

Institut für Experimentelle Chirurgie mit zentraler Versuchstierhaltung  
Medizinische Fakultät der Universität Rostock  
Direktor: Prof. Dr. med. B. Vollmar



**Tiermodelle zum 'complex regional pain syndrome' (CRPS)  
Neurophysiologische und  
intravitalfluoreszenzmikroskopische Studien an der Ratte**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität Rostock

vorgelegt von

Burkhard Finke, geb. am 22. April 1977 in Aachen  
aus Winterthur

Rostock, Juli 2008

Dekan:

Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter:

Prof. Dr. med. B. Vollmar

2. Gutachter:

PD Dr. med. G. Gradl

3. Gutachter:

Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Trentz

**Inhalt**

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
2.1	Historischer Rückblick	6
2.2	Definition des CRPS	7
2.3	Epidemiologie	7
2.4	Klinik und Diagnostik	8
2.5	Pathogenese und Pathophysiologie des CRPS	10
2.6	Therapie des CRPS	12
2.7	Tiermodelle zur Untersuchung des CRPS	13
<b>3</b>	<b>Ziel der Studie</b>	<b>15</b>
3.1	Fragestellung	15
<b>4</b>	<b>Material und Methodik</b>	<b>16</b>
4.1	Versuchstiere und Haltung	16
4.2	Modelle	16
4.2.1	Modell der chronischen Nervenligatur	16
4.2.2	Modell der chronischen Substanz P Applikation	17
4.3	Untersuchungstechniken	17
4.3.1	Klinische Testung	17
4.3.2	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	20
4.3.3	Vollblutanalyse	27
4.3.4	Postmortale Bestimmung des Muskelödems	28
4.3.5	Immunhistochemie des EDL-Muskels	28
4.3.6	Proteinanalyse	29
4.4	Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll	32
4.4.1	Experimentelle Gruppen	32
4.4.2	Experimentelles Protokoll, zeitlicher Ablauf der Versuche	35
4.5	Statistik	35

<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>37</b>
<b>5.1</b>	<b>Ergebnisse nach chronischer Nervenligatur</b>	<b>37</b>
5.1.1	Makrohämodynamik	37
5.1.2	Klinische Beurteilung von Temperatur und Schwellung der Hinterläufe und postmortale Muskelödembestimmung	37
5.1.3	Schmerz	38
5.1.4	Mikrozirkulation	40
5.1.5	Apoptose	44
<b>5.2</b>	<b>Ergebnisse nach chronischer Nervenligatur mit Caspase-Inhibition</b>	<b>46</b>
5.2.1	Makrohämodynamik	46
5.2.2	Klinische Beurteilung von Temperatur und Schwellung der Hinterläufe und postmortale Muskelödembestimmung	47
5.2.3	Schmerz	48
5.2.4	Mikrozirkulation	50
5.2.5	Apoptose	51
<b>5.3</b>	<b>Ergebnisse nach chronischer Applikation von Substanz P</b>	<b>54</b>
5.3.1	Makrohämodynamik	54
5.3.2	Klinische Beurteilung von Temperatur und Schwellung der Hinterläufe und postmortale Muskelödembestimmung	54
5.3.3	Schmerz	55
5.3.4	Mikrozirkulation	58
5.3.5	Apoptose	60
<b>5.4</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>6.1</b>	<b>Diskussion von Material und Methodik</b>	<b>62</b>
6.1.1	Diskussion der Modelle	62
6.1.2	Diskussion der Untersuchungstechniken	65
<b>6.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>70</b>
6.2.1	Modell der chronischen Nervenligatur	70
6.2.2	Modell der chronischen Substanz P Applikation	73

<b>6.3</b>	<b>Schlussfolgerung</b>	<b>78</b>
<b>6.4</b>	<b>Klinische Perspektiven</b>	<b>79</b>
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>I</b>
<b>8.1</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>8.2</b>	<b>Chemikalien</b>	<b>IV</b>
8.2.1	Lösungen der Proteinanalytik	IV
8.2.2	z-VAD-fmk Stammlösung	VI
8.2.3	Substanz P Stammlösung	VII
<b>8.3</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>VIII</b>
<b>8.4</b>	<b>Publikationen und Kongressteilnahmen</b>	<b>X</b>
<b>8.5</b>	<b>Selbstständigkeitserklärung</b>	<b>XI</b>
<b>8.6</b>	<b>Thesen</b>	<b>XII</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	<b>XIV</b>

# 1 Zusammenfassung

Das Complex regional pain syndrome (CRPS) ist eine überwiegend posttraumatisch und postoperativ auftretende Erkrankung, deren Pathogenese bis heute nicht befriedigend geklärt ist. Man unterscheidet zwei Typen: Typ I tritt ohne Nervenschädigung und Typ II mit manifester Nervenläsion auf. Das klinische Bild ist bestimmt durch eine typische Schmerzsymptomatik sowie durch eine Störung der Vasomotorik, der Schweißsekretion und Ödembildung. Im Anfangsstadium unterscheidet sich die Klinik wenig von postoperativen Verläufen, was die Frühdiagnostik schwierig macht. Gleichzeitig ist die frühe Erkennung massgeblich für die Langzeitprognose. Häufig finden sich chronische Verläufe mit Atrophie aller Gewebekompartimente der betroffenen Extremität und langfristiger Invalidisierung. Generell werden zwei grundsätzliche Pathomechanismen als Ursache des CRPS diskutiert. Zum einen werden Veränderungen im zentralen, peripheren und sympathischen Nervensystem verantwortlich gemacht, andererseits periphere entzündliche Mechanismen diskutiert. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Krankheitsbildes wird dem Neurotransmitter Substanz P zugesprochen, welcher aus peripheren Nervenendigungen freigesetzt wird und an der Entstehung neurogener Entzündungen beteiligt ist. Die Therapie des CRPS erfolgt multidisziplinär mit Schmerztherapie, Ruhigstellung und Physiotherapie. Aufgrund der mangelnden Kenntnis zur Pathogenese wurde bis heute kein kausaler Therapieansatz gefunden. Erkenntnisse aus klinischen Studien am Patienten sind limitiert, da Patienten erst in Studien eingeschlossen werden, wenn das Vollbild der Erkrankung ausgebildet ist. Daten zur Initialphase liegen wenige vor. Invasive Untersuchungstechniken können das Krankheitsbild aggravieren und sind somit obsolet. Daher ist der Tierversuch in der Erforschung des CRPS unumgänglich. Verschiedene Modelle wurden bisher entwickelt, so unter anderem das chronic constriction injury Modell (CCI) mit chronischer Nervenligatur. Bisher konnte keines dieser Modelle das CRPS befriedigend mit allen seinen klinischen Facetten widerspiegeln.

In der vorliegenden Arbeit wurden Tiermodelle zur Pathophysiologie des CRPS analysiert. Am weit verbreiteten CCI-Modell wurden nach chronischer Nervenligatur der neuropathische Schmerz und ein Zusammenhang zwischen diesem und apoptotischen Muskelzellen untersucht. Ausserdem wurde das CCI-Modell auf lokale Entzündungsreaktion hin untersucht. In einem neu entwickelten Modell wurde die Rolle von peripher ausgeschütteter Substanz P bei der Entstehung der neurogenen Entzündung im Rahmen des CRPS beleuchtet. Bei diesem Modell wurde zuvor gesunden Tieren Substanz P über 24 Stunden mittels eines Katheters in die A. femoralis infundiert. Es wurde untersucht, ob die Applikation von Substanz P in gesundem Gewebe per se eine Schmerzreaktion hervorrufen kann. An beiden Modellen wurde das Schmerzverhalten der Tiere mit ausführlichen

## Zusammenfassung

neurophysiologischen Methoden getestet. Es wurden klinische Parameter, wie lokale Ödeme und Temperaturdifferenzen registriert. Mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie wurden die Mikrozirkulation, kapillares Leakage und lokale Entzündungsreaktionen im Muskel erfasst. Apoptose wurde intravitalfluoreszenzmikroskopisch, histologisch und mittels Western-Blot nachgewiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass chronische Ligatur des Nervus ischiadicus ein CRPS ähnliches Schmerzsyndrom und myozytäre Apoptose, aber keine inflammatorische Reaktion im Muskelgewebe verursacht. Inhibition der Apoptose mit dem Pancaspaseinhibitor z-VAD-fmk lindert die Ausprägung des Schmerzsyndroms durch Senkung der myozytären Apoptoserate. Ausserdem wurde nachgewiesen, dass chronische Applikation von Substanz P über 24 Stunden lang anhaltende mechanische Hyperalgesie und muskuläre Inflammation verursacht, ohne myozytäre Apoptose auszulösen.

Die untersuchten Modelle zeigen Teilaspekte des klinischen Bildes des CRPS auf, wobei weder die Nervenligatur noch die Substanz P Applikation das Krankheitsbild umfassend widerspiegeln. Eine isolierte periphere Nervenschädigung führt nicht per se zu einer neurogenen Entzündung. Die entzündliche Komponente der Erkrankung wird durch Substanz P eindrücklich induziert, was die Funktion des Neurotransmitters als Trigger von neurogenen Erkrankungen betont.

## 2 Einleitung

### 2.1 Historischer Rückblick

Das Krankheitsbild des „complex regional pain syndrome“ (CRPS) ist eine schon seit Jahrhunderten bekannte und in seinem klinischen Erscheinungsbild immer wieder beschriebene Erkrankung. Bereits 1766 beschrieb John Hunter in einem Abstract in „The lessons on the principles of surgery“ (Hunter, 1766) schmerzhaft posttraumatische Extremitätendystrophien. In dieser Arbeit ging er insbesondere auf die Fernwirkung von Traumen auf distale Muskel und Hautareale ein. Als „Kausalgie“ beschrieb der Chirurg Mitchell 1864 ein Krankheitsbild, das mit geröteten, geschwollenen und brennend schmerzhaften Händen und Füßen einherging (Mitchell et al., 1864). Er hatte dieses Phänomen während des Sezessionskrieges an Soldaten mit Schussverletzungen an den Extremitäten beobachtet. Sehr detailliert wurde die Erkrankung schließlich durch den Hamburger Chirurgen Paul Sudeck im Jahre 1902 beschrieben (Sudeck, 1902). Er interpretierte das Krankheitsbild als eine „entgleiste Heilentzündung“ und beschrieb als erster die im Röntgenbild sichtbare typische Knochenatrophie. Bis heute findet sich in vielen Lehrbüchern die von ihm vorgenommene Einteilung in drei Stadien nach radiologischen und klinischen Aspekten (Sudeck, 1902; Sudeck, 1942).

Im 20. Jahrhundert entwickelte sich verstärkt eine wissenschaftliche Auseinandersetzung mit den pathophysiologischen Grundlagen und therapeutischen Optionen des Krankheitsbildes. Autoren wie de Takats und Miller, Livingston und Evans postulierten eine neurologische Ursache und prägten den Begriff der „reflex sympathetic dystrophy“ (de Takats und Miller, 1943; Livingston, 1943; Evans, 1947). Bisher konnten die exakten pathophysiologischen Grundlagen der Erkrankung trotz zahlreicher klinischer Studien sowie experimenteller Untersuchungen an Tiermodellen nicht zweifelsfrei entschlüsselt werden. Neben dem heterogenen klinischen Erscheinungsbild der Erkrankung führte dies zu einer immensen Vielfalt der Terminologie. Bezeichnungen wie Morbus Sudeck (Sudeck, 1902), Schulter-Hand Syndrom (Steinbrocker et al, 1948), sympathische Reflexdystrophie für posttraumatisch dystrophe Veränderungen (Evans, 1947) und Kausalgie nach manifester Nervenläsion (Mitchell et al., 1864, Blumberg et al., 1991) sind 1993 im Rahmen einer Konsensuskonferenz der „International Association for the Study of Pain“ (IASP) zur Vereinheitlichung der Terminologie unter dem Begriff „complex regional pain syndrome“ (CRPS) zusammengefasst worden (Stanton-Hicks et al., 1995).



### 2.2 Definition des CRPS

Die Subtypisierung des CRPS geht auf die Ätiologie des klinischen Erscheinungsbildes ein. In einen Typ I und Typ II wird je nach Vorliegen einer peripheren Nervenschädigung unterschieden, wobei Typ I den Symptomenkomplex nach einem Trauma ohne nervale Läsion beschreibt und somit dem Krankheitsbild der Sympathischen Reflexdystrophie entspricht (Jänig und Baron, 2004). CRPS II, in der alten Terminologie als Kausalgie bezeichnet, wird bei manifester Schädigung eines Nerven diagnostiziert (Rommel et al., 2004).

Bei ungleicher Ätiologie, die dem CRPS Typ I bzw. Typ II zugrunde liegt, findet man in der klinischen Ausprägung keine Unterschiede (Baron et al. 2003). Die Erkrankung wird durch massiven Spontanschmerz definiert, der im Bezug zur vorliegenden Verletzung unverhältnismäßig stark ist. Weitere Charakteristika sind Allodynie und/oder Hyperalgesie, Veränderungen der Vasomotorik und Schweißsekretion sowie Ödembildung an der betroffenen Extremität und eine fehlende Beschränkung der Störungen auf das Versorgungsgebiet eines peripheren Nerven (Rommel et al., 2004).

Die „International Association for the Study of Pain“ (IASP) nennt folgende Diagnosekriterien für das CRPS (Stanton-Hicks et al., 1995, Jänig und Stanton-Hicks 1996, Rommel et al., 2004):

- Spontanschmerz, Allodynie und/oder Hyperalgesie nach schmerzhaftem Ereignis/ Trauma ohne (CRPS I, Sudeck-Syndrom) oder mit (CRPS II, Kausalgie) peripherer Nervenläsion
- Störungen überschreiten das Versorgungsgebiet eines peripheren Nerven
- Im Vergleich zum auslösenden Ereignis unverhältnismäßig stark ausgeprägt
- In der Frühphase bestand oder es besteht noch eine ödematöse Schwellung, Veränderungen der Hautdurchblutung und Schweißsekretionsstörungen
- Andere Erkrankungen, die die Veränderungen erklären können, müssen ausgeschlossen sein

### 2.3 Epidemiologie

Die überwiegend vorkommende Variante des „complex regional pain syndrome“ ist das CRPS Typ I. In einer prospektiven klinischen Studie diagnostizierten Birklein et al. (Birklein et al., 2000b) unter 145 CRPS-Patienten 84% CRPS I und 16% CRPS II. Angaben, wie häufig es nach Traumata z.B. am Unterarm zum CRPS kommt, schwanken zwischen 11 und 37% (Atkins et al., 1990; Field et al., 1992; Gradl et al., 2003). Wie oft manifeste Nervenläsionen in das klinische Bild des CRPS II gipfeln, wurde bisher nicht in prospektiven

Studien untersucht. Der prozentuale Anteil wird hier allerdings deutlich niedriger liegen als beim CRPS Typ I im Verhältnis zu Unterarmfrakturen.

### 2.4 Klinik und Diagnostik

Der Schmerz ist das Leitsymptom des CRPS. Typisch ist der heftige, als bohrend oder brennend angegebene Spontanschmerz, der in 90% der Fälle auftritt. Dieser wird in der Regel als diffus beschrieben und ist meist durch körperliche Anstrengung, sowie Orthostasebedingungen (Herabhängen des Armes) aggravierbar. Wichtig ist, dass die Ausprägung des Schmerzes nicht im Verhältnis zum vorliegenden Trauma liegt. Als weitere Schmerzqualitäten werden sowohl thermische als auch mechanische Allodynie (50-80%) und Hyperalgesie (70%) angegeben. Auch Dys- und Hypästhesien werden beschrieben. Sympathische Symptome treten auf in Form typischer Veränderungen der Hauttemperatur, gestörter Schweißbildung (80%) und Ödementwicklung (70%). Bei der Veränderung der Hauttemperatur ist zu beachten, dass sie bei bis zu 80% der Patienten auftritt, die Veränderung aber heterogen ist. So wird überwiegend eine Überwärmung der erkrankten Extremität im Vergleich zur Gegenseite festgestellt. Es wurde aber auch Abkühlung der betroffenen Seite beobachtet. Ähnlich kann es sowohl zu Hyper- als auch Hypohydrosis kommen. Charakteristisch sind außerdem die Beteiligung von peripheren Gelenken mit Versteifung und die Demineralisierung beteiligter Knochen. Desweiteren kann es im Rahmen eines CRPS bei bis zu 90% der Fälle zu motorischen Störungen, wie Tremor oder Koordinationdefiziten bis hin zu Paresen kommen. In 30-40% der Fälle werden trophische Störungen der Haut und der Hautanhangsgebilde beobachtet. Auch eine psychische Komponente wird beschrieben (Baron et al., 2003).

Die Vielfalt in der Symptomatik des Krankheitsbildes stellt ein entscheidendes Problem bei der Diagnostik dar. Nach Weichteil- oder Nervenschädigung einer Extremität, sei es rein traumatisch oder im Zuge einer posttraumatischen oder elektiven Operation, ist die Abgrenzung vom CRPS zum normalen Verlauf der Heilung zunächst schwierig (Gradl et al., 2006). In der Frühphase unterscheiden sich die Verläufe in der Schmerzhaftigkeit und den typischen Entzündungszeichen nur wenig. Gleichzeitig ist aber die frühe Erkennung des CRPS entscheidend für die rechtzeitige und richtige Therapie und damit für den weiteren klinischen Verlauf (Baron et al., 2003). Die diagnostischen Kriterien der IASP können helfen, CRPS frühzeitig von posttraumatischen Entzündungsreaktionen zu differenzieren. Unterschiedliche klinische Studien haben Kriterien gefunden, anhand derer eine frühzeitige Diagnosestellung erleichtert wird. Rommel et al. fassen diese in ausführlichen klinischen Tests zusammen (Rommel et al., 2004). Neben der Schmerzanamnese werden vegetative

und motorische Störungen ebenso erfasst wie sensorische Beeinträchtigungen. Baron fasst 2003 die drei wichtigsten Aspekte der klinischen Diagnostik zusammen:

- die typische Lokalisation mit distaler Generalisierung,
- die Zusammenhänge von Schmerz, neurologischer Symptomatik und Gelenkfunktionen sowie
- der zeitliche Ablauf mit meist rapider Entwicklung der Symptomatik innerhalb von Stunden oder Tagen.

Die Beschwerden treten in der Regel distal generalisiert auf. Die Lokalisation ist also nicht auf das Innervationsgebiet eines einzelnen Nervens beschränkt. Es besteht ein Zusammenhang zwischen den Schmerzen und einerseits der charakteristischen neurologischen Symptomatik, d.h. der Beteiligung des somatosensorischen, des somatomotorischen und des autonomen Nervensystems. Andererseits wird ein Zusammenhang des Schmerzes zu Gelenkbeteiligung beobachtet. In der Frühphase entwickelt sich die Symptomatik des CRPS typischerweise rapide, d.h. innerhalb von Stunden oder Tagen mit Verlagerung von lokalen Schmerzen im traumatisierten Bereich zum typischen diffusen Schmerzbild in der gesamten distalen Extremität. Als technische Zusatzuntersuchung geben Baron und Mitarbeiter die 3-Phasen-Skelettszintigraphie mit hoher Sensitivität und Spezifität an (Baron et al., 2003). Gradl et al. empfehlen 2003 die klinische Evaluation als sensitiv (78%) und spezifisch (94%) (Gradl et al., 2003). Die Radiographie geben sie als spezifisch (91%) aber wenig sensitiv (33%) an. Für die Thermographie wird eine niedrige Sensibilität (58%), als auch Spezifität (66%) angegeben. Das wichtigste Standbein der Diagnostik ist also die aufmerksame Beobachtung der Klinik im posttraumatischen bzw. postoperativen Verlauf.

Aufgrund der häufigen Chronifizierung des Krankheitsbildes können langfristige Invalidisierungen auftreten (Field et al. 1992). So lassen sich nach sechs Monaten bei bis zu 80% der Fälle anhaltende Versteifungen beobachten und nach 12 Monaten bei bis zu 50% (Bickerstaff et al., 1994). In einer Langzeitverlaufsstudie konnte gezeigt werden, dass sich acht Jahre nach Diagnosestellung keine wesentlichen Veränderung im ISS (Impairment-Level SumScore) im Vergleich mit den Daten ein Jahr nach Diagnosestellung entwickelt hatte (Vaneker et al. 2006). Das häufige Auftreten mit geschätzten 15000 Neuerkrankungen/Jahr in Deutschland zusammen mit der Chronizität des Leidens bedingt eine erhebliche sozialmedizinische Bedeutung. Die volkswirtschaftliche Belastung wird mit jährlich über hundert Millionen Euro angegeben (Dertwinkel et al. 1994).

## 2.5 Pathogenese und Pathophysiologie des CRPS

Die Anlehnung des Überbegriffs CRPS an die Klinik bei sehr grober ätiologischer Einteilung in Typ I und II macht klar, dass die Bezeichnung CRPS ein eher vager Begriff ist, dessen nicht-mechanistischer Ansatz von Jänig und Baron wiederholt kritisiert wird (Baron und Wasner, 2001; Jänig und Baron 2004). Durch Konzentration auf mechanistische Ansätze helfen tierexperimentelle Modelle, die Hypothesen zum Krankheitsbild zu überprüfen und somit potentielle Pathomechanismen zu entschlüsseln, bzw. das Feld der möglichen Ursachen einzugrenzen (Jänig und Baron, 2002). Generell werden zwei verschiedene pathomechanistische Ansätze als Ursache des CRPS diskutiert (Jänig und Baron, 2004). Zum einen wird der Ansatz vertreten, dass Veränderungen des sympathischen, des peripheren und des zentralen Nervensystems zur klinischen Ausprägung des CRPS führen (Jänig, 2001; Jänig und Baron 2002). Andererseits spricht die Tatsache, dass das klinische Bild des CRPS mit klassischen Entzündungszeichen einhergeht, dafür, dass periphere entzündliche Mechanismen an der Entstehung des CRPS beteiligt sind (Jänig und Baron, 2004). Eine gemeinsame Vorstellung, die in unterschiedlichen Ansätzen zum Tragen kommt, ist die Verlängerung oder Verstärkung entzündlicher Reaktionen durch Faktoren, die bei CRPS-Erkrankten erhöht vorliegen.

So postulieren Jänig und Baron (2002) einen sympathisch aufrechterhaltenen Schmerz, der am CRPS beteiligt sein soll. Dieser wird durch eine erhöhte Aktivität in sympathischen Neuronen unterhalten, die zu einer Schmerzhypersensibilisierung durch unerschwellige Reizung von afferenten Neuronen im Dorsalhorn im Rückenmark führt. Eine Blockade des Ganglion stellatum bei diesen Patienten führte teilweise zu Schmerzlinderung (Torebjörk et al., 1995). Im Gegensatz dazu erhöhte eine Reizung des sympathischen Systems durch Abkühlung des gesamten Körpers im Vollbad die Schmerzempfindlichkeit (Baron et al., 2002).

Die Rolle von Substanz P wird immer wieder bei der Schmerzinduktion durch afferente Nerven an deren peripheren Endigungen betont (Guo et al., 2004; Jang et al., 2004). Die teilweise permanent anhaltende schmerzlindernde Wirkung von Sympathikusblockaden bei CRPS-Patienten (Jänig und Baron, 2002) lässt sowohl an die Aufhebung der unerschweligen Reizung und damit der Hyperreaktivität der nozizeptiven Neurone denken, als auch an eine ebenfalls durch verminderte Reizung der Nozizeptoren bedingte verminderte antidrome Freisetzung von Substanz P. Hierfür spricht auch, dass bei Guo et al. (Guo et al., 2004) sowohl eine intrathekale, als auch eine periphere Applikation des Substanz P-Antagonisten LY 303870 zu einer Linderung der mechanischen Allodynie führte. Also muss sowohl die nach zentral gerichtete, als auch die periphere Wirkung von Substanz P in Erklärungsansätzen zu der Entstehung und Aufrechterhaltung des Schmerzes bei CRPS bedacht werden.

Für die Erklärung des peripheren Ödems bei CRPS liegen ebenfalls Ansätze vor, die unterschiedliche Mechanismen für die Entstehung bzw. Verlängerung dieses Symptoms postulieren. Blumberg et al. stellten 1994 den Einfluss spinaler Anästhesie auf periphere Ödembildung vor. In ihren Untersuchungen kam es zu einem Rückgang von Ödemen bei CRPS-Patienten (Blumberg et al., 1994). Jänig und Baron (2002) erklären dies durch eine Blockierung sympathischer Ganglien und damit einer Ausschaltung sympathischer Dysfunktion. Sie machen die cholinerge Innervation der Blutgefäße für die Ödembildung verantwortlich, schließen aber gleichzeitig einen Einfluss des Sympathikus auf nozizeptive Neurone als Ursache für die Ödembildung nicht aus (Jänig und Baron, 2002). Die permanente sympathische Reizung afferenter Neurone führt zu antidromem Transport und peripherer Freisetzung von Substanz P. Dieser so genannte Hinterhornreflex vermittelt über Interneurone auf spinaler Ebene eine Vasodilatation und Ödembildung im zugehörigen Innervationsgebiet. Hierbei spielt die periphere Ausschüttung von Substanz P aus afferenten, nozizeptiven Fasern eine entscheidende Rolle (Willis, 1999). Eine Hemmung dieses Hinterhornreflexes und damit der Rückgang eines Ödems durch spinale Anästhesie könnten also mit dem Rückgang peripherer Substanz P Freisetzung zusammenhängen.

Bei verschiedenen denervierenden dystrophischen Erkrankungen des Skelettmuskelapparates, so der Polyneuropathie (Tews et al., 1997) oder der Spinalen Muskelatrophie (Migheli et al., 1997), konnte apoptotischer Zelluntergang im betroffenen Muskel nachgewiesen werden. Yoshimura und Harii zeigten im Tiermodell an der Ratte, dass Denervierung von Muskel zu myozytärer Apoptose führt (Yoshimura und Harii, 1999). Migheli et al. konnten hingegen feststellen, dass es bei entzündlichen Muskelerkrankungen, wie Polymyositis und Dermatomyositis, nicht zu Muskelzellapoptose kommt (Migheli et al., 1997). Bei klinisch eindrücklicher Geweberückbildung an der betroffenen Extremität bei CRPS Patienten muss neben einfacher Atrophie auch an Substanzverlust durch Apoptose gedacht werden. Da die Entnahme von Muskelbiopsien bei CRPS-Patienten wegen möglicher Aggravierung des Krankheitsbildes nicht in Frage kommt, liegen zu dieser Fragestellung keine am Menschen erhobenen Daten vor. Ob eine myozytäre Apoptose an der Entstehung des CRPS typischen Schmerzbildes im Tiermodell beteiligt ist, kann zurzeit nicht abschliessend beurteilt werden. Auch ist nicht geklärt, ob eine neurogene Entzündung zu Muskelzellapoptose führt.

Sudeck's Interpretation des Krankheitsbildes als „entgleiste Heilentzündung“ (1902), also als entzündlichen Prozess, wurde in den letzten Jahren durch klinische Untersuchungen immer mehr untermauert (Heerschap et al., 1993; Oyen et al., 1993; Goris, 1998; van der Laan et al., 1998a; Birklein et al., 2000b). Es scheint inzwischen sicher, dass das Krankheitsbild des CRPS entscheidend durch die entzündliche Komponente geprägt ist. Noch ist nicht abschließend geklärt, in welchem Ausmaß Substanz P an der Entwicklung der

inflammatorischen Merkmale beteiligt ist. Verschiedene Faktoren weisen jedoch darauf hin, dass der Neurotransmitter eine wichtige Rolle spielt (Otsuka und Yoshinaka, 1993; Daemen et al., 1998). In einer Studie von Jang et al. wird Substanz P mit der Induktion von neuropathischem Schmerz in Zusammenhang gebracht (Jang et al., 2004). Scardina et al. stellen in einer Studie die These auf, dass Substanz P bei neurogenen Inflammationen eine Triggerrolle übernimmt (Scardina et al., 2004).

## 2.6 Therapie des CRPS

Bei der Therapie des CRPS ist an erster Stelle die frühest mögliche Diagnose wichtig. Die therapeutischen Bemühungen müssen multidisziplinär koordiniert werden. Zu jedem Zeitpunkt der Erkrankung muss eine den aktuellen Symptomen angepasste Therapiekonzeption angewandt werden, um dem sowohl inter- als auch intraindividuell unterschiedlichen Krankheitsbild gerecht zu werden. Je nach Ausprägung müssen die verschiedenen Aspekte des Syndroms, wie die Schmerzen, autonome Störungen (z.B. Ödem), Bewegungseinschränkungen und psychische Aspekte parallel behandelt und unterschiedlich stark gewichtet werden (Dertwinkel et al., 1998; Stanton-Hicks et al., 1998; Baron et al., 2003). Für den Erfolg der physiotherapeutischen Behandlung ist eine adäquate Schmerztherapie erforderlich. Desweiteren sind einige Leitregeln zu beachten: so dürfen durch die Behandlung keine zusätzlichen Schmerzen oder andere Symptomverstärkung ausgelöst werden. Ebenso verzögert eine zu rasche Intensivierung der therapeutischen Maßnahmen, als auch ein Hinauszögern der indizierten Therapie die Heilungsaussichten. In der Pharmakotherapie kommen einerseits Nichtopioid-Analgetika, Metamizol und Opioide zur Schmerztherapie zum Einsatz. Kortikosteroide werden im Akutstadium zur Behandlung der entzündlichen Komponente vorübergehend hochdosiert eingesetzt. Antidepressiva und Antikonvulsiva werden hauptsächlich zur Therapie des chronischen CRPS eingesetzt. Interventionelle Maßnahmen, wie die Sympathikusblockade oder -ektomie, sollten bei therapieresistenten Fällen nach diagnostischen Blockade frühzeitig durchgeführt werden (Baron et al., 2003). Kalzitonin findet häufige Anwendung und soll vor allem eine schmerzreduzierende Wirkung durch Hemmung der Knochenumbauvorgänge beim chronischen CRPS haben (Taoussanis, 1981). Der Routineeinsatz dieser Substanzgruppe ist allerdings durch die hohe Rate insbesondere gastrointestinaler Nebenwirkungen kritisch zu betrachten (Schürmann et al., 2001). Diese Zusammenstellung zeigt, dass die Therapie des CRPS überwiegend symptomatisch ist, wobei zu diskutieren bleibt, ob die Sympathikusblockade einen kausalen Ansatz darstellt. Aufgrund des mangelnden pathomechanistischen Verständnisses der Erkrankung ist eine kausale Behandlungsmethode bis heute nicht möglich. Trotz fortschreitender Therapiemöglichkeiten

ist die klinische Symptomatik oft wenig reversibel und mündet nicht selten in Langzeitverläufe, welche die betroffenen Patienten langfristig invalidisieren (Atknis et al., 1990; Veldmann et al., 1993).

### **2.7 Tiermodelle zur Untersuchung des CRPS**

Die klinische Forschung ist in der Suche nach einem schlüssigen Konzept zur Pathophysiologie des CRPS durch einige Faktoren limitiert. Die meisten klinischen Studien beschäftigen sich mit Patienten, bei denen das CRPS bereits voll ausgeprägt ist und die sich somit nicht mehr in der Initialphase der Erkrankung befinden. Hingegen sind prospektive Studien an Risikokollektiven selten. Da invasive Untersuchungstechniken das Krankheitsbild aggravieren können, sind solche am Patienten kontraindiziert (Jänig, 1991). Um die Symptome des Krankheitsbildes zu simulieren und invasive Untersuchungstechniken in ihrer Entstehungsphase einzusetzen, wurden daher unterschiedliche tierexperimentelle Modelle entwickelt (Bennet und Xie, 1988; Kim und Chung, 1992; Gradl et al., 2004; Guo et al., 2004).

Zur Induktion des posttraumatisch entstehenden CRPS I existiert bislang kein etabliertes Tiermodell. Durch die lokale, intraartikuläre Injektion eines Sauerstoffradikals versuchten Van der Laan et al. erstmals eine lokale Entzündungsreaktion im Sinne eines „local SIRS“ am Hinterlauf einer Ratte zu erzeugen (Van der Laan et al., 1998a). Dieses Modell konnte sich nicht etablieren, da es mit der posttraumatischen Genese des CRPS I wenig gemeinsam hatte. Guo et al. stellten 2004 ein posttraumatisches Tiermodell vor, bei dem Ratten mit Tibiafraktur nach 4 wöchiger Gipsbehandlung, wie auch Kontrolltiere ohne Fraktur, Allodynie, ödematöse Schwellung, Überwärmung und periartikuläre Osteoporose entwickelten (Guo et al., 2004). Durch die Induktion eines Ischämie-Reperfusionsschadens am Hinterlauf von Ratten konnten Coderre et al. 4 Wochen nach Intervention ein gesteigertes Schmerzverhalten nachweisen. Im Jahr 2005 konnten Gradl et al. zeigen, dass die lokale intraarterielle Applikation eines mediatorreichen Überstandes zuvor traumatisierten Muskels zu lokaler Entzündungsreaktion und einem langanhaltenden Schmerzsyndrom ähnlich dem CRPS führt (Gradl et al., 2005a).

Zur experimentellen Induktion des durch Nervenläsion entstandenen CRPS II wurden bereits mehrere Tiermodelle vorgestellt, die immer noch als Standard bei der experimentellen Analyse des CRPS verwendet werden. Das Modell nach Kim und Chung sieht eine feste Ligatur der Spinalnerven L5 und L6 vor, was ein ausgeprägtes neuropathisches Schmerzsyndrom mit Allodynie und Hyperpathie, sowie autonomen Störungen, wie Veränderungen der Hauttemperatur und Ödem, hervorruft (Kim und Chung, 1992). Bei diesem Modell sind die sensiblen und motorischen Ausfälle, die durch die feste

## Einleitung

Ligatur entstehen, problematisch. Bennet und Xie führten hingegen am N. ischiadicus eine rückenmarksnahe vierfache lose Ligatur durch, („chronic constriction injury (CCI)“), die ebenfalls zu neuropathischem Schmerz, Temperaturveränderungen und Ödem führte, dabei aber zu keiner Einschränkung der motorischen und sensiblen Eigenschaften des Nerven führte (Bennet und Xie, 1988). Auch die von Shir und Seltzer durchgeführte feste Ligatur des N. ischiadicus führte zu ähnlichen Symptomen (Shir und Seltzer, 1990). Diese Modelle zeichnen neuropathischen Schmerz im Tiermodell suffizient nach, können aber nicht als integrierende Modelle zum CRPS II bezeichnet werden. Ein wichtiger Aspekt des CRPS ist die lokale Entzündungsreaktion, die in diesen Modellen nicht zum Tragen kommt.



### 3 Ziel der Studie

In der vorliegenden Arbeit werden Tiermodelle zur Pathophysiologie des CRPS analysiert. Zum einen wird das weit verbreitete CCI-Modell zum neuropathischen Schmerz eingehend evaluiert und ein Zusammenhang zwischen apoptotischen Muskelzellen und den im Modell beobachteten Schmerzen untersucht. Die These Paul Sudecks, dass bei der Entstehung des CRPS eine entzündliche Komponente massgebend ist, erlebte in letzter Zeit eine Renaissance (Heerschap et al., 1993; Oyen et al., 1993; Goris, 1998; van der Laan et al., 1998a; Birklein et al., 2000b). Vor diesem Hintergrund wird untersucht, ob das CCI-Modell auch die lokale Entzündungsreaktion des CRPS widerspiegelt. Desweiteren wird vor diesem Hintergrund die Rolle von Substanz P bei der neurogenen Entzündung des CRPS durch die Wirkung des Neurokinins im peripheren Gewebe beleuchtet. Es wird untersucht, ob die Applikation von Substanz P in gesundem Gewebe per se eine Schmerzreaktion hervorrufen kann. Auch das Ausmass der Entzündungsreaktion, die durch die Gabe von Substanz P in zuvor ungeschädigtem Muskelgewebe hervorgerufen werden kann, wird analysiert.

#### 3.1 Fragestellung

Zur Untersuchung der unter dem Punkt „Ziel der Studie“ genannten Aspekte sollen in einer experimentellen *in vivo* Studie anhand neurophysiologischer und intravitalmikroskopischer Techniken folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welche morphologischen Veränderungen des Muskels gehen mit dem klinischen Bild des neuropathischen Schmerzes im CCI-Modell einher?
2. Spielen apoptotische Muskelzellen im CCI-Modell eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung der typischen Schmerzsymptomatik?
3. Welchen Effekt hat peripher freigesetzte Substanz P auf die Mikrozirkulation des Muskels? Löst Substanz P im Muskel eine lokale Entzündungsreaktion aus?
4. Führt eine periphere Applikation von Substanz P zur Entwicklung einer Schmerzsymptomatik?
5. Erfüllt Substanz P durch kurzzeitige Applikation eine Triggerfunktion bei der Auslösung einer neurogenen Entzündung?
6. Werden durch CCI und Substanz P Applikation unterschiedliche Aspekte, wie zum Beispiel Schmerzqualitäten oder Inflammation des CRPS im Modell nachempfunden?

