

Aus der Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Beitrag des sensorischen und sympathischen Nervensystems zur  
Expression des vaskulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und zur  
Rekrutierung Opioid-haltiger Immunzellen für die Inhibition von  
Entzündungsschmerzen

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ute Brendl  
aus Berlin

---

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Schäfer  
2. Priv.-Doz. Dr. H. Rittner  
3. Prof. Dr. R. Ignatius

Datum der Promotion: 07.09.2012

---

---

Publikation als Resultat dieser Inauguraldissertation:

Mousa SA, Shaqura M, Brendl U, Al-Khrasani M, Furst S, Schafer M. Involvement of the peripheral sensory and sympathetic nervous system in the vascular endothelial expression of ICAM-1 and the recruitment of opioid-containing immune cells to inhibit inflammatory pain. *Brain Behav Immun.* 2010 Nov;24(8):1310-23.

---

---

**Für meine Eltern**

---

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>iv</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>v</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>vi</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Physiologische Bedeutung.....	1
1.1.1 <i>Periphere Opioidrezeptoren</i> .....	1
1.1.2 <i>Opioidpeptide in Immunzellen</i> .....	2
1.1.3 <i>Freisetzung der Opioidpeptide aus Immunzellen und ihre Bedeutung für den Schmerz</i> .....	3
1.1.4 <i>Interaktion von freigesetzten Opioiden aus Immunzellen mit ihren peripheren Rezeptoren</i> .....	5
1.2 Rekrutierung von Immunzellen in entzündetes Gewebe.....	7
1.3 Peripheres sensorisches Nervensystem und Immunsystem.....	9
1.4 Sympathisches Nervensystem und Immunsystem.....	11
1.4.1 <i>Operative und chemische Methoden der Sympathektomie</i> .....	12
1.5 Ziele der Studie.....	13
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
2.1 Tiere.....	15
2.1.1 <i>Aufzucht und Pflege</i> .....	15
2.2 Chemikalien, Seren, modifiziertes Freund's Complete Adjuvant und Antikörper.....	15
2.2.1 <i>Chemikalien</i> .....	15
2.2.2 <i>Seren</i> .....	17
2.2.3 <i>Modifiziertes Freund's Complete Adjuvant</i> .....	17
2.2.4 <i>Primäre Antikörper</i> .....	17
2.2.5 <i>Sekundäre Antikörper</i> .....	17
2.2.6 <i>Technische Hilfsmittel</i> .....	18
Tabelle 2: Technische Hilfsmittel.....	19
2.3 Narkose.....	19
2.3.1 <i>Kurzarkose</i> .....	19

2.3.2	<i>Länger dauernde Narkose</i> .....	19
2.4	Injektionen .....	19
2.4.1	<i>Entzündungsinduktion mit modifiziertem Freund's Complete Adjuvant</i> .....	19
2.4.2	<i>Subkutane Injektion von Capsaicin</i> .....	20
2.4.3	<i>Intraperitoneale Injektion von 6-Hydroxydopamin</i> .....	20
2.5	Perfusion, Gewebeentnahme und Kryoprotektion des Gewebes .....	23
2.5.1	<i>Perfusion und Gewebeentnahme</i> .....	23
2.5.2	<i>Vorbereitung des Gewebes und der Objektträger</i> .....	23
2.6	Immunhistochemie und Immunfluoreszenz .....	23
2.6.1	<i>Immunhistochemische Färbung</i> .....	23
2.6.2	<i>Morphologische Kriterien der immunreaktiven Zellen</i> .....	25
2.6.3	<i>Immunfluoreszenzfärbung</i> .....	25
2.6.4	<i>Quantifikation</i> .....	26
2.7.	Algesiometrie .....	27
2.7.1.	<i>Nozizeptive Schwelle</i> .....	27
2.7.2.	<i>Kaltwasser-Schwimmstress</i> .....	27
2.8	Statistische Analyse .....	28
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>29</b>
3.1	Verlust CGRP-IR subkutaner Nervenendigungen nach Cap-Behandlung .....	29
3.2	Beitrag subkutaner sensorischer Nervenfasern zur Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten während FCA-induzierter Entzündungsschmerzen .....	30
3.3	Lokalisation sensorischer und sympathischer Nervenfasern in enger Nachbarschaft zu endotheliale ICAM-1 in entzündetem subkutanem Pfortengewebe .....	34
3.4	Veränderungen der Expression von Gefäßendothel ICAM-1 durch die De-generation sensorischer Nervenfasern während einer schmerzhaften Entzündung .....	34
3.5	Verlust von subkutanen TH-IR sympathischen Nervenfasern nach 6-OHDA Behandlung .....	36
3.6	Beitrag subkutaner sympathischer Nervenfasern zur Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten während FCA-induzierter Entzündungsschmerzen .....	37
3.7	Veränderungen der Expression von Gefäßendothel ICAM-1 durch die Degeneration subkutaner sympathischer Nervenfasern während einer schmerzhaften Entzündung .....	40

3.8 Einfluss der peripheren sensorischen und sympatischen Nervenfasern auf die lokale Opioid-vermittelte, Schwimmstress-induzierte Inhibition von Entzündungsschmerzen.....	40
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>42</b>
<b>5. Schlussfolgerungen .....</b>	<b>50</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>52</b>
<b>7. Referenzen.....</b>	<b>54</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>66</b>
<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>67</b>
<b>Publikationen &amp; Vorträge .....</b>	<b>67</b>

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Interaktion von Opioiden mit ihren peripheren Opioidrezeptoren in entzündetem Gewebe .....	5
<b>Abbildung 2:</b> Leukozyten-Extravasation.....	8
<b>Abbildung 3:</b> Chemische Strukturformel von Capsaicin.....	10
<b>Abbildung 4:</b> Chemische Strukturformel von 6-OHDA im Vergleich zu Noradrenalin..	13
<b>Abbildung 5:</b> Schematische Darstellung der Injektionen von FCA und Cap .....	22
<b>Abbildung 6:</b> Schematische Darstellung der Injektionen von FCA und 6-OHDA .....	22
<b>Abbildung 7:</b> Avidin-Biotin-Methode .....	25
<b>Abbildung 8:</b> Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CGRP-IR Nerven innerhalb peripherer Nerven (A, D) und von TH-IR Nervenfasern innerhalb peripherer Nerven (B, E) und in Blutgefäßen (C, F) nach Vehikel- (A, B, C) oder Cap- (D) bzw. 6-OHDA Behandlung (E, F) .....	30
<b>Abbildung 9:</b> Immunhistochemische Lokalisation (I) und quantitative Analyse (II) von END-IR (A, B, E) und ENK-IR (C, D, F) Immunzellen 6 h nach FCA. Cap (B, D) vs. Vehikel (A, C).....	32
<b>Abbildung 10:</b> Immunhistochemische Lokalisation (I) und quantitative Analyse (II) von END-IR (A, B, II E) und ENK-IR (D, I E, II F) Immunzellen 4 d nach FCA, Cap (B, I E) vs. Vehikel (A, D). Präabsorption des END (C) oder ENK (I F) Antiserums. ....	33
<b>Abbildung 11:</b> Konfokale Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie von ICAM-1 (A, D, G) (rot) und CGRP- (B) oder TH- (E, H) Immunoreaktivität (grün) in FCA-entzündetem subkutanem Pfortengewebe. Kombinierte Aufnahmen von ICAM-1 und CGRP (C) oder ICAM-1 und TH (F, I) .....	35
<b>Abbildung 12:</b> Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von ICAM-1 (A-H) (rot) im subkutanen Pfortengewebe 6 h (A, B, E, F) und 4 d (C, D, G, H) nach FCA und Behandlung mit Cap (B, D) oder 6-OHDA (F, H) und den Vehikeln (A, C und E, G).....	36
<b>Abbildung 13:</b> Immunhistochemische Lokalisation (I) und quantitative Analyse (II) von END-IR (A, B, E) und ENK-IR (C, D, F) Immunzellen 6 h nach FCA, 6-OHDA (B, D) vs. Vehikel (A, C).....	38

**Abbildung 14:** Immunhistochemische Lokalisation (I) und quantitative Analyse (II) von END-IR (A, B, E) und ENK-IR (C, D, F) Immunzellen 4 d nach FCA, 6-OHDA (B, D) vs. Vehikel (A, C)..... 39

**Abbildung 15:** Zeitverlauf des PPT nach CWS in der entzündeten (gefüllte Kreise) im Vergleich zur kontralateralen nicht entzündeten (leere Kreise) Pfote nach FCA (A). Einfluss der intraplantaren Injektion von Naloxon auf den Maximaleffekt der CWS-induzierten PPT-Erhöhung (B)..... 41

### **Tabellenverzeichnis**

**Tabelle 1:**

Chemikalien..... 15

**Tabelle 2:**

Technische Hilfsmittel..... 18

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ABC</b>	Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AR</b>	Adrenozeptor
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin 30%
<b>CAP</b>	Capsaicin (8-Methyl-N-Vanillyl-6-Nonenamid)
<b>CGRP</b>	Calcitonin Gene-Related Peptide
<b>CRF</b>	Corticotropin Releasing Faktor
<b>CWS</b>	cold water swim
<b>DAB</b>	Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
<b>DRG</b>	sensibles Rückenmarksganglion
<b>DYN</b>	Dynorphin
<b>EDA</b>	Epiduralanästhesie
<b>END</b>	$\beta$ -Endorphin
<b>ENK</b>	Methionin-Enkephalin
<b>FCA</b>	modifiziertes Freund's complete adjuvant
<b>FITC</b>	Fluorescein
<b>GCSx</b>	Ganglionektomie des Ganglion zervikale superius
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IGSF</b>	Immunglobulin-Superfamilie
<b>IL</b>	Interleukin
<b>INF-<math>\gamma</math></b>	Interferon- $\gamma$
<b>i.p.</b>	intraperitoneal
<b>i.pl.</b>	intraplantar
<b>IR</b>	Immunoreaktivität
<b>LFA-1</b>	Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen

<b>LK</b>	Lymphknoten
<b>NA</b>	Norardenalin
<b>NGF</b>	Nervenwachstumsfaktor
<b>NKA</b>	Neurokinin A
<b>NK-1R</b>	Neurokinin-1-Rezeptor
<b>NPY</b>	Neuropeptid Y
<b>6-OHDA</b>	6-Hydroxydopamin
<b>PAR-2</b>	Proteinase-aktivierter Rezeptor -2
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung
<b>PCIA</b>	Patienten-kontrollierte intravenöse Analgesie
<b>PENK</b>	Pro-Enkephalin
<b>PDYN</b>	Prodynorphin
<b>PMN</b>	Polymorphonukleäre Immunzellen
<b>POMC</b>	Proopiomelanocortin
<b>PPT</b>	paw pressure threshold
<b>s.c.</b>	subkutan
<b>SEM</b>	Standardabweichung
<b>SNS</b>	sympathisches Nervensystem
<b>SP</b>	Substanz P
<b>TH</b>	Thyrosinhydroxylase
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor- $\alpha$
<b>VIP</b>	vasoaktives intestinales Polypeptid
<b>VRST-1</b>	Vanilloid-Rezeptor Subtyp-1
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## 1. Einleitung

### 1.1 Physiologische Bedeutung

Im Rahmen eines entzündlichen Geschehens wandern Immunzellen in das Entzündungsgebiet ein und bekämpfen die Entzündungsursache durch Antikörperausschüttung und zytotoxische Effekte. Des Weiteren spielen Immunzellen eine wichtige Rolle bei der körpereigenen (endogenen) Schmerzhemmung. Sie synthetisieren Opioidpeptide, hauptsächlich  $\beta$ -Endorphin (END) und Methionin-Enkephalin (ENK), und können diese im entzündeten Gewebe freisetzen. Die sezernierten Opioidpeptide binden an in der Nähe befindlichen Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Nervenfasern (C-Fasern) und führen zu wirksamer Analgesie (Przewolocki et al., 1992; Stein C, 1995; Cabot PJ et al., 1997, 2001; Mousa SA et al., 2001).

Der Begriff Analgesie umfasst alle Dimensionen (sensorisch, emotional-affektiv, kognitiv) der menschlichen Wahrnehmung einer Abnahme von Schmerzen. In dieser Arbeit wird der Begriff Analgesie verwendet, wenn es sich um klinische Studien an Patienten handelt. Im Gegensatz dazu spricht man von Antinozizeption über die ausschließlich sensorische Komponente, bei der die Weiterleitung schmerzhafter Stimuli über das Nervensystem reduziert ist. Dieser Begriff wird im Zusammenhang mit Tierexperimenten verwendet.

#### 1.1.1 Periphere Opioidrezeptoren

Alle drei Typen von Opioidrezeptoren ( $\mu$ -,  $\delta$ -,  $\kappa$ -) sind auf peripheren sensorischen Nervenendigungen lokalisiert (Stein C et al., 1989). Ihre Aktivierung durch Opioide führt zu einer potenten Antinozizeption bei Tieren oder zur Analgesie beim Menschen (Fields HL et al., 1980; Stein C et al., 1990; Stein C et al., 1996; Zhou L et al., 1998). Die Zellkörper der peripheren sensorischen Neurone exprimieren die mRNA sowie die entsprechenden Proteine der Opioidrezeptoren (Stein C et al., 2001). Die Opioidrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren ( $G_i$  und/oder  $G_0$ ) und vermitteln ihre inhibitorischen Effekte an primär afferenten Nerven hauptsächlich über die Modulation von spannungsaktivierten Kalziumkanälen (Jiang M et al., 1998; Borgland SL et al., 2001; Stein C et al., 2001). Während einer Entzündung im peripheren Gewebe werden die lokalen Opioid-vermittelten antinozizeptiven Effekte signifikant verstärkt (Schäfer M et al., 1995; Stein C et al., 2001). Die Synthese der

Opioidrezeptoren in den sensiblen Rückenmarksganglien (DRG) wird gesteigert (Ji RR et al., 1995; Zhang Q et al., 1998) und innerhalb weniger Tage nach Entzündungsinduktion nimmt der axonale Transport der Opioidrezeptoren stark zu (Abbildung 1). Dadurch kommt es zu einer Hochregulation der Rezeptoren an den peripheren Nervenendigungen der sensorischen Neurone (Hassan AH et al., 1993; Mousa SA et al., 2001). Zusätzlich wird durch das besondere Milieu im entzündeten Gewebe (z. B. niedriger pH-Wert) die G-Protein Kopplung von Opioidrezeptoren effizienter. Die Entzündung induziert eine Zunahme der peripheren sensorischen Nervenendigungen, ein Vorgang, den man „sprouting“ nennt. Zusätzlich zerreißen die perineuralen Hüllen, wodurch der Zugang der Opioidagonisten zu ihren Rezeptoren erleichtert wird (Stein C et al., 2001). Das Vorhandensein von Opioidrezeptoren wurde ebenfalls auf Immunzellen nachgewiesen (Hassan AH et al., 1993; Sharp BM, 2002). Dort sind sie an der Steuerung von Proliferation, Chemotaxis, Zytokinproduktion und Mastzelldegranulation beteiligt (Carr DJ, 1991).

#### 1.1.2 Opioidpeptide in Immunzellen

Opioidpeptide sind die natürlichen Liganden der Opioidrezeptoren. Im zentralen Nervensystem (ZNS) und im endokrinen System wurden drei Familien ausführlich untersucht, die Endorphine, Enkephaline und Dynorphine. Jede Familie ist auf einem bestimmten Gen codiert und wird aus den entsprechenden Vorläuferproteinen gewonnen. Die Endorphine entstehen aus Proopiomelanocortin (POMC), die Enkephaline aus Proenkephalin (PENK) und entsprechend Dynorphin (DYN) aus Prodynorphin (PDYN). Die Opioidpeptide zeigen unterschiedliche Selektivität und Affinität für die drei Opioidrezeptoren:  $\mu$  (END und ENK),  $\delta$  (ENK und END) und  $\kappa$  (DYN) (Höllt V, 1986; Millan MJ, 1986).

Blalock konnte als einer der ersten die POMC-Expression durch Immunzellen zeigen (Blalock JE, 1994). Sitte et al. gelang der Nachweis von Exon 1-3 beinhaltender POMC mRNA, also des kompletten POMC-Transkripts, in Lymphozyten der drainierenden poplitealen Lymphknoten (LK) von Ratten mit FCA-induzierter Hinterpfotenentzündung (Sitte N et al., 2007). Exon 1 des POMC-Gens codiert für die Promotorregion und die mRNA Cap-Region, welche normalerweise nicht translatiert werden. Exon 2 enthält die Signalpeptidsequenz, die für den Transport des entstehenden Polypeptids in das Endoplasmatische Retikulum notwendig ist (Kalies KU, Hartmann E, 1998). Die

funktionell aktiven Peptide Adrenocorticotropes Hormon (ACTH), Melanozytenstimulierendes Hormon (MSH) und END sind auf Exon 3 codiert (Drouin J et al., 1985).

In den Immunzellen vieler Vertebraten, unter anderem bei Menschen und Ratten, wurde END, welches neben ACTH und MSH während der posttranslationalen Prozessierung von POMC entsteht, inzwischen nachgewiesen (Ottaviani E et al., 1997; Mousa SA et al., 2004). Zusätzlich gelang die Darstellung der Kollokalisierung von POMC und END in verschiedenen Immunzell-Subtypen mittels Immunhistochemie und Immunfluoreszenz (Mousa SA et al., 2004; Sitte N et al., 2007). Ein signifikanter, bis zweifacher Anstieg der END-Immunoreaktivität (END-IR) konnte in den poplitealen LK 12, 24 und 48 Stunden nach FCA-induzierter Hinterpfotenentzündung bei Ratten mittels Radio-Immunoassay gezeigt werden (Sitte N et al., 2007). Die zur Prozessierung von POMC zu END benötigten Enzyme, die aus intensiven Studien des Hypophysenzwischenlappens bekannt sind (Benjannet S et al., 1991; Marcinkiewicz M et al., 1993; Seidah NG et al., 1999; Mbikay M et al., 2001), ließen sich in Immunzellen ebenfalls nachweisen (Mousa SA et al., 2004; Lansac G et al., 2006).

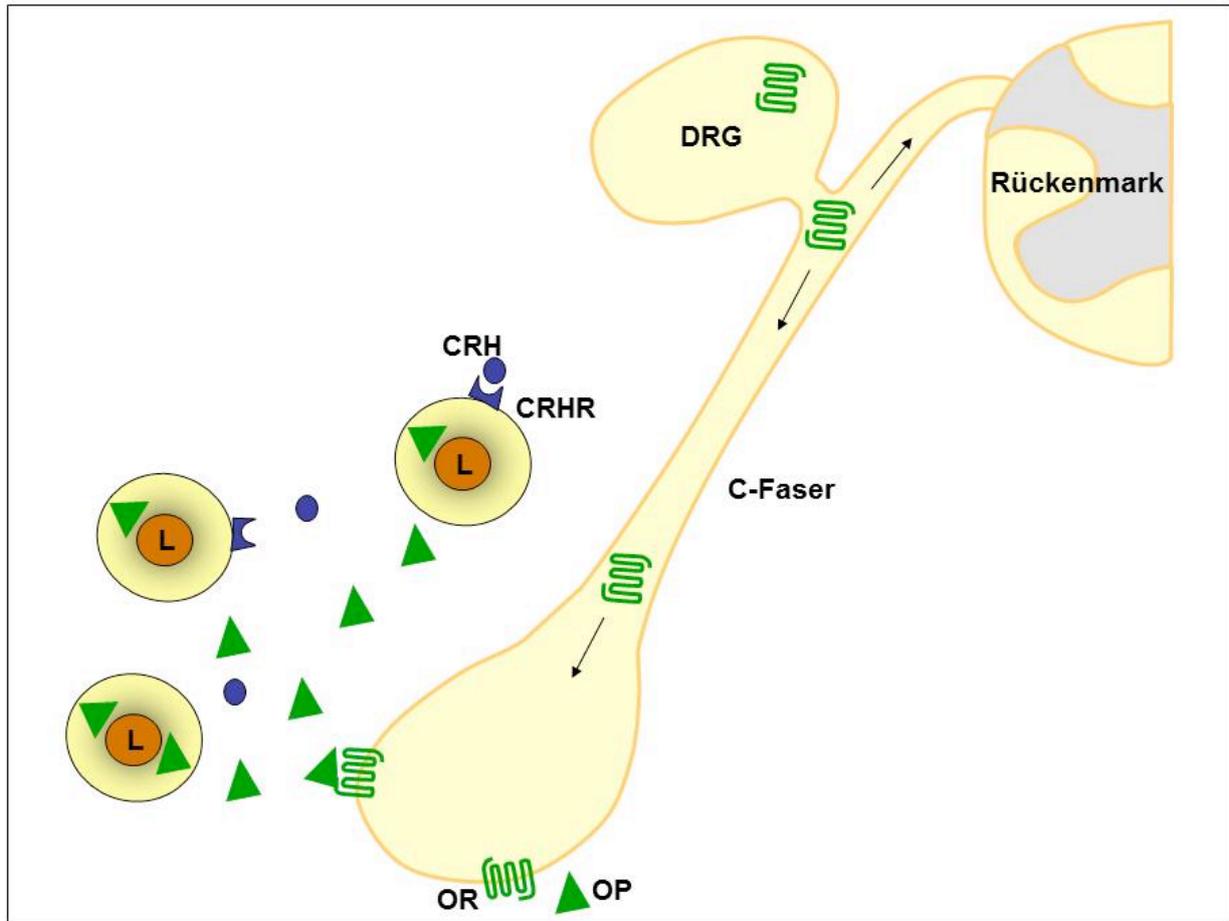
PENK abhängige Opioidpeptide wurden ebenfalls in Immunzellen von Menschen und Nagetieren entdeckt. Dabei gelang es die mRNA und das Peptid von ENK in Immunzellen nachzuweisen (Linner KM et al., 1996). Während einer schmerzhaften Entzündung lassen sich POMC, POMC mRNA, END und ENK in zirkulierenden Immunzellen, in Immunzellen im entzündeten Subkutangewebe sowie in Immunzellen der drainierenden LK darstellen. Unter Entzündungsbedingungen wird die Synthese der Opioidpeptide in Lymphozyten, Granulozyten, Monozyten und Makrophagen gesteigert (Carr DJ, 1991; Przewlocki R et al., 1992; Cabot PJ et al., 1997, 2001; Mousa SA et al., 2004; Sitte N et al., 2007). Diese Entdeckungen zeigen, dass lokale Signale, die im Rahmen einer Entzündung erzeugt werden, die Synthese von Opioidpeptiden in verschiedenen Arten von Immunzellen stimulieren können. Nach Sekretion der Opioidpeptide können diese ihre peripheren Opioidrezeptoren aktivieren und eine lokale Antinozizeption auslösen.

### 1.1.3 Freisetzung der Opioidpeptide aus Immunzellen und ihre Bedeutung für den Schmerz

In der Hypophyse können END und andere von POMC abstammende Peptide (z. B. ACTH) durch Corticotropin Releasing Hormon (CRH) freigesetzt werden. Dieser

„releasing“ Faktor stammt aus dem Hypothalamus und kontrolliert die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrindenachse. Dadurch ist CRH Hauptregler der endokrinen, neuroendokrinen und autonomen Reaktionen und Verhaltensweisen auf Stress. CRH kann die Abwehrreaktionen des Körpers auf Stress regulieren, indem es Überschussreaktionen verhindert und die Homöostase des Körpers schützt (Munck A et al., 1984).

Es wurde gezeigt, dass CRH und sein Rezeptor nicht nur im ZNS, sondern auch auf Immunzellen, Fibroblasten und Gefäßendothelzellen vorkommen (Croffort LJ et al., 1992; Mousa SA et al., 1996). Im entzündeten peripheren Gewebe induziert CRH dosisabhängig und rezeptorspezifisch die Sekretion von END und ENK aus aktivierten Immunzellen in vitro (Kavelaars A et al., 1990; Schäfer et al., 1994, Cabot PJ et al., 2001) und aus ortsansässigen Immunzellen in vivo (Kavelaars A et al., 1990; Schäfer M et al., 1994, 1996; Cabot PJ et al., 1997, 2001) (Abbildung 1). Die Opioidpeptide werden aus präformierten Vesikeln ausgeschüttet, ein Prozess, der  $Ca^{2+}$ -abhängig ist (Cabot PJ et al., 1997; Mousa SA et al., 2004). Experimenteller Stress bei Tieren wie beispielsweise erzwungenes Schwimmen in kaltem Wasser für eine Minute (cold water swim, CWS) oder postoperativer Stress bei Patienten führt in entzündeten Geweben zur vorübergehenden Freisetzung von END und ENK aus Immunzellen, die in das Entzündungsgebiet einwandern. Die Opioidpeptide binden an periphere Opioidrezeptoren auf nahe gelegenen sensorischen Nervenfasern und führen zu potenter, nachweisbarer Antinozizeption bei Tieren und bewirken eine klinisch relevante Analgesie bei Patienten. In gesundem Gewebe, wie der kontralateralen, nicht mit FCA entzündeten Rattenpfote, konnte eine Einwanderung Opioid-haltiger Immunzellen nicht gezeigt werden (Stein C et al., 1993; Schäfer M et al., 1996). Lokale Injektionen von nichtselektiven Opioidantagonisten in kleinen, systemisch inaktiven Dosen blockierten dosisabhängig und stereospezifisch die Stress induzierte Antinozizeption, was auf periphere Wirkstellen hinweist (Stein C et al., 1990). In der entzündeten Pfote verhinderten die Immunsuppression mittels Cyclosporin A- (Stein C et al., 1990; Schäfer M et al., 1994) oder Cyclophosphamidgabe (Zöllner C et al., 2008) die Opioid-vermittelte Antinozizeption. Das Vorliegen einer Entzündung und ein intaktes Immunsystem bilden die notwendigen Voraussetzungen der peripheren, endogenen Opioid-vermittelten Antinozizeption.



**Abbildung 1:** Interaktion von Opioiden mit ihren peripheren Opioidrezeptoren in entzündetem Gewebe. Opioidrezeptoren (OR) werden in den Rückenmarksganglien (DRG) synthetisiert und entlang der zentralen und peripheren Fortsätze der primär afferenten Nerven (C-Fasern) transportiert. Infolge einer Aktivierung durch Stress oder durch die Bindung von Corticotropin Releasing Hormon (CRH) an den Corticotropin Releasing Hormon-Rezeptor (CRHR) setzen Immunzellen Opiode (OP) frei, welche die peripheren Opioidrezeptoren aktivieren und zu Antinozizeption führen.

#### 1.1.4 Interaktion von freigesetzten Opioiden aus Immunzellen mit ihren peripheren Rezeptoren

Eine zentrale Opioid-vermittelte Schmerzhemmung wurde erstmals postuliert nachdem gezeigt werden konnte, dass die elektrische Stimulation bestimmter Hirnregionen eine potente Antinozizeption auslöst und diese Antinozizeption durch die Gabe von Opioidantagonisten blockiert bzw. durch lokale Opiatinjektionen imitiert werden konnte. Zu den strukturellen Komponenten dieses zentralen absteigenden Schmerzhemmungssystems gehören das periaquäduktale Höhlengrau im Mittelhirn, der Nucleus raphe magnus und Nucleus reticularis magnocellularis im rostroventralen Bereich der Medulla oblongata sowie die Substantia gelatinosa im Hinterhorn des Rückenmarks (Terman

GW et al., 1984). Das periaquäduktale Höhlengrau ist reich an Opioidpeptiden und Opioidrezeptoren. Efferente Neurone des periaquäduktalen Höhlengraus zum Nucleus raphe magnus und zum benachbarten Nucleus reticularis magnocellularis werden über eine opioiderge Hemmung inhibitorischer Interneurone aktiviert. Die efferenten Fasern aktivieren Serotonin-haltige Zellen des Nucleus raphe magnus und Nucleus reticularis magnocellularis, deren efferente Axone im Funiculus dorsolateralis des Rückenmarks verlaufen und schmerzleitende Neurone im Hinterhorn inhibieren. Diese schmerzleitenden Neurone werden synaptisch mit C-Fasern aus der Peripherie verschaltet und aktivieren über eine Feedback-Schleife das absteigende Schmerzhemmungssystem des periaquäduktalen Höhlengraus und Nucleus raphe magnus (Basbaum AI, Fields HL, 1984). Neben dieser zentralen Opioid-vermittelten Antinozizeption kann auch in entzündeten peripheren Geweben eine potente Antinozizeption durch die Freisetzung von END und ENK aus Immunzellen erzielt werden (Machelska H, Stein C, 2002).

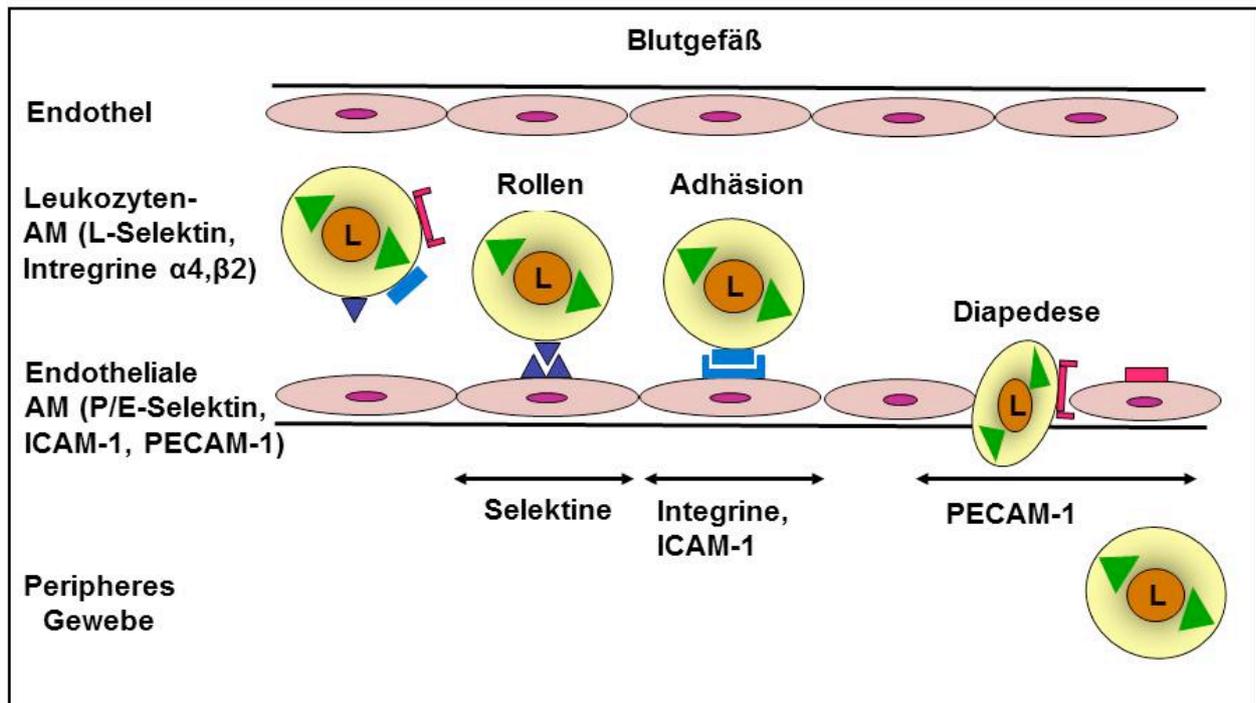
Zu späteren Zeitpunkten, 4-6 Tage (d), nach Entzündungsinduktion mit Freund's complete adjuvant (FCA) in Ratten spielt hauptsächlich END eine Rolle bei der CWS induzierten Antinozizeption. Die Wirkung beruht vorwiegend auf der Bindung an  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptoren (Stein C et al., 1990). ENK und DYN sowie  $\kappa$ -Rezeptoren sind zu diesen späteren Zeitpunkten nicht involviert. 4 d nach Entzündungsauslösung durch FCA triggert CRH als wichtiges endogenes Agens die CWS-induzierte Antinozizeption. Auf einen Stressreiz hin kann CRH lokal im entzündeten Gewebe sezerniert werden und seine Rezeptoren auf Immunzellen aktivieren. Die Immunzellen schütten daraufhin Opioide aus, die an Opioidrezeptoren auf sensorischen Nerven binden und so zu einer verminderten Schmerzwahrnehmung führen (Schäfer M et al., 1996) (Abbildung 1). Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmaß der endogenen Schmerzhemmung proportional zur Anzahl der Opioid-haltigen Immunzellen im entzündeten Pfortengewebe ist. Verschiedene Arten von Immunzellen tragen dazu in unterschiedlichen Entzündungsstadien bei (Rittner HL et al., 2001). In der frühen Entzündungsphase (6 h FCA) wandern überwiegend Opioid-haltige Granulozyten (PMN) in das Entzündungsgebiet ein und vermitteln durch ihre Opioide die Antinozizeption. In der späten Entzündungsphase (4 d FCA) sind mononukleäre Immunzellen (80-85 % Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten) vorherrschend (Mousa SA et al., 2000; Rittner HL et al., 2001; Machelska H et al., 2003).

Die Immunzellen im Entzündungsgebiet stellen die Quelle der Opioidpeptide dar. Dies wurde durch das Fehlen der CWS- und CRH induzierten Antinozizeption bei Immunsuppression nach Behandlung mit Cyclosporin A sowie durch das Fehlen der Antinozizeption nach Blockade der Selektin-abhängigen Extravasation Opioid-haltiger Immunzellen verdeutlicht (Stein C et al., 1990; Schäfer M et al., 1994; Machelska H et al., 1998; Machelska H, Stein C, 2000).

## 1.2 Rekrutierung von Immunzellen in entzündetes Gewebe

Die Rekrutierung der Immunzellen wird unter anderem durch Chemokine (chemotaktische Zytokine) vermittelt (Rossi D, Zlotnik A, 2000), die im Entzündungsgebiet von ortsansässigen Zellen (z. B. Alveolarmakrophagen), Endothelzellen und einwandernden Immunzellen sezerniert werden. Die Chemokine werden an Glykosaminoglykanen auf dem entzündeten Endothel präsentiert und agieren mit Chemokinrezeptor-tragenden Immunzellen. Dadurch kommt es zu einer gesteigerten Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf Endothel- und Immunzellen und nachfolgend zu Rollen, fester Adhäsion und transendothelialer Migration der Immunzellen (Middleton J et al., 2002).

Initial werden die Leukozyten abgefangen und rollen entlang der Gefäßendothelzellen. Dieser Schritt wird hauptsächlich durch Selektine kontrolliert. Selektine sind Glykoproteine auf der Zelloberfläche von Leukozyten (L-Selektin), Endothelzellen (P-, E-Selektin) und Thrombozyten (P-Selektin). Sie interagieren mit ihren jeweiligen Liganden auf Endothel- und Immunzellen. Durch das Rollen werden die Immunzellen aktiviert, was zu einer Hochregulation und erhöhten Bindungsbereitschaft der Leukozytenintegrine  $\alpha/\beta 2$  (CD11/CD18) und  $\alpha 4\beta 1$  (CD49d/CD29; very late antigen-4; VLA-4) durch die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren führt. Integrine sind eine weit verbreitete Familie heterodimerer Membranmoleküle, welche die feste Adhäsion der Leukozyten an die Endothelzellen steuern. Dies geschieht durch die Interaktion mit Liganden der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF), z. B. dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1/CD54), welches unter anderem von Endothelzellen und Leukozyten exprimiert wird (Veihelmann A et al., 1999). ICAM-1 ist ein 90-kDa grosses, induzierbares Zelloberflächen-Glykoprotein und eines der wichtigsten Moleküle für die feste Adhäsion und die Diapedese von Immunzellen (Springer TA, 1990; Butcher EC, Picker LJ, 1996; Petruzzelli L et al., 1999). Unter Einbeziehung



**Abbildung 2:** Leukozyten-Extravasation. Die Rekrutierung der Immunzellen aus der Zirkulation in das Entzündungsgebiet ist ein komplexer Vorgang, der aus mehreren Teilschritten besteht und durch verschiedene Adhäsionsmoleküle auf Leukozyten und Endothelzellen vermittelt wird. Die Immunzellen bleiben am Endothel haften und rollen an ihm entlang. Ein Vorgang, der hauptsächlich durch Selektine gesteuert wird. Integrine auf der Oberfläche der Leukozyten, vor allem  $\alpha 4$  und  $\beta 2$ , bewirken ihre feste Adhäsion an den Endothelzellen. Integrine interagieren mit Liganden der IgSF (z.B.  $\beta 2$  mit ICAM-1). Infolge kommt es, unter anderem durch PECAM-1 vermittelt, zur Transmigration der Immunzellen durch das Endothel. L, Leukozyt. AM, Adhäsionsmolekül. ICAM-1, interzelluläres Adhäsionsmolekül-1. PECAM-1, Thrombozyten-Endothelzelladhäsionsmolekül-1.

weiterer Mitglieder der IgSF, hauptsächlich dem Thrombozyten-Endothelzelladhäsionsmolekül-1 (PECAM-1/CD31), wandern die Leukozyten zwischen den Endothelzellen hindurch und werden zum Entzündungsgebiet gelotst (Abbildung 2). Dort initiieren sie eine Abwehrreaktion (Springer TA, 1994; Butcher EC, Picker LJ, 1996; Brown E, 1997).

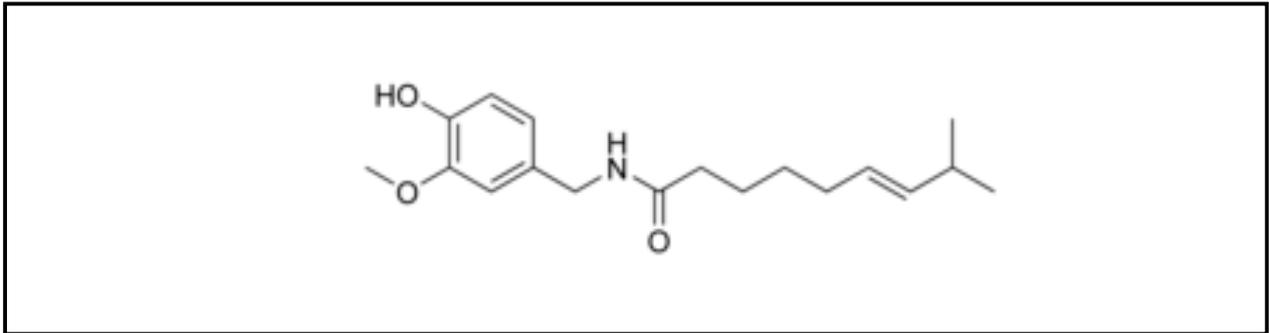
In den letzten Jahren konnten wir zeigen, dass die Immunzellrekrutierung nicht ausschliesslich die Initiierung einer Immunantwort zur Folge hat, sondern dass dieselben Mechanismen involviert sind, wenn die Kontrolle von Entzündungsschmerzen im Vordergrund steht. Eine schmerzhaft Entzündung führt zur Hochregulation von P-Selektin und PECAM-1 auf Endothelzellen und zu einer simultanen Einwanderung END-haltiger Leukozyten in das entzündete subkutane Pfortengewebe. END-haltige Leukozyten co-exprimieren L-Selektin (Mousa SA et al., 2000). Die Blockade von Selektinen durch Fucoidin führte zur verminderten Einwanderung END-haltiger

Immunzellen in entzündetes Pfortengewebe von Ratten. Dadurch war der END-Gehalt im Gewebe verringert und die Opioid-vermittelte Antinozizeption beeinträchtigt (Machelska H et al., 1998). Die Blockade von hochreguliertem ICAM-1 reduzierte ebenfalls die Extravasation von Opioid-haltigen Immunzellen in entzündetes Pfortengewebe von Ratten mit FCA-induzierter Entzündung und infolgedessen die lokale Opioid-vermittelte Antinozizeption (Machelska H et al., 2002).

### **1.3 Peripheres sensorisches Nervensystem und Immunsystem**

Bei den Vertebraten sind primär afferente Neurone aus pseudounipolaren Nervenfasern aufgebaut. Ihre Zellkörper liegen in den DRG bzw. für die Hirnnerven im Ganglion trigeminale. Der zentrale Fortsatz der primär afferenten Nerven wird im Hinterhorn des Rückenmarks auf das folgende zweite sensorische Neuron synaptisch umgeschaltet. Der periphere Fortsatz endet in der Haut oder in den serösen Häuten der inneren Organe. Es werden myelinisierte (A $\delta$ ) und dünne, unmyelinisierte Nervenfasern unterschieden. Letztere werden auch C-Fasern genannt und sind bekannt für ihre besondere Empfindlichkeit gegenüber Capsaicin (Abbildung 3). Capsaicin (Cap) ist ein aus Pflanzen der Gattung Capsicum gewonnenes Alkaloid, welches experimentell oft für die selektive Ausschaltung der C-Fasern genutzt wird. Die Behandlung mit Cap führt zu einer selektiven Zerstörung der C-Fasern, indem Cap an den Vanilloid-Rezeptor (Vanilloid Rezeptor Subtyp-1, VRST-1), einen metabotropen Ca<sup>2+</sup>-Ionenkanal, auf den C-Fasern bzw. A $\delta$ -Fasern bindet. Es erfolgt daraufhin ein erhöhter Kalziumeinstrom in die Nervenzellen. Das Kalzium aktiviert Kalzium-aktivierte Proteasen, unter anderem Caspasen, wodurch eine Apoptose eingeleitet wird (Chard PS et al., 1995; Hail N, 2003). A $\delta$ - und C-Fasern sind beide in der Lage, Schmerzreize von der Peripherie zum Rückenmark zu vermitteln.

Es existieren zunehmende Nachweise dafür, dass sensorische Nervenfasern über eine Ausschüttung von Neuropeptiden wie Substanz P (SP), Calcitonin-gene related-peptide (CGRP) und Neurokinin A (NKA) an subkutanen und synovialen Entzündungsprozessen beteiligt sind (Matucci-Cerinic M, Partsch G, 1992). SP gehört zu den Tachykininen, einer Familie von Peptiden, welche die gleiche C-Terminalsequenz Phe-X-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> besitzen (Erspamer V, 1981).



**Abbildung 3:** Chemische Strukturformel von Capsaicin

SP und CGRP werden bei Entzündungen, z. B. bei der FCA-induzierten Pfotenentzündung der Ratte im DRG hochreguliert, axonal verstärkt in die Peripherie transportiert und vermehrt im entzündeten Gewebe ausgeschüttet (Donnerer J et al., 1992). Fünf Tage nach Entzündungsinduktion mit FCA stiegen die SP- und CGRP-Levels im Nervus ischiadicus signifikant an. In den entsprechenden DRG zeigte sich ebenfalls ein, wenn auch nicht signifikanter, Anstieg (Donnerer J et al., 1992).

SP und CGRP binden an ihre entsprechenden Rezeptoren auf in der Haut befindlichen Immunzellen. SP bindet an den Neurokinin-1-Rezeptor (NK-1R), welcher sich auf Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten nachweisen liess (Ho WZ et al., 1997; Lai JP et al., 1998; Cao T et al., 2000). CGRP bindet an spezifische Rezeptoren, die bisher auf Lymphozyten (Wang X et al., 1995), einer Makrophagen-ähnlichen Zelllinie (Abello J et al., 1991) und auf unreifen dendritischen Zellen (Dunzendorfer S et al., 2001) nachgewiesen wurden.

Viele Studien weisen darauf hin, dass die Effekte der sensorischen Neuropeptide auf die zellvermittelte Immunität stimulierender Natur sind. Sie können mononukleäre Immunzellen (Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten) sowie PMN aktivieren und Proliferation, Antikörpersynthese und -sekretion, Chemotaxis (Matucci-Cerinic M, Partsch G, 1992; Reinisch N et al., 1993), Zytokinproduktion und -sekretion, Phagozytose und Ausschüttung lysosomaler Enzyme auslösen (Brunelleschi S et al., 1998; Ho WZ et al., 1998; Hernanz A et al., 2003).

Die Freisetzung von Neuropeptiden aus peripheren sensorischen Nerven kann durch verschiedene Mediatoren erfolgen. Mittlerweile sind viele Mediatoren identifiziert worden, die diese Freisetzung direkt (Bradykinin, Hitze, Wasserstoffionen) oder indirekt (Adenosintriphosphat, Zytokine, Prostaglandine) induzieren können [zusammengefasst

von Richardson JD, Vasko MR, 2002]. Den freigesetzten Neuropeptiden SP und CGRP wird eine wichtige Bedeutung bezüglich der Immunzellrekrutierung beigemessen. Für diese beiden Neuropeptide wurde in vitro und in vivo ein chemotaktischer Effekt auf verschiedene Immunzellen nachgewiesen (Matucci-Cerinic M, Partsch G, 1992; Schratzberger P et al., 1997). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass SP und CGRP an der Expression der Adhäsionsmoleküle P- und E-Selektin auf Gefäßendothelzellen beteiligt sind (Smith CH et al., 1993). Selektine bewirken ein Rollen der Immunzellen auf dem Endothel, was dem ersten Schritt der Rekrutierung entspricht (Abbildung 2).

In den letzten Jahren hat zusätzlich der Proteinase-aktivierte Rezeptor-2 (PAR-2) in diesem Zusammenhang das Interesse verschiedener Arbeitsgruppen geweckt. PAR-2 ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, der am N-Terminal durch Trypsin gespalten wird. Die dann demaskierte N-Terminalsequenz agiert als Ligand und aktiviert den Rezeptor selbst (Nystedt S et al., 1995). PAR-2 wird auf Immunzellen, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und peripheren sensorischen Nerven, speziell auf C-Fasern, exprimiert. Die PAR-2 Aktivierung auf C-Fasern führt zu einer Freisetzung von SP und CGRP (Steinhoff M et al., 2000; Hoogerwerf WA et al., 2001). Untersuchungen an einem Mausmodell für Kolon-Entzündung zeigten einen Beitrag des PAR-2 peripherer sensorischer Nerven zur Rekrutierung von Granulozyten ins Entzündungsgebiet (Fiorucci S et al., 2001; Cenac N et al., 2003).

#### **1.4 Sympathisches Nervensystem und Immunsystem**

Werden afferente schmerzleitende Nervenfasern im Rahmen einer schmerzhaften Entzündung aktiviert, so erfolgt über einen Reflexbogen die Aktivierung efferenter sympathischer Nervenfasern. Primäre (Thymus, Knochenmark) und sekundäre (z. B. LK) lymphatische Organe werden dicht durch efferente sympathische Nerven innerviert (Felten DL et al., 1987; Felten DL, Feltern SY, 1988). Die postganglionären sympathischen Nervenfasern bilden Nervenplexus um die Blutgefäße und treten gemeinsam mit ihnen an der Hilusregion z. B. von LK ein. Die Nervenfasern verzweigen sich im LK zusammen mit den Blutgefäßen und lassen sich hauptsächlich in der parakortikalen Region um Lymphfollikel darstellen. Einige Nervenfasern verlassen den Gefäßplexus, verlaufen in das Parenchym des LK und enden mit ihren Varikositäten zwischen den Lymphozyten (Felten DL et al., 1987). Noradrenalin (NA) wird aus

Vesikeln an den Varikositäten parakrin sezerniert und agiert mit Adrenozeptoren (AR) beispielsweise auf Lymphozyten (Felten DL et al., 1985).

Postganglionäre sympathische Nerven können das Immunsystem über eine direkte neuronale Wirkung beeinflussen (Elenkov IJ et al., 2000; Elenkov IJ, 2008;). Immunzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche AR, an welche NA bindet und kontrollierende Einflüsse des sympathischen Nervensystems (SNS) vermitteln kann (Hadden JW et al., 1970; Abrass CK et al., 1985; Suzuki S et al., 1997). Monozyten und Lymphozyten exprimieren hauptsächlich  $\beta$ -AR (Kohm AP, Sanders VM, 2000; Takahashi HK et al., 2003). Straub et al. demonstrierten in vitro mit Hilfe einer Boyden-Kammer einen chemotaktischen Effekt von NA und Neuropeptid Y (NPY) auf Monozyten, welcher über  $\beta$ -AR vermittelt wurde (Straub RH et al., 2000). Katecholamine potenzieren zusätzlich die Synthese von Interleukin-8 (IL-8) durch Monozyten. IL-8 ist ein Chemokin, welches die Rekrutierung von Granulozyten in ein Entzündungsgebiet steuert (Engstad CS et al., 1999).

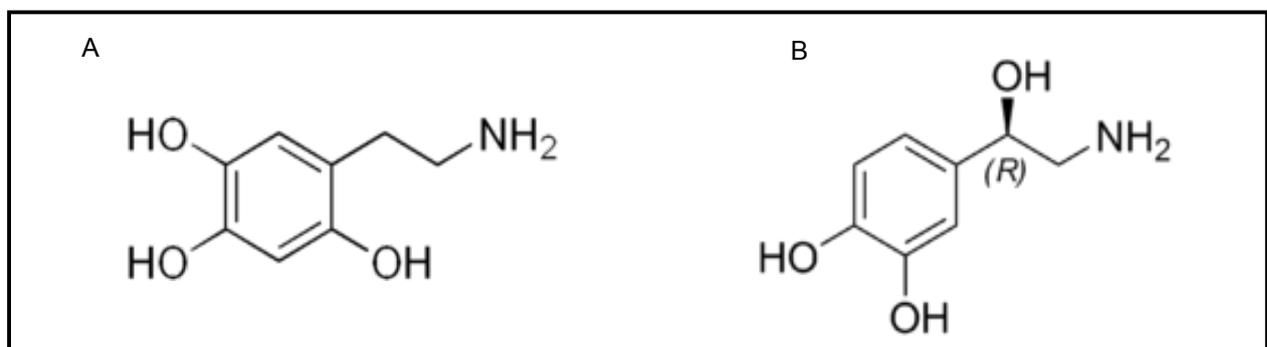
Unsere früheren Studien zeigten, dass eine zentrale Blockade der Schmerzleitung durch die intrathekale Gabe von Morphin zu einer signifikanten Abnahme der Immunzellrekrutierung bei Ratten mit FCA-induzierter Pfotenentzündung und folglich zu einer Abschwächung der intrinsischen, peripheren Opioid-vermittelten Antinozizeption führte (Schmitt TK et al., 2003). Zusätzlich demonstrierten wir bei Patienten, die einem abdominalchirurgischen Eingriff in Epiduralanästhesie unterzogen wurden, dass eine fehlende lokalanästhetische Blockade von im Zusammenhang mit einer Gewebsverletzung stehenden, peripheren schmerzhaften Stimuli eine Einwanderung von Opioid-haltigen Immunzellen in das verletzte Gewebe provoziert (Heurich M et al., 2007). Leider lassen sich in der Epiduralanästhesie die Einflüsse auf sensorische und postganglionäre sympathische Nerven, den afferenten und efferenten Schenkel des Schmerz-evozierten Reflexbogens, nicht unterscheiden. Dadurch ist eine differenzierte Zuweisung des immunzellrekrutierenden Effektes zu den C-Fasern oder den postganglionären sympathischen Nerven in diesem Versuch nicht möglich.

#### 1.4.1 Operative und chemische Methoden der Sympathektomie

Zur Untersuchung einer potentiellen Rolle des sympathischen Nervensystems bei der Immunzellrekrutierung finden chemische (z. B. 6-Hydroxydopamin (6-OHDA), Reserpin oder Guanethidin) und operative Methoden der Sympathektomie Anwendung. Die

Behandlung ausgewachsener Ratten mit 6-OHDA (Abbildung 4) hat die Zerstörung der Axone der postganglionären sympathischen Nerven zur Folge. 6-OHDA wirkt als falscher Neurotransmitter. Es wird über Noradrenalin Re-Uptake Transporter in die noradrenergen Nervenendigung aufgenommen und führt zur Bildung von Wasserstoffperoxid, Superoxidanionen und Hydroxyl-Radikalen. Diese binden an Bestandteile der Nervenzellmembran und bewirken eine Zytolyse des Axons. Der neuronale Zellkörper bleibt intakt und nach einer gewissen Zeit regeneriert sich das Axon (Heikkila RE, Cohen G, 1973).

Bei der operativen Sympathektomie erfolgt häufig eine Resektion von Ganglien, z. B. des Ganglion cervicale superior.



**Abbildung 4:** Chemische Strukturformel von 6-OHDA (A) im Vergleich zu Noradrenalin (B)

## 1.5 Ziele der Studie

Diese Studie wurde mit dem Ziel durchgeführt den relativen Beitrag von C-Fasern und postganglionären sympathischen Nerven zur Rekrutierung Opioid-haltiger Immunzellen zur Hemmung von entzündungsbedingten Schmerzen zu untersuchen. Weiterhin haben wir versucht einen möglichen Mechanismus der Immunzellrekrutierung im Rahmen einer schmerzhaften Entzündung über die Modulation der Expression von Gefäßendothel ICAM-1 darzustellen.

Mit dem Wissen um die wichtige Rolle Opioid-haltiger Immunzellen in Bezug auf die intrinsische Kontrolle entzündungsbedingter Schmerzen untersuchten wir, ob die selektive Degeneration der C-Fasern bzw. der postganglionären sympathischen Nerven mittels ihrer entsprechenden Neurotoxine Cap bzw. 6-OHDA i) die Rekrutierung Opioid-haltiger Immunzellen aus der Zirkulation in FCA-entzündetes, schmerzhaftes Gewebe verhindert, ii) die Hochregulation der ICAM-1-Expression in Blutgefäßen in enger

Nachbarschaft zu CGRP- und TH-IR Nervenfasern in entzündetem subkutanem Gewebe abschwächt, iii) die stressinduzierte Opioid-vermittelte Antinozizeption im Entzündungsgebiet aufhebt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Tiere

#### 2.1.1 Aufzucht und Pflege

Alle Experimente wurden mit männlichen Wistar Ratten, die an der Freien Universität Berlin gezüchtet wurden, durchgeführt. Die Tiere hatten ein Gewicht von 170 bis 200 g. Die Ratten wurden individuell in einem Käfig mit Sägespäneinlage gehalten und hatten freien Zugang zu Standard Nagerfutter (Sniff, Ratte und Maus, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser. Alle Experimente wurden während der Lichtphase eines 12h/12h (8:00 Uhr/20:00 Uhr) hell-dunkel-Zyklus durchgeführt. Die Raumtemperatur betrug  $22 \pm 0,5$  °C, und die Luftfeuchtigkeit wurde zwischen 60 % und 65 % gehalten. Die Vorschriften bezüglich ethischer Standards der International Association for the Study of Pain (1985) und die Vorschriften des Tierpflegekomitees des Landes Berlin wurden eingehalten.

### 2.2 Chemikalien, Seren, modifiziertes Freund's Complete Adjuvant und Antikörper

#### 2.2.1 Chemikalien

Substanz	Hersteller
Capsaicin (= 8-Methyl-N-Vanillyl-6-Nonenamid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chromium-Kalium-Sulfat-Dodecahydrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
3',3'- Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
4',6'- Diamidino-2-phenylindol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethanol (100 %)	MERCK, Darmstadt

Gelatine Type B	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
6-Hydroxydopamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Isofluran	Curamed Pharma GmbH, Karlsruhe
Isotone NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Kieselgel mit Feuchtigkeitsindikator	MERCK, Darmstadt
Methanol (100 %)	Mallinckrod Baker B.V., Deventer, Holland
Natriummetabisulfat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PBS (Phospat gepufferte Salzlösung) Tabletten	Gibco, Paisley, Schottland
Saccharose	K. Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Thionin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thimerosal (Quecksilber-[(o-Carboxyphenyl) Ethyl-Natrium-Salz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 80 (Polyoxyethylensorbitan Monooleat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Wasserstoffperoxid (30 Gew.-%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

**Tabelle 1:** Chemikalien

### 2.2.2 Seren

Für die Herstellung der immunhistochemischen Lösungen wurden Bovines Serum Albumin 30 % (BSA) von Sigma Chemicals Co (St. Louis, MO, USA) sowie normales Ziegenserum und normales Pferdeserum von Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA) verwendet.

### 2.2.3 Modifiziertes Freund's Complete Adjuvant

Das modifizierte Freund's Complete Adjuvant (FCA) von Calbiochem (La Jolla, CA, USA) enthält 0,1 % durch Hitze abgetötetes, getrocknetes *Mycobacterium butyricum* in 85 % Marcol 52 und 15 % Arlacel A.

### 2.2.4 Primäre Antikörper

Die polyklonalen Kaninchen anti-Ratte Antikörper (AK) (Immunglobulin G, IgG) gegen END (anti-END), ENK (anti-ENK) und den Meerschwein anti-Ratte AK gegen CGRP (anti-CGRP) erhielten wir von Peninsula Laboratories (Merseyside, UK). Der monoklonale Maus anti-Ratte Thyrosinhydroxylase (TH)-AK wurde uns von Incstar (Minneapolis, MN, USA) zur Verfügung gestellt. Den polyklonalen Huhn anti-Ratte TH-AK erhielten wir von Abcam plc. (Cambridge, UK). Den monoklonalen Maus anti-Ratte ICAM-1 AK (Klon-Nummer 1A29) stellte uns Seikagaku (Tokio, Japan) zur Verfügung. Die Antikörper wurden im Verhältnis 1:4 in sterilem Wasser aufgelöst und bis zum Gebrauch als 10 µl und 20 µl Mengen bei -20 °C aufbewahrt.

### 2.2.5 Sekundäre Antikörper

Der sekundäre AK (biotinylierter Ziege anti-Kaninchen AK oder biotinylierter Pferd anti-Meerschwein AK) ist Teil des Vectastain® Elite ABC- (Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex) Kit von Vector Laboratories, Inc. (Burlingame, CA, USA) und wurde für die Immunhistochemie verwendet (Abbildung 7).

Der Fluoresceinisothiocyanat (FITC)- konjugierte Esel anti-Maus AK (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Suffolk, UK) und der Texas Rot-konjugierter Ziege anti-Kaninchen AK dienten der Einzel-Immunfluoreszenzfärbung. Für die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung verwendeten wir Texas Rot-konjugierten Ziege anti-Maus AK (Vector Laboratories) in Kombination mit Alexa Fluor 488 Ziege anti-Meerschwein oder -anti-Huhn AK (Invitrogen, Karlsruhe).

2.2.6 Technische Hilfsmittel

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
Cryo Embedding Compound	Microm International GmbH, Walldorf
Deckgläser (24 x 50 mm)	Menzel GmbH, Braunschweig
Faltenfilter Ø 240 mm	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Lasermikroskop Zeiss LSM 510	Carl Zeiss, Göttingen
Kamera	Carl Zeiss, Jena
Lichtmikroskop Axioskop 2	Carl Zeiss, Jena
Kryostat Microm HM 560	Microm International GmbH, Walldorf
Millex-HA-Filter	Millipore S.A., Molsheim, Frankreich
Narkosegerät „Tiberius“	Drägerwerk, Lübeck
Objekträger (geschnitten/Mattrand)	Menzel GmbH, Braunschweig
Omnifix-F (1ml Spritze)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG, Eberstadt
Pipette eppendorf Reference 100 µl	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf
Pipette FALCON 5 ml, 10 ml, steril	Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont, De Claix, Frankreich
Skalpellklingen, steril	Aesculap, Tuttlingen
Schnelleindeckmittel für die Mikroskopie Entellan/DPX (Dystren, Plastizierer, Xylene)	MERCK, Darmstadt

Vortex-2 Genie	Scientific Industries, USA
----------------	----------------------------

**Tabelle 2:** Technische Hilfsmittel

## 2.3 Narkose

### 2.3.1 Kurznarkose

Für die Kurznarkose wurden die Ratten aus dem Käfig genommen und in einen Glasbehälter gesetzt, der ein mit Isofluran getränktes Papiertuch enthielt. Über dem Papier lag eine Keramikplatte mit Löchern, die das Aufsteigen des Isoflurangases erlaubte. Auf diese Keramikplatte wurde die Ratte gesetzt. Der Behälter wurde mit einem Glasdeckel bedeckt, um Ratte und Isoflurangas darin zu behalten. Sobald die Ratte schlief, wurde die intraplantare (i.pl.) Injektion des FCA oder die intraperitoneale (i.p.) Injektion des 6-OHDA bzw. des Vehikels vorgenommen.

### 2.3.2 Länger dauernde Narkose

Für die länger dauernde Narkose erhielten die Ratten Methohexital 60 mg/kg i.p. Nach Eintritt der Narkose wurde die subkutane Injektion des Cap bzw. des Vehikels vorgenommen. Das Methohexital wirkte 30 bis 45 min. bevor die Ratten wieder erwachten.

## 2.4 Injektionen

### 2.4.1 Entzündungsinduktion mit modifiziertem Freund's Complete Adjuvant

Alle Ratten erhielten unter Kurznarkose mit Isofluran eine Injektion von 0,15 ml FCA i.pl. in die rechte Hinterpfote. Bei dieser Methode entwickelt sich einheitlich in der beimpften Pfote eine lokale Entzündung mit Hyperalgesie (verstärkte Antwort gegenüber einem normalerweise schmerzhaften Stimulus), vermehrtem Pfootenvolumen, erhöhter Pfootentemperatur und Infiltration durch verschiedene Immunzellen, die bis zu 6 Tage anhält. In der frühen Entzündungsphase (6 h nach FCA) wandern bevorzugt polymorphonukleäre Zellen (z.B. Granulozyten) ein. Während der späten

Entzündungsphase (4 d nach FCA) bilden mononukleäre Zellen die Hauptpopulation immigrierender Immunzellen (Rittner HL et al., 2001).

Alle Injektionen wurden mit einer 1 ml Spritze mit 26 G Kanüle (Omnifix-F, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) durchgeführt.

#### 2.4.2 Subkutane Injektion von Capsaicin

Die Herstellung der Injektionslösung und das Injektionsschema erfolgten in Anlehnung an ein früher veröffentlichtes Protokoll (Zhang Q et al., 1998; Zhou L et al., 1998). Cap wurde in einer Konzentration von 10 mg/ml in physiologischer Kochsalzlösung, die 20 % Ethanol und 10 % Tween 80 enthielt, gelöst und die Lösung bis zum Gebrauch bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Untersuchung des Beitrags primär afferenter Nervenfasern zur Rekrutierung Opioid-haltiger Immunzellen in der frühen Entzündungsphase (6 h nach FCA) erhielten die Ratten der Interventionsgruppe an den drei Tagen vor der FCA-Gabe einmal täglich Cap subkutan (s.c.) in steigender Dosierung. Am ersten Tag 30 mg/kg, am zweiten Tag 50 mg/kg und am dritten Tag 70 mg/kg (Abbildung 5A). Cap ist ein starker Schmerzreiz, weshalb diese Injektionen in Methohexital-Narkose durchgeführt wurden. Die Behandlung mit Cap führt hauptsächlich zu einem Verlust von C-Fasern (Pini A et al., 1990; Holzer P, 1991). Zur Untersuchung der gleichen Fragestellung in der späten Entzündungsphase (4 d nach FCA) erhielten die Ratten der Interventionsgruppe 30 mg/kg, 50 mg/kg und 70 mg/kg Cap s.c. einmal täglich an den drei folgenden Tagen nach FCA-Gabe (Abbildung 5B). Die Kontrolltiere bekamen an den entsprechenden drei Tagen den Vehikel (physiologische Kochsalzlösung mit 20 % Ethanol und 10 % Tween 80) s.c. gespritzt.

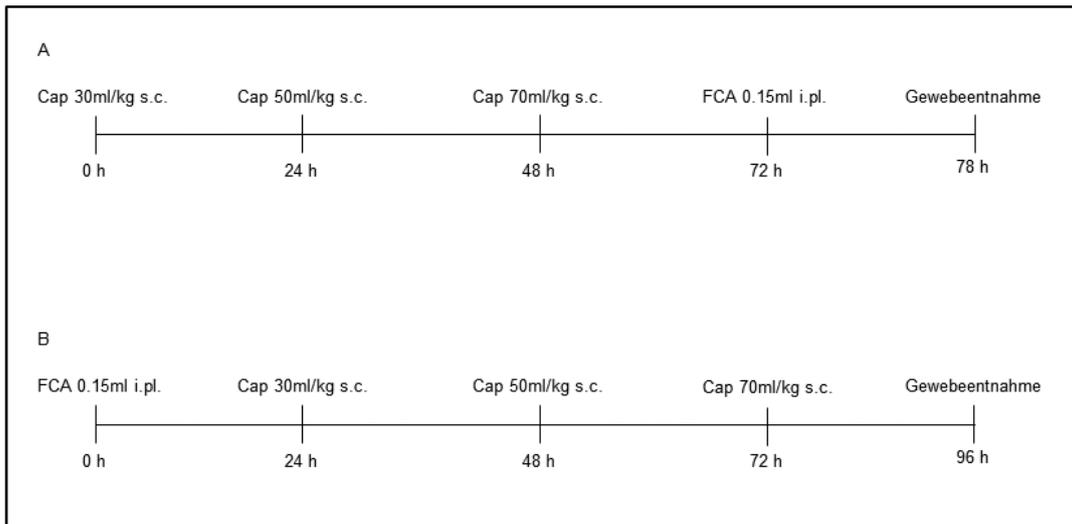
#### 2.4.3 Intraperitoneale Injektion von 6-Hydroxydopamin

Die Herstellung der Injektionslösung und das Injektionsschema erfolgten in Anlehnung an ein früher veröffentlichtes Protokoll (Zhang Q et al., 1998; Zhou L et al., 1998). 6-OHDA wurde in einer Konzentration von 100 mg/ml in Aqua dest. gelöst und 1 % Natriummetabisulfat hinzugefügt. 6-OHDA muss vor Licht geschützt werden. Die Lösung wurde täglich neu angesetzt.

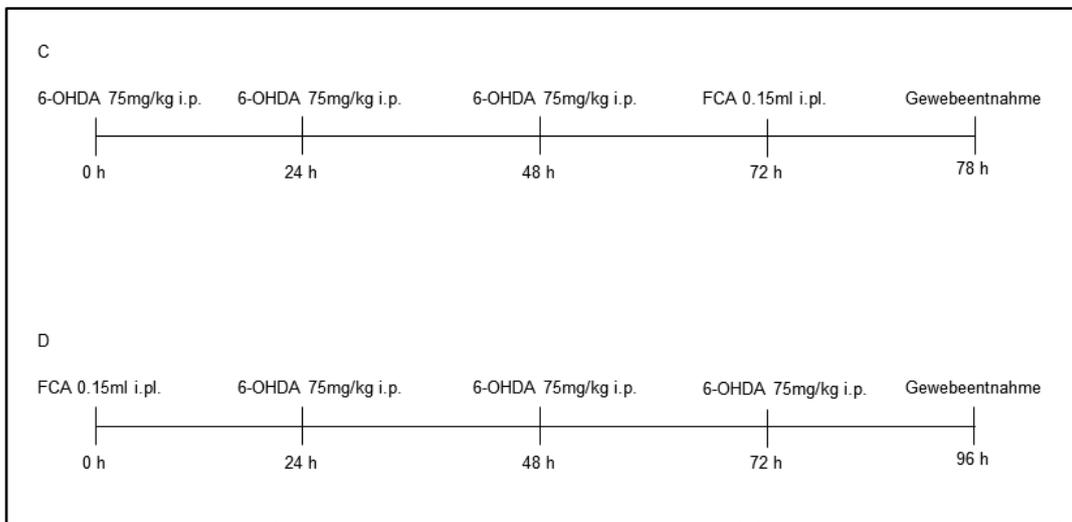
Zur Untersuchung des Beitrags postsynaptischer sympathischer Nervenfasern zur Rekrutierung Opioid-haltiger Immunzellen in der frühen Entzündungsphase (6 h nach

FCA) erhielten die Ratten der Interventionsgruppe einmal täglich an den drei Tagen vor der FCA-Gabe eine Injektion von 0,15 ml 6-OHDA-Lösung i.p. in einer Dosis von 75 mg/kg unter Kurznarkose mit Isofluran (Abbildung 6C). Zur Untersuchung der gleichen Fragestellung in der späten Entzündungsphase (4 d nach FCA) erhielten die Ratten der Interventionsgruppe 75 mg/kg 6-OHDA-Lösung i.p. unter Kurznarkose an den drei folgenden Tagen nach FCA-Gabe (Abbildung 6D). Die Kontrolltiere bekamen an den entsprechenden drei Tagen jeweils 0,15 ml des Vehikels (Aqua dest. mit 1 % Natriummetabisulfat) i.p. gespritzt.

Diese Behandlung erzeugt eine chemische Sympathektomie in vivo (Levine JD et al., 1986; Zhou L et al., 1998). Nach Verabreichung des 6-OHDA zeigten die Ratten typische Zeichen der Sympathikolyse, z.B. Ptosis und leichte Diarrhoe. Sie waren aber insgesamt aktiv und es lagen keine weiteren Anzeichen von Krankheit oder Erschöpfung vor (Zhou L et al., 1998).



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Injektionen von FCA und Cap zur Untersuchung des Beitrags sensorischer Nervenfasern zur Rekrutierung Opioid-haltiger Immunzellen in der frühen Entzündungsphase (6 h FCA) (A) und in der späten Entzündungsphase (4 d FCA) (B). FCA, modifiziertes Freund's Complete Adjuvant. Cap, Capsaicin.



**Abbildung 6:** Schematische Darstellung der Injektionen von FCA und 6-OHDA zur Untersuchung des Beitrags sympathischer Nervenfasern zur Rekrutierung Opioid-haltiger Immunzellen in der frühen Entzündungsphase (6 h FCA) (C) und in der späten Entzündungsphase (4 d FCA) (D). FCA, modifiziertes Freund's Complete Adjuvant. 6-OHDA, 6-Hydroxydopamin.

## **2.5 Perfusion, Gewebeentnahme und Kryoprotektion des Gewebes**

### 2.5.1 Perfusion und Gewebeentnahme

Je nach Experiment wurden 6 h oder 4 d nach der Entzündungsauslösung mit FCA die Ratten tief mit Isofluran anästhesiert und transkardial zuerst während 15 min. mit PBS (0,1 M, pH 7,4) zum Auswaschen aller zellulären Blutbestandteile aus der Zirkulation perfundiert. Im Anschluss erfolgte die Perfusion mit 300 ml kaltem PBS (0,1 M, pH 7,4) mit Zusatz von 4 % Paraformaldehyd (Fixierungslösung) (Mousa SA et al., 2004). Die Gewebeentnahme erfolgte an der entzündeten rechten Hinterpfote. Die Haut mit subkutanem Gewebe und Teilen der Beugemuskulatur wurde mit Hilfe eines Skalpells oberhalb der Knochen entfernt.

Das Gewebe wurde für 90 min. in der Fixierungslösung bei 4 °C fixiert.

### 2.5.2 Vorbereitung des Gewebes und der Objektträger

Für mindestens einen Tag nach der Entnahme wurde das Gewebe bei 4 °C in Saccharoselösung bestehend aus 10 % Saccharose in 0,1 M PBS kryoprotectiert, um es während des Schneidens am Kryostat Microm HM 560 (Microm International GmbH, Walldorf) zu schützen. Danach wurde es in tissue-Tek-compound (OCT, Miles Inc. Elkhart, IN, USA) eingebettet und bei -20 °C tiefgefroren. Am Kryostat wurden 7 µm dünne Serienschritte angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Um eine feste Haftung der Gewebeschnitte auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden diese zuvor mit Gelatine beschichtet. In Aqua dest. wurden 0,5 % Gelatine unter Rühren und Erhitzen auf 45 °C gelöst und 0,05 % Chromium-Kalium-Sulfat hinzugefügt. Die Lösung wurde gefiltert, die Objektträger darin eingetaucht und zum Trocknen in eine Objektträgerbox gestellt.

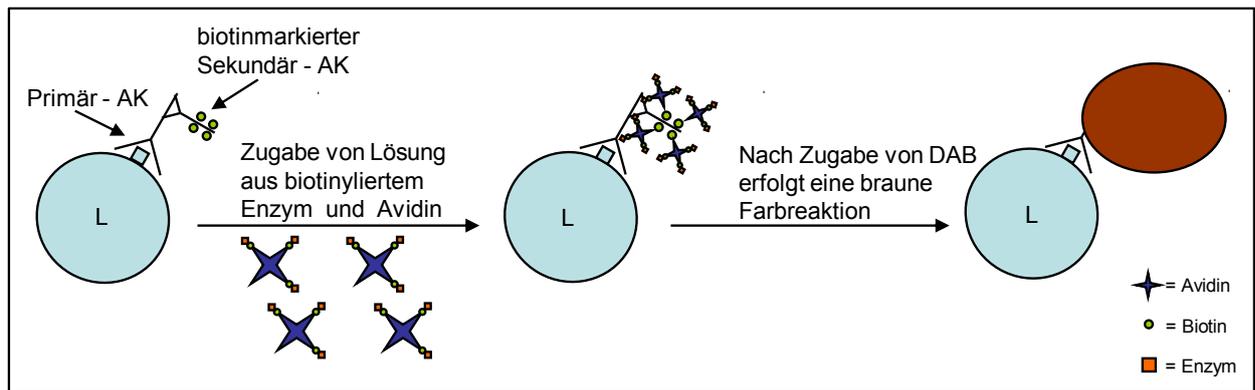
## **2.6 Immunhistochemie und Immunfluoreszenz**

### 2.6.1 Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung wurde anhand eines früher beschriebenen Protokolls durchgeführt (Mousa SA et al., 2004). Es wurde mit dem Avidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase-Komplex (Vectastain® Elite ABC-Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) gearbeitet (Abbildung 7).

Zu Beginn wurden alle Objektträger für 10 min. in PBS (0,01 M) gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation der Schnitte für 45 min. in PBS (0,01 M), welche 0,3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 10 % Methanol enthielt, um die endogene Peroxidase zu blockieren. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen inkubierten wir anschliessend die Schnitte für 60 min. in einer Blockierungslösung bestehend aus PBS (0,01 M) mit 0,3 % Triton X-100, 1 % BSA, 4 % Ziegenserum und 4 % Pferdeserum. Über Nacht wurden die Schnitte dann bei 4 °C mit den primären AK inkubiert. Wir verwendeten polyklonale Kaninchen anti-Ratte AK gegen END und ENK und einen Meerschwein anti-Ratte AK gegen CGRP. Die primären AK lösten wir in einer Verdünnung von 1:4 in sterilem Wasser auf und zusammen mit PBS (0,01 M), welche 2,5 % BSA sowie 0,3 % Triton X-100 enthielt, stellten wir eine Verdünnung von 1:1000 her. Am Folgetag inkubierten wir die Schnitte für 60 min. mit dem sekundären AK (biotinylierter Ziege anti-Kaninchen AK oder biotinylierter Pferd anti-Meerschwein AK). Die Lösungen stellten wir her, indem wir zu PBS (0,01 M) mit 2,5 % BSA und 0,3 % Triton X-100 2 Tropfen aus der Dosierflasche (ca. 100 µl) des jeweiligen sekundären AK hinzufügten. Danach erfolgte für 45 min. die Inkubation mit dem ABC. Zur Herstellung dieser Lösung gaben wir zu 10 ml PBS (0,01 M) 2 Tropfen aus der Dosierflasche (ca. 100 µl) der Avidin-Dehydrogenase und 2 Tropfen aus der Dosierflasche (ca. 100 µl) des biotinylierten Enzyms hinzu. Mit 3',3'- Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) in 0,01 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enthaltender 0,05 M Tris-gepufferter Salzlösung (pH 7,6) wurden die Gewebeschnitte anschliessend für 3-5 min. gefärbt und nach stattgefundenener Enzymreaktion in Leitungswasser gewaschen (Abbildung 7). Zuletzt färbten wir die Schnitte mit Thionin gegen (ausser bei anti-CGRP) und dehydrierten sie in einer Alkoholreihe. Vor dem Eindecken mit DPX (Merck, Darmstadt) tauchten wir alle Schnitte in Xylol-Lösungen mit steigender Konzentration.

Soweit nicht anders beschrieben, fanden alle Inkubationen bei Raumtemperatur (RT) statt und nach jedem Schritt wurden die Objektträger mit PBS (0,01 M) dreimal über jeweils 15 min. auf einer Rührplatte gewaschen. Um die Spezifität der Färbung zu demonstrieren, führten wir folgende Kontrollfärbungen durch: (1) Präabsorption der verdünnten AK gegen END und ENK mit reinem END und ENK (je 5 µg/ml) (Peninsula Laboratories, Merseyside, UK) für 24 h bei 4°C und (2) Weglassen entweder der primären Antikörper, der sekundären AK oder des ABC. Diese Kontrollfärbungen zeigten keine END-, ENK- und CGRP-Immunoreaktivität (IR).



**Abbildung 7:** Avidin-Biotin-Methode. Der Primär-AK (polyklonaler Kaninchen anti-Ratte AK spezifisch gegen END oder ENK gerichtet) bindet an das entsprechende Antigen. Der sekundäre biotinylierte Ziege anti-Kaninchen AK bindet an den primären AK. Vorgeformte Avidin-Biotin-Peroxidasekomplexe (ABC) reagieren mit dem biotinylierten Sekundär-AK aufgrund der hohen Affinität des Avidins zum Biotin. Die im ABC enthaltene Peroxidase reagiert mit dem zugegebenen Chromogen 3',3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB). Es erfolgt eine Chromogenreaktion, wodurch die Orte der Antikörperbindung braun sichtbar werden. AK, Antikörper; L, Leukozyt

### 2.6.2 Morphologische Kriterien der immunreaktiven Zellen

Die spezifisch immunhistochemisch reaktiven Zellen wurden anhand folgender Kriterien morphologisch identifiziert: (1) Makrophagen/Monozyten im entzündeten subkutanen Gewebe zeichnen sich aus durch einen großen Zellkörper, ein vakuolisiertes Zytoplasma sowie einen unregelmäßig geformten Nukleus. (2) Lymphozyten sind kleine Zellen mit einem großen Zellkern und einem schmalen Zytoplasmasaum und (3) PMN besitzen einen großen Zellkörper und einen multisegmentierten Nukleus (Mousa SA et al., 2004).

### 2.6.3 Immunfluoreszenzfärbung

Die Einzel-Immunfluoreszenzfärbung führten wir wie vorher bereits beschrieben durch (Binder W et al., 2004). Zu Beginn wurden alle Objektträger für 10 min. in PBS (0,01 M) gewaschen. Nach Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit einer Lösung bestehend aus PBS (0,01 M) mit 0,3 % Triton X-100, 1 % BSA, 4 % Ziegenserum und 4 % Pferdeserum für 60 min. bei RT, inkubierten wir die Schnitte mit dem Meerschwein-AK gegen CGRP (1:1000) (Peninsula Laboratories, USA), dem monoklonalen Maus anti-Ratte AK gegen TH (1:2000) (Incstar, Minneapolis, MN, USA) oder dem monoklonalen Maus anti-Ratte AK gegen ICAM-1 (1:1000) (Seikagaku, Tokyo, Japan) über Nacht bei 4 °C. Danach wurden die Objektträger mit PBS (0,01 M) dreimal für

jeweils 15 min. gewaschen und für 60 min. mit dem sekundären Texas Rot-konjugierten Ziege anti-Kaninchen AK oder dem FITC-konjugierten Esel anti-Maus AK (Jackson ImmunoResearch Laboratories) inkubiert.

Für die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung erfolgte die Inkubation der in PBS (0,01 M) schwimmenden Gewebeschnitte wie bereits beschrieben (Mousa SA et al., 2007a, 2007b) mit dem monoklonalen Maus anti-Ratte AK gegen ICAM-1 in Kombination mit dem Meerschwein-AK gegen CGRP oder dem polyklonalen Huhn anti-TH AK (1:1000) (Abcam plc, Cambridge, UK). Anschliessend erfolgte das Waschen des Gewebes in PBS. Danach inkubierten wir die Gewebeschnitte mit Texas Rot-konjugiertem Ziege anti-Maus AK (Vector Laboratories) in Kombination mit Alexa Fluor 488 Ziege anti-Meerschwein AK oder Ziege anti-Huhn AK (Invitrogen, Karlsruhe). Das Gewebe wurde danach erneut mit PBS gewaschen und die Nuklei mit 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (0.1 µg/ml in PBS) (Sigma) blau gefärbt.

Nach erneutem Abwaschen der Schnitte mit PBS (0,01 M, 3 x 15 min.), brachten wir Deckgläschen mit Vectashield (Vector Laboratories) auf und werteten die Schnitte unter einem Zeiss LSM 510 Laserscanner-Mikroskop (Carl Zeiss, Göttingen) aus.

Um die Spezifität der Färbung zu demonstrieren, veranlassten wir folgende Kontrollfärbungen: (1) Weglassen des primären Antiserums oder des sekundären AK. Diese Kontrollfärbungen zeigten weder ICAM-1-IR, CGRP-IR noch TH-IR.

#### 2.6.4 Quantifikation

Im subkutanen Pfortengewebe erfolgte die Auszählung der END- oder ENK-IR Leukozyten, der TH- oder CGRP-IR Nervenfasern und der ICAM-1-IR Blutgefäße durch einen geblindeten Untersucher in 3 Gewebeschnitten pro Ratte und 5 Kästchen (384 µm<sup>2</sup> für Immunzellen, 384 mm<sup>2</sup> jeweils für Nervenfasern und Blutgefäße) pro Schnitt unter Berechnung eines Durchschnittswertes. Verwendet wurden dafür ein Zeiss Lichtmikroskop Axioskop 2 und ein Zeiss Lasermikroskop LSM 510 (Mousa SA et al., 2000, 2007a, 2007b). Für die Analyse verwendeten wir fünf Ratten pro Gruppe.

## 2.7. Algesiometrie

### 2.7.1. Nozizeptive Schwelle

Bereits 5 d vor den Versuchen brachten wir die Tiere in das Versuchslabor. Dort wurden sie einmal täglich über 4 d nach einem festen Protokoll gehandhabt um Stress und Angst während der Versuche möglichst gering zu halten. Vier Tage nach Induktion der FCA-Entzündung bestimmten wir die mechanischen nozizeptiven Schwellenwerte mittels Pfootendruck-Algesiometrie an der rechten und linken Hinterpfote (modifizierter Randall-Selitto Test; Ugo Basile, Comerio, Italien) vor und 1, 5, 10, und 20 min. nach CWS. Dafür setzten wir die zu untersuchende Hinterpfote auf einen Teflonblock und platzierten einen keilförmigen, stumpfen Kolben (Durchmesser 1,75 mm<sup>2</sup>) auf der Dorsalseite der Pfote. Auf einer Anzeige ließ sich der schrittweise ansteigende Druck ablesen. Der Pfootendruck, der nötig war um ein Wegziehen der Pfote herbeizuführen (paw pressure threshold, PPT) wurde aus dem Durchschnittswert drei aufeinander folgender Durchgänge mit jeweils 10 Sekunden Pause ermittelt. Als Maximaldruck wurden 250 g frei gewählt. Die Reihenfolge zwischen rechter und linker Pfote veränderten wir stets um einen Lerneffekt bei den Tieren zu vermeiden. Der Untersucher war bezüglich des Versuchprotokolls geblindet. Die Daten sind als Prozentwert des maximal möglichen Effekts (MPE) mit dem frei gewählten Endwert von 250 g dargestellt und wurden anhand folgender Formel berechnet (PPT behandelt - PPT basal/250 - PPT basal).

### 2.7.2. Kaltwasser-Schwimmstress

Frühere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass 1 min. CWS in 0-4 °C kaltem Wasser eine unilaterale, Opioid-spezifische Zunahme des PPT in der FCA-entzündeten Pfote bei gleichbleibendem PPT in der kontralateralen, nicht entzündeten Pfote bewirkt (Parsons CG et al., 1990; Schäfer M et al., 1996). Nach Bestimmung der Basis-PPT-Werte setzten wir die mit Cap, 6-OHDA oder den entsprechenden Vehikeln behandelten Ratten 4 d nach FCA für den CWS für 1 min. zum Schwimmen in eine Wanne mit 0-4 °C kaltem Wasser (Parsons CG et al., 1990). Anschliessend wurden die Ratten abgetrocknet und der PPT sofort reevaluiert. In einem separaten Experiment erhielten fünf Tiere mit FCA-induzierter Pfootenentzündung, aber ohne Vorbehandlung mit Cap oder 6-OHDA, eine i.pl. Injektion von 18 µg des Opioidrezeptorantagonisten

Naloxon 5 min. vor dem CWS und der PPT wurde 1, 5, 20, und 30 min. nach dem CWS reevaluiert.

## **2.8 Statistische Analyse**

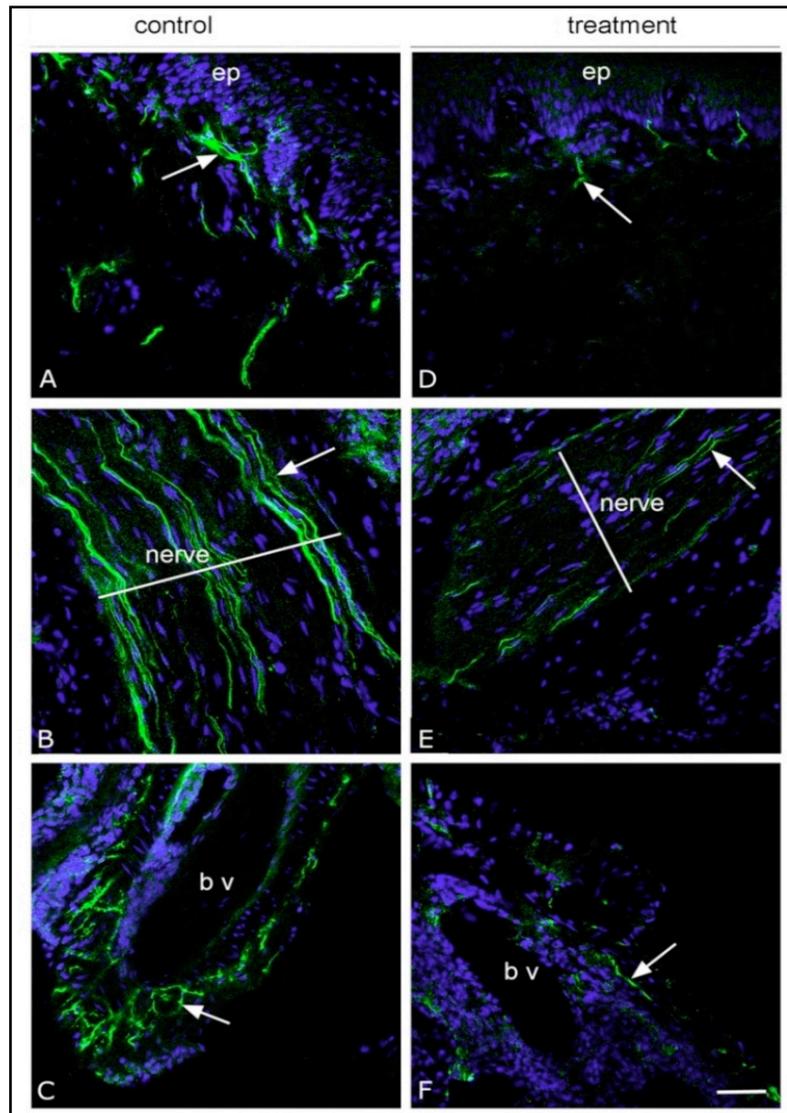
Wir analysierten die Daten der Immunhistochemie und Immunfluoreszenz sowie die Daten der Verhaltensexperimente für den Vergleich der Interventionsgruppen (Behandlung mit Cap, 6-OHDA oder Naloxon) mit den Kontrollgruppen (Behandlung mit den entsprechenden Vehikeln). Für normal verteilte Daten verwendeten wir den ungepaarten Student t-Test und für nicht normal verteilte Daten den Mann-Whitney U-Test. Der Zeitverlauf der Schwimmstress-Versuche wurde wiederholt durch ANOVA gefolgt vom Dunnett's Test analysiert. Die Unterschiede betrachteten wir bei  $P < 0,05$  als signifikant.

Die statistische Analyse und die graphische Darstellung der Daten führten wir mit Sigma Stat 2.03 (SPSS Science, Chicago, IL) durch.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Verlust CGRP-IR subkutaner Nervenendigungen nach Cap-Behandlung**

Nach der Behandlung mit Capsaicin untersuchten wir unter Verwendung eines CGRP-spezifischen AK die Veränderungen CGRP-IR Nervenfasern innerhalb des subkutanen Pfortengewebes. Die Abbildungen 8 A und 8 D demonstrieren die Immunfluoreszenz-mikroskopische Lokalisation von CGRP-IR Nerven (grüne Fluoreszenz) innerhalb peripherer Nerven bei Ratten mit FCA-induzierter subkutaner Pfortenentzündung nach Vehikel- (A) oder Cap-Behandlung (D). Unter der Epidermis von mit Cap behandelten Ratten zeigte sich eine deutliche Reduktion der CGRP-IR Nerven (D) im Vergleich zur Vehikelbehandlung (A). Balken =20  $\mu\text{m}$ . In der quantitativen Analyse konnten wir eine signifikante Reduktion der Anzahl der CGRP-IR Nervenfasern im subkutanen Pfortengewebe um 56% nach Cap-Behandlung ( $5,3 \pm 0,2\%/384 \text{ mm}^2$ ) verglichen mit den Vehikel-behandelten Tieren nachweisen ( $12,0 \pm 0,4\%/384 \text{ mm}^2$ ) ( $P < 0,05$ , ungepaarter Student t-Test).

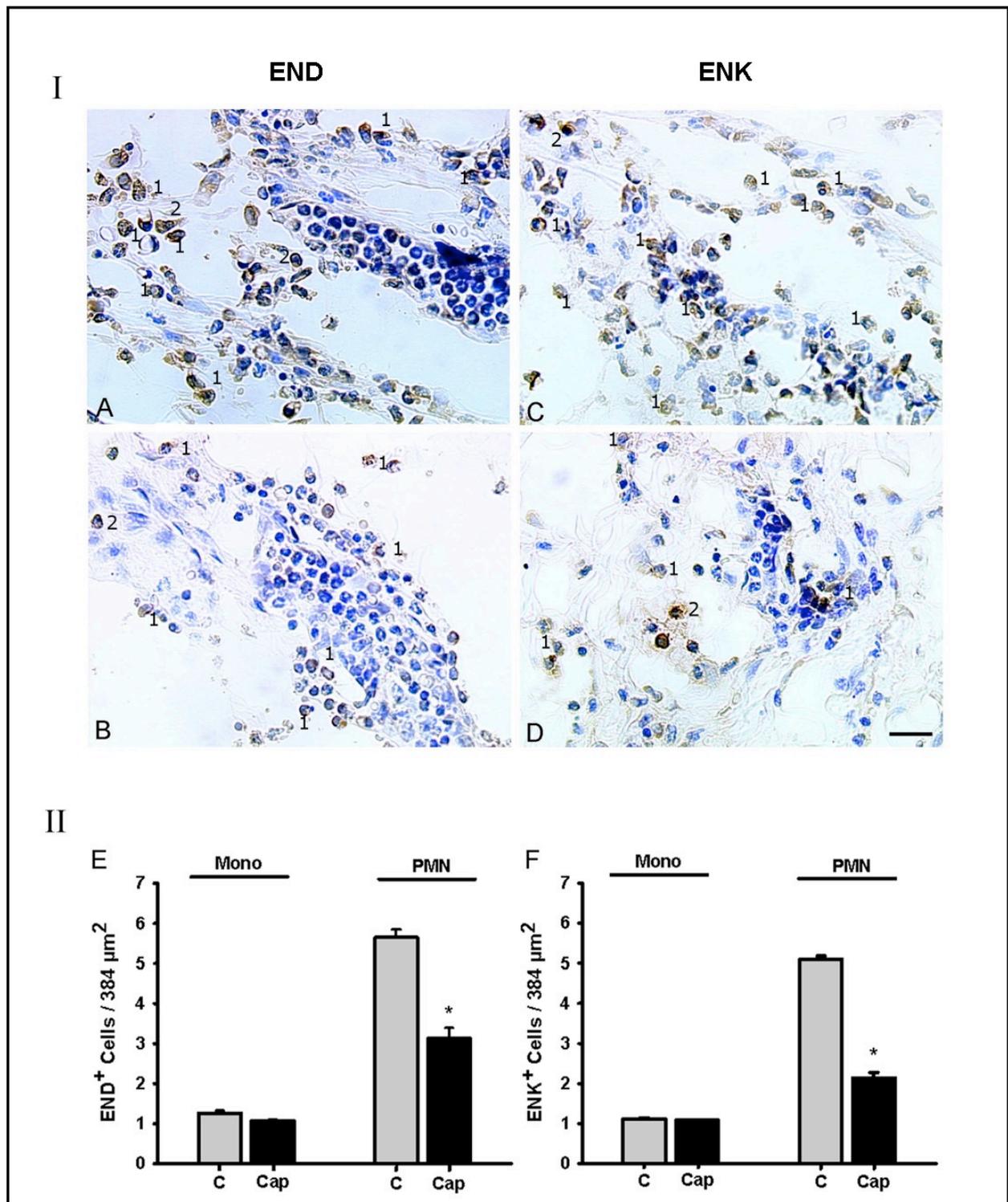


**Abbildung 8:** Immunfluoreszenzmikroskopische Lokalisation von CGRP-IR Nerven innerhalb peripherer Nerven (A, D) und von TH-IR sympathischen Nervenfasern innerhalb peripherer Nerven (B, E) und Blutgefäße (C, F) nach Vehikel- (A, B, C) oder Cap- (D) bzw. 6-OHDA Behandlung (E, F). Nach Cap zeigte sich eine signifikante Reduktion der CGRP-IR Nerven unter der Epidermis (D) im Vergleich zur Vehikelbehandlung (A). Die Gabe von 6-OHDA führte im Vergleich zur Vehikelbehandlung (B, C) zu einer signifikanten Reduktion von TH-IR Nervenfasern innerhalb peripherer Nerven (nerve) der Haut (E) und von TH-IR Nervenendigungen in der Gefäßwand (F). bv, Blutgefäß; ep, Epidermis; treatment, Cap- oder 6-OHDA Behandlung; control, Vehikelbehandlung

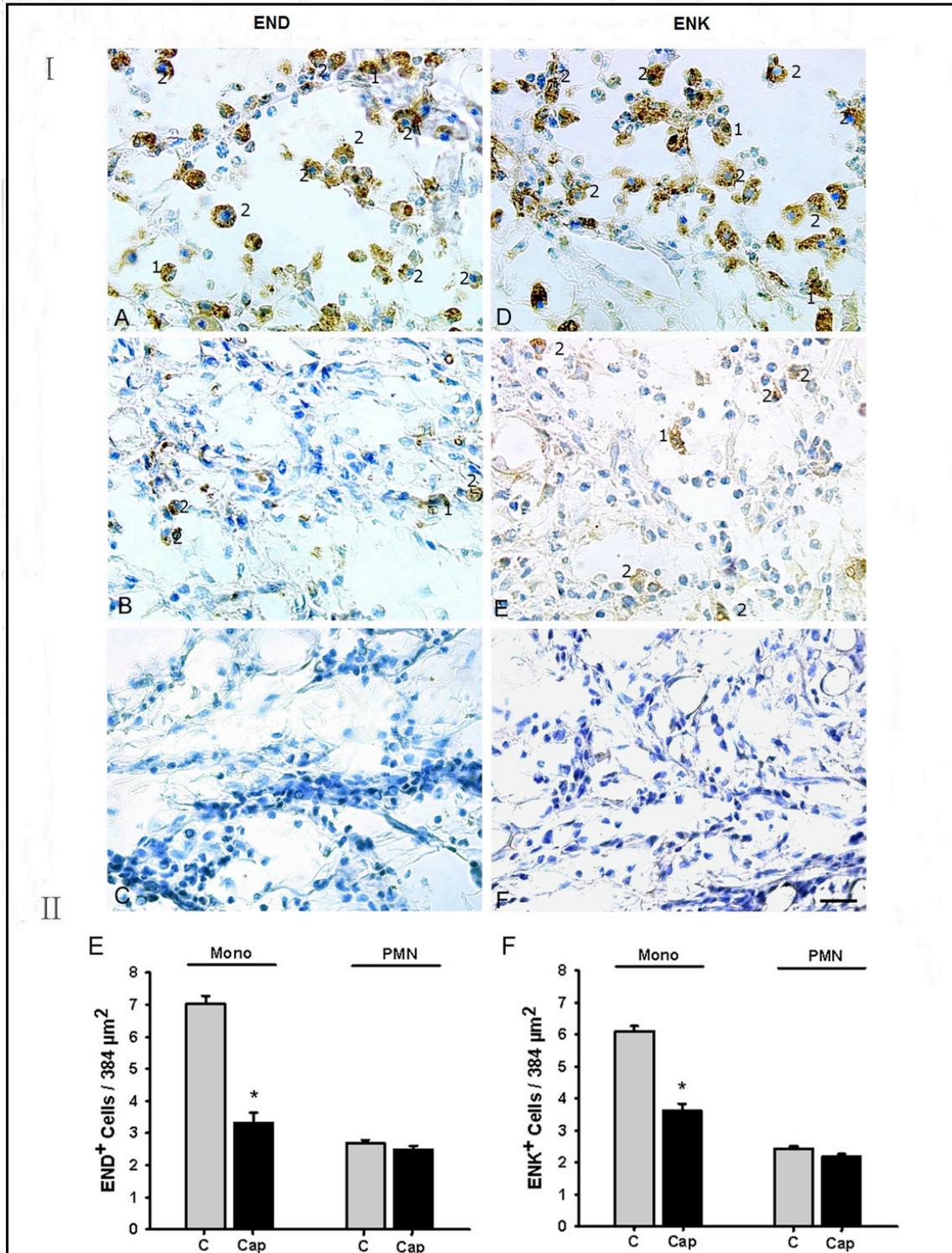
### 3.2 Beitrag subkutaner sensorischer Nervenfasern zur Rekrutierung Opioidhaltiger Leukozyten während FCA-induzierter Entzündungsschmerzen

Während der frühen Phase des Entzündungsschmerzes (6 h nach FCA) liessen sich die Opioidpeptide vorwiegend in PMN (in Abbildung 9 I mit 1 markiert) nachweisen. PMN bildeten zu diesem Zeitpunkt die Hauptpopulation der in das subkutane Pfortengewebe eingewanderten Immunzellen (Abbildung 9 A-D, Balken = 40  $\mu$ m). B, D zeigen, dass die

Cap-Behandlung eine signifikante Abnahme der Rekrutierung END- (B) oder ENK-IR (D) PMN in das entzündete subkutane Gewebe im Vergleich zur Vehikelbehandlung (A, C) zu Folge hatte. In der quantitativen Analyse (Abbildung 9 II) konnten wir zeigen, dass die Degeneration der CGRP-IR Nervenfasern durch Cap (schwarze Balken) zu einer signifikanten Abnahme END-IR und ENK-IR PMN im Vergleich zur Vehikelbehandlung (graue Balken) führte (\* $P < 0,05$ , ungepaarter Student t-Test) (Abbildung 9 E, F). Der Vehikel wird in den Abbildungen der quantitativen Analyse mit C für control bezeichnet. Die Anzahl mononukleärer Zellen (Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, in Abbildung 9 I mit 2 markiert) war 6 h nach FCA vergleichsweise gering und zeigte keine signifikanten Veränderungen. Die Daten in Abbildung 9 E, F sind als Mittelwert  $\pm$  S.E.M angegeben. Die immunhistochemische Lokalisation von END-IR (A, B) und ENK-IR (D, E) Immunzellen im entzündeten subkutanen Pfortengewebe 4 d nach FCA-Gabe bei Ratten mit Cap- (B, E) oder Vehikelbehandlung (A, D) wird in Abbildung 10 I dargestellt. Während der späten Phase des Entzündungsschmerzes konnten wir die Opioidpeptide vorwiegend in mononukleären Zellen (in Abbildung 10 I markiert mit 2) lokalisieren. Die mononukleären Immunzellen stellten die überwiegende Leukozytenpopulation im FCA-entzündeten subkutanen Pfortengewebe dar. B, I E zeigen, dass die Cap-Behandlung eine signifikante Abnahme der Rekrutierung END- (B) oder ENK-IR (I E) mononukleärer Zellen in das entzündete subkutane Gewebe im Vergleich zur Vehikelbehandlung (A, D) zur Folge hatte. Die Abbildungen C und F demonstrieren, dass sich nach Präabsorption des END (C) oder ENK (F) Antiserums mit einem synthetischen END- oder ENK-Peptid keine relevante IR zeigte. Balken = 20  $\mu$ m. In der quantitativen Analyse (Abbildung 10 II) stellten wir fest, dass die Degeneration der CGRP-IR Nervenfasern durch Cap (schwarze Balken) im Vergleich zur Vehikelbehandlung (graue Balken) zu einer signifikanten Abnahme von END-IR (II E) und ENK-IR mononukleären Immunzellen (II F) führte (\* $P < 0,05$ , ungepaarter Student t-Test). Die Anzahl PMN (in Abbildung 10 I mit 1 markiert) war 4 d nach FCA vergleichsweise gering und zeigte keine signifikanten Veränderungen. Die Daten in Abbildung 10 II E, F sind als Mittelwert  $\pm$  S.E.M angegeben.



**Abbildung 9:** Immunhistochemische Lokalisation (I) und quantitative Analyse (II) von END-IR (A, B, E) und ENK-IR (C, D, F) Immunzellen 6 h nach FCA, Cap (B, D) vs. Vehikel (A, C). 6 h nach FCA immigrierten vorwiegend Opioid-haltige PMN (mit 1 markiert) in das Entzündungsgebiet. Die Degeneration der CGRP-IR Nervenfasern durch Cap führte zu einer signifikanten Abnahme END-IR und ENK-IR PMN im Vergleich zur Vehikelbehandlung. Die Anzahl mononukleärer Zellen (mit 2 markiert) war vergleichsweise gering und zeigte keine signifikanten Veränderungen nach Cap- oder Vehikelbehandlung. \*  $P < 0,05$ ; Cap-Behandlung, schwarze Balken; Vehikelbehandlung, graue Balken; Mono, mononukleäre Immunzellen



**Abbildung 10:** Immunhistochemische Lokalisation (I) und quantitative Analyse (II) von END-IR (A, B, II E) und ENK-IR (D, I E, II F) Immunzellen 4 d nach FCA, Cap (B, I E) vs. Vehikel (A, D). 4 d nach FCA dominierten Opioid-haltige mononukleäre Zellen (mit 2 markiert) das Entzündungsgebiet. Die Degeneration der CGRP-IR Nervenfasern durch Cap führte zu einer signifikanten Abnahme von END-IR und ENK-IR mononukleären Zellen im Vergleich zur Vehikelbehandlung. PMN (mit 1 markiert) waren in geringer Anzahl vorhanden und zeigten keine signifikanten Veränderungen nach Cap- oder Vehikelbehandlung. Nach Präabsorption des END (C) oder ENK (I F) Antiserums mit einem synthetischen END- oder ENK-Peptid zeigte sich keine relevante IR. \*  $P < 0,05$ ; Cap-Behandlung, schwarze Balken; Vehikelbehandlung, graue Balken; Mono, mononukleäre Immunzellen

### **3.3 Lokalisation sensorischer und sympathischer Nervenfasern in enger Nachbarschaft zu endotheliale ICAM-1 in entzündetem subkutanem Pfortengewebe**

In Abbildung 11 wird die konfokale Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie von ICAM-1 (A, D, G) (rote Fluoreszenz) und CGRP (B) beziehungsweise TH (E, H) (grüne Fluoreszenz) in FCA-entzündetem subkutanem Pfortengewebe von Ratten dargestellt. C, F und I sind kombinierte Aufnahmen von ICAM-1 und CGRP (C) oder ICAM-1 und TH (F, I), mit denen wir eindeutig demonstrieren konnten, dass CGRP-IR sensorische Nervenfasern sowie TH-IR sympathische Nervenfasern in engem Kontakt zu ICAM-1 positiven Blutgefäßen im entzündeten subkutanen Gewebe liegen. Balken = 20 µm.

### **3.4 Veränderungen der Expression von Gefäßendothel ICAM-1 durch die Degeneration sensorischer Nervenfasern während einer schmerzhaften Entzündung**

Die konfokale Mikroskopie der ICAM-1 Immunfluoreszenzfärbung zeigte eine konstante, aber spärliche Expression von Gefäßendothel ICAM-1 in Ratten ohne Pfortenentzündung (Daten nicht dargestellt). In der in Abbildung 12 gezeigten konfokalen Mikroskopie der ICAM-1 Immunfluoreszenzfärbung (rote Fluoreszenz) in Blutgefäßen im entzündeten subkutanen Pfortengewebