Martin Moll

Dr. med.

Nerve Injury-Induced Neuronal Cell Death In The Dorsal Horn Of The Spinal Cord Contributes To Chronic Neuropathic Pain

Fach/ Einrichtung: Pharmakologie

Doktormutter: Prof. Dr. Rohini Kuner

Summary/ Zusammenfassung

Introduction

The mechanisms underlying the transition from acute to chronic neuropathic pain are incompletely understood. Here, using the cutting-edge technique of unbiased stereology, I examine in the mouse and the potential cell loss in the dorsal horn after peripheral nerve injury. I further explore the role of the N-Methyl-D-aspartate receptor in apoptosis induction after peripheral nerve injury. I investigated whether this may reduce the numbers of inhibitory interneurons and consequently result in disinhibition of pain signaling and chronic pain behavior.

Results

I used a commonly accepted surgical model, the spared nerve injury model, to induce neuropathic pain in the mouse. A time course of apoptosis induction in the ipsilateral dorsal horn reveals a dynamic with a peak at day 7 and a decrease to baseline after a couple of weeks. An optical fractionator was then employed to quantify the neuronal cell numbers in laminae I+II and laminae III+IV in injured and uninjured animals 4 weeks after surgery. This showed a substantial cell loss after neuropathic pain induction treatment. Furthermore, γ-aminobutyric- acid producing interneurons in laminae I+II of genetically modified mice were also significantly decreased in numbers.

Grin1$^{flox/flox}$ mice were treated with virus to knockout the *Grin1* gene conditionally in the dorsal horn to examine the role of the N-Methyl-D-aspartate receptor. Following this treatment a significant

reduction of apoptosis induction was shown. To confirm the model an *in situ* hybridization aiming for Grin1 in ipsilateral and contralateral dorsal horn was performed.

Discussion

The results show that peripheral nerve injury causes apoptosis in the mouse dorsal horn with a following cell loss of total neurons and γ-aminobutyric acid inhibitory interneurons. This not only supports the hypothesis that reduction of inhibition causes chronic pain development but also indicates further cell loss of non-inhibitory interneuronal cell population following excitotoxic glutamate signaling. Depletion of the functional N-Methyl-D-aspartate receptor prevents apoptosis induction and consecutive neurodegeneration, which corroborates the significant role of this receptor in that pathway. Furthermore, behavioral data of mice lacking this receptor show the occurrence of pain behavior at the acute stage without persistence, so that after a couple weeks the mechanical allodynia diminishes and reaches baseline again.

Conclusion

Neuropathic pain resembles in some key aspects a neurodegenerative disease. The N-Methyl-D-aspartate receptor plays a leading role in the apoptosis induction pathway and the persistence of pain behavior in neuropathic pain. Disinhibition due to loss of inhibitory signaling in the dorsal after inhibitory interneuron loss may shift the balance between excitatory and inhibitory signaling to excitotoxicity. This could inspire further pharmacologic investigation for secondary prevention of chronic pain after nerve injury in the future. Moreover, autopsies of spinal cords from persons suffering from chronic neuropathic pain may indicate a link to human pain physiology.

Einleitung

Noch immer sind die einzelnen Mechanismen, welche die Überleitung von akutem zu chronischem Schmerz beschreiben nicht vollständig erfasst. In der vorliegenden Arbeit untersuche ich anhand eines Maus-Modells mit modernster wissenschaftlicher Methodik den Verlust von Zellen im Dorsalhorn nach peripherer Nervenverletzung.

Darüber hinaus wird die Rolle des N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors für die Apoptose infolge einer Nervenverletzung untersucht. Die Aktivierung dieses Rezeptors könnte ein Überangebot an intrazellulären Kalzium-Ionen zur Folge haben, das als zytotoxisches Signal im Dorsalhorn wirkt. Dies führt möglicherweise zum Zelltot von Inhibitorneuronen und schließlich über Disinhibierung zu chronischem Schmerzverhalten.

Ergebnisse

Als Modell für den neuropathischen Schmerz wurde das Verfahren der sogenannten “spared nerve injury” verwandt. Der zeitliche Verlauf der Apoptose im ipsilateralen Dorsalhorn zeigte eine Dynamik mit einem Maximalwert an Tag 7 nach der Operation sowie einen Abfall der Dynamik nach wenigen Wochen. Mithilfe eines sogenannten “optical fractionator” (Optical-Fraktionator) wurden die Zellen in operierten und nicht operierten Tieren 4 Wochen nach Eingriff in zwei Regionen stereologisch quantifiziert. Das erste Areal umfasste Laminae I+II und das zweite Areal schließt Laminae III+IV ein. Hierbei zeigte sich ein signifikanter neuronaler Zellverlust in Tieren mit dem OP-Verfahren des neuropathischen Schmerz-Modells. Darüber hinaus ergab sich ebenfalls eine signifikante Zellreduktion in Laminae I+II von γ-Aminobuttersäure produzierenden Interneuronen in genetisch modifizierten Tieren.

Das ipsilaterale Dorsalhorn von *Grin1*$^{flox/flox}$ Mäusen wurden mit einem *Cre*-codierenden viralen Vektor infiziert was zu einem Knockout des *Grin1* Gen führte, um die Bedeutung des N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors zu untersuchen. Nach der Behandlung zeigte sich eine signifikante Verringerung des Zelluntergangs nach peripherer Nervenverletzung. Eine *in situ* Hybridisierung die auf Grin1 zielte bestätigte die verminderte Expression von GluN1 im Vergleich zur kontralateralen Seite.

Diskussion

Die Ergebnisse zeigen, dass eine periphere Nervenverletzung Apoptose im ipsilateralen Dorsalhorn der Maus verursacht. Dies beinhaltet einen konsekutiven Verlust von Neuronen allgemein sowie von γ-Aminobuttersäure produzierenden Interneuronen im Besonderen.

Dies stützt zum einen die Hypothese, dass die Verringerung der Inhibition chronischen Schmerz mitbedingen kann. Zum anderen zeigt es aber auch, dass nicht-inhibitorische Interneurone infolge eines zytotoxischen Glutamat-Signals untergehen.

Ferner zeigte sich, dass ein lokales Ausschalten des funktionellen N-Methyl-D-Aspartat Rezeptors Zellen vor dem Zelltod und konsekutiver Neurodegeneration bewahrt hat, was die Bedeutung dieses Rezeptors hervorhebt.

Weiterhin haben Mäuse, denen dieser Rezeptor lokal im Dorsalhorn fehlt, durchaus ein Schmerzverhalten in der Akutphase. Dieses ist nicht persistent, sodass nach einigen Wochen die mechanische Allodynie soweit rückgängig ist, dass der Ausgangswert wieder erreicht wird.

Darüber hinaus zeigten Autopsien von humanen Patienten die jahrelang unter chronisch neuropathischen Schmerz gelitten haben, eine deutliche Größenabnahme des ipsilateralen Dorsalhorns, was eine Verbindung dieser Arbeit zur menschlichen Physiologie darstellen könnte.

Schlussfolgerung

Neuropathischer Schmerz ähnelt in einigen Eckpunkten einer neurodegenerativen Erkrankung.

Der N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor spielt eine Schlüsselrolle in der Apoptose-Induktion sowie in der Persistenz von neuropathischem Schmerzverhalten. Die Disinhibition infolge des Verlustes von inhibitorischer Signalgebung im Dorsalhorn nach Verlust von inhibitorischen Interneuronen verschiebt das Gewicht von Exzitation und Inhibition in Richtung inhibitorischer Signalgebung. Dies kann zukünftigen pharmakologischen Forschungsprojekten als Ansatz dienen für eine mögliche sekundäre Prävention von chronischem Schmerz nach peripherer Nervenverletzung.