## 4 Material und Methodik

### 4.1 Versuchstiere und Haltung

Als Versuchstiere wurden männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht (KG) von 225-250g verwendet. Die Tiere wurden vor Beginn der experimentellen Untersuchungen mindestens eine Woche in einem klimatisierten Raum der zentralen Versuchstierhaltung des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Universität Rostock (Tierschutzbeauftragter Dr. rer. nat. H. Stein) artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in Einzellaborkäfigen bei 12 stündigem Tag-/Nachtrhythmus unter Bereitstellung von Wasser und Standardlaborfutter gehalten. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz genehmigt (AZ: LVL-MV 310-4/7221.3-1.1-019/01).

### 4.2 Modelle

Die Anästhesie der Tiere wurde mit Pentobarbital (50mg/ kg KG, Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos) intraperitoneal eingeleitet. Die Tiere wurden am rechten Hinterlauf rasiert und anschließend entsprechend der nachfolgend beschriebenen chirurgischen Zugänge in Bauch- oder Rückenlage positioniert. Mittels Heizplatte (Klaus Effenberger, Medizintechnische Geräte, Pfaffing, Deutschland) wurde die Körperkerntemperatur konstant bei 36-37°C gehalten. Alle Eingriffe wurden unter nicht sterilen, aseptischen Bedingungen mit mikrochirurgischen Instrumenten durchgeführt.

#### 4.2.1 Modell der chronischen Nervenligatur

Zur Induktion eines chronischen Nervenschadens wurde das „chronic constriction injury“ (CCI) Modell von Bennet und Xie (1988) verwendet. Bei diesem Modell wird der Nervus ischiadicus der Ratte mittels einer rückenmarksnahen, losen Ligatur definiert und reproduzierbar chronisch geschädigt. Das CCI-Modell ist eine international anerkannte Methode zur Induktion eines tierexperimentellen Schmerzsyndroms und wurde von vielen Autoren hierzu genutzt (Attal et al., 1990; Munglani et al., 1996; Yonehara und Yoshimura, 2001). In diesen Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese Methode der chronischen Nervenligatur zu einer CRPS II-typischen Schmerzsymptomatik führt (Bennet und Xie, 1988; Attal et al., 1990).

### 4.2.2 Modell der chronischen Substanz P Applikation

Substanz P gehört zu den Tachykininen, einer Familie bioaktiver Peptide, zu der auch Neurokinin A und B gehören (Black PH, 2002). Substanz P bindet vorwiegend an Neurokinin-1-Rezeptoren. Zur chronischen Applikation von Substanz P wurden den Versuchstieren osmotische Alzet<sup>®</sup>-Minipumpen („alzet<sup>®</sup> mini-osmotic pump“, Mittlere Pumprate: 8,06µl pro Stunde über 24 Stunden, Füllungsvolumen 230µl; DURECT Corporation, Cupertino, USA) subkutan unter die Bauchhaut implantiert. Diese Pumpen geben ihren Inhalt in isotoner Umgebung mittels osmotischen Drucks kontinuierlich über 24 Stunden ab. Über einen Katheter (Polyethylen Katheter, Innendurchmesser: 0.28mm; ReCathCo, ILL, Pittsburgh, USA), der die Alzet<sup>®</sup>-Minipumpe mit der Arteria femoralis der Tiere konektiert, wurde der Hinterlauf der Tiere konstant mit Substanz P perfundiert. Mit dieser Technik wurde den Tieren über 24 Stunden kontinuierlich 260µg Substanz P/kg KG lokal in das Versorgungsgebiet der Arteria femoralis appliziert.

## 4.3 Untersuchungstechniken

Alle Tiere wurden initial vor chirurgischer Intervention an Tag 0, nach 1 Tag und vor der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie an Tag 4 nach Versuchsprotokoll klinisch getestet. Bei Gruppen mit einem Versuchsprotokoll von nur 1 Tag wurden die Tiere entsprechend an Tag 0 und an Tag 1 vor der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie klinisch untersucht.

### 4.3.1 Klinische Testung

*Messung von Hauttemperatur und Ödem.* Als typische klinische Entzündungszeichen „Dolor, Calor, Rubor, Tumor und Functio laesa“ wurden diese Daten als Maß für eine lokale Entzündungsreaktion angesehen. Die Messung der klinischen Parameter Hauttemperatur und Volumen der Pfoten erfolgte unmittelbar vor der chirurgischen Intervention an Tag 0 bzw. vor der chirurgischen Intervention an den entsprechenden Untersuchungstagen. Die Untersuchungen wurden in Pentobarbital- bzw. Äthernarkose durchgeführt.

Die Messung der Hauttemperatur erfolgte mittels einer Oberflächenelektrode (Mon-a-therm, Hauttemperaturfühler 90045, Mallinckrodt Medical, St. Louis, USA) an der Plantarseite der Pfote. Es wurde die Temperatur der betroffenen rechten Pfote und der kontralateralen Pfote erfasst. Beurteilt wurde die Differenz der Temperaturen zwischen den beiden Seiten. Außerdem wurde die Körperkerntemperatur erfasst.

## Material und Methodik

Das Pfootenvolumen wurde durch Wasserverdrängung in einem 10ml- Glaskolben erfasst. Hierbei wurden die betroffene und die kontralaterale Pfote bis zum Sprunggelenk in den Kolben eingetaucht und die Differenz der Füllhöhe des Wassers im Gefäß notiert (Abbildung 1). Als Ödem wurde die Volumendifferenz zwischen der betroffenen und der kontralateralen Pfoten angegeben.



Abbildung 1: Messung der Wasserverdrängung des Hinterlaufs einer Ratte zur klinischen Bestimmung eines Ödems der Pfote.

*Neurophysiologische Erfassung des Schmerzes.* Zur Erfassung des Spontanverhaltens der Tiere konnten sich diese in einem 16x15x22cm großen Plexiglaskäfig (Eigenbau, Universität Rostock, Deutschland) auf einem metallenen Untergrund bei Raumtemperatur (21°C) frei bewegen. Nach 10 Minuten Gewöhnungsphase wurde ohne Intervention durch den Beobachter die Haltung der rechten Hinterpfote beurteilt. In 3 Phasen von jeweils 300s wurde das Tier beobachtet und die Haltung der Pfote wie folgt kategorisiert:

0= die betroffene Pfote liegt normal auf, 1= die betroffene Pfote liegt leicht auf und die Zehen befinden sich ventroflektierter Haltung, 2= nur die Innenseite der betroffenen Pfote liegt auf, 3= nur die Ferse der betroffenen Pfote liegt auf und die Pfote befindet sich in ventroflektierter Haltung, 4= die gesamte Pfote ist angehoben, 5= das Tier leckt an der betroffenen Extremität (Abbildung 2).

Es wurde erfasst, wie lange das Tier während der Beobachtungszeiträume die betroffene Pfote in den jeweiligen Stellungskategorien hielt. Der als Untersuchungsergebnis angegebene Schmerzindex für das Spontanverhalten errechnet sich nach folgender Formel:

$$(0x t_{\text{Kat. 0}} + 1x t_{\text{Kat. 1}} + 2x t_{\text{Kat. 2}} + 3x t_{\text{Kat. 3}} + 4x t_{\text{Kat. 4}} + 5x t_{\text{Kat. 5}}) / 300s$$

Hierbei sind  $t_{\text{Kat. 0-5}}$  die Zeiten, die das Tier die betroffene Extremität in der jeweiligen Kategorie hielt (Attal et al., 1990).

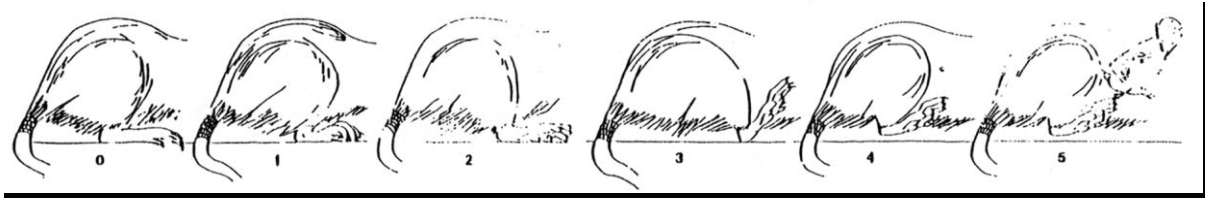


Abbildung 2: Klinische Testung nach Attal et al. (1990). Die Zeichnung zeigt den betroffenen Hinterlauf des Tieres. Sechs verschiedene Haltungen werden nach der jeweiligen nozizeptiven Reaktion klassifiziert.

Schmerztestung auf thermische Reize: Der oben beschriebene Plexiglaskäfig ermöglichte über einen Schienenmechanismus den Wechsel der Bodenplatte, ohne dass das Tier den Käfig hierfür verlassen musste. Der Untergrund konnte somit gegen eine elektrisch geheizte und eine mittels Durchflusskühler (Multitemp. II, LKB Bromma, Schweden) gekühlte Platte (beide Eigenbau, Universität Rostock, Deutschland) (Abbildung 3) ersetzt werden. Damit erlaubte der Aufbau die Schmerztestung auf thermische Reize bei Temperaturen von 40°C und von 4°C. Nach einer jeweiligen Gewöhnungsphase von 10min erfolgte die Bestimmung des nozizeptiven Index nach oben genanntem Schema.

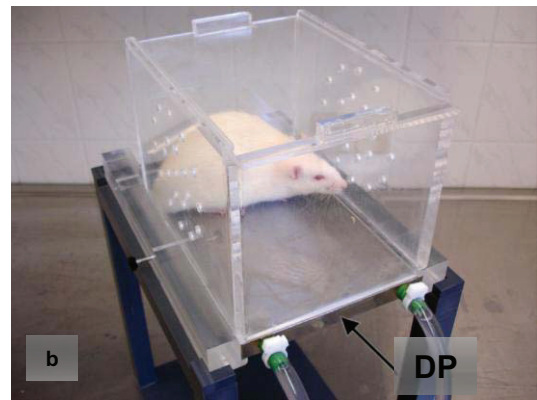
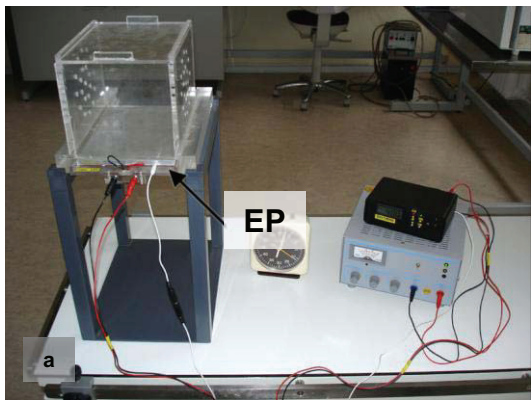


Abbildung 3: Schmerztestung unter thermischer Reizung: a.) Versuchsaufbau mit elektrisch heizbarer Platte (EP; 40°C) und b.) Testung mit Durchflussgekühlter Platte (DP; 4°C).

Schmerztestung auf mechanischen Reiz: Mittels Filamenten nach von Frey (Semmes-Weinstein Monofilaments, North Coast Medical Inc., Morgan Hill, CA, USA) wurde an der rechten Hinterpfote die mechanische Schmerzschwelle quantifiziert. Über den bereits erwähnten Schienenmechanismus des Plexiglaskäfigs konnte die Bodenplatte durch einen metallenen Maschenboden mit 0,6x0,6cm großen Maschen ersetzt werden. Nach 10min Gewöhnungsphase auf diesem Untergrund begann die Testung mit geeichten von Frey Filamenten mit 0,6g bis 15g (5,83mN bis 147mN) (Abbildung 4). Die Reaktion des Tieres wurde in 5 Durchgängen im Abstand von jeweils 3min getestet. Pro Durchgang wurde die rechte Hinterpfote 6-mal mit einer Frequenz von 1/s stimuliert. Als positive Reaktion wurde ein Wegziehen der Pfote gewertet. Beginnend mit dem feinsten Filament wurden mit allen

Stärken jeweils 5 Durchgänge durchgeführt. Die Angabe des Testergebnisses erfolgt in Prozent ( $((100/30) \times \text{positive Reaktionen} = \%)$ ) (Chaplan et al., 1994).

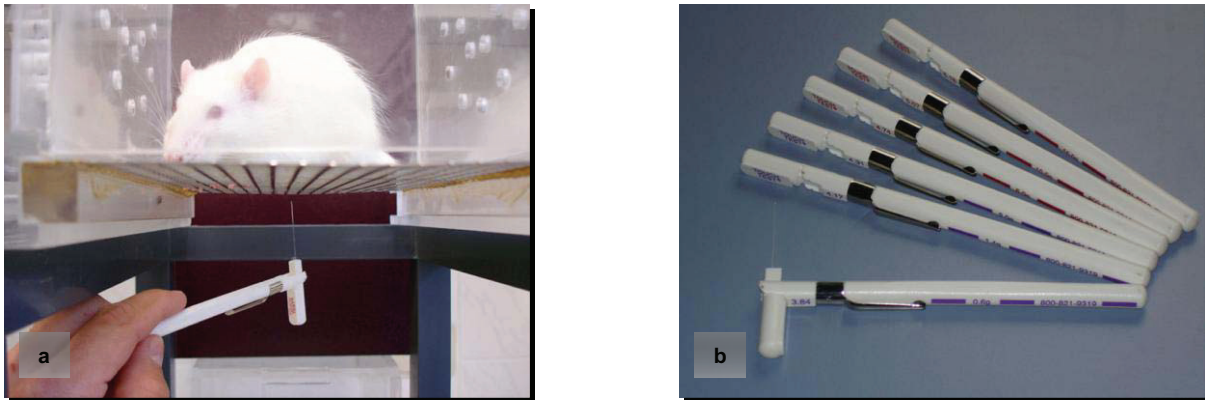


Abbildung 4: a.) Testung der mechanischen Schmerzschwelle mittels einem von Frey Filament. b.) Von Frey Filamente: 0,6g; 1,4g; 2,0g; 6,0g; 10,0g; 15,0g.

### 4.3.2 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie stellte den Endpunkt des *in vivo* Untersuchungszeitraumes dar und wurde an Tag 4 des Versuchsprotokolls durchgeführt. Bei den Gruppen mit 1 tägigem Versuchsprotokoll endete der *in vivo* Untersuchungszeitraum an Tag 1 mit der intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Alle intravitale Fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Epifluoreszenzmikroskop durchgeführt (E600-FN, Nikon, Tokyo, Japan).

Die Narkose zur Präparation und Mikroskopie der Tiere wurde mit Pentobarbital-Natrium (50mg/kg KG, Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos) intraperitoneal eingeleitet. Die Tiere wurden an Hals, Abdomen und am rechten Hinterlauf rasiert und anschließend in Rückenlage positioniert. Mittels Heizplatte wurde die Körperkerntemperatur konstant bei 36-37°C gehalten. Der chirurgische Eingriff am Hals wurde mit einem horizontalen Hautschnitt begonnen. Nach stumpfer Dissektion des Unterhautfettgewebes erfolgte die Freilegung der Trachea und zum Zweck der nachfolgenden Beatmung (Tidalvolumen: 0,1ml/ kg KG, Frequenz: 50/ min, Eigenbau, Universität Rostock) eine Tracheotomie. Anschließend wurde die Arteria carotis communis dextra dargestellt und mittels Querinzision zur Kanülierung (PE-50 Katheter, Portex, Hythe, Kent, UK) eröffnet. Mittels eines druckstabilen Katheters konnte der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) bestimmt werden (Sirecust, Siemens, Deutschland) und Blut für nachfolgende Untersuchungen entnommen werden. Letztere umfassten die Blutgasanalyse (Rapidlab 348, Bayer Vital, Fernwald, Deutschland) und die Bestimmung eines Differentialblutbildes (AcTdiff, Coulter, Hamburg, Deutschland). Die Blutdruckkurve erlaubte zusätzlich das Ablesen der Herzfrequenz. Über den liegenden

Katheter erfolgte die Applikation des Anästhetikums Pentobarbital zur Aufrechterhaltung der Narkose, sowie die Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen für die der Präparation folgenden intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Alle Eingriffe wurden unter nicht sterilen, aber aseptischen Bedingungen mit mikrochirurgischen Instrumenten durchgeführt.

Die Untersuchung der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur erfolgte am Musculus extensor digitorum longus (EDL). Die mikrochirurgische Präparation wurde erstmals von Tyml und Budreau (1991) beschrieben und durch Schaser et al. (1999) modifiziert.

Das Modell ermöglicht am lebenden Versuchstier intravitalmikroskopische Untersuchungen der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur. Durch Autofluoreszenz und durch Gabe verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe kann dabei mittels Fluoreszenzauflichtmikroskopie das gesamte mikrovaskuläre Netzwerk des freipräparierten EDL-Muskels beurteilt werden. Bei diesem Modell bleibt die mikrovaskuläre Durchblutung der Muskeloberfläche für mindestens 5 Stunden stabil (Tyml et al., 1991). Zahlreiche Publikationen umfassen Untersuchungen unter physiologischen Bedingungen (Tyml et al., 1991) und die Veränderungen der Gewebepfusion unter pathologischen Bedingungen, wie Weichteiltrauma (Schaser et al., 1999; Gierer et al., 2004; Gradl et al., 2005), Fraktur (Zhang et al., 2003) und Nervenschaden (Gradl et al., 2004).

Am Hinterlauf der auf den Bauch umgelagerten Ratte wurde die Haut lateral in der Längsachse auf einer imaginären Linie zwischen Knie- und Sprunggelenk auf einer Länge von ca. 2,5cm inzidiert. Nach Präparation und Darstellung der Faszie wurde diese auf der Länge des Zugangs eröffnet. Zur Vermeidung von Blutungen wurden zuvor die Faziengefäße durch Elektrokoagulation mit einer feinen bipolaren Pinzette (ICC 50, Erbe, Tübingen, Deutschland) verödet. In der Folge erfolgte die Präparation des EDL-Muskels zwischen Beuge- (Musculus gastrocnemius/- soleus) und Streckmuskulatur (Musculus tibialis anterior). Zur Minimierung von Mikrozirkulationsstörungen, welche durch das chirurgische Trauma verursacht werden, wurde eine Berührung des EDL-Muskels mit chirurgischem Besteck möglichst vermieden. Anschließend wurden die benachbarten Muskelgruppen zur Exposition der Oberfläche des EDL-Muskels mit Haltefäden retrahiert (Abbildung 5). Zur Vermeidung von Austrocknung wurde das gesamte exponierte Gewebe intermittierend mit 37°C warmer Kochsalzlösung superfundiert. Zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurde die Präparation schließlich mit einem feinen, für die Objektträgerendeckung üblichen Deckglas abgedeckt.

## Material und Methodik

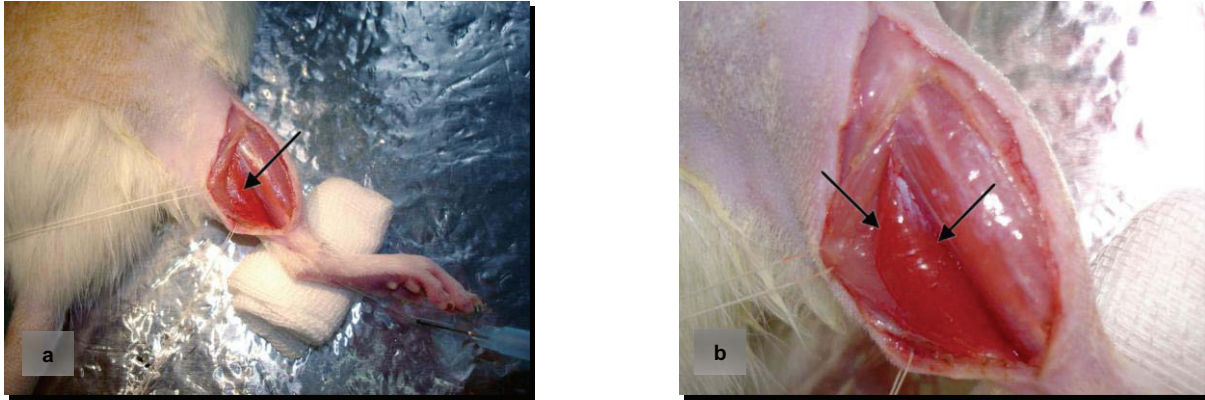


Abbildung 5: Mikrochirurgische Präparation des EDL-Muskels (Pfeile) zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie in Anlehnung an die von Tymił et al. (1991) und von Schaser et al. (1999) modifizierte Technik. a.) Übersichtsaufnahme und b.) Detailaufnahme.

Die Lichtgebung zur Intravitalfluoreszenzmikroskopie erfolgte mit einer 100W Quecksilberdampf Lampe und entsprechenden Filtersets zur blauen (Exzitation/Emission: 465-495nm/>505nm), grünen (Exzitation/Emission: 510-560/>575nm) und ultravioletten (Exzitation/Emission: 340-380nm/>400nm) Epiillumination. Die Verwendung von Wasserimmersionsobjektiven (20x/0,75W, 40x/0,80W, Nikon, Tokyo, Japan) ermöglichte eine 306- bzw. 630-fache Vergrößerung. Die quantitative Analyse der muskulären Mikrozirkulation erfolgte unter Nutzung der 306x und der 630x Vergrößerung. Die Darstellung apoptotischer Zellen erfolgte ausschließlich anhand der 630x Vergrößerung. Die jeweiligen stabilen und von Bewegungsartefakten freien Aufzeichnungen wurden entlang des gesamten EDL-Muskels von proximal nach distal randomisiert durchgeführt. Die einzelnen Gesichtsfelder wurden jeweils für 30s aufgezeichnet. Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mittels einer charge coupled device (CCD) Videokamera (FK 6990.IQ, Pieper, Berlin, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern/s aufgezeichnet und nach Umwandlung in ein digitales Bildformat und Zwischenschaltung eines Videozeitgenerators (TCI-70 RTV, Alpermann/Velte, Hamburg, Deutschland) mit einem S-VHS Videorekorder auf Videoband gespeichert (AG-7350, Panasonic, Osaka, Japan). Die Auswertung der Bilder erfolgte off-line an einem Computer-assoziierten Bildverarbeitungsprogramm (CapImage, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland).

Das mikrovaskuläre Gefäßsystem des quergestreiften Skelettmuskels umfasst terminale Arteriolen, nutritive Kapillaren, postkapillare Venolen und Sammelvenolen. Bei überwiegend geradlinigem Verlauf zeichnen sich die terminalen Arteriolen bei einem Durchmesser von ca. 20-40 $\mu$ m durch eine glatte Wandstruktur aus. Im nachfolgenden Verlauf zweigen sich diese in Winkeln von 120-150° in nachgeschaltete Arteriolen ( $\varnothing$ =10-20 $\mu$ m) auf, die ihrerseits das darauf folgende nutritive kapillare ( $\varnothing$ =5-8 $\mu$ m) Gefäßbett mit oxygeniertem Blut versorgen. In diesem Gefäßbett liegen die Kapillaren in einem Abstand von 40-70 $\mu$ m zueinander und stehen über Querverbindungen teilweise miteinander in



Kontakt. Aus dem nutritiven Kapillarbett wird das sauerstoffarme Blut über postkapillare Venolen ( $\varnothing=30-50\mu\text{m}$ ) und Sammelvenolen ( $\varnothing=40-120\mu\text{m}$ ) drainiert. Anhand der Fließrichtung, der Fließgeschwindigkeit und der bei Venolen unregelmäßigeren Wandstruktur lassen sich arterielle und venöse Gefäße voneinander unterscheiden.

*NADH-Autofluoreszenz.* Als Indikator des Redoxstatus des Skelettmuskelgewebes diente die NADH-Autofluoreszenz (Ince et al., 1993; Vollmar et al., 1997). Bestimmte Biomoleküle im Gewebe, so genannte Fluorophore, sind nach Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge in der Lage, die aufgenommene Energie wieder als Licht abzustrahlen (Autofluoreszenz). Die Wellenlänge dieses Fluoreszenzlichtes ist charakteristisch für das angeregte Molekül. Die Intensität der abgestrahlten Gewebefluoreszenz ist abhängig von der Konzentration und der Absorption durch das Blut. Bekannte Fluorophore des menschlichen Organismus sind z.B. Kollagen, NADH (reduzierte Form des Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid), Flavine, Porphyrine und Tryptophan. NADH emittiert nach Anregung mit Licht einer Wellenlänge von 360nm selbst Licht mit einer Wellenlänge von 470-475nm. Nach ultravioletter Epiillumination des Gewebes zur Erfassung der NADH-Autofluoreszenz mittels 306x Vergrößerung wurden anhand der gespeicherten Videosequenzen Grauwerte des Skelettmuskelgewebes nach 5s Belichtung computerassistent mittels Densitometrie ermittelt und mit Werten zwischen 0 und 255 angegeben (Vollmar et al., 1997). Um Interferenzen mit mikrovaskulären Strukturen zu vermeiden, wurden die Messungen streng unter Aussparung von Gefäßen durchgeführt (Gierer et al., 2005) (Abbildung 6).

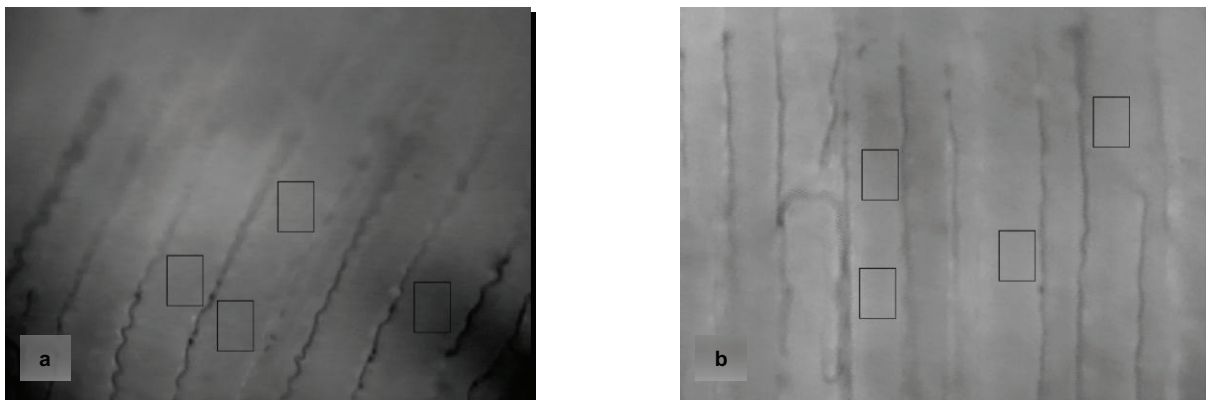


Abbildung 6: Exemplarische intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung kapillarer Netzwerke vor Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen. Die densitometrische Bestimmung der NADH-Autofluoreszenz erfolgte streng zwischen den Kapillaren (Kästchen). (630x) a.) niedrige und b.) hohe Autofluoreszenz als Zeichen der Sauerstoffschuld des Gewebes.

*Leukozyten-Endothelzellinteraktion.* Zur intravitalmikroskopischen Darstellung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion als Parameter der Inflammation erfolgte die intraarterielle Injektion von Rhodamin-6G (1%, MW 496kDa, 0,15mg/ kg KG, Sigma, Deisenhofen,

Deutschland) (Grünfilter: Exzitation/ Emission: 530-560nm/>580nm). Dieser Farbstoff ist ein positiv geladener, lipophiler Fluoreszenzfarbstoff, welcher Mitochondrien und Kernstrukturen lebender Zellen färbt und sich daher zur Visualisierung von Leukozyten in der Gefäßbahn eignet (Horobin et al., 1990, Baatz et al., 1995). Insbesondere werden hierbei Granulozyten und Monozyten angefärbt (Horobin et al., 1990).

Die Beobachtung der Interaktion von Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel erfolgte mit 630x Vergrößerung in postkapillaren Venolen mit einem Gefäßdurchmesser von 30µm bis 60µm (Abbildung 7). Zur Charakterisierung der Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel wurden sie in drei Gruppen klassifiziert: die nicht-adhärenenten („floating leukocytes“), die temporär adhärenenten („rolling leukocytes“) und die permanent adhärenenten („sticking leukocytes“) Leukozyten. Gefäßabschnitte wurden über eine Länge von 100µm 30s lang ausgewertet. Als nicht adhärenente Leukozyten wurden solche definiert, die den Gefäßabschnitt ohne Interaktion mit dem Endothel passierten. Leukozyten, die das Gefäßsegment mit 40% der Zentralstromgeschwindigkeit passierten, wurden als temporär adhärenent bezeichnet. Das Leukozyten-Rolling wurde in Prozent aller fließenden Leukozyten in diesem Gefäßsegment angegeben. Als permanent adhärenent wurden Leukozyten definiert, die über den gesamten Beobachtungszeitraum fest an der Endotheloberfläche hafteten (n/mm<sup>2</sup> Endotheloberfläche). Die Fläche errechnete sich aus Durchmesser und Länge des Gefäßsegmentes, bei Annahme einer zylindrischen Geometrie des entsprechenden Abschnitts:

$$F = l \times (\pi \times d)$$

F= Endotheloberfläche

l= Länge des Segments

d= Durchmesser des Segments

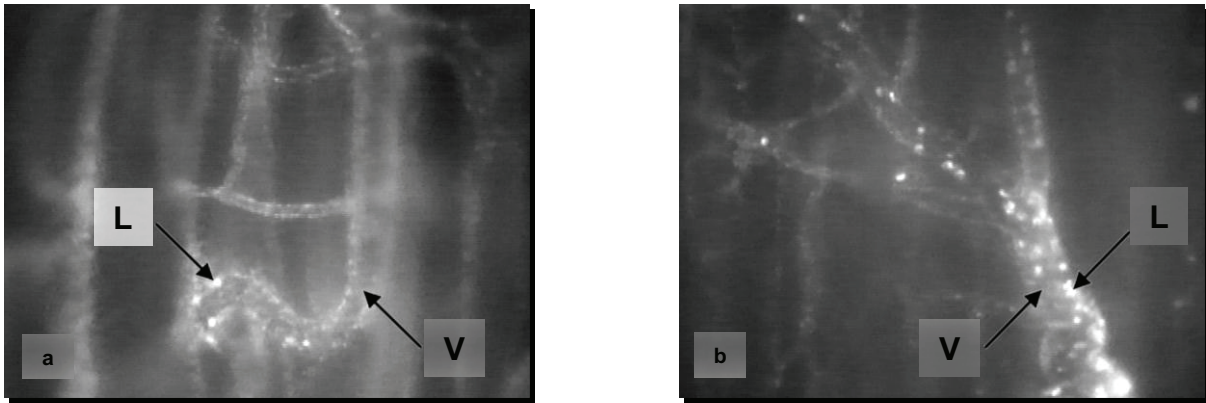


Abbildung 7: Exemplarische intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung postkapillarer Venolen (V) nach Rhodamin-6G Markierung von Leukozyten (L) zur quantitativen Auswertung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion. (306x) a.) niedrige und b.) hohe Leukozytenakkumulation.

*Funktionelle Kapillardichte.* Die quantitative Erfassung der nutritiven Perfusion des EDL-Muskels erfolgte über die Messung der funktionellen Kapillardichte (FKD). Dieser Parameter erfasst die Gesamtlänge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro mikroskopischem Gesichtsfeld ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) bei Beobachtung mit 630x Vergrößerung. Zur Kontrastierung des mikrovaskulären Gefäßbettes wurde nach Bestimmung des NADH Autofluoreszenz Fluoreszein-Isothiozyanat markiertes Dextran (FITC-Dextran, 5%, MW 150kDa, 15mg/kg KG, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) über den Katheter in der Arteria carotis communis dextra injiziert. Hierdurch war eine Visualisierung der perfundierten Gefäße unter Verwendung des Blaufilters (Exzitation/ Emission: 465-495nm/>505nm) möglich. Die Messungen der FKD erfolgten in fünf randomisierten Gesichtsfeldern. Jedes dieser Gesichtsfelder wurde für 30s aufgezeichnet und zur Erfassung der FKD komplett durchfokussiert. Off-line wurden die mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren computerassistent durch Nachzeichnen markiert, deren Gesamtlänge bestimmt und auf die Fläche bezogen ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) (Abbildung 8).

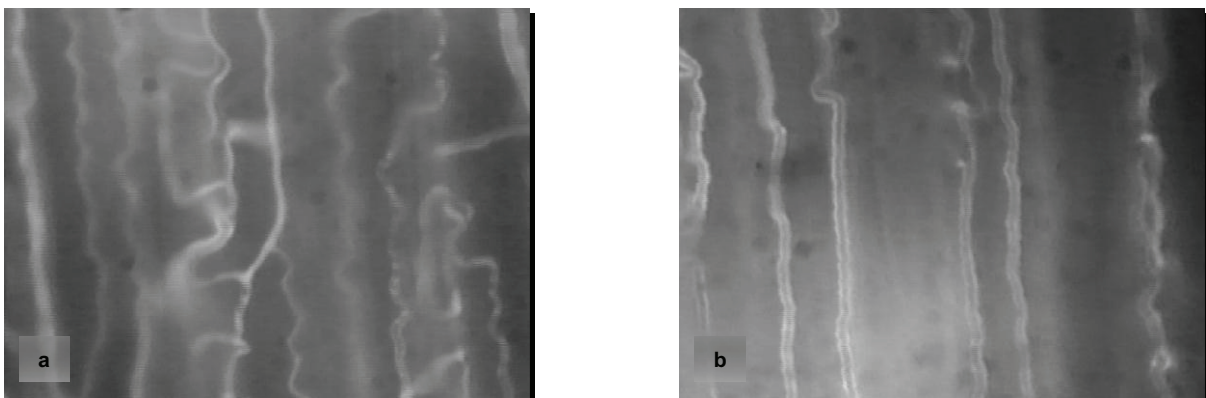


Abbildung 8: Exemplarische intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung des kapillaren Netzwerkes des EDL-Muskels nach Plasmamarkierung mit FITC-Dextran (5%). (630x) a.) hohe FKD, b.) niedrige FKD mit Ausfall individueller Kapillaren.

## Material und Methodik

*Makromolekulare Leakage.* Die Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran (5%, MW 150kDa, 15mg/kg KG, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) diene neben der Beurteilung des Gefäßbettes auch zur Bestimmung der mikrovaskulären Gefäßwandpermeabilität. Aufgrund seines hohen Molekulargewichts zeichnet sich dieser Farbstoff bei intaktem Endothel durch eine geringe Extravasation aus. Unter pathologischen Bedingungen, wie zum Beispiel nach Weichteiltrauma, kann es zu einer Erhöhung der Gefäßwandpermeabilität mit Austritt von FITC-Dextran in den perivaskulären Raum kommen (Abbildung 9). Mittels Densitometrie (Pries et al., 1988) wurden computerassistent die Grauwerte des perivaskulären Gewebes und des angefärbten intravasalen Blutplasmas bestimmt und zueinander in Relation gesetzt (paravasal/ intravasal). Unter physiologischen Bedingungen ergibt sich ein Wert von  $<0,8$ , während unter pathologischen Bedingungen Werte  $>1$  beobachtet werden, wenn die Fluoreszenz durch Plasmaaustritt paravasal höher ist als intravasal. Die Messungen erfolgten bei 203x Vergrößerung pro Versuchstier an fünf unterschiedlichen postkapillaren Venolen.

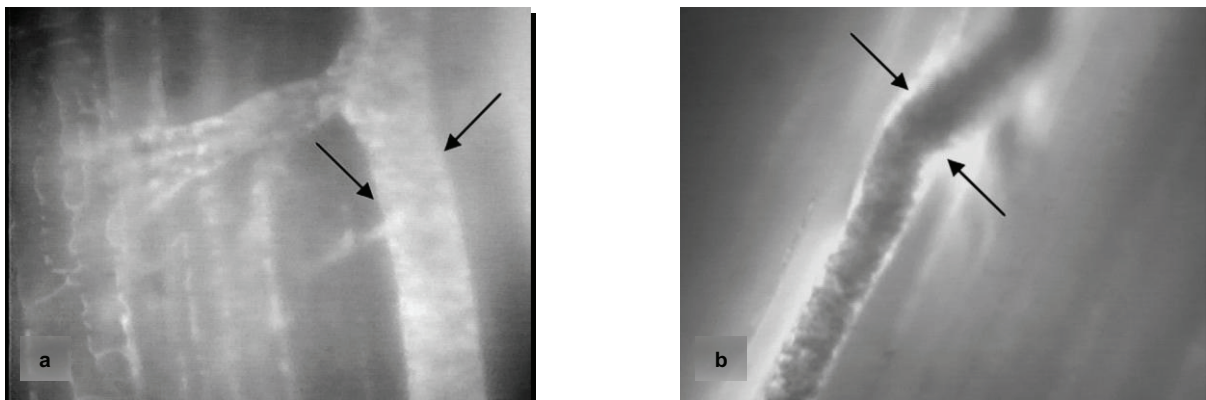


Abbildung 9: Exemplarische intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung der makromolekularen Leakage anhand der Plasmaextravasation (FITC-Dextran markiertes Plasma) in den perivaskulären Raum (Pfeile) postkapillarer Venolen. (306x) a.) niedrige und b.) hohe makromolekulare Leakage.

