

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus der Klinik für Neurologie

Akute Zytokin-vermittelte thermische  
Hyperalgesie im Rattenmodell: Rolle von TRPV1

Inaugural – Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der Medizin

durch die Medizinische Fakultät

der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von

Mareike Schulte

aus Nordhorn

2015

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. T. Hagenacker  
2. Gutachter: Frau Priv.-Doz. Dr. rer. nat. J. Rudner

Tag der mündlichen Prüfung: 30. März 2016

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	5
1.1. Einführung .....	5
1.2. Nozizeption und Schmerz .....	7
1.2.1. Das nozizeptive System.....	7
1.2.2. Nozizeptorschmerz und neuropathischer Schmerz.....	9
1.2.3. Therapie neuropathischer Schmerzen .....	10
1.3. TRP-Rezeptoren .....	11
1.3.1. Einführung.....	11
1.3.2. Familie der TRP-Rezeptoren.....	11
1.3.3. Thermosensitive TRP-Rezeptoren.....	12
1.3.4. Der TRPV1- Rezeptor .....	15
1.4. Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen.....	17
1.4.1. Sensibilisierungsmechanismen .....	17
1.4.2. Zentrale Sensibilisierung .....	18
1.4.3. Periphere Mechanismen .....	19
1.4.4. Bedeutung von TNF bei neuropathischen Schmerzen .....	20
1.5. Selektive TRPV1- Rezeptor Analoga.....	22
1.5.1. TRPV1-Antagonisten .....	23
1.5.2. TRPV1- Agonisten .....	23
1.5.2.1. Resiniferatoxin.....	25
1.6. Zielsetzung der Arbeit .....	27
2. Material und Methoden .....	28
2.1. Versuchstiere .....	28
2.2. Chemikalien .....	28
2.3. Intrathekale Injektion.....	28
2.4. Verhaltenstestungen.....	29
2.4.1. Testung der thermalen Hyperalgesie .....	29
2.4.2. Testung der taktilen Allodynie .....	30
2.4.3. Dosierungen der Testsubstanzen .....	31
2.4.3.1. TNF.....	31
2.4.3.2. RTX .....	31
2.4.4. Protokoll der Verhaltenstestungen .....	31
2.4.5. Erläuterungen zur Festlegung der Gruppengröße .....	33

2.5. Datenanalyse .....	34
2.5.1. Auswertung der Messung der taktilen Allodynie .....	34
2.5.2. Auswertung der Messung der thermalen Hyperalgesie .....	35
2.6. Statistische Auswertung.....	35
3. Ergebnisse .....	36
3.1. Wirkung auf schmerzassoziertes Verhalten intrathekaler Injektionen.....	36
3.2. Wirkung von intrathekaler TNF-Applikation: Induktion einer taktilen Allodynie und einer thermalen Hyperalgesie .....	38
3.3. Vergleich zwischen TNF-Injektion und TNF+RTX- Injektion.....	41
4. Diskussion .....	46
4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse .....	46
4.2. Intrathekale TNF-Applikation induziert schmerzassoziertes Verhalten .....	46
4.2.1. Zeitlicher Verlauf des schmerzassozierten Verhaltens nach intrathekaler TNF-Applikation .....	46
4.2.2. Beurteilung der Dosisabhängigkeit des schmerzassozierten Verhaltens nach intrathekaler TNF-Applikation .....	49
4.3. Modulation des schmerzassozierten Verhaltens durch zusätzliche intrathekale RTX-Applikation .....	49
4.3.1. Zeitlicher Verlauf des schmerzassozierten Verhaltens durch zusätzliche intrathekale RTX-Applikation .....	50
4.3.2. Vorteile der intrathekalen RTX- Applikationsform: Erhalt der physiologischen thermalen Sensibilität .....	51
4.4. Limitationen der Studie .....	52
4.5. Ausblick .....	54
4.5.1. Ausblick: Anlage intrathekaler Katheter.....	54
5. Zusammenfassung .....	56
6. Literaturverzeichnis.....	57
7. Anhang .....	65
7.1. Tabellenverzeichnis .....	65
7.2. Abbildungsverzeichnis .....	66
7.3. Abkürzungsverzeichnis .....	67
8. Danksagung .....	69
9. Lebenslauf.....	70

# 1. Einleitung

## 1.1. Einführung

Ergebnissen einer repräsentativen Bevölkerungsstichprobe zufolge leiden 28,3% der in Deutschland lebenden Menschen unter chronischen Schmerzen und damit definitionsgemäß unter Schmerzen, die länger als 3 Monate bestehen. In Deutschland leben ca. 23 Mio. Personen mit chronischen Schmerzen (Häuser et al., 2014). Die Jahre 2000-2010 wurden von der Joint Commission of Healthcare Organizations zur Dekade der Schmerztherapie und Schmerzforschung ernannt. Damit sollte auf die massive Einschränkung der Lebensqualität von Patienten mit chronischen Schmerzen, aber auch auf die finanziellen Auswirkungen für das Gesundheitssystem hingewiesen werden (Harden, 2005).

Eine besondere und häufig chronische Form des Schmerzes ist der neuropathische Schmerz, der typischerweise nach einer Läsion des somatosensorischen Systems entsteht (Treede et al., 2008; Jensen et al., 2011). Nervenverletzungen lösen molekulare und zelluläre Veränderungen aus, die zu einer vermehrten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (u.a. Tumornekrosefaktor- $\alpha$ ) führen und so eine Sensibilisierung und verstärkte Expression verschiedener Rezeptoren, wie des Hitzerezeptors TRPV1 (=transient receptor potential vanilloid) bewirken (Schäfers et al., 2003a; Hensellek et al., 2007). Klinisch äußern sich neuropathische Schmerzen oft durch eine verstärkte Wahrnehmung sensibler Reize in Form einer Allodynie (= ein gewöhnlich nicht-schmerzhafter Reiz löst Schmerzen aus) oder einer Hyperalgesie (= verstärkte Schmerzempfindlichkeit) (Benrath et al., 2012). Patienten, die unter neuropathischen Schmerzen leiden, werden mit Antidepressiva, Antikonvulsiva und Opioiden behandelt; durch diese Pharmaka kann Ihnen aber oft nur unzureichend geholfen werden und schwerwiegende Nebenwirkungen müssen hingenommen werden (Dworkin et al. 2010). Von den rezeptorselektiven Pharmaka verspricht man sich deshalb in Zukunft eine wirkungsstärkere und nebenwirkungsärmere analgetische Therapiemöglichkeit.

In dieser Arbeit wird in einem Rattenmodell untersucht, ob die akute intrathekale Applikation des Zytokins Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF) zur Entstehung neuropathischer Schmerzen in Form einer taktilen Allodynie und/oder einer thermalen Hyperalgesie führt. Es wird herausgestellt, dass die Zytokin-vermittelte Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie durch die intrathekale Injektion des TRPV1- Agonisten Resiniferatoxin moduliert werden kann.

Bevor die Methoden und Ergebnisse erläutert werden, gibt das folgende Kapitel einen Überblick über das nozizeptive System, die Bedeutung von TNF, des Hitzerezeptors TRPV1 und für die Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen.

## **1.2. Nozizeption und Schmerz**

Der Begriff Nozizeption beschreibt die Aufnahme und Verarbeitung noxischer Reize durch das somatosensorische System. Noxen sind potentiell gewebeschädigend und können in Form von thermischen, mechanischen oder chemischen Reizen auftreten. Der Ausdruck der Nozizeption umfasst dabei die rein objektiven Prozesse der Reizaufnahme, die anhand elektrophysiologischer Techniken gemessen werden können (Schaible, 2006). Im Gegensatz dazu ist Schmerz laut der International Association for the Study of Pain (IASP) „[...] ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potenzieller Gewebeschädigung einhergeht oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“ Der Terminus Schmerz ist demnach subjektiv geprägt, wird beispielsweise anhand einer visuellen Analogskala gemessen und beinhaltet verschiedene Komponenten. Dazu zählen sensorisch-diskriminative, affektive, vegetative, kognitive und motorische Schmerzkomponenten (Benrath et al., 2012).

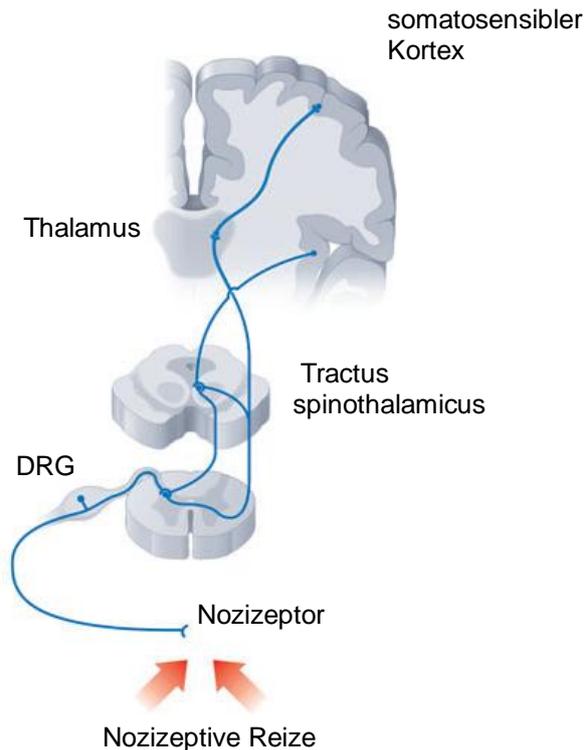
### **1.2.1. Das nozizeptive System**

Noxische Reize werden über nicht-korpuskuläre freie Nervenendigungen, sogenannte Nozizeptoren oder auch primärafferente Neurone genannt, aufgenommen. Die meisten Nozizeptoren sind polymodal, das heißt sie reagieren auf thermische (Kälte, Hitze), chemische und mechanische (z.B. Quetschung) noxische Stimuli. Die Erregung eines Nozizeptors wird durch die Aktivierung von verschiedenen Ionenkanälen und Rezeptoren, die in den sensorischen Endigungen exprimiert werden, ausgelöst (Schaible, 2006). Dabei wird zwischen ionotropen Rezeptoren und metabotropen Rezeptoren unterschieden. Bindet ein Ligand an einen ionotropen Rezeptor, wird unmittelbar ein Ionenkanal geöffnet. Ein metabotroper Rezeptor setzt nach Aktivierung eine Signalkaskade in Gang, die über second messenger Ionenkanäle oder andere Zellfunktionen beeinflusst (Schaible, 2006). Durch welche Reize ein Rezeptor aktiviert wird, ist von der Modalität des jeweiligen Rezeptors abhängig: Der Hitzerezeptor TRPV1 löst ab 43°C ein Aktionspotential im Nozizeptor aus, der Kälterezeptor TRPA1 (transient receptor potential ankyrin) wird durch noxische Kälte aktiviert. Chemorezeptoren werden durch verschiedene Gewebsmediatoren (Bradykinin, Prostaglandine) aktiviert (Benrath et al., 2012; Schaible, 2006). Einige proinflammatorische Gewebsmediatoren (u.a. TNF, Bradykinin) können dabei nicht nur direkt bestimmte Rezeptoren erregen, sondern auch nozizeptive Endigungen sensibilisieren, indem sie die Erregungsschwelle anderer Rezeptoren senken (Constantin et al., 2008; Schaible, 2006). Darüber hinaus werden im Rahmen einer Entzündung und der damit einhergehenden Sensibilisierung durch Gewebsmediatoren

sogenannte „stumme“ Nozizeptoren erregt, die sonst nicht aktivierbar wären (Benrath et al., 2012; Schaible 2006). Dadurch werden normalerweise nicht-noxische Reize als schmerzhaft empfunden (= Allodynie) (Schaible, 2006). Nach einer Reizung von Nozizeptoren können diese selbst durch die Freisetzung von Neuropeptiden wie beispielsweise der Substanz P oder CGRP (calcitonin gene-related peptide) eine Entzündungsreaktion auslösen. Diese äußert sich u.a. durch Vasodilatation und die Einwanderung von Entzündungszellen ins betroffene Areal und wird auch als neurogene Entzündung bezeichnet, da sie vom Nozizeptor ausgeht (Schaible, 2006).

Über die Aktivierung der Rezeptoren wird der Nozizeptor erregt und die Reize schließlich über verschiedene Fasertypen an die Zellkörper übermittelt. Die meisten Nozizeptoren sind unmyelinisierte C-Fasern mit kleinem Faserdurchmesser (1  $\mu\text{m}$ ) und einer Leitungsgeschwindigkeit  $< 2\text{m/s}$ , die einen dumpfen und schwer abzugrenzenden Schmerz übertragen. Dünn myelinisierte A $\delta$ -Fasern hingegen vermitteln mit einer mittleren Leitungsgeschwindigkeit von  $15\text{m/s}$  schnell einen gut zu lokalisierenden und stechenden, hellen Schmerz (Benrath et al., 2012). Die Zellkörper der Nozizeptoren befinden sich je nach Ort der Stimuli im Hinterwurzelganglion (DRG = dorsal root ganglion), oder für den Gesichtsbereich im Ganglion trigeminale. Die Nervenzellen in diesen Ganglien sind pseudounipolar. Das bedeutet, dass jeweils eine periphere und eine zentrale Nervenendigung vorliegen, die aus einem gemeinsamen Zellfortsatz entspringen; die periphere Nervenendigung nimmt die sensiblen Informationen auf, die dann über die zentralen Nervenendigungen auf Rückenmarksneurone verschaltet wird. Die zentrale Nervenendigung der nozizeptiven A $\delta$ - und C-Fasern enden überwiegend in den Schichten I,II und V des Rückenmarks, die sich im Hinterhorn befinden (Schaible, 2006). Über aufsteigende Nervenfaserbahnen, den Tractus spinothalamicus und den Tractus spinoreticularis, werden die nozizeptiven Signale dann an den Hirnstamm und das thalamokortikale System übermittelt, das schließlich für die bewusste Schmerzwahrnehmung verantwortlich ist (s. Abbildung 1).

Deszendierende Bahnen, die von Hirnstammkernen ausgehen, können die nozizeptive Signalverarbeitung im Rückenmark hemmen oder erregen. Eine wichtige Rolle für das endogene antinozizeptive System spielen dabei das periaquäduktale Grau und die Ausschüttung endogener Opiode (Benrath et al., 2012).



### Abbildung 1: Das nozizeptive System

Noxische Reize werden vom Nozizeptor aufgenommen, an das Hinterwurzelganglion (DRG) übertragen und über den spinothalamischen Trakt an den Thalamus und den somatosensiblen Kortex vermittelt. (Adaptiert nach: Costigan et al., 2009)

### 1.2.2. Nozizeptorschmerz und neuropathischer Schmerz

Der Entstehung nach wird der Nozizeptorschmerz vom neuropathischen Schmerz abgegrenzt. Der Nozizeptorschmerz wird durch gewebeschädigende thermische, mechanische oder chemische Reize ausgelöst. Er tritt beispielsweise bei entzündlichen Prozessen oder Gewebeläsionen (z.B. Verbrennungen) auf und ruft schmerzvermeidendes Verhalten hervor. So wird die Hand beim Griff auf die Herdplatte ruckartig weggezogen oder eine verletzte Extremität unwillkürlich geschont. Dieser physiologische Schmerz verhindert auf diese Weise weitere Gewebsschädigungen und stellt ein Warnsignal für den Körper dar (Benrath et al., 2012).

Davon abzugrenzen ist der neuropathische Schmerz, der sich nach Nervenläsionen manifestiert und als pathophysiologischer Schmerz nicht der Gefahrenerkennung dient (Benrath et al., 2012). Aktuell wird neuropathischer Schmerz definiert als „Schmerz, der als direkte Konsequenz einer Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Systems entsteht“ (Treede et al., 2008; Jensen et al., 2011). Die Schädigung kann im peripheren Nervensystem auftreten wie bei Polyneuropathien im Rahmen des Diabetes mellitus, durch Nervenkompressionen oder als postzosterische Neuralgie. Zentrale neuropathische

Schmerzen entstehen beispielsweise durch eine Ischämie oder Blutung im Bereich des Nervensystems, aber auch nach traumatischen spinalen Schädigungen (Benrath et al., 2012). Klinisch äußert er sich oft durch brennende, elektrisierende Schmerzen, die persistieren oder blitzartig einschließen können. Darüber hinaus treten einerseits häufig sensible Reizsymptome, andererseits aber auch Ausfallerscheinungen auf, die sogenannte Plus- bzw. Negativsymptomatik (Benrath et al., 2012). Wichtige Begriffe dieser Symptomatik werden in Tabelle 1 definiert.

<b>Plussymptomatik</b>	<b>Negativsymptomatik</b>
<b>Parästhesie:</b> Als abnorm wahrgenommene Empfindung, die entweder spontan oder nach Provokation auftritt	<b>Hypästhesie:</b> Verringerte Empfindlichkeit gegenüber sensiblen nicht schmerzhaften Reizen (mechanisch, thermisch)
<b>Hyperpathie:</b> Verstärkte Schmerzempfindlichkeit bei überschwelligem Schmerzreizen und erhöhter Schmerzschwelle	<b>Hypoalgesie:</b> Verringerte Schmerzempfindlichkeit
<b>Hyperalgesie (mechanisch, thermisch):</b> Verstärkte Schmerzempfindlichkeit bei überschwelligem Schmerzreizen und herabgesetzter Schmerzschwelle	<b>Anästhesie:</b> Fehlende Empfindungswahrnehmung von taktilen, thermischen oder schmerzhaften Reizen
<b>Allodynie:</b> Schmerzauslösung durch taktile, normalerweise nicht schmerzhaft Reize	<b>Analgesie:</b> Fehlende Schmerzempfindung bei physiologisch schmerzhaften Reizen

**Tabelle 1: Definition der klinischen Symptome des neuropathischen Schmerzes**  
(nach Maier et al., 2011)

### 1.2.3. Therapie neuropathischer Schmerzen

Die Behandlung neuropathischer Schmerzen stellt bis heute eine Herausforderung in der Schmerztherapie dar. Trotz zahlreicher Behandlungsmöglichkeiten kann bei Betroffenen häufig keine ausreichende Schmerzreduktion erzielt werden. Der kausale Therapieansatz beschränkt sich darauf, weitere Nervenschädigungen zu vermeiden, indem zum Beispiel bei Patienten mit Diabetes mellitus der Blutzucker optimal eingestellt wird oder eine vorhandene Nervenkompression wie beim Karpaltunnelsyndrom operativ entlastet wird (Benrath et al., 2012). Da sich bereits geschädigte Nerven nur langsam und nicht vollständig regenerieren, ist eine symptomatische Therapie zur Schmerzkontrolle für Betroffene überaus wichtig. Medikamentös kommen Opiode, Antikonvulsiva, Lokalanästhetika oder Antidepressiva (Trizyklika, selektive Wiederaufnahmehemmer: SSRI, SNRI) oft auch in Kombination zum Einsatz (Benrath et al., 2012). Die pharmakologische Therapie ist optimalerweise ein Teil des Konzeptes der multimodalen Schmerztherapie, das zudem psychologische, physiotherapeutische und ergotherapeutische Maßnahmen beinhaltet.

## **1.3. TRP-Rezeptoren**

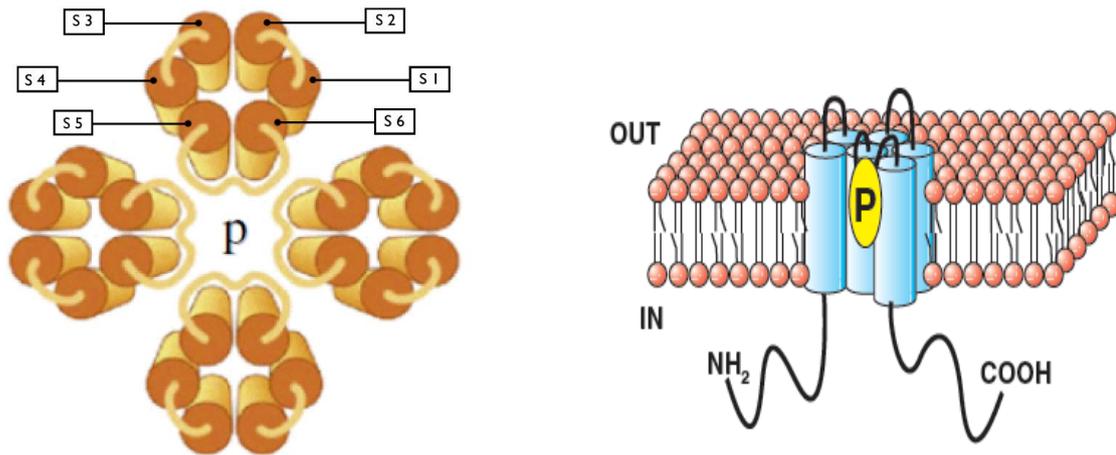
### **1.3.1. Einführung**

Als vielversprechender Ansatzpunkt für selektive Pharmaka zur Behandlung des neuropathischen Schmerzes ist der Hitzerezeptor TRPV1 aus der Familie der TRP (transient receptor potential)-Rezeptoren von besonderem Interesse. Er wird in Nozizeptoren und spinalen Nervenendigungen exprimiert (Nilius und Owsianik, 2011).

### **1.3.2. Familie der TRP-Rezeptoren**

TRP-Rezeptoren stellen eine große Gruppe von Ionenkanälen dar, die in verschiedensten Geweben und Zellen exprimiert werden und dort in unterschiedliche physiologische Prozesse involviert sind (Nilius und Owsianik, 2011). So vermitteln sie beispielsweise die Reizantwort auf thermische, chemische aber auch intrazelluläre Stimuli (Wu et al., 2010).

Der erste TRP-Kanal wurde 1969 in mutierten Photorezeptoren der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt. Während der Wildtyp auf einen kontinuierlichen Lichtreiz mit anhaltendem Rezeptorpotential reagierte, war bei mutierten Fliegen nur ein transientes Rezeptorpotential messbar (Cosens and Manning, 1969). Mittlerweile wurden in der Familie der TRP-Rezeptoren bei Säugetieren 28 Kanäle entdeckt, die in sechs Untergruppen gegliedert werden: TRPC 1-7 (*canonical*), TRPV 1-6 (*vanilloid*), TRPM 1-8 (*melastatin*), TRPA 1 (*ankyrin*) (früher: ANKTM1), TRPML 1-3 (*mucolipin*) und TRPP 1-3 (*polycystin*) (Wu et al., 2010). Im Gegensatz zu anderen Ionenkanälen werden die TRP-Kanäle nicht durch Liganden oder ihre Selektivität klassifiziert, sondern anhand von Sequenzhomologien (Wu et al., 2010). Trotz großer Sequenzunterschiede zwischen den einzelnen Untergruppen wird eine identische Struktur für die Kanäle der TRP-Familie angenommen. Sie bestehen aus homologen oder heterologen Tetrameren, die sich jeweils aus sechs Transmembransequenzen (6TM: S1-S6) zusammensetzen. Dabei bilden S5 und S6 jedes Tetramers zusammen mit einer verbindenden Schleife die Porenregion des Kanals (Clapham, 2003; s. Abb.2). Eine weitere Gemeinsamkeit liegt in den zytoplasmatisch lokalisierten C- und N- Termini (Nilius und Owsianik, 2011).



### Abbildung 2: Aufbau eines TRP- Kanals

links: Der typische TRP- Kanal besteht aus einem Tetramer, das jeweils aus 6 Transmembransequenzen besteht. Die Porenregion wird aus S5, S6 und einer verbindenden Schleife gebildet (modifiziert nach: Carvajal et al., 2012).

rechts: Im Zytoplasma befinden sich die N- und C-Termini (Nilius und Owsianik, 2011).

Die meisten TRP- Kanäle sind spannungsabhängige, nicht-selektive Kationenkanäle mit  $P_{Ca}/P_{Na} \leq 10$ , die die intrazellulären Konzentrationen von  $Ca^{2+}$  und/oder  $Na^{+}$  erhöhen. Ausnahmen stellen sowohl die Kanäle TRPM4/5 dar, die für monovalente Kationen selektiv sind, als auch TRPV5 und TRPV6, die nur für  $Ca^{2+}$  durchlässig sind (Clapham, 2003). Die Aktivität vieler TRP-Kanäle wird durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und auch durch intrazelluläres  $Ca^{2+}$  moduliert (Wu et al., 2010).

### 1.3.3. Thermosensitive TRP-Rezeptoren

Von besonderer Relevanz für die Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen sind thermosensitiven Rezeptoren, die sich bei Säugetieren aus den Hitze- bzw. Wärmerezeptoren TRPV1-4, TRPM 2, TRPM 4, TRPM 5 und den Kälterezeptoren TRPM8 und TRPA 1 zusammensetzen (Saito und Shingai, 2006). Eine Auflistung der thermosensitiven Kanäle mit ihren Expressionsorten, ihrer Funktion und den jeweiligen Agonisten zur Aktivierung gibt Tabelle 2.

TRP-Kanal	Gewebliche Expression	Funktion	Agonisten
<b>TRPV 1</b>	DRG und TG, spinale und periphere Nervenendigungen, Gehirn, Haut (u.a. kutane sensorische Nervenfasern, Mastzellen, epidermale Keratinozyten, dermale Blutgefäße, Haarfollikel), Schweißdrüsen, Pankreas, Blase (Urothel, glatte Muskulatur, Blutgefäße und Neurone)	Temperaturempfinden, autonome Thermoregulation, Nozizeption, Im Gehirn: synaptische Plastizität (Langzeit-Depression), Endocannabinoid-System, Leitung der Wachstumskegel, Regulation der Essensaufnahme, Osmorezeptor im Gehirn bei einer bestimmten TRPV1-Variante	Hitze $\geq 43^{\circ}\text{C}$ , Capsaicin, Resiniferatoxin, Piperin, Protonen, Anandamid, Metaboliten der Arachidonsäure, Kampfer
<b>TRPV 2</b>	DRG und ZNS Neurone, GIT, Milz, Mastzellen, glatte Muskulatur, Herz- und Skelettmuskelzellen, Blase	Temperaturempfinden, Nozizeption, Axonauswuchs in spinalen Motoneuronen, wichtige Rolle für die Phagozytose in Makrophagen	Hitze $\geq 52^{\circ}\text{C}$ , IGF-1
<b>TRPV 3</b>	DRG und TG, Gehirn, Keratinozyten, Haarfollikel, Zunge, Hoden	Temperaturempfinden, Nozizeption, Hautintegrität, Wundheilung, Haarwachstum, Sebozytenfunktion	Wärme $33^{\circ}\text{-}39^{\circ}\text{C}$ , pflanzliche Substanzen wie Kampfer, Eugenol, Carvacrol
<b>TRPV 4</b>	ZNS (große Neurone), TG, Herz, Leber, Niere (epitheliale Tubulus- und Glomeruluszellen), Haut (Keratinozyten), Osteoblasten, Blutgefäße (Endothel), Blase (Urothel) Hoden, Cochlea	Temperaturempfinden, Mechanorezeption, Osmorezeptor, Nozizeption, Modulation von Zellmigration, Mechanorezeptor im Urothel (wichtig für Kontinenz), vasomotorische Kontrolle im Endothel, osteogene und osteoklastische Funktion, bedeutend bei neurodegenerativen und orthopädischen Krankheiten	Temperaturbereich $27\text{-}34^{\circ}\text{C}$ , Hypoosmolarität, Phorbol ester, $5^{\prime}\text{-}6^{\prime}\text{-EET}$
<b>TRPM2</b>	Gehirn, Knochenmark, periphere Blutzellen (Granulozyten), Lunge, Milz, Auge, Herz, Leber	Granulozytenaktivierung, Insulinfreisetzung im Pankreas, bedeutend für Apoptose, Reaktion auf oxidativen und nitrosativen Stress	Temperaturbereich $35^{\circ}\text{C}\text{-}42^{\circ}\text{C}$ , oxidativer und nitrosativer Stress: ADP-Ribose, NAD

<b>TRPM4</b>	Herz, Pankreas, Mastzellen, glatte Muskelzellen, Macula densa, Lunge, Plazenta	Mastzellmigration und-degranulation durch $Ca^{2+}$ -Regulation als $Ca^{2+}$ undurchlässiger Kationenkanal, Katecholaminfreisetzung aus chromaffinen Zellen, Vasopressinfreisetzung aus dem Hypothalamus	Temperaturbereich 15-35°C, $Ca^{2+}$
<b>TRPM5</b>	Zunge (Geschmacksknospen), Lunge, Hoden, GIT, Gehirn, endokriner Pankreas	Geschmack (süß, bitter, umami), positiver Regulator der Glukose- induzierten Insulinfreisetzung, trigeminaler nasaler Chemosensor	Temperaturbereich 15-35°C, $Ca^{2+}$
<b>TRPM8</b>	Sensorische DRG und TG, Ganglion nodosum (Innervation von oberem GIT), glatte Gefäßmuskulatur, Leber, Magenfundus, Blase (Urothel), männlicher Genitaltrakt, hohe Expression in Tumoren (Prostata, Brust, Kolon, Lunge und Haut)	Temperaturempfinden, Spermamotilität, Akrosomreaktion	Temperaturbereich 8-28°C, Menthol, Icilin
<b>TRPA1</b>	Haarzellen, sensorische DRG und TG, Fibroblasten	Temperaturempfinden, vielseitigster Chemosensor, Nozizeption, Olfaktorik, kälte-induzierte Kontraktion (Kolon, Blase)	Kälte $\leq 17^\circ C$ , Icilin, Cannabinoide (THC), Zimtaldehyd, Diallyldisulfid (u.a.in Knoblauch), Isothiocyanate (in Senf, Meerrettich)

**Tabelle 2: Überblick über die Eigenschaften thermosensitiver TRP- Kanäle**

Abkürzungen: DRG= Dorsal root ganglion/Hinterwurzelganglion, TG= trigeminales Ganglion, GIT= Gastrointestinaltrakt, EET=Epoxyeicosatriensäuren, ZNS= Zentrales Nervensystem (modifiziert von Nilius und Owsianik, 2011; Montell, 2005 ; Wu et al., 2010; Saito und Shingai, 2006)

### 1.3.4. Der TRPV1- Rezeptor

Der TRPV1-Rezeptor wurde 1997 von Caterina et al. in Nozizeptoren als Capsaicin-Rezeptor, der als Sensor und Überträger für schmerzhafte thermale Reize fungiert, charakterisiert und erstmals kloniert. Wie bei den meisten Vertretern der TRP-Familie (vgl. Kapitel 1.4) ist auch der TRPV1-Rezeptor ein nicht selektiver Kationenkanal mit einer hohen Durchlässigkeit für Calcium. Für seine Permeabilität gilt:  $\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Na}^+ \cong \text{K}^+$  (Caterina et al., 1997). Als polymodaler Rezeptor kann der TRPV1-Rezeptor zum einen durch thermische Reize  $\geq 43^\circ\text{C}$  und zum anderen chemisch z.B. durch Protonen aktiviert werden. Capsaicin (der scharfe Stoff der Chilischote) und Resiniferatoxin (die Substanz von *Euphorbia resinifera* aus der Familie der Wolfmilchgewächse) stellen pflanzliche Agonisten des TRPV1-Rezeptors dar (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998). Auch tierische Gifte von Nesseltieren, wie das Gift der Würfelqualle, oder Gifte von Vogelspinnen, z.B. das double-knot Toxin der *Ornithoctorinae* können den TRPV1-Rezeptor aktivieren (Cuypers et al., 2006; Bohlen et al., 2010). Nach der Aktivierung des TRPV1-Rezeptors öffnet sich der von ihm gebildete Ionenkanal und Natrium- und Calciumionen strömen in die Zelle, was eine Depolarisation der Zelle begünstigt (Greffrath, 2006). Thermische Reize, Capsaicin und die tierischen Gifte vermitteln so über die Stimulierung des TRPV1-Rezeptors in sensorischen Nervenendigungen ein Schmerzsignal an das ZNS, der als brennend wahrgenommen wird.

Der TRPV1-Rezeptor wird hauptsächlich in neuronalen Geweben wie in peripheren nozizeptiven Fasern und deren zugehörigen Spinalganglien, in den Laminae I und II des Hinterhorns des Rückenmarks und in zerebralen Arealen (Thalamus, Hypothalamus, periaquäduktales Grau) exprimiert (Caterina et al., 1997; Tominaga et al., 1998; Helliwell et al., 1998; Cristino et al., 2006; Roberts et al., 2004). Eine weit verbreitete Expression der TRPV1-Rezeptoren lässt sich ebenso in extraneuronalen Geweben feststellen (s. Tabelle 2).

Um die Funktionen des TRPV1-Rezeptors in Nozizeptoren zu verdeutlichen, wurden Verhaltenstestungen an TRPV1<sup>-/-</sup>-Mäusen durchgeführt. Mäuse, die keinen TRPV1-Rezeptor exprimierten, zeigten im Gegensatz zum Wildtyp kein schmerzassoziertes Verhalten nach intraplantarer Vanilloid-Applikation (Capsaicin/ Resiniferatoxin) und bei Temperaturen über 50°C eine reduzierte Schmerzsensitivität im Hot Plate Test (Caterina et al., 2000). Nach schmerzhaften mechanischen Stimuli dagegen lässt sich zwischen Wildtyp und Knockout-Mäusen keine unterschiedliche Reizantwort feststellen (Caterina et al., 2000). Der TRPV1-Rezeptor ist auch an der Entstehung der thermalen Hyperalgesie unter inflammatorischen Bedingungen beteiligt: Die intraplantare Injektion von

entzündungsförderndem Freundes Adjuvans (CFA) oder Carageen reduziert beim Wildtyp im Gegensatz zu TRPV1<sup>-/-</sup>-Mäusen die Pfotenrückzugsschwelle im Plantartest (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). Zudem stellen Entzündungsmediatoren endogene Liganden des TRPV1-Rezeptors dar und aktivieren direkt oder indirekt den TRPV1-Rezeptor. Metabolite der Arachidonsäure beispielsweise aktivieren den TRPV1-Rezeptor direkt, Bradykinin und Nerve Growth Factor hingegen erhöhen seine Aktivität indirekt über die Aktivierung eigener Rezeptoren, indem sie eine von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) vermittelte Hemmung des TRPV1-Rezeptors aufheben (Hwang et al., 2000; Chuang et al., 2001). Während die Regulation des TRPV1-Rezeptors durch PIP2 in den letzten Jahren kontrovers diskutiert wurde, bestärkt eine aktuelle Studie die Annahme, dass PIP2 zu einer verminderten Aktivität des TRPV1-Rezeptors führt (Cao et al., 2013).

Sensibilisiert wird der TRPV1-Rezeptor durch eine Phosphorylierung, die durch proinflammatorische Substanzen, wie beispielsweise den TNF, ausgelöst und über unterschiedliche Kinasen vermittelt wird. Es sind verschiedene Sensibilisierungswege bekannt:

#### 1. Herabsetzung der Aktivierungsschwelle

Die thermische Aktivierungsschwelle des TRPV1-Rezeptors wird durch einen Proteinkinase C-abhängigen Signalweg herabgesetzt, so dass dieser bereits bei geringeren Temperaturen ab 41°C (normal: 43°C, s. Tabelle 2) aktiv ist (Constantin et al., 2008). TNF und die Entzündungsstoffe Prostaglandin E2 und Prostaglandin I2 sensibilisieren auf diesem Weg den Hitzerezeptor (Constantin et al., 2008; Moriyama et al., 2005).

#### 2. Verstärkte Wirkung von Agonisten

In Anwesenheit der proinflammatorischen Substanz Bradykinin, einem Induktor der Proteinkinase C, lösen Agonisten wie Capsaicin, Anandamid oder Protonen in der gleichen Konzentration eine potenzierte TRPV1-Wirkung und damit stärkere Membranströme aus (Vellani et al., 2001). Auch in Anwesenheit von TNF werden die von Capsaicin ausgelösten TRPV1-vermittelten Ionenströme vergrößert (Constantin et al., 2008).

### 3. Expressionssteigerung von TRPV1-Rezeptoren

Durch einen von NGF induzierten Signalweg, in dem die Phosphoinositid-3-Kinase (PI 3-Kinase) eine wichtige Rolle spielt, wird der TRPV1-Rezeptor phosphoryliert und die Membraninsertion weiterer TRPV1-Rezeptoren veranlasst (Zhang et al., 2005). Nach Langzeitapplikation verstärkt TNF in DRGs die Expression der TRPV1-Rezeptoren (Hensellek et al., 2007).

Zusammenfassend sensibilisieren proinflammatorische Substanzen unter Verwendung komplexer Signalwege den TRPV1-Rezeptor und bedingen so die Entstehung einer thermalen Hyperalgesie. TNF spielt eine bedeutende Rolle in der Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors und damit in der Pathophysiologie der thermalen Hyperalgesie.

#### **1.4. Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen**

In den letzten Jahren hat sich das Diagnose- und Behandlungskonzept neuropathischer Schmerzen gewandelt. Während neuropathische Schmerzsyndrome zuvor nach ätiologischen Gesichtspunkten klassifiziert und therapiert wurden, rücken nun pathophysiologische Gesichtspunkte stärker in den Vordergrund. So entwickelten Scholz et al. 2009 eine standardisierte Einteilung für chronische Schmerzen, in denen die Patienten nach Beantwortung von Fragebögen und Ergebnissen klinischer Untersuchungen in Subgruppen eingeteilt wurden, die die Unterscheidung zwischen neuropathischen und nicht- neuropathischen Schmerzen ermöglichen soll (Scholz et al., 2009). Diese symptomorientierte Einteilung könne z.B. mit hoher Sensitivität und Spezifität zwischen radikulären und nicht-neuropathischen Rückenschmerzen differenzieren. Die Autoren gehen davon aus, dass die so entstandenen Subgruppen sich auch in den zugrundeliegenden Pathomechanismen unterscheiden und diese Einteilung zudem in der Behandlung neuropathischer Schmerzen von großem Nutzen sein könnte (Scholz et al., 2009). Laut dieser Studie ist es auch für das therapeutische Konzept wichtig, die pathophysiologischen Prozesse nachzuvollziehen.

##### **1.4.1. Sensibilisierungsmechanismen**

Unter physikalischen Bedingungen löst eine Aktivierung der Nozizeptoren, die eine hohe Reizschwelle für thermische, mechanische und chemische Reize aufweisen, einen akuten Schmerz aus, der einen Gewebeschaden deklariert. Nach einer Läsion des Nervensystems treten zelluläre und molekulare Veränderungen auf, die sich zunächst in einer erniedrigten Erregungsschwelle und einer Spontanaktivität der Nozizeptoren äußern (periphere Sensibilisierung). Durch diese Vorgänge wird eine zentrale Sensibilisierung

bedingt, die schließlich zu chronischen Schmerzsyndromen führt (Baron et al., 2010). Im Folgenden wird detaillierter auf die Vorgänge der peripheren und zentralen Sensibilisierung eingegangen.

#### **1.4.2. Zentrale Sensibilisierung**

Die Mechanismen der peripheren Sensibilisierung münden in einer Übererregbarkeit der Nozizeptoren, die eine kontinuierliche Aktivität afferenter nozizeptiver Nervenfasern erzeugen. Durch die anhaltenden Entladungen werden auf Rückenmarksebene exzitatorische Aminosäuren (v.a. Glutamat) und Neuropeptide freigesetzt (Baron et al., 2010). Diese Neurotransmitter induzieren postsynaptische Veränderungen an sekundären Neuronen und vermitteln dadurch die zentrale Sensibilisierung (Baron et al., 2010). Laut IASP wird darunter ein gesteigertes Antwortverhalten nozizeptiver Neurone im zentralen Nervensystem auf normale oder unterschwellige Reize verstanden. Da diese Definition Unschärfen beinhaltet, wird der Begriff der zentralen Sensibilisierung im Folgenden als Vorgang verstanden, der zu einer verstärkten Schmerz Wahrnehmung führt (Sandkühler, 2007). Die Langzeitpotenzierung (LTP) stellt einen wichtigen zellulären Mechanismus der zentralen Sensibilisierung dar und induziert eine langanhaltende Steigerung der synaptischen Transmission (Sandkühler, 2007). Vermittelt wird die LTP über einen intrazellulären Calciumanstieg, der über calciumabhängige Signalwege verschiedene Proteinkinasen induziert (Sandkühler, 2007). Für den intrazellulären Calciumanstieg kommen verschiedene Rezeptoren in Betracht; auf spinaler Ebene sind dabei das Neuropeptid Substanz P und der zugehörige NK-1 (Neurokinin 1)-Rezeptor wichtig (Sandkühler, 2007; Khasabov et al., 2002). Infolge dieser Veränderungen sind die sekundären afferenten Hinterhornneurone übererregbar, ihre Erregungsschwelle wird gesenkt und sie können bereits durch niederschwellige, mechanosensitive A $\beta$ - und A $\delta$ -Fasern erregt werden (Baron et al., 2010). Taktile Reize werden dann als schmerzhaft empfunden, klinisch entsteht eine Allodynie (Baron et al., 2010). Nicht nur die Verstärkung pronozizeptiver Faktoren, sondern auch die Abschwächung antinozizeptiver Systeme tragen zur zentralen Sensibilisierung und zur Entwicklung neuropathischer Schmerzen bei. In Tiermodellen wurde nach peripherer Nervenläsion im zugehörigen Rückenmarkssegment eine verminderte Expression von  $\mu$ -Opioidrezeptoren in den Hinterwurzelganglien festgestellt (Kohno et al., 2005). Und in weiteren Tiermodellen zur diabetischen Neuropathie konnte eine Reduktion inhibitorischer GABA-( $\gamma$ -Aminobuttersäure) Rezeptoren belegt werden (Wang et al., 2011). Studien an Patienten mit einem komplexen regionalen Schmerzsyndrom (CRPS) bestätigen die Ergebnisse. Dieses Schmerzsyndrom ist charakterisiert durch motorische, sensorische und autonome Funktionsstörungen; die Hauptsymptome sind spontaner und evozierter Schmerz (Seifert

et al., 2009). Bei CRPS-Patienten konnte im Vergleich zu gesunden Probanden eine verringerte Adaptation auf schmerzhafte elektrische Reize an der betroffenen und der gesunden Hand festgestellt werden (Seifert et al., 2009). Laut den Autoren spiegelt das eine verminderte Aktivität des endogenen antinozizeptiven Systems wider (Seifert et al., 2009). Ein weiterer Faktor, der zur zentralen Sensibilisierung beiträgt, sind kortikale neuroplastische Veränderungen. Patienten mit einem Karpaltunnelsyndrom, die im Allgemeinen unter Schmerzen und Parästhesien in den ersten drei Fingern leiden, und gesunde Probanden wurden anhand der fMRT (funktionelle Magnetresonanztomographie) untersucht. Nach Stimulation des zweiten und dritten Fingers zeigten sich bei betroffenen Patienten im kontralateralen somatosensorischen Kortex großflächigere Aktivierungen als bei den gesunden Personen (Napadow et al., 2006). Diese maladaptive kortikale Plastizität kann durch geeignete Therapiemaßnahmen wie Akupunktur korrigiert werden (Napadow et al., 2007).

### **1.4.3. Periphere Mechanismen**

Nach der Läsion eines Axons eines peripheren Nervens kommt es im Rahmen der Waller-Degeneration zu einer Infiltration von Immunzellen. Durch Gentranskription, veränderte Rezeptorexpression oder posttranslationale Prozesse wie Phosphorylierung wird die Erregungsschwelle der Rezeptoren gesenkt und die Antwort auf noxische Reize verstärkt. Klinisch äußern sich diese Vorgänge als Hyperalgesie und Allodynie (Cheng et al., 2008).

Der einschießende Spontanschmerz im Rahmen neuropathischer Schmerzen erklärt sich durch ektopere Entladungen (Cheng et al., 2008), die durch veränderte Expressionsmuster von Ionenkanälen bedingt sind. In der Entstehung des ektopen Aktionspotentials sind vor allem Natriumkanäle bedeutend (Aurilio et al., 2008). So wurde bei Ratten nach Axotomie die mRNA des spannungsabhängigen Natriumkanals  $Na_v1.3$ , die eigentlich nur embryonal exprimiert wird, in adulten Spinalganglien nachgewiesen (Waxman et al., 1994). Und bei Patienten mit peripherer Nervenverletzung konnte in Neuomen belegt werden, dass bestimmte Natriumkanäle ( $Na_v1.3$ ,  $Na_v1.7$ ,  $Na_v1.8$ ) vermehrt exprimiert werden (Black et al., 2008). Die Trigeminusneuralgie äußert sich durch blitzartig einschießende Schmerzen und geht ebenfalls mit veränderten Expressionen von Natriumkanälen einher:  $Na_v1.3$  ist vermehrt und  $Na_v1.7$  vermindert exprimiert (Siqueira et al., 2009). Calciumkanäle tragen entscheidend zur Erhaltung der depolarisierenden Prozesse bei. Durch die erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration werden über Signalkaskaden Kinasen aktiviert, die durch Phosphorylierung die Effektivität weiterer Membranproteine (u.a. weitere Calciumkanäle) verstärken (Aurilio et al., 2008). Diese pathophysiologischen Veränderungen erklären die effektive Behandlung neuropathischer Schmerzen durch

Antikonvulsiva, die spannungsabhängige Natrium- bzw. Calciumkanäle blockieren. Die Spontanaktivität tritt nicht nur in geschädigten, sondern auch in benachbarten intakten Axonen auf (Wu et al., 2002). Studien zu TRPV1 bestätigen, dass in unmittelbarer Nähe liegende unverletzte Axone und deren Veränderungen für die Entwicklung neuropathischer Schmerzen ebenfalls bedeutend sind. Tierexperimentell wurde bewiesen, dass der TRPV1-Rezeptor nach partieller Nervenläsion in unverletzten Spinalganglien vermehrt exprimiert wird und in vorherigen TRPV1-negativen Spinalganglien nachweisbar ist (Hudson et al., 2001; Rashid et al. 2003). Dies trägt vermutlich zur Sensibilisierung für thermische Reize und damit zur klinischen Hyperalgesie bei. Die TRPV1-Rezeptoren können durch gesteigerte Expression, die verminderte Erregungsschwelle und die Sensibilisierung durch Phosphorylierung bereits durch normale Körpertemperaturen aktiviert werden und so wiederum zur ektopen Aktivität der Nervenfasern führen (Baron et al. 2010).

#### **1.4.4. Bedeutung von TNF bei neuropathischen Schmerzen**

TNF, auch als Kachexin, (Aggarwal et al., 2012), stellt ein Schlüsselmolekül im Rahmen der Immunreaktion auf systemische akute und chronische Entzündungen dar und stimuliert die Produktion weiterer Zytokine. Es spielt aber auch in vielen anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. So verursacht es in Tumorzellen Nekrose und Apoptose, ist an der embryonalen Entwicklung beteiligt, führt nach chronischer Exposition zu Kachexie und Depressionen und ist in der Pathogenese zahlreicher Autoimmunerkrankungen (Rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn) von zentraler Bedeutung (zum Überblick: Chu, 2013).

Nach einer Nervenläsion trägt die Freisetzung von proinflammatorischen Signalstoffen, v.a. von TNF entscheidend zur Entwicklung des neuropathischen Schmerzes bei. Synthetisiert wird TNF nach einer Nervenverletzung von inflammatorischen Zellen vor allem von Makrophagen im ZNS (Mikrogliazellen, Astrozyten) und im peripheren Nervensystem von Schwannzellen (Ohtori et al., 2004). Das Zytokin vermittelt seine Effekte über zwei Rezeptoren: der Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1 (TNFR1, p55-R) wird konstitutiv exprimiert, TNFR2 (p75-R) ist unter inflammatorischen Bedingungen induzierbar (Clark et al., 2013).

Zahlreiche Studien verdeutlichen die bedeutende Rolle von TNF: In einem Tiermodell für neuropathische Schmerzen werden lockere Ligaturen um den N.ischiadicus gelegt (chronic constrictive injury = CCI) und so eine periphere Nervenläsion, die mit einer Hyperalgesie einhergeht, induziert. In diesem Tiermodell steigt die TNF-Expression in

verletzten und in benachbarten unverletzten Hinterwurzelganglien an (Schäfers et al., 2003a). Die Auswirkungen des freigesetzten TNFs werden durch exogene TNF-Applikationen und nachfolgende Verhaltenstestungen am Rattenmodell verdeutlicht. Die Injektion von TNF in DRGs ruft eine taktile Allodynie bei Ratten hervor. Intraplantare TNF-Injektion bewirkt bei Ratten eine thermale Hyperalgesie (Constantin et al., 2008) und auch nach epineuraler oder intrathekaler TNF-Applikation wird in Verhaltenstestungen eine mechanische Allodynie und eine thermale Hyperalgesie an Ratten festgestellt (Sorkin und Doom, 2000; Youn et al., 2008; Gao et al., 2009). Bei Ratten, die zuvor eine Spinalnervenligatur bekommen hatten, führte die TNF-Injektion in die betroffenen Hinterwurzelganglien in geringerer Dosierung zu einer schneller entstehenden taktilen Allodynie (Schäfers et al., 2003b). Diese Ergebnisse lassen sich elektrophysiologisch bekräftigen. *In vitro* löst die TNF-Applikation an normalen DRGs kurzzeitige Entladungen aus (Schäfers et al., 2003b), an geschädigten DRGs ließen sich bereits bei niedrigeren TNF-Dosierungen schneller entstehende, höhere und länger anhaltende Entladungen feststellen (Schäfers et al., 2003b). Wichtig dabei ist, dass diese Sensibilisierung für TNF ebenso wie die erhöhte TNF-Expression auch an in unmittelbarer Nähe gelegenen unverletzten DRGs beobachtet werden konnte (Schäfers et al., 2003b). *In vivo* äußert sich die Sensibilisierung dadurch, dass sich die nach einer Spinalnervenligatur entstandene taktile Allodynie auch auf benachbarte, nicht betroffene Dermatome erstreckt (Schäfers et al., 2003b). Das nach einer Nervenligatur induzierte Schmerzverhalten kann durch intrathekale präemptive Injektion des TNF-Antikörpers Etanercept verhindert werden (Svensson et al., 2005).

Die beiden TNF-Rezeptoren werden sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen exprimiert (Clark et al., 2013) und nach peripherer Nervenläsion in DRGs und dem Rückenmark hochreguliert (Ohtori et al., 2004; Schäfers et al., 2003c). Bislang ist noch nicht gänzlich geklärt, welcher Subtyp welche Funktion im Entstehungsprozess des neuropathischen Schmerzes einnimmt. Durch Studien mit selektiven TNFR1- bzw. TNFR2-Agonisten kann vermutet werden, dass TNFR1 unter physiologischen Bedingungen stärker an der Übertragung nozizeptiver Signale durch TNF beteiligt ist, während TNFR2 unter pathologischen Bedingungen wie nach Nervenverletzungen bedeutender wird (Schäfers et al., 2008). In TNFR1- und TNFR2-Knockout-Mäuse wurde gezeigt, dass sich nach intrathekaler TNF-Applikation keine thermale Hyperalgesie (Zhang et al., 2011).

TNF erhöht nach intrathekaler Injektion über einen TNFR1-abhängigen Signalweg MCP-1 (monozyte chemoattractant protein-1) in Astrozyten (Gao et al., 2009). Dieses Protein aktiviert extrazelluläre Kinasen, verstärkt die exzitatorische synaptische Überleitung und

die über den NMDA- Rezeptor vermittelten Ströme. Unter anderem über dieses Protein trägt TNF so vermutlich auch zur zentralen Sensibilisierung bei (Gao et al., 2009).

TNF sensibilisiert auch den TRPV1-Rezeptor und spielt somit eine entscheidende Rolle in der Entstehung der thermalen Hyperalgesie. In kultivierten DRGs erhöht TNF nach Langzeitapplikation (24-48 h) die TRPV1-Rezeptorexpression (Hensellek et al., 2007). Höchstwahrscheinlich wird die zunehmende Expression über einen TNFR1-abhängigen Signalweg und extrazelluläre Kinasen vermittelt; in vielen Hinterwurzelganglien konnte eine Kolokalisation des TNFR1- und des TRPV1-Rezeptors bewiesen werden (Hensellek et al., 2007). Auch kurzfristige Effekte des TNF auf den TRPV1- Rezeptor konnten nachgewiesen werden, so verstärkt TNF die Sensibilität des präsynaptischen TRPV1-Rezeptors gegenüber seinem endogenen Agonisten N-Oleoyl Dopamin (Spicarova und Palecek, 2010). Da in diesem Experiment Rückenmarksschnitte untersucht wurden, kommt die erhöhte TRPV1-Rezeptorexpression in DRGs für diese Beobachtung nicht in Frage. Die Autoren nehmen an, dass eine Phosphorylierung des TRPV1-Rezeptors, die durch TNF initiiert wurde, zur Signalverstärkung beiträgt (Spicarova und Palecek, 2010). Eine Phosphorylierung des TRPV1-Rezeptors wird auch bei Ionenströmen, die durch Capsaicin oder Hitze ausgelöst wurden und durch TNF verstärkt werden, angenommen. Daran beteiligt sind p38/MAP-Kinasen und Proteinkinase C-abhängige Signalwege, die zu einer Sensibilisierung des TRPV1-Rezeptors führen (Constantin et al., 2008).

Elektrophysiologische Untersuchungen zeigen, dass in DRG-Neuronen sowohl TNF als auch Capsaicin unter repetitiver Depolarisation Ionenströme durch spannungsabhängige Calciumkanäle (voltage activated calcium channels, VACC) reduzieren (Hagenacker et al, 2005; Hagenacker et al., 2010). Werden nozizeptive Neurone mit TNF inkubiert und anschließend die von Capsaicin ausgelösten über TRPV1-vermittelten Calciumströme der VACCs gemessen, sind diese deutlich reduziert. Unter dem Einfluss von TNF werden VACCs somit für Capsaicin sensibilisiert. Eine wahrscheinliche Erklärung dafür bietet die durch TNF ausgelöste erhöhte TRPV1-Expression (Hagenacker et al., 2010). Dieser Studie zufolge scheinen TRPV1-Agonisten gegenüber TRPV1-Antagonisten bei der Behandlung neuropathischer Schmerzen vielversprechender zu sein, da sie unter pathologischen Bedingungen eine verstärkte Blockade der Calciumkanäle und damit einen zusätzlichen analgetischen Effekt ausüben (Hagenacker et al., 2010).

### **1.5. Selektive TRPV1- Rezeptor Analoga**

Zuvor wurde erläutert, dass der TRPV1-Rezeptor für die Wahrnehmung und die Übertragung noxischer thermaler Reize und insbesondere auch für die Entwicklung der

thermalen Hyperalgesie bedeutend ist. Für gezieltere Therapiemöglichkeiten wurden deshalb TRPV1-selektive Pharmaka entwickelt. Dabei zeigte sich, dass sowohl Agonisten als auch Antagonisten des TRPV1-Rezeptors eine analgetische Potenz aufweisen.

### **1.5.1. TRPV1-Antagonisten**

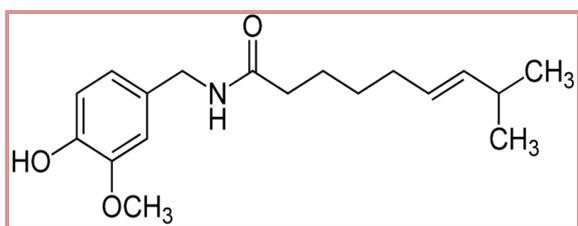
Die Wirkungsweise der TRPV1-Antagonisten beruht auf einer Blockade des TRPV1-Rezeptors, so dass eine Aktivierung des TRPV1-Rezeptors durch endogene Liganden im Rahmen eines entzündlichen Geschehens verhindert wird (Trevisani und Gatti, 2013). Zu den länger bekannten TRPV1-Antagonisten zählen das Capsaicin-Analogon Capsazepin und Ruthenium-Red (Caterina et al., 1997). Aus der großen Gruppe der entwickelten TRPV1-Antagonisten konnten viele Substanzen erfolgreich zur analgetischen Therapie bei Ratten in neuropathischen und inflammatorischen Schmerzmodellen (Pomoni et al., 2003), in Tumorschmerzmodellen (Shinoda et al., 2008) und in Schmerzmodellen zur Arthrose (Puttfarcken et al., 2010) eingesetzt werden. In einer klinischen Studie wurde nach analgetischer Therapie mit dem TRPV1-Antagonisten AMG 517 ausgeprägte Hyperthermien teilweise über 40°C festgestellt (Gavva et al., 2008). In einer weiteren Studie mit einem TRPV1-Antagonisten (ABT-102) blieb zwar die Körpertemperatur konstant unter 39° C, es wurde aber eine signifikante, dosisabhängige Erhöhung der thermischen Schmerzschwelle und ein vermindertes Schmerzempfinden auf überschwellige thermische Reize gemessen (Rowbotham et al., 2011), wodurch für die Probanden z.B. ein erhöhtes Verbrennungsrisiko besteht. Aufgrund der ausgeprägten Nebenwirkungen wurde eine 2. Generation der TRPV1-Antagonisten entwickelt. Neue TRPV1-Antagonisten, die zwar die Capsaicin vermittelte TRPV1-Aktivierung verhindern, die über Protonen ausgelöste Aktivierung aber nicht effektiv blocken, zeigen im Tiermodell keine hyperthermischen Nebenwirkungen (Watabiki et al., 2011). Ihre analgetische Potenz konnte bereits bei neuropathischen und inflammatorischen Schmerzen im Tiermodell bewiesen werden. In höheren Dosierungen tritt als Nebenwirkung eine Hypothermie auf (Watabiki et al., 2011) so dass weitere klinische Studien nötig sind, um die Nebenwirkungen der neuen TRPV1-Antagonisten beurteilen zu können.

### **1.5.2. TRPV1- Agonisten**

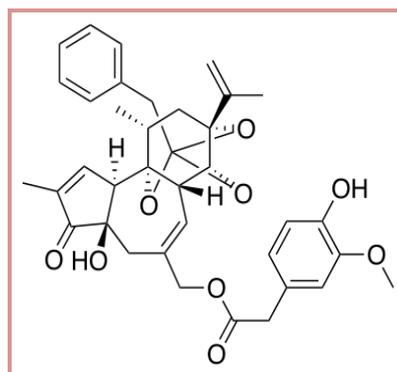
Der wohl bekannteste und älteste TRPV1-Agonist ist Capsaicin. Die Anwendung von capsaicinhaltigen Cremes verdeutlicht das Wirkungsprinzip der TRPV1-Agonisten: Initial lösen die Cremes einen brennenden, stechenden Schmerz im behandelten Hautareal aus, das einer Aktivierung des Hitzerezeptors entspricht (Nolano et al., 1999). Nach repetitiver Gabe befinden sich die betroffenen TRPV1-Rezeptoren in einem refraktären Zustand und können längere Zeit nicht mehr erregt werden; diese Desensibilisierung

äußert sich als Hypoalgesie und geht mit einer reversiblen Degeneration epidermaler Nervenfasern einher (Nolano et al., 1999). Topisches Capsaicin wird beispielsweise bei neuropathischen oder muskuloskelettalen Schmerzen verwendet, es hat aber in der üblichen Dosierung nur eine mäßige Effizienz (Mason et al., 2004). Da die Nebenwirkungen eine Dosiserhöhung beschränken, wurden lokale Injektionen, hochkonzentrierte Pflaster oder auch flüssige Darreichungsformen von Capsaicin untersucht (Brederson et al., 2013). Pflaster mit 8% hochkonzentriertem Capsaicin werden nach erfolgreichen Studien in Europa zur Therapie peripherer neuropathischer Schmerzen eingesetzt (Anand und Bley, 2011). Studien zur Wirksamkeit von Capsaicin in flüssiger Form (NGX-1998) in den Konzentrationen 10 % und 20% zur Behandlung der postzosterischen Neuralgie sind abgeschlossen, Resultate stehen aber zur Zeit noch aus (vgl. Website NIH unter der Studiennummer NCT01228838).

Ein neu entdeckter TRPV1-Agonist ist Palvanil. Palvanil kommt in geringen Mengen in Paprikagewächsen vor und ist im Vergleich zu Capsaicin eher mild. Erste Studien am Mausmodell belegen, dass Palvanil nach intraperitonealer Injektion bei neuropathischen und inflammatorischen Schmerzen wirksam ist (Luongo et al., 2012). Nach systemischer Applikation treten zwar die für TRPV1-Agonisten typischen Nebenwirkungen wie Hypothermie und Bronchokonstriktion auf, sind aber bei Palvanil signifikant geringer ausgeprägt als bei Capsaicin (Luongo et al., 2012).



(1)



(2)

**Abbildung 3: Chemische Strukturen von Capsaicin (1) und Resiniferatoxin (2)**

### 1.5.2.1. Resiniferatoxin

Resiniferatoxin (RTX) ist mit einer mittleren effektiven Konzentration von  $EC_{50} \approx 40$  nM im Vergleich zu Capsaicin ( $EC_{50} \approx 712$  nM) ein vielfach stärker wirksamer TRPV1-Agonist (Caterina et al., 1997).

In elektrophysiologischen Untersuchungen wurde bewiesen, dass RTX verglichen mit Capsaicin irreversibel an den TRPV1-Rezeptor bindet und über eine sich langsamer entwickelnde TRPV1-Aktivierung länger anhaltende nach intrazellulär gerichtete Calciumeinströme induziert (Raisinghani et al., 2005). In geringen Konzentrationen (RTX = 3pM) depolarisiert RTX langsam und anhaltend die Membran und verhindert damit die Entstehung von Aktionspotentialen (Raisinghani et al., 2005).

In weiteren Studien wurde der Einfluss von RTX auf die synaptischen Ströme zwischen Spinalganglien und Hinterhornneuronen des Rückenmarks untersucht und festgestellt, dass RTX die Frequenz spontaner exzitatorischer postsynaptischer Ströme (EPSCs) erhöht (Jeffry et al., 2009). Vermutlich geschieht dies über präsynaptische Rezeptoren, die über eine TRPV1-Aktivierung angeregt werden und die Freisetzung von Neurotransmittern erhöhen (Jeffry et al., 2009). Die Entstehung von evozierten EPSCs wird durch präsynaptische Mechanismen verhindert, was wahrscheinlich zur einer kurzzeitigen Blockierung der nozizeptiven Weiterleitung führt und schließlich die Schmerzwahrnehmung verhindert (Jeffry et al., 2009).

Immunhistochemische Untersuchungen zeigen, dass intrathekale RTX-Applikation bei Ratten langfristig zu einem Rückgang von TRPV1-Rezeptoren an zentralen Nervenendigungen führt (Jeffry et al., 2009). Dies ist vermutlich durch einen TRPV1-vermittelten Calciumeinstrom bedingt, der zu einer Ablation der Nervenendigungen führt (Jeffry et al., 2009; Bishnoi et al., 2011). Die Anzahl der TRPV1-Rezeptoren in Spinalganglien und an peripheren Nervenendigungen blieb von der intrathekalen RTX-Injektion unbeeinflusst (Jeffry et al., 2009).

Verhaltensstudien unterstützen diese Ergebnisse. Intraplantare Capsaicin-Injektionen führen zu einem gesteigerten Schmerzverhalten und zu einer thermalen Hyperalgesie mit verminderter Pfotenrückzugsschwelle im Plantartest (Gilchrist et al., 1996). Diese Capsaicinwirkungen können durch intrathekale oder intraperitoneale RTX-Applikation ebenso verhindert werden wie die durch Carrageen ausgelöste inflammatorische thermale Hyperalgesie (Jeffry et al., 2009). Die mechanische Sensibilität bleibt nach intraperitonealer oder intrathekaler RTX-Applikation unbeeinflusst (Bishnoi et al., 2011;

Jeffry et al., 2009). Ein entscheidender Vorteil der intrathekalen RTX-Applikation ist, dass die physiologische thermale Sensibilität weitestgehend unverändert erhalten bleibt, während nach intraperitonealer Injektion ein Anstieg der Pfotenrückzugsschwelle gemessen wurde (Bishnoi et al., 2011). Die intrathekale RTX-Injektion stellt somit eine selektive Therapiemöglichkeit dar, die die Übertragung thermaler nozizeptiver Signale aufhalten kann; dabei bleiben sensorische efferente Funktionen, wie die über TRPV1-vermittelte Freisetzung von Substanz P, und die Reaktion auf unschädliche thermale Reize erhalten (Jeffry et al., 2009). In anderen Tiermodellen wurde die antinozizeptive Wirksamkeit dieser neuen Therapiemöglichkeit bereits bekräftigt. Eine vorausgegangene Studie zu spontanen Knochentumoren bei Hunden bestätigt die thermale analgetische Potenz intrathekalen RTX-Applikation bei Krebserkrankungen (Brown et al., 2005). Es traten vorübergehend hämodynamische Nebenwirkungen wie Blutdruck- und Herzfrequenzanstieg auf und es wurde – im Gegensatz zu den Studien von Jeffry und Bishnoi - ab einer Konzentration von 1,2 µg/kg KG auch bei der gesunden Hundepopulation eine erhöhte Pfotenrückzugsschwelle gemessen (Brown et al., 2005). Die intrathekale RTX-Applikation zeigte bei Mäusen einen geringen Einfluss auf die thermale Sensibilität und übt einen analgetischen Effekt erst nach Inflammation durch Carrageen vollständig aus (Mishra et Hoon, 2010). Karai und seine Mitarbeiter stellten eine dosisabhängige Erhöhung der Pfotenrückzugsschwelle nach intrathekalen RTX-Injektion (RTX= 10-200 ng) bei Ratten fest und ebenfalls eine Blockierung der inflammatorischen thermalen Hyperalgesie (Karai et al., 2004). Durch weitere Verhaltenstestungen wiesen sie nach, dass die mechanische Sensibilität und die lokomotorische Funktionen, die intakte motorische und propriozeptive Funktionen voraussetzen, durch intrathekale RTX-Gabe nicht beeinflusst werden (Karai et al., 2004). Darüber hinaus verdeutlichen ihre Verhaltenstestungen an Hunden, die an Knochentumoren oder Osteoarthritis litten, die analgetische Wirksamkeit der intrathekalen RTX-Therapie: Eine einzelne Injektion (1µg/kg) erhöhte die tägliche Aktivität der Tiere und verringerte den Opiatbedarf (Karai et al., 2004). Diese Effekte hielten 10 Wochen an (Karai et al., 2004). Gegenwärtig wird die intrathekale RTX-Therapie zurzeit erstmals in einer klinischen Studie an Patienten mit therapierefraktären Schmerzen bei fortgeschrittenen Karzinomkrankungen angewendet. Die Studie des *National Institutes of Health* hat im Dezember 2008 begonnen und die Rekrutierungsphase beendet. Erste Ergebnisse sind ab Juni 2020 zu erwarten (vgl. Website NIH unter der Studiennummer NCT00804154).

## 1.6. Zielsetzung der Arbeit

TNF spielt nach einer Nervenläsion für den Entstehungsprozess neuropathischer Schmerzen eine zentrale Rolle, indem es u. a. den TRPV1-Rezeptor sensibilisiert. In dieser Arbeit wird herausgestellt, ob die akute intrathekale TNF-Injektion im Rattenmodell neuropathische Schmerzen im Rahmen einer thermalen Hyperalgesie und einer taktilen Allodynie auslöst. Dabei soll der zeitliche Verlauf nach intrathekaler TNF-Applikation beobachtet und durch die Verwendung von drei unterschiedlichen TNF-Dosierungen dosisabhängige Effekte verdeutlicht werden.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob nach intrathekaler TNF-Stimulation ein analgetischer Effekt des TRPV1-Agonisten RTX beobachtet werden kann und ob dieser sogar verstärkt auftritt. RTX vermindert als TRPV1-Agonist durch Desensibilisierung die synaptische Transmission zwischen DRG und dem Hinterhorn des Rückenmarks und blockiert so die Weiterleitung des nozizeptiven Signals. In dieser Studie wird deshalb die Modulation der durch TNF-induzierten thermalen Hyperalgesie und/oder taktilen Allodynie durch eine intrathekale RTX-Applikation geprüft. Die Klärung der Fragestellung, ob TRPV1-Agonisten nach Nervenläsionen und damit einhergehenden erhöhter TNF-Expression (verstärkte) analgetische Effekte haben, ist für die zukünftige Forschung neuer Pharmaka zur Behandlung neuropathischer Schmerzen von hoher Relevanz.

Ziele dieser Studie sind demnach, vertiefende Einblicke in die Kenntnisse der Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen unter besonderer Berücksichtigung spinaler Prozesse zu erhalten und diese neuen Erkenntnisse zur weiteren Erforschung selektiver Pharmaka zu nutzen.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchstiere**

Es wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Stamm: CD) mit einem Gewicht von 190-230 g (Charles River, Sülzbach, Deutschland) im Zentralen Tierlabor des Universitätsklinikum Essen gehalten. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei einer konstanten Raumtemperatur, einer konstanten Luftfeuchtigkeit und einem jeweils 12stündigen Tag-/Nachtrhythmus. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Standardfutter und Wasser. Alle dieser Arbeit zugrundeliegenden Tierversuche wurden durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz des Landes NRW (LANUV) genehmigt (TSG G940/07).

### **2.2. Chemikalien**

TNF (Sigma-Aldrich, Deutschland) wurde zusammen mit gelöstem BSA (bovines Serumalbumin; Sigma Aldrich, Deutschland) mit 0,9% NaCl zu den verschiedenen Versuchskonzentrationen von 2 ng, 20 ng und 200 ng verdünnt.

Resiniferatoxin (Alomone labs, Israel) wurde in Ethanol gelöst und entsprechend verdünnt.

### **2.3. Intrathekale Injektion**

Bei der Durchführung einer intrathekalen Injektion ist es wichtig, dass die Möglichkeit einer spinalen Schädigung bei einer Punktion möglichst gering bleibt. Deswegen werden Punktionen unterhalb des Übergangs des Rückenmarks in die Cauda equina durchgeführt. Bei Ratten stellt der Beckengürtel einen guten Orientierungspunkt für diese Höhe zwischen den Wirbelkörpern L5 und L6 dar und wird daher auch zur Lokalisationsbestimmung der direkten transkutanen intrathekalen Injektion angewendet. Nach einer vorherigen inhalativen Kurznarkose mit Isofluran wurden die Ratten in einer Hand gehalten. Auf der Höhe des Beckenknochens wurde mit einer 25 Gauge Nadel, die mit einer Hamiltonspritze verbunden war, senkrecht zur Wirbelsäule die intrathekale Punktion durchgeführt. In Anlehnung an das Protokoll von Mestre et al., 1994 wird bei erfolgreicher Punktion des Subarachnoidalraums eine plötzliche Ausschlagbewegung des Schwanzes beobachtet (Mestre et al., 1994). Nach intrathekaler Injektion mit einem Volumen von 10 µl wurde die Spritze für einige Sekunden noch in der gleichen Position belassen und dann langsam entfernt, um eine weitere versehentliche Applikation zu

verhindern (Mestre et al., 1994). Diese Technik führt in einem hohen Prozentsatz (> 90%) zu einer sicher intrathekalen Injektion des gesamten Volumens.

## 2.4. Verhaltenstestungen

### 2.4.1. Testung der thermalen Hyperalgesie

Die thermale Hyperalgesie wurde mithilfe eines Plantartestes (Ugo Basile) nach der Methode nach Hargreaves (Hargreaves et al., 1988) getestet (s. Abb. 4). Die Ratten wurden dazu auf einer Glasplatte in durchsichtige Plexiglaskästen gesetzt. Nach einer ca. 15 minütigen Eingewöhnungsphase an die neue Umgebung wurde die verschiebbare Wärmequelle mittig im hinteren Drittel der Hinterpfote platziert und angeschaltet. Bewegt die Ratte aufgrund des Stimulus die Hinterpfote, schaltet sich die Wärmequelle automatisch ab und die im Gerät integrierte elektrische Uhr wird gestoppt (Galbraith et al., 1993). Bleibt innerhalb einer bestimmten Zeitspanne (35 Sekunden) eine Reaktion des Tieres aus, wird die Wärmequelle zum Schutz des Tieres automatisch ausgeschaltet. Somit wird einem dauerhaften thermalen Gewebeschaden vorgebeugt und eine Sensibilisierung der Haut verhindert. Bei einem Testdurchlauf wurden beide Hinterpfoten abwechselnd und in je fünfminütigen Abstand jeweils dreimal getestet.



**Abbildung 4: Testung der thermalen Hyperalgesie**

Quelle: Website Harvard Apparatus

#### 2.4.2. Testung der taktilen Allodynie

Die Testung der taktilen Allodynie wurde mit von Frey-Haaren durchgeführt (Ugo Basile, s. Abb. 6). Dazu wurden die Versuchstiere in Plexiglaskästen gesetzt, die sich auf einem erhöhten weitmaschigen Gitternetz (Porengröße: 0,6 x 0,6 cm, Edelstahl) befanden, so dass man die Hinterpfoten jederzeit gut erreichen konnte. Nachdem sich die Tiere an die neue Umgebung gewöhnt hatten (ca. 15 Minuten), wurde die Plantarsole im vorderen Bereich zwischen der dritten und vierten Zehe durch ein von Frey-Haar mit gleich bleibenden Druck 6-8 Sekunden stimuliert, so dass sich das Haar durchbog (Chaplan et al., 1994). Das Wegziehen, ruckartige Anheben oder Schütteln der Hinterpfote auf die Stimulation wurde als positive Reaktion gewertet und dann das jeweils schwächere Testhaar verwendet. Falls sich das Versuchstier nach der Stimulation gänzlich bewegt hat oder unruhig wurde, war dies eine fragliche Reaktion und derselbe Reiz wurde noch einmal dargeboten. Verharrte das Versuchstier in seiner Stellung und hat somit auch die Hinterpfote nicht bewegt, wurde das als eine negative Reaktion gewertet: das nächst stärkere von Frey-Haar wurde für den nächsten Stimulus ausgewählt. Diese Schema entspricht der Up- and Down- Methode (Chaplan et al., 1994). Jede Hinterpfote wurde bei einem Testdurchlauf insgesamt sechsmal nach dieser Methode getestet. Zwischen den einzelnen Stimuli wurde ein Abstand von fünf Sekunden eingehalten, damit die jeweilige Reizantwort unabhängig vom vorherigen Reiz war.



**Abbildung 5: Testung der taktilen Allodynie mit von Frey-Haaren**

Quelle: Website Samitek Instruments

### **2.4.3. Dosierungen der Testsubstanzen**

#### **2.4.3.1. TNF**

Die TNF-Dosierungen von 2 ng, 20 ng und 200 pro Injektion wurden anhand der vorhandenen Literatur adaptiert. In in vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass TNF in einer Konzentration von 100 ng/ml in DRGs den Natriumeinstrom über spannungsabhängige Natriumkanäle erhöht und die Leitfähigkeit für Kalium steigert, was insgesamt eine leichtere Erregbarkeit der Neurone bedingt (Czeschik et al., 2008). In naiven DRGs konnten durch 100 pg/ml und 1000 pg/ml TNF neuronale Entladungen ausgelöst werden (Schäfers et al., 2003b). Die direkte intraganglionäre Injektion von TNF in DRGs mit 1 pg/ml und 10 pg/ml TNF löst eine signifikante taktile Allodynie aus (Schäfers et al., 2003b). Ein selektiver TNFR-1 Agonist aktiviert in naiven DRG ebenfalls in den Konzentrationen 10-1000 pg/ml u.a. A $\delta$ -Fasern (Schäfers et al., 2008). Eine intrathekale Injektion des TNFR1-Agonisten von 500 ng in Ratten bedingt die Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie (Schäfers et al., 2008). 0,2ng TNF repetitiv über einen intrathekal einliegenden Katheter appliziert, löst eine thermale Hyperalgesie und eine taktile Allodynie aus (Youn et al., 2008). Bei Mäusen führt die intrathekale Injektion von 0,2- 20 ng zu einer dosisabhängigen Verstärkung der thermalen Hyperalgesie (Gao et al., 2009). Eine intrathekale Injektion von 20 ng TNF führt bei Mäusen zur Entstehung einer signifikanten Hyperalgesie (Zhang et al., 2011). Auf Basis der vorliegenden Daten ist somit bei der Auswahl der hier applizierten Mengen von TNF von einer Wirksamkeit auszugehen.

#### **2.4.3.2. RTX**

Die intrathekale RTX-Injektion wurde angelehnt an die Studie von Jeffry et al. 2009 in einem Rattenmodell mit 1,9  $\mu$ g/kgKG RTX durchgeführt. In einem Vergleich mit niedrigeren Dosierungen hatte diese Dosierung den stärkeren Effekt auf die thermale Rückzuglatenz (Jeffry et al., 2009).

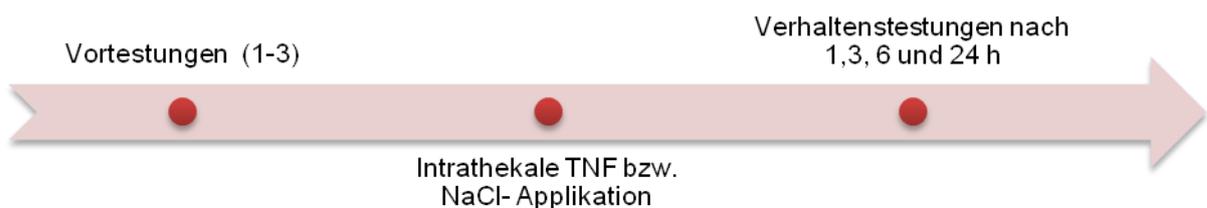
### **2.4.4. Protokoll der Verhaltenstestungen**

Die Verhaltensversuche begannen jeweils 7d nach Eintreffen der Tiere im Zentralen Tierlabor. In allen Versuchsgruppen erfolgte zunächst eine Vortestung unter Kontrollbedingungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen zur Erhebung der Baselinedaten. Zur Feststellung, ob die intrathekale Injektion an sich zu einer Änderung des Verhaltens führt, wurde in der ersten Versuchsgruppe nur 0,9% NaCl injiziert. Anschließend erfolgte ein Versuchsdurchlauf mit intrathekalen TNF-Injektionen. Da drei verschiedene Dosierungen von TNF (2 ng, 20 ng und 200 ng) getestet wurden, wurde

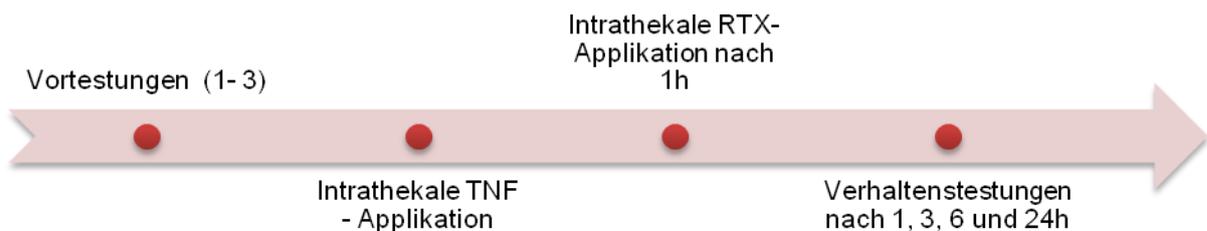
diese Gruppe (Vehikelgruppe mit NaCl 0,9% eingeschlossen) in vier Untergruppen eingeteilt und 1, 3, 6 und 24 h nach intrathekaler TNF-Spritzung Verhaltenstestungen durchgeführt (s. Abb. 6a). Im letzten Versuchsdurchlauf wurde zunächst intrathekal TNF (je nach Gruppe 2, 20 oder 200 ng) und nach 60 Minuten RTX intrathekal appliziert (1,9 µg/kgKG). Nach der RTX-Applikation wurden ebenfalls nach 1, 3, 6 und 24 h die Verhaltenstestungen durchgeführt (s. Abb 6b). Zu jedem Messzeitpunkt erfolgte die Testung der thermalen Hyperalgesie und der taktilen Allodynie. Der Aufbau der einzelnen Versuchsgruppen ist in Tabelle 3 erläutert.

Die Untersuchung erfolgte dabei jeweils durch einen für die Versuchsgruppen verblindeten Untersucher.

a) Intrathekale TNF bzw. NaCl- Applikation



b) Intrathekale TNF+ RTX-Applikation



**Abbildung 6: Schema des zeitlichen Ablaufs der Verhaltenstestungen**

Dargestellt sind der zweite Versuchsdurchlauf (a), bei dem TNF intrathekal in den Dosierungen 2, 20 und 200ng bzw. NaCl 0,9 % appliziert wurde und der dritte Versuchsdurchlauf (b), bei dem den Tieren zusätzlich nach 1h 1,9µg/kg KG RTX intrathekal injiziert wurde.

	Anzahl der Tiere pro Gruppe	Tierstamm (Ratten)	Intrathekale Injektion	Zeit der Testungen nach Injektion
<b>1. Versuchsreihe</b>	4	Sprague-Dawley	NaCl 10 µl	1,3,6 und 24h
<b>2. Versuchsreihe</b>	8	Sprague-Dawley	TNF 2 ng	1,3,6 und 24h
	8	Sprague-Dawley	TNF 20 ng	1,3,6 und 24h
	8	Sprague-Dawley	TNF 200 ng	1,3,6 und 24h
<b>3. Versuchsreihe</b>	7	Sprague-Dawley	TNF 2 ng	1,3,6 und 24h
	7	Sprague-Dawley	TNF 20 ng	1,3,6 und 24h
	7	Sprague-Dawley	TNF 200 ng	1,3,6 und 24h
	7	Sprague-Dawley	TNF 2 ng + RTX 1,9 µg/kg KG	1,3,6 und 24h
	7	Sprague-Dawley	TNF 20 ng + RTX 1,9 µg/kg KG	1,3,6 und 24h
	7	Sprague-Dawley	TNF 200 ng + RTX 1,9 µg/kg KG	1,3,6 und 24h
	7	Sprague-Dawley	NaCl 10 µl	1,3,6 und 24h

**Tabelle 3: Aufbau der Versuchsreihen**

#### **2.4.5. Erläuterungen zur Festlegung der Gruppengröße**

Die Anzahl der Versuchstiere in den einzelnen Testreihen wurde anhand der Literatur zum Thema adaptiert. Aus der Literatur lässt sich folgern, dass die intrathekale Injektion von TNF in den meisten Studien auch in kleinen Gruppengrößen zu einer stabilen Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie und taktilen Allodynie geführt hat. Nach der intrathekalen Injektion von ~ 20ng TNF trat bei Mäusen in einer Gruppengröße von 5-6 nach 3 Stunden eine thermale Hyperalgesie und taktile Allodynie im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (Narita et al., 2008; Gao et al., 2009). In einem Vorversuch dieser Studien wurde zur Festlegung der Dosierung eine dosisabhängige Verstärkung der Entwicklung der thermalen Hyperalgesie festgestellt und für die intrathekalen TNF-Dosierungen 2 ng und 20 ng im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Reduktion der thermalen Rückzugslatenz berechnet, hier betrug die Gruppengröße 4 Tiere pro Gruppe (Gao et al., 2009, vgl. supplemental figure 2). Eine weitere Studie stellte bei einer

Gruppengröße von 5 Mäusen nach intrathekalen Injektion von 20 ng TNF nach 1, 3 und 6 h die Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie im Vergleich zur Kontrollgruppe fest (Zhang et al., 2011). Aufgrund dieser in mehreren Studien publizierten Daten wurde für die vorliegende Arbeit eine Gruppengröße von 7-8 pro Interventionsgruppe verwendet. In den Vorversuchen mit NaCl wurden eine Gruppengröße von 4 verwendet. Aufgrund des zeitlichen Aufwandes insbesondere der thermischen Testung ist eine höhere Gruppengröße als 8 Tiere nicht umsetzbar, da die Messung zu den angegebenen Zeitpunkten sonst nicht durchführbar ist, bzw. die Tiere in zeitlichem Verzug zur Injektion getestet würden. Dies würde zu einer Zunahme der Fehlerwahrscheinlichkeit führen.

## 2.5. Datenanalyse

### 2.5.1. Auswertung der Messung der taktilen Allodynie

Zur Quantifizierung der Daten der taktilen Allodynie wurde die Up- and Down-Methode (Dixon, 1980) verwendet. Diese Methode ist anwendbar auf Experimente nach dem Alles-oder Nichts-Prinzip, das besagt, dass entweder eine Reaktion auftritt oder ausbleibt. Voraussetzungen für die Anwendung der Up- and-down- Methode sind seriell anzuwendende Experimente, die einen gleich großen Abstand der jeweiligen Reizdosis aufweisen (Dixon, 1980).

Bei den durchgeführten Testungen wurden acht verschiedene Haarstärken von 3,61 bis 5,18 verwendet. Dabei gilt: Haarstärke =  $\log_{10}(10 \times \text{Kraft in mg})$ . Die  $LD_{50}$  stellt die zu ermittelnde 50% Pfotenrückzugsschwelle dar, bei der 50 % der Tiere auf den dargebotenen Reiz positiv reagieren (Chaplan et al., 1994). Die Reize werden konsekutiv gesetzt. Eine positive Reaktion wurde in einer Tabelle mit einem „x“ gekennzeichnet und daraufhin das nächst stärkere Testhaar verwendet. Bei negativen Reaktionen wurde ein „o“ notiert, der folgende Reiz wurde dann mit dem nächst schwächeren Testhaar ausgeübt.

Nach Chaplan gilt für die 50 % Pfotenrückzugsschwelle:

$$\text{50\% Pfotenrückzugsschwelle in g} = (10^{[X_f + k\delta]}) / 10000$$

Mit:  $X_f$  = Haarstärke des letzten benutzten von Frey-Haares  
 $k$  = Tabellenwert nach Dixon 1980 für das entsprechende Reaktionsmuster  
 (Bsp. oxoxox)  
 $\delta$  = die mittlere Differenz zwischen den Haarstärkewerten

Auf diese Weise wurde für jede Ratte zu jedem Testzeitpunkt ein entsprechender Schwellenwert ermittelt. Daraufhin wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen für die jeweiligen Gruppen wie folgt berechnet:

Mittelwert:

$$\text{Mittelwert} = \frac{x + y + z}{3}$$

Standardabweichung  $\sigma$  :

$$\sigma(x) = \sqrt{\text{Var}(x)}$$

Standardmessfehler SEM:

$$\text{SEM} = \frac{\sigma}{\sqrt{n}}$$

### 2.5.2. Auswertung der Messung der thermalen Hyperalgesie

Sowohl die rechte als auch die linke Hinterpfote der Tiere wurden in einem Abstand von mindestens fünf Minuten dreimal getestet. Aus diesen drei Werten wurde schließlich der Mittelwert, die Standardabweichung und der Standardfehler wie oben beschrieben ermittelt.

### 2.6. Statistische Auswertung

Es erfolgte eine Bestimmung der Mittelwerte, Standardabweichungen und Varianzen sowie eine multivariate Varianzanalyse (Analysis of variance; ANOVA) und eine Post-Hoc Analyse mit dem Tukey-Test (GraphPad Prism, Version 6). Als Streuungsmaß wurde der SEM (=Standardmessfehler) verwendet. P-Werte von  $< 0.05$  wurden als signifikant gewertet. Die Graduierung der Signifikanzniveaus erfolgte nach folgender Definition:

$$\begin{aligned} \text{p-Wert} < 0.05 &\rightarrow * \\ \text{p-Wert} < 0.01 &\rightarrow ** \\ \text{p-Wert} < 0.001 &\rightarrow *** \end{aligned}$$

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Wirkung auf schmerzassoziiertes Verhalten intrathekaler Injektionen

Zur Überprüfung, ob bereits die intrathekale Injektion zu einer Veränderung des schmerzassoziierten Verhaltens führt, erfolgte die intrathekale Injektion von NaCl im Vorfeld der Hauptversuchsreihe bei einer kleinen Gruppe der Tiere (n=4). Es erfolgte eine Injektion von 10 µl 0,9% NaCl mit nachfolgender Testung zu definierten Zeitpunkten.

Dabei zeigte sich, dass es durch die intrathekale Injektion innerhalb von 24 Stunden weder zu einer signifikanten Änderung der mechanischen Schmerzschwellen in der von Frey Testung noch zu einer Änderung der thermalen Rückzuglatenz in der Hitzetestung kommt (vgl. Tabelle 4 und Abbildung 7).

##### a) von Frey Testung

	Mittelwert in g	SEM
Vortest 1	12,40	3,75
Vortest 2	16,53	2,93
Vortest 3	11,67	3,69
Vortest 4	12,64	3,11
1h	11,42	3,37
3h	14,82	3,00
6h	12,76	3,51
24h	16,12	1,94

##### b) Hitzetest

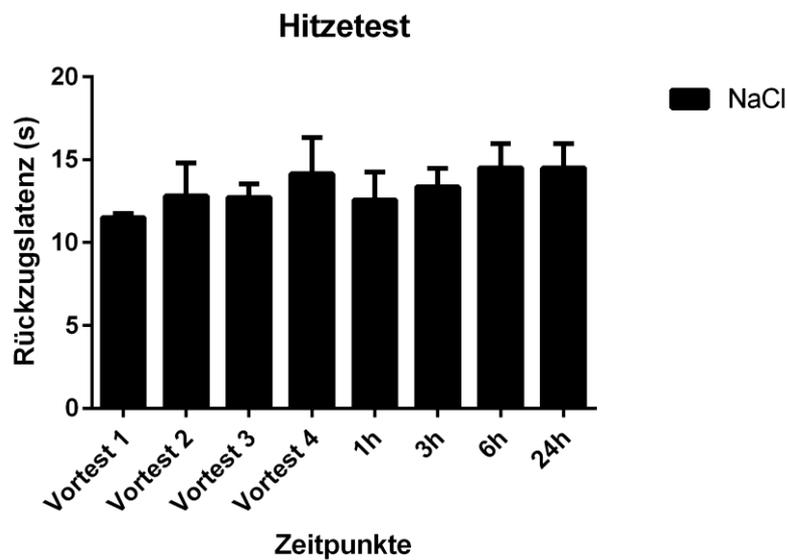
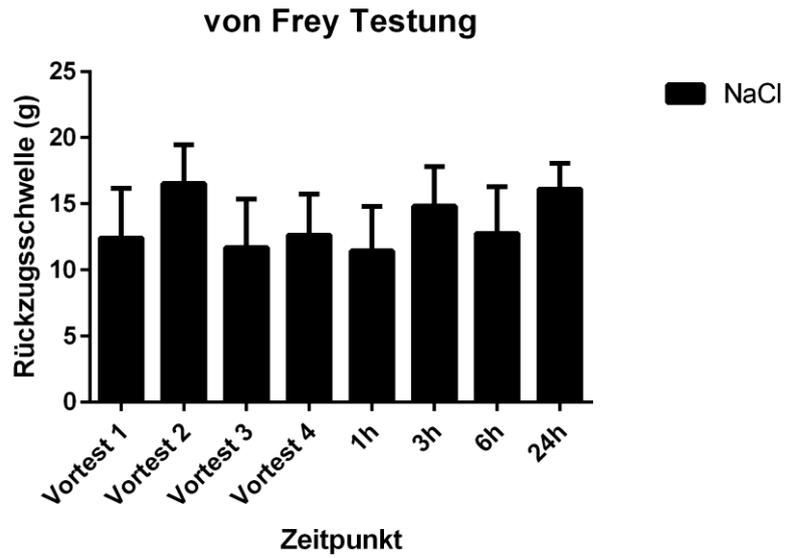
	Mittelwert in s	SEM
Vortest 1	11,50	0,25
Vortest 2	12,80	2,00
Vortest 3	12,72	0,82
Vortest 4	14,15	2,17
1h	12,57	1,67
3h	13,36	1,12
6h	14,50	1,48
24h	14,50	1,48

**Tabelle 4: Darstellung der Mittelwerte und der SEM nach intrathekaler Injektion von 10µl NaCl**

a) der Rückzugsschwelle in g in der von Frey Testung

b) der Rückzuglatenz in s im Hitzetest

(n=4)



**Abbildung 7: Darstellung der von Frey Testung und des Hitzetests im Zeitverlauf nach intrathekalen Injektion von 10µl 0,9 % NaCl**

Innerhalb von 24 Stunden nach intrathekalen NaCl- Injektion lässt sich zu keinem der getesteten Zeitpunkte eine signifikante Veränderung des Schmerzverhaltens darstellen (n= 4; Fehlerbalken = SEM).

### **3.2. Wirkung von intrathekaler TNF-Applikation: Induktion einer taktilen Allodynie und einer thermalen Hyperalgesie**

Im zweiten Versuchsteil erfolgte die intrathekale Injektion von TNF in der Dosierung 2 ng, 20 ng oder 200 ng mit nachfolgender Untersuchung des schmerzassoziierten Verhaltens an definierten Zeitpunkten.

Nach intrathekaler Injektion von TNF lässt sich in in der 2 ng-Gruppe nach 1, 3, 6 und 24 Stunden eine signifikante Reduktion der Rückzugsschwelle in der von Frey Testung im Vergleich zu den Vortestungen feststellen. In der 20ng-Gruppe zeigt sich zu den Zeitpunkten 1 und 3 h eine signifikante Reduktion der Rückzugsschwelle im Vergleich zu dem Ausgangswert. In der 200ng-Gruppe kommt es nach 24 Stunden verglichen mit den Vortestungen zu einer signifikanten Reduktion der Rückzugsschwelle (vgl. Tab. 5, 7 und Abbildung 8 oben). Signifikante Unterschiede im zeitlichen Verlauf zeigen sich dabei für die einzelnen Dosierungen jeweils nur im Vergleich zu den Kontrollwerten. Im Vergleich der Zeitpunkte untereinander zwischen den verschiedenen Dosierungen ergeben sich ebenfalls mit der gewählten Auswertungsmethode (vgl. Kap. 2.6.) keine signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 7).

In der Hitzetestung lässt sich nach intrathekaler Injektion in der 2 ng-TNF-Gruppe keine signifikante Reduktion der Rückzugslatenz im Vergleich zum Vortest beobachten. In der 20 ng-Gruppe kommt es nach 24 Stunden zu einer signifikanten Reduktion der Rückzugslatenzen verglichen mit dem Ausgangswert. Nach Injektion von 200 ng TNF lässt sich eine signifikante Reduktion der Rückzugslatenzen ebenfalls zu dem Zeitpunkt 24 h nach Injektion in Vergleich mit den Vortestungen feststellen (vgl. Tab. 6, 7 und Abbildung 8 unten). Auch hier zeigen sich im zeitlichen Verlaufen in den einzelnen Gruppen lediglich signifikante Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollwerten. Im Vergleich der einzelnen Zeitpunkte untereinander zwischen den Dosierungen zeigen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (s. Tabelle 7).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass durch die intrathekale Injektion von TNF für alle getesteten Dosierungen - aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten - eine taktile Allodynie induziert wird. Die Entstehung einer thermalen Hyperalgesie kann 24 Stunden nach intrathekaler Injektion für die TNF-Dosierungen 20 ng und 200 ng festgestellt werden.

	TNF 2ng		TNF 20ng		TNF 200ng	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
<b>Vortest</b>	20,24	1,16	16,58	2,22	17,77	1,74
<b>1h</b>	10,67	3,16	8,52	1,31	12,47	1,75
<b>3h</b>	11,59	2,57	9,39	1,56	14,41	2,13
<b>6h</b>	11,43	2,78	12,72	1,98	13,44	1,54
<b>24h</b>	10,18	2,30	9,52	1,42	7,41	1,39

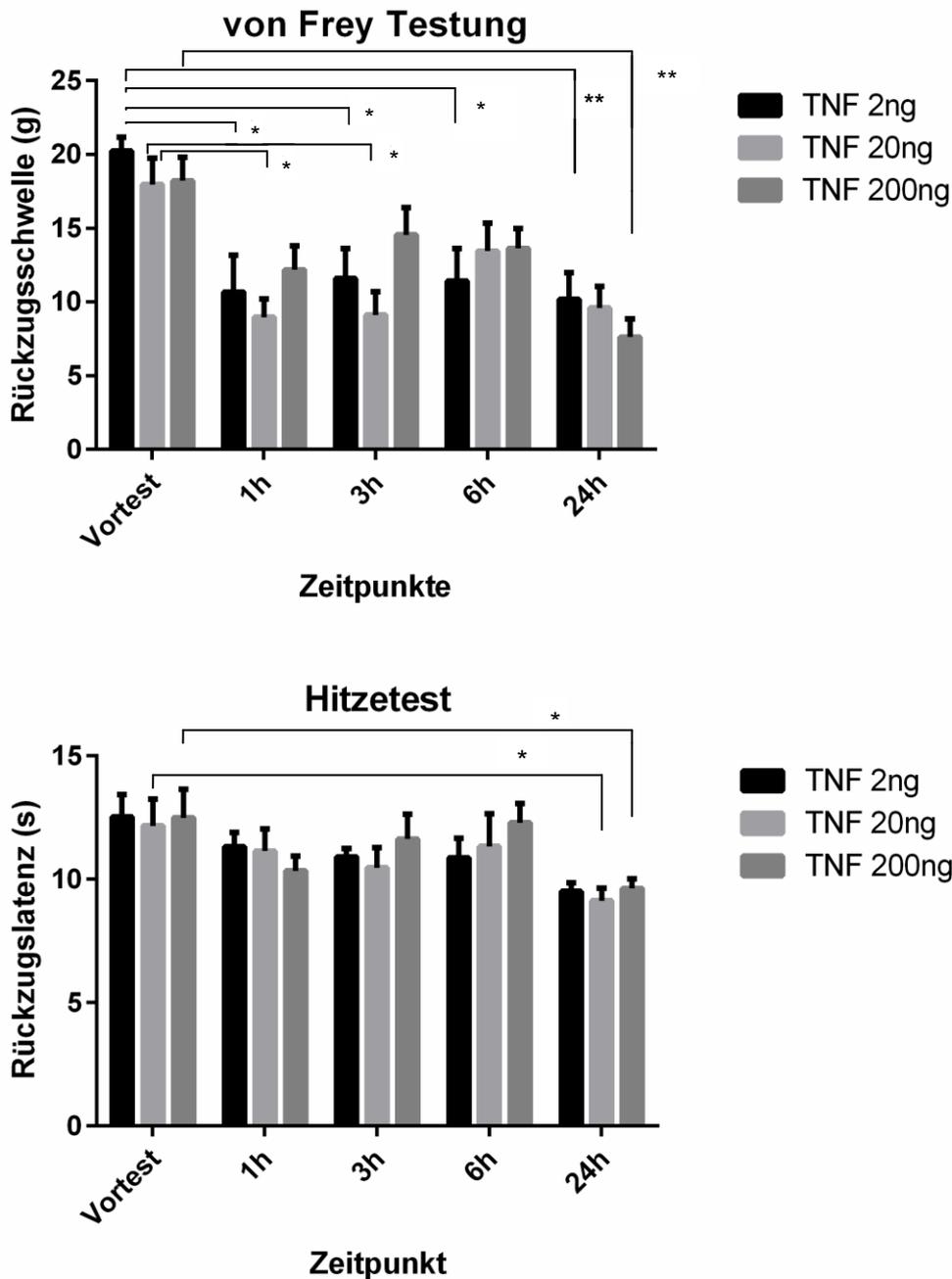
**Tabelle 5: Darstellung der Mittelwerte in g und der SEM in der von Frey Testung nach intrathekaler TNF-Injektion in den verschiedenen Dosierungen im Zeitverlauf (n=8 pro Gruppe)**

	TNF 2ng		TNF 20ng		TNF 200ng	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
<b>Vortest</b>	12,53	0,90	12,17	1,09	12,49	1,16
<b>1h</b>	11,32	0,59	11,14	0,90	10,34	0,60
<b>3h</b>	10,91	0,33	10,47	0,82	11,63	1,01
<b>6h</b>	10,87	0,78	11,33	1,33	12,29	0,78
<b>24h</b>	9,50	0,35	9,13	0,51	9,63	0,38

**Tabelle 6: Darstellung der Mittelwerte in s und der SEM in der Hitzetestung nach intrathekaler TNF-Injektion in den verschiedenen Dosierungen im Zeitverlauf (n=8 pro Gruppe)**

<b>Signifikanztestung zwischen den Gruppen</b>	<b>Signifikanzniveau</b>
<b>von Frey Testung</b>	
Vortest:TNF 2ng vs. 1h:TNF 2ng	*
Vortest:TNF 2ng vs. 3h:TNF 2ng	*
Vortest:TNF 2ng vs. 6h:TNF 2ng	*
Vortest:TNF 2ng vs. 24h:TNF 2ng	**
Vortest:TNF 20ng vs. 1h:TNF 20ng	*
Vortest:TNF 20ng vs. 3h:TNF 20ng	*
Vortest:TNF 200ng vs. 24h:TNF 200ng	**
<b>Hitzetestung</b>	
Vortest:TNF 20ng vs. 24h:TNF 20ng	*
Vortest:TNF 200ng vs. 24h:TNF 200ng	*

**Tabelle 7: Darstellung der signifikanten Werte für die von Frey Testung und die Hitzetestung im zeitlichen Verlauf: (\* p <0,05; \*\* p< 0,01; n= 8 pro Gruppe)**



**Abbildung 8: Zeitverlauf der von Frey Testung und des Hitzetests nach intrathekaler Injektion von 10µl TNF in den Dosierungen 2ng, 20 ng und 200 ng**

In der von Frey Testung lässt sich eine signifikante Reduktion der Rückzugsschwelle in g in der Gruppe TNF 2 ng im Vergleich zwischen dem Ausgangswert und allen anderen gemessenen Zeitpunkten (1h, 3h, 6 h und 24 h) darstellen. Nach intrathekaler Injektion von TNF 20 ng lässt sich zu den Zeitpunkten 1h und 3h nach Injektion verglichen mit dem Vortest eine signifikante Reduktion der Rückzugsschwelle ermitteln. In der Dosierung TNF 200 ng tritt 24 h nach intrathekaler TNF-Injektion verglichen mit dem Ausgangswert eine signifikante taktile Allodynie auf. In der Hitzetestung lässt sich eine signifikante Reduktion der Rückzugslatenz in s in den Gruppen TNF 20 ng und TNF 200 ng jeweils im Vergleich Vortest vs. 24 h darstellen (n=8 pro Gruppe; \*p <0,05; \*\* p< 0,01; Vortest= gemittelter Wert aus den Vortestungen 1-4; Fehlerbalken = SEM).

### 3.3. Vergleich zwischen TNF-Injektion und TNF+RTX- Injektion

Im dritten Versuchsteil erfolgte die intrathekale Injektion von TNF in der Dosierung 2 ng, 20 ng oder 200 ng mit anschließender Injektion von RTX in jeder TNF-Untergruppe. Nachfolgend erfolgte die Evaluation des schmerzassoziierten Verhaltens zu den definierten Zeitpunkten.

In der von Frey Testung konnte kein signifikanter Unterschied der Rückzugsschwelle zwischen alleiniger intrathekaler TNF-Applikation (2 ng, 20 ng und 200 ng) oder intrathekaler TNF-Gabe in den entsprechenden Dosierungen mit darauffolgender RTX-Applikation (1,9 µg/kg KG) festgestellt werden (vgl. Tab. 8 und Abb.9). Auch ein Trend im Vergleich TNF vs. TNF+ RTX ist nicht ersichtlich. Auch im zeitlichen Verlauf zeigten Vergleiche in den einzelnen Gruppen zu verschiedenen Zeitpunkten keine signifikanten Unterschiede.

In der Hitzetestung ruft eine zusätzliche intrathekale RTX-Gabe (1,9 µg/kgKG) nach Injektion von TNF für alle drei verwendeten TNF-Dosierungen zu den angegebenen Zeitpunkten (1 h, 3 h, 6 h und 24 h) gesteigerte Werte der Rückzugslatenzen - verglichen mit alleiniger TNF-Applikation – hervor. Im Vergleich zwischen alleiniger 20 ng TNF-Applikation und der Gruppe 20 ng TNF+ RTX zeigt sich für den Zeitpunkt 24 h eine signifikante Erhöhung der Rückzugslatenz. Im Vergleich der Gruppen TNF 200 ng vs TNF 200 ng +RTX konnte ebenfalls 24 h nach Injektion eine signifikante Steigerung der Rückzugslatenz nach zusätzlicher RTX- Injektion festgestellt werden (vgl. Tab. 9, 10 und Abb. 9 unten).

Im zeitlichen Verlauf zeigt sich in der Gruppe 20 ng TNF+RTX im Vergleich Vortest vs. 24 h eine signifikante Erhöhung der Rückzugslatenz. In der Gruppe 200 ng TNF +RTX kann für den Zeitpunkt 24 h eine signifikante Steigerung der Rückzugslatenz verglichen mit den jeweiligen anderen Testzeitpunkte (Vortest, 1 h, 3 h, 6 h) festgestellt werden (vgl. Tabelle 10 und Abb. 9 unten).

Zudem kann in den Gruppen 20 ng TNF+RTX und 200 ng TNF+RTX nach 24 h im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikante Steigerung der thermalen Rückzugslatenz festgestellt werden.

Zusammenfassend konnte in der von Frey Testung zwischen alleiniger intrathekaler TNF-Applikation und TNF+RTX- Applikation kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In der Hitzetestung führte eine zusätzliche intrathekale RTX- Injektion in den verwendeten TNF-Dosierungen zu jedem getesteten Zeitpunkt im Vergleich zu alleiniger TNF-Applikation zu einer Erhöhung der thermalen Rückzugslatenz. Für die Dosierungen TNF

20 ng und 200 ng wurde im Vergleich mit den jeweiligen RTX-Gruppen zum Zeitpunkt 24 h eine signifikant niedrigere Rückzugslatenz festgestellt. Zudem konnte für die Gruppe 200 ng +RTX im zeitlichen Verlauf eine zunehmende Steigerung der Rückzugslatenzen innerhalb von 24 h festgestellt werden.

