

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Entzündungen und Infektionen führen zu einer Einwanderung von Immunzellen in geschädigtes Gewebe und zur Freisetzung zahlreicher Mediatoren. Diese Mediatoren unterstützen die Immunzellen, sich gegen Gewebetrauma und Infektion zu wehren und fördern den Heilungsprozess. Gleichzeitig können die Mediatoren jedoch auch Schmerzen hervorrufen, indem sie primär sensorische Neurone (die sogenannten „Nozizeptoren“) aktivieren (peripheres Nervensystem, PNS) ¹. Die elektrische Weiterleitung erfolgt über die Hinterstrangbahnen des Rückenmarkes zum Gehirn (zentrales Nervensystem, ZNS). Im Gehirn wird unter Einfluß verschiedener Faktoren (Gemütszustand des Individuums, Erfahrungen der Vergangenheit, usw.) die Empfindung „Schmerz“ wahrgenommen ². Schmerz ist definiert als „eine unangenehme sensorische Wahrnehmung und/oder emotionale Erfahrung, einhergehend mit einer drohenden bzw. gerade sich ereignenden Gewebeschädigung“ ³. Wenn ein unter normalen Umständen schmerzhafter Reiz als schmerzhafter empfunden wird, spricht man von einer Hyperalgesie (International Association for the Study of Pain, IASP). Analgesie ist im Gegensatz dazu definiert als die verringerte Schmerzwahrnehmung eines schmerzhaften Reizes ³.

In den vergangenen über 100 Jahren wurden zahlreiche Medikamente zur Schmerzlinderung entdeckt und weiterentwickelt. Später zeigte sich, dass Substanzen mit vergleichbaren Eigenschaften auch vom Körper selbst produziert werden. Beispielsweise sind Opioide immer noch die stärksten bekannten Medikamente zur Analgesie, und vom Körper werden Opioidpeptide mit ähnlichen analgetischen Eigenschaften produziert (siehe auch 1.2). Opioide verursachen allerdings systemische Nebenwirkungen, wie z.B. Atemdepression, Übelkeit, Erbrechen und Obstipation. Dies limitiert ihre Einsatzmöglichkeiten bzw. schränkt die durch die Schmerzlinderung gewonnene Verbesserung der Lebensqualität ein. Auf Grund dessen zielt die Forschung darauf ab, die lokalen Wirkungen der Opioide und der Opioidpeptide näher zu untersuchen, um in einem nächsten Schritt lokal wirksame Medikamente zu entwickeln, die im Idealfall keine systemischen Nebenwirkungen verursachen.

1.2 Analgetische Wirkung von Immunzellen

Üblicherweise werden Opioidpeptide von Neuronen im zentralen Nervensystem gebildet und zur Analgesie freigesetzt ⁴. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass

auch Immunzellen lokal Opioidpeptide freisetzen und auf diese Art und Weise Schmerzwahrnehmung und -verarbeitung beeinflussen können⁵. Opioidrezeptoren werden in Spinalganglienzellen des Rückenmarkes produziert und zu peripheren sensorischen Nervenendigungen am Entzündungsort transportiert (axonaler Transport)⁶. Es gibt mehrere Opioidpeptide, die an Opioidrezeptoren binden. Hierzu gehören β -Endorphin (END), Leu- und Met-Enkephalin (ENK), Dynorphin (DYN), sowie Endomorphin-1 und -2. Verschiedene Immunzellpopulationen wie Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten/Makrophagen enthalten Opioidpeptide^{5,7}. Nach Stimulation sezernieren sie Opioidpeptide, die an Opioidrezeptoren auf sensorischen Nervenendigungen binden und eine Analgesie auslösen⁷. Der Mechanismus der Immunzellaktivierung und der Opioidpeptidfreisetzung wird im nächsten Abschnitt genauer erläutert. Je nach Entzündungsstadium sind die verschiedenen Immunzellpopulationen zu unterschiedlichen Anteilen involviert: Zu späten Entzündungszeitpunkten (96 h nach Beginn einer experimentell induzierten Entzündung; siehe nächster Absatz) stellen Monozyten/Makrophagen den überwiegenden Anteil der in entzündetem Gewebe vorhandenen Immunzellen dar, während zu früheren Entzündungszeitpunkten (2 h nach Entzündungsbeginn) vorwiegend Granulozyten an der Opioidpeptidproduktion beteiligt sind⁷. Die vorliegende Studie konzentriert sich auf die Wirkung eben dieser Granulozyten. Es wird daher im folgenden näher auf die Granulozyten eingegangen.