*Apoptose.* Um den Schädigungsgrad des EDL-Muskels beurteilen zu können, erfolgte eine quantitative Analyse der Muskelzellapoptose. Intravitalmikroskopisch erfolgte die Visualisierung nach Injektion von Bisbenzimid (1%, 15mg/kg KG, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) (Ultraviolettfilter: Exzitation/Emission: 330-380nm/ $>415$ nm). Bisbenzimid lagert sich in Zellkernen an adenin- und thyminreiche Regionen der DNA an und färbt somit alle Zellkerne. Apoptotische Kerne zeigen in charakteristischer Weise eine Kondensation, Fragmentation und Margination des nukleären Chromatins (Menger und Vollmar, 2000; Eipel et al., 2004). Nach Injektion von Bisbenzimid kann anhand dieser kernmorphologischen Differenzen zwischen apoptotischen und gesunden Zellen differenziert werden (Abbildung 10). Um die Anzahl der apoptotischen Muskelzellen zu erfassen, wurden bei 630x

Vergrößerung zehn randomisierte Gesichtsfelder untersucht. Angegeben wird die Anzahl apoptotischer Muskelzellen pro Gesichtsfeld.

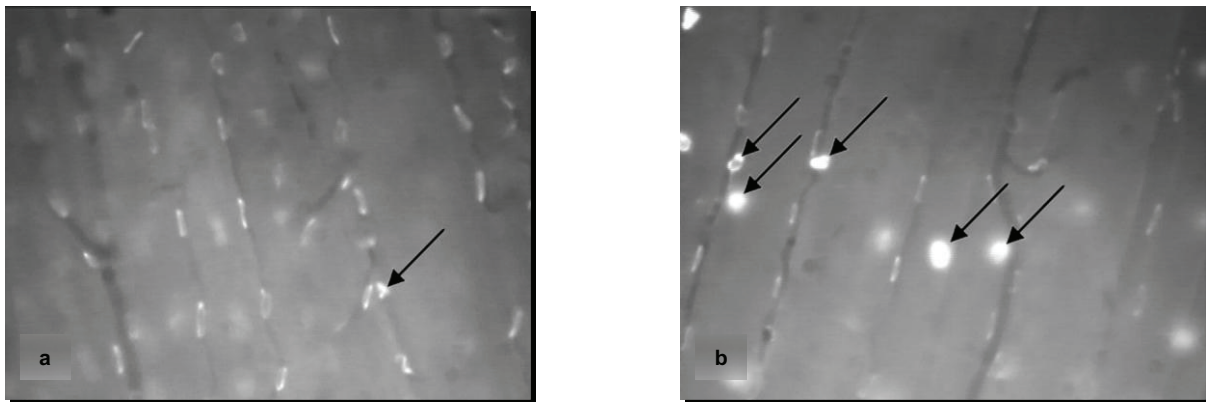


Abbildung 10: Exemplarische intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung Bisbenzimid gefärbter Muskelzellen, welche zum Teil eine für Apoptose charakteristische Kernmorphologie zeigen (Pfeile). (630x) a.) niedrige und b.) hohe Zahl apoptotischer Zellen.

*Euthanasie und Gewebeasservation.* Nach Abschluss der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden die Tiere durch Vertiefung der Narkose und Ausbluten getötet. Zur weiteren molekularbiologischen und histologischen Untersuchung wurden der EDL-Muskel und der Musculus tibialis anterior entnommen. Außerdem wurden bei den Tieren mit chronischer Substanz P Applikation und den entsprechenden Kontrolltieren sowohl die Konnektionstellen und die intraarterielle Lage der Katheter als auch der Füllungsgrad der osmotischen Pumpen überprüft, um die vollständige Applikation von Substanz P sicherzustellen.

### 4.3.3 Vollblutanalyse

Vor Durchführung der Intravitalmikroskopie zur Analyse der Mikrozirkulation des Skelettmuskels wurde Blut aus dem intraarteriellen Katheter entnommen. Hierbei wurde für die Blutgasanalyse eine heparinisierte Glaskapillare mit ca. 90µl Blut verwendet. Anschließend konnten die arteriellen Partialdrücke von Sauerstoff ( $\text{PaO}_2$ ) und Kohlendioxid ( $\text{PaCO}_2$ ), sowie pH-Wert, Hämatokrit (Hkt) und Basenüberschuss (BE) bestimmt werden (Rapidlab 348, Bayer Vital, Fernwald, Deutschland). Zur Erstellung des Differentialblutbildes wurde arterielles Blut in 200µl EDTA-Röhrchen abgenommen und anschließend mittels eines Blutanalysegerätes (AcTdiff, Coulter, Hamburg, Deutschland) die systemische Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenkonzentration bestimmt.

### 4.3.4 Postmortale Bestimmung des Muskelödems

Zur Analyse des Grades des intramuskulären Ödems wurde nach Abschluss der intravitalen Mikroskopie und Tötung des Tieres der Musculus tibialis anterior der betroffenen Extremität entnommen. Nach Wiegen des Muskels zur Bestimmung des Feuchtgewichts erfolgte die Trocknung des Gewebes bei 65°C über 72h und nachfolgend eine erneute Gewichtsbestimmung. Aus beiden Gewichtsangaben wurde der Feucht-/Trockengewichtsquotient errechnet, welcher als Maß für den Grad des Gewebeödems dient.

### 4.3.5 Immunhistochemie des EDL-Muskels

Für die lichtmikroskopischen Untersuchungen des EDL-Muskels wurden im Anschluss an die Intravitalmikroskopie und Tötung des Tieres Muskelgewebe entnommen und in 4%iger Formalinlösung 3-4 Tage fixiert. Nach Einbettung in Parafin wurden von den Gewebeblöcken Serien an Dünnschnitten angefertigt.

*TUNEL-Analyse.* Die Dünnschnittpräparate dienten zum histomorphologischen Nachweis apoptotischer Skelettmuskelzellen unter Verwendung der TUNEL-Methode (ApopTag, Shemicon International Inc., Temecula, CA, USA). Bei der TUNEL-Färbung (transferase-mediated dUTP biotin nick end-labeling) wird durch das Enzym terminale desoxynucleotidyl Transferase (TdT) an DNA-Bruchstücke apoptotischer Zellen ein biomarkiertes dUTP angehängt, dessen Biotin im Anschluss durch einen farblich markierten Antikörper sichtbar gemacht werden kann.

*Histologische Auswertung.* Im Auflichtmikroskop (Axioskop 40, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) erfolgte die quantitative Auswertung bei 400x Vergrößerung (40x Objektiv, Achroplan, Zeiss, 0,65 NA). Die quantitative Auswertung der Dünnschnittpräparate erfolgte durch Auszählen der TUNEL positiven Zellen in 25 Gesichtsfeldern (High power field, HPF) (Abbildung 11).

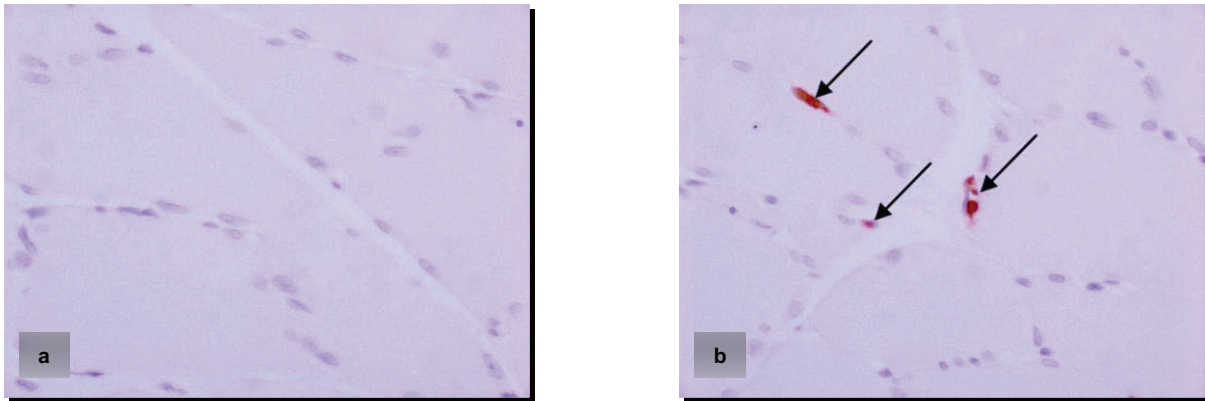


Abbildung 11: Exemplarische lichtmikroskopische Aufnahme mittels TUNEL-Methode histochemisch markierter DNA-Bruchstücke in Zellkernen apoptotischer Myozyten (Pfeile) in EDL-Muskeldünnschnittpräparaten (400x) mit a.) niedriger und b.) hoher Zahl apoptotischer Zellen.

### 4.3.6 Proteinanalyse

Die Zusammensetzung aller im nachfolgenden aufgeführten Puffer und Lösungen sind dem Anhang zu entnehmen.

*Gewebeasservation und Western-Blot Proteinanalyse aus EDL Muskelgewebe.* Zum Nachweis von Caspase-3, einer Effektorprotease der Zellapoptose wurde an EDL-Muskelgewebe eine Proteinanalyse mittels Western-Blot durchgeführt. Hierzu wurde nach Beendigung der Intravitalmikroskopie Muskelgewebe entnommen, in einem 200µl Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff (N<sub>2</sub>) kryokonserviert und bei -80°C eingelagert. Von den bei -80°C gelagerten Gewebeproben wurden Aliquots mit einem Gewicht von 30mg ausgewogen und mit Hilfe eines Dismembrators pulverisiert. Anschließend wurden die pulverisierten Gewebe in Lysispuffer aufgenommen (100µl/10mg Gewebe) und für 30min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben für 10min bei 4°C und 10000xg in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Der klare proteinhaltige Überstand wurde gewonnen und ein weiteres Mal für 10min bei 10000xg und 4°C zentrifugiert. Nachfolgend wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

*Proteinbestimmung.* Die Proteinbestimmung diente der quantitativen Analyse der aus dem EDL-Muskel gewonnenen Proteine und wurde mit BCA (Bicinchinoic acid, Fertiglösung, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) vorgenommen. Bei dieser Methode bildet das in der Lösung enthaltene Kupfer Komplexe mit den Proteinen und führt in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration zu einem charakteristischen Farbumschlag. Die Messung erfolgte im Dreifachansatz in einer Mikrotiterplatte unter Verwendung aufsteigender Konzentrationen von 0,1mg/ml bis 1,0mg/ml gegen einen Proteinstandard. Die Proben wurden in einer 1:20 Verdünnung angesetzt, das Gesamtvolumen betrug 120µl. Die Extinktion wurde bei 562nm gemessen.

*Western-Blot Analyse.* Die Western Blot Analyse ist eine proteinchemische Methode zum Zweck der Detektion bestimmter Proteine aus einem Proteingemisch.

Dabei werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung in einer denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt, anschließend auf eine Membran transferiert und dort fixiert. Nach Blockierung der freien unspezifischen Bindungsstellen mit einer Blockierlösung (z.B. bovine serum albumin (BSA), Milchpulver) erfolgt die Inkubation mit dem primären Antikörper, der spezifisch gegen spezielle Epitope des gesuchten Proteins gerichtet ist. Dieser Antikörper kann mono- oder polyklonaler Natur sein.

Der gebundene primäre Antikörper kann mit Hilfe eines sekundären Antikörpers nachgewiesen werden, der entweder radioaktiv markiert oder an ein Enzym gekoppelt ist. Zur Visualisierung der gebundenen Reaktion werden verschiedene Detektionsverfahren eingesetzt.

*SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.* In der SDS-PAGE lassen sich spezifische Proteine der Größe nach fraktionieren. Zur Vorbereitung werden 60µg Protein mit Probenpuffer versetzt. Dazu wurde 2x Probenpuffer im Verhältnis 1:1 mit der entsprechenden Proteinprobe angesetzt, mit 1x Probenpuffer auf 25µl Endvolumen aufgefüllt und nachfolgend für 5min bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE, entsprechend der Größe des zu bestimmenden Proteins in 14%igem Polyacrylamidgel. Bis zum Austritt der Proben aus dem Sammelgel wurde die SDS-PAGE für ca. 1h konstant bei 20mA durchgeführt. Anschließend wurde die Stromstärke bis auf 40mA erhöht. Die Proteine passierten entsprechend ihres Molekulargewichts die Gelmatrix von der Kathode bis zur Anode. Für die Molekulargewichtsbestimmung wurde ein Proteinstandard mitgeführt.

*Semi-Dry-Blot.* Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden unter Verwendung eines Semi-Dry-Blotters aus der Polyacrylamidmatrix auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurden zunächst die Filterpapiere für mindestens 5min in Anoden- bzw. Kathodenpuffer getränkt. Die Membran wurde für 15s in Methanol äquilibriert, anschließend in Aqua bidestillata überführt und bis zum Aufbau des Semi-Dry-Blots in Anodenpuffer II getränkt. Eine Transfereinheit setzt sich wie folgt zusammen (Abbildung 12).

Die Transferzeit betrug bei konstanter Stromstärke von 275mA 1h 45min. Nach dem Transfer wurde die Membran für 10min in TBS gewaschen und anschließend zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen über Nacht bei 4°C in Blockierlösung (BSA, Santa Cruz, CA, USA) inkubiert. Die Gele wurden für den Nachweis gleichmäßigen Proteinauftrags 1min in Coomassie Blue G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) gefärbt. Durch Entfärbung in 7%igem Eisessig erfolgte die Visualisierung der Proteinbanden.



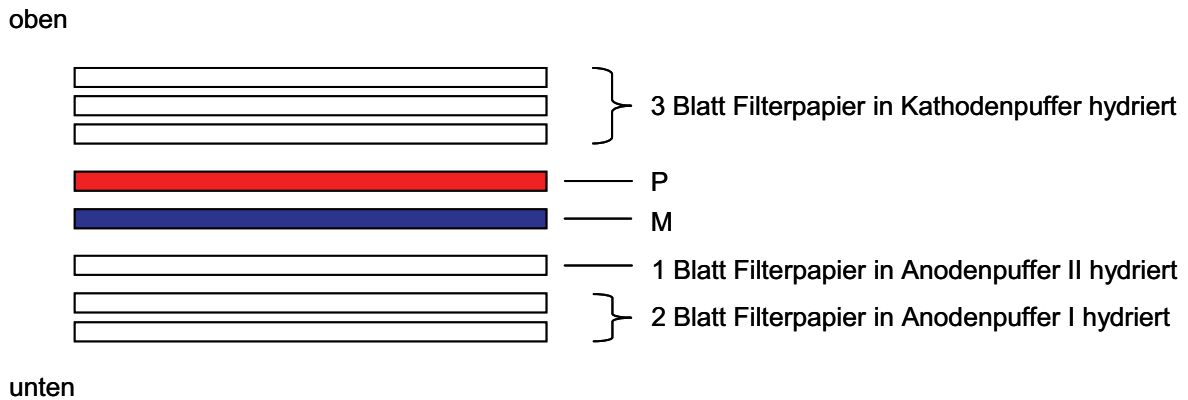


Abbildung 12: Schematische Darstellung zum Aufbau des Semi-Dry-Blots, bei dem die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus der Polyacrylamidmatrix (P) über ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine PVDF-Membran (M) transferiert werden. Die Proteine können renaturieren und dabei teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder annehmen. Weitere Komponenten der Transfereinheit sind die spezifisch hydrierten Filterpapiere.

*Antikörperbindung.* Zum Nachweis spezifischer Proteine aus dem Proteingemisch wurde die Membran für 2h mit der entsprechenden Antikörperlösung (Antikörper in Blockierungslösung) auf dem Schüttler (Duomax 2030, Heidolph, Schwabach, Deutschland) bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper (Cleaved Caspase-3 (ASP 175) Antibody, 1:1000, Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) wurde die Membran 3x10min in TBST und 2x15min in TBS gewaschen, um nichtgebundene überflüssige Antikörper zu entfernen.

Die Inkubation mit dem sekundären HRP („horseradish Peroxidase“ (eng.: Meerrettich Peroxidase)-konjugierten Antikörper (Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody, 1:1000, Cell Signaling, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) erfolgte über 1h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran erneut wie oben beschrieben in TBST und TBS gewaschen.

*Detektion.* Die Detektion der Immunreaktion erfolgte mit dem ECL<sup>+</sup>-Verfahren (enhanced-chemiluminescence). Das ECL<sup>+</sup>-Verfahren basiert auf dem Prinzip der Chemilumineszenz. Dabei wird die Reaktion von Peroxidasen (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) mit dem Luminogen PS-3 (Phosphatidylserin) acridan durch die Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert. Unter leicht alkalischen Bedingungen erzeugen die als Zwischenprodukte entstehenden Acridium-Ester-Verbindungen zusammen mit dem Luminogen PS-3 eine Chemolumineszenz bei 430nm, welche schliesslich für die Detektion genutzt wird.

Für die Detektion wurde die Membran bei Raumtemperatur für 5min mit dem ECL<sup>+</sup>-Gemisch (1:50) inkubiert. Durch Röntgenfilmanalyse konnte anschließend eine Visualisierung des gesuchten Proteins erfolgen.

*Densitometrie.* Nach Detektion der gesuchten Proteinbanden erfolgte die densitometrische Analyse, um neben qualitativen auch quantitative Aussagen über den

Proteingehalt des Gewebes treffen zu können. Die densitometrische Analyse erfolgte computerassistent (Nonlinear Dynamics, New Castle upon Tyne, UK).

### 4.4 Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll

#### 4.4.1 Experimentelle Gruppen

Die Ligatur des Nervus ischiadicus erfolgte in Pentobarbitalnarkose und Bauchlagerung des Tieres. Der chirurgische Zugang erfolgte nach Rasur und Desinfektion des Operationsgebietes mittels Jodlösung (Betaisadonalösung, Mundipharma GmbH, Limburg (Lahn), Deutschland) über einen ca. 1,5cm langen Hautschnitt parallel zur Wirbelsäule auf Höhe der Glutealmuskulatur. Nach Darstellung und Präparation des Musculus gluteus maximus wurde dieser zur Freilegung des Nervens parallel zum Hautschnitt durchtrennt. Kaudal des Musculus gluteus medius war das Nervenbett des Nervus ischiadicus nach stumpfer Dissektion bindegewebiger Strukturen einsehbar. Unter Verwendung feuchter Wattestäbchen (Paul Hartmann Ag, Heidenheim, Deutschland) und einer vorne abgerundeten mikrochirurgischen Präparationsschere wurde der Nerv über den Verlauf von ca. 1cm aus dem umliegenden Bindegewebe freigelegt. Vier locker geknüpft Ligaturen (Dermafil Green Polyester, 3/0, SMI Ag, Hünningen, Belgien) des Nervens erfolgten mit einem Abstand von jeweils 1mm zueinander (Abbildung 13). Danach wurde der Nerv in seinen physiologischen Verlauf gebettet und die Glutealmuskulatur reponiert. Die Inzision des Musculus gluteus maximus wurde mit Einzelknopfnähten (Vicryl, Polyglactin, resorbierbar, 5/0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Haut wurde fortlaufend genäht und im Anschluss erneut mit Jodlösung desinfiziert.

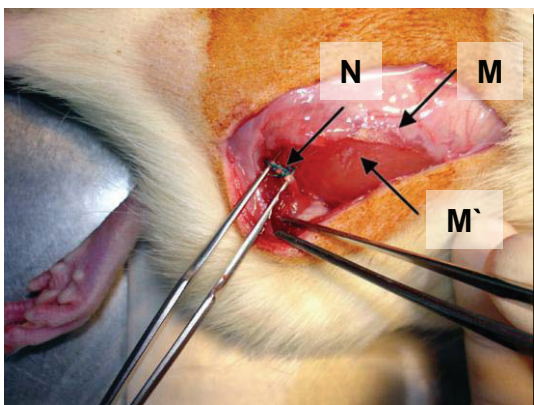


Abbildung 13: Freipräparierter Nervus ischiadicus (N) mit vierfacher loser Ligatur. (M= Musculus gluteus maximus, M' = Musculus gluteus medius).

Bei den Tieren einer weiteren Gruppe wurde zusätzlich zu der oben beschriebenen chronischen Nervenligatur eine Inhibition von Zellapoptose durchgeführt. Die Hemmung von

Zellapoptose erfolgte unter Verwendung des Apoptoseinhibitors z-VAD (z-VAD (OMe)-fmk, Alexis biochemicals, San Diego, CA, USA). z-VAD gehört zu der Familie der Pan-Caspaseinhibitoren und wurde in zahlreichen Tiermodellen zur Apoptosehemmung eingesetzt. Systemisch appliziert ist die Substanz nicht ZNS-gängig (Wiessner et al., 2000; Yang et al., 2004). Daher wird sie bei erwünschter zentralnervöser Wirkung intradural appliziert (Okuda et al., 2000; Bizat et al., 2005; Scholz et al., 2005). Da im vorliegenden Versuchsaufbau eine periphere Apoptoseinhibition im Muskelgewebe erwünscht war, wurde z-VAD den Tieren 30min vor Nervenligatur und anschließend alle 24h unter Ätherkurznarkose in die Schwanzvene injiziert. Die Injektionslösung setzte sich aus 50µl Stammlösung und 250µl PBS-Puffer (Dulbecco's PBS, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) zusammen. Von der Injektionslösung erhielten die Tiere pro Applikation 1ml/kg KG, d.h. 3,3mg z-VAD/kg KG (Yaoita et al., 1998). Über den Versuchsverlauf von 4 Tagen wurden pro Tier insgesamt 13,2 mg z-VAD/kg KG appliziert.

Bei n=10 Tieren (Nervenligatur, NL n=5; Nervenligatur und z-VAD, NLZ n=5) wurde die oben beschriebene Operation zur Induktion der chronischen Nervenligatur durchgeführt. Von diesen 10 Tieren wurden 5 Tiere zur Apoptoseinhibition systemisch mit dem Pan-Caspasehemmer z-VAD behandelt (NLZ). Bei den Tieren der Kontrollgruppe (n=7) (Sham-Ligatur, SL) erfolgte die gleiche Operation mit Freilegung, jedoch ohne Ligatur des Nervens. Nach der Operation erwachten die Tiere in ihrem Käfig aus der Narkose und hatten dort freien Zugang zu Wasser und Standardlaborfutter.

Zur kontinuierlichen lokalen Applikation von Substanz P wurden osmotische Alzet<sup>®</sup>-Minipumpen (mittleres Pumpvolumen: 8µl/h über 24h; mittleres Füllvolumen 200µl; mittleres Restvolumen 8µl; DURECT Corporation, Cupertino, USA) verwendet. Diese Alzet<sup>®</sup>-Minipumpen wurden subkutan unter die Bauchhaut der Tiere implantiert und mittels eines Katheters (Polyethylen, Innendurchmesser: 0.28mm; ReCathCo, ILL, Pittsburgh, USA) mit der Arteria femoralis dextra konnektiert. Unmittelbar vor Gebrauch wurden Aliquots mit 100µl Substanz P-Stammlösung einzeln aufgetaut und mit 50µl Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen, Deutschland) verdünnt. Um eine Okklusion von Katheter und Femoralarterie zu verhindern, wurden der Lösung 50µl Heparin (Liquemin 5000IE/ ml, Roche Applied Science, Mannheim Germany) beigefügt. Das Gesamtvolumen der Injektionslösung entsprach mit 200µl dem Füllungsvolumen der osmotischen Pumpe. Abzüglich des Restvolumens der Pumpen erhielten die Tiere über 24h 260µg Substanz P/kg KG. Die osmotischen Pumpe wurden den Herstellerangaben folgend vor Implantation ca. 1h in physiologischer Kochsalzlösung gewässert und kurz vor der chirurgischen Präparation der Femoralarterie mit der Injektionslösung gefüllt.

Die chirurgische Präparation erfolgte unter Pentobarbitalnarkose in Rückenlagerung. Nach Rasur und Jod Desinfektion der Inguinalregion wurde die Haut über

## Material und Methodik

eine Länge von ca. 2cm am medialen Oberschenkel parallel zum Os femur inzidiert. Von diesem Zugang aus erfolgten zunächst die stumpfe Präparation einer subkutanen Tasche am Bauch des Tieres und die Implantation der mit dem Katheter verbundenen osmotischen Pumpe. Anschließend wurde unter maximaler Schonung des Nervus femoralis die Faszien der Gefäßnervenstrasse stumpf dissektiert und die Arteria femoralis auf einer Länge von ca. 1cm freigelegt. Nach proximaler Ligatur des Gefäßes wurde durch einen queren Schnitt das Lumen eröffnet und die Arterie mit dem Katheter kanüliert. Um die intraarterielle Lage zu fixieren, wurde der Katheter an der Arterie und am umliegenden Gewebe fixiert (Abbildung 14). Die Haut wurde durch eine fortlaufende Naht verschlossen und erneut mit Jodlösung desinfiziert. Nach der Operation erwachten die Tiere in ihrem Käfig aus der Narkose und hatten dort freien Zugang zu Wasser und Standardlaborfutter.

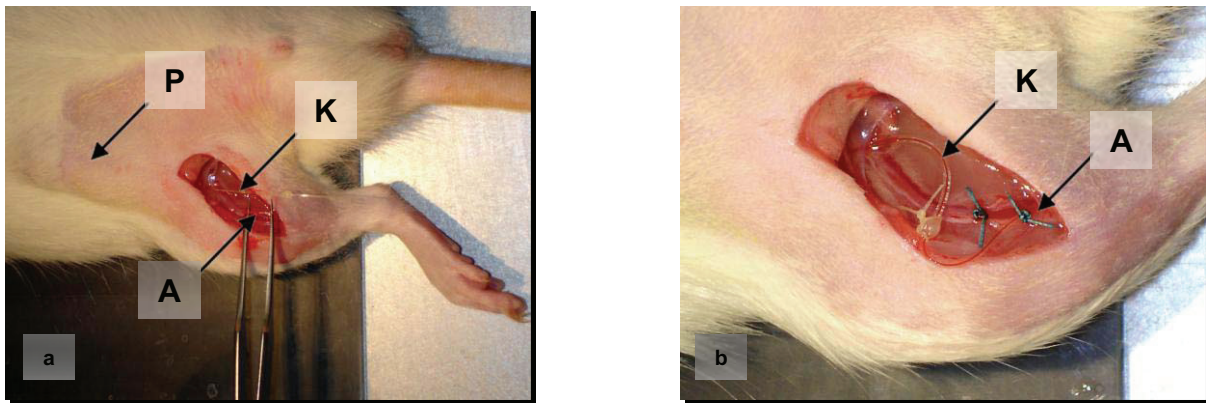


Abbildung 14: Inguinale Inzision, mit subkutan implantierter Alzet®-Minipumpe (P), Katheter (K) und freigelegter Arteria femoralis (A). a.) Übersicht, b.) Detail.

Tiere der Substanz P-Gruppen (SP 1, SP 4) erhielten die Pumpen mit der Substanz P-haltigen Injektionslösung. Eine Gruppe wurde an Tag 1 des Versuchsprotokolls intravitalmikroskopisch untersucht (SP 1, n=6), eine zweite Gruppe an Tag 4 (SP 4, n=5). Bei Tieren der Kontrollgruppen wurden die Pumpen mit 50µl Heparin und 150µl physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. Tiere der Kontrollgruppe wurden entweder an Tag 1 (NaCl 1, n=6) oder an Tag 4 (NaCl 4, n=5) mittels *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie untersucht.

### Modell der chronischen Nervenligatur

- SL:** Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage, n=7
- NL:** Tiere mit chronischer Nervenligatur, Versuchsdauer 4 Tage, n=5
- NLZ:** Tiere mit chronischer Nervenligatur und Caspaseinhibition mittels z-VAD-fmk, Versuchsdauer 4 Tage, n=5

### Modell der chronischen Substanz P Applikation

- NaCl 1:** Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 1 Tag, n=6
- NaCl 4:** Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage, n=5
- SP 1:** Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 1 Tag n=6
- SP 4:** Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 4 Tage, n=5

#### 4.4.2 Experimentelles Protokoll, zeitlicher Ablauf der Versuche

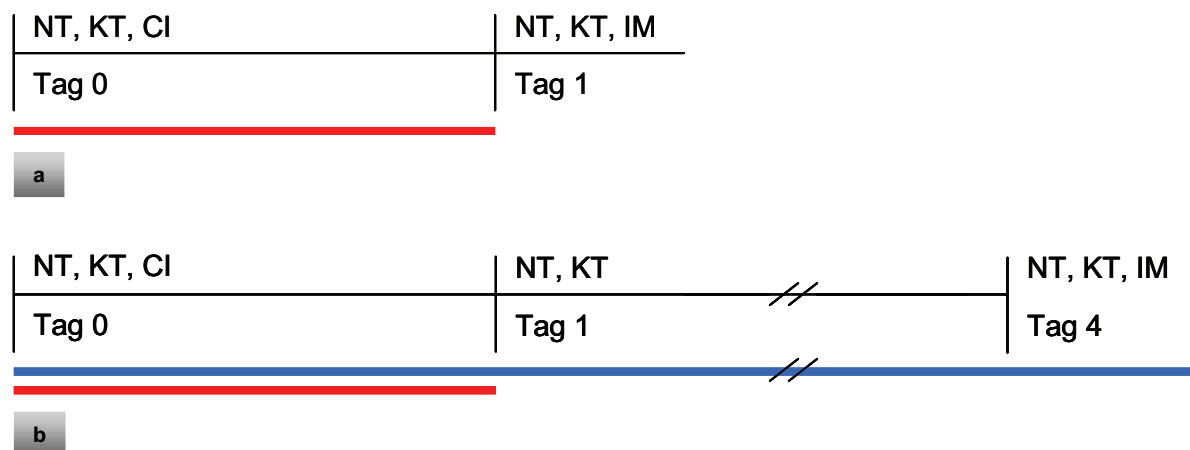


Abbildung 15: Zeitliches Protokoll der Versuche a.) über 1 Tag und b.) über 4 Tage. NT= neurophysiologische Testung, KT= klinische Testung, CI= chirurgische Intervention, IM= intravitale Fluoreszenzmikroskopie. Blaue Linie= Dauer der Nervenligatur (NL, NLZ), rote Linien= Dauer der NaCl-Infusion (NaCl 1, NaCl 4), bzw. der Substanz P Infusion (SP 1, SP 4).

## 4.5 Statistik

Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Nach Bestätigung der Normalverteilung der Werte erfolgte der Vergleich zwischen den Gruppen mittels „one way analysis of variance“ (ANOVA) bzw. Student's t-Test für den unverbundenen Paarvergleich. Bei fehlender Normalverteilung erfolgte für den Gruppenvergleich die Kruskal-Wallis Varianzanalyse bzw. für den paarweisen Vergleich die

## Material und Methodik

Anwendung des Mann Whitney U-Tests. Unterschiede wurden bei  $p < 0,05$  als signifikant angesehen.

Sämtliche statistischen Tests wurden unter Verwendung des Software Pakets SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Ergebnisse nach chronischer Nervenligatur

#### 5.1.1 Makrohämodynamik

Während des chirurgischen Eingriffs zur Intravitalfluoreszenzmikroskopie wurden kontinuierlich die Vitalparameter Herzfrequenz (HF) und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) erfasst. In beiden Versuchsgruppen, d.h. den Tieren mit chronischer Nervenligatur als auch den sham-operierten Tieren, zeigten sich physiologische Normalwerte. Die in Tabelle 1 dargestellten Werte wurden unmittelbar vor der Intravitalmikroskopie erhoben.

Tabelle 1: Herzfrequenz (HF) und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) unmittelbar vor Beginn der Intravitalmikroskopie. (SL= shamoperierte Kontrolltiere, NL Tiere mit chronischer Nervenligatur) Mittelwerte  $\pm$  SEM.

	SL	NL
HF (n/min)	312 $\pm$ 12	317 $\pm$ 9
MAP (mmHg)	103 $\pm$ 5	106 $\pm$ 4

#### 5.1.2 Klinische Beurteilung von Temperatur und Schwellung der Hinterläufe und postmortale Muskelödembestimmung

An Tag 0 vor, sowie an den Tagen 1 und 4 nach chirurgischer Intervention wurden klinische Parameter der Pfote erhoben. Es wurden das Volumen und die Hauttemperatur der betroffenen Pfote erfasst und die Werte mit den korrespondierenden der Gegenseite verglichen.

Bei Tieren mit chronischer Nervenligatur (NL) ergaben sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von Tag 0 bis Tag 4 im Vergleich zu sham-operierten Tieren (SL) keine Differenzen bezüglich des Temperaturunterschiedes zwischen den Pfoten der einzelnen Tiere (Tabelle 2). Die Messung der Volumendifferenz ergab an Tag 0 keinen Unterschied zwischen den Gruppen. An Tag 1 und an Tag 4 zeigte sich allerdings eine Schwellung der betroffenen Pfote nach Nervenligatur (NL) mit einer Volumendifferenz zwischen der betroffenen und der kontralateralen, gesunden Pfote, welche an Tag 4 signifikant gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe (SL) erhöht war (Tabelle 2).

## Ergebnisse

Als weiteres Maß für eine ödematöse Veränderung wurde der Feucht-/Trockengewichtsquotient des Musculus tibialis anterior des betroffenen Hinterlaufs bestimmt. Es konnte bei den Tieren mit Ligatur des Nervus ischiadicus (NL) im Vergleich zu den Kontrolltieren (SL) ein leicht aber nicht signifikant erhöhter Flüssigkeitsgehalt im Sinne eines Muskelödems festgestellt werden.

Tabelle 2: Temperaturdifferenz (°C) und Volumendifferenz (ml) zwischen der betroffenen Pfote und der gesunden Gegenseite an den Tagen 0, 1 und 4 sowie der Quotient aus Feucht- und Trockengewicht des M. tibialis anterior an Tag 4. (SL= Shamoperierte Kontrolltiere, NL= Tiere mit chronischer Nervenligatur) Mittelwerte  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. SL.

	Tag	SL	NL
Temperaturdifferenz	0	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,1
	1	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1
	4	0,4 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,2
Volumendifferenz	0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	1	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0
	4	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0*
Feucht-/Trockengewicht	4	4,4 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 0,2

### 5.1.3 Schmerz

Spontanes Schmerzverhalten und thermische Allodynie wurden nach der Methode von Attal et al. (1990) getestet. Die Testung der mechanischen Schmerzschwelle wurde mittels repetitiver Stimulation mit von Frey-Filamenten aufsteigender Stärke an der betroffenen Pfote durchgeführt.

An Tag 0 vor Ligatur des Nervus ischiadicus bzw. der Sham-Operation wurden bei den Tieren Werte im Sinne eines physiologischen Schmerzverhaltens beobachtet. Es ergaben sich bei keinem der getesteten Parameter Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 16).



## Ergebnisse

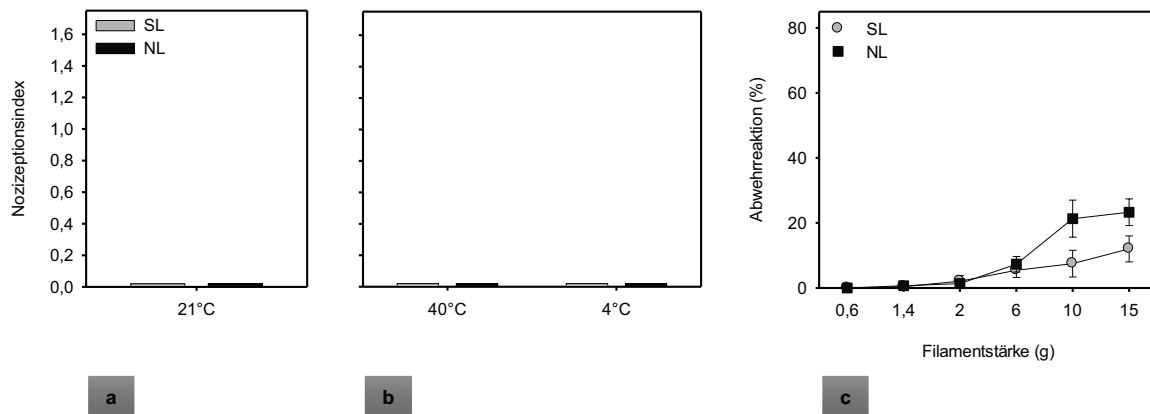


Abbildung 16: Tag 0: Testung a.) des spontanen Schmerzverhaltens (21°C) sowie der Schmerzreaktion b.) auf thermische Reizung (40°C; 4°C) und c.) auf mechanische Reizung. (SL= shamoperierte Kontrolltiere, NL Tiere mit chronischer Nervenligatur) Mittelwert  $\pm$  SEM.

Ligatur des Nervus Ischiadicus führte an Tag 1 zu einem typischen Schmerzverhalten mit Handlungsabnormalitäten der betroffenen Pfote. Sowohl bei Zimmertemperatur als auch bei thermischer Reizung (40°C; 4°C) zeigten sich signifikant höhere Werte bei Tieren mit Nervenligatur (NL) im Vergleich zu shamoperierten Tieren (Abbildung 17). Mechanische Reizung führte nach 1 Tag bei Tieren mit ligiertem Nervus ischiadicus (NL) zu keinem abnormalen Schmerverhalten. Die Abwehrreaktion zeigte sich leicht erhöht, ohne sich jedoch signifikant von der Kontrollgruppe zu unterscheiden (Abbildung 17).

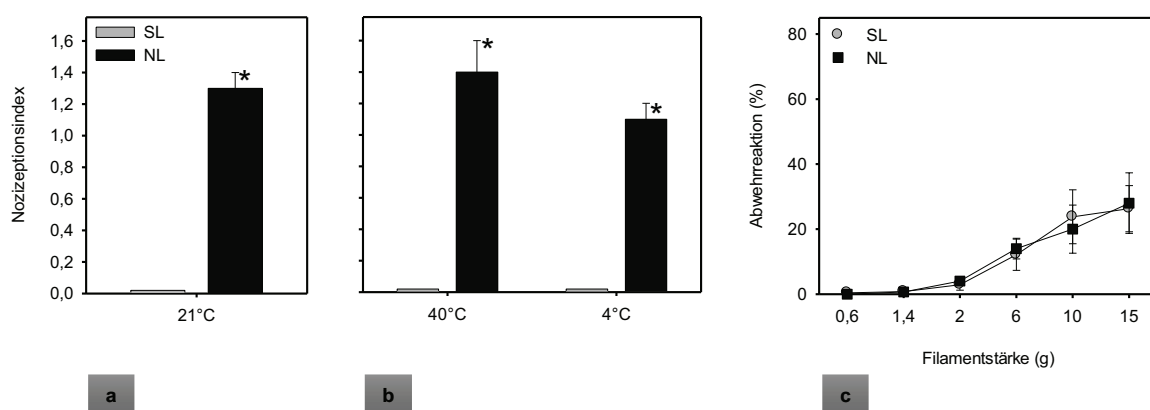


Abbildung 17: Tag 1: Testung a.) des spontanen Schmerzverhaltens (21°C) sowie der Schmerzreaktion b.) auf thermische Reizung (40°C; 4°C) und c.) auf mechanische Reizung. (SL= shamoperierte Kontrolltiere, NL Tiere mit chronischer Nervenligatur) Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. SL.

Nach 4 Tagen Nervenligatur (NL) wurde ein ähnliches Bild bei spontanem Schmerzverhalten und nach thermischer Reizung beobachtet. Auch zu diesem Zeitpunkt war

der Index für die Nozizeption gegenüber den Kontrolltieren (SL) signifikant erhöht (Abbildung 18). An Tag 4 zeigten sich auch nach mechanischer Reizung verstärkte Abwehrreaktionen. So war die Abwehrreaktion bei Reizung mit von Frey-Filamenten von 15g Stärke gegenüber den shamoperierten Kontrolltieren (SL) signifikant erhöht (Abbildung 18).

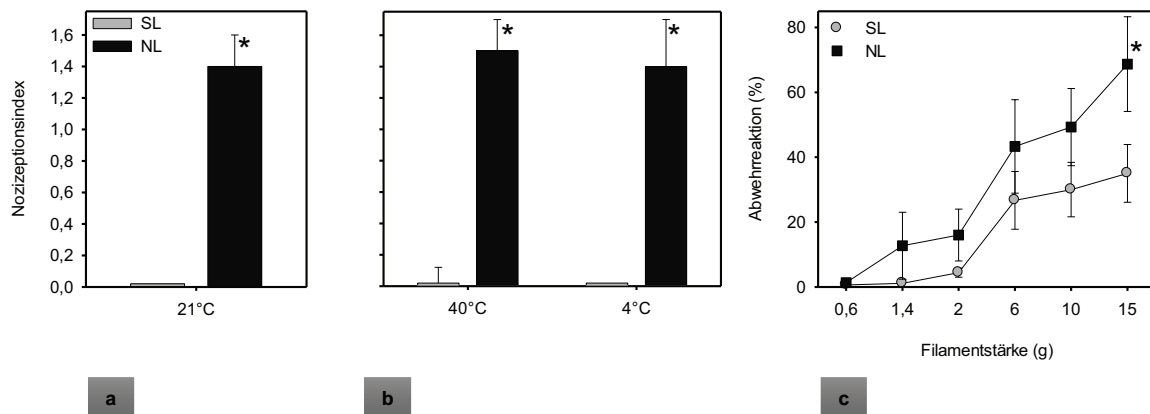


Abbildung 18: Tag 4: Testung a.) des spontanen Schmerzverhaltens (21°C) sowie der Schmerzreaktion auf b.) thermische Reizung (40°C; 4°C) und c.) auf mechanische Reizung. (SL= shamoperierte Kontrolltiere, NL Tiere mit chronischer Nervenligatur) Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. SL.

### 5.1.4 Mikrozirkulation

Durch intraarterielle Applikation von Rhodamin-6G (1%) werden Leukozyten im Blutgefäßsystem angefärbt und dadurch intravitalfluoreszenzmikroskopisch darstellbar. Mittels dieser Technik lässt sich das Fließverhalten der Entzündungszellen beurteilen und beschreiben, ob sie im Sinne eines losen Kontaktes am Endothel entlang rollen, an diesem fest adhären oder gar keinen Kontakt zum Gefäßendothel haben. Die Zahl fest am Endothel postkapillarer Venolen haftender Leukozyten ist unter physiologischen Bedingungen gering. Dahingegen sind am Endothel entlang rollende Leukozyten auch unter physiologischen Bedingungen zu beobachten.

Die Ligatur des Nervus ischiadicus (NL) hat im EDL-Muskel zu keiner Veränderung des Fließverhaltens von Leukozyten bzw. der Leukozyten-Endothelzellinteraktion in postkapillaren Venolen geführt. Im Anteil rollender Leukozyten bzw. in der Zahl fest adhärenter Leukozyten konnte im Vergleich zu den Kontrolltieren (SL) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abbildungen 19 und 20).

## Ergebnisse

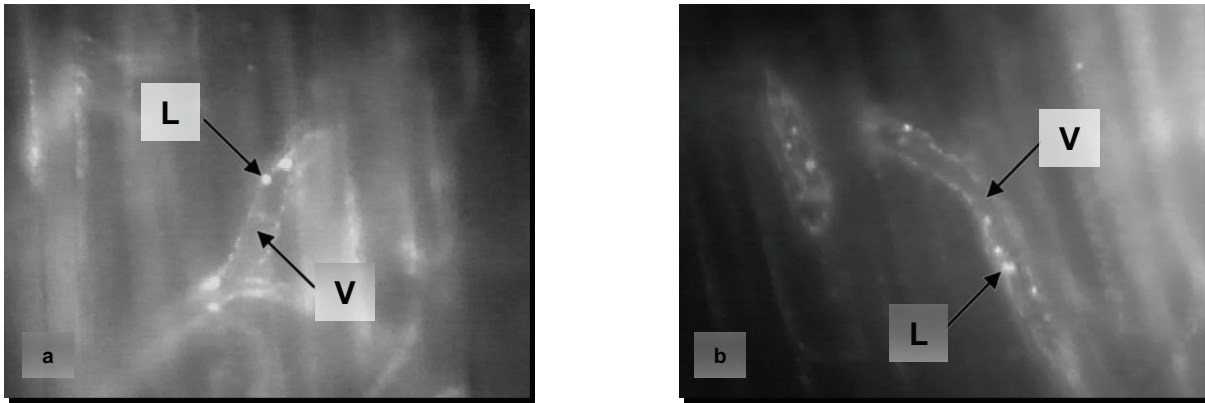


Abbildung 19: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung Rhodamin-6G markierter Leukozyten in einer postkapillaren Venole (306x) zur quantitativen Analyse der Leukozyten-Endothelzellinteraktion. a.) nach Shamoperation (SL) und b.) nach Nervenligatur (NL)

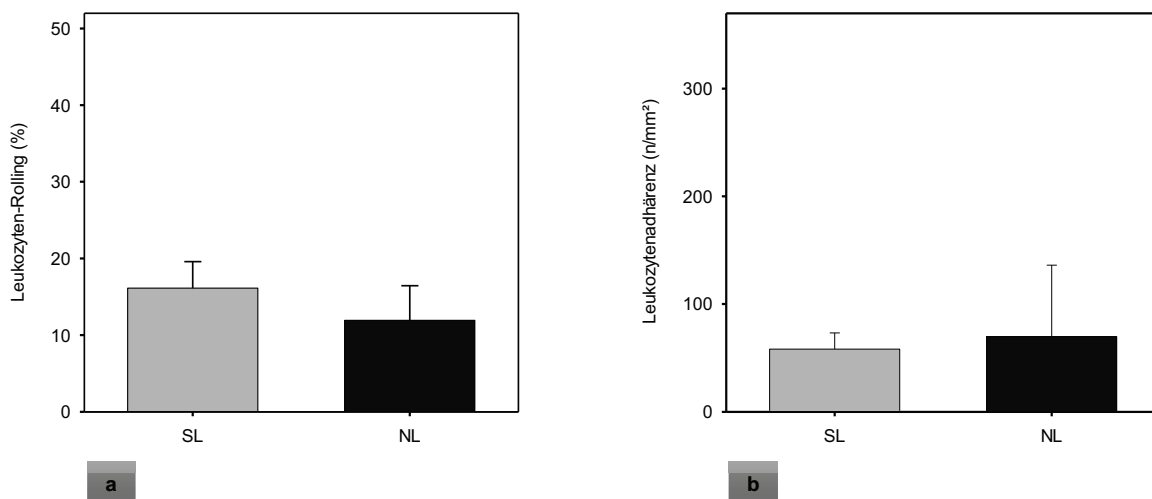


Abbildung 20: a.) Prozentualer Anteil langsam am Endothel postkapillarer Venolen entlang rollender Leukozyten (relativ zur Gesamtzahl aller bewegten Leukozyten). b.) Anzahl am Endothel postkapillarer Venolen fest adhärenter Leukozyten. (SL= shamoperierte Kontrolltiere, NL Tiere mit chronischer Nervenligatur) Mittelwert  $\pm$  SEM.

Nach intraarterieller Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran (5%, MW 150kDa) wird das mikrovaskuläre Gefäßsystem des EDL-Muskels kontrastiert. Der Farbstoff flutet über die terminalen Arteriolen an und wird nach Passage des nutritiven Kapillarbettes über die postkapillaren Venolen aus dem Muskelgebiet drainiert. Aufgrund der unter physiologischen Bedingungen geringen Extravasation des Plasmamarkers konnte mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie die Mikrozirkulation des EDL-Muskels während des gesamten Beobachtungszeitraums kontrastreich dargestellt werden (Abbildung 21).

## Ergebnisse

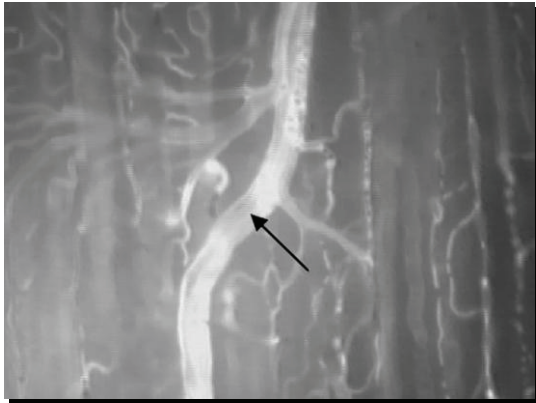


Abbildung 21: Intravitalfluoreszenzmikroskopische (306x) Übersichtsaufnahme der Mikrozirkulation des EDL-Muskels nach Injektion von FITC-Dextran. Die Aufnahme zeigt das kapillare Netzwerk, drainierende postkapillare Venolen und eine Sammelveole (Pfeil).

Unter pathologischen Bedingungen kommt es aufgrund der Lockerung von „tight-junctions“ des Gefäßendothels zum Plasmaaustritt aus den Gefäßen in das perivasale Gewebe. Diese makromolekulare Leakage kann durch den Austritt des Plasmafarbstoffs FITC-Dextran mittels Fluoreszenzmikroskopie sichtbar gemacht werden. Die unter physiologischen Bedingungen perivasal niedrigere Fluoreszenz wird unter pathologischen Umständen höher und überschreitet teilweise die intravasale Fluoreszenzintensität. Der normal unter 0,8 liegende Quotient (perivasale Helligkeit/intravasale Helligkeit) kann dann auf Werte größer 1 ansteigen.

Die makromolekulare Leakage aus postkapillaren Venolen veränderte sich durch die Ligatur des Nervus ischiadicus (NL) nicht wesentlich (Abbildung 22). Der Quotient von peri-/intravasaler Fluoreszenzintensität nach Ligatur zeigte keinen signifikanten Unterschied zu den bei den sham-operierten Tieren erfassten Werten (Tabelle 3).

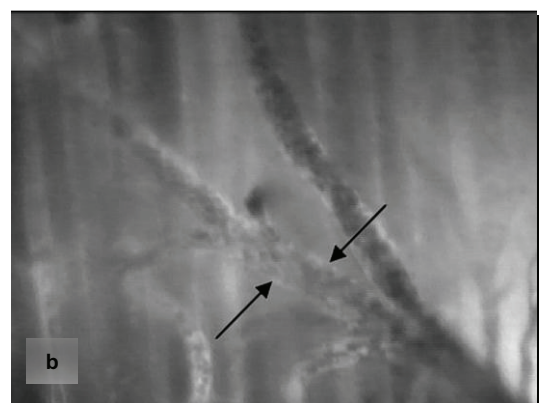
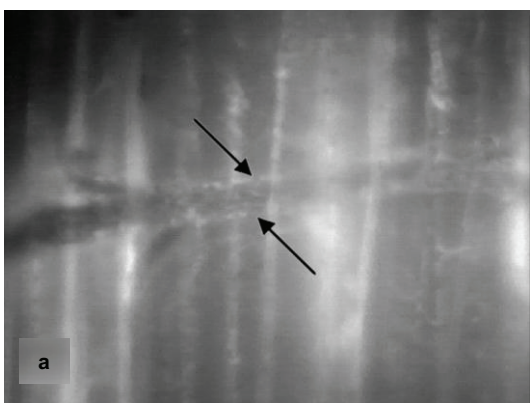


Abbildung 22: Intravitalmikroskopische Darstellung (306x) makromolekularer Leakage in postkapillaren Venolen mit Darstellung von niedriger Plasmaextravasation (FITC-Dextran markiert) im perivaskulären Raum (Pfeile). a.) nach Shamoperation (SL) und b.) nach Nervenligatur (NL).

Die funktionelle kapillare Dichte (FKD) stellt einen wichtigen Parameter für die nutritive Versorgung des Gewebes dar, die durch Verringerung der Kapillardichte oder durch verminderte Perfusion des Kapillarnetzes beeinträchtigt wird.

## Ergebnisse

Die funktionelle kapillare Dichte (FKD) des EDL-Muskels wurde durch die Ligatur des Nervus ischiadicus (NL) nicht wesentlich beeinträchtigt (Abbildung 23). Somit ergaben sich im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe (SL) keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 3).

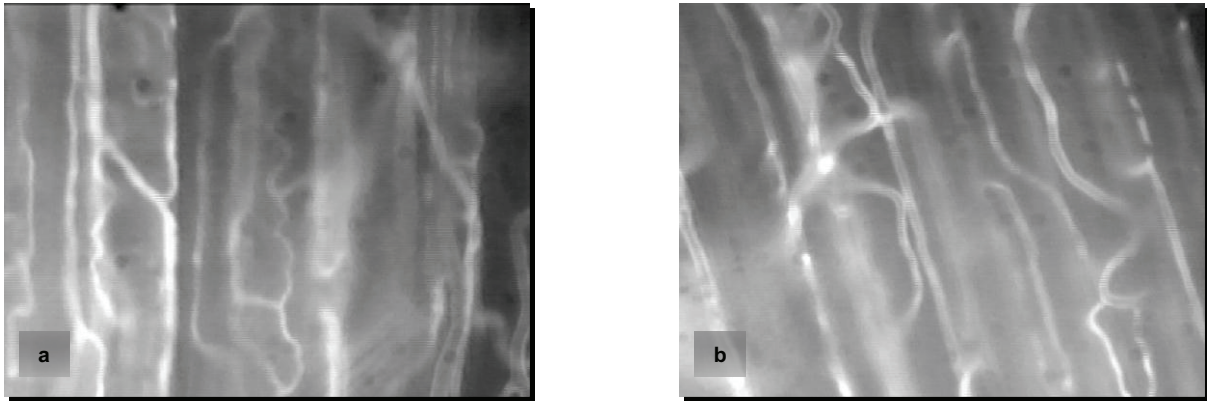


Abbildung 23: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung (630x) eines kapillaren Gefäßnetzes nach Gabe von FITC-Dextran (5%) zur Bestimmung der funktionellen kapillaren Dichte, a.) nach Shamoperation (SL), b.) nach Nervenligatur (NL).

Der Nachweis und die quantitative Bestimmung des Fluorophors NADH erlauben die Beurteilung der Gewebeversorgung mit Sauerstoff. Während NADH unter physiologischen Bedingungen als Koenzym und Energielieferant in der Atmungskette zügig oxidiert wird, kommt es bei Sauerstoffmangel zu einem intrazellulären Rückstau, der durch UV-Epiillumination unter dem Intravitalfluoreszenzmikroskop nachweisbar ist. Ein densitometrischer Anstieg der NADH Autofluoreszenz des Gewebes indiziert also Sauerstoffmangel im Gewebe.

Einhergehend mit der funktionellen kapillaren Dichte zeigte die nutritive Sauerstoffversorgung des EDL-Muskels durch die Ligatur des Nervus ischiadicus keine Einbußen (Abbildung 24). Die densitometrischen Werte der NADH Autofluoreszenz unterschieden sich zwischen den Tieren mit Nervenligatur und den sham-operierten Tieren nicht (Tabelle 3).

## Ergebnisse

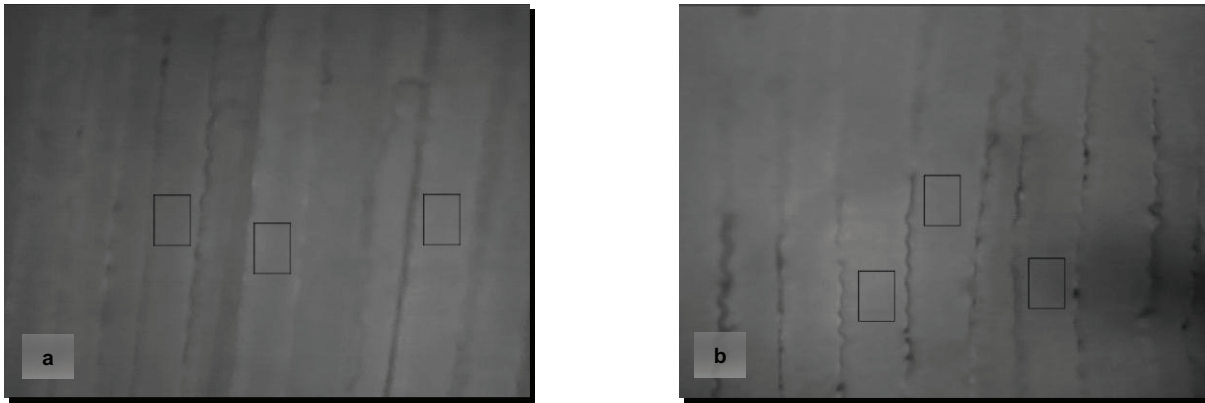


Abbildung 24: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung (306x) mikrovaskulärer Netzwerke ohne Fluoreszenzfarbstoff zur densitometrischen Bestimmung der NADH-Autofluoreszenz. Zur Vermeidung von Interferenzen mit dem Blutfluss in Kapillaren wurde die Messung streng zwischen den Kapillaren durchgeführt (Kästchen). a.) nach Shamoperation (SL) und b.) nach Nervenligatur (NL).

Tabelle 3: Funktionelle kapillare Dichte (FKD), NADH-Autofluoreszenz und makromolekulare Leakage in Tieren mit Nervenligatur (NL) und shamoperierten Tieren (SL). Mittelwert  $\pm$  SEM.

	SL	NL
Funktionelle kapillare Dichte (cm/cm <sup>2</sup> )	606 $\pm$ 41	517 $\pm$ 31
NADH Autofluoreszenz (aU)	131 $\pm$ 10	109 $\pm$ 18
Makromolekulare Leakage	0,97 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,02

### 5.1.5 Apoptose

Der apoptotische Muskelzelltod ist ein Maß für die Schädigung des Muskelgewebes. Apoptotische Myozyten wurden sowohl intravitalfluoreszenzmikroskopisch als auch immunhistochemisch nachgewiesen. *In vivo* wurden Zellkerne mit dem Fluoreszenzfarbstoff Bisbenzimid (1%) markiert und dann apoptotische Zellen anhand der typischen Morphologie nukleärer Kondensation, Fragmentierung und Margination quantitativ erfasst. Zusätzlich wurden an Dünnschnittpräparaten des EDL-Muskels mittels TUNEL-Färbung DNA-Strangbrüche apoptotischer Zellen markiert und ebenfalls quantitativ erfasst. Anhand Western-Blot Proteinanalyse erfolgte weiterhin der Nachweis von Caspase-3, einer Effektorprotease der Zellapoptose.

Durch die Ligatur des Nervus ischiadicus entwickelte sich innerhalb 4 Tagen eine deutliche Muskelzellapoptose. Sowohl die intravitalfluoreszenzmikroskopische Auswertung als auch die histochemische TUNEL-Analyse (Abbildungen 25, 26 und 27) zeigten signifikant erhöhte Zahlen apoptotischer Myozyten nach Nervenligatur (NL) im Vergleich zu den Kontrolltieren (SL). In der Western-Blot Proteinanalyse (Abbildung 28) zeigte sich eine

## Ergebnisse

deutlich breitere Bande im Bereich von 32,5kDa, also von Caspase-3 gegenüber den Kontrolltieren (SL).

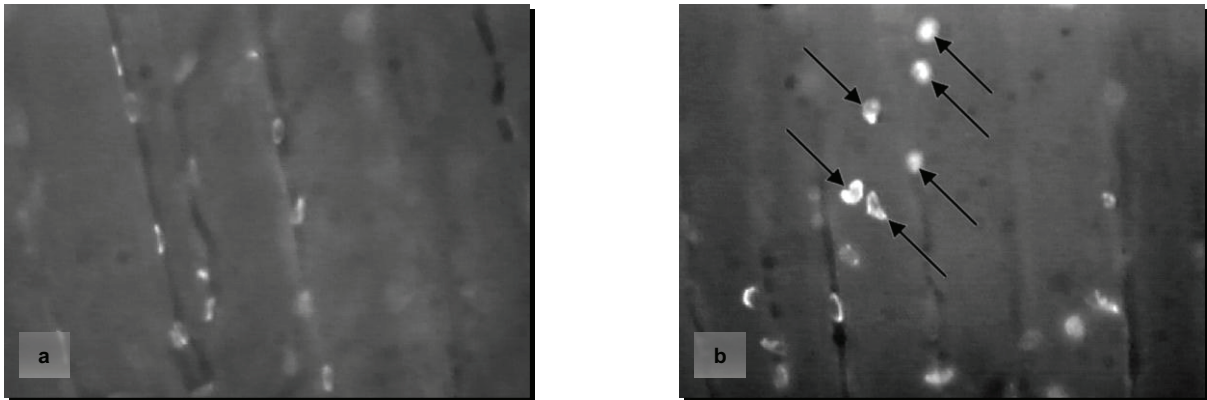


Abbildung 25: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (630x) von Bisbenzimid (1%) gefärbten Muskelzellen mit Apoptose-typischer Morphologie (Pfeile) a.) nach Shamoperation (SL) und b.) nach Nervenligatur (NL)

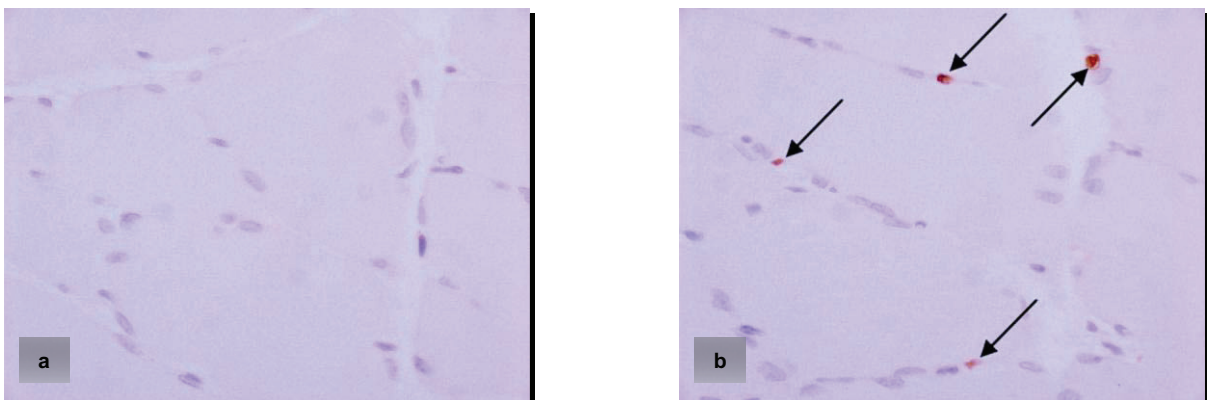


Abbildung 26: Lichtmikroskopische Aufnahmen (400x) TUNEL-gefärbter EDL-Muskelpräparate mit Darstellung einzelner TUNEL-positiver d.h. apoptotischer Myozyten (Pfeile) a.) nach Shamoperation (SL) und b.) nach Nervenligatur (NL).

## Ergebnisse

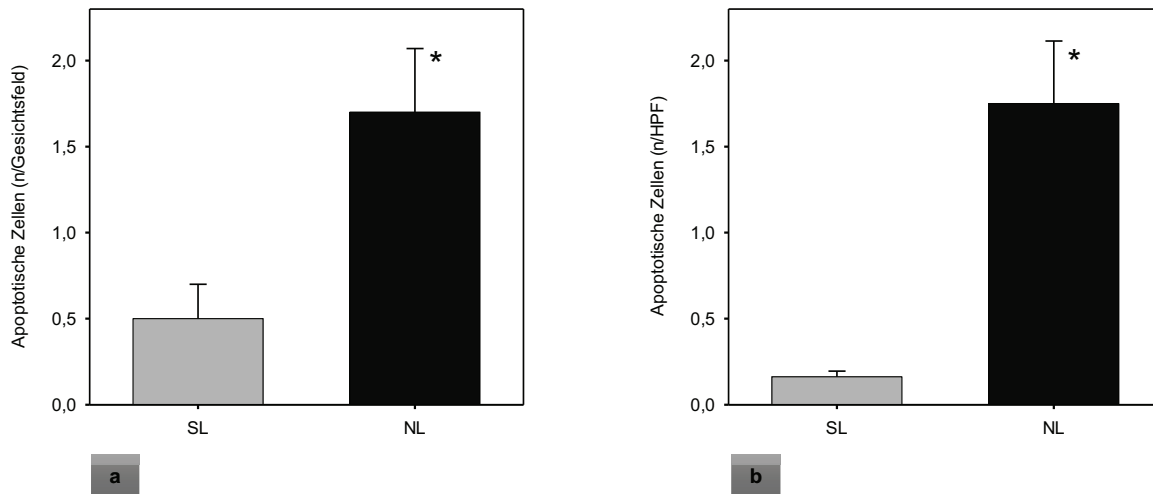


Abbildung 27: Quantitative Analyse der Muskelzellapoptose im EDL-Muskel a.) nach Bisbenzimidfärbung und intravitalfluoreszenzmikroskopischer Auswertung sowie b.) nach histochemischer TUNEL Färbung und Auswertung. (SL= shamoperierte Kontrolltiere, NL Tiere mit chronischer Nervenligatur) Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. SL.

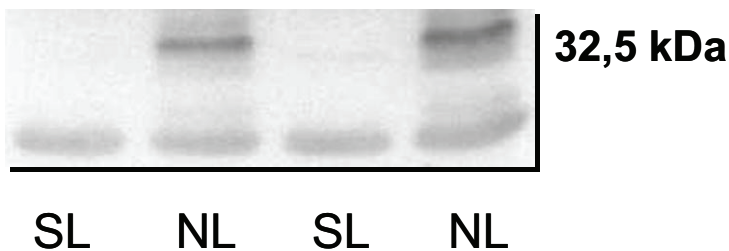


Abbildung 28: Western-Blot zum Nachweis von Caspase-3 in EDL-Muskelhomogenat nach Shamoperation (SL) und nach Nervenligatur (NL). Deutlich zu sehen ist die Hochregulation von Caspase-3 nach Nervenligatur.

## 5.2 Ergebnisse nach chronischer Nervenligatur mit Caspase-Inhibition

### 5.2.1 Makrohämodynamik

In den Versuchsgruppen, d.h. den Tieren mit Sham-Operation, Nervenligatur bzw. Nervenligatur und Pan-Caspase-Inhibition, zeigten sich für die Vitalparameter Herzfrequenz (HF) und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) physiologische Normalwerte. Die in Tabelle 4 dargestellten Werte wurden unmittelbar vor der Intravitalmikroskopie erhoben.



## Ergebnisse

Tabelle 4: Herzfrequenz (HF) und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) unmittelbar vor Beginn der Intravitalmikroskopie. (SL= Shamoperierte Kontrolltiere, NL= Tiere mit chronischer Nervenligatur, NLZ= Tiere mit chronischer Nervenligatur und Caspaseinhibition mittels z-VAD) Mittelwerte  $\pm$  SEM.

	SL	NL	NLZ
HF (n/min)	315 $\pm$ 13	309 $\pm$ 11	312 $\pm$ 8
MAP (mmHg)	105 $\pm$ 7	103 $\pm$ 6	108 $\pm$ 4

### 5.2.2 Klinische Beurteilung von Temperatur und Schwellung der Hinterläufe und postmortale Muskelödembestimmung

Die Bestimmung der Temperaturdifferenz zwischen der betroffenen und der kontralateralen gesunden Pfote ergab über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Unterschiede zwischen den Gruppen nach Shamoperation (SL) und nach Nervenligatur (NL) bzw. nach Nervenligatur und Caspaseinhibition (NLZ). Der Vergleich der Pfootenvolumina von rechts und links zeigte an Tag 4 eine signifikante Differenz zwischen der Gruppe der sham-ligierten Tiere (SL) und den nervligierten Tieren (NL). Zwischen den Tieren mit chronischer Ligatur unter Caspaseinhibition (NLZ) und den Tieren der Kontrollgruppe (SL) ergab sich hingegen kein Unterschied bezüglich der Volumendifferenz zwischen den Pfoten der einzelnen Tiere (Tabelle 5).

Die Bestimmung des Muskelödems im Musculus tibialis anterior anhand des Feucht-/Trockengewichtsquotienten zeigte keine signifikanten Unterschiede der Gruppen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Temperaturdifferenz (°C) und Volumendifferenz (ml) zwischen der betroffenen Pfote und der gesunden Gegenseite an den Tagen 0, 1 und 4 sowie der Quotient aus Feucht- und Trockengewicht des M. tibialis anterior an Tag 4. (SL= Shamoperierte Kontrolltiere, NL= Tiere mit chronischer Nervenligatur, NLZ= Tiere mit chronischer Nervenligatur und Caspaseinhibition mittels z-VAD) Mittelwert ± SEM, \* p<0,05 vs. SL.

	Tag	SL	NL	NLZ
Temperaturdifferenz	0	0,1±0,0	0,2±0,1	0,2±0,0
	1	0,2±0,1	0,4±0,1	0,5±0,0
	4	0,4±0,2	0,5±0,2	0,7±0,2
Volumendifferenz	0	0,0±0,0	0,0±0,0	0,0±0,0
	1	0,0±0,0	0,1±0,0	0,1±0,0
	4	0,0±0,0	0,1±0,0*	0,0±0,0
Tocken-/Feuchtgewicht	4	4,4±0,2	4,7±0,2	4,5±0,1

### 5.2.3 Schmerz

An Tag 0, d.h. vor chirurgischer und medikamentöser Intervention zeigten die Tiere aller Gruppen ein physiologisches Schmerzverhalten ohne Unterschiede im spontanen und thermischen Schmerzverhalten (Abbildung 29).

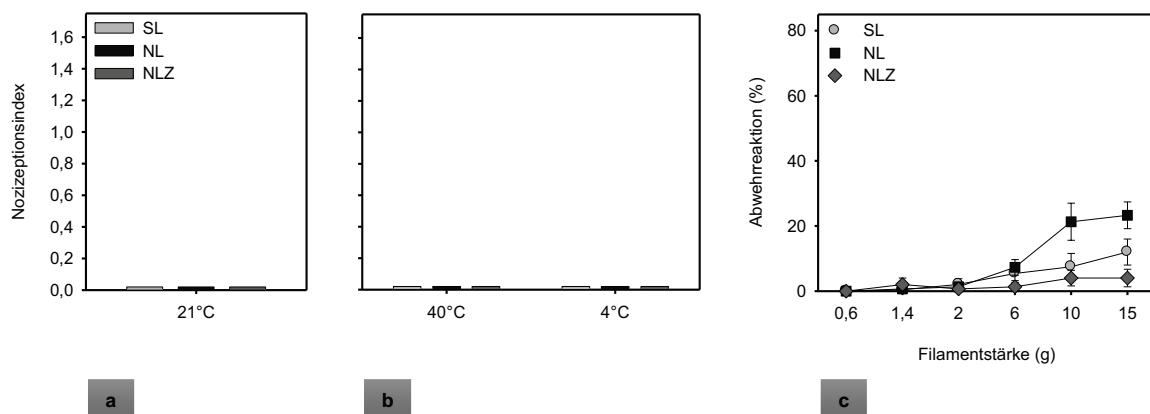


Abbildung 29: Tag 0: Testung a.) des spontanen Schmerzverhaltens (21°C), b.) der Schmerzreaktion auf thermische Reizung (40°C; 4°C) und c.) auf mechanische Reizung. (SL= Shamoperierte Kontrolltiere, NL= Tiere mit chronischer Nervenligatur, NLZ= Tiere mit chronischer Nervenligatur und Caspaseinhibition mittels z-VAD) Mittelwert ± SEM.

An Tag 1 nach chirurgischer Intervention und medikamentöser Therapie zeigten sich bei der Nozizeption deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren (SL) entwickelten die Tiere nach Nervenligatur eine massive Senkung der spontanen und thermischen Schmerzschwelle. Die Indices der Nozizeption bei Raumtemperatur wie auch bei thermischer Reizung mit 40°C oder 4°C waren signifikant gegenüber den Kontrolltieren erhöht. Die Tiere mit chronischer Nervenligatur, welche mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk behandelt wurden (NLZ), zeigten hingegen keine den Kontrolltieren (SL) gegenüber erhöhte Werte. Die Werte waren spontan und unter thermischer Reizung deutlich niedriger gegenüber den unbehandelten Tieren mit Nervenligatur (NL) (Abbildung 30).

Die mechanische Schmerzschwelle unterschied sich an Tag 1 nicht unter den Gruppen. Weder die Gruppe mit Nervenligatur (NL) noch die Tiere mit Nervenligatur und Pan-Caspase-Inhibition (NLZ) zeigten signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abbildung 30).

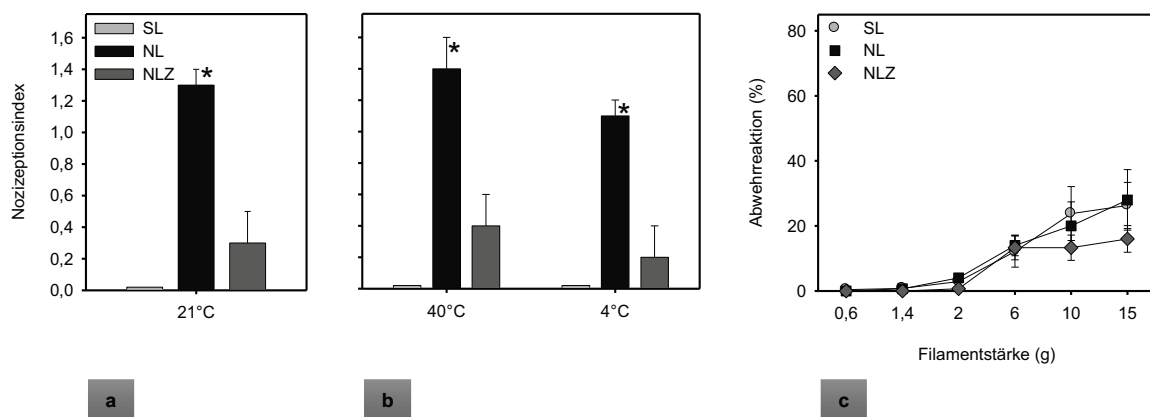


Abbildung 30: Tag 1: Testung a.) des spontanen Schmerzverhaltens (21°C), sowie der Schmerzreaktion b.) auf thermische Reizung (40°C; 4°C) und c.) auf mechanische Reizung. (SL= Shamoperierte Kontrolltiere, NL= Tiere mit chronischer Nervenligatur, NLZ= Tiere mit chronischer Nervenligatur und Caspaseinhibition mittels z-VAD) Mittelwert  $\pm$  SEM, \* p < 0,05 vs. SL.

