mäusen und KO-Mäusen (n = 4 pro Genotyp und Intervention) nach Injektion von CFA bzw. NaCl 0,9 % i.pl., ipsilaterale Seiten, Gewebeentnahme an Tag 7 nach Injektion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (* = p<0.05 und ** = p<0,0005). Immunfluoreszenzfärbungen von FP reaktiv für PGP 9.5 (c und d), sowie für CGRP (e und f) in WT-Mäusen (c und e) und in KO-Mäusen (d und f) nach i.pl. CFA-Injektion. In KO-Mäusen finden sich nach Injektion von CFA signifikant weniger PGP 9.5 und CGRP positive epidermale Nervenfasern. Bei Wildtypen findet sich ein Unterschied nur bei der PGP 9.5 Färbung.*

4.4.1.2 Calcitonin gene related peptide (CGRP)

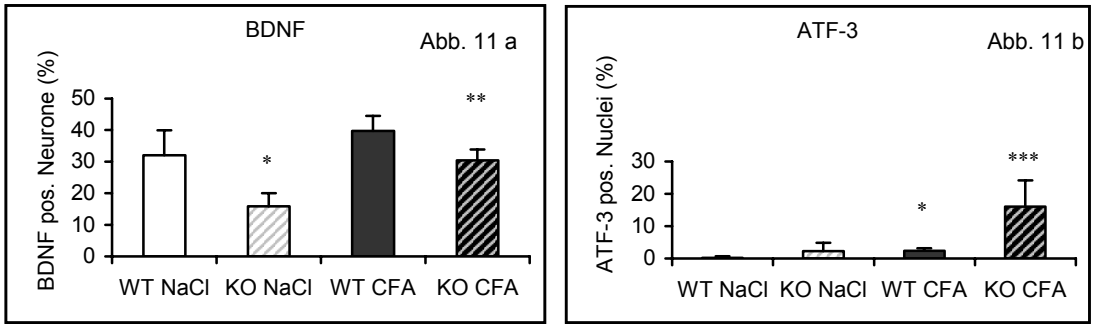
Mittels der CGRP immunreaktiven Färbung konnte der Unterschied in den ENF weiter eingeordnet werden. CGRP ist hauptsächlich in den kleinen und mittelgroßen sensorischen Neuronen vorhanden (Gibbins et al. 1985, Mc-Carthy and Lawson, 1990) und wird von Kilo et al. (1997) als wichtiger die

Entzündung unterstützender und schmerzfördenderer Mediator beschrieben. Es stellte sich heraus, dass diese Subgruppe von peptidergen sensorischen Neuronen in KO-Mäusen nach CFA Injektion im Vergleich zu den mit NaCl 0,9 % behandelten Kontrollgruppen deutlich reduziert war ($p<0,05$), wohingegen in Wildtypen kein Unterschied gefunden werden konnte (siehe Abbildungen 10b, e und f).

4.4.2 Immunhistochemische Färbungen von Spinalganglien

4.4.2.1 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

BDNF ist ein Überlebensfaktor für serotonerge Neurone und moduliert die 5-HTT Funktion (Mössner et al. 2000). BDNF wird außerdem als Neurotransmitter angesehen, dem bei der Vermittlung von inflammatorischem Schmerz große Bedeutung zugemessen wird (Pezet et al. 2002). BDNF wird hauptsächlich in den kleinen bis mittelgroßen Neuronen gefunden, die zusätzlich CGRP enthalten (Luo et al. 2001).

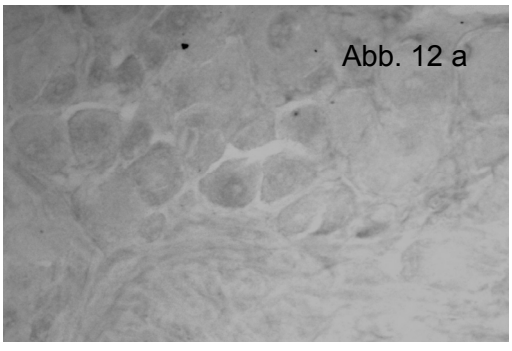


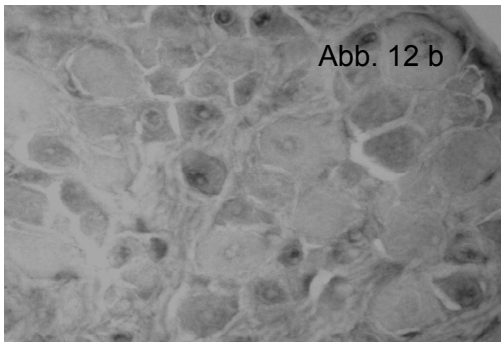
Abbildungen 11 a+b: *BDNF und ATF-3 immunreaktive Neurone/Nuclei in % aller gezählten Neurone/Neuronenkerne in DRG von WT-Mäusen und KO-Mäusen (n = 4 pro Genotyp und Intervention) nach Injektion von CFA bzw. NaCl 0,9 % i.pl., ipsilaterale Seiten, Gewebeentnahme an Tag 7 nach Injektion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (* = $p<0.05$ versus WT NaCl, ** = $p<0,005$ versus KO NaCl und *** = $p<0.01$ versus KO NaCl). In KO-Mäusen finden sich generell weniger BDNF positive Neurone, nach CFA Injektion steigt ihre Anzahl jedoch signifikant an. In KO-Mäusen finden sich nach CFA Injektion signifikant mehr ATF-3 positive Nuclei.*

Nach Injektion von CFA konnte in verschiedenen Studien ein Anstieg an BDNF in sensiblen Neuronen verzeichnet werden (Cho et al 1997, Obata et al. 2003). In den vorliegenden Untersuchungen änderte sich nach der Injektion von CFA hingegen die Anzahl an BDNF positiven Neuronen nur in KO-Mäusen eindeutig. Sie nahm gegenüber den mit NaCl 0,9 % behandelten Kontrollgruppen signifikant zu ($p<0,005$). Bei WT-Mäusen war lediglich ein Trend zum Anstieg nach CFA festzustellen (Abb. 11 a). Beim Vergleich der Kontrollgruppen fiel jedoch auf, dass sich bei KO-Mäusen von vorne herein signifikant weniger BDNF immunreaktive Neurone anfärben ließen als bei Wildtypen ($p<0,05$).

4.4.2.2 Activating transcription factor 3 (ATF-3)

ATF-3 gehört zu der Familie der ATF-3/CREB Transkriptionsfaktoren. Tsujino et al. (2000) konnten mittels der ATF-3-Antikörper Färbung verletzte Neurone detektieren. Wir konnten sowohl bei WT- als auch bei KO-Mäusen eine signifikant erhöhte Anzahl an ATF-3 positiven Neuronen in DRG nach CFA-Injektion feststellen ($p<0,05$). Besonders deutlich war der Unterschied wie schon bei der Untersuchung der ENF bei den KO-Mäusen, was auf eine erhöhte Verletzbarkeit von Neuronen in diesen Tieren hindeuten kann ($p<0,01$). Nach Injektion von NaCl 0,9 % war die Anzahl geschädigter Neurone, wie zu erwarten, sehr gering (Abbildungen 11 b, 12 a+b).

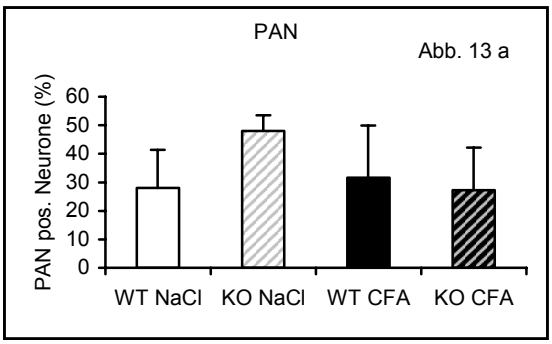


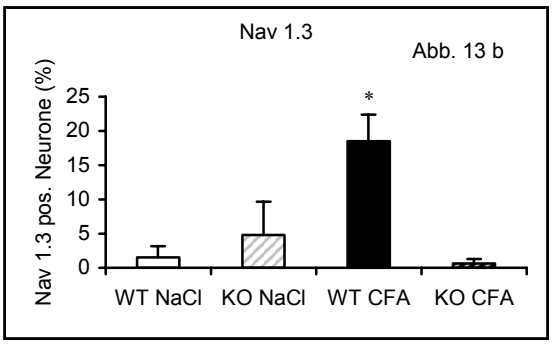


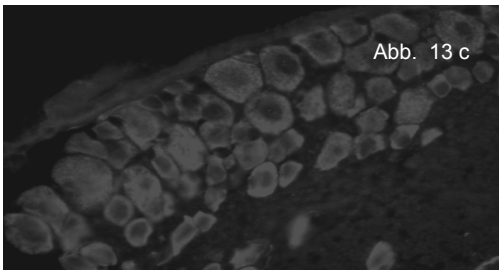
Abbildungen 12 a+b: *Färbungen von DRG reaktiv für ATF-3 in WT- (12 a) und in KO-Mäusen (12 b) nach i.pl. CFA-Injektion. In KO-Mäusen finden sich signifikant mehr ATF-3 positive Kerne als in WT-Mäusen (siehe auch Abb.11 b).*

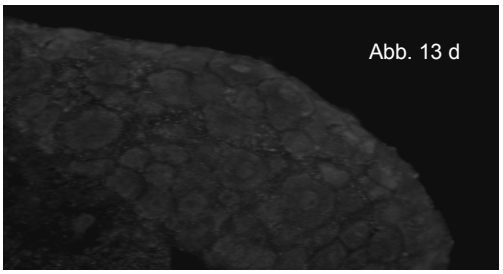
4.4.2.3 Spannungsabhängige Natriumkanäle: PAN und Na_v 1.3

Periphere Entzündungsreaktionen im Nerven induzieren Veränderungen in der Expression und der Funktion von spannungsabhängigen Natriumkanälen in den dazugehörigen DRG. 5-HT hat zusätzlich direkte Interaktionsmöglichkeiten an diesen Kanälen (Lai et al. 2004). Waxman et al. (2000) postulieren, dass nahezu die gesamte Breite neuropathischer Schmerzen mit einer Hoch- oder Runterregulierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen einhergeht und hier ein Angriffspunkt mit großem Potential für eine effektivere Therapie dieser Schmerzen gegeben ist.









Abbildungen 13 a-d: *PAN und Na_v 1.3 immunreaktive Neurone in % aller gezählten Neuronen in DRG von WT-Mäusen und KO-Mäusen (n = 4 pro Genotyp und Intervention) nach Injektion von CFA bzw. NaCl 0,9 % i.pl., ipsilaterale Seiten, Gewebeentnahme an Tag 7 nach Injektion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (* = p<0.0005). Immun-fluoreszenzfärbungen von DRG reaktiv für Na_v 1.3 in WT- (13 c) und KO-Mäusen (13 d) nach i.pl. CFA-Injektion. In Wildtypen sind nach CFA Injektion die Na_v 1.3 positiven Neurone signifikant vermehrt vorhanden. Bei der PAN-Färbung findet sich kein Unterschied zwischen den Gruppen.*

Um herauszufinden inwieweit diese Veränderungen bzw. die unterschiedlichen Gewebespiegel an 5-HT auch in unserem Modell Einfluss nehmen, untersuchten wir die Natriumkanäle der DRG mittels einer Färbung mit Antikörpern gegen alle spannungsabhängigen Natriumkanäle (PAN) und gegen Na_v 1.3. PAN-Antikörper binden spezifisch an die α-Untereinheit aller spannungs-abhängigen Natriumkanäle (Noda et al. 1986). Mit Antikörpern gegen Na_v 1.3 kann der Subtyp Na_v 1.3 identifiziert werden. Er ist nach Nervenverletzung und bei Entzündungsreaktionen vermehrt exprimiert (Black et al. 1999).

Vor der Injektion von CFA zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen. Auch nach dem Setzen einer Entzündungsreaktion durch CFA waren in der PAN-Färbung keine Unterschiede feststellbar. In der Na_v 1.3-Färbung jedoch waren bei Wildtypen die Na_v 1.3 immunreaktiven Neurone signifikant vermehrt detektierbar (Abbildungen 13 a-d).

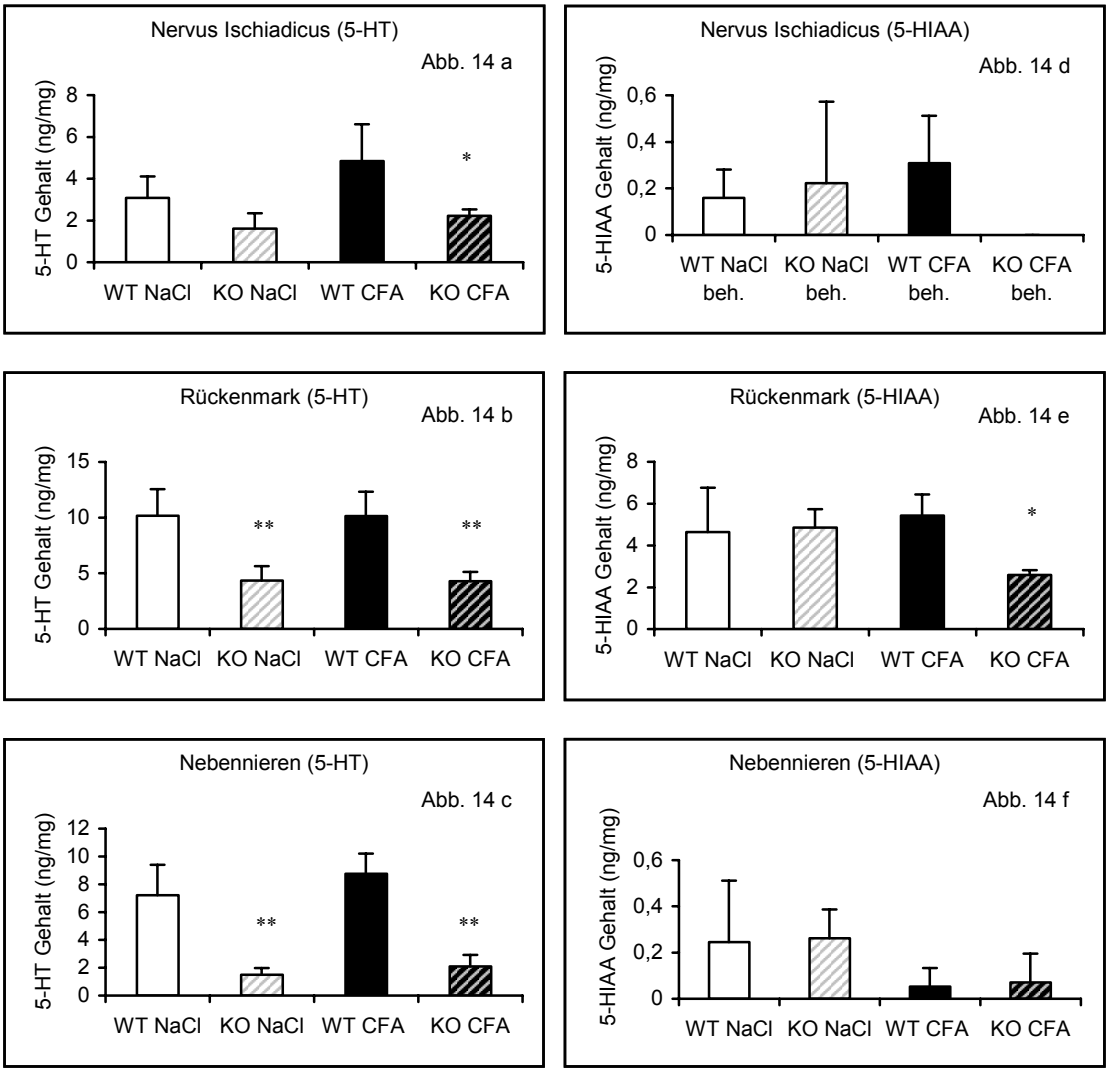
4.5 High Performance Liquid Chromatography

4.5.1 5-HT Gehalt

Innerhalb der beiden Genotypen fand sich kein Unterschied im 5-HT Gehalt zwischen der CFA-behandelten und der NaCl-behandelten Gruppe. Weiterhin bestanden in den Gewebeproben von Nebennieren und Nervus Ischiadicus keine Unterschiede zwischen behandelter und unbehandelter Seite. Bei KO-Mäusen ließ sich im Vergleich zu WT-Mäusen in den verschiedenen Geweben ein durchgehend niedrigerer Gehalt an 5-HT messen. Das deckt sich mit den Ergebnissen von Fabre et al. (2000), die beschreiben, dass KO-Mäuse extrazellulär im ZNS zwar eine erhöhte Menge an 5-HT besitzen, der Gesamtgehalt an 5-HT im Gehirn jedoch vermindert ist.

Signifikante Unterschiede bestanden in allen drei untersuchten Geweben; im N. ischiadicus jedoch signifikant nur nach CFA Injektion ($p<0,05$), im RM und den

Nebennieren sowohl nach CFA als auch nach NaCl 0,9 % Injektionen (p<0,001). (Abbildungen 14 a-c)



Abbildungen 14 a-f: *5-HT/5-HIAA Gehalt (ng/mg Gewebsprotein) im N. ischiadicus, RM und Nebennieren von WT-Mäusen und KO-Mäusen (n = 4 pro Genotyp und Intervention) nach Injektion von CFA bzw. NaCl 0,9 % i.pl., ipsilaterale Seiten (Nebenniere: linke und rechte Seite gemittelt), Gewebeentnahme an Tag 7 nach Injektion. Die dargestellten Werte sind Mittelwerte der jeweiligen Gruppen (* = p<0.05 und ** = p<0.001). In KO-Mäusen findet sich sowohl nach NaCl 0,9 % als auch nach CFA Injektion signifikant weniger 5-HT als bei WT-Mäusen. In KO-Mäusen war nach CFA Injektion im N. ischiadicus keine 5-HIAA nachweisbar, im RM findet sich signifikant weniger 5-HIAA als bei Wildtypen.*

4.5.2 5-HIAA Gehalt

5-HIAA war in den mit NaCl 0,9 % behandelten Kontrollgruppen unabhängig vom Genotyp ohne signifikante Unterschiede in allen untersuchten Gewebeproben gleichwertig vorhanden. Dies weist daraufhin, dass sich der Serotoninstoffwechsel in KO-Mäusen trotz des Gendefektes für 5-HTT in einem Gleichgewicht befindet.. Nach CFA Injektion hingegen war im RM der KO-Mäuse gegenüber den WT-Mäusen signifikant weniger 5-HIAA vorhanden ($p<0,05$) und im N. ischiadicus sogar gar nicht nachweisbar. Konträr dazu bestand bei den Wildtypen ein Trend zum Anstieg von 5-HIAA nach CFA Injektion (siehe Abbildungen 14 d+e). Interessanterweise bestand bezüglich des N. ischiadicus hierbei kein Unterschied zwischen behandelter und unbehandelter Seite (Daten nicht dargestellt). Die Untersuchung der Nebennieren erbrachte nach CFA Injektion keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen. Am ehesten war auch hier bei den KO-Mäusen ein Trend zur Reduktion zu erkennen (Abbildung 14 f).

5. Diskussion

5.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass 5-HTT-KO-Mäuse gegenüber Wildtypen nach CFA-induzierter Pfotenentzündung bei identisch ausgeprägter Pfotenschwellung eine reduzierte Hitzehyperalgesie, jedoch eine gleich stark ausgeprägte Allodynie auf mechanische Reize zeigen. Dies geht mit reduzierten Gewebespiegeln (N. ischiadicus, Nebennieren und RM) an 5-HT und 5-HIAA in KO-Mäusen einher.

Die beobachtete reduzierte Hitzehyperalgesie bei KO-Mäusen ist von einer deutlicheren Abnahme der Hautinnervation sowie einer Verletzung von Neuronen in den DRG begleitet, ausweislich der Kern-Anfärbung für ATF-3. Weiterhin ist in den DRG der KO-Mäuse entsprechend den niedrigeren

Gewebespiegeln an 5-HT auch weniger BDNF detektierbar, die erwartete Hochregulierung des spannungsabhängigen Natriumkanals Na_v 1.3 unterbleibt bei diesen Mäusen.

Bei der Bewertung der vorliegenden Daten ist insgesamt zu berücksichtigen, dass nur eine einmalige Gewebeentnahme an Tag 7 erfolgte, als zwar die mechanische Allodynie noch bestand, aber bezüglich der Hitzehyperalgesie die Tiere bereits zu den Ausgangswerten zurückgekehrt waren.
Unter anderem veranlasste dies unsere Arbeitsgruppe dazu, ergänzende, teils weiterführende Versuchsreihen durchzuführen, deren Ergebnisse jedoch erst nach der weitgehenden Fertigstellung meiner Dissertation vorlagen und daher hier nur ergänzend erwähnt werden können.

5.2 Unterschiede zwischen dem Genotyp 5-HTT -/- und einer tatsächlichen Behandlung mit SSRI

5-HT ist als Entzündungsmediator in der Peripherie allgemein akzeptiert (Sommer 2006), wie SSRI eine durch 5-HT induzierte Entzündung jedoch beeinflussen können, wird kontrovers diskutiert. Die Verabreichung von SSRI in einem Entzündungsmodell mit Carrageenan (Abdel-Salam et al. 2004) reduzierte die Entzündung, hingegen wurde diese bei einer artifiziell induzierten Arthritis durch die Gabe von SSRI noch verstärkt (Harbuz et al. 1998).
Die für die vorliegende Studie verwendeten 5-HTT -/- Mäuse wurden mit ihrer genetischen Defizienz für den 5-HTT bisher immer als Modell einer lebenslangen Behandlung mit SSRI betrachtet. Wir konnten jedoch nach CFA induzierter Entzündung keinen Unterschied in der Pfotenschwellung als Zeichen einer unterschiedlichen Entzündungsreaktion in den beiden Genotypen feststellen. Dies bedeutet, dass trotz einer „lebenslangen Behandlung mit SSRI“ eine gleich starke Entzündungsreaktion bei den KO-Mäusen festzustellen war. Dies mag an dem von uns benutzten Modell mit CFA versus Carrageenan liegen oder daran, dass sicherlich viele Unterschiede zwischen einer

genetischen Defizienz für den 5-HT Transporter bei KO-Mäusen und einer tatsächlichen Behandlung mit SSRI von Wildtypen bestehen. Auch Langzeiteffekte, wie die bekannte Reduktion von intrazellulärem 5-HT bei KO-Mäusen (Bengel et al. 1998) sind hierbei zu berücksichtigen.

5.3 Genotyp 5-HTT -/- hat keine Auswirkungen auf eine mechanische Allodynie

Wie schon in der vorhergehenden Studie unserer Arbeitsgruppe mit einer experimentellen Mononeuropathie (siehe 1.6) konnten wir auch in diesem chronisch entzündlichen Schmerzmodell keine unterschiedliche Schmerzschwelle bezüglich der mechanischen Allodynie in den beiden Genotypen feststellen.
Im Gegensatz zur Hitzehyperalgesie geht man davon aus, dass die mechanische Allodynie über Adelta Fasern vermittelt wird und es zu Veränderungen in der spinalen Verschaltung kommt (Field et al. 1999). Es scheint daher, dass die Defizienz des 5-HTT kaum Einfluss auf die zentrale Schmerzverarbeitung nimmt, sondern hauptsächlich in die periphere Entstehung des Schmerzes involviert ist.

5.4 CFA reduziert die Anzahl epidermaler Nervenfasern und aktiviert ATF-3 in Spinalganglienneuronen

Obwohl die i.pl. Injektion von CFA lediglich als Modell für eine chronische Entzündung gilt, wurde die nervenzerstörende Wirkung von CFA immer wieder diskutiert (Kato et al. 2003). Zudem wurde in verschiedenen Studien mit neuropathischen Schmerzmodellen gezeigt, dass die epidermale Innervation nach Läsion abnimmt. Beim Menschen ist das Krankheitsbild der „Small fiber“ Neuropathie bekannt, bei dem ebenfalls eine Abnahme der Hautinnervation meist mit brennenden Schmerzen in den Füßen einhergeht. Aus diesem Grunde untersuchten wir sowohl die Anzahl der ENF in FP bezüglich einer

möglichen Reduzierung bzw. Zerstörung durch CFA, als auch die DRG mittels einer ATF-3-Färbung auf geschädigte Neurone hin.

Im Gegensatz zur deutlichen Reduktion von ENF und ATF-3-positiven DRG in KO-Mäusen war bei Wildtypen nur eine geringe Reduktion feststellbar. Eine generelle nervenzerstörende Wirkung von CFA kann daher nicht bestätigt werden. Jedoch scheint der Genotyp 5-HTT -/- eine besondere neuronale Vulnerabilität aufzuweisen. CFA zerstört hier nicht nur periphere ENF, es kommt außerdem zu einer toxischen Wirkung auf die neuronalen Somata in den DRG.

Zusätzlich ist bei den KO-Mäusen auch die Subpopulation der CGRP positiven Nervenfasern - oder auch nur CGRP selbst, bei erhaltenen Fasern – von einer Reduzierung betroffen. CGRP, das als wichtiges Neuropeptid in der Vermittlung einer Hitzehyperalgesie gilt (Oprée und Kress 2000 und Obreja et al. 2001), ist demnach bei KO-Mäusen nicht in gleichem Maße vorhanden wie in Wildtypen.

Man könnte spekulieren, dass schon allein der von uns beobachtete stärkere Verlust der Hautinnervation nach CFA bei KO-Mäusen eine direkt korrelierende Ursache für die verminderte Hitzehyperalgesie bei diesen Mäusen darstellt. In verschiedenen Studien konnte jedoch keine enge Korrelation zwischen dem Grad der Schmerzhaftigkeit und dem Verlust der Hautinnervation gefunden werden (Lindenlaub et al. 2000, Verdu und Navarro 1997, Nolano et al. 1999, Wallengren et al. 1995 und Shinoda et al. 2003). Es scheint daher unwahrscheinlich, dass bei einer nach wie vor vorhandenen großen Anzahl an ENF dies der alleinige Grund für die verminderte Hitzehyperalgesie ist.
Warum die KO-Mäuse eine erhöhte neuronale Vulnerabilität aufweisen, bleibt ungeklärt. Ein Grund könnte das geringere Vorhandensein des neurotrophen Faktor BDNF in diesen Mäusen sein (siehe 5.5).

5.5 Gegenseitige Regulation von 5-HT und BDNF

Zetterstrom et al. (1999) postulieren, dass man bei niedrigen Gewebespiegeln von 5-HT auch weniger BDNF findet. Dies können wir mit unseren Ergebnissen bestätigen (siehe 4.4.2.1), denn in den unbehandelten Kontrollgruppen der KO-Mäuse, in deren Gewebe sich weniger 5-HT als bei Wildtyp-Kontrollen nachweisen lässt, findet sich auch signifikant weniger BDNF.

Die direkte Beeinflussung der BDNF Expression durch das serotonerge System konnte von Galter und Unsicker (2000) nachgewiesen werden, sie zeigten dass 5-HT über den 5-HT_{1A}-Rezeptor die BDNF-Expression stimuliert. Umgekehrt hat BDNF als neurotropher Faktor auch Einfluss auf das serotonerge System (Mössner et al. 2000). Mamounas et al. (1995 und 2000) zeigten, dass die lokale Applikation von BDNF das Aussprießen von unverletzten serotonergen Axonen fördert, sowie zur Regeneration von geschädigten Neuronen führt.
Es ist demnach gut vorstellbar, dass der Mangel an dem neurotrophen Faktor BDNF die in 5.2 beschriebene erhöhte neuronale Vulnerabilität bei KO-Mäusen zu Folge hat.

Auch auf die Erregbarkeit sensibler Neurone übt BDNF Einfluss. Pezet et al. (2002) fanden heraus, dass diese durch BDNF verstärkt wird. Auf unsere Untersuchungen angewendet, bedeutet dies im Umkehrschluss, dass bei niedrigen Gewebespiegeln an Serotonin weniger BDNF exprimiert wird, weniger BDNF jedoch zur verminderten Erregbarkeit von sensiblen Neuronen und damit zur reduzierten Hitzehyperalgesie von KO-Mäusen führen kann.

Der geringere Gewebespiegel von 5-HT im peripheren Nervengewebe (N. ischiadicus) von KO-Mäusen scheint an der Spitze einer Ursachen-Wirkungskette zu stehen. In ergänzenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte durch die i.pl. Injektion von 5-HT nach CFA-induzierter Entzündung die Schwelle der Hitzehyperalgesie von KO-Mäusen auf das Level der Wildtypen abgesenkt werden und somit die genetische Defizienz für den 5-

HTT in diesen Mäusen kupiert werden. Diese Ergebnisse stützen die weithin anerkannte Rolle von 5-HT als Schmerzmediator im peripheren Nervensystem (Sommer 2004).

Die von uns festgestellten erniedrigten spinalen Gewebespiegel von 5-HT bei gleichzeitig fehlender Hitzehyperalgesie in KO-Mäusen sind schwieriger zu interpretieren. Bislang wurde vermutet, dass 5-HT auf zentraler Ebene hauptsächlich analgetische Effekte hat (Suzuki et al. 2004, siehe auch 1.4), vor kurzem konnte jedoch gezeigt werden, dass eine Verminderung des spinalen 5-HT Spiegels in einem Model einer Nervenverletzung zu einer Abschwächung der Hypersensitivität führt (Rahman et al. 2006). Deswegen könnte nicht nur das peripher, sondern auch das spinal erniedrigte 5-HT zu der beobachteten verminderten Hitzehyperalgesie in KO-Mäusen führen.

5.6 BDNF reguliert spannungsabhängige Natriumkanäle

Spannungsabhängige Natriumkanäle spielen eine zentrale Rolle in der neuronalen Erregbarkeit. Der Subtyp Na_v 1.3 ist nach Nervenverletzung und Entzündung hochreguliert (Black et al. 1999), was unsere vorliegenden Ergebnissen bei Wildtypen ebenfalls bestätigen (Abb. 13 b). Bei KO-Mäusen kommt es jedoch nicht zu der erwarteten Hochregulierung. Sollte dieser Kanal speziell in die Vermittlung einer Hitzehyperalgesie involviert sein, wäre hier ein weiterer Grund für die reduzierte Hitzehyperalgesie bei KO-Mäusen zu finden.

Auch dieses Beobachtung lässt sich wiederum in eine Ursachen-Wirkungskette mit den geringeren Gewebespiegeln von 5-HT und BDNF bei KO-Mäusen bringen (siehe 5.5). Denn für BDNF selbst wurde zwar ein Einfluß auf den Kanal Na_v 1.3 noch nicht untersucht, jedoch haben andere Neurotrophine wie der Nerv Growth Factor und der Glial Cell Derived Neurotrophic Factor nachgewiesen Einfluss auf diesen Kanal (Leffler et al. 2002). Außerdem konnte in vitro nachgewiesen werden, dass BDNF zu einem vermehrten

Natriumzellstrom in PC12 Zellen führt (Fanger et al. 1995) sowie eine ligandenvermittelte Wirkung am Kanal Na_v 1.9 hat (Blum et al. 2002).

5.7 5-HIAA als möglicher eigener intrinsischer Faktor

Zuletzt sei noch auf die mögliche Rolle von 5-HIAA hingewiesen. Sie ist der Hauptmetabolit von 5-HT und wird als inerte Substanz betrachtet. Ihr Nachweis im Liquor gilt als Indikator für die Aktivität serotonerger Neurone (Helander und Some 2000). Aufgrund der signifikant niedrigeren Gewebespiegel an 5-HIAA in KO-Mäusen äußerten wir den Verdacht, dass bei gleichzeitig fehlender Hitzehyperalgesie diese ebenfalls eine eigene bis dato noch nicht beschriebene intrinsische Aktivität haben könnte.
Tatsächlich konnte in weiterführenden Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe für 5-HIAA eine eigene intrinsische Aktivität nachgewiesen werden, denn durch die i.pl. Injektion von 5-HIAA nach CFA-induzierter Entzündung konnte die Schwelle für die Hitzehyperalgesie bei KO-Mäusen signifikant erniedrigt werden.

6. Zusammenfassung

In der Behandlung neuropathischer und anderer chronischer Schmerzen werden trizyklische Antidepressiva bereits mit Erfolg eingesetzt, die nebenwirkungsärmeren SSRI zeigen jedoch nur einen mäßigen Erfolg.

In dieser Studie gingen wir der Frage nach, inwieweit 5-HTT -/- Mäuse, die als Modell einer lebenslangen Behandlung mit SSRI gelten, in einem chronisch entzündlichen Schmerzmodell ein anderes Schmerzverhalten zeigen als Wildtypen und ob sich auf neuronaler Ebene durch das Ausschalten des 5-HT Transporters Ursachen für ein geändertes Schmerzverhalten finden lassen. Von besonderem Interesse war dabei auch, welche Rolle 5-HT in der peripheren Schmerzvermittlung zukommt.

Mit standardisierten Testverfahren wurden die 5-HTT -/- Mäuse und Wildtypmäuse nach i.pl. Injektion von CFA auf zwei Schmerzqualitäten hin untersucht. Die Schmerzschwelle für taktile Reize wurde mit von Frey Haaren bestimmt, zur Testung der Hitzehyperalgesie wurde eine Infrarotwärmequelle benutzt. Anschließend wurden an dem Gewebe immunhistochemische Analysen durchgeführt und mittels HPLC der Gehalt an 5-HT in verschiedenen Gewebeproben bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit dem Genotyp 5-HTT -/- gegenüber dem Wildtyp von einer durch CFA-Injektion induzierten Hitzehyperalgesie weitgehend unbeeinträchtigt bleiben. Gleichzeitig bestand bei den KO-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypen eine deutlichere Abnahme der Hautinnervation sowie eine stärker ausgeprägte Verletzung von DRG-Neuronen, entsprechend einer erhöhten neuronalen Vulnerabilität gegenüber CFA. Im Gewebe der KO-Mäuse fand sich durchweg weniger 5-HT als bei Wildtypen, in DRG-Neuronen der KO-Mäuse war weiterhin weniger BDNF detektierbar.

Wir postulieren, dass für die reduzierte Hitzehyperalgesie bei den KO-Mäusen unter anderem der geringere Gewebespiegel von 5-HT und damit folglich in einer Art Ursachen-Wirkungskette auch die geringeren Gewebespiegel von BDNF und 5-HIAA mit ihren entsprechenden Auswirkungen verantwortlich sind.

5-HTT -/- Mäuse als Modell für eine lebenslange Behandlung mit SSRI sind also nicht nur wie kürzlich beschrieben im neuropathischen Schmerzmodell, sondern auch in einem chronisch entzündlichen Schmerzmodell weitgehend vor einer Hitzehyperalgesie geschützt. Unter der Berücksichtigung dieser Daten sollte daher der Einsatz von SSRI in der Behandlung chronischer Schmerzen erneut überprüft werden.

7. Literaturverzeichnis

Abdel-Salam O.M., Baiuomy A.R., Arbid M.S. (2004) *Studies on the anti-inflammatory effect of fluoxetine in the rat.* Pharmacol. Res. 49:119-131.

Ali Z., Ringkamp M., Hatke T., Chien H., Flavahan N., Campbell J.,Meyer R. (1999) Uninjured C-fiber nociceptors develop spontaneous activity and a-adrenergic sensitivity follwing L6 spinal nerve ligation in monkey. J. Neurophysiol. 81: 455–466.

Ansari A. (2000) *The efficacy of newer antidepressants in the treatment of chronic pain: a review of current literature.* Harv. Rev. Psychiatry 7:257-277.

Bardin L., Schmidt J., Alloui A., Eschalier A. (2000) *Effect of intrathecal administration of serotin in chronci pain models in rats.* EJP 409: 37-43.

Bengel D., Murphy D. L., Andrews A. M., Wichems C. H., Feltner D., Heils A. , Mössner R., Westphal H., Lesch K. P. (1998) *Altered brain serotonin homeostasis and locomotor insensitivity to 3,4-methylenedioxy-methamphetamine ("Ecstasy") in serotonin transporter deficient mice.* Mol Pharmacol 53: 649-655.

Bennett G.J. und Xie Y.K. *a peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain snesation like those seen in man.* Pain 53: 649-655.

Benninghoff A., Drenckhahn D. (2004) *Anatomie.* Band 2

Black J.A., Cummins T.R., Plumpton C., Chen Y.H., Hormuzidar W., Clare J.J., Waxman S.G. (1999) *Upregulation of a silent sodium channel after peripheral, but not central nerve injury in DRG neurons.* J Neurophysiol 82: 2776-2785.

Blakely R.D., De Felice L.J., Hartzell H.C. (1994) *Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters.* J. Exp. Biol. 196: 263-281.

Blum R., Kafitz K.W., Konnerth A. (2002) *Neurotrophin-evoked depolarization requires the sodium channel $Na_V1.9$.* Nature 419: 687-693.

Brunnhuber S., Frauenknecht S., Lieb K. 2005 *Intensivkurs Psychiatrie und Psychotherapie.* 53-54.

Butler S.H., Godefroy F., Besson J.M., Weil-Fugazza J .(1992) *A limited arthritic model for chronic pain studies in the rat.* Pain 48: 73–81.

Capasso F, Dunn C.J., Yamamoto S., Willoughby D.S.A., Giroud J.P. *Further studies on carageenin induced pleurisy in rats.* J of Pathology 116: 117-124.

Chaplan S. R., Bach F. W., Pogrel J. W., Chung F. M., Yaksh T. L. (1994) *Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw.* J Neurosci Methods, 53: 55-63.

Cho H.J., Kim J.K., Park H.C., Kim J.K., Kim D.S., Ha S.O., Hong H.S. (1997) *Rush, Increased brain-derived neurotrophic factor immunreactivity in rat dorsal root ganglia and spinal cord following peripheral inflammation.* Brain Res. 749: 358-362.

Cummins T.R. und Waxman S.G. (1997) *Downregulation of tetrodotoxin-resistant sodium currents and upregulation of a rapidly repriming tetrodotoxin-sensitive sodium current in small spinal sensory neurons after nerve injury.* J Neurosci. 1997 17(10): 3503-14.

Dalsgaard C.J., Rydh M., Haegerstrand A. (1989) *Cutaneous innervation in man visualized with protein gene product 9.5 (PGP-9.5) antibodies.* Histochemistry 92: 385–90.

Davis K.D., Meyer R.A., Campbell J.N. *Chemosensitivity and sensitization of nociceptive afferents that innervate the hairy skin of monkey.* J Neurophysiol 696:1071-1081.

Dixon W. J. (1965) *The Up-and-down method for small samples.* J Am Statist Assoc, 60: 967-978.

Dray A. (1995) *Inflammatory mediators of pain.* Br J Anaesth 75: 125-131.

Durham P.L. und Russo A.F (1999) *Regulation of Calcitonin Gene-Related Peptide Secretion by a Serotonergic Antimigraine Drug*. J Neurosc *19*(9): 3423–3429.

Eide P.K. und Hole K. (1993) *The role of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes and plasticity in the 5-HT systems in the regulation of nociceptive sensivity.* Cephalalgia, 13: 75-85.

Eschalier A., Mestre C., Dubrya C., Ardid D. (1994) *Why are antidepressents effective as pain relief?* CNS Drugs 2: 261-267.

Fanger G.R., Jones J.R., Maue R.A. (1995) *Differential regulation of neuronal sodium channel expression by endogenous and exogenous tyrosine kinase receptors expressed in rat pheochromocytoma cells.* J. Neurosci 15: 202-213.

Field M.J., Bramwell S., Hughes J., Singh L. (1999) *Detection of static and dynamic components of mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain: are they signalled by distinct primary sensory neurones?* Pain 83: 303-311.

Fozard J.R. (1984) *Neuronal 5-HT receptors in the periphery.* Neurophamacology 23: 1473-1486.

Forth W., Henschler D., Rummel W. (2001) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* 8. Auflage, Urban & Fischer Verlag.

Freynhagen R. und Baron R. (2003) *Kompendium Neuropathischer Schmerz.* 8-70.

Galter D. und Unsicker K. (2000) *Brain-derived neurotrophic factor and trkB are essential for cAMP-mediated induction of the serotonergic neuronal phenotype. J Neurosci Res* 61: 295-301.

Gerner P, Mujtaba M., Sinnott C.J., Wang G.K. (2001) *Amitryptyline versus bupivacaine in rat sciatic nerve blockade.* Anesthesiology 94: 661-667.

Gibbins I.L., Furness J.B., Costa M., MacIntyre I., Hillyard C.J., Girgis S. (1985) *Co-localization of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity with substance P in cutaneous, vascular and visceral sensory neurons of guinea pigs.* Neurosci. Lett. 57: 125-130.

Harbuz M.S., Marti O., Lightman S.L., Jessop D.S. (1998) *Alteration of central serotonin modifies onset and severity of adjuvant-induced arthritis in the rat.* Br.J. Rheumatol. 37: 1077-1083.

Hargreaves K., Dubner R., Brown F., Flores C., Joris J. (1988) *A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia.* Pain, 32: 77-88.

Hoyer D., Clarke D.E., Fozard J.R., Hartig P.R., Martin G.R., Mylechrane E.J., Saxena P.R., Humphrey P.P. (1994) *International union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin).* Pharmacol Rev. 46 (2): 157-203.

Kato N., Nemoto K., Arino H., Fujikawa K. (2003) *Influence of peripheral inflammation on growth-associated phosphoprotein(GAP-43) expression in dorsal root ganglia and on nerve recovery after crush injury.* Neurosci Res 45: 297-303.

Kilo S., Harding-Rose C., Hargreaves K.M., Flores C.M. (1997) *Peripheral CGRP release as a marker for neurogenic inflammation: a model system for the study of neuropeptide secretion in rat paw skin* Pain 73: 201–207.

Kreutzig T. (2006) *Kurzlehrbuch Biochemie.*

Lai J., Porreca F., hunter J.C., Gold M.S. (2004) *Voltage-gated sodium channels and hyperalgesia.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 44: 371-397.

Leffler A., Cummins T.R., Dib-Hajj S.D., Hormuzadir W.N., Black J.A., Waxman S.G. (2002) *GDNF and NGF reverse changes in repriming of TTX-sensitive Na(+) currents following axotomy of dorsal root ganglion neurons.* J Neurophysiol 88: 650-658.

Lesch K.P. (1997) *Serotoninergic neurons an 5-HT receptors in the CNS.* Handbook of experimental pharmacology Vol. 129: 671-705.

Lesch K.P. und Heils A. (2000) *Serotonergic gene transcriptional control regions: targets for antidepressants drug development?* Int J Neuropsychopharmcol 3: 67-79.

Levy D.M., Terenghi G., Gu X.H., Abraham R.R., Springall D.R., Polak J.M. (1992) I*munohistochemical measurements of nerves and neuropeptides in diabetic skin: relationship to tests of neurological function.* Diabetologia 35: 889–897.

Luo X., Rush R.A., Zhou X. (2001) U*ltrastructural localization of brain–derived neurotrophic factor in rat primary sensory neurons.* Neurosci. Res. 39: 377-384.

Mac Iver M.B. und Tanelian D.L. (1993) *Structural and functional specialization of A and C fiber free nerve endings innervating rabbit corneal epithelium.* J. Neurosci. 13: 4511–4524.

Mamounas L. A., Altar C. A., Blue M. E., Kaplan D. R., Tessarollo L., Lyons W. E. (2000) *BDNF promotes the regenerativesprouting, but not survival, of injured serotonergic axons in the adult rat brain.* J. Neurosci. 20: 771–782.

Mamounas L. A., Blue M. E., Siuciak J. A., Altar C. A. (1995) *Brainderivied neurotrophic factor promotes the survival and sprouting of serotonergic axons in rat brain.* J. Neurosci. 15: 7929–7939.

Max M., Lynch S., Muir J. (1992) *Effects of desimipramine, amitriptyline and fluoxetine on pain in diabetic neuroptahy* New eng J Med 326: 1250-1256.

McCarthy B.G., Hsieh S.T., Stocks A., Hauer P., Macko C., Cornblath D.R., Griffin J.W., McArthur J.C. (1995) *Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy.* Neurology 45: 1848–1855.

McQuay H.J., Tramer M., Nye B.A., Carroll D., Wiffen P.J., Moore R.A. (1996) *A systematic review of antidepressants inneuropathic pain.* Pain 68: 217-227.

Merskey H. und Bogduk N. (1994) *Classification of chronic pain*. IASP press, Vol. 2: 210-213.

Moalem G., Grafe P., Tracey D.J. (2005) *Chemical mediators enhance the excitability of unmyelinatedsensory axons in normal and injured peripheral nerve of the rat.* Neuroscience 134(4):1399-411.

Mössner R.,Daniel S., Albert D., Heils A., Okladnova O., Schmitt A., Lesch K.P. (2000) *Serotonin transporter function is modulated by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) but not nerve groth factor (NGF).* Neurochem Int 36: 197-202.

Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H., Schäfer-Korting M., (2005) *Arzneimittelwirkungen.* 462-466.

Noda M., Ikeda T., Suzuki H., Takeshima H., Takahashi T., Kuno M., Numa S. (1986) *Expression of functional sodium channels from cloned cDNA.* Nature 3;322(6082): 826-8.

Nolano M., Simone D.A., Wendelschafer-Crabb G., Johnson T., Hazen E., Kennedy W.R. (1999)*Topical capsaicin in humans: parallel loss of epidermal nerve fibers and pain sensation*. Pain 81: 135–145.

Oprée A, Kress M. (2000) Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-α, il-1β and il-6 but not il-8 in the development of heat hyperalgesia effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin. Neuroscience 20:6289-6293.

Obreja O., Schmelz M., Poole S., Kress M. (2001) *Interleukin-6 in combination with its soluble il-6 receptor sensitises rat skin nociceptors to heat in vivo.* Pain 96(1-2):57-62.

Obata K., Yamanaka H., Dai Y.,Tachibana T., Fukuoka T.,Tokunaga A.,Yoshikawa H., Noguchi K. (2003) *Differential activation of extracellular signal-regulated protein kinase in primary afferent neurons regulates brain-derived neurotrophic factor expression after peripheral inflammation and nerve injury.* J. of Neurosc. 23(10): 4117– 4126.

Pousset F., Fournier J., Legoux P., Keane P., Shire D., Soubrie P. (1996) *Effect of serotonin on cytokine mRNA expression in rat hippocampal astrocytes.* Mol Brain Res. 38: 54–62.

Pezet S., Malcangio M., McMahon S.B. (2002) *BDNF: a neuromodulator in nociceptive pathways?* Brain Res. Rev. 40: 240-249.

Rahman W., Suzuki R., Webber M., Hunt S.P., Dickenson A.H. (2006) *Depletion of endogenous spinal 5-HT attenuates the behavioural hypersensitivity to mechanical and cooling stimuli induced by spinal nerve ligation.* Pain 123: 264-274.

Reinert A., Kaske A., Mense S. (1998), *Inflammation-induced increase in the density of neuropeptide-immunoreactive nerve endings in rat skeletal muscle.* Exp. Brain Res. 21: 174-180.

Rioux A., Fabe V., Lesch K.P., Moessner R., Murphy D.L., Lanfumey L., Hamon M., Martes M.P. (1999) *Adaptive changes of serotonin 5-HT2A receptors in mice lacking the serotonin transporter.* Neurosci. Lett. 262: 113-116.

Sawynok J., Esser M.J., Reid A.R. (1999) *Peripheral antinociceptive actions of deispramine and fluoxetine in an inflammatory andneuropathic pain test in the rat.* Pain 82:149-158.

Schmidt R.F., Thews G., Lang F. (2000) *Physiologie des Menschen. 195-250.*

Shinoda M., Honda T., Ozaki N., Hattori H., Mizutani H., Ucda N., Sugiura Y. (2003) *Nerve terminals extend into the temperomandibular joint of adjuvant arthritic rats.* Pain 7: 493-505.

Simonneaux V. und Ribelayga C. (2003) *Generation of the Melatonin Endocrine Message in Mammals: A Review of the Complex Regulation of Melatonin Synthesis by Norepinephrine, Peptides, and Other Pineal Transmitters*. *Pharmacol Rev* 55: 325-395.

Sindrup S., Bjerre U., Dejgaard A. et al. (1992) *The SSRI citalopram relieves the symptoms of diabetic neuropathy.* Clin Pharm Ther 52: 547-552.

Sindrup S., Gram F., Brosen K. et al. (1990) *The selectives serotonine reuptake inhibitor paroxetine is effective in the treatment of diabetic polyneuropathy symptoms.* Pain 42: 135-144.

Sommer C. (2004) *Serotonin in pain and analgesia.* Mol. Neurobiol. 30: 117-125.

Sommer C. (2006) *Is serotonin hyperalgesic or analgesic?* Curr. Pain Headache Rep. 10: 101-106.

Sommer C. und Schäfers M. (1998) (a) *Painful mononeuropathy in C57BL/Wld mice with delayed wallerian degeneration: differential effects of cytokine production and nerve regeneration on thermal and mechanical hypersensitivity.* Brain Res. 784: 154-162.

Suzuki R., Rygh L.J., Dickenson A.H. (2004) *Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing.* Trends Pharmacol. Sci. 25: 613-617.

Taiwo Y.O. und Levine J.D. (1992) *Serotonin is a directly-acting hyperalgesic agent in the rat.* Neuroscience Vol. 48.2: 485-490.

Tokunaga A., Saika M., Senba E. (1998) 5*HT2A receptorsubtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery.* Pain 76: 349-355.

Tsujino H., Kondo E., Fukuoka T., Dai Y., Tokunaga A., Miki K., Yonenobu K., Ochi T., Noguchi K. (2000) *Activating Transcription Factor 3 (ATF3) Inductionby Axotomy in Sensory and Motoneurons: A NovelNeuronal Marker of Nerve Injury.* Molecular and Cellular Neuroscience 15: 170–182.

Verdu E. und Navarro X. (1997) *Comparison of immunohistochemical and functional reinnervation of skin and muscle after peripheral nerve-injury.* Exp. Neurol. 146: 187–198.

Vogel C., Mössner R., Gerlach M., Heinemann T., Murphy D.L., Riederer P., Lesch K.P., Sommer C. (2003) *Absence of thermal hyperalgesia in serotonin transporter-deficient mice.* J. Neurosci. 23: 708-715.

Wallengren J., Badendick K., Sundler F., Hakanson R., Zander E. (1995) *Innervation of the skin of the forearm in diabetic patients: relation to nerve function.* Acta Derm.-Venereol. 75: 37–42.

Wallengren J., Tegner E., Sundler F. (2002) *Cutaneous sensory nerve fibers are decreased in number after peripheral and central nerve damage* J. Am. Acad. Dermatol. 46: 215-7.

Wang L., Hilliges M., Jernberg T., Wiegleb E.D., Johansson O. (1990) *Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibres and cells in human skin* Cell Tissue Res. 261: 25–33.

Wang Y.X., Bowersox S.S., Pettus M., Gao D. (1999) *Antinociceptive properties of Fenfluramine, Serotin Reuptake Inhibitor , in a rat model of neuropathy.* J Pharmacol Exp. Ther. 291: 1008-1016.

Waxmann S.G., Cummins T.R., Dib-Hajj S.D., Black J.A. (2000) *Voltage-gated sodium channels and the molecular pathogenesis of pain: a review*. J. Rehabil. Res. Dev. 37(5): 517-28.

Wessely P. (2001) *Neuropathische Schmerzen – Symptomatik, Diagnostik, Therapiemöglichkeiten.*

Yaksh T.L. und Wilson P.R. (1979) S*pina serotonin terminal system mediates antinociception*. J. Pharmacol. Exp. Ther. 208: 446-453.

Yoder E.J.,Tamir H., Ellisman M.H. (1997) *Serotonin receptors expressed by myelinating Schwann cells in rat sciatic nerve.* Brain Res. 753: 299-308.

Zetterstrom T.S., Pei Q., Madhav T.R., Coppell A.L., Lewis L. , Graham-Smith D.G. (1999) *Manipulations of brain 5-HT levels affect gene expression for BDNF in rat brain.* Neuropharmacology 38:1063-1073.

8. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATF-3	Activating transcription factor 3
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovine Fraktion V
bzw.	beziehungsweise
CFA	Complete Freund´s Adjuvant
CGRP	calcitonin gene related peptide
CCI	Chronic Constriction Injury
cm	Zentimeter
DAB	3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid-Dihydrat
Dabco	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DRG	dorsal root ganglia, Spinalganglien
ENF	freie epidermale Nervenendigungen
FCS	Foetal Bovine Serum
FP	Footpads
g	Gramm
H	Helligkeit
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbungen
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
hr	Stunden
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
5-HT	Serotonin
5-HTT	Serotonin-Transporter
ICH	Immunhistochemie
i.p.	intraperitoneal
i.pl.	intraplantar
K	Kontrast
kg	Kilogramm
KO	Knockout / 5-HTT -/- Mäuse
LZI	Verschlusszeit
M	Mol / molar
min	Minuten

ml	Mililiter
mm	Milimeter
µg	Mgrogramm
µl	Mgroliter
n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid
NaCl 0,9 %	physiologischer Natriumchlorid Lösung
Na_v 1.3	spannungsabhängiger Natriumkanal 1.3
NSARs	Nicht-steroidale Antiphlogistika (-rheumatica)
N. ischiadicus	Nervus ischiadicus
PAN-Na_v	Spannungsabhängige Natriumkanäle
PBS	Phosphatpuffer
PFA	Paraformaldehyd
PGP 9.5	protein gene product 9.5
pos.	positiv
RT	Raumtemperatur
RM	Rückenmark
sek	Sekunden
SSRI	selektive Serotonin Wiederaufnahmehemmer
TZA	Trizyklische Antidepressiva
TRIS	Tris-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
u.a.	unter anderem
V	Ausgangswert
WT	Wildtyp / 5-HTT +/+ Mäuse
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung:

Bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Claudia Sommer für die Überlassung des interessanten Themas, die Einarbeitung in die Thematik und die geduldige Betreuung während aller Phasen der Arbeit. Besonders beeindruckt hat mich die immer „offene Tür“ ihres Arbeitszimmers und die trotz des betriebsamen Klinikalltags bestehende stetige Bereitschaft zur Diskussion der Ergebnisse und Lösung kleinerer Probleme.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus V. Toyka sowie Herrn Prof. Dr. Manfred Gerlach für die Möglichkeit der Nutzung ihrer Labore sowie die Bereitstellung von Geräten und Material.

Herrn Prof. Dr. Klaus-Peter Lesch und Dr. Reinald Mößner möchte ich danken für das aufmerksame Verfolgen meiner Arbeit und die interessanten Diskussionen über die mutmaßliche intrinsische Aktivität von 5-HIAA, sowie Herrn Prof. Lesch für das Koreferat meiner Arbeit.

Neben allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich namentlich Frau Lydia Biko, Frau Barbara Gado und Frau Barbara Dekant für die gute Zusammenarbeit. Ohne ihre zuverlässige und unermüdliche Hilfe bei der Durchführung der Experimente und der histologischen Aufarbeitung wäre die Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen.

Herzlich danken möchte ich auch meinen Eltern und Großeltern, die mir das Studium der Medizin ermöglicht haben und reges Interesse an meiner Arbeit bis zur Fertigstellung gezeigt haben.

Meiner Frau Nicole danke ich für das Korrekturlesen sowie ihre Geduld und Unterstützung besonders in der Schlussphase der Arbeit.

Lebenslauf:

Name:	Florian Emil Palm
Anschrift:	Rathausstr. 17 63571 Gelnhausen
Geburtsdatum:	10. Januar 1977
Geburtsort:	Fulda
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet
Konfession:	römisch katholisch
Eltern:	Gerard Palm Hannelore Assmann, geborene Bernhard
Geschwister:	Sabine Flohr, geborene Palm
Schulbildung:	1983 – 1987 Grundschule Florenberg, Pilgerzell 1987 – 1996 Rabanus-Maurus-Schule, Fulda
Schulabschluß:	Allgemeine Hochschulreife am 24. Juni 1996
Wehrdienst:	09/1996 – 06/1997 als Hauptgefreiter im Sanitätsdienst
Studium:	10/1997 – 02/2000 Studium an der Theol. Fakultät Fulda, Studiengang Katholische Theologie: Vordiplom 02/2000
	Seit 04/2000 Studium an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Studiengang Humanmedizin:
	Physikum 03/2002
	Erstes Staatsexamen 03/2003
	Zweites Staatsexamen 03/2005
	Drittes Staatsexamen 05/2006

Approbation als Arzt am 26. Mai 2006

Famulaturen:

Urologie / Univ.-Klinikum Würzburg und Praxis in Fulda

Innere Medizin / Herz-Jesu-Krankenhaus in Fulda

Chirurgie / KKH Land Hadeln in Otterndorf

Anästhesie / Kreiskliniken Oberallgäu

Schmerztherapeutische Praxis in Fulda

Allgemeinmedizinische Praxis in Staig

Praktisches Jahr:

1. Tertial 04 – 08/2005: Pädiatrie
   Creighton University Omaha &
   University of Nebraska / USA

2. Tertial 08 – 11/2005: Chirurgie
   Spital Grenchen (Universität Bern) / Schweiz

3. Tertial 11/2005 – 03/2006: Innere Medizin
   Juliusspital Würzburg

Berufliche Tätigkeit: Seit 1. Juni 2006 Assistenzarzt an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin des Klinikums Offenbach.

Gelnhausen-Meerholz, 26. Februar 2008