	TNF 2ng	TNF 20ng	TNF 200ng	TNF 2ng + RTX	TNF 20ng + RTX	TNF 200ng + RTX	NaCl
<b>Vortest</b>	16,92 +/- 1,67	15,92 +/- 1,93	16,44 +/- 2,04	14,71 +/- 1,96	13,66 +/- 2,15	16,39 +/- 1,68	17,93 +/- 1,79
<b>1h</b>	13,88 +/- 1,70	12,78 +/- 1,77	14,03 +/- 2,50	9,04 +/- 1,06	11,69 +/- 2,23	13,15 +/- 2,41	19,74 +/- 1,07
<b>3h</b>	16,83 +/- 1,48	13,02 +/- 2,01	14,65 +/- 1,67	16,98 +/- 2,33	16,22 +/- 1,98	18,46 +/- 1,85	19,42 +/- 1,30
<b>6h</b>	13,40 +/- 1,30	14,70 +/- 2,22	14,37 +/- 2,40	16,14 +/- 1,17	13,49 +/- 2,22	13,93 +/- 2,10	15,04 +/- 1,43
<b>24h</b>	9,79 +/- 1,09	10,74 +/- 1,35	9,26 +/- 2,09	12,15 +/- 2,27	9,98 +/- 1,75	15,93 +/- 1,86	14,93 +/- 1,58

**Tabelle 8: Darstellung der Mittelwerte in g und der SEM in der von Frey Testung nach intrathekalen NaCl/TNF-Injektion bzw. nach intrathekalen TNF+RTX-Injektion in den verschiedenen Dosierungen im Zeitverlauf (n=7 pro Gruppe)**

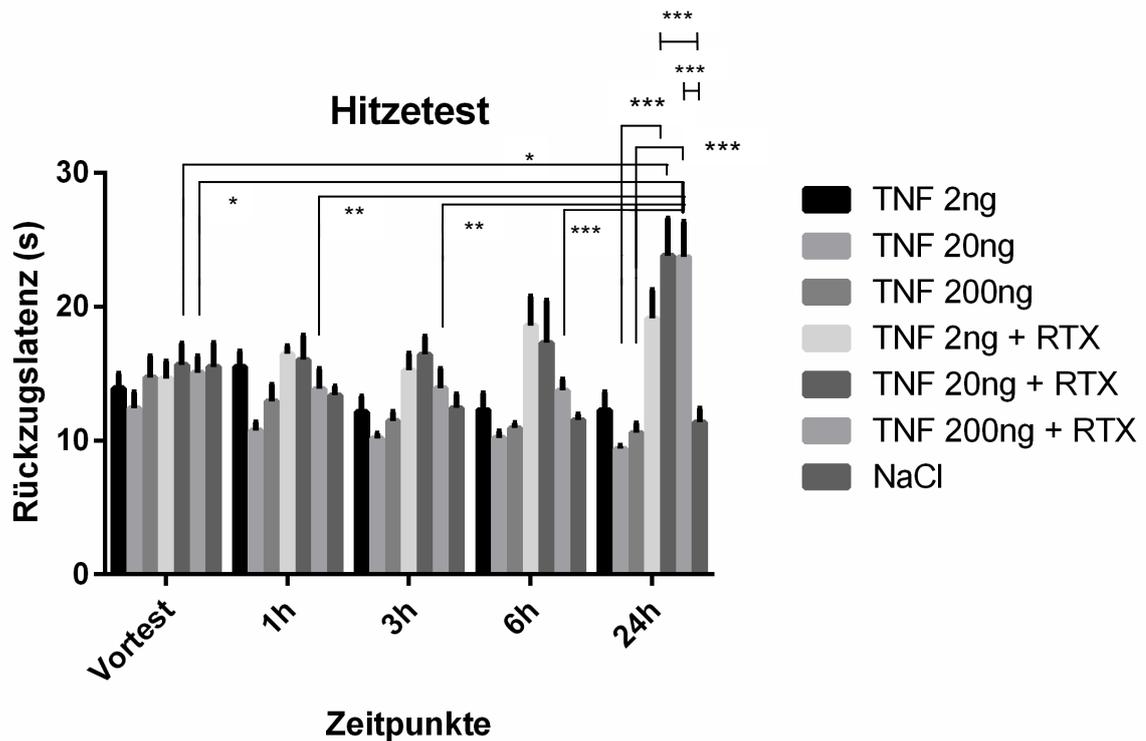
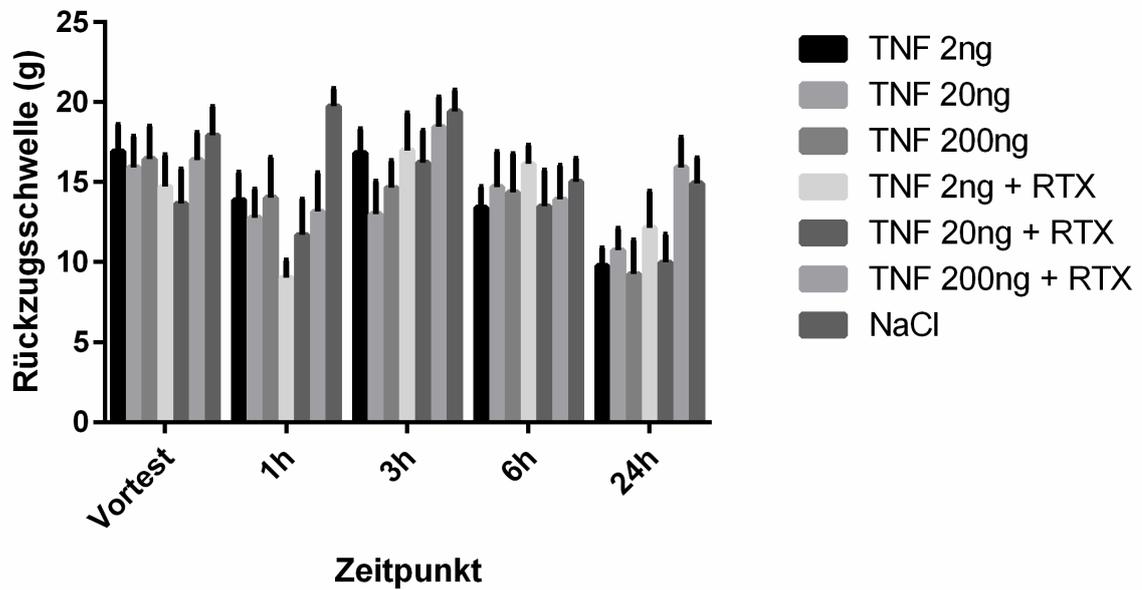
	TNF 2ng	TNF 20ng	TNF 200ng	TNF 2ng + RTX	TNF 20ng + RTX	TNF 200ng + RTX	NaCl
<b>Vortest</b>	13,92 +/- 1,06	12,42 +/- 1,20	14,72 +/- 1,58	14,64 +/- 1,28	15,66 +/- 1,60	15,05 +/- 1,23	15,50 +/- 1,80
<b>1h</b>	15,52 +/- 1,15	10,75 +/- 0,61	12,93 +/- 1,25	16,47 +/-0,58	16,04 +/- 1,79	13,86 +/- 1,47	13,39 +/- 0,67
<b>3h</b>	12,15 +/- 1,18	10,16 +/- 0,39	11,46 +/-0,67	15,25 +/-1,23	16,44 +/- 1,32	13,92 +/- 1,45	12,43 +/-1,04
<b>6h</b>	12,28 +/- 1,26	10,21 +/- 0,48	10,94 +/- 0,38	18,58 +/- 2,18	17,32 +/-3,13	13,74 +/-0,83	11,54 +/- 0,43
<b>24h</b>	12,27 +/-1,34	9,39 +/- 0,23	10,58 +/- 0,72	19,10 +/-2,15	23,82 +/-2,76	23,72 +/- 2,62	11,35 +/-1,03

**Tabelle 9: Darstellung der Mittelwerte in s und der SEM in der Hitzetestung nach intrathekalen NaCl/TNF-Injektion bzw. nach intrathekalen TNF+RTX-Injektion in den verschiedenen Dosierungen im Zeitverlauf (n=7 pro Gruppe)**

Gruppe	Testung	Signifikanztestung zwischen den Gruppen	Signifikanzniveau
TNF 20 ng	24 h	24h:TNF 20ng vs. 24h:TNF 20ng + RTX	***
TNF 200 ng	24 h	24h:TNF 200ng vs. 24h:TNF 200ng + RTX	***
TNF 20 ng + RTX	VT	Vortest:TNF 20ng + RTX vs. 24h:TNF 20ng + RTX	*
TNF 200 ng + RTX	VT	Vortest:TNF 200ng + RTX vs. 24h:TNF 200ng + RTX	*
	1h	1h:TNF 200ng + RTX vs. 24h:TNF 200ng + RTX	**
	3h	3h:TNF 200ng + RTX vs. 24h:TNF 200ng + RTX	**
	6h	6h:TNF 200ng + RTX vs. 24h:TNF 200ng + RTX	***
NaCl vs TNF+RTX	24h	24h:TNF 20ng + RTX vs. 24h:NaCl	***
	24 h	24h:TNF 200ng + RTX vs. 24h:NaCl	***

**Tabelle 10: Darstellung der signifikanten Werte für die Hitzetestung nach intrathekaler NaCl/TNF- Injektion bzw. nach intrathekaler TNF+RTX- Injektion in den einzelnen Gruppen und im Vergleich zur Kontrollgruppe (\*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001; n= 7 pro Gruppe)**

## von Frey Testung



**Abbildung 9: Zeitverlauf der von Frey Testung und des Hitzetests nach intrathekaler Injektion von NaCl/TNF bzw. TNF+ RTX- Injektion**

Den Tieren wurde eine Stunde nach vorheriger intrathekaler TNF-Gabe RTX (1,9 µg/kg KG) intrathekal appliziert. In der von Frey Testung lässt sich zwischen alleiniger intrathekaler TNF-Gabe und TNF mit darauffolgender intrathekaler RTX-Applikation (1,9µg/kg KG) zu keinem der gemessenen Zeitpunkte in den einzelnen Dosierungen ein signifikanter Unterschied feststellen (vgl. Tabelle 10). In der Hitzetestung besteht zu jedem Zeitpunkt eine Steigerung der Rückzugslatenz nach TNF und darauffolgender RTX-Applikation im Vergleich zu alleiniger TNF-

Gabe. Für die Gruppe TNF 20 ng+RTX zeigt sich 24 h nach Injektion im Vergleich zu alleiniger intrathekaler TNF-Gabe von 20 ng eine signifikante Steigerung der Rückzugslatenz. Nach 24 Stunden besteht für die Gruppe TNF 200 ng+ RTX im Vergleich zu alleiniger intrathekaler TNF-Gabe ebenfalls eine signifikante Steigerung der Rückzugslatenz. In der Gruppe TNF 20 ng +RTX zeigt sich im Vergleich Vortest vs. 24 h nach Injektion eine signifikante Steigerung der Rückzugslatenz. In der Gruppe 200ng+RTX zeigt sich nach 24 h sich im Vergleich zu den Zeitpunkten Vortest, 1h, 3h und 6 h eine signifikante höhere Rückzugslatenz. Zudem lässt sich eine signifikante niedrigere Rückzugslatenz in der Kontrollgruppe im Vergleich zu den Dosierungen 20/200ng TNF+RTX nach 24 h feststellen.

(\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ,  $n = 7$  pro Gruppe; Vortest= gemittelter Wert aus den Vortestungen 1-4; Fehlerbalken = SEM)

## **4. Diskussion**

### **4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse**

TNF ist ein proinflammatorisches Zytokin, das für die Entwicklung neuropathischer Schmerzen von zentraler Bedeutung ist. Diese Studie zeigt, dass die intrathekale Applikation von TNF im Rattenmodell zu gesteigertem schmerzassoziierten Verhalten in Form einer taktilen Allodynie und thermalen Hyperalgesie führt. Die intrathekale Applikation des TRPV1-Agonisten RTX kann *in vivo* nach vorheriger intrathekaler TNF-Injektion die Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie verhindern und führt zu einer deutlichen Steigerung der thermalen Rückzugslatenzen, was die Rolle von TRPV1 an der TNF-induzierten Hyperalgesie nahelegt. Eine durch TNF induzierte taktile Allodynie bleibt durch intrathekale RTX-Applikation unverändert.

### **4.2. Intrathekale TNF-Applikation induziert schmerzassoziiertes Verhalten**

Die aktuelle Datenlage über die Entstehung einer taktilen Allodynie und einer thermalen Hyperalgesie durch intrathekale TNF-Injektionen ist diskrepant. So konnte in einer Studie nach intrathekaler TNF-Injektion keine Entwicklung einer taktilen Allodynie bei Ratten beobachtet werden (Reeve et al., 2000), während in anderen Studien am Ratten- oder Mausmodell sowohl die Entwicklung einer taktilen Allodynie als auch die Induktion einer thermalen Hyperalgesie nach intrathekaler TNF-Injektion beobachtet wurde (Youn et al., 2008; Gao et al., 2009; Narita et al., 2008). In der vorliegenden Studie zeigt sich im Rattenmodell sowohl eine taktile Allodynie als auch eine thermale Hyperalgesie nach intrathekaler TNF-Gabe.

#### **4.2.1. Zeitlicher Verlauf des schmerzassoziierten Verhaltens nach intrathekaler TNF-Applikation**

Die Reduktion der taktilen Rückzugsschwelle und der thermalen Rückzugslatenz sind in dieser Studie jeweils nach 24 h am deutlichsten ausgeprägt (vgl. Abb. 8 oben und unten). Im Zeitverlauf der taktilen Allodynie (vgl. Abb. 8 oben) konnte im Vergleich mit der individuellen Baseline für die TNF-Dosierungen 2 ng und 200 ng nach 24 h die höchste signifikante Verminderung der taktilen Rückzugsschwelle eruiert werden. Aber auch zu früheren Zeitpunkten waren im Vergleich zur individuellen Baseline signifikante Veränderungen festgestellt worden: Für die Dosierung 20 ng TNF wurden auch nach 1 h und 3 h eine signifikante Verminderung der taktilen Rückzugsschwelle verzeichnet; und für die Dosierung 2 ng TNF konnte zudem nach 1 h, nach 3 h und nach 6 h eine signifikante Schwellenreduktion im Vergleich mit dem individuellen Ausgangswert

dargestellt werden. Im Zeitverlauf der thermalen Hyperalgesie (vgl. Abb. 8) konnte eine signifikante Reduktion der Rückzugslatenz ausschließlich zu dem Zeitpunkt 24 h nach intrathekaler Injektion für die TNF-Dosierungen 20 und 200 ng festgestellt werden. Innerhalb einer Gruppe ließen sich zwischen den Testzeitpunkten untereinander weder in der mechanischen noch der thermalen Testung im zeitlichen Verlauf signifikante Unterschiede nachweisen, sodass eine zeitliche Abhängigkeit des sonst ausgeprägten Effektes innerhalb des Zeitraums von 24 h nicht festgestellt werden kann. Im Folgenden wird daher vor allem das zeitliche Verhältnis zwischen dem Auftreten der taktilen Allodynie und der thermalen Hyperalgesie diskutiert.

In einer anderen Studie wurde – im Vergleich zur hier dargestellten zeitgleichen stärksten Ausprägung der taktilen Allodynie und thermalen Hyperalgesie 24 h nach intrathekaler TNF-Injektion - dagegen eine langsamere Entwicklung der taktilen Allodynie im Vergleich zur Entstehung der thermalen Hyperalgesie festgestellt (Youn et al., 2008). So wurde bereits nach 30 min eine signifikante Reduktion der thermalen Rückzugslatenz gemessen und nach 2 h wieder eine Annäherung an den Ausgangswert nachgewiesen, während eine signifikante Minderung der taktilen Rückzugsschwelle erst nach 2 h auftrat (Youn et al., 2008). Festzuhalten ist, dass auch bei der aktuellen Studie bereits 1 h und 3 h bzw. 6 h nach intrathekaler TNF-Injektion für die Dosis 20 ng bzw. 2 ng eine signifikante taktile Allodynie nachgewiesen werden konnte, während eine signifikante thermale Hyperalgesie erst nach 24 h messbar war. Dies scheint im Gegensatz zu dem früheren Auftreten einer thermalen Hyperalgesie, wie in der Studie von Youn beschrieben, zu stehen. Diese unterschiedlichen zeitlichen Ergebnisse könnten unter anderem durch die niedrigere TNF-Dosierung (TNF= 200 pg), die unterschiedliche Applikationsmethode mittels eines intrathekalen Katheters oder ein unterschiedliches Lösungsmittel bedingt sein (Youn et al., 2008). Allerdings würde dies wahrscheinlich einen insgesamt veränderten zeitlichen Verlauf zur Folge haben und daher nicht das frühere Auftreten einer thermalen Hyperalgesie erklären.

In einer weiteren Studie am Mausmodell wurde ebenfalls ein zeitgleiches Signifikanzmaximum der taktilen Allodynie und der thermalen Hyperalgesie nach intrathekaler TNF-Injektion von 20 ng herausgestellt (Gao et al., 2009). Es konnte jeweils nach 1 h und nach 3 h eine Signifikanz der thermalen Rückzugslatenzen und der taktilen Rückzugsschwelle festgestellt werden; die größte Signifikanz wurde jeweils bei dem Endpunkt nach 3 h gemessen (Gao et al., 2009). In der aktuellen Studie kann nach 3 h für die TNF-Dosierungen 20 ng und 2 ng zwar im Vergleich zu dem Vortest eine signifikante taktile Allodynie, jedoch keine thermale Hyperalgesie nachgewiesen werden; die größte

Signifikanz besteht für beide Testungen nach 24 h. Ein Grund für das frühere Auftreten des schmerzassoziierten Verhaltens ist bei gleicher TNF-Dosierung von 20 ng in der unterschiedlichen Tierspezies und auch in den verschiedenen Körpergewichten zu suchen. In der aktuellen Studie wurden Ratten mit einem Gewicht von 190-230 g getestet, in der Studie von Gao et al. wurden Mäuse mit einem Gewicht von 25-35 g verwendet. Daher erscheint ein insgesamt früheres Auftreten der taktilen Allodynie und der thermalen Hyperalgesie nachvollziehbar, zumal zum weiteren Vergleich die Testungen für 6 und 24 h nach intrathekalen TNF-Applikation nicht zur Verfügung stehen.

Weitere Ergebnisse über einen Zeitraum von insgesamt 7 d gehen aus einer vergleichbaren Studie hervor (Narita et al., 2008). Diese Studie erfolgte ebenfalls am Mausmodell (22-30 g) und es wurde eine intrathekale TNF-Dosierung von 1 pmol verwendet, das circa 17 ng TNF entspricht, und daher mit der Studie von Gao et al. verglichen werden kann (Narita et al., 2008). Nach intrathekalen TNF-Injektion von 1 pmol wurde die Reduktion der thermalen Rückzugslatenzen über 7 d gemessen und eine maximale Reduktion der Latenzen nach 3 h und eine etwas geringere Reduktion 6 h nach intrathekalen TNF-Injektion herausgestellt (Narita et al., 2008). Zu beiden Zeitpunkten besteht ein signifikanter Unterschied. Diese Ergebnisse stimmen somit mit denen von Gao et al. überein. Im Vergleich mit der aktuellen Studie ist wichtig, dass im weiteren zeitlichen Verlauf - entgegen der obigen Erwartung - über 7 d keine weitere Reduktion der thermalen Rückzugslatenzen eintritt, sondern bereits nach 24 h der Ausgangswert erreicht wird (Narita et al., 2008). Ein Grund dafür könnte die geringere intrathekale Injektionsmenge darstellen: diese betrug in der aktuellen Studie und ebenso bei Gao et al. 10 µl, während Narita et al. ein Gesamtvolumen von 4 µl intrathekal applizierten. Eine veränderte zeitliche Anflutung ist anzunehmen.

#### **4.2.2. Beurteilung der Dosisabhängigkeit des schmerzassoziierten Verhaltens nach intrathekaler TNF-Applikation**

Am Mausmodell wurde eine dosisabhängige Verstärkung der thermalen Hyperalgesie 3 h nach intrathekaler TNF-Applikation (0,2-20 ng) gezeigt (Gao et al., 2009). Die aktuelle Studie kann diese Ergebnisse durch Verhaltenstestungen an Ratten nicht bestärken: Verglichen mit dem gemittelten Ausgangswert haben alle TNF-Dosierungen 3 h nach intrathekaler Injektion in etwa die gleiche Reduktion der Rückzuglatenz zur Folge. Nach 24 h jedoch lässt sich der Trend der dosisabhängigen Verstärkung der thermalen Hyperalgesie erkennen (vgl. Abb. 9). So ist die Reduktion der Rückzuglatenz für TNF 2 ng nicht signifikant unterschiedlich, während für die Dosierungen 20 ng und 200 ng ein signifikanter Unterschied vorliegt. Eine klare Dosisabhängigkeit kann aber durch die vorliegenden Daten aufgrund der fehlenden Signifikanzen zwischen den einzelnen Dosierungen zu gleichen Zeitpunkten nicht belegt werden.

#### **4.3. Modulation des schmerzassoziierten Verhaltens durch zusätzliche intrathekale RTX-Applikation**

Die intrathekale Injektion von RTX verhindert in dieser Studie die Entstehung der durch TNF-induzierten thermalen Hyperalgesie. Hinsichtlich der Entwicklung einer taktilen Allodynie lässt sich nach intrathekaler RTX-Applikation jedoch kein richtungsweisender Effekt erkennen.

Diese Ergebnisse stimmen mit denen einer anderen Studie überein (Jeffry et al., 2009): Darin wurde nachgewiesen, dass die thermale Hyperalgesie, die zuvor durch intraplantare Injektion von Carrageen induziert worden war, durch intrathekale RTX-Gabe (1,9 µg/kgKG) reduziert werden kann (Jeffry et al., 2009). Die durch Carrageen ausgelöste taktiler Allodynie wurde von der intrathekalen RTX-Injektion ebenfalls nicht beeinflusst (Jeffry et al., 2009). Weitere Studien untermauern das Ergebnis, dass die mechanische Sensibilität durch intrathekale RTX-Injektion nicht verändert wird (Bishnoi et al., 2011; Karai et al., 2004). Da TRPV1<sup>-/-</sup>-Mäuse und Wildtypmäuse auf unschädliche und noxische mechanische Reize gleich reagieren (Caterina et al., 2000), scheint es folgerichtig, dass der TRPV1- Rezeptor und damit auch der selektive TRPV1-Agonist RTX keinen Einfluss auf die mechanische Sensibilität ausüben können. Demgegenüber steht die Tatsache, dass TRPV1- Antagonisten in verschiedenen Applikationsformen (oral, intraplantar) das Auftreten einer taktilen Allodynie in neuropathischen, inflammatorischen und Tumorschmerzmodellen verhindern können (Pomonis et al., 2003; Shinoda et al., 2008; Watabiki et al., 2011). Durch welchen Mechanismus dies geschieht, ist noch nicht abschließend geklärt. Ein möglicher Ansatzpunkt ist, dass spinale TRPV1-positive

Interneurone an der Modulation des mechanischen nozizeptiven Signals beteiligt sind (Kim et al., 2012). Warum die intrathekale RTX-Injektion auf die mechanische Sensibilität keinen Einfluss hat, kann durch diesen Ansatz jedoch nicht erklärt werden.

Dank zahlreicher Studien ist der antinozizeptive Effekt der intrathekalen RTX-Applikation in inflammatorischen Schmerzmodellen sowie in Tumorschmerzmodellen unbestritten, so dass die intrathekale RTX-Therapie zurzeit auch in klinischen Studien angewendet wird (s. Kap. 1.4.3). Noch relativ unerforscht ist diese Therapiemöglichkeit bislang aber bei neuropathischen Schmerzen. Daher ist es unklar, ob und welchen Einfluss eine erhöhte TNF-Expression auf die Wirkungsstärke des TRPV1-Agonisten RTX hat. Es wird vermutet, dass TRPV1-Agonisten in Gegenwart von TNF eine höhere analgetische Potenz aufweisen (Hagenacker et al., 2010; s. Kap. 1.4.3.). Diese Studie liefert weitere Hinweise zur Bestätigung dieser Vermutung: 24 Stunden nach intrathekaler TNF-Applikation war der TNF-Effekt für die Dosierungen 20 ng und 200 ng am stärksten ausgeprägt, es entstand eine signifikante thermale Hyperalgesie. Zu diesem Zeitpunkt tritt - verglichen mit alleiniger TNF-Applikation - auch die höchste Signifikanz der analgetischen RTX-Wirkung auf. Zudem lässt sich durch diese Arbeit annehmen, dass der analgetische Effekt des RTX von der TNF-Dosierung abhängig ist. Nach 24 h ließ sich feststellen, dass die Steigerung der Rückzugslatenzen und damit der analgetische Effekt von RTX nach Applikation von höheren TNF-Dosierungen ausgeprägter war (vgl. Abb. 9). So lässt sich in der TNF-Dosierung 2 ng vs. TNF 2ng +RTX zwar kein signifikanter Unterschied feststellen, wohl aber für die Gruppen TNF 20 ng/200 ng vs. TNF20 ng/200 ng+RTX. Die Ursache dafür könnte eine durch TNF erhöhte TRPV1-Rezeptorexpression oder eine verstärkte Hemmung spannungsabhängiger Calciumkanäle sein (Hagenacker et al., 2010). Eine klare Dosisabhängigkeit der RTX- Wirkung von der TNF-Dosierung kann jedoch aufgrund der fehlenden Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen nicht festgestellt werden.

#### **4.3.1. Zeitlicher Verlauf des schmerzassoziierten Verhaltens durch zusätzliche intrathekale RTX-Applikation**

In der Gruppe TNF 200 ng +RTX kann eine Erhöhung der Rückzugslatenzen im zeitlichen Verlauf beobachtet werden. Es lässt sich zu jedem der Kontrollzeitpunkte (VT, 1 h, 3 h und 6 h) ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu 24 h darstellen (vgl. Abbildung 9 und Tabelle 10). Dies kann nur zum Teil durch die nach 24h TNF-induzierte thermale Hyperalgesie und damit die höhere analgetische Potenz von RTX erklärt werden. Denn es muss beachtet werden, dass nach alleiniger intrathekaler TNF-Applikation von 200 ng zwischen den Zeitpunkten kein signifikanter Unterschied berechnet werden konnte. Die

intrathekale Injektion von RTX scheint somit zusätzlich einen verzögerten Wirkungseintritt zu haben. In dieser Studie konnte für die Dosierung 200 ng TNF+RTX im Vergleich zu den anderen Zeitpunkten im Hitzetest nach 24 h ein Wirkungsmaximum von RTX nachgewiesen werden. In einer Studie zu spontanen Knochentumoren bei Hunden wird nach einmaliger RTX- Applikation in einer vergleichbaren Dosis von 1,2 µg/kgKG eine Erhöhung der Rückzugslatenz vom 2. bis zum 12. Tag nach Injektion festgestellt (Brown et al., 2005). Nach Inflammation durch Carrageen übt eine intrathekale RTX- Injektion von 200 ng bei Mäusen für einen Zeitraum von 2 Tagen einen analgetischen Effekt aus (Mishra et Hoon, 2010). Es ist somit von einer RTX- Wirkung auszugehen, die den Zeitraum der hier getesteten Zeitpunkte überschreitet. Für nachfolgenden Untersuchungen erscheint es daher sinnvoll zur Evaluation der RTX- Wirkung einen längeren Zeitraum zu untersuchen.

#### **4.3.2. Vorteile der intrathekalen RTX- Applikationsform: Erhalt der physiologischen thermalen Sensibilität**

Die Ergebnisse zahlreicher Studien deuten darauf hin, dass die intrathekale Injektion im Gegensatz zu den anderen Applikationsformen entscheidende Vorteile bietet. Ein wichtiger Ansatzpunkt ist, dass nur die zentralen TRPV1-Rezeptoren von der intrathekalen RTX-Injektion blockiert werden, die TRPV1-Rezeptoren, die in Spinalganglien und peripheren Nervenendigungen lokalisiert sind, aber unbeeinflusst bleiben (Jeffry et al., 2009). Auf diese Weise bleiben wichtige efferente Funktionen des TRPV1- Rezeptors, wie die Freisetzung von Neuropeptiden (Jeffry et al., 2009) und lokomotorische und propriozeptive Funktionen erhalten (Karai et al., 2004). Einigen Studien zufolge kann nach intrathekaler RTX-Injektion nur eine geringgradige Veränderung der physiologischen thermalen Sensibilität festgestellt, aber eine deutlichere Reduktion der thermalen Rückzugslatenzen nach einer inflammatorischen Reaktion z.B. mittels Carrageen festgestellt werden (Bishnoi et al., 2011; Mishra et Hoon, 2010). In anderen Studien wurde dagegen nach alleiniger intrathekaler RTX-Applikation eine dosisabhängige Reduktion der thermalen Rückzugslatenz bis zum Cut-off (14 oder 20 s) gemessen (Brown et al., 2005; Karai et al., 2004). Die vorliegende Studie bestätigt, dass nach vorheriger intrathekaler TNF-Applikation (=Inflammation) und anschließender intrathekaler RTX-Injektion ein deutlicher Anstieg der Rückzugslatenzen gemessen werden kann. Über die Veränderung der physiologischen thermalen Sensibilität können durch die aktuelle Studie nur bedingt Aussagen getroffen werden, da hierzu eine Vergleichsgruppe mit alleiniger intrathekaler RTX- Applikation nötig wäre. Es ist aber festzustellen, dass in den Gruppen 20/200 ng TNF+ RTX nach 24 h im Vergleich zur Kontrollgruppe, die die physiologische thermale Sensibilität widerspiegelt, signifikante

Unterschiede berechnet werden konnten. Außerdem ist festzuhalten, dass zu Beginn der Testung die naiven Tiere stabile Werte der Rückzugslatenzen aufwiesen (15,1 s +/- 0,5), die vermutlich der physiologischen thermalen Sensibilität entsprechen. Die durchschnittliche Rückzugslatenz der Tiere, die intrathekal TNF und anschließend RTX erhielten, beträgt nach 24 Stunden 22,2 s +/- 3,1. Damit liegt der Wert zwar oberhalb der vermuteten physiologischen thermalen Sensibilität, aber unterhalb des Cut-off-Wertes (35 s). Insgesamt lässt sich somit folgern, dass zwar eine Veränderung, aber nicht ein vollständiger Verlust der thermalen Sensibilität durch intrathekale RTX-Injektion hervorgerufen wird.

#### **4.4. Limitationen der Studie**

Eine Darstellung der Grenzen dieser Studie ist wichtig, um zum einen die Ergebnisse richtig beurteilen zu können und zum anderen Verbesserungen in nachfolgenden Studien anzustreben.

Wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben, bleibt die Vergleichbarkeit zum Erhalt der physiologischen thermalen Sensibilität bei diesem Versuchsmodell aufgrund der fehlenden Kontrollgruppe, die nur mit RTX behandelt wird, eingeschränkt. Konkretere Aussagen hierzu wären in einem Vergleich intrathekaler Injektionen NaCl+RTX vs. TNF+RTX vs. NaCl+ NaCl möglich. In diesem Versuchsmodell kann auch die Fragestellung, ob TRPV1-Agonisten in Gegenwart von TNF eine höhere analgetische Potenz aufweisen, genauer untersucht werden.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die fehlende Signifikanz in der dritten Versuchsreihe zwischen der Kontrollgruppe und den Tieren nach intrathekaler TNF-Injektion.

In der ersten Versuchsreihe konnte dargestellt werden, dass durch die intrathekale Injektion von NaCl keine signifikante Änderung des Schmerzverhaltens auftritt. In der zweiten Versuchsreihe konnte belegt werden, dass eine intrathekale TNF-Injektion jeweils im Vergleich zu den Vortestungen für die unterschiedlichen Dosierungen zu verschiedenen Zeitpunkten eine thermische Hyperalgesie und eine taktile Allodynie induziert. Ein Vergleich mit einer Kontrollgruppe ist hier nicht gegeben. In der dritten Versuchsreihe konnten signifikante Unterschiede im Vergleich TNF vs. TNF+RTX und NaCl vs. TNF+RTX dargestellt werden. Der erwartete signifikante Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den TNF-Gruppen, den man im Hinblick auf die vorherigen Versuchsreihen vermutet hätte, bleibt aus. Die Ergebnisse aus der zweiten Versuchsreihe sind bezüglich der Abnahme der Rückzugsschwellen und -latenzen auch jeweils als Trends in der dritten Versuchsreihe erkennbar, signifikante Unterschiede sind aber nicht zu berechnen. Ein Grund für die fehlenden Signifikanzen zwischen den TNF-Gruppen und

der Kontrollgruppe könnte die Reduktion der thermalen Rückzugslatenz, die auch in der Kontrollgruppe im zeitlichen Verlauf auftritt, sein. Hier sinken zwar im zeitlichen Verlauf v.a. die thermalen Rückzugslatenzen, diese Unterschiede waren jedoch ebenfalls nicht signifikant. Dass die alleinige intrathekale Injektion zur Veränderung des Schmerzverhaltens führt, konnte in der ersten Versuchsreihe ausgeschlossen werden. Eine mögliche Fehlerquelle, die zu einer falschen Reduktion der thermalen Rückzugslatenz führt, ist, dass die Wärmequelle nicht immer an der exakt gleichen Stelle der Hinterpfote des Tieres platziert wurde, was aufgrund der unterschiedlichen Dicke der Haut zu falschen Testergebnissen führen kann. Eine Konditionierung der Tiere im Sinne eines Lernverhaltens, dass bereits ein Schmerz bei bestimmten Gegenständen oder leichten Reizen „erwartet wird“, kann nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, ist aber in der Literatur beim verwendeten Versuchsablauf nicht beschrieben. Eine Adaptation bei Testung des Schmerzverhaltens ist nicht anzunehmen, weil an aversive Schmerzreize in der Regel keine Adaptation erfolgt, sondern eine Sensibilisierung im Langzeitverlauf auftritt.

In dieser Studie konnte nach intrathekaler TNF-Injektion – im Gegensatz zu vergleichbaren Studien (vgl. Gao et al., 2009) - keine signifikante dosisabhängige Verstärkung der thermalen Hyperalgesie nachgewiesen werden; ein Trend war jedoch erkennbar. Da eine signifikante thermale Hyperalgesie nach 24 h erst ab einer Dosierung von 20 ng auftrat, erscheint es sinnvoll in nachfolgenden Untersuchungen entsprechend höhere TNF-Dosierungen anzuwenden. Dafür spricht, dass die intrathekale Injektion eines TNFR1-Agonisten von 500 ng bei Ratten die Entwicklung einer thermalen Hyperalgesie bedingt (Schäfers et al., 2008), auch wenn die Vergleichbarkeit aufgrund der unterschiedlichen Substanzen (TNFR- Agonisten vs. TNF) eingeschränkt bleibt. Ein weiterer Punkt ist, dass die TNF-Dosierungen durch die vorhandene Literatur festgelegt wurde, die Studien am Maus- und Rattenmodell einschließt. Aufgrund unterschiedlicher Tierspezies und geringeren Körpergewicht im Vergleich zu Ratten ist zu vermuten, dass auch höhere TNF-Dosierungen bei Ratten eine Veränderung des Schmerzverhaltens herbeiführen. Nichtsdestotrotz sollte festgehalten werden, dass in der vorliegenden Studie auch für die niedrigste Dosierung von 2 ng in der von Frey Testung signifikante Unterschiede festgestellt wurden.

## 4.5. Ausblick

Aufgrund des vermutenden Effektes von TNF auf die analgetische Wirksamkeit von RTX, wäre nun ein weiterer Vergleich zwischen Vehikeltieren mit alleiniger RTX-Applikation (NaCl+RTX) und Tieren, denen präemptiv TNF appliziert wurde (TNF+RTX) interessant, um die These einer Wirkungsverstärkung von RTX durch TNF zu untermauern. Zudem könnte durch diesen Versuchsaufbau auch der Einfluss von RTX auf die physiologische thermale Sensibilität geklärt werden.

Interessant wäre auch die analgetische Funktion der intrathekalen RTX- Injektion an etablierten neuropathischen Schmerzmodellen zu prüfen. So könnte beispielsweise nach einer Spinalnervenligatur eine intrathekale RTX-Applikation durchgeführt werden, um eine nähere klinische Relevanz aufzuzeigen.

Durch die dargestellten Ergebnisse der Verhaltenstestungen stellt sich die Frage, welche *in vitro*-Vorgänge den hier beschriebenen Feststellungen zugrunde liegen. Es bleibt zu klären, warum der analgetische Effekt von RTX durch TNF verstärkt wird und welche Rolle Ionenkanäle (v.a. Calciumkanäle) in diesem Zusammenhang spielen.

Da in dieser Studie die kurzfristigen und akuten Effekte der intrathekalen TNF- und RTX-Injektion über 24 h dargestellt wurden, bleibt offen welche langfristigen und dauerhaften Effekte die RTX-Injektion auf die zentralen TRPV1-Rezeptoren hat und welche Nebenwirkungen dadurch auftreten (vgl. Kap. 4.3.1). Denkbar wäre die Implantation intrathekalen Katheter (s. Kap. 4.4.1), um die längerfristige intrathekale Gabe komplikationslos durchführen zu können und langfristige Effekte bzw. Nebenwirkungen beurteilen zu können.

### 4.5.1. Ausblick: Anlage intrathekalen Katheter

Um repetitive intrathekale Applikationen über einen längeren Zeitraum durchführen zu können, kann den Ratten durch Punktion der atlantookzipitalen Membran nach der Methode nach Yaksh ein Katheter in den Subarachnoidalraum eingesetzt werden (Yaksh und Rudy 1976). Die Katheter bestehen aus einem Polyethylenschlauch, der mittels eines durchgängigen Knotens in zwei Teilstücke unterteilt wird. Die gut zu tastende Tuberantia occipitalis dient als Orientierungspunkt zur Freilegung der Membrana atlantooccipitalis (eine Faszie zwischen Occiput und Axis), durch die der Subarachnoidalraum eröffnet wird. Mit dem Skalpell wird ein an der Tuberantia occipitalis beginnender Hautschnitt nach kaudal fortgesetzt und durch eine kleine Querinzision direkt unterhalb der Tuberantia

occipitalis erweitert. Die freiliegende Nackenmuskulatur wird gespalten und aufgedehnt, so dass die Membrana atlantooccipitalis OP-mikroskopisch sichtbar ist und weiter freigelegt wird. In die Membran wird mithilfe einer Kanüle eine Stichinzision durchgeführt, aus dem nach korrekter Eröffnung sofort der Liquor austritt und der vorbereitete Katheter wird in den kaudalen Subarachnoidalraum vorgeschoben. Zur Fixierung des anderen Teilstückes wird mit einer Kanüle auf Augenhöhe eine subkutane Öffnung durchstoßen und der Katheter hindurchgezogen. Muskulatur und Haut werden mit Nahtmaterial adaptiert. Nachdem die Tiere aus der Narkose erwachen und keine motorischen Defizite aufweisen, werden sie in Einzelkäfigen untergebracht.



**Abbildung 10: Freilegung der Membrana atlantooccipitalis**

Das Tier ist während der Operation beidseits durch die äußeren Gehörgänge in einem Stereotaxierrahmen fixiert. Die Nackenmuskulatur wird durch einen Wundspreizer gedehnt und so der Blick auf die schimmernde Membran ermöglicht (Grütters 2012).

## 5. Zusammenfassung

Diese Studie untersucht mittels Verhaltenstestungen (Plantartest, Frey-Haare) am Rattenmodell, ob die akute intrathekale Injektion des proinflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor (TNF) eine taktile Allodynie und/oder eine thermale Hyperalgesie auslöst und ob das zytokin-induzierte schmerzassoziierte Verhalten durch die intrathekale Applikation des TRPV1 (transient-receptor-potential-vanilloid 1)-Agonisten Resiniferatoxin (RTX) moduliert werden kann.

Es wurde nachgewiesen, dass die intrathekale TNF-Injektion nach 24 h in den Dosierungen 2 ng und 200 ng im Vergleich zu den Vortesten eine signifikante taktile Allodynie und in den TNF-Dosierungen 20 ng und 200 ng eine signifikant unterschiedliche thermale Hyperalgesie auslöst. Durch anschließende intrathekale RTX- Applikation kann im Vergleich zu alleiniger intrathekaler TNF- Injektion ein signifikanter Anstieg der thermalen Rückzuglatenzen nach 24 Stunden in den TNF-Dosierungen 20 ng und 200 ng festgestellt und somit die Entstehung einer zuvor von TNF-induzierten thermalen Hyperalgesie verhindert und im Vergleich zur Kontrollgruppe auch eine Veränderung der thermalen Sensibilität festgestellt werden. Die Entwicklung einer taktilen Allodynie wird von der intrathekalen RTX-Injektion nicht beeinflusst.

Aus den Ergebnissen kann ein von der TNF-Dosierung abhängiger analgetischer Wirkungseffekt von RTX vermutet und somit gefolgert werden, dass die Pharmakotherapie mit selektiven TRPV1-Agonisten wie RTX in der medikamentösen Behandlung neuropathischer Schmerzen einen entscheidenden Vorteil bietet. Als mögliches zelluläres Korrelat kommt eine durch TNF induzierte erhöhte TRPV1-Rezeptorexpression oder eine durch TNF induzierte verstärkte Hemmung spannungsabhängiger Calciumkanäle in Betracht.

Diese Studie trägt zur weiteren Erforschung TRPV1-selektiver Pharmaka in der medikamentösen Therapie bei neuropathischen Schmerzsyndromen bei und bietet mittelfristig eine Grundlage für weitere klinische Studien.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Aggarwal, B.B., Gupta, S.C., Kim, J.H. (2012): Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood* 119(3):651–665.
2. Anand, P., Bley, K. (2011): Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. *Br. J. Anaesth.* 107, 490–502.
3. Aurilio, C., Pota, V., Pace, M.C., Passavanti, M.B., Barbarisi, M. (2008): Ionic channels and neuropathic pain: physiopathology and applications. *J Cell Physiol.* 215 (1); 8-14.
4. Baron, R., Binder, A., Wasner, G. (2010): Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol.* 10, 807–819.
5. Benrath, J., Hatzenbuehler, M., Fresenius, M, Heck, M. (2012): *Repetitorium Schmerztherapie*. 3. Auflage; Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
6. Bishnoi, M., Bosgraaf, C., Premkumar, L.S. (2011): Preservation of acute pain and efferent functions following intrathecal resiniferatoxin induced analgesia in rats. *J. Pain* 12 (9), 991-1003.
7. Black, J.A., Nikolajsen, L., Kroner, K., Jensen, T.S., Waxman, S.G. (2008): Multiple sodium channel isoforms and mitogen-activated protein kinases are present in painful human neuromas. *Ann. Neurol.* 64, 644–653.
8. Bohlen, C.J., Priel, A., Zhou, S., King, D., Siemens, J., Julius, D. (2010): A bivalent tarantula toxin activates the capsaicin receptor, TRPV1, by targeting the outer pore domain. *Cell* 141, 834–845.
9. Brederson, J.D., Kym, P.R., Szallasi, A. (2013): Targeting TRP channels for pain relief. *Eur. J. Pharmacol.* 716, 61–76.
10. Brown, D.C., Iadarola, M.J., Perkowski, S.Z., Erin, H., Shofer, F. Laszlo, K.J., Olah, Z., Mannes, A.J. (2005): Physiologic and antinociceptive effects of intrathecal resiniferatoxin in a canine bone cancer model. *Anesthesiology* 103, 1052–1059.
11. Cao, E., Cordero-Morales, J.F., Liu, B., Qin, F., Julius, D. (2013): TRPV1 channels are intrinsically heat sensitive and negatively regulated by phosphoinositide lipids. *Neuron* 77, 667–679.
12. Carvajal, A.F., Fernández-Ballester, G., Devesa, I., González-Ros, J.M., Ferrer-Montiel, A. (2012): New strategies to develop novel pain therapies: addressing thermoreceptors from different points of view. *Pharmaceuticals* 5, 16-48.
13. Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D. (2000): Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306–313.
14. Caterina, M.J., Schumacher, M.A., Tominaga, M., Rosen, T.A., Levine, J.D., Julius, D. (1997): The capsaicin receptor: A heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389, 816-824.

15. Chaplan, S.R., Bach, F.W., Pogrel, J.W., Chung, J.M., Yaksh, T.L. (1994): Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* 53, 55–63.
16. Cheng, J.K., Ji, R.R.(2008): Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem. Res.* 33, 1970–1978.
17. Chu, W.M. (2013): Tumor necrosis factor. *Cancer Lett* 328(2): 222–225.
18. Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., Shields, S., Jordt, S.E., Basbaum, A.I., Chao, M.V., Julius, D. (2001): Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411, 957–962.
19. Clapham, D.E. (2003) : TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426, 517–524.
20. Clark, A.K., Old, E.A., Malcangio, M.(2013): Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J. Pain Res.* 6, 803-814.
21. Constantin, C.E., Mair, N., Sailer, C.A., Andratsch, M., Xu, Z., Blumer, M.J.F., Scherbakov, N., Davis, J.B., Bluethmann, H., Ji, R., Kress, M.(2008): Endogenous tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) requires TNF receptor type 2 to generate heat hyperalgesia in a mouse cancer model. *J. Neurosci.* 28, 5072–5081.
22. Cosens, DJ, Manning, A (1969): Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant. *Nature* 224, 285–287.
23. Costigan, M., Scholz, J., Woolf, C.J. (2009): Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 1–32.
24. Cristino, L., de Petrocellis, L., Pryce, G., Baker, D., Guglielmotti, V., Di Marzo, V. (2006): Immunohistochemical localization of cannabinoid type 1 and vanilloid transient receptor potential vanilloid type 1 receptors in the mouse brain. *Neuroscience* 139, 1405–1415.
25. Cuyppers, E., Yanagihara, A., Karlsson, E., Tytgat, J. (2006): Jellyfish and other cnidarian envenomations cause pain by affecting TRPV1 channels. *FEBS Lett.* 580, 5728–5732.
26. Czeschik, J.C., Hagenacker, T., Schäfers, M., Büsselberg, D.(2008): TNF-alpha differentially modulates ion channels of nociceptive neurons. *Neurosci Lett* 434, 293–298.
27. Davis, J.B., Gray, J., Gunthorpe, M.J., Hatcher, J.P., Davey, P.T., Overend, P., Harries, M.H., Latcham, J., Clapham, C., Atkinson, K., Hughes, S.A., Rance, K., Grau, E., Harper, A.J., Pugh, P.L., Rogers, D.C., Bingham, S., Randall, A., Sheardown, S.A. (2000): Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia. *Nature* 405, 183–187.
28. Dixon, W.J. (1980): Efficient analysis of experimental observations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20, 441-462.

29. Dworkin, R.H., O'Connor, A.B., Audette, J., Baron, R., Gourlay, G.K., Haanpaa, M.L., Kent, J.L. Krane E.J., LeBel, A.A., Levy, R.M., Mackey, S.C., Mayer, J., Miaskowski, C., Raja, S.N., Rice, A.S.C., Schmader, K.E., Stacey B., Stanos, S., Treede, R., Turk, D.C., Walco, G.A., Wells, C.D. (2010): Recommendations for the Pharmacological Management of Neuropathic Pain: An Overview and Literature Update. *Mayo Clin Proc.* 85(3)(suppl), 3-14.
30. Galbraith, J.A., Mrosko, B.J., Myers, R.R. (1993): A system to measure thermal nociception. *J. Neurosci. Methods* 49, 63-68.
31. Gao, Y.J., Zhang, L., Samad, O.A., Suter, M.R., Yasuhiko, K., Xu, Z.Z., Park, J.Y., Lind, A.L., Ma, Q., Ji, R.R. (2009): JNK-induced MCP-1 production in spinal cord astrocytes contributes to central sensitization and neuropathic pain. *J. Neurosci* 29, 4096–4108.
32. Gavva, N.R., Treanor, J.J., Garami, A., Fang, L., Surapaneni, S., Akrami, A., Alvarez, F., Bak, A., Darling, M., Gore, A., Jang, G.R., Kessler, J.P., Ni, L., Norman, M.H., Palluconi, G., Rose, M.J., Salfi, M., Tan, E., Romanovsky, A.A., Banfield, C., Davar, G. (2008): Pharmacological blockade of the vanilloid receptor TRPV1 elicits marked hyperthermia in humans. *Pain* 136, 202–210.
33. Gilchrist, H.D., Allard, B.L., Simone, D.A. (1996): Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 67, 179–188.
34. Greffrath, W. (2006): The capsaicin receptor. "TRPing" transduction for painful stimuli. *Schmerz* 20, 219–225.
35. Grütters, R.S.G. (2012): Die Wirkung des Neuropeptids Nocistatin auf das chronische Schmerzverhalten in einem Modell für neuropathischen Schmerz bei der Ratte.
36. Häuser, W., Schmutzer, G., Henningsen, P., Brähler, E. (2014): Chronische Schmerzen, Schmerzkrankheit und Zufriedenheit der Betroffenen mit der Schmerzbehandlung in Deutschland. Ergebnisse einer repräsentativen Bevölkerungsstichprobe. *Schmerz* 28, 483–492.
37. Hagenacker, T., Splettstoesser, F., Greffrath, W., Treede, R. D., Büsselberg, D. (2005): Capsaicin differentially modulates voltage-activated calcium channel currents in dorsal root ganglion neurones of rats. *Brain Res.* 1062, 74–85.
38. Hagenacker, T., Czeschik, J.C., Schäfers, M., Büsselberg, D. (2010): Sensitization of voltage activated calcium channel currents for capsaicin in nociceptive neurons by tumor-necrosis-factor. *Brain Res. Bull.* 81, 157–163.
39. Harden, R.N. (2005): Chronic neuropathic pain: mechanisms, diagnosis, and treatment. *Neurologist.* 11, 111–122.
40. Hargreaves, K., Dubner, R., Brown, F., Flores, C. and Joris, J. (1988): A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 32, 77-88.

41. Helliwell R.J., McLatchie L.M., Clarke M., Winter J., Bevan S., and McIntyre P. (1998): Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neurosci. Lett.* 250, 177–180.
42. Hensellek, S., Brell, P., Schaible, H.G., Brauer, R., Segond von Banchet, G. (2007): The cytokine TNF alpha increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol. Cell Neurosci.* 36, 381-391
43. Hudson, L.J., Bevan, S., Wotherspoon, G., Gentry, C., Fox, A., Winter, J. (2001) : VR1 protein expression increases in undamaged DRG neurons after partial nerve injury. *Eur. J. Neurosci.* 13, 2105–2114.
44. Hwang, S.W., Cho, H., Kwak, J., Lee, S.Y., Kang, C.J., Jung, J., Cho, S., Min, K.H., Suh, Y.G., Kim, D., Oh, U. (2000): Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: endogenous capsaicin-like substances. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6155–6160.
45. Jensen, T.S., Baron, R., Haanpää, M., Kalso, E., Loeser, J.D., Rice, A.S., Treede, R.D. (2011): A new definition of neuropathic pain. *Pain* 152, 2204–2205.
46. Jeffry, J.A., Yu, S.Q., Sikand, P., Parihar, A., Evans, M.S., Premkumar L.S. (2009): Selective targeting of TRPV1 expressing sensory nerve terminals in the spinal cord for long lasting analgesia. *PLoS One* 4 (9), e7021.
47. Karai, L., Brown, D.C., Mannes, A.J., Connelly, S.T., Brown, J., Gandal, M., Wellisch, O.M., Neubert, J.K., Olah, Z., Iadarola, M.J. (2004): Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest* 113, 1344–1352.
48. Khasabov, S.G., Rogers, S.D., Ghilardi, J.R., Peters, C.M., Mantyh, P.W., Simone, D.A. (2002): Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J. Neurosci.* 22, 9086–9098.
49. Kim, Y.H., Back, S.K., Davies, A.J., Jeong, H., Jo, H.J., Chung, G., Na, H.S., Bae, Y.C., Kim, S.J., Kim, J.S., Jung, S.J., Oh, S.B. (2012): TRPV1 in GABAergic interneurons mediates neuropathic mechanical allodynia and disinhibition of the nociceptive circuitry in the spinal cord. *Neuron* 74, 640–647.
50. Kohno, T., Ji, R.R., Ito, N., Allchorne, A.J., Befort, K., Karchewski, L.A., Woolf, C.J. (2005): Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain* 117, 77–87.
51. Luongo, L., Costa, B., D'Agostino, B., Guida, F., Comelli, F., Gatta, L., Matteis, M., Sullo, N., De Petrocellis, L., de Novellisa, V., Maione, S., Di Marzo, V. (2012): Palvanil, a non-pungent capsaicin analogue, inhibits inflammatory and neuropathic pain with little effects on bronchopulmonary function and body temperature. *Pharmacol Res* 66, 243-250.
52. Maier, C., Rolke, R., Diener, H.-C. (2011): Schmerz begriffe. In: Diener, H.-C., Maier, C. (Hrsg.): *Die Schmerztherapie. Interdisziplinäre Diagnose- und Behandlungsstrategien*. 4. Auflage; S. 3-4. München: Elsevier GmbH Urban und Fischer Verlag.

53. Mason, L., Moore, A., Derry, S., Edwards, J.E., McQuay, H.J. (2004): Systematic review of topical capsaicin for the treatment of chronic pain. *Br. Med. J.* 328, 991–997.
54. Mestre, C., Pelissier T., Fialip J., Wilcox G., Eschalier A. (1994) : A method to perform direct transcutaneous intrathecal injection in rats. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 32, 197–200.
55. Mishra, S.K., Hoon, M.A. (2010) : Ablation of TrpV1 neurons reveals their selective role in thermal pain sensation. *Mol. Cell. Neurosci.* 43,157-163.
56. Montell, C. (2005): The TRP superfamily of cation channels. *Sci. STKE* 272, re3.
57. Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S., Tominaga, M.(2005): Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol. Pain* 1, 3–9.
58. Napadow, V., Kettner, N., Ryan, A., Kwong, K.K., Audette, J., Hui, K.K.(2006): Somatosensory cortical plasticity in carpal tunnel syndrome — a cross-sectional fMRI evaluation. *NeuroImage* 31, 520–530.
59. Napadow, V., Liu, J., Li, M., Kettner, N., Ryan, A., Kwong, K.K., Hui, K.K., Audette, J.F.(2007): Somatosensory cortical plasticity in carpal tunnel syndrome treated by acupuncture. *Human Brain Mapping* 28,159–171.
60. Narita, M., Shimamura, M., Imai, S., Kubota, C., Yajima, Y., Takagi, T., Shiokawa, M., Inoue, T., Suzuki, M., Suzuki, T. (2008): Role of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of cyclooxygenase-2 mRNA in thermal hyperalgesia induced by chronic inflammation in mice. *Neuroscience* 152, 477- 486.
61. Nilius, B., Owsianik, G. (2011): The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biology* 12, article 218.
62. 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 fibres and pain sensation. *Pain* 81,135-145.
63. Ohtori, S., Takahashi, K., Moriya, H., Myers, R.R. (2004): TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord. *Spine* 29, 1082-1088.
64. Puttfarcken, P.S., Han, P., Joshi, S.K., Neelands, T.R., Gauvin, D.M., Baker, S.J., Lewis, L.G., Bianchi, B.R., Mikusa, J.P., Koenig, J.R., Perner, R.J., Kort, M.E., Honore, P., Faltynek, C.R., Kym, P.R., Reilly, R.M. (2010): A-995662 [(R)-8-(4-methyl-5-(4-(trifluoromethyl)phenyl)oxazol-2-ylamino)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-2-ol], a novel, selective TRPV1 receptor antagonist, reduces spinal release of glutamate and CGRP in a rat knee joint pain model. *Pain* 150, 319-326.
65. Pomonis, J.D., Harrison, J.E., Mark, L., Bristol, D.R., Valenzano, K.J., Walker, K. (2003): N-(4-Tertiarybutylphenyl)-4-(3-chlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydropyridine-1(2H)-carboxamide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: II. In vivo characterization in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 306, 387-393.

66. Raisinghani, M., Pabbidi, R.M., Premkumar, L.S. (2005): Activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by resiniferatoxin. *J Physiol* 567, 771–786.
67. Rashid, M.H., Inoue, M., Kondo, S., Kawashima, T., Bakoshi, S., Ueda, H. (2003): Novel expression of vanilloid receptor 1 on capsaicin-insensitive fibers accounts for the analgesic effect of capsaicin cream in neuropathic pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 304, 940–948.
68. Reeve, A.J., Patel, S., Fox, A., Walker, K., Urban, L. (2000): Intrathecally administered endotoxin or cytokines produce allodynia, hyperalgesia and changes in spinal cord neuronal responses to nociceptive stimuli in the rat. *Eur J Pain* 4, 247–257.
69. Roberts, J.C., Davis, J.B., Benham, C.D. (2004): [<sup>3</sup>H]Resiniferatoxin autoradiography in the CNS of wild-type and TRPV1 null mice defines TRPV1 (VR-1) protein distribution. *Brain Res.* 995, 176–183.
70. Rowbotham, M.C., Nothaft, W., Duan, W.R., Wang, Y., Faltynek, C., McGaraughty, S., Chu, K.L., Svensson, P. (2011): Oral and cutaneous thermosensory profile of selective TRPV1 inhibition by ABT-102 in a randomized healthy volunteer trial. *Pain* 152, 1192–1200.
71. Saito, S. and Shingai, R. (2006): Evolution of thermoTRP ion channel homologs in vertebrates. *Physiol Genomics* 27, 219–230.
72. Sandkühler J. (2007): Understanding LTP in pain pathways. *Mol. Pain* 3, article 9.
73. Schaible, H.G. (2006): Peripheral and central mechanisms of pain generation. In: Stein, C. (Hrsg.): *Handbook of Experimental Pharmacology*. Vol. 177; S. 3–28. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag.
74. Schäfers, M., Geis, C. Svensson, C.I., Luo, Z.D., Sommer, C. (2003a): Selective increase of tumour necrosis factor- $\alpha$  in injured and spared myelinated primary afferents after chronic constrictive injury of rat sciatic nerve. *Eur J Neurosci* 17, 791-804.
75. Schäfers, M., Lee, D.H., Brors, D., Yaksh, T.L., Sorkin, L.S. (2003b): Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to exogenous tumor necrosis factor- $\alpha$  after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 23, 3028-3038.
76. Schäfers, M., Sorkin, L.S., Geis, C., Shubayev, V.I. (2003c): Spinal nerve ligation induces transient upregulation of tumor necrosis factor receptors 1 and 2 in injured and adjacent uninjured dorsal root ganglia in the rat. *Neurosci Lett* 347, 179-182.
77. Schäfers, M., Sommer, C., Geis, C., Hagenacker, T., Vandenabeele, P., Sorkin, L.S. (2008): Selective stimulation of either tumor necrosis factor receptor differentially induces pain behavior in vivo and ectopic activity in sensory neurons in vitro. *Neuroscience* 157 (2), 414–423.
78. Scholz, J., Mannion, R.J., Hord, D.E., Griffin, R.S., Rawal, B., Zheng, H., Scoffings, D., Phillips, A., Guo, J., Laing, R.J., Abdi, S., Decosterd, I., Woolf, C.J. (2009): A novel tool for the assessment of pain: validation in low back pain. *PLoS Med* 6, e1000047.

79. Seifert, F., Kiefer, G., DeCol, R., Schmelz, M., Maihöfner, C. (2009): Differential endogenous pain modulation in complex-regional pain syndrome. *Brain* 132, 788–800.
80. Shinoda, M., Ogino, A., Ozaki, N., Urano, H., Hironaka, K., Yasui, M., Sugiura, Y. (2008): Involvement of TRPV1 in nociceptive behavior in a rat model of cancer pain. *J. Pain* 9, 687-699.
81. Siqueira, S.R., Alves, B., Malpartida, H.M., Teixeira, M.J., Siqueira, J.T. (2009): Abnormal expression of voltage-gated sodium channels Nav1.7, Nav1.3 and Nav1.8 in trigeminal neuralgia. *Neuroscience* 164, 573–577.
82. Sorkin, L.S., Doom, C.M. (2000): Epineurial application of TNF elicits an acute mechanical hyperalgesia in the awake rat. *J Peripher Nerv Syst* 5, 96–100.
83. Spicarova, D., Palecek, J. (2010): Tumor necrosis factor alpha sensitizes spinal cord TRPV1 receptors to the endogenous agonist N-oleoyldopamine. *J Neuroinflammation* 7, 49.
84. Svensson, C.I., Schäfers, M., Jones, T.L., Powell, H., Sorkin, L.S.(2005): Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal P-p38. *Neurosci Lett.* 379, 209–213.
85. Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., Rosen, T.A., Gilbert, H., Skinner, K., Raumann, B.E., Basbaum, A.I., Julius, D. (1998): The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 531-543.
86. Treede, R.D., Jensen, T.S., Campbell, J.N., Cruccu, G., Dostrovsky, J.O., Griffin, J.W., Hansson, P., Hughes, R., Nurmikko, T., Serra, J. (2008): Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology.* 70,1630–1635.
87. Trevisani, M., Gatti, R. (2013): TRPV1 Antagonists as Analgesic Agents. *Open Pain J* 6, 108-118
88. Vellani, V., Mapplebeck, S., Moriondo, A., Davis, J.B., McNaughton, P.A. (2001): Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol* 534, 813–825.
89. Wang, X.L., Zhang, Q., Zhang, Y.Z., Liu, Y.T., Dong, R., Wang, Q.J., Guo, Y.X.(2011): Downregulation of GABA<sub>B</sub> receptors in the spinal cord dorsal horn in diabetic neuropathy. *Neurosci Lett.* 490, 112–115.
90. Watabiki, T., Kiso, T., Kuramochi, T., Yonezawa, K., Tsuji, N., Kohara, A., Kakimoto, S., Aoki, T., Matsuoka, N. (2011):Amelioration of neuropathic pain by novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist AS1928370 in Rats without hyperthermic effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 336,743–750.
91. Waxman, S.G., Kocsis, J.D., Black, J.A., (1994): Type III sodium channel mRNA is expressed in embryonic but not adult spinal sensory neurons, and is reexpressed following axotomy. *J. Neurophysiol.* 72, 466-470.
92. Wu, L-J, Sweet, T-B, Clapham, D.E.(2010): International union of basic and clinical pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol.Rev.*62,381–404.

93. Wu, G., Ringkamp, M., Murinson, B.B., Pogatzki, E.M., Hartke, T.V., Weerahandi, H.M., Campbell, J.N., Griffin, J.W., Meyer, R.A. (2002): Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci* 22, 7746–7753.
94. Yaksh, T. L. , Rudy, T.A. (1976): Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space. *Physiol Behav* 17, 1031-1036.
95. Youn, D.H., Wang, H., Jeong, S.J.(2008): Exogenous tumor necrosis factor-alpha rapidly alters synaptic and sensory transmission in the adult rat spinal cord dorsal horn. *J Neurosci Res.* 86, 2867–2875.
96. Zhang, L., Berta, T., Xu, Z.Z., Liu, T., Park, J.Y., Ji, R.R. (2011): TNF-alpha contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain* 152, 419-427.
97. Zhang, X., Huang, J., McNaughton, P.A. (2005): NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J* 24, 4211–4223.

#### **Internetquellen:**

98. Website National Institutes of Health
  - a) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01228838?term=NCT01228838&rank=1>  
(zuletzt zugegriffen am 29.12.2015)
  - b) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00804154?term=NCT00804154&rank=1>  
(zuletzt zugegriffen am 29.12.2015)
99. Website Harvard Apparatus  
[http://www.harvardapparatus.com/webapp/wcs/stores/servlet/haisku2\\_10001\\_11051\\_34519\\_-1\\_HAI\\_ProductDetail\\_N\\_37367\\_37370](http://www.harvardapparatus.com/webapp/wcs/stores/servlet/haisku2_10001_11051_34519_-1_HAI_ProductDetail_N_37367_37370)  
(zuletzt zugegriffen am 09.04.2015)
100. Website Samitek Instruments  
<http://samitekstruments.com/Product-detail.aspx?id=56&pid=15>  
(zuletzt zugegriffen am 09.04.2015)

## 7. Anhang

### 7.1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Definition der klinischen Symptome des neuropathischen Schmerzes	10
Tabelle 2:	Überblick über die Eigenschaften thermosensitiver TRP- Kanäle	13-14
Tabelle 3:	Aufbau der Versuchsgruppen	33
Tabelle 4:	Darstellung der Mittelwerte und der SEM nach intrathekaler Injektion von 10µl NaCl	36
Tabelle 5:	Darstellung der Mittelwerte in g und der SEM in der von Frey Testung nach intrathekaler TNF-Injektion in den verschiedenen Dosierungen im Zeitverlauf	39
Tabelle 6:	Darstellung der Mittelwerte in s und der SEM in der Hitzetestung nach intrathekaler TNF-Injektion in den verschiedenen Dosierungen im Zeitverlauf	39
Tabelle 7:	Darstellung der signifikanten Werte für die von Frey Testung und die Hitzetestung im zeitlichen Verlauf:	39
Tabelle 8:	Darstellung der Mittelwerte in g und der SEM in der von Frey Testung nach intrathekaler NaCl/TNF-Injektion bzw. nach intrathekaler TNF+RTX-Injektion in den verschiedenen Dosierungen im Zeitverlauf	42
Tabelle 9:	Darstellung der Mittelwerte in s und der SEM in der Hitzetestung nach intrathekaler NaCl/TNF-Injektion bzw. nach intrathekaler TNF+RTX-Injektion in den verschiedenen Dosierungen im Zeitverlauf	42
Tabelle 10:	Darstellung der signifikanten Werte für die Hitzetestung nach intrathekaler NaCl/TNF- Injektion bzw. nach intrathekaler TNF+RTX-Injektion in den einzelnen Gruppen und im Vergleich zur Kontrollgruppe	43

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Das nozizeptive System	9
Abbildung 2: Aufbau eines TRP- Kanals	12
Abbildung 3: Chemische Strukturen von Capsaicin und Resiniferatoxin	24
Abbildung 4: Testung der thermalen Hyperalgesie	29
Abbildung 5: Testung der taktilen Allodynie mit von Frey-Haaren	30
Abbildung 6: Schema des zeitlichen Ablaufs der Verhaltenstestungen	32
Abbildung 7: Darstellung der von Frey Testung und des Hitzetests im Zeitverlauf nach intrathekaler Injektion von 10µl 0,9% NaCl	37
Abbildung 8: Zeitverlauf der von Frey Testung und des Hitzetests nach intrathekaler Injektion von 10µl TNF in den Dosierungen 2ng, 20 ng und 200 ng	40
Abbildung 9: Zeitverlauf der von Frey Testung und des Hitzetests nach intrathekaler Injektion von NaCl/TNF bzw. TNF+ RTX- Injektion	44
Abbildung 10: Freilegung der Membrana atlantooccipitalis	55

### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovines Serumalbumin
CFA	Complete Freund´s Adjuvant
CGRP	calcitonin gene-related peptide
DRG	dorsal root ganglion
EPSC	excitatory postsynaptic currents
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
LTP	Langzeitpotenzierung
MAP	mitogen activated protein
MCP-1	monozyte chemoattractant protein-1
mRNA	messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid (üblicherweise 0,9%)
Nav	spannungsabhängiger Natriumkanal
NGF	nerve growth factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NK-1	Neurokinin-Rezeptor 1
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	Tumornekrosefaktor- Rezeptor

TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
RTX	Resiniferatoxin
SNRI	serotonine noradrenaline re-uptake inhibitor
SPR	Substanz P- Rezeptor
SSRI	selective serotonine re-uptake inhibitor
VACC	voltage activated calcium channels
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **8. Danksagung**

Mein Dank für die hilfreiche Unterstützung zur Erstellung meiner Doktorarbeit geht an meinen Doktorvater Priv.-Doz. Dr. Tim Hagenacker, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Den anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für experimentelle Schmerzforschung und Arbeitskräften des Tierlabors danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Ein besonderer und herzlicher Dank geht an meine Eltern, die mir sowohl das Studium der Humanmedizin als auch die Dissertation ermöglicht haben.

Bei meinen Geschwistern und Freunden bedanken ich mich für die sprachliche Korrektur meiner Publikation und für die nötige Abwechslung.

## **9. Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der Online- Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.