An Tag 4 zeigte sich ein ähnliches Bild, wie an Tag 1 nach Nervenligatur (NL, NLZ) bzw. Sham-Operation (SL). Die Indices der Nozizeption der Tiere mit Nervenligatur unterschieden sich massiv von denen der sham-operierten Tiere (SL). Sowohl die Testung des Spontanverhaltens bei 21°C als auch bei thermischer Reizung mit 40°C und 4°C ergab signifikant höhere Werte als in der Kontrollgruppe (SL). Das Schmerzverhalten der Tiere mit Nervenligatur und Caspase-Inhibition (NLZ) unterschied sich deutlich von den unbehandelten Tieren mit Nervenligatur und zeigte keine Signifikanz gegenüber den Kontrolltieren (SL) (Abbildung 31).

Bei der Analyse der mechanischen Schmerzschwelle ergab sich für die Tiere mit Nervenligatur eine erniedrigte Schmerzschwelle nach Reizung mit von Frey-Filamenten. So

zeigte sich in dieser Gruppe ein höherer Prozentsatz an Abwehrreaktionen. Bei einer Filamentstärke von 15g unterschied sich der Wert signifikant von dem der Kontrollgruppe (SL). Die Tiere nach Nervenligatur und Apoptose-Inhibition durch den Pan-Caspase-Blocker z-VAD-fmk (NLZ) zeigten gegenüber den Kontrolltieren (SL) keine erniedrigte mechanische Schmerzschwelle und unterschieden sich bei einer Filamentstärke von 15g deutlich von den unbehandelten Tieren mit Nervenligatur (NL) (Abbildung 31).

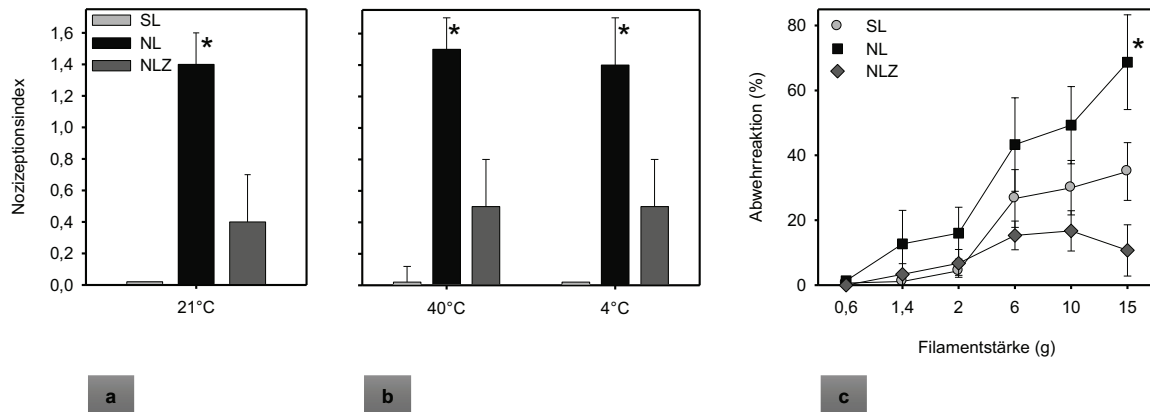


Abbildung 31: Tag 4: Testung a.) des spontanen Schmerzverhaltens (21°C), sowie der Schmerzreaktion b.) auf thermische Reizung (40°C; 4°C) und c.) auf mechanische Reizung. (SL= Shamoperierte Kontrolltiere, NL= Tiere mit chronischer Nervenligatur, NLZ= Tiere mit chronischer Nervenligatur und Caspaseinhibition mittels z-VAD) Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  vs. SL.

## 5.2.4 Mikrozirkulation

Die intravitalmikroskopische Untersuchung des Fließverhaltens der Rhodamin 6G gefärbten Leukozyten in postkapillaren Venolen ergab keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 32). Die Ligatur des Nervus ischiadicus führte weder bei Tieren mit (NLZ) bzw. ohne (NL) Caspase-Inhibition zur erhöhten Leukozyten-Endothelzellinteraktion im Sinne einer lokalen Entzündungsreaktion. Die quantitative Auswertung sowohl der Fraktion rollender Leukozyten als auch der Zahl fest adhärenter Leukozyten ergab im Normbereich liegende Werte.

## Ergebnisse

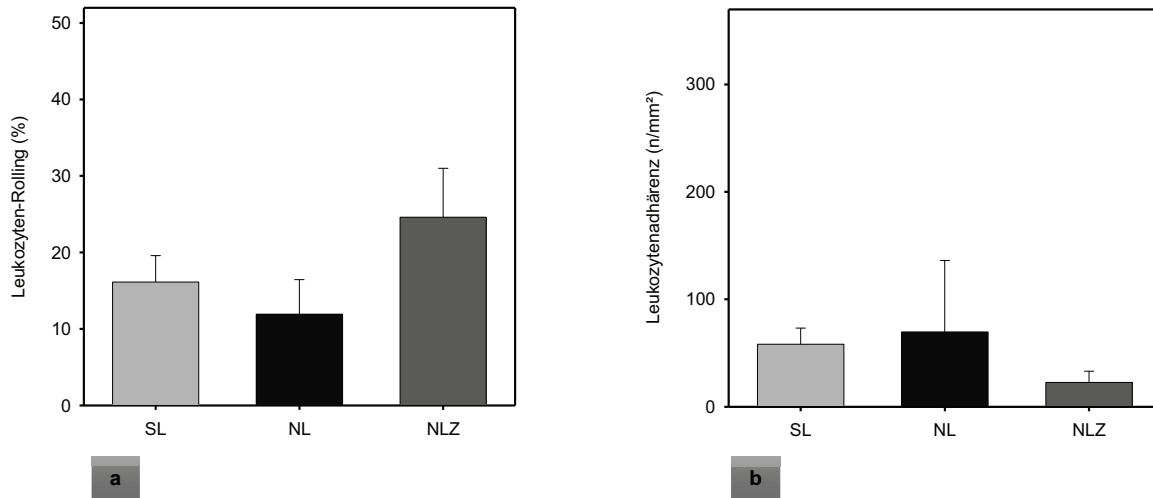


Abbildung 32: a.) Prozentualer Anteil langsam am Endothel postkapillarer Venolen entlang rollender Leukozyten (relativ zur Gesamtzahl aller bewegten Leukozyten) und b.) Anzahl am Endothel postkapillarer Venolen adhärenter Leukozyten. (SL= Shamoperierte Kontrolltiere, NL= Tiere mit chronischer Nervenligatur, NLZ= Tiere mit chronischer Nervenligatur und Caspaseinhibition mittels z-VAD) Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die chronische Nervenligatur führte zu keiner Beeinflussung der mikrovaskulären Perfusion im Sinne verminderter funktioneller Kapillardichte, erhöhter NADH-Autofluoreszenz oder erhöhter makromolekularer Leakage. Die genannten Parameter unterschieden sich nicht von den Werten in der Kontrollgruppe. Auch die Applikation des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk führte bei Tieren mit Nervenligatur (NLZ) zu keiner Veränderung dieser Parameter (Tabelle 6).

Tabelle 6: Funktionelle kapillare Dichte (FKD), NADH-Autofluoreszenz und makromolekulare Leakage in Tieren mit Nervenligatur (NL), Nervenligatur und Pan-Caspase-Inhibition (NLZ) sowie in shamoperierten Tieren (SL). Mittelwert  $\pm$  SEM.

	SL	NL	NLZ
Funktionelle Kapillardichte (cm/cm <sup>2</sup> )	606 $\pm$ 41	517 $\pm$ 31	540 $\pm$ 9
NADH Autofluoreszenz (aU)	131 $\pm$ 10	109 $\pm$ 18	128 $\pm$ 17
Makromolekulare Leakage	0,97 $\pm$ 0,12	0,87 $\pm$ 0,02	0,79 $\pm$ 0,09

### 5.2.5 Apoptose

Die chronische Ligatur des Nervus ischiadicus bewirkte im EDL-Muskel eine Zunahme apoptotischer Muskelzellen. Übereinstimmend ergaben die quantitativen

## Ergebnisse

Auswertungen apoptotischer Myozyten anhand der Bisbenzimid-Markierung und Kernmorphologie (Abbildung 33) sowie durch TUNEL-Färbung (Abbildung 34) einen massiven Anstieg der Muskelzell-Apoptose, mit signifikantem Unterschied gegenüber den Kontrolltieren (Abbildung 35). Im Gegensatz dazu konnte durch Behandlung mit dem Pan-Caspase-Inhibitor z-VAD-fmk der Anstieg der Apoptoserate im EDL-Muskel nach Nervenligatur nahezu komplett inhibiert werden (Abbildung 33 und 34). So liegen die Ergebnisse sowohl der Intravitalmikroskopie als auch der Histochemie bei den Tieren mit Nervenligatur und z-VAD-fmk im Bereich derer von Kontrolltieren ohne Nervenligatur (Abbildung 35).

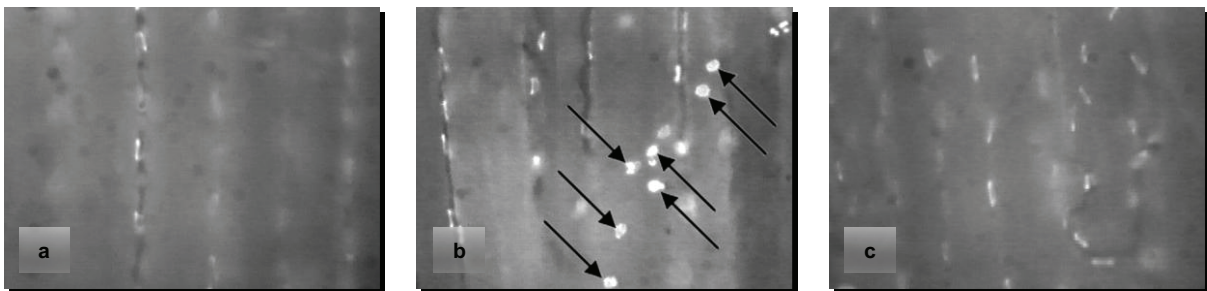


Abbildung 33: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen Bisbenzimid gefärbter Muskelzellen, welche zum Teil für Apoptose charakteristische Kernmorphologie zeigen (Pfeile) (630x). a.) nach Shamoperation (SL), b.) nach Nervenligatur (NL) und c.) nach Nervenligatur mit Pan-Caspase-Inhibition (NLZ).

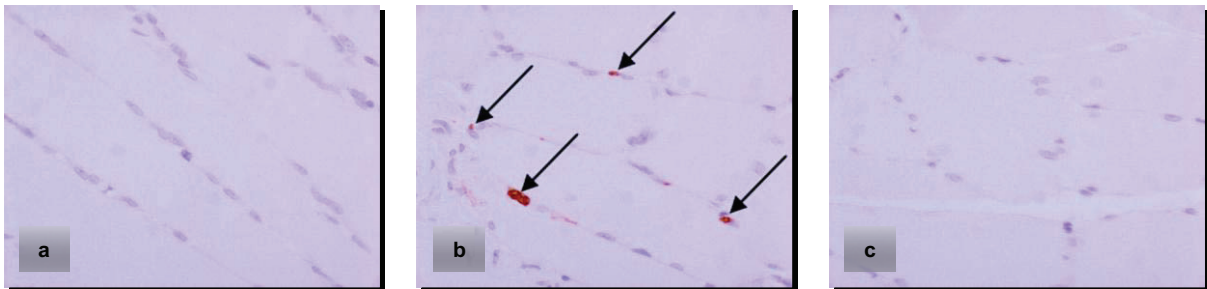


Abbildung 34: Lichtmikroskopische Aufnahmen (400x) von Dünnschnittpräparaten des EDL-Muskels nach TUNEL-Färbung zur Darstellung von apoptotischen Myozyten a.) nach Shamoperation (SL), b.) nach Nervenligatur (NL) und c.) nach Nervenligatur mit Pan-Caspase-Inhibition (NLZ).

## Ergebnisse

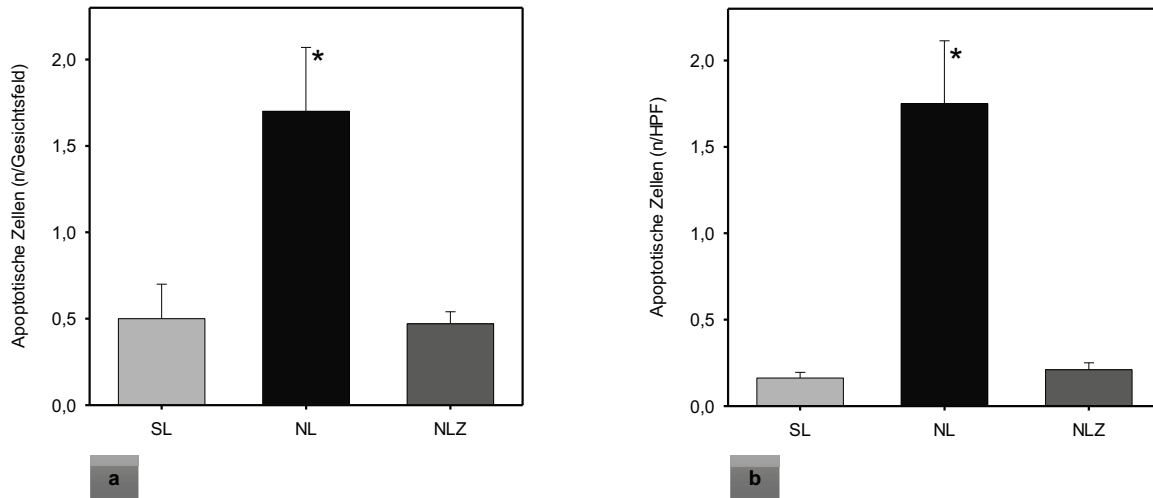


Abbildung 35: Quantitative Analyse der Muskelzellapoptose im EDL-Muskel a.) nach intravitalfluoreszenzmikroskopischer und b.) nach histochemischer Auswertung. (SL= Shamoperierte Kontrolltiere, NL= Tiere mit chronischer Nervenligatur, NLZ= Tiere mit chronischer Nervenligatur und Caspaseinhibition mittels z-VAD) Mittelwert  $\pm$  SEM, \*  $p < 0,05$  NL vs. SL.

Auch die Auswertung der Western-Blot Proteinanalyse zur Erfassung der Caspase-3 Protein-Expression bestätigten die genannten Ergebnisse. Nach Nervenligatur konnte eine deutliche Zunahme der Bande im Bereich des Caspase-3 Proteins (32,5kDa) gegenüber den sham-operierten Tieren beobachtet werden. Durch Caspaseinhibition mittels z-VAD-fmk konnte dieser Anstieg der Caspase-3 Expression unterdrückt werden (Abbildung 36).

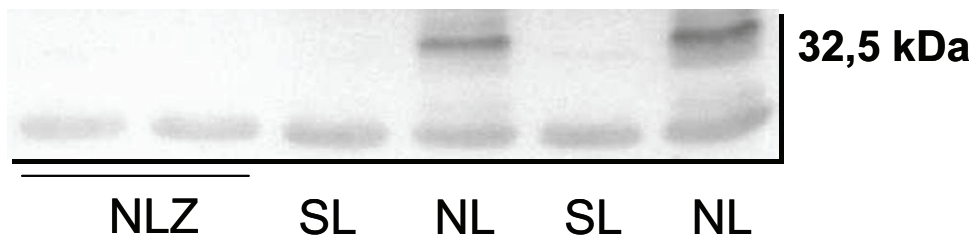


Abbildung 36: Western-Blot Proteinanalyse zum Nachweis der Expression von Caspase-3 im EDL-Muskelhomogenat nach Shamoperation (SL), nach Nervenligatur (NL) und nach Nervenligatur mit Caspaseinhibition (NLZ). Deutlich zu sehen ist die Caspase-3-Hochregulation nach Nervenligatur und deren Ausbleiben bei Pan-Caspase-Inhibition.

## 5.3 Ergebnisse nach chronischer Applikation von Substanz P

### 5.3.1 Makrohämodynamik

Die Vitalparameter Herzfrequenz (HF) und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) zeigten in den Versuchsgruppen mit chronischer Substanz P Applikation sowie den korrespondierenden NaCl-behandelten Kontrolltieren physiologische Werte. Die in Tabelle 7 dargestellten Werte wurden unmittelbar vor der Intravitalmikroskopie erhoben.

Tabelle 7: Herzfrequenz (HF) und mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) unmittelbar vor Beginn der Intravitalmikroskopie. (NaCl 1= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 1 Tag; NaCl 4= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage; SP 1= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 1 Tag; SP 4= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 4 Tage) Mittelwerte  $\pm$  SEM.

	NaCl 1	NaCl 4	SP 1	SP 4
HF (n/min)	318 $\pm$ 11	312 $\pm$ 14	315 $\pm$ 13	309 $\pm$ 12
MAP (mmHg)	103 $\pm$ 7	108 $\pm$ 3	105 $\pm$ 6	107 $\pm$ 5

### 5.3.2 Klinische Beurteilung von Temperatur und Schwellung der Hinterläufe und postmortale Muskelödembestimmung

Die Erfassung der Temperaturen der Pfoten der betroffenen und der kontralateralen Extremität ergaben an Tag 0 vor chirurgischer Intervention keine Differenz. Ebenso unterschieden sich die Gruppen zu diesem Zeitpunkt nicht anhand der Volumendifferenz der Pfoten.

An Tag 1 nach Implantation der Alzet<sup>®</sup>-Minipumpen und Start der 24-stündigen Infusion von Substanz P zeigte sich kein Unterschied zwischen den Gruppen hinsichtlich der Temperaturdifferenz zwischen betroffener Pfote und der Gegenseite. Dahingegen konnte ein deutlicher Anstieg der Volumendifferenz im Sinne eines Ödems der betroffenen Extremität beobachtet werden. Bei Tieren der Gruppe mit chronischer Applikation von Substanz P und intravitalfluoreszenzmikroskopischer Untersuchung an Tag 1 des Protokolls (SP 1) ergab sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (NaCl 1) (Tabelle 8).

An Tag 4 des Beobachtungszeitraumes ergab sich zwischen den Tieren, welche mit Substanz P Perfusion an Tag 4 intravitalmikroskopisch untersucht wurden (SP 4), und den Kontrolltieren (NaCl 4) nach wie vor ein deutlicher Unterschied in den Volumendifferenzen



## Ergebnisse

der betroffenen und der kontralateralen Pfote. Eine Signifikanz konnte zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht beobachtet werden (Tabelle 8).

Die Analyse des Muskelödems anhand des Feucht-/Trockengewichtquotienten des Musculus tibialis anterior zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Weder nach 1 noch nach 4 Tagen zeigten sich Unterschiede zwischen den Substanz P behandelten Tieren (SP 1 bzw. SP 4) und den Kontrolltieren (NaCl 1 bzw. NaCl 4) (Tabelle 8).

Tabelle 8: Temperaturdifferenz (°C) und Volumendifferenz (ml) zwischen der betroffenen Pfote und der Gegenseite an den Tagen 0, 1 und 4 und der Quotient aus Feucht- und Trockengewicht des M. tibialis anterior an Tag 4. (NaCl 1= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 1 Tag; NaCl 4= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage; SP 1= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 1 Tag; SP 4= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 4 Tage) Mittelwert ± SEM, # p<0,05 vs. NaCl 1.

	Tag	NaCl 1	NaCl 4	SP 1	SP 4
Temperaturdifferenz	0	0,4±0,0	0,8±0,3	0,6±0,2	0,2±0,0
	1	1,2±0,4	1,9±0,5	1,2±0,3	0,3±0,1
	4	-	0,6±0,2	-	0,4±0,2
Volumendifferenz	0	0,0±0,0	0,1±0,1	0,0±0,0	0,0±0,0
	1	0,0±0,0	0,1±0,0	0,2±0,1 <sup>#</sup>	0,2±0,1
	4	-	0,0±0,0	-	0,1±0,0
Trocken-/Feuchtgewicht	1	4,2±0,1	-	4,1±0,1	-
	4	-	4,3±0,1	-	4,3±0,1

### 5.3.3 Schmerz

Vor Implantation der Alzet<sup>®</sup>-Minipumpen und Infusion von Substanz P ergaben sich an Tag 0 bei der Evaluation der Schmerzparameter physiologische Werte. Sowohl spontan als auch bei thermischer Reizung mit Wärme oder Kälte zeigte sich zwischen den Gruppen kein unterschiedliches Verhalten. Auch die mechanische Reizung mit von Frey-Filamenten ergab bei allen vier Gruppen ein identisches, der physiologischen Norm entsprechendes Abwehrverhalten (Abbildung 37).

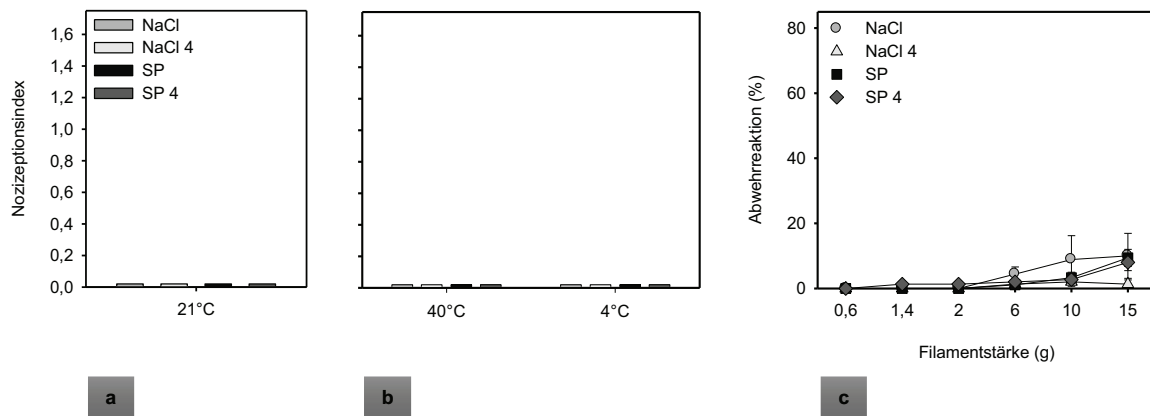


Abbildung 37: Tag 0: Testung a.) des spontanen Schmerzverhaltens (21°C), b.) der Schmerzreaktion auf thermische Reizung (40°C; 4°C) und c.) auf mechanische Reizung. (NaCl 1= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 1 Tag; NaCl 4= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage; SP 1= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 1 Tag; SP 4= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 4 Tage) Mittelwert  $\pm$  SEM.

Die Erfassung der Indices der Nozizeption 1 Tag nach Implantation der osmotischen Alzet-Minipumpen und Start der 24-stündigen Infusion zeigte kein pathologisches spontanes Schmerzverhalten. Auch thermischer Reiz auf warmem oder kaltem Untergrund zeigte keine erhöhte Nozizeption.

Auf mechanische Reizung zeigten die Tiere nach 24-stündiger Infusion von Substanz P (SP 1 und SP 4) jedoch einen gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen (NaCl 1 bzw. NaCl 4) massiv höheren Prozentsatz positiver Abwehrreaktionen auf mechanische Reizung. Bei der Testung mit von Frey-Filamenten der Stärken 10g und 15g ergaben sich bei Tieren beider Studienprotokolle (1 Tag Versuchsdauer (SP 1) bzw. 4 Tage Versuchsdauer (SP 4)) durch die Applikation von Substanz P signifikant höhere Werte als bei den jeweiligen Kontrollgruppen nach Infusion von Kochsalzlösung (NaCl 1 bzw. NaCl 4) (Abbildung 38).

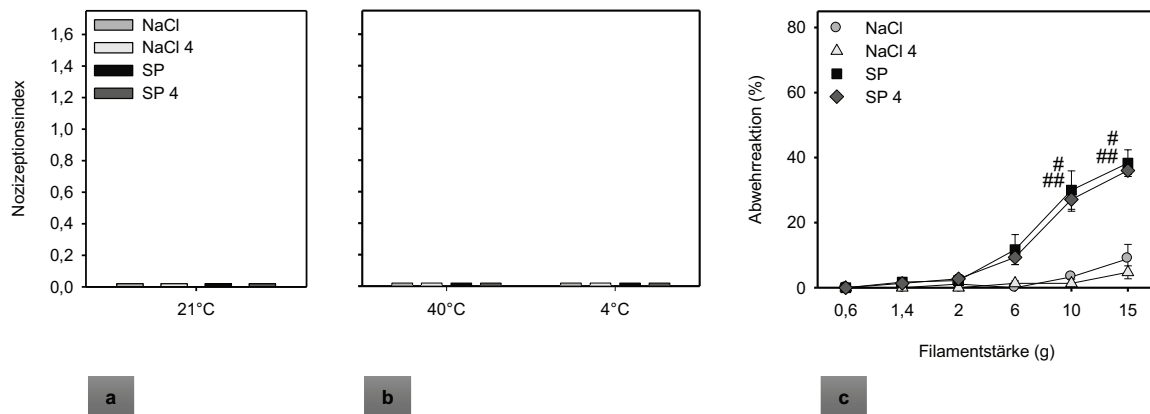


Abbildung 38: Tag 1: Testung a.) des spontanen Schmerzverhaltens (21°C), b.) der Schmerzreaktion auf thermische Reizung (40°C; 4°C) und c.) auf mechanische Reizung. (NaCl 1= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 1 Tag; NaCl 4= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage; SP 1= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 1 Tag; SP 4= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 4 Tage) Mittelwert  $\pm$  SEM, #  $p < 0,05$  SP 1 vs. NaCl 1; ##  $p < 0,05$  SP 4 vs. NaCl 4.

An Tag 4 nach Implantation der Alzet<sup>®</sup>-Minipumpen und Start der 24-stündigen Infusion ergab sich bei Analyse des Spontanverhaltens kein Unterschied zwischen den Substanz P behandelten Tieren (SP 4) und den Tieren der Kontrollgruppe (NaCl 4). Auch thermische Reizung der Pfote führte zu keiner pathologischen Reaktion in einer der beiden Gruppen. So lagen die Indices der Nozizeption alle im Normbereich.

Auf mechanische Reizung reagierten die Tiere am Tag 4 nach Substanz P Applikation mit deutlich erniedrigter Schmerzschwelle. Bei Testung mit von Frey-Filamenten der Stärken 6g bis 15g ergaben sich bei den Substanz P behandelten Tieren (SP 4) signifikant höhere Werte als bei der Kontrollgruppe (NaCl 4) (Abbildung 39).

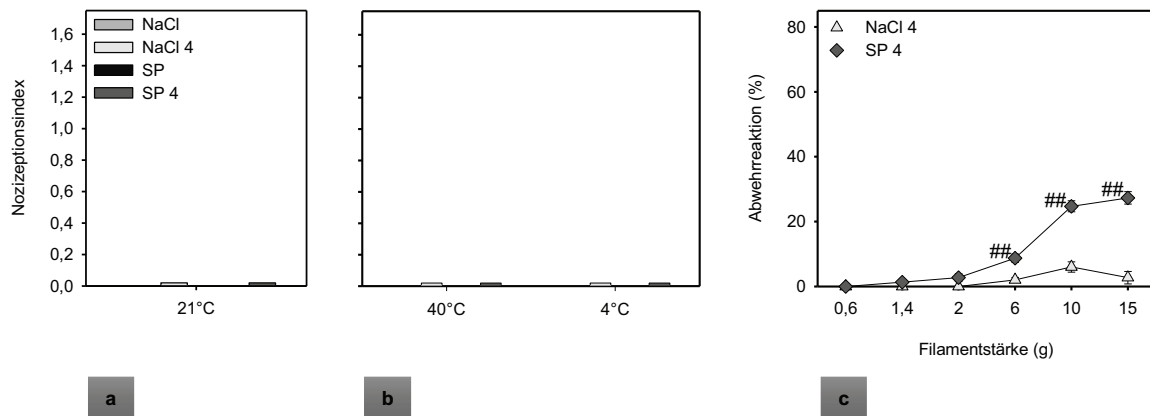


Abbildung 39: Tag 4: Testung a.) des spontanen Schmerzverhaltens (21°C), sowie der Schmerzreaktion b.) auf thermische Reizung (40°C; 4°C) und c.) auf mechanische Reizung. (NaCl 1= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 1 Tag; NaCl 4= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage; SP 1= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 1 Tag; SP 4= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 4 Tage) Mittelwert  $\pm$  SEM, #  $p < 0,05$  vs. NaCl 1; ###  $p < 0,05$  vs. NaCl 4.

### 5.3.4 Mikrozirkulation

Die intravitale Evaluation der Leukozyten-Endothelzellinteraktion zeigte bei den Tieren an 1 Tag nach Start der Substanz P-Infusion eine massive Entzündungsreaktion (Abbildung 40). Im Vergleich zu den Kochsalzbehandelten Kontrolltieren war der Prozentsatz der rollenden Leukozyten bei den Substanz P behandelten Tieren (SP 1) signifikant höher (Abbildung 41). Ebenso zeigte sich bei den Substanz P-behandelten Tieren (SP 1) eine gegenüber den Kontrolltieren (NaCl 1) signifikant höhere Zahl fest am Endothel adhärenter Leukozyten (Abbildung 41).

Bei den Tieren, die an Tag 4 nach der Implantation der Alzet<sup>®</sup>-Minipumpen und Substanz P Gabe intravitalfluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden (SP 4), zeigte sich ebenso noch eine massive Entzündungsreaktion. So war der Anteil rollender Leukozyten bei dieser Gruppe gegenüber den Kontrolltieren (NaCl 4) ebenfalls signifikant erhöht (Abbildung 41). Die Anzahl fest am Endothel haftender Leukozyten war zu diesem Zeitpunkt sogar noch stärker erhöht, als bei den Tieren mit eintägigem Versuchsprotokoll (SP 1) (Abbildung 41).

## Ergebnisse

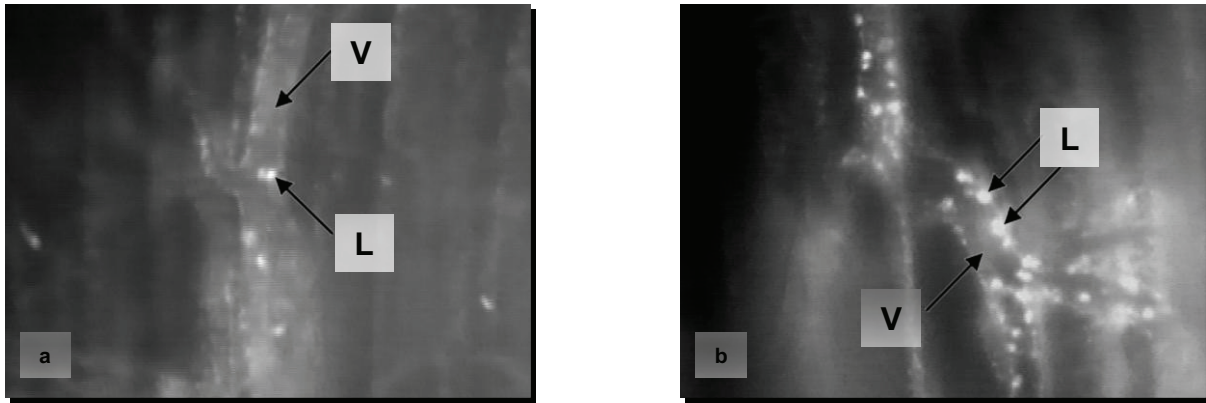


Abbildung 40: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Darstellung Rhodamin-6G markierter Leukozyten (L) in postkapillaren Venolen (V) (306x) zur quantitativen Analyse der Leukozyten-Endothelzellinteraktion. a.) nach Kochsalzinfusion (NaCl 1) und b.) nach Substanz P-Infusion (SP 1)

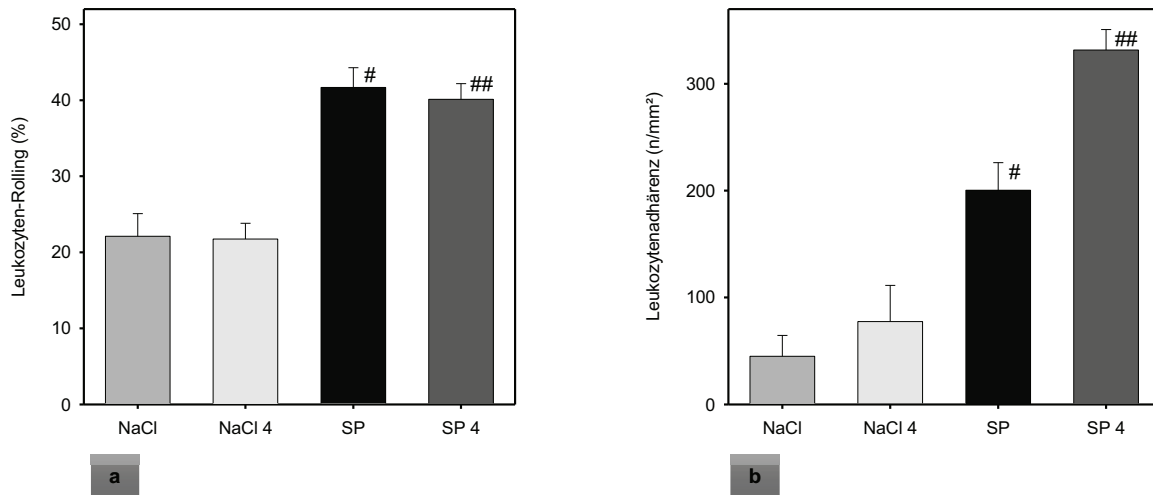


Abbildung 41: a.) Prozentualer Anteil langsam am Endothel postkapillarer Venolen entlang rollender Leukozyten (relativ zur Gesamtzahl aller bewegten Leukozyten) und b.) Anzahl am Endothel postkapillarer Venolen fest adhärenter Leukozyten. (NaCl 1= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 1 Tag; NaCl 4= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage; SP 1= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 1 Tag; SP 4= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 4 Tage) Mittelwert  $\pm$  SEM, #  $p < 0,05$  vs. NaCl 1; ##  $p < 0,05$  vs. NaCl 4.

Die Untersuchungen der mikrozirkulatorischen Parameter der funktionellen Kapillardichte, der NADH-Autofluoreszenz und der makromolekularen Leakage zeigten keine Einschränkung der Gewebepfusion und der Endothelzellintegrität durch die 24-stündige Applikation von Substanz P. Die Daten ergaben weder nach eintägigem noch nach viertägigem Versuchsprotokoll für keinen der genannten Parameter signifikante Unterschiede zwischen Substanz P behandelten (SP 1 und SP 4) und den jeweiligen Kontrolltieren (NaCl 1 bzw. NaCl 4) (Tabelle 9).

Tabelle 9: Funktionelle kapillare Dichte (FKD), NADH-Autofluoreszenz und makromolekulare Leakage. (NaCl 1= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 1 Tag; NaCl 4= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage; SP 1= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 1 Tag; SP 4= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 4 Tage) Mittelwert  $\pm$  SEM.

	NaCl 1	NaCl 4	SP 1	SP4
Funktionelle Kapillardichte (cm/cm <sup>2</sup> )	475 $\pm$ 23	485 $\pm$ 24	516 $\pm$ 14	543 $\pm$ 11
NADH Autofluoreszenz (aU)	150 $\pm$ 5	109 $\pm$ 6	148 $\pm$ 7	109 $\pm$ 1
Makromolekulare Leakage	0,66 $\pm$ 0,03	0,70 $\pm$ 0,05	0,71 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,04

### 5.3.5 Apoptose

Die intravitalfluoreszenzmikroskopische wie auch die histochemische Untersuchung des EDL-Muskels auf apoptotische Muskelzellen zeigte keinen Anstieg der Apoptoserate durch Substanz P (Abbildung 42). Auch die Western-Blot Proteinanalyse der Caspase-3 zeigte keinen Hinweis auf eine Zunahme dieses Effektorcaspase-Proteins im Sinne einer erhöhten Rate an Zellapoptose im untersuchten Gewebe (Abbildung 43).

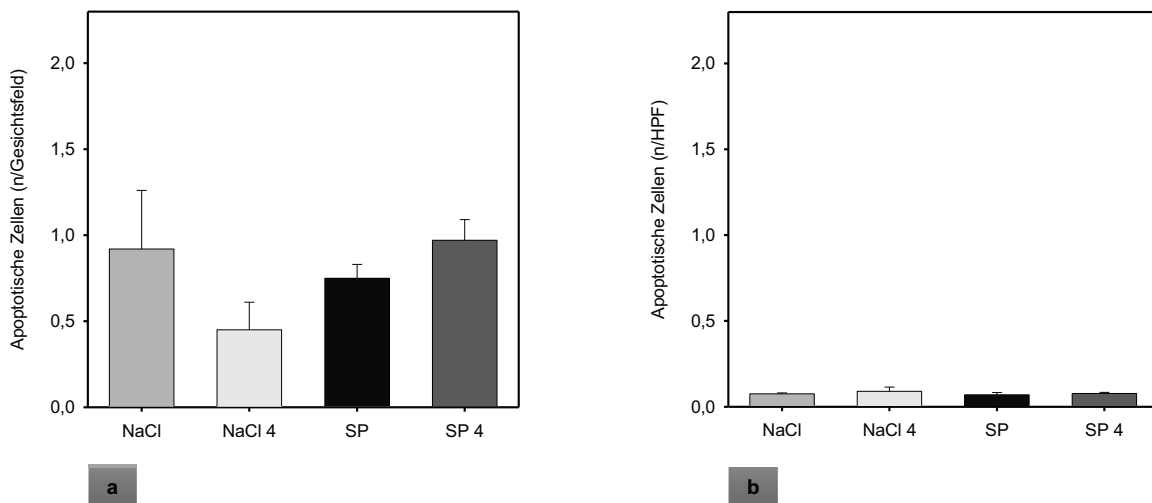


Abbildung 42: Quantitative Darstellung der Muskelzellapoptose im EDL-Muskel a.) nach intravitalfluoreszenzmikroskopischer und b.) nach histochemischer Auswertung. (NaCl 1= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 1 Tag; NaCl 4= Shamoperierte Kontrolltiere, Versuchsdauer 4 Tage; SP 1= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 1 Tag; SP 4= Tiere mit chronischer Applikation von Substanz P, Versuchsdauer 4 Tage) Mittelwert  $\pm$  SEM.

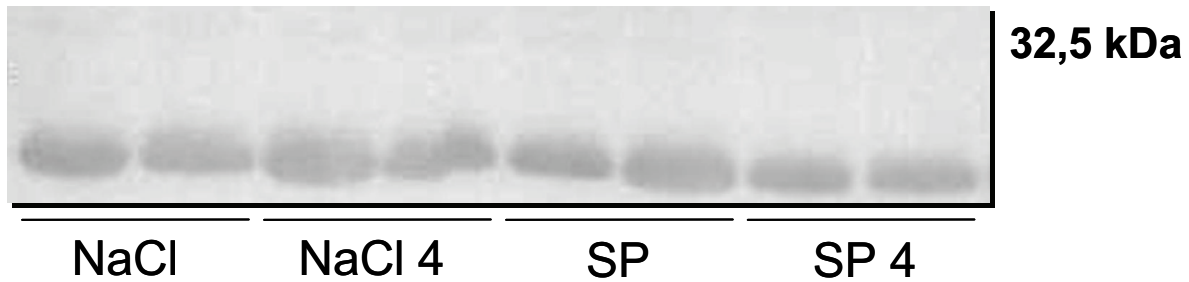


Abbildung 43: Western-Blot Analyse zum Nachweis der Expression von Caspase-3 in EDL-Muskelhomogenat nach Infusion von Kochsalz-Lösung (NaCl 1, NaCl 4) und Substanz P (SP 1, SP 4). Zu sehen ist eine vergleichbar hohe Caspase-3-Expression in allen Gruppen.

## 5.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass:

1. chronische Ligatur des Nervus ischiadicus zur Entwicklung eines Schmerzsyndromes ähnlich des CRPS und zur Apoptose von Muskelzellen führt, aber keine inflammatorische Reaktion im Muskelgewebe verursacht,
2. Caspaseinhibition mittels des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk Muskelzellapoptose nach chronischer Nervenligatur inhibiert und die Ausprägung des durch diese Ligatur verursachten Schmerzsyndroms lindert,
3. die chronische Applikation von Substanz P über 24h lang anhaltende mechanische Hyperalgesie und Inflammation im Muskelgewebe verursacht, ohne jedoch Muskelzell-Apoptose auszulösen.

## 6 Diskussion

Das „complex regional pain syndrome“ ist ein häufiges Krankheitsbild und eine gefürchtete Komplikation bei Operationen am Unterarm (Atkins et al., 1990; Gradl et al., 2003). Die Erkrankung führt häufig zu langwierigen Verläufen und Invalidisierungen (Field et al., 1992). Trotz intensiver Forschungsbemühungen seit der Erstbeschreibung durch Paul Sudeck vor 100 Jahren konnte die Pathogenese bis heute nicht abschliessend erklärt werden. Die mögliche Aggravierung der Krankheit lässt eine Forschung mit invasiven Techniken am Patienten nicht zu. Daher ist die Forschung an Tiermodellen beim CRPS unerlässlich. Hierbei verlangen neue Erkenntnisse und Erklärungsansätze auch die Entwicklung neuer Tiermodelle. Die verschiedenen Theorien zur Pathogenese machen unterschiedliche Ansätze bei der tierexperimentellen Forschung notwendig (Jänig und Baron 2002). So wird einerseits eine inflammatorische Genese des CRPS postuliert (Sudeck, 1904; Jänig und Baron 2004), andererseits besteht die Theorie der primär neuropathischen Ursache (Jänig, 2001; Jänig und Baron, 2002). Die Annahme, dass eine vermehrte Ausschüttung von Neurotransmittern an der Entstehung des Krankheitsbildes beteiligt ist, geht in beide Theorien ein.

### 6.1 Diskussion von Material und Methodik

#### 6.1.1 Diskussion der Modelle

Seit der Beschreibung „über die akute (trophoneurotische) Knochenatrophie nach Entzündungen und Traumen der Extremitäten“ durch Sudeck im Jahre 1902 beschäftigen sich eine Vielzahl von Studien mit diesem Symptomenkomplex, welcher heute unter dem Oberbegriff CRPS zusammengefasst ist (Livingston, 1943; Evans, 1947; Steinbrocker et al., 1948; Blumberg et al., 1991). Aufgrund der nach wie vor unklaren Pathogenese erstrecken sich diese Bemühungen bis in aktuelle Forschungsarbeiten (Birklein, 2001; Baron et al., 2002; Black 2002; Jänig, 2002; Atkins, 2003). Es werden sowohl klinische als auch tierexperimentelle Studien durchgeführt, wobei klinische Studien aufgrund der möglichen Aggravierung des Krankheitsbildes invasive Methoden weitestgehend vermeiden müssen (Jänig, 1991). Daher ist die Durchführung von tierexperimentellen Ansätzen und deren Weiterentwicklung unumgänglich.

*Modell der chronischen Nervenligatur.* Die Entwicklung tierexperimenteller Modelle zum CRPS geht auf Wall et al. (1979) zurück. Ein Modell zur Untersuchung einer kompletten Deafferenzierung nach Nervenresektion und Neuombildung führte zwar zu einer



Schmerzsensation distal der Nervenläsion, nicht aber zum CRPS-typischen neuropathischen Schmerz mit Hyperalgesie und Allodynie (Wall et al., 1979). Ausserdem ist eine komplette Konturunterbrechung eines Nervens im klinischen Alltag selten anzutreffen. Weitaus häufigere Ursache peripherer Neuropathien sind partielle Unterbrechungen, bei denen Teilfunktionen des Nervens erhalten bleiben (Bennett und Xie, 1988). Daraus folgernd sieht das später entwickelte Modell von Bennett und Xie (1988) eine lose vierfache Ligatur des Nervus ischiadicus proximal der Trifurkation auf Höhe des Hinterlaufgelenks der Ratte vor. Es wurde gezeigt, dass die Versuchstiere nach partieller Nervenläsion unter Erhalt der sensorischen und motorischen Funktionen ein ausgeprägtes neuropathisches Schmerzsyndrom mit der Ausbildung von Allodynie und Hyperalgesie entwickeln (Bennett und Xie, 1988). Dieses Schmerzsyndrom mit Höhepunkt an Tag 4 nach Läsion ging mit veränderter Sudomotorik, gesteigertem Nagelwachstum und Ausbildung eines neuropathischen Ödems einher. Dies sind Symptome, die an das humane CRPS II nach Nervenläsion denken lassen. Neben dieser auch als „chronic constriction injury“ (CCI) bezeichneten Form der Induktion der Neuropathie haben Shir und Seltzer das „spare nerve model“ entwickelt (1990), bei dem ein Teil des Nervus ischiadicus ( $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{2}$ ) mit einer Ligatur fest abgebunden wird. Eine ebenfalls feste Ligatur, allerdings der Spinalnerven L5 und L6, führten Kim und Chung durch (Kim und Chung, 1992). In beiden Modellen konnte in vergleichbarem zeitlichem Verlauf eine Reduktion der thermischen und taktilen Schmerzschwelle beobachtet werden (Shir und Seltzer 1990; Kim und Chung, 1992). Ein Nachteil dieser Modelle mit partieller Nervenläsion ist, dass durch unterschiedliche Druckverhältnisse beim CCI-Modell (Bennett und Xie, 1988) bzw. durch Fassen unterschiedlich großer Nervenanteile beim Modell nach Shir und Seltzer (1990) die Anzahl verletzter Nervenfasern variiert. Das Modell nach Bennett und Xie (1988) gilt als international anerkannt, wurde von vielen Autoren zur tierexperimentellen Induktion von neuropathischem Schmerz an der Ratte eingesetzt (Attal et al., 1990; Munglani et al., 1996; Yonehara und Yoshimura, 2001) und diente auch in der vorliegenden Studie zur Induktion des Nervenschadens.

*Modell der chronischen Substanz P Applikation.* Um die Wirkung von Substanz P per se auf primär gesundes Gewebe und insbesondere auf das muskuläre Kompartiment der Extremität zu untersuchen, wurde eine kontinuierliche intraarterielle Applikation von Substanz P über 24h durchgeführt. Da das CRPS alle Gewebe der betroffenen Extremität betrifft, wurde die intraarterielle Applikation gewählt, um die gesamte Extremität mit Substanz P zu perfundieren. Da bisher in der Literatur eine intraarterielle Perfusion mit Substanz P nicht beschrieben wurde, konnte auf eine bereits etablierte Methode nicht zurückgegriffen werden. Insbesondere bezüglich der Dosierung waren Voruntersuchungen notwendig. Bei tierexperimentellen Ansätzen zur Untersuchung der Wirkung von Substanz P werden in der

Literatur unterschiedliche Applikationsarten sowie deutlich differierende Mengen Substanz P angegeben. So applizieren Nikolaus und Mitarbeiter 0.001 $\mu$ g ins ventrale Pallidum von Ratten (Nikolaus et al., 1999). Baumann und Mitarbeiter applizieren 20214 $\mu$ g in den Nucleus tractus solitarius von Ratten. In der vorliegenden Studie wurde die Gabe verschiedener Mengen Substanz P getestet. Zu niedrige Dosierungen zeigten keinen messbaren Effekt auf das Gewebe, während zu hohe Dosierungen letale systemische Nebenwirkungen zeigten. Es kam zu Hypersekretion der Schleimhäute der oberen Atemwege, zu Pulsanstieg und schliesslich zum Kreislaufstillstand. Die in der vorliegenden Studie gewählte Dosis zeigte einerseits reproduzierbare Wirkung der Substanz P an der betroffenen Extremität der Tiere, andererseits keine kardiopulmonalen Nebenwirkungen. Um eine eventuelle Triggerrolle bei der Entwicklung eines Schmerzsyndroms und/oder einer neurogenen Inflammation nachzuweisen, wie von Scardina und Mitarbeitern vermutet (Scardina et al., 2004), wurden die Tiere sowohl 1 Tag als auch 4 Tage nach Beginn der 24-stündigen Infusion von Substanz P untersucht.

Die chronische Nervenligatur nach Bennett und Xie (1988) wird als Auslöser eines experimentellen neuropathischen Schmerzes angewandt (Attal et al., 1990; Munglani et al., 1996; Daemen et al., 1998; Yonehara und Yoshimura, 2001) und wurde lange Zeit als Modell zur Induktion eines experimentellen CRPS Typ II gewertet. Diese Interpretation beruht in erster Linie auf klinischen Beobachtungen, wie der Entwicklung des Schmerzsyndroms und der Beobachtung eines Ödems der betroffenen Pfote. Die Entwicklung einer neurogenen Entzündung nach chronischer Nervenligatur konnte bisher allerdings nicht nachgewiesen werden. Yonehara und Yoshimura (2001) wiesen nach chronischer Nervenligatur eine erhöhte basale Freisetzung von Substanz P aus peripheren Nervenendigungen nach. Meert et al. zeigten im CCI-Modell eine Erniedrigung der Schmerzschwelle durch Substanz P (Meert et al., 2003). Substanz P Antagonisten bewirkten in einer Studie von Jang et al., (2004) die verzögerte Entstehung eines Schmerzsyndrom nach Nervenläsion. Substanz P wird als vorrangiger Mediator in der Entwicklung neurogener Entzündungen diskutiert (Black, 2002; Legat et al., 2002; Seegers et al., 2003; Scardina et al., 2004). In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass dermale Applikation von Substanz P bei CRPS Patienten zu signifikant höherer Plasmaextravasation als bei gesunden Probanden führt (Birklein, 2005). Ausserdem zeigte sich, dass die Ausschüttung von Substanz P in betroffenes Gewebe von CRPS Patienten sowohl gegenüber Kontrollprobanden, als auch gegenüber der nicht betroffenen Extremität der CRPS-Patienten erhöht war (Birklein, 2005). In Studien an CPRS Erkrankten nach Ausheilung des Syndroms konnte eine erhöhte Bereitschaft zu neurogener Entzündung gezeigt werden (Leis et al., 2004). Leis und Mitarbeiter postulieren desweiteren eine verminderte Inaktivierung von Substanz P bei CRPS Patienten (Leis et al., 2003).

### 6.1.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

*Neurophysiologische Erfassung des Schmerzes.* Die aufwendige nozizeptive Testung des spontanen Schmerzverhaltens und der thermischen Allodynie stützt sich auf die Methode von Attal et al. (1990), bei der ohne Intervention des Beobachters die Stellung der betroffenen Rattenhinterpfote auf thermoneutralem, sowie warmem und kaltem Untergrund analysiert wird. Hierbei wurde die Abwehrhaltung der Pfote in verschiedenen Stellungen zur Vermeidung von Schmerz maßgebend für die Quantifizierung eines Schmerzscore beurteilt (Attal et al., 1990; van der Laan et al., 1998a). Diese Methode zur Erfassung des Schmerzscore ohne Intervention durch den Beobachter wurde von Attal et al. (1990) zur Analyse des spontanen Schmerzverhaltens beschrieben. In der vorliegenden Studie wird sie entweder auf warmem oder kaltem Untergrund in identischer Form zur Beurteilung der Wärme- und Kälteallodynie genutzt. Die Temperatur von 40°C wurde nach Kingery et al. (1999) und Meert et al. (2003) gewählt. Andere Autoren beschreiben eine Entwicklung von Allodynie erst bei Temperaturen von über 40°C (Guilbaud et al., 1989; Attal et al., 1990). Dies könnte eine Erklärung für den nur geringen Abfall der Schmerzschwelle bei 40°C gegenüber Raumtemperatur sein. Andere Verfahren zur Erfassung der thermischen Schmerzschwelle, wie der „acetone drop test“, bei dem mittels eines Acetontropfens ein Kältereiz ausgelöst wird (Choi et al., 1994; Coderre et al., 2004) oder die Methode von Attal et al. (1990), der die betroffene Pfote in Wasser unterschiedlicher Temperaturen taucht, haben den Nachteil, dass eine Intervention durch den Untersucher nicht vermieden werden kann. Mittels der von Hargreaves vorgestellten Methode zur Erfassung von Wärmeallodynie mittels Wärmestrahler (Hargreaves et al., 1987) kann die thermische Schmerzschwelle sehr präzise gemessen werden, allerdings nur in Temperaturbereichen, die über der Umgebungstemperatur liegen. Der in der vorliegenden Studie angewandte Aufbau hat den Vorteil, dass zur Beobachtung sowohl des spontanen Schmerzverhaltens, als auch des Schmerzverhaltens unter Wärme und Kältereizung ein identischer Score verwendet wurde, der einen Vergleich des Schmerzverhaltens unter den unterschiedlichen Bedingungen erleichtert.

Die Testung der mechanischen Schmerzschwelle stützte sich auf die Verwendung von von Frey-Haaren (Kim und Chung, 1992; Chaplan et al., 1994). Dabei wurde mittels Filamenten (0,6- 15g) die betroffene Hinterpfote plantar gereizt. Die maximale Filamentstärke von 15g wurde gewählt, da stärkere Filamente zu einem Anheben der Pfote durch den Untersucher führten. Chaplan et al. (1994) zeigten in ihrer Arbeit, dass die hier verwendete Methode zur Erfassung der mechanischen Schmerzschwelle reproduktiv und nicht abhängig von der Erfahrung des Untersuchers ist. Die Schmerzreaktion war bei allen Modellen nach Intervention mit zunehmender Filamentstärke signifikant gegenüber den jeweiligen Kontrollgruppen erhöht. Dies deckt sich mit vormals gefundenen Ergebnissen, die eine

erniedrigte mechanische Schmerzschwelle nach Nervenschaden (Bennett und Xie, 1988; Shir und Seltzer 1990; Kim und Chung, 1992) bzw. erhöhter Substanz P Konzentration im Gewebe (Meert et al., 2003) zeigten.

*Mikrozirkulationsmodell.* Zur intravitalmikroskopischen Untersuchung von Skelettmuskelgewebe wurden über die letzten Jahrzehnte unterschiedliche Tiermodelle zur Exposition des Muskels etabliert. Hierbei kommen verschiedene Tierspezies und auch Lokalisationen von Skelettmuskel zum Einsatz. Zur direkten Visualisierung der Mikrozirkulation werden u.a. der Musculus sartorius des Frosches (TymI und Groom, 1980; Dietrich und TymI, 1992) und der Katze (Sullivan und Johnson, 1981), der Musculus cremaster des Hamsters (Klitzman und Duling, 1979), der Ratte (Lee et al., 2005) sowie der Maus (Lindenblatt et al., 2005), der Musculus tibialis anterior des Hamsters (Damon und Duling, 1987) und der Musculus soleus der Ratte (Badhwar et al., 2003) verwendet. Bei Tiermodellen mit Exposition von Muskelgewebe zur Intravitalmikroskopie ist zu bedenken, dass es durch die Freilegung der Muskeloberfläche und das chirurgische Trauma zu Beeinflussung hämodynamischer Parameter, wie der nutritiven Perfusion und der Leukozyten-Endothelzellinteraktion, kommen kann. Der Vorteil der hier angewandten atraumatischen Präparation des EDL-Muskels ist eine weitest gehende Vermeidung von mikrochirurgisch induzierten Schäden. Die mikrochirurgische Präparation des EDL-Muskels erfolgte in Anlehnung an die von TymI und Budreau (1991) beschriebene Technik. Eine Vielzahl von Studien wurde unter der Verwendung dieses Modells durchgeführt und publiziert (Pudupakkam et al., 1998, TymI et al., 1999; Mittlmeier et al., 2003; Badhwar et al., 2004; Gierer et al., 2005; Schaser et al., 2005). Der atraumatisch präparierte EDL-Muskel zeigt ein physiologisch perfundiertes Gewebe mit einer intakten Mikrozirkulation. Präparationsbedingte Zeichen von Inflammation, wie z.B. Akkumulation von Leukozyten oder Auftreten von apoptotischen Zellen, werden nur vereinzelt beobachtet.

Die vorliegende Untersuchung zur Analyse der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur nach Nervenläsion bzw. Applikation von Substanz P wurde an beatmeten Ratten unter intraperitonealer Narkose durchgeführt. Aufgrund der komplexen Pathomechanismen der Gewebeschädigung und -regeneration war eine experimentelle Untersuchung am intakten Organismus erforderlich. *In vivo* Untersuchungen erlauben insbesondere die hämodynamischen und mikrozirkulatorischen Parameter gut zu beurteilen. Alternative Untersuchungen, wie z.B. *ex vivo* Perfusionssysteme oder *in vitro* Zellkulturansätze kamen daher nicht in Betracht.

Die chirurgische Präparation zur intravitalmikroskopischen Analyse der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur macht eine Narkose notwendig. Das Anästhetikum Pentobarbital wird nach intraperitonealer Injektion resorbiert und anschließend von der Leber verstoffwechselt (Hoetzel et al., 2006). Es führt zu einer Reduktion des Sauerstoffverbrauchs

aller Organe. Während der Narkose kommt es zu Vasodilatation, wodurch Körpertemperatur und die basale metabolische Umsatzrate reduziert werden (Craft und Leitl, 2006). Aufgrund der Gefahr einer Hypothermie des Versuchstieres mit Beeinträchtigung der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur ist eine permanente Kontrolle und Regulation der Körpertemperatur während des gesamten Narkosezeitraumes nötig. Nach Katheteranlage und Präparation des EDL-Muskels kann die intravitale Fluoreszenzmikroskopie vorgenommen werden. Mit Hilfe dieser Technik erfolgt eine quantitative Analyse mikrohämodynamischer und mikrozirkulatorischer Parameter in den Kapillaren und postkapillaren Venolen der Muskulatur. Es können nach Applikation von spezifischen Fluoreszenzmarkern individuelle Zellfunktionen, wie z.B. das Fließverhalten von Leukozyten und das Auftreten von apoptotischen Skelettmuskelzellen beurteilt werden. Somit können am lebenden Muskel dynamische Parameter der Mikrozirkulation, wie auch Parameter der lokalen Entzündungsreaktion erhoben werden. Weiterhin kann gezielt auf die in der Fragestellung dieser Studie aufgeführten Aspekte des CRPS eingegangen werden. Diese können wiederum mit den Ergebnissen der neurophysiologischen Untersuchungen in Beziehung gesetzt werden.

*Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.* Als Untersuchungstechnik wurde die intravitale Mikroskopie in Epi-Illumination gewählt, da sie die direkte Visualisierung der Mikrozirkulation des Skelettmuskels gewährleistet. Die Technik erlaubt die Analyse individueller Segmente der Mikrozirkulation, d.h. der Arteriolen, der Kapillaren und der postkapillaren Venolen, sowie die detaillierte Beobachtung und Quantifizierung dynamischer Phänomene über einen längeren Zeitraum. Die intravitale Mikroskopie ist daher als so genannte „direkte Technik“ anderen Verfahren, welche nur indirekte Aussagen über die Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur ermöglichen, überlegen. Als Beispiele sind hier die Mikrosphären-Technik (Vollmar et al., 1992; Anetzberger et al., 2004; Vincent et al., 2001), die H<sub>2</sub>-Clearance-Technik (Young, 1980) oder die Laser-Doppler Flowmetrie (Clark et al., 2001; Binzoni et al., 2003; Schaser et al., 2005) zu nennen.

Nach Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen erlaubt die intravitale Mikroskopie unter Verwendung verschiedener Filterblöcke die Visualisierung der Skelettmuskulatur mit gleichzeitiger Analyse sowohl mikrozirkulatorischer als auch zellulärer Aspekte. Da die Epi-Illuminationstechnik die Begutachtung größerer Areale der Skelettmuskulatur ermöglicht, können pathophysiologische Veränderungen, wie z.B. ein nutritives Perfusionsversagen, direkt visualisiert werden. Überdies ermöglicht die intravitale Fluoreszenzmikroskopie eine direkte Visualisierung von Skelettmuskelschäden im Gewebe. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie ist demnach eine geeignete Methode zur *in vivo* Analyse der Mikrohämodynamik und Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur unter physiologischen und

pathologischen Bedingungen. Weiterhin können die regionale Durchblutung und lokale Vasomotorik quantitativ erfasst werden.

Durch Aktivierung und Rekrutierung von Leukozyten mit Margination, Adhäsion und Migration (Springer, 194) besteht die Möglichkeit der Interaktion der Leukozyten („roller“ bzw. „sticker“) mit dem Gefäßendothel. Durch Markierung der Leukozyten mit einem Fluoreszenzfarbstoff kann diese Interaktion visualisiert und deren Ausmaß quantitativ erfasst werden. Für die Fluoreszenzmarkierung der Leukozyten wurde Rhodamin 6G intraarteriell appliziert. Die ebenfalls mögliche ex vivo Markierung von Leukozyten trägt das Risiko einer extrakorporalen Aktivierung mit Veränderung der rheologischen Eigenschaften der Zellen (Nash et al.; 1988; Kirkpatrick et al., 1998) und der Expression von Integrinen (Hamblin et al., 1992). Bereits ab einer Dosierung von  $>0,1\text{mg/kg}$  KG Rhodamin 6G werden bei Ratten ein Großteil der Granulozyten (99,9%), der Monozyten (97,0%) und der Lymphozyten (75,2%) angefärbt (Batz et al., 1995). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass beim vorliegenden Versuchsaufbau ein Großteil der Leukozyten *in vivo* mit Rhodamin 6G angefärbt wurde. Durch zeitliche Begrenzung der Fluoreszenzlicht-Exposition des EDL-Muskelgewebes wurden phototoxische Effekte minimiert. Desweiteren erfolgte die Auswertung der Untersuchung off-line, was ebenfalls zur Minimierung der Untersuchungszeit und damit Lichtexposition beitrug.

Als Marker des Intravasalraumes wurde hochmolekulares, Fluoreszein-markiertes Dextran mit einem Molekulargewicht von 150kDa verwendet. Aus Untersuchungen an der Rückenhautkammer am Hamster sind protektive Eigenschaften von Dextran auf Leukozyten-Endothelzellinteraktion und funktionelle Kapillardichte bekannt (Steinbauer et al., 1997; Steinbauer et al., 1998) Desweiteren ist die Wirkung von Dextran als Radikalfänger bekannt. Diese Eigenschaften sind stark vom Molekulargewicht abhängig, wobei insbesondere niedermolekulares Dextran als protektiv gilt. Das in der vorliegenden Arbeit verwendete hochmolekulare Dextran besitzt nur einen geringen protektiven Einfluss (Laurent et al., 1976). Eine Hemmung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion oder eine Verbesserung der funktionellen Kapillardichte kann jedoch nicht komplett ausgeschlossen werden. Die in dieser Studie nachgewiesene Aktivierung von Leukozyten nach Applikation von Substanz P könnte also ohne die Verwendung von hochmolekularem Dextran eher noch ausgeprägter auftreten. Durch Einsatz von makromolekularem FITC-Dextran kann anhand des densitometrischen Vergleiches von Fluoreszenzaktivität ausserhalb zu innerhalb des Gefäßlumens eine Aussage über den Austritt von Plasma in den Perivasalraum getroffen werden. Dies ist eine quantitative Größe für die Ausbildung eines intramuskulären Ödems. Weiterhin können durch die Intravitalmikroskopie funktionelle Parameter, wie funktionelle Kapillardichte, Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit ermittelt werden. Die funktionelle

Kapillardichte ist die Voraussetzung für eine adäquate nutritive Gewebeversorgung, welche durch Messung der Gesamtlänge perfundierter Kapillaren pro Flächeneinheit erfasst wird.

Die reduzierte Form des Nikotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid NADH ist der wichtigste Energieträger zwischen Citratzyklus und Atmungskette. Bei gehemmter Aktivität der Atmungskette, z.B. durch verminderte Sauerstoffversorgung kommt es zu einem Rückstau von NADH im Gewebe. NADH ist ein so genanntes Fluorophor und somit in der Lage, nach Anregung mit Licht die aufgenommene Energie in Form von Autofluoreszenz wieder ab zu geben. Ohne Zugabe von Fluoreszenzfarbstoffen kann diese Autofluoreszenz densitometrisch gemessen und quantitativ ausgewertet werden und dient als Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes (Ince et al., 1993; Vollmar et al., 1997). Diese Methode wurde an verschiedenen Tiermodellen zur Bestimmung der Gewebeoxygenierung verwendet, so am Modell zur Untersuchung eines standardisierten Weichteiltraumas am Hinterlauf von Ratten (Gierer et al., 2003; Gierer et al., 2005; Gradl et al. 2005). Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass der freigelegte Muskel nicht traumatisiert wird, wie z.B. bei der Verwendung von Stichelektroden zur Messung des Sauerstoffpartialdruckes im Gewebe. Durch die randomisierte Erfassung von Gesichtsfeldern auf der gesamten Oberfläche des Muskels und der off-line Auswertung wird die Oxygenierung in einem Zeitfenster von weniger als 1min erfasst.

Durch Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes Bisbenzimid können kernmorphologische Differenzen zwischen gesunden und apoptotischen Zellen sichtbar gemacht werden (Eipel et al., 2004). Hierbei wird die für die Apoptose typische Kondensation und Fragmentierung von Zellkernen sichtbar gemacht, wodurch eine quantitative Auswertung der Muskelzellapoptose möglich wird (Westermann et al., 1999).

*Histochemie des EDL-Muskels.* Histomorphologische Untersuchungen dienen der *ex vivo* Beurteilung der Skelettmuskulatur. Neben dem *in vivo* Nachweis apoptotischer Muskelzellen mittels Bisbenzimid führten wir die *ex vivo* Markierung dieser Zellen mittels TUNEL-Methode durch. Bei dieser Methode werden in histologischen Schnittpräparaten DNA-Strangbrüche markiert, wodurch wiederum eine quantitative Auswertung des Apoptosegrades des EDL-Muskels möglich wird (Gujral et al., 2001).

## 6.2 Diskussion der Ergebnisse

### 6.2.1 Modell der chronischen Nervenligatur

Die Ausprägung einer Temperaturdifferenz im Vergleich zur unbehandelten Gegenseite konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden werden. Es zeigte sich zwar eine Differenz der Temperatur, ein signifikanter Unterschied bestand jedoch nicht. Im Gegensatz zu den von Bennet und Xie genannten Werten (Bennet und Xie, 1988) ist der Temperaturunterschied gering, was dadurch erklärt werden könnte, dass die betroffene Extremität sowohl pathologisch erhöhte, als auch erniedrigte Temperatur aufweisen kann. Temperaturanstieg und Ödembildung werden als klinische Zeichen einer lokalen Entzündungsreaktion sowohl bei CRPS des Menschen als auch bei Tiermodellen für neuropathischen Schmerz angesehen (Goris, 1998; Daemen et al., 1998). Es konnte gezeigt werden, dass antidrome Nervenstimulation in einem Modell zur neurogenen Entzündung zu einer Zunahme von Plasma-Extravasation und Ödembildung aufgrund von Substanz P Sezernierung aus peripheren Nervenendigungen führt (Yonehara und Yoshimura, 2001). Nach Nervenläsion konnte erhöhte Plasma-Extravasation nach elektrischer Nervenstimulation mittels Methylprednisolon vermindert werden (Kingery et al., 1999). In der vorliegenden Studie konnte durch die reine Nervenläsion ohne zusätzliche Stimulation eine signifikante Ödembildung beobachtet werden. Die intravitalmikroskopisch erhobenen Daten zur Plasmaextravasation mittels FITC-Dextranfärbung zeigten jedoch keine Ödembildung im Muskelgewebe. Damit übereinstimmend wurde nach Nervenläsion keine Erhöhung des Feucht-/Trockengewicht-Quotienten des Muskelgewebes als Zeichen eines muskulären Ödems beobachtet. Die Ausbildung des Ödems konnte hiermit in Übereinstimmung mit früheren Studien (Kingery et al., 1999; Yonehara und Yoshimura, 2001) als subkutan eingegrenzt werden. Dies passt auch zu der Beobachtung, dass Nervenligatur zu einer ausgeprägten Muskelatrophie und nicht zu einem muskulären Ödem führt (Bennet und Xie, 1988).

Wie auch schon in anderen Studien gezeigt (Attal et al., 1990; Muglani et al., 1996; Yonehara und Yoshimura, 2001), führte die Ligatur des N. ischiadicus im CCI-Modell nach Bennet und Xie (Bennet und Xie, 1988) zur Entwicklung von spontanem Schmerz, von Hyperalgesie und von Allodynie. Dieses Schmerzmuster ist typisch für das Krankheitsbild des CRPS (Baron et al., 2003). Das Kardinalsymptom des CRPS ist der Schmerz, welcher bei ca. 90% der betroffenen Patienten spontan auftritt. Allodynie, sowohl thermisch als auch mechanisch, treten bei ca. 65% der Fälle auf und Hyperalgesien bei ca. 70% (Baron et al., 2003). Somit wird ein wichtiger Aspekt der klinischen Erscheinung des CRPS durch die chronische Nervenligatur wieder gespiegelt. Die milde Ausprägung der Wärme- und



Kälteallodynie und insbesondere der Hyperalgesie lassen sich durch den Zeitpunkt der Untersuchung erklären. So wird in verschiedenen Arbeiten eine Aggravierung des Schmerzsyndroms mit maximaler Ausprägung zwischen dem 3. und 7. Tag (Shir und Seltzer, 1990; Kim und Chung, 1992; Yonehara und Yoshimura, 2001; Miletic et al., 2002) nach Nervenligatur beschrieben. Von einem weiterhin progredienten Verlauf des Schmerzsyndroms nach Ligatur des N. ischiadicus kann also ausgegangen werden. An dieser Stelle muss angemerkt werden, dass in der vorliegenden Studie mit relativ kurzer Nachuntersuchungsperiode ein Zeitraum über die akute Phase der Nervenschädigung hinaus untersucht wurde. In diesem Zeitraum von 4 Tagen konnte bereits eine Entwicklung der Symptome beobachtet werden. Ergebnisse einer Langzeitstudie stehen aber noch aus.

In der vorliegenden Studie liefert die *in vivo* Analyse der muskulären Mikrozirkulation mittels Fluoreszenzmikroskopie eine physiologische funktionelle kapillare Dichte und niedrige NADH-Werte im Gewebe. Dies spricht für eine intakte nutritive Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff (Vollmar et al., 1997; Gradl et al., 2004; Gierer et al., 2005). Als einer der wichtigsten Energieträger im Transfer zwischen dem Citratzyklus und der Atmungskette staut sich NADH bei Hemmung der Atmungskette z.B. durch Sauerstoffmangel im Gewebe an (Vollmar et al., 1997). Erhöhte NADH Werte im Muskelgewebe konnten weder nach Nervenligatur noch bei den Kontrolltieren beobachtet werden, so dass eine Beeinträchtigung der Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff durch die Ligatur des N. ischiadicus ausgeschlossen werden kann.

Durch *in vivo* Analyse der Leukozyten-Endothelzellinteraktion konnte in der vorliegenden Studie eindeutig gezeigt werden, dass die chronische lose Ligatur eines peripheren Nerven nicht zur Entwicklung einer Entzündungsreaktion im innervierten Muskel führt. Die Anzahl am Gefäßendothel entlang rollender oder fest anhaftender Leukozyten unterschied sich nicht zwischen Tieren mit Nervenligatur und den Kontrolltieren. In einer Laser Doppler gestützten Studie am CCI-Modell von Daemen et al. werden kutane Hyperperfusion und ein erhöhter Myeloperoxidase-Gehalt des Gewebes in Folge von Neuropeptidausschüttung als Zeichen einer neurogenen Entzündung angesehen. In dieser Studie wurde mittels Bestimmung des Myeloperoxidase-Gehalts eine muskuläre Leukozytenkumulation als Folge der Nervenligatur nachgewiesen (Daemen et al., 1998). Die direkt erhobenen Daten der *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie der vorliegenden Studie widersprechen dieser Beobachtung. Da eine erhöhte Leukozyten-Endothelzellinteraktion den ersten Schritt einer leukozytären Gewebeinfiltration darstellt, kann eine Kumulation von Entzündungszellen im Gewebe nicht angenommen werden. Eine entzündliche Genese des CRPS wurde bereits von Sudeck diskutiert (Sudeck, 1904; Sudeck 1942) und von anderen Autoren immer wieder aufgegriffen (Heerschap et al., 1993; Goris, 1998). Insbesondere in klinischen Studien an Erkrankten konnte in den letzten Jahren eine entzündliche

Komponente beim CRPS nachgewiesen werden (Goris, 1998; van der Laan et al., 1998b; Oyen et al., 1993; Birklein et al., 2000b). In der vorliegenden Arbeit konnte also eindeutig nachgewiesen werden, dass das CCI-Modell in dieser Hinsicht nicht dem Erkrankungsbild CRPS des Menschen gerecht wird.

Als weiteres Ergebnis der vorliegenden Studie konnte erstmals das Auftreten von Muskelzellapoptose nach Nervenläsion gezeigt werden. Sowohl mittels Bisbenzimid-Färbung zur intravitalmikroskopischen Darstellung, TUNEL-Histochemie und Western-Blot Proteinanalytik konnte eine signifikante Zunahme der Muskelzellapoptose gegenüber den Kontrolltieren nachgewiesen werden. Beim Menschen wurden apoptotische Muskelzellen als Folge beeinträchtigter Muskelinnervation mittels TUNEL-Färbung von DNA-Strangbrüchen bei Patienten mit Polyneuropathie beobachtet (Tews et al., 1997). Da Gewebebiopsien bei CRPS Patienten wegen der Gefahr der Aggravierung des Krankheitsbildes obsolet sind, liegen keine Daten zu Muskelzellapoptose bei CRPS vor. Im Rahmen von Amyotrophischer Lateralsklerose und Polyneuropathie (Tews et al., 1997) und bei Spinaler Muskelatrophie (Migheli et al., 1997) wurde Muskelzellapoptose als Folge der Muskeldenervation bei Motoneuron-Schädigung anhand histochemischer TUNEL-Untersuchungen nachgewiesen. Auch in Tierexperimenten zur Muskeldenervation konnte anhand TUNEL-Analyse vermehrte DNA-Fragmentation als Zeichen der erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen nachgewiesen werden (Yoshimura und Harii, 1999). Der Nachweis von muskulärer Apoptose im CCI-Modell mit nur eingeschränkter und nicht komplett aufgehobener Innervation ist eine wichtige Erkenntnis der vorliegenden Studie. Zu erwähnen ist weiterhin, dass die beobachtete Myozytenapoptose nicht mit einer lokalen Entzündungsreaktion einherging. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen von Roos und Mitarbeitern überein, die zeigten, dass die Phagozytose apoptotischer Zellen ein nicht entzündlicher Prozess mit aktiver Unterdrückung pro-inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen ist (Roos et al., 2004). Die Phagozytose nekrotischer Zellen führt hingegen zu einem pro-inflammatorischen Zytokinprofil im Gewebe.

Die muskuläre Zellapoptose wurde in einem zweiten Versuchsabschnitt mittels intravenöser Gabe des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk vollständig unterdrückt. Z-VAD-fmk ist eine nicht ZNS gängige Substanz (Wiessner et al., 2000; Yang et al., 2004) die entsprechend systemisch appliziert keinen Einfluss auf zentralnervöse Apoptose hat. Scholz und Mitarbeiter beschreiben, dass die zentrale Applikation von z-VAD-fmk bei peripherer Nervenläsion im Tiermodell zu einer verminderten Ausprägung des neuropathischen Schmerzsyndroms führt (Scholz et al., 2005). Dieser Effekt wird auf die verminderte Apoptoserate von Hinterhornneuronen zurückgeführt. Um die Rolle von apoptotischen Muskelzellen bei der Entwicklung des Schmerzsyndroms im CCI-Modell zu beschreiben, wurde z-VAD-fmk in der vorliegenden Studie intravenös verabreicht und somit ein protektiver

Effekt auf Hinterhornneurone ausgeschlossen. Auch die systemische Applikation ohne zentralnervöse Wirkung des Pan-Caspase-Inhibitors z-VAD-fmk führte zu einem signifikant abgeschwächten Schmerzsyndrom nach Ligatur des N. ischiadicus. Sowohl die thermische Allodynie, als auch der Spontanschmerz und die mechanische Hyperalgesie treten bei verminderter myozytärer Apoptoserate in abgeschwächter Form auf. Es konnte also nachgewiesen werden, dass die Hemmung von Apoptose im pathologisch innervierten Muskel zu einer signifikanten Milderung der Schmerzsymptomatik führt und dass somit apoptotische Myozyten ursächlich an der Entstehung von Schmerz im CCI-Modell beteiligt sind.

### 6.2.2 Modell der chronischen Substanz P Applikation

An Tag 1 konnte klinisch ein deutlich ausgeprägtes Ödem nach Gabe von Substanz P beobachtet werden. Durch die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren, z.B. IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  führt Substanz P zu Vasodilatation und Ödembildung (Lotz et al., 1988; O'Connor et al., 2004). Auch in anderen Arbeiten wurde ein Zusammenhang zwischen der Freisetzung von Substanz P aus peripheren Endigungen afferenter Nervenfasern und Ödembildung bzw. Proteinextravasation gefunden. Das in der vorliegenden Arbeit beobachtete Ödem war an Tag 4 noch zu beobachten, zeigte aber zu diesem Zeitpunkt keine Signifikanz gegenüber den Werten der Kontrolltiere. Dies zeigt eine Parallele mit den Ergebnissen von Yonehara und Yoshimura (2001), die eine verminderte Plasmaextravasation bei chronisch erhöhter basaler Ausschüttung von Substanz P nachweisen konnten. In ihrer Studie wurde Capsaicin zur Induktion eines Substanz P vermittelten Ödems verwendet. Mittels Mikrodialyse wurde im Subkutangewebe der Pfote einerseits die Substanz P Konzentration gemessen. Gleichzeitig wurde die Extravasation von Evans blau-Farbstoff und somit das subkutane Ödem quantifiziert. Tiere zeigten nach chronischer Nervenläsion im Vergleich zu gesunden Tieren ohne Nervenläsion eine erhöhte Basalausschüttung von Substanz P. Dies ging einher mit einem verminderten Anstieg der Plasmaextravasation nach Capsaicinapplikation in der Gruppe mit Nervenläsion trotz vergleichbar hoher Substanz P Ausschüttung in beiden Gruppen zu diesem Zeitpunkt. Yonehara und Yoshimura folgern aus diesen Ergebnissen, dass die chronisch erhöhte Basalausschüttung von Substanz P zu einer Desensibilisierung des Gewebes gegenüber Substanz P führt. Auch in der vorliegenden Studie konnte ein Rückgang des subkutanen Ödems gezeigt werden. Die Untersuchungen des Flüssigkeitsgehalts des Musculus tibialis anterior ergaben, dass das Muskelgewebe der Extremität nach Substanz P Behandlung nicht ödematös verändert war. Mittels *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass es im Muskelgewebe nach Substanz P Applikation nicht zur Ausprägung von makromolekularer Leakage kommt. Obwohl sich die

intravitalmikroskopische Untersuchung des subkutanen Fettgewebes als nicht repräsentativ herausstellte, kann im Zusammenschluss der Ergebnisse der klinischen Tests, der Analyse des Verhältnisses Feucht-/Trockengewichts der Muskulatur und der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie gesagt werden, dass das beobachtete Extremitätenödem nach Substanz P Gabe im subkutanen Fettgewebe und nicht in der Muskulatur lokalisiert zu sein scheint. Diese Ergebnisse passen zu den von Gilligan und Mitarbeitern gefundenen Daten, dass die intrakutane Applikation von Substanz P zu subkutaner Ödembildung führt (Gilligan et al., 1994). In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass ein Caragen induziertes Ödem durch Substanz P Gabe aggraviert wurde. An CRPS Patienten durchgeführte Untersuchungen, bei denen Substanz P subkutan appliziert wurde, zeigte sich eine im Vergleich zu Kontrollprobanden erhöhte Plasmaextravasation (Leis et al., 2003). Die subkutane Lokalisation des Ödems, die in nicht invasiven Studien nur postuliert werden kann, wurde durch die vorliegende Untersuchung in Übereinstimmung mit früheren Ergebnissen (Yonehara und Yoshimura, 2001) bestätigt.

Eine lokale Temperaturerhöhung konnte an den betroffenen Pfoten der Tiere nach Substanz P Gabe nicht beobachtet werden. Als Erklärung hierfür könnte die Tatsache dienen, dass es beim CRPS sowohl zu abnorm überwärmten Extremitäten, als auch zu Unterkühlung der betroffenen Extremität kommen kann (Baron et al., 2003).

Die neurophysiologischen Testungen im Verlauf der Untersuchungen konnten eindeutig zeigen, dass die 24-stündige Infusion von Substanz P in die A. femoralis zu einem lang anhaltenden Schmerzsyndrom führte. Eine Schmerzexacerbation durch Substanz P nach Nervenläsion konnte bereits von Meert et al. nachgewiesen werden (Meert et al., 2003). Bisher war jedoch unklar, ob Substanz P in gesundem Gewebe per se einen Spontanschmerz auslöst (Herbert und Holzer, 2002), Somit konnte mit der vorliegenden Untersuchung die Aussage von Herbert und Holzer, dass eine Substanz P vermittelte neurogene Inflammation *per se* nicht zu Schmerzen führe (Herbert und Holzer, 2002), klar widerlegt werden. Substanz P wird in Spinalganglien afferenter Nerven synthetisiert und mittels axonalen Transportes prodrom nach zentral transportiert, um sich dort als Kotransmitter an der Schmerzweiterleitung zu beteiligen (Herbert und Holzer, 2002). Brimijoin et al. fanden, dass der überwiegende Teil der synthetisierten Substanz P antidrom über die afferenten Fasern der nozizeptiven Nerven in peripheres Gewebe transportiert wird (Brimijoin et al., 1980). Die detaillierten Analysen des Schmerzverhaltens in der vorliegenden Studie zeigten die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie, ausgelöst ausschliesslich durch die periphere Applikation von Substanz P in zuvor gesundes Gewebe. Die Testung mit von Frey-Filamenten unterschiedlicher Stärke erlaubte die Differenzierung zwischen mechanischer Hyperalgesie und Allodynie. Mechanische Reize, die bei Kontrolltieren nicht schmerzhaft waren, führten auch nach Substanz P Gabe nicht zu einer positiven

Schmerzreaktion. Somit konnte eine Allodynie nicht festgestellt werden. Hingegen kam es als Zeichen der Hyperalgesie zu einer Senkung der Schmerzschwelle bei mechanischen Reizen, die auch von Kontrolltieren als schmerzhaft empfunden wurden. Tests mit Temperaturreizen ermöglichten keine Differenzierung zwischen den Gruppen. Diese Aussage deckt sich mit den Ergebnissen von Jang und Mitarbeitern, die beobachten konnten, dass die Gabe eines NK 1-Rezeptorantagonisten vor spinaler Nervenläsion zur verzögerten Ausbildung der typischen mechanischen Hyperalgesie führt (Jang et al., 2004). Mit dem Nachweis erhöhter Substanz P-Konzentrationen im lumbalen Rückenmark nach Schädigung des N. ischiadicus zeigten Vachon et al. die Beteiligung der Substanz an der mechanischen Hyperalgesie (Vachon et al., 2004). Als Neurotransmitter ist Substanz P bei Schmerzsyndromen im ZNS erhöht (Duggan et al., 1987). Intrathekale Applikation des Substanz P Antagonisten LY 303870 führt zu verminderter mechanischer Hyperalgesie in Ratten (Kingery et al., 2003). Ein hyperalgesierender Effekt von Substanz P wurde durch intrathekale Applikation des Neurotransmitters erreicht (Hua et al., 1999; Birklein et al., 2001). Nach Brimijoin et al. werden bis zu 90% der im Spinalganglion synthetisierten Substanz P axonal antidrom in das Innervationsgebiet des Nerven transportiert und dort in das Gewebe abgegeben (Brimijoin et al., 1980). Ein Nachweis von erhöhter Substanz P Konzentration auf spinaler Ebene lässt indirekt also darauf schließen, dass auch die Sezernierung im Innervationsgebiet des Nerven erhöht ist. Neben zentraler Beteiligung an der Schmerzübertragung wird Substanz P im peripheren Gewebe eine Schmerzverstärkende Wirkung zugesprochen. So zeigten Meert et al. (2003), dass intraplantare Applikation von Substanz P zu einer Verstärkung eines durch Nervenläsion ausgelösten Schmerzsyndroms führte. 2004 zeigten Jang und Mitarbeiter, dass die Entwicklung eines Schmerzsyndroms aufgrund rückenmarksnaher Spinalnervenläsion durch die Gabe eines Substanz P Antagonisten verzögert werden kann, wenn der Antagonist vor Setzen der Läsion appliziert wird. Unmittelbar nach Nervenschädigung zeigte sich keine solche Verzögerung. Im Gegensatz dazu konnte in der gleichen Untersuchung gezeigt werden, dass die Antagonisierung des Neuropeptids „calcitonin-gene-related factor“ (CGRP) sowohl vor als auch nach Nervenschädigung eine Verzögerung des Schmerzsyndroms bewirken kann. Substanz P ist also in der Induktionsphase entscheidend an der Entstehung des Schmerzsyndroms beteiligt, andere Neuropeptide ausserdem an der Aufrechterhaltung (Jang et al., 2004). Wie bei der Entwicklung des Ödems scheint also auch bei der Ausprägung des Substanz P vermittelten bzw. verstärkten Schmerzsyndroms die initiale Phase entscheidend zu sein. So vermuten Jang et al. eine Triggerfunktion der Substanz P bei der Entstehung von neuropathischem Schmerz. Scardina und Mitarbeiter bezeichnen Substanz P als Neuromodulator neurogener Entzündungen (Scardina et al., 2004). Im Einklang mit aktueller Literatur konnte in der aktuellen Studie nachgewiesen werden, dass

die 24-stündige Perfusion primär ungeschädigten Gewebes mit Substanz P zur Entwicklung eines lang anhaltenden Schmerzsyndroms mit mechanischer Hyperalgesie führt, wie sie auch bei CRPS Patienten gefunden wird, allerdings ohne die Ausprägung einer thermischen Komponente. Entscheidend ist hierbei, dass das Schmerzsyndrom durch die alleinige periphere Gabe des Neurotransmitters nicht nur ausgelöst werden konnte, sondern die Triggerfunktion von Substanz P durch die Persistenz dieses Schmerzsyndroms über 3 Tage nach Beendigung der 24-stündigen Substanz P Applikation nachgewiesen werden konnte.

Die Analyse der muskulären Mikrozirkulation mittels *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie zeigte keine Veränderungen der kapillaren Perfusion oder der nutritiven Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff nach der Gabe von Substanz P. Somit konnte gezeigt werden, dass Substanz P zu keiner Beeinflussung der Perfusion des Muskels führt.

Im Gegensatz dazu wurde intravitalmikroskopisch nachgewiesen, dass es durch Gabe von Substanz P zur Ausprägung einer deutlichen und anhaltenden Entzündungsreaktion im Muskelgewebe kommt. Bereits 1993 wurde postuliert, dass Substanz P unter den Neuropeptiden wahrscheinlich der potenteste Auslöser neurogener Entzündungen ist (Otsuka und Yoshinaka). Wie auch bei Patienten mit CRPS war im Blutbild der Tiere der vorliegenden Studie aber kein systemischer Anstieg der Leukozyten zu beobachten. Tierversuche konnten zeigen, dass Substanz P hingegen an lokalen Entzündungsreaktionen beteiligt ist. Freigegeben in das Gewebe führt Substanz P zur lokalen Ausschüttung von Entzündungsmediatoren, wie Zytokinen, Sauerstoffradikalen, Arachidonsäurederivaten und Histamin (O'Connor et al., 2004). Black beschreibt eine Aktivierung von Mastzellen und anderen Entzündungszellen durch Substanz P (Black, 2002). Außerdem bewirkt Substanz P durch Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen eine Leukozytenakkumulation (Smith et al., 1993). In der vorliegenden Studie konnte ein massiver Anstieg der Leukozyten-Endothelzellinteraktion im betroffenen Muskelgewebe nachgewiesen werden. Dies passt zu Voruntersuchungen, in denen gezeigt werden konnte, dass Substanz P die Expression von Endothel-Leukozyten Adhäsionsmolekül-1 (ELAM 1) an mikrovaskulärem Endothel erhöht (Matis et al., 1990; Smith et al., 1993). Desweiteren vermittelt Substanz P eine vermehrte Lymphozyten-Proliferation und Immunglobulin-Produktion (Stanisz et al., 1986; Lotz et al., 1988) und hat einen antiapoptotischen Effekt auf Entzündungszellen, wie z.B. Makrophagen, Neutrophile und Thymozyten (De Fea et al., 2000; Dimri et al., 2000; Böckmann et al., 2001). Neben seinem Ursprung aus Nervenendigungen wird Substanz P auch aus Entzündungszellen, z.B. Makrophagen freigegeben (Weinstock et al., 1988; Bost et al., 1992). Aus Nerven ins periphere Gewebe abgegebene Substanz P führt also zu Akkumulation von Leukozyten, die ihrerseits wiederum Substanz P auszuschütten. Beim sogenannten Axonreflex löst Histamin aus mittels Substanz P aktivierten Mastzellen einen prodromen Nervimpuls aus, der

wiederum antidrom zur Ausschüttung von Substanz P führt. (Black et al., 2002). Substanz P führt also einerseits zu lokalen Entzündungsreaktionen im Gewebe, andererseits über Histamin induzierte Nervenreizung und aktivierte Entzündungszellen wiederum zu einer erhöhten Ausschüttung von Substanz P. Diese aufgeführten Eigenschaften von Substanz P legen die Vermutung einer entscheidenden Beteiligung an prolongierten, überschüssenden Entzündungsreaktionen, wie beim CRPS vermutet, nahe.

Die Analyse muskulärer Zellapoptose zeigte keinen vermehrten Zelltod nach Infusion von Substanz P. Weder intravitalmikroskopisch noch mittels Histochemie oder Westernblot Proteinanalyse konnten Zeichen einer erhöhten Apoptoserate beobachtet werden. In verschiedenen Studien wurde apoptoseinduzierendes Potential von Substanz P gefunden (Del Rio et al., 2001; Bang et al., 2003), in anderen Studien hingegen wurde ein antiapoptotischer Effekt von Substanz P auf Entzündungs- bzw. Nerven- sowie Mukosazellen nachgewiesen (De Fea et al., 2000; Dimri et al., 2000; Böckmann et al., 2001; Lallemand et al., 2003; Koon et al., 2007). In der vorliegenden Studie konnte ein apoptotischer Effekt auf Muskelzellen ausgeschlossen werden.

Perianin et al. kamen zu dem Schluss, dass Leukozyten durch den Einfluss von Substanz P für den Einfluss anderer Entzündungsmediatoren sensibilisiert werden (Perianin et al., 1989). Diese Interpretation der sensibilisierenden Wirkung von Substanz P taucht immer wieder in der Auswertung von Studienergebnissen auf. Weber et al. konnten 2001 nachweisen, dass die periphere Substanz P-Ausschüttung im entzündeten Bereich bei Patienten mit CRPS erhöht war. Somit zeigte sich bei diesen Patienten eine erhöhte Bereitschaft, eine neurogene Entzündung zu entwickeln. Diese Beobachtung wird durch die Ergebnisse von Legat et al. (2002) gestützt, welche die Verschärfung einer neurogenen Entzündung durch UV-Licht induzierte periphere Substanz P-Freisetzung zeigten. In Hamstern führte nach CCI die intradermale Applikation von Substanz P in die betroffene Pfote zu Aggravierung der Schmerzsymptomatik. Dieser Effekt wurde erreicht mit Dosierungen, die in nicht operierten Kontrolltieren keinerlei Auswirkung zeigten (Meert et al., 2003). Gilligan et al. (1994) konnten durch Substanz P-Injektion ein Caragen-bedingtes Ödem aggravieren. Diese Beobachtungen sprechen für eine Sensibilisierung durch periphere Substanz P Freisetzung. Birklein et al. (2001) konnten die Freisetzung von Substanz P aus peripheren Nervenendigungen von nozizeptiven C-Fasern nachweisen, nachdem diese gereizt worden waren. In einer Untersuchung zum CCI-Modell an der Ratte konnten Jang et al. zeigen, dass es im Zuge der Nervenligatur durch die Antagonisierung von Substanz P mit einem Neurokinin-1-Blocker zu einer verminderten Schmerzentwicklung kommt (2004). In der gleichen Studie kommen Jang et al. aufgrund der unterschiedlichen hohen Ausprägung der Antagonisierbarkeit zu verschiedenen Zeitpunkten zu der Annahme, dass Substanz P bei der Entwicklung des neuropathischen Schmerzes die Rolle eines

Triggers übernimmt, während andere Neurokinine am weiteren Erhalt des Schmerzes beteiligt sind. Die Theorie, dass Substanz P bei der Entstehung einer neurogenen Entzündung einen Triggereffekt bewirkt, wird auch von Scardina geäußert (2004). Diese Annahme konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden, da eine 24-stündige Applikation zu einem andauernden Schmerzsyndrom mit lokaler Entzündungsreaktion über 4 Tage führte. Eine Beobachtung über einen nochmals längeren Zeitraum ist anzustreben, um die Triggerrolle der Substanz P in diesem Modell weiter zu belegen.

### 6.3 Schlussfolgerung

Im Zusammenschluss kann gesagt werden, dass die beiden in der vorliegenden Studie untersuchten Modelle zu Pathomechanismen des CRPS im Tierversuch einerseits sich überschneidende, aber auch unterschiedliche Aspekte des Krankheitsbildes widerspiegeln. In beiden Modellen zeigte sich in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur (Gilligan et al., 1994; Kingery et al., 1999; Yonehara und Yoshimura, 2001; Leis et al., 2003) die Entwicklung eines subkutanen Ödems. Das durch Nervenläsion hervorgerufene Schmerzsyndrom kommt dem klinischen Schmerzsyndrom bei CRPS Patienten aufgrund der vorliegenden thermischen und mechanischen Allodynie, sowie des zeitlichen Verlaufs mit Progression über 4 Tage sehr nah (Baron et al., 2003). Als ursächlich an der Entstehung dieses Schmerzsyndroms konnte erstmalig das Vorkommen von Muskelzellapoptose nachgewiesen werden. Auch durch die Applikation von Substanz P konnte ein Schmerzsyndrom ausgelöst werden. Allerdings trat ausschliesslich mechanische Hypersensibilität auf, die CRPS typische thermische Allodynie konnte nicht nachgewiesen werden. Die entzündliche Komponente des CRPS, die immer wieder betont wird (Sudeck, 1902; Heerschap et al., 1993; Oyen et al., 1993; Goris, 1998; van der Laan et al., 1998a; Birklein et al., 2000b), ist im CCI-Modell hingegen nicht zu beobachten. Diese zeigt sich jedoch deutlich ausgeprägt nach Substanz P Applikation. Hierbei ist bedeutend zu erwähnen, dass auch an Tag 4 nach Beginn der 24-stündigen intraarteriellen Gabe von Substanz P eine lokale Entzündungsreaktion zu beobachten ist.

Die in dieser Studie verwendeten Modellansätze zeigen isoliert zum einen die direkten Folgen einer chronischer Nervenläsion, zum anderen die direkten Folgen einer chronischen Substanz P Applikation. Es ist also wichtig zu betonen, dass beide in der vorliegenden Untersuchung vorgestellten Tiermodelle kein vollwertiges CRPS mit allen seinen klinischen Teilaspekten auslösen können. Chronische Nervenläsion wie auch chronische Substanz P Applikation provozieren Teilaspekte des „complex regional pain syndrome“. Einzelne Teilaspekte des CRPS zeigten sich bei beiden Modellen. Daher wird durch den Vergleich der Modelle eine gewisse Zuordnung klinischer Aspekte zu deren



Auslöser möglich. So kann man sagen, dass eine Nervenläsion per se zu keiner neurogenen Entzündung führt. Bekannt ist, dass Nervenläsionen zu erhöhter Substanz P Sensibilität im vom geschädigten Nerven versorgten Gewebe führt (Herbert und Holzer, 2002; Meert et al., 2003). Die beschriebenen Mechanismen, über die Substanz P zu neurogener Entzündung und insbesondere deren Prolongation führen können, lassen vermuten, dass beim CRPS eine pathologische Antwort auf eine Nervenläsion des Organismus im Sinne einer erhöhten Ausschüttung oder eines verminderten Abbaus von Substanz P und/oder einer erhöhten Sensibilität auf Substanz P vorliegt. Sudeck's These einer „entgleisten Heilentzündung“ (Sudeck, 1902) findet somit hier eine erneute Bestätigung. Die Rolle von Substanz P als initialer Trigger von neurogenen Entzündungen (Jang et al., 2004; Scardina et al., 2004) wird in der vorliegenden Studie aufgrund des langanhaltenden Verlaufs sowohl des Schmerzsyndroms als auch der Entzündungsreaktion über 4 Tage, also auch 3 Tage nach Beendigung der Substanz P Applikation, bestätigt.

### 6.4 Klinische Perspektiven

Der antiinflammative Ansatz der CRPS Therapie wird durch die vorliegende Studie bestätigt. Der Einsatz von Kortikosteroiden führt zu einer direkten Verminderung der entzündlichen Antwort. Desweiteren kann die Verminderung von Substanz P Ausschüttung aus Entzündungszellen postuliert werden. Somit ist eine entzündungshemmende Therapie nicht als ausschließlich symptomatisch anzusehen, sondern trägt wahrscheinlich zur Unterbrechung eines sich selbst erhaltenden „Circulus vitiosus“ bei.

Der Einsatz von NK-1 Rezeptorantagonisten zur spezifischen Blockade der Substanz P Aktivität führte bisher nicht zu den erhofften Ergebnissen in der Therapie chronischer Schmerzsyndrome (Herbert und Holzer, 2002). Die erwartete analgetische Wirkung dieser Stoffklasse, in Tierexperimenten erfolgreich nachgewiesen, konnte am Menschen nicht reproduziert werden. Als Erklärungsansatz führen Herbert und Holzer auf, dass bei chronischen Schmerzzuständen ein zentraler Sensibilisierungsprozess stattgefunden hat, bei dem auch andere Transmitter, wie Glutamat, eine wichtige Rolle spielen (Herbert und Holzer, 2002). Herbert und Holzer verweisen auf Studien, die an Patienten mit lang bestehenden neuropathischen Schmerzen durchgeführt wurden (Block, 1998; Goldstein et al., 2000). Der Blickpunkt bei Studien zu chronischen Schmerzsyndromen wird in erster Linie auf die zentralnervöse Rolle von Substanz P gelenkt. Nach den vorliegenden Ergebnissen ist eine Wirkung von NK-1 Rezeptorantagonisten im peripheren Gewebe eher Erfolg versprechend. Hierbei wäre eine Rezeptorblockade in der Frühphase des CRPS wichtig, um einen Triggereffekt von Substanz P (Jang et al., 2004; Scardina et al., 2004) mit Hochregulation der Substanz P- und NK-1 Rezeptor Synthese (Herbert und

Holzer, 2002) zu unterbinden. Die durch Substanz P hervorgerufene Sensibilisierung von peripheren Nervenendigungen konnte bereits in Versuchen zu akuter Arthritis mittels NK1-Rezeptor Antagonisten erfolgreich reduziert werden (Pawlak et al., 2001). In einem weiteren Akutschmerzmodell konnte an Ratten eine postoperative Hypersensitivität in der Umgebung von Operationswunden mit einem NK-1 Rezeptorantagonist gemindert werden (Gonzales et al., 1998). Jang et al. konnten nach Nervenläsion die Ausprägung einer Hyperalgesie durch frühzeitige Applikation eines NK-1 Rezeptorblockers verzögern (Jang et al., 2004). Am Menschen wurde die Wirkung von NK-1 Rezeptorantagonisten bei akuten und chronischen Schmerzzuständen untersucht. Es zeigte sich, dass sich keine analgetische Wirkung bei chronischen Krankheitsbildern erzielen lässt (Block, 1998; Goldstein et al., 2000). Bei einer Studie an Patienten mit Schmerzen nach Zahnextraktion hingegen konnte eine analgetische Wirkung des NK-1 Antagonisten CP 99994 bei Akutschmerz nachgewiesen werden (Dionne et al., 1998). Das analgetische Potential von NK-1 Rezeptorantagonisten sollte daher überdacht werden und untersucht werden, ob eine frühzeitige Gabe von Substanz P Antagonisten bei CRPS Patienten zu einer verminderten Ausprägung des Krankheitsbild führt.

## 7 Literatur

1. *Anetzberger H, Thein E, Becker M, et al.*, Microspheres accurately predict regional bone blood flow. *Clin Orthop Relat Res*, 2004, 424 p253-65
2. *Atkins RM, Duckworth T, Kanis JA*, Features of algodystrophy after Colles' fracture. *J Bone Joint Surg Br*, 1990, 72(1) p105-10
3. *Atkins RM*, Complex regional pain syndrome. *J Bone Joint Surg Br*, 2003, 85(8) p1100-6
4. *Attal N, Jazat F, Kayser V, et al.*, Further evidence for 'pain-related' behaviours in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. *Pain*, 1990, 41(2) p235-51
5. *Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, et al.*, Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp*, 1995, 15(2) p85-91
6. *Badhwar A, Dungey AA, Harris KA, et al.*, Limitations of ischemic tolerance in oxidative skeletal muscle: perfusion vs tissue protection. *J Surg Res*, 2003, 109(1) p62-7
7. *Badhwar A, Bihari A, Dungey AA, et al.*, Protective mechanisms during ischemic tolerance in skeletal muscle. *Free Radic Biol Med*, 2004, 36(3) p371-9
8. *Baron R, Levine JD, Fields HL*, Causalgia and reflex sympathetic dystrophy: does the sympathetic nervous system contribute to the generation of pain? *Muscle Nerve*, 1999, 22(6) p678-95
9. *Baron R, Wasner G*, Complex regional pain syndromes. *Curr Pain Headache Rep*, 2001, 5(2) p114-23
10. *Baron R, Schattschneider J, Binder A, et al.*, Relation between sympathetic vasoconstrictor activity and pain and hyperalgesia in complex regional pain syndromes: a case-control study. *Lancet*, 2002, 359(9318) p1655-60
11. *Baron R, Binder A, Ulrich W, et al.*, [Complex regional pain syndrome. Sympathetic reflex dystrophy and causalgia], *Schmerz*, 2003, 17(3) p213-26
12. *Bauman NM, Wang D, Luschei ES, et al.*, Effect of substance P injection into the nucleus tractus solitarius of rats on cricothyroid and thyroarytenoid motor activity and cardiovascular and respiratory systems. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2002, 111(10) p875-83
13. *Bennett GJ, Xie YK*, A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*, 1988, 33(1) p87-107
14. *Bickerstaff DR, Kanis JA*, Algodystrophy: an under-recognized complication of minor trauma. *Br J Rheumatol*, 1994, 33(3) p240-8

15. *Binzoni T, Leung TS, Boggett D, et al.*, Non-invasive laser Doppler perfusion measurements of large tissue volumes and human skeletal muscle blood RMS velocity. *Phys Med Biol*, 2003, 48(15) p2527-49
16. *Birklein F, Riedl B, Sieweke N, et al.*, Neurological findings in complex regional pain syndromes-analysis of 145 cases. *Acta Neurol Scand*, 2000a, 101(4) p262-9
17. *Birklein F, Weber M, Neundorfer B*, Increased skin lactate in complex regional pain syndrome: evidence for tissue hypoxia? *Neurology*, 2000b, 55(8) p1213-5
18. *Birklein F, Schmelz M, Schiffer S, et al.*, The important role of neuropeptides in complex regional pain syndrome. *Neurology*, 2001, 57(12) p2179-84
19. *Birklein F*, Complex regional pain syndrome. *J Neurol*, 2005, 252(2) p131-8
20. *Bizat N, Galas MC, Jacquard C, et al.*, Neuroprotective effect of zVAD against the neurotoxin 3-nitropropionic acid involves inhibition of calpain. *Neuropharmacology*, 2005, 49(5) p695-702
21. *Black PH*, Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun*, 2002, 16(6) p622-53
22. *Blair SJ, Chinthagada M, Hoppenstehdt D, et al.*, Role of neuropeptides in pathogenesis of reflex sympathetic dystrophy. *Acta Orthop Belg*, 1998, 64(4) p448-51
23. *Block GA*, The substance p receptor antagonist L-754030 (MK-0869) is ineffective in the treatment of postherpetic neuralgia. *Neurology*, 1998, 50: A225
24. *Blumberg H, Griesser HJ, Hornyak M*, [Neurologic aspects of clinical manifestations, pathophysiology and therapy of reflex sympathetic dystrophy (causalgia, Sudeck's disease)], *Nervenarzt*, 1991, 62(4) p205-11
25. *Blumberg H, Hoffmann U*, [Diagnosis of sympathetic reflex dystrophy. Comparison of ischemia test and modified guanethidine blockade], *Nervenarzt*, 1994, 65(6) p370-4
26. *Blumberg H, Hoffmann U, Mohadjer M, et al.*, Clinical phenomenology and mechanisms of reflex sympathetic dystrophy: emphasis on edema. IASP Press, Proceedings of the 7<sup>th</sup> World Congress in Pain. Research and Management, 1994, vol. 2, pp. 455-481
27. *Bockmann S, Seep J, Jonas L*, Delay of neutrophil apoptosis by the neuropeptide substance P: involvement of caspase cascade. *Peptides*, 2001, 22(4) p661-70
28. *Bost KL, Breeding SA, Pascual DW*, Modulation of the mRNAs encoding substance P and its receptor in rat macrophages by LPS. *Reg Immunol*, 1992, 4(2) p105-12
29. *Brimijoin S, Lundberg JM, Brodin E, et al.*, Axonal transport of substance P in the vagus and sciatic nerves of the guinea pig. *Brain Res*, 1980, 191(2) p443-57

30. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, et al., Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. *Apoptosis*, 2003, 8(4) p345-52
31. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, et al., Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 1994, 53(1) p55-63
32. Choi Y, Yoon YW, Na HS, et al., Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 1994, 59(3) p369-76
33. Clark AD, Barrett EJ, Rattigan S, et al., Insulin stimulates laser Doppler signal by rat muscle in vivo, consistent with nutritive flow recruitment. *Clin Sci*, 2001, 100(3) p283-90
34. Coderre TJ, Xanthos DN, Francis L, et al., Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain*, 2004, 112(1-2) p94-105
35. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, et al., The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol*, 2004, 201(2) p167-80
36. Craft RM, Leiti MD, Potentiation of morphine antinociception by pentobarbital in female vs. male rats. *Pain*, 2006, 121(1-2) p115-25
37. Daemen MA, Kurvers HA, Kitslaar PJ, et al., Neurogenic inflammation in an animal model of neuropathic pain. *Neurol Res*, 1998, 20(1) p41-5
38. Damon DH, Duling BR, Are physiological changes in capillary tube hematocrit related to alterations in capillary perfusion heterogeneity? *Int J Microcirc Clin Exp*, 1987, 6(4) p309-19
39. Dertwinkel R, Tryba M, Zenz M, Sympathische Reflexdystrophie, Stumpf- und Phantomschmerz. *Dt Ärzteblatt*, 1994, 91 p1275-1282
40. Dertwinkel R, Strumpf M, Zenz M, [Sympathetic reflex dystrophy and phantom pain. Diagnosis, therapy and prognosis], *Z Arztl Fortbild Qualitatssich*, 1998, 92(1) p35-40
41. Dietrich HH, Tyml K, Microvascular flow response to localized application of norepinephrine on capillaries in rat and frog skeletal muscle. *Microvasc Res*, 1992, 43(1) p73-86
42. Dimri R, Sharabi Y, Shoham J, Specific inhibition of glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis by substance P. *J Immunol*, 2000, 164(5) p2479-86
43. Dionne RA, Max MB, Gordon SM, et al., The substance P receptor antagonist CP-99,994 reduces acute postoperative pain. *Clin Pharmacol Ther*, 1998, 64(5) p562-8
44. Duggan AW, Morton CR, Zhao ZQ, et al., Noxious heating of the skin releases immunoreactive substance P in the substantia gelatinosa of the cat: a study with antibody microprobes. *Brain Res*, 1987, 403(2) p345-9

45. *Eipel C, Bordel R, Nickels RM, et al.*, Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286(5) pG769-76
46. *Evans JA*, Reflex sympathetic dystrophy, report on 57 cases. *Ann Int Med*, 1947, 26 p417-426
47. *De Fea KA, Vaughn ZD, O'Bryan EM, et al.*, The proliferative and antiapoptotic effects of substance P are facilitated by formation of a beta -arrestin-dependent scaffolding complex. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(20) p11086-91
48. *Field J, Warwick D, Bannister GC*, Features of algodystrophy ten years after Colles' fracture. *J Hand Surg [Br]*, 1992, 17(3) p318-20
49. *Gaus S, Moriwaki K, Suyama H, et al.*, Capsaicin treatment inhibits osteopenia and heat hyperalgesia induced by chronic constriction injury to the sciatic nerve in rats. *Hiroshima J Med Sci*, 2003, 52(3) p43-51
50. *Gierer P, Vollmar B, Schaser KD, et al.*, Efficiency of small-volume resuscitation in restoration of disturbed skeletal muscle microcirculation after soft-tissue trauma and haemorrhagic shock. *Langenbecks Arch Surg*, 2004, 389(1) p40-5
51. *Gierer P, Mittlmeier T, Bordel R, et al.*, Selective cyclooxygenase-2 inhibition reverses microcirculatory and inflammatory sequelae of closed soft-tissue trauma in an animal model. *J Bone Joint Surg Am*, 2005, 87(1) p153-60
52. *Gilligan JP, Lovato SJ, Erion MD, et al.*, Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. *Inflammation*, 1994, 18(3) p285-92
53. *Goldstein DJ, Wang O, Todd LE, et al.*, Study of the analgesic effect of lanepitant in patients with osteoarthritis pain. *Clin Pharmacol Ther*, 2000, 67(4) p419-26
54. *Gonzalez MI, Field MJ, Holloman EF, et al.*, Evaluation of PD 154075, a tachykinin NK1 receptor antagonist, in a rat model of postoperative pain. *Eur J Pharmacol*, 1998, 344(2-3) p115-20
55. *Goris RJ*, Reflex sympathetic dystrophy: model of a severe regional inflammatory response syndrome. *World J Surg*, 1998, 22(2) p197-202
56. *Gradl G, Steinborn M, Wizgall I, et al.*, [Acute CRPS I (morbus sudeck) following distal radial fractures-methods for early diagnosis], *Zentralbl Chir*, 2003, 128(12) p1020-6
57. *Gradl G, Gaida S, Gierer P, et al.*, In vivo evidence for apoptosis, but not inflammation in the hindlimb muscle of neuropathic rats. *Pain*, 2004, 112(1-2) p121-30
58. *Gradl G, Gaida S, Finke B, et al.*, Supernatant of traumatized muscle induces inflammation and pain, but not microcirculatory perfusion failure and apoptotic cell death. *Shock*, 2005a, 24(3) p219-25

59. *Gradl G, Schurmann M*, Sympathetic dysfunction as a temporary phenomenon in acute posttraumatic CRPS I. *Clin Auton Res*, 2005b, 15(1) p29-34
60. *Gradl G, Gaida S, Finke B, et al.*, Exaggeration of tissue trauma induces signs and symptoms of acute CRPS I, however displays distinct differences to experimental CRPS II. *Neurosci Lett*, 2006, 402(3) p267-72
61. *Guilbaud G, Benoist JM, Eschali er A, et al.*, Evidence for central phenomena participating in the changes of responses of ventrobasal thalamic neurons in arthritic rats. *Brain Res*, 1989, 484(1-2) p383-8
62. *Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, et al.*, Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology*, 2001, 33(2) p397-405
63. *Guo TZ, Offley SC, Boyd EA, et al.*, Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*, 2004, 108(1-2) p95-107
64. *Habler HJ, Timmermann L, Stegmann JU, et al.*, Involvement of neurokinins in antidromic vasodilatation in hairy and hairless skin of the rat hindlimb. *Neuroscience*, 1999, 89(4) p1259-68
65. *Hamblin A, Taylor M, Bernhagen J, et al.*, A method of preparing blood leucocytes for flow cytometry which prevents upregulation of leucocyte integrins. *J Immunol Methods*, 1992, 146(2) p219-28
66. *Hargreaves KM, Troullos ES, Dionne RA*, Pharmacologic rationale for the treatment of acute pain. *Dent Clin North Am*, 1987, 31(4) p675-94
67. *Heerschap A, den Hollander JA, Reynen H, et al.*, Metabolic changes in reflex sympathetic dystrophy: a <sup>31</sup>P NMR spectroscopy study. *Muscle Nerve*, 1993, 16(4) p367-73
68. *Herbert MK, Holzer P*, [Why are substance P(NK1)-receptor antagonists ineffective in pain treatment?] *Anaesthesist*, 2002, 51(4) p308-19
69. *Hoetzel A, Leitz D, Schmidt R, et al.*, Mechanism of hepatic heme oxygenase-1 induction by isoflurane. *Anesthesiology*, 2006, 104(1) p101-9
70. *Horobin RW, Rashid F*, Interactions of molecular probes with living cells and tissues. Part 1. Some general mechanistic proposals, making use of a simplistic Chinese box model. *Histochemistry*, 1990, 94(2) p205-9
71. *Hua XY, Chen P, Marsala M, et al.*, Intrathecal substance P-induced thermal hyperalgesia and spinal release of prostaglandin E2 and amino acids. *Neuroscience*, 1999, 89(2) p525-34
72. *Hunter J*, *Oeuvres completes*. Masson, Paris, 1766

73. *Ince C, Coremans JM, Bruining HA*, In vivo NADH fluorescence. *Adv Exp Med Biol*, 1992, 317 p277-96
74. *Jadad AR, Carroll D, Glynn CJ, et al.*, Intravenous regional sympathetic blockade for pain relief in reflex sympathetic dystrophy: a systematic review and a randomized, double-blind crossover study. *J Pain Symptom Manage*, 1995, 10(1) p13-20
75. *Jang JH, Nam TS, Paik KS, et al.*, Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. *Neurosci Lett*, 29 2004, 360(3) p129-32
76. *Jänig W*, Systemic and specific autonomic reactions in pain: efferent, afferent and endocrine components. *Eur J Anaesthesiol*, 1985, 2(4) p319-46
77. *Jänig W*, Experimental approach to reflex sympathetic dystrophy and related syndromes. *Pain*, 1991, 46(3) p241-5
78. *Jänig W, Stanton-Hicks M*, Reflex sympathetic dystrophy- a reappraisal. IASP Press, 1996, vol. 6
79. *Jänig W, Baron R*, Complex regional pain syndrome is a disease of the central nervous system. *Clin Auton Res*, 2002, 12(3) p150-64
80. *Jänig W, Baron R*, Experimental approach to CRPS. *Pain*, 2004, 108(1-2) p3-7
81. *Kim SH, Chung JM*, An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*, 1992, 50(3) p355-63
82. *Kingery WS, Castellote JM, Maze M*, Methylprednisolone prevents the development of autotomy and neuropathic edema in rats, but has no effect on nociceptive thresholds. *Pain*, 1999, 80(3) p555-66
83. *Kingery WS, Davies MF, Clark JD*, A substance P receptor (NK1) antagonist can reverse vascular and nociceptive abnormalities in a rat model of complex regional pain syndrome type II. *Pain* 2003, 104(1-2) p75-84
84. *Kirkpatrick UJ, Adams RA, Lardi A, et al.*, Rheological properties and function of blood cells in stored bank blood and salvaged blood. *Br J Haematol*, 1998, 101(2) p364-8
85. *Klitzman B, Duling BR*, Microvascular hematocrit and red cell flow in resting and contracting striated muscle. *Am J Physiol*, 1979, 237(4) p481-90
86. *Koon HW, Zhao D, Zhan Y, et al.*, Substance P mediates antiapoptotic responses in human colonocytes by Akt activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(6) p2013-8
87. *van der Laan L, Kapitein P, Verhofstad A, et al.*, Clinical signs and symptoms of acute reflex sympathetic dystrophy in one hindlimb of the rat, induced by infusion of a free-radical donor. *Acta Orthop Belg*, 1998a, 64(2) p210-7



88. *van der Laan L, ter Laak HJ, Gabreels-Festen A, et al.*, Complex regional pain syndrome type I (RSD): pathology of skeletal muscle and peripheral nerve. *Neurology*, 1998b, 51(1) p20-5
89. *Lallemend F, Lefebvre PP, Hans G, et al.*, Substance P protects spiral ganglion neurons from apoptosis via PKC-Ca<sup>2+</sup>-MAPK/ERK pathways. *J Neurochem*, 2003, 87(2) p508-21,
90. *Laurent TC, Sundelof LO, Wik KO, et al.*, Diffusion of dextran in concentrated solutions. *Eur J Biochem*, 1976, 68(1) p95-102
91. *Lee H, Natsui H, Akimoto T, et al.*, Effects of cryotherapy after contusion using real-time intravital microscopy. *Med Sci Sports Exerc*, 2005, 37(7) p1093-8
92. *Legat FJ, Griesbacher T, Schicho R, et al.*, Repeated subinflammatory ultraviolet B irradiation increases substance P and calcitonin gene-related peptide content and augments mustard oil-induced neurogenic inflammation in the skin of rats. *Neurosci Lett*, 2002, 329(3) p309-13
93. *Leis S, Weber M, Isselmann A, et al.*, Substance-P-induced protein extravasation is bilaterally increased in complex regional pain syndrome. *Exp Neurol*, 2003, 183(1) p197-204
94. *Leis S, Weber M, Schmelz M, et al.*, Facilitated neurogenic inflammation in unaffected limbs of patients with complex regional pain syndrome. *Neurosci Lett*, 2004, 359(3) p163-6
95. *Leriche R*, De la causalgie, envisage comme une névrite du sympathique et de son traitement par la dénudation et l'excision des plexus nerveux périartériels. *Presse Med*, 1916, 24 p178-180
96. *Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, et al.*, Sustained hypothermia accelerates microvascular thrombus formation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(6) p2680-7
97. *Livingston WK*, Pain mechanism. A physiological interpretation of causalgia and its related states. Macmillan, New York, 1943
98. *Lotz M, Vaughan JH, Carson DA*, Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science*, 1988, 241(4870) p1218-21
99. *Matis WL, Lavker RM, Murphy GF*, Substance P induces the expression of an endothelial-leukocyte adhesion molecule by microvascular endothelium. *J Invest Dermatol*, 1990, 94(4) p492-5
100. *Meert TF, Vissers K, Geenen F, et al.*, Functional role of exogenous administration of substance P in chronic constriction injury model of neuropathic pain in gerbils. *Pharmacol Biochem Behav*, 2003, 76(1) p17-25

101. *Nikolaus S, Huston JP, Hasenohrl RU*, The neurokinin-1 receptor antagonist WIN51,708 attenuates the anxiolytic-like effects of ventralpallidal substance P injection. *Neuroreport*, 1999, 10(11) p2293-6
102. *Menger MD, Vollmar B*, Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation*, 2000, 7(5) p291-306
103. *Migheli A, Mongini T, Doriguzzi C, et al.*, Muscle apoptosis in humans occurs in normal and denervated muscle, but not in myotonic dystrophy, dystrophinopathies or inflammatory disease. *Neurogenetics*, 1997, 1(2) p81-7
104. *Miletic G, Miletic V*, Increases in the concentration of brain derived neurotrophic factor in the lumbar spinal dorsal horn are associated with pain behavior following chronic constriction injury in rats. *Neurosci Lett*, 2002, 319(3) p137-40
105. *Mitchell SW, Morehouse CR, Keen WW*, Gunshot wounds and other injuries of the nerves. J. B. Lippincott, Philadelphia, PA, 1864
106. *Mittlmeier T, Vollmar B, Menger MD, et al.*, Small volume hypertonic hydroxyethyl starch reduces acute microvascular dysfunction after closed soft-tissue trauma. *J Bone Joint Surg Br*, 2003, 85(1) p126-32
107. *Munzlani R, Harrison SM, Smith GD, et al.*, Neuropeptide changes persist in spinal cord despite resolving hyperalgesia in a rat model of mononeuropathy. *Brain Res*, 1996, 743(1-2) p102-8
108. *Nash GB, Jones JG, Mikita J, et al.*, Effects of preparative procedures and of cell activation on flow of white cells through micropore filters. *Br J Haematol* 1988, 70(2) p171-6
109. *Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, et al.*, The effect of apoptosis inhibitors on experimental autoimmune encephalomyelitis: apoptosis as a regulatory factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000, 267(3) p826-30
110. *Otsuka M, Yoshioka K*, Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev*, 1993, 73(2) p229-308
111. *Oyen WJ, Arntz IE, Claessens RM, et al.*, Reflex sympathetic dystrophy of the hand: an excessive inflammatory response? *Pain*, 1993, 55(2) p151-7
112. *Pawlak M, Schmidt RF, Heppelmann B, et al.*, The neurokinin-1 receptor antagonist RP 67580 reduces the sensitization of primary afferents by substance P in the rat. *Eur J Pain*, 2001, 5(1) p69-79
113. *Perianin A, Snyderman R, Malfroy B*, Substance P primes human neutrophil activation: a mechanism for neurological regulation of inflammation. *Biochem Biophys Res Commun*, 1989, 161(2) p520-4
114. *Pries AR*, A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp*, 1988, 7(4) p327-45

115. *Pudupakkam S, Harris KA, Jamieson WG, et al.*, Ischemic tolerance in skeletal muscle: role of nitric oxide. *Am J Physiol*, 1998, 275(1 Pt 2) pH94-9
116. *Del Rio G, Castro-Obregon S, Rao R, et al.*, APAP, a sequence-pattern recognition approach identifies substance P as a potential apoptotic peptide. *FEBS Lett*, 2001, 494(3) p213-9
117. *Rommel O, Malin JP, Janig W, et al.*, [Clinical findings in patients with chronic complex regional pain syndrome], *Anaesthesist*, 2004, 53(10) p965-77
118. *Roos A, Xu W, Castellano G, et al.*, Mini-review: A pivotal role for innate immunity in the clearance of apoptotic cells. *Eur J Immunol*, 2004, 34(4) p921-9
119. *Scardina GA, Augello L, Messina P*, [The role of neuromodulators (substance P and calcitonin gene-related peptide) in the development of neurogenic inflammation in the oral mucosa], *Minerva Stomatol*, 2004, 53(1-2) p21-32
120. *Schaser KD, Vollmar B, Menger MD, et al.*, In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury. *J Orthop Res*, 1999, 17(5) p678-85
121. *Schaser KD, Bail HJ, Schewior L, et al.*, Acute effects of N-acetylcysteine on skeletal muscle microcirculation following closed soft tissue trauma in rats. *J Orthop Res*, 2005, 23(1) p231-41
122. *Scholz J, Broom DC, Youn DH, et al.*, Blocking caspase activity prevents transsynaptic neuronal apoptosis and the loss of inhibition in lamina II of the dorsal horn after peripheral nerve injury. *J Neurosci*, 2005, 25(32) p7317-23
123. *Schurmann M, Gradl G, Andress HJ, et al.*, Assessment of peripheral sympathetic nervous function for diagnosing early post-traumatic complex regional pain syndrome type I. *Pain*, 1999, 80(1-2) p149-59
124. *Schurmann M, Gradl G, Zaspel J, et al.*, Peripheral sympathetic function as a predictor of complex regional pain syndrome type I (CRPS I) in patients with radial fracture. *Auton Neurosci*, 2000, 86(1-2) p127-34
125. *Schurmann M, Gradl G, Wizgal I, et al.*, Clinical and physiologic evaluation of stellate ganglion blockade for complex regional pain syndrome type I. *Clin J Pain*, 2001, 17(1) p94-100
126. *Schurmann M, Vogel T, Gartner A, et al.*, [Experiences with calcitonin treatment of patients with type I complex regional pain syndrome (CRPS I--Sudeck disease)], *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 2001, 139(5) p452-7
127. *Seegers HC, Hood VC, Kidd BL, et al.*, Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptors during neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther*, 2003, 306(1) p8-12

128. *Shir Y, Seltzer Z*, A-fibers mediate mechanical hyperesthesia and allodynia and C-fibers mediate thermal hyperalgesia in a new model of causalgiform pain disorders in rats. *Neurosci Lett*, 1990, 115(1) p62-7
129. *Sieweke N, Birklein F, Riedl B, et al.*, Patterns of hyperalgesia in complex regional pain syndrome. *Pain*, 1999, 80(1-2) p171-7
130. *Smith CH, Barker JN, Morris RW, et al.*, Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J Immunol*, 1993, 151(6) p3274-82
131. *Springer TA*, Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*, 1994, 76(2) p301-14
132. *Stanton-Hicks M, Jänig W, Hassenbusch S, et al.*, Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. *Pain*, 1995, 63(1) p127-33
133. *Stanton-Hicks M, Baron R, Boas R, et al.*, Complex Regional Pain Syndromes: guidelines for therapy. *Clin J Pain*, 1998, 14(2) p155-66
134. *Stanisz AM, Befus D, Bienenstock J*, Differential effects of vasoactive intestinal peptide, substance P, and somatostatin on immunoglobulin synthesis and proliferations by lymphocytes from Peyer's patches, mesenteric lymph nodes, and spleen. *J Immunol*, 1986, 136(1) p152-6
135. *Steinbauer M, Harris AG, Messmer K*, Effects of dextran on microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle. *Am J Physiol*, 1997, 272(4 Pt 2) p1710-6
136. *Steinbauer M, Harris AG, Leiderer R, et al.*, Impact of dextran on microvascular disturbances and tissue injury following ischemia/reperfusion in striated muscle. *Shock*, 1998, 9(5) p345-51
137. *Steinbrocker O, Spitzer N, Friedmann H*, The shoulder-hand syndrome in reflex dystrophy of the upper extremity. *Ann Int Med*, 1948, 29 p22-52
138. *Sudeck P*, Über die akute (trophoneurotische) Knochenatrophie nach Entzündungen und Traumen der Extremitäten. *Dtsch Med Wochenschr*, 1902, 28:336-338
139. *Sudeck P*, Die sogenannte akute Knochenatrophie als Entzündungsvorgang. *Chirurg*, 1942, 14: 449-458
140. *Sullivan SM, Johnson PC*, Effect of oxygen on blood flow autoregulation in cat sartorius muscle. *Am J Physiol*, 1981, 241(6) p1807-15
141. *de Takats G, Miller D*, Posttraumatic dystrophy of the extremities. *Arch Surg*, 1943, 46: 496-479
142. *Taoussanis K*, [Treatment of Sudeck's syndrome with calcitonin], *Med Welt*, 1981, 32(37) p1375-7
143. *Tews DS, Goebel HH*, DNA-fragmentation and expression of apoptosis-related proteins in muscular dystrophies. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1997, 23(4) p331-8

144. *Torebjork E, Wahren L, Wallin G, et al.*, Noradrenaline-evoked pain in neuralgia. *Pain* 1995, 63(1) p11-20
145. *Tyml K, Groom AC*, Regulation of blood flow in individual capillaries of resting skeletal muscle in frogs. *Microvasc Res*, 1980, 20(3) p346-57
146. *Tyml K, Budreau CH*, A new preparation of rat extensor digitorum longus muscle for intravital investigation of the microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp*, 1991, 10(4) p335-43
147. *Tyml K, Mathieu-Costello O, Cheng L, et al.*, Differential microvascular response to disuse in rat hindlimb skeletal muscles. *J Appl Physiol*, 1999, 87(4) p1496-505
148. *Vachon P, Masse R, Gibbs BF*, Substance P and neurotensin are up-regulated in the lumbar spinal cord of animals with neuropathic pain. *Can J Vet Res*, 2004, 68(2) p86-92
149. *Vaneker M, Wilder-Smith OH, Schrombges P, et al.*, Impairments as measured by ISS do not greatly change between one and eight years after CRPS 1 diagnosis. *Eur J Pain*, 2006, 10(7) p639-44
150. *Veldman PH, Reynen HM, Arntz IE, et al.*, Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients. *Lancet*, 1993, 342(8878) p1012-6
151. *Verdugo RJ, Campero M, Ochoa JL*, Phentolamine sympathetic block in painful polyneuropathies. II. Further questioning of the concept of 'sympathetically maintained pain'. *Neurology*, 1994, 44(6) p1010-4
152. *Vincent MA, Rattigan S, Clark MG*, Size-dependent effects of microspheres on vasoconstrictor-mediated change in oxygen uptake by perfused rat hindlimb. *Microvasc Res*, 2001, 62(3) p306-14
153. *Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, et al.*, Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg*, 1992, 75(3) p421-30
154. *Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, et al.*, High-resolution microscopic determination of hepatic NADH fluorescence for in vivo monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Microvasc Res*, 1997, 54(2) p164-73
155. *Wall PD, Scadding JW, Tomkiewicz MM*, The production and prevention of experimental anesthesia dolorosa. *Pain*, 1979, 6(2) p175-82
156. *Weber M, Birklein F, Neundorfer B, et al.*, Facilitated neurogenic inflammation in complex regional pain syndrome. *Pain*, 2001, 91(3) p251-7
157. *Weinstock JV, Blum A, Walder J, et al.*, Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis *mansoni* produce substance P. *J Immunol*, 1988, 141(3) p961-6

158. *Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, et al.*, Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery*, 1999, 126(5) p881-9
159. *Wiessner C, Sauer D, Alaimo D, et al.*, Protective effect of a caspase inhibitor in models for cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Cell Mol Biol*, 2000, 46(1) p53-62
160. *Willis WD*, Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res*, 1999, 124(4) p395-421
161. *Yang L, Sugama S, Mischak RP, et al.*, A novel systemically active caspase inhibitor attenuates the toxicities of MPTP, malonate, and 3NP in vivo. *Neurobiol Dis*, 2004, 17(2) p250-9
162. *Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al.*, Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation*, 1998, 97(3) p276-81
163. *Yonehara N, Yoshimura M*, Influence of painful chronic neuropathy on neurogenic inflammation. *Pain*, 2001, 92(1-2) p259-65
164. *Yoshimura K, Harii K*, A regenerative change during muscle adaptation to denervation in rats. *J Surg Res*, 1999, 81(2) p139-46
165. *Young W*, H2 clearance measurement of blood flow: a review of technique and polarographic principles. *Stroke*, 1980, 11(5) p552-64
166. *Zhang L, Bail H, Mittlmeier T, et al.*, Immediate microcirculatory derangements in skeletal muscle and periosteum after closed tibial fracture. *J Trauma*, 2003, 54(5) p979-85

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria (lat.: Arterie)
Abb.	Abbildung
APS	<u>A</u> mmonium <u>p</u> ersulfat
aU	<u>a</u> rbitrary <u>u</u> nits (eng.: willkürliche Einheiten)
BCA	<u>b</u> ic <u>i</u> nch <u>i</u> noic <u>a</u> cid
BE	<u>b</u> ase <u>e</u> xcess (eng.: Basenüberschuss)
BSA	<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin
°C	<u>G</u> rad <u>C</u> elsius
CCD	<u>c</u> harged <u>c</u> oupled <u>d</u> evice
CCI	<u>c</u> hronic <u>c</u> onstriction <u>i</u> njury
CGRP	<u>c</u> alcitonin <u>g</u> ene <u>r</u> elated <u>f</u> actor
cm	<u>C</u> ent <u>i</u> meter
CRPS	<u>c</u> omplex <u>r</u> egional <u>p</u> ain <u>s</u> yndrome
d	<u>d</u> ay (eng.: Tag)
d.h.	<u>d</u> as <u>h</u> eißt
DM	<u>D</u> eutsche <u>M</u> ark
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
DNA	<u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid (eng.: Desoxyribonucleinsäure)
dUTP	<u>D</u> esoxyu <u>r</u> idin <u>t</u> riphosphat
EDL	Musculus <u>e</u> xtensor <u>d</u> igitorum <u>l</u> ongus
EDTA	<u>e</u> thylene- <u>d</u> iamine- <u>t</u> etraacetic <u>a</u> cid
eng.	<u>e</u> nglisch
et al.	<u>e</u> t <u>a</u> lia (lat.: und andere)
FITC	<u>f</u> luorescein <u>i</u> so <u>t</u> hiocyanate
FKD	<u>f</u> unktionelle <u>K</u> apill <u>a</u> rdichte
g	<u>G</u> ramm
g	<u>G</u> ravitations-Kraft=Erdbeschleunigung=9,81m/sek <sup>2</sup>
geb.	<u>g</u> eboren
GF	<u>G</u> esicht <u>s</u> feld
h	<u>h</u> our (eng.: Stunde)
HF	<u>H</u> erzfrequenz
HKT	<u>H</u> ämatokrit
HPF	<u>h</u> igh <u>p</u> ower <u>f</u> ield

## Anhang

HRP	<u>H</u> orser <u>a</u> dish <u>P</u> eroxidase (eng.: Meerrettich Peroxidase)
i.a.	<u>i</u> ntra <u>a</u> rteriell
IASP	<u>I</u> nternational <u>a</u> ssociation for the <u>s</u> tudy of <u>p</u> ain
IE	<u>I</u> nternationale <u>E</u> inheit
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IL	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin
i.v.	<u>i</u> ntra <u>v</u> enös
IVM	<u>I</u> ntra <u>v</u> itale Fluoreszenz <u>m</u> ikroskopie
i.p.	<u>i</u> ntra <u>p</u> eritoneal
ISS	<u>I</u> mpairment-Level <u>S</u> um <u>S</u> core
Kat.	<u>K</u> ategorie
kDa	Kilodalton
kg	<u>K</u> ilogramm
KG	<u>K</u> örpergewicht
l	<u>L</u> iter
lat.	lateinisch
M	<u>m</u> olar
mA	<u>M</u> illiampère
MAP	<u>m</u> ittlerer <u>a</u> rterieller <u>D</u> ruck
mg	<u>M</u> illigramm
min	<u>M</u> inute
ml	<u>M</u> illiliter
mm	<u>M</u> illimeter
mN	<u>M</u> ikronewton
MW	Molekulargewicht (eng.: <u>m</u> olecular <u>w</u> eight)
n	<u>n</u> umber (eng.: Anzahl)
NaCl	<u>N</u> atrium <u>ch</u> lorid
NADH	reduzierte Form des <u>N</u> icotinsäueamid- <u>A</u> denin- <u>D</u> inucleotid
nm	<u>N</u> anometer
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamid <u>G</u> ele <u>e</u> ktrophorese
PMSF	<u>P</u> henyl <u>m</u> ethan <u>S</u> ulfonyl <u>F</u> luorid
PS	<u>P</u> hosphatidyl <u>s</u> erin
PVDF	<u>P</u> oly <u>v</u> inylid <u>e</u> nfluorid
$\pi$	Kreiszahl=3,14159
®	eingetragenes Warenzeichen
s	<u>s</u> econd (eng.: Sekunde)



## Anhang

SIRS	<u>s</u> ystemic <u>i</u> nflammatory <u>r</u> esponse <u>s</u> yndrome
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate
SMP	<u>s</u> ympathetically <u>m</u> aintained <u>p</u> ain (eng: sympathisch unterhaltener Schmerz)
SP	<u>S</u> ubstanz <u>P</u>
S-VHS	<u>S</u> uper <u>v</u> ideo <u>h</u> ome <u>s</u> ystem
Tab.	Tabelle
t	<u>t</u> ime (eng.: Zeit)
TBS	<u>T</u> ris <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
TBST	<u>T</u> BS <u>t</u> ween
TdT	<u>t</u> erminale <u>d</u> esoxynucleotid <u>T</u> ransferase
TEMED	<u>T</u> etramethylethylendi <u>a</u> min
™	<u>t</u> rade <u>m</u> ark
TNF-α	<u>T</u> umor <u>n</u> ecrosis <u>f</u> actor- <u>α</u>
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	<u>t</u> ransferase-mediated d <u>U</u> TP biotin <u>n</u> ick <u>e</u> nd- <u>l</u> abeling
UV	<u>u</u> ltraviolett
µm	<u>M</u> ikrometer
µl	<u>M</u> ikroliter
vs.	<u>v</u> ers <u>u</u> s
W	<u>W</u> att
z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel
ZNS	<u>Z</u> entrales <u>N</u> ervens <u>s</u> ystem

## 8.2 Chemikalien

### 8.2.1 Lösungen der Proteinanalytik

#### Proteinextraktion aus Muskelgewebe

Lysispuffer	0,1ml 1M Tris, pH 7,5 20µl 5M NaCl 4µl 250mM EDTA 0,5 ml Triton-X-100 50µl NaN <sub>3</sub> 0,2ml 100mM PMSF 0,1ml Protease Inhibitor Cocktail ad 10ml Aqua bidestillata
-------------	---

#### Proteinmengenbestimmung

Reagenz	BCA-Fertiglösung Cu <sup>2+</sup> Sulfat-Fertiglösung
---------	--

#### Proteindenaturierung

SDS-Probenpuffer	2,5ml 1M Tris pH 6,8 0,8g SDS 4,587g Glycerin (87%) 154,2mg DTT 0,2ml 1% Bromphenolblau ad 10ml Aqua bidestillata
------------------	--

#### SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel	1,34ml Aqua bidestillata 3,75ml 1M Tris, pH 8,8 4,7ml 30% Acrylamid 100µl 10% SDS 100µl 10% APS 10µl TEMED
----------	---

## Anhang

Sammelgel	4,1ml Aqua bidestillata 0,75ml 1M Tris, pH 6,8 1ml 30% Acrylamid 50µl 10% SDS 50µl 10% APS 5µl TEMED
Laufpuffer für SDS-PAGE	30,3g Tris 144g Glycin 10g SDS ad 1000ml Aqua bidestillata
Anodenpuffer I	34,34g Tris 200ml Methanol ad 1000ml Aqua bidestillata pH 10,4
Anodenpuffer II	3,028g Tris 200ml Methanol ad 1000ml Aqua bidestillata pH 10,4
Kathodenpuffer	34,342g Tris 0,751g Glycin 200ml Methanol ad 1000ml Aqua bidestillata pH 9,4
Coomassie-Färbelösung	0,1% Brilliant Blue 25% Methanol 5% Essigsäure ad 1000ml Aqua bidestillata

TBS  
24,2g Tris  
80g NaCl  
ad 1000ml Aqua bidestillata  
pH 7,6

TBST  
100ml 10x TBS  
1ml Tween 20  
ad 1000ml Aqua bidestillata

Blockierungslösung  
50g BSA  
1000ml TBST

### Detektionssystem

ECL-plus™  
2ml Solution A  
40µl Solution B

### Visualisierung

Entwicklungslösung  
90ml Entwicklungsreagenz  
323ml Aqua bidestillata

Fixierungslösung  
90ml Fixierungsreagenz  
323ml Aqua bidestillata

### 8.2.2 z-VAD-fmk Stammlösung

5mg z-VAD (OMe)-FMK (Alexis biochemicals, San Diego, CA, USA)

0,25ml Dimethylsulfoxid (DMSO, Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz)

Lagerung in 50µl Aliquots bei -20°C, nicht länger als 6 Monate

### 8.2.3 Substanz P Stammlösung

5mg Substanz P (Calbiochem, Merck Biosciences GmbH,  
Schwalbach/ Ts., Deutschland)

4,7ml 5%iger Essigsäure

0,3ml 10M NaOH-Lösung

Lagerung in 100µl Aliquots bei -80°C

### 8.3 Lebenslauf

Name	Burkhard Finke
Medizinische Ausbildung	
Seit November 2006	Assistenzarzt Klinik für Unfallchirurgie, UniversitätsSpital Zürich (CH), Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Trentz
Juni 2006	Drittes Staatsexamen und Approbation, Universität Rostock (D)
Dezember-März 2006	Unterassistent Abteilung für Innere Medizin, Instituto Superior de las Ciencias Médicas de Santiago de Cuba (C), Prof. Dr. med. J. César
August-November 2005	Unterassistent Departement Chirurgie, UniversitätsSpital Zürich (CH), Prof. Dr. med. Dr. h.c. O. Trentz
April-Juli 2005	Unterassistent Orthopädische Universitätsklinik, Universität Rostock (D), Prof. Dr. med. W. Mittelmeier
März 2005	Zweites Staatsexamen
August 2004-Februar 2005	Forschungssemester, Institut für Experimentelle Chirurgie mit zentraler Versuchstierhaltung, Universität Rostock (D), Prof. Dr. med. B. Vollmar
Juli 2004	Famulatur Praxis für Mund- Kiefer- und Gesichtschirurgie, Dr. med. habil. U. Peters, Rostock (D)
2002-2004	Betreuer des Physiologischen Praktikums,

## Anhang

	Institut für Physiologie, Universität Rostock (D), Prof. Dr. Th. Noack
August-September 2003	Famulatur Klinik für Neurochirurgie, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada (ES)
Februar 2003	Famulatur Kardiologie, Herzzentrum der Universität Dresden (D), Prof. Dr. med. R. H. Strasser
September 2002	Erstes Staatsexamen
Februar 2002	Famulatur Pädiatrische Abteilung, Hospital Hermano Pedro, Antigua, (Gca)
September 2001	Physikum
Oktober 1999	Studienbeginn Humanmedizin, Universität Rostock (D)

## 8.4 Publikationen und Kongressbeiträge

### Originalarbeiten

Gradl G, Gaida S; **Finke B**; Lindenblatt N; Gierer P; Menger MD; Mittlmeier T; Vollmar B. Supernatant of traumatized muscle induces inflammation and pain, but not microcirculatory perfusion failure and apoptotic cell death. Shock, 2005, 24: 219-25

Gradl G, Gaida S; **Finke B**; Gierer P; Mittlmeier T; Vollmar B. Exaggeration of tissue trauma induces signs and symptoms of acute CRPS I, however displays distinct differences to experimental CRPS II. Neurosci Lett, 2006, 402: 267-72

Gradl G, **Finke B**; Schattner S; Gierer P; Mittlmeier T; Vollmar B. Continuous intra-arterial application of substance P induces signs and symptoms of experimental complex regional pain syndrome (CRPS) such as edema, inflammation and mechanical pain but no thermal pain. Neuroscience 2007, 148: 757-65

### Kongressbeiträge

Gradl G, **Finke B**, Gierer P, Mittlmeier T, Vollmar B. Die durch Traumatisierung freigesetzten Mediatoren bewirken die posttraumatische Entzündung und den Schmerz, nicht aber die Muskelzellapoptose. Chir Forum 34: 327-328,2005

**Finke B**, Gradl G, Mittlmeier T, Vollmar B. Die Rolle von Substanz P in der Pathogenese des „complex regional pain syndrome“ (CRPS). Chir Forum 36: 287-288, 2007



## 8.5 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich,

- diese Arbeit selbstständig angefertigt,
- die verwendeten Ergebnisse und Daten anderer vollständig angegeben und korrekt zitiert,
- sowie weitere Mitwirkung Dritter offen gelegt zu haben.

Burkhard Finke, Rostock, Juli 2008

## 8.6 Thesen

1. Das „complex regional pain syndrome“ (CRPS) ist eine überwiegend posttraumatisch und postoperativ auftretende Erkrankung, deren Pathogenese bis heute nicht befriedigend geklärt ist. Das klinische Bild ist durch eine typische Schmerzsymptomatik sowie durch eine Störung der Vasomotorik und Schweißsekretion und Ödembildung bestimmt. Bei chronischem Verlauf kommt es häufig zu langfristiger Invalidisierung.
2. Generell werden zwei grundsätzliche Pathomechanismen als Ursache des CRPS diskutiert. Zum einen werden Veränderungen im zentralen, peripheren und sympathischen Nervensystem verantwortlich gemacht, andererseits periphere entzündliche Mechanismen diskutiert. Eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Krankheitsbildes wird dem Neurotransmitter Substanz P zugesprochen, welcher aus peripheren Nervenendigungen freigesetzt wird und an der Entstehung neurogener Entzündungen beteiligt ist.
3. In der vorliegenden Arbeit wurden Tiermodelle zur Pathophysiologie des CRPS analysiert. Am etablierten CCI-Modell („chronic constriction injury“) wurden nach chronischer Nervenligatur der neuropathische Schmerz und ein Zusammenhang zwischen diesem und apoptotischen Muskelzellen untersucht. Außerdem wurde das CCI-Modell auf lokale Entzündungsreaktion hin untersucht.
4. In einem neu entwickelten Modell wurde Substanz P über einen Zeitraum von 24 Stunden mittels Katheter in die A. femoralis infundiert. An diesem Modell wurde die Rolle von peripher ausgeschütteter Substanz P bei der Entstehung der neurogenen Entzündung und des Schmerzsyndroms beim CRPS beleuchtet.
5. In ausführlichen neurophysiologischen Untersuchungen wurde das Schmerzverhalten der Tiere getestet. Weiterhin wurden klinische Parameter, wie lokale Ödeme und Temperaturdifferenzen, registriert. Mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurden die Mikrozirkulation, kapillares Leakage und lokale Entzündungsreaktionen im Muskel erfasst. Apoptose wurde intravitalfluoreszenzmikroskopisch, histologisch und mittels Western-Blot nachgewiesen.
6. Chronische Nervenligatur im CCI-Modell löst ein typisches, dem CRPS ähnliches neuropathisches Schmerzsyndrom hervor, das mit Apoptose von Myozyten einhergeht. CCI führt hingegen zu keiner inflammatorischen Reaktion im Muskel.
7. Inhibition der nach chronischer Nervenligatur beobachteten Apoptose mit dem Pancaspaseinhibitor z-VAD-fmk lindert die Ausprägung des Schmerzsyndroms durch Senkung der myozytären Apoptoserate. Die Apoptose von Myozyten bei

chronischer Nervenligatur scheint somit ursächlich an der Entwicklung der Schmerzsymptomatik beteiligt zu sein.

8. Chronische intraarterielle Applikation von Substanz P löst eine muskuläre Inflammation und mechanische Hyperalgesie aus, verursacht aber keine myozytäre Apoptose. Substanz P hat keinen Einfluss auf die Mikrozirkulation des Muskelgewebes.
9. Substanz P spielt bei der Auslösung neurogener Entzündungen eine Triggerrolle, da eine 24-stündige Applikation eine über 4 Tage währende lokale Entzündungsreaktion und Hyperalgesie hervorruft.
10. Die untersuchten Modelle zeigen Teilaspekte des klinischen Bildes des CRPS auf. Weder das Modell der chronischen Nervenligatur noch das der chronischen Substanz P Applikation spiegeln das Krankheitsbild umfassend wider. Eine isolierte periphere Nervenschädigung führt nicht per se zu einer neurogenen Entzündung. Die entzündliche Komponente der Erkrankung wird durch Substanz P eindrücklich induziert und die Funktion des Neurotransmitters als Trigger von neurogenen Erkrankungen betont.

### 9 Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Herrn PD Dr. med. G. Gradl und Frau Prof. Dr. med. B. Vollmar für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, sowohl in der Entwicklung des Themas, als auch der Durchführung der Versuche und der Fertigstellung der Promotion. Desweiteren möchte ich mich bedanken bei Susanne Gaida für ihre Vorarbeit, die mir den Einstieg in unsere Arbeitsgruppe erleichtert hat. Außerdem bedanke ich mich bei Kathrin Sievert und den Medizinisch Technischen Assistentinnen des Instituts für experimentelle Chirurgie Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Frenz und Maren Nerowski für ihre Unterstützung der Experimente und insbesondere bei Dorothea Frenz für die Anfertigung der histologischen Präparate und bei Maren Nerowski für die Durchführung der proteinanalytischen Untersuchungen.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Brüdern, die den Grundstein für meinen Werdegang gelegt haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Ehefrau Juliane, die mich allzeit konstruktiv fordert und unterstützt.