Hinweise auf eine analgetische Wirkung von Granulozyten geben z.B. Untersuchungen von Rittner et al. und Stein et al.⁷⁻¹². Im Tiermodell läßt sich eine lokal begrenzte Entzündung durch Injektion von komplettem Freundeschem Adjuvanz (FCA) in die Hinterpfote hervorrufen. Hierbei kommt es in der frühen Entzündungsphase (< 24 Stunden) vornehmlich zur Einwanderung von Granulozyten¹². Diese führt zu einer Hyperalgesie der Rattenpfote. Im Tiermodell ist es nicht möglich, eine subjektive, schmerzhaft empfundene Empfindung direkt zu ermitteln. Messbar sind dagegen Verhaltensweisen nach noxischen Reizen, wie z.B. Abwehr- oder Fluchtbewegungen, die indirekt eine schmerzhaft empfundene Empfindung anzeigen. Bei Berührung der entzündeten Pfote wird das Tier eine Verhaltensreaktion zeigen, die darauf abzielt, den unangenehmen und potentiell schädigenden Reiz zu vermeiden (siehe auch Abschnitt 2.7).

Die in der experimentell induzierten Entzündung nachweisbaren Granulozyten können stimuliert werden und hierdurch Opioidpeptide aus Granula freisetzen. Eine Freisetzung läßt sich experimentell durch lokale Injektion von Corticotropin Releasing Factor (CRF) auslösen. Alternativ erfolgt die Freisetzung auch unter Stressbe-

dingungen (z.B. Kaltwasserschwimmtest; Cold Water Swim Stress (CWS)). Dieser Schwimmstress führt durch Ausschüttung von CRF und Katecholaminen aus sympathischen Nervenendigungen zur Freisetzung von Opioidpeptiden und zur Schmerzhemmung^{5,7,10,11,13}. In einer Studie wurde gezeigt, dass bei Granulozyten-depletierten Tieren die CRF-induzierte Analgesie nahezu aufgehoben ist¹⁴.

1.3 Hyperalgetische Wirkung von Immunzellen

Immunzellen können jedoch auch schmerzverstärkend wirken. Im Entzündungsverlauf werden hyperalgetische Mediatoren wie z.B. Zytokine, Chemokine, Nerve Growth Factor (NGF), Prostaglandine und Adenosintriphosphat (ATP) von eingewanderten Immunzellen oder ortsständigen Zellen freigesetzt¹⁵. Die genannten Substanzen führen zur Aktivierung bzw. Sensitivierung von Nozizeptoren auf sensorischen Nervenendigungen und verursachen damit eine Hyperalgesie^{2,16}. Immunzellen können auf diese Art und Weise über Freisetzung hyperalgetischer Mediatoren wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) zu einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit führen.

Für eine hyperalgetische Wirkung der Granulozyten gibt es in klinischen Studien nur indirekte Hinweise: Jones et al. untersuchten beispielsweise die Neutrophilenmigration in das Knie von Patienten mit rheumatoider Arthritis bzw. Osteoarthritis: Arthritispatienten hatten im Vergleich zu gesunden Menschen eine massive Neutrophilenakkumulation im Kniegelenk, die mit starken Schmerzen einherging. Eine Reduktion der Neutrophilenmigration um 60 % durch intraartikuläre Steroid-Injektion korrelierte mit einem Rückgang der Schmerzen¹⁷. Jedoch lässt sich durch diesen Studienansatz kein selektiver Einfluss auf die Granulozyten belegen. In Tiermodellen fanden sich ebenfalls Hinweise auf eine Rolle der Granulozyten in der Hyperalgesie: Levine et al. rekrutierten mittels Formylpeptiden (fMLP) bzw. Leukotrien B₄ (LTB₄) Granulozyten und stellten fest, dass die durch Injektion dieser Stoffe ausgelöste Hyperalgesie durch Granulozytendepletion reversibel war^{18,19}. Allerdings sind auch diese Ergebnisse nicht eindeutig, da zur Granulozytendepletion unspezifische Verfahren eingesetzt und ein Einfluss auf andere Immunzellpopulationen nicht untersucht wurde.

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, den Widerspruch in den oben genannten Studien zu klären: es wird untersucht, ob eine Erhöhung der Granulozytenzahl im experimentellen Entzündungsmodell (FCA) einen Einfluss auf die Schmerzintensität hat. Um die Beziehung zwischen Granulozyten und Hyperalgesie im entzündeten

Gewebe näher betrachten zu können soll die Migration von Granulozyten ins Gewebe analysiert werden. In einem zweiten Schritt soll die Anzahl der Granulozyten im entzündeten Gewebe variiert und die jeweilige Veränderung der Hyperalgesie untersucht werden.

Chemokine sind ein wesentlicher Faktor der Transmigration der Granulozyten durch das Endothel in entzündetes Gewebe. Sie gehören zu einer Superfamilie mit mehr als 40 bekannten Mitgliedern sehr kleiner Proteine (6-15 kD), die anhand der Position der vier Cysteinreste am Aminoende in Untergruppen klassifiziert werden²⁰⁻²². Entscheidend für die Granulozytenrekrutierung ist die Gruppe der CXC-Chemokine, bei denen auf das CXC-Motiv unmittelbar eine Glutaminsäure-Leucin-Arginin-Sequenz folgt. Das C steht für Cystein, wobei bei den CXC-Chemokinen die beiden Cysteinreste durch eine Aminosäure (X) getrennt sind. Chemokine werden am Ort der Entzündung produziert und auf der luminalen Endothelseite präsentiert²³. Granulozyten erkennen eine Gruppe dieser Chemokine (CXCR2-Liganden) mittels eines spezifischen Rezeptors (CXCR2-Rezeptor). Dieser gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Nach Bindung eines Chemokines an den Rezeptor kommt es über einen intrazellulären Ca^{2+} -Anstieg zur Granulozytenaktivierung^{24,25} und -einwanderung in das entzündete Gewebe²⁶. Bei der Ratte erfolgt die Granulozytenrekrutierung spezifisch und selektiv über den CXCR2-Rezeptor. Für diesen Rezeptor sind vier Liganden bekannt: keratinocyte derived chemokine (KC), cytokine-induced chemokine-2 (CINC-2), macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2), lipopolysaccharide-induced chemokine (LIX). Die Expressionsmuster der vier Chemokine variieren je nach appliziertem Entzündungsstimulus und untersuchtem Gewebe. So wird LIX hauptsächlich im Myokardgewebe exprimiert, während es in Leber- oder Darmgewebe eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint²⁷. Amano et al. untersuchten die Chemokin-Messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Expression in einem Pneumoniemodell der Ratte. Dabei zeigte sich, dass CINC-2-mRNA bereits vor Infektionsbeginn exprimiert wird, während die KC- und MIP-2-mRNA-Expression erst einen Tag nach Infektionsbeginn detektierbar ist²⁸.

Hinsichtlich ihrer Funktion zur Granulozytenrekrutierung ist die Zellselektivität der vier Chemokine entscheidend: Sie rekrutieren selektiv Granulozyten und beeinflussen andere Zellpopulationen, wie z.B. Monozyten nicht. Shibata et al. erreichten mittels kombinierter MIP-2- und CINC-2-Injektion in einer subkutan erzeugten Lufthöhle auf dem Rattenrücken eine Granulozytenrekrutierung, wobei 98 % der rekrutierten

Zellen Granulozyten waren ²⁵. Zur Auslösung einer Granulozytenmigration scheint die Aktivierung des CXCR2-Rezeptors entscheidend zu sein und nicht welches der vier Chemokine diesen Rezeptor aktiviert: Ramallo et al. blockierten bei Mäusen selektiv den CXCR2-Rezeptor und hemmten damit die Granulozytenrekrutierung um 74 %, wohingegen die Monozytenmigration durch diese Blockade keine signifikanten Veränderungen zeigte ²⁹. Da für die Untersuchungen des Zusammenhanges von Granulozyten und Hyperalgesie lediglich eine Veränderung der Granulozytenzahlen wichtig ist, habe ich das Chemokin MIP-2 beispielhaft zur Induktion der Granulozytenmigration herausgegriffen. Zudem scheint die Granulozytenrekrutierung durch MIP-2 effektiver zu sein als durch KC ^{30,31}.

1.4 Methoden zur Quantifizierung einer Hyperalgesie und Analgesie

Zur Quantifizierung der Schmerzschwellen in einem tierexperimentellen Entzündungsmodell ist es möglich, Verhaltensexperimente mit thermalen oder mechanischen Reizen durchzuführen. Dabei wird Hitze oder Druck auf die zu testende Körperregion des Tieres appliziert und die Zeit bzw. das Gewicht bestimmt, bei der bzw. bei dem das Tier beginnt, Fluchtbewegungen zu zeigen. Diese Standardverfahren der Schmerzmessung werden als modifizierte Randall-Sellito-Methode ³² und Methode nach Hargreaves ³³ bezeichnet.

Schmerz und Entzündung führen zu einer Aktivierung von Nozizeptoren. Periphere schmerzhafte Stimuli werden über A δ - und C-Fasern zum zugehörigen Hinterhorn des Rückenmarks geleitet. Hier erfolgt die synaptische Umschaltung auf Fasern, die im Tractus spinothalamicus zu spezifischen Thalamuskernen und von dort nach erneuter Umschaltung zum limbischen System und zum Kortex ziehen. In zahlreichen Studien wurde eine Korrelation zwischen schmerzhaften Reizen und einem Anstieg der Expression des c-Fos-Proteins in den zugehörigen Rückenmarkanteilen nachgewiesen ³⁴⁻³⁶. Diese c-Fos Expression wird also als indirekter Marker einer schmerzhaften Entzündung angesehen. C-Fos gehört zu Gruppe der immediate-early gene-Familie, dessen Expression in recht kurzer Zeit (1-2 h) hochreguliert werden kann. Dabei unterscheidet man zwischen dem Ort der c-Fos-Produktion, der von der Dauer der Reizeinwirkung abhängig ist (akuter oder chronischer Stimulus) und der Höhe der c-Fos-Produktion, die von der Reizintensität gesteuert wird.

Akute Reize führen zu einer c-Fos-Protein-Erhöhung in den oberflächlichen Schichten, v.a. in den Laminae I, II und V. Chronische Reize hingegen veranlassen eine Steigerung des c-Fos-Proteins in den tieferen Rückenmarksschichten (Hals des Hin-

terhorns in den Laminae V und VI, sowie im ventralen Rückenmarkshorn in den Laminae VII, VIII und X) ³⁴⁻³⁶. Abbadie et al. zeigten am Modell der FCA-Injektion in die Rattenhinterpfote, dass 1,5 h nach FCA-Injektion (akuter Stimulus) c-Fos-Protein hauptsächlich in den oberflächlichen Laminae I und II detektiert wird. Mit zunehmender Entzündungsdauer (48 h, chronischer Stimulus) verlagert sich die Aktivierung von c-Fos zu den tieferen Laminae VII und VIII des Rückenmarkes ³⁷. Ein anderes Beispiel für einen akuten Reiz können kurz andauernde gewebschädigende Temperaturen darstellen: Hunt et al. applizierten Hitzeimpulse von 40 °C bzw. 52 °C für jeweils 20 s an eine Rattenhinterpfote ³⁴. Dies führte ebenfalls zur gesteigerten c-Fos-Protein-Produktion in den oberflächlichen Schichten (Laminae I und II) des Hinterhorns.

Je schädigender und je schmerzhafter ein peripherer Reiz ist, desto mehr c-Fos-Protein wird gebildet, d.h. die Menge an c-Fos-Protein im ipsilateralen Hinterhorn des Rückenmarkes steigt mit der Intensität des einwirkenden thermischen, mechanischen oder chemischen Stimulus an. Presley et al. quantifizierten beispielsweise c-Fos-Protein zu verschiedenen Zeitpunkten nach subkutaner Formalin-Injektion (akuter Reiz) in die Rattenhinterpfote und wiesen nach, dass die Expression dosisabhängig durch zusätzliche Injektion von Analgetika (wie z.B. Morphin) verringert bzw. vollständig unterdrückt werden kann ³⁶. Abbadie et al. wiesen nach, dass die Anzahl der c-Fos-positiven Neurone in Ketamin-anästhesierten Ratten mit FCA-induzierter Arthritis (chronischer Reiz) geringer ist, als diejenige in nicht-anästhesierten Ratten. Die Anzahl der c-Fos-positiven Neurone ist bei Ratten mit Arthritis wesentlich höher als in gesunden Ratten ³⁷. Bisher gibt es in der Literatur nur sehr wenige Studien, die den Zusammenhang von c-fos-mRNA und Hyperalgesie näher betrachten. Li et al. untersuchten die c-fos-mRNA nach intraplantarer Formalin-Injektion in eine Rattenpfote. Die vermehrte c-fos-mRNA-Expression in den korrespondierenden Anteilen des Rückenmarkes korrelierte mit einer Hyperalgesie der betroffenen Pfote. Die Hyperalgesie war bereits 30 min nach Injektion nachweisbar ³⁸.

Auf Grund der vorliegenden Literaturdaten bietet die Quantifizierung der c-Fos-Proteinmenge im Rückenmark eine Möglichkeit, Schmerz nicht nur in Verhaltensexperimenten, sondern zusätzlich auch indirekt auf biochemischer Ebene nachzuweisen.

1.5 Fragestellung

Um die mögliche Wirkung der Granulozyten auf Analgesie bzw. Hyperalgesie bei der FCA-induzierten Entzündung der Rattenhinterpfote näher zu untersuchen, sollten folgende Fragen untersucht werden:

- 1) Welche CXCR2-Liganden werden zu welchem Zeitpunkt exprimiert?
- 2) Lassen sich Granulozyten selektiv durch lokale Injektion eines CXCR2-Liganden (MIP-2) rekrutieren?
- 3) Ist es möglich, Granulozyten durch Injektion eines spezifischen Serums (anti-PMN Serum; PMN = polymorphonukleäre Zellen) selektiv zu depletieren?
- 4) Welche Auswirkungen hat die Veränderung der Granulozytenzahl auf das Schmerzempfinden der Ratte?

Teile dieser Untersuchungen sind bereits publiziert ^{9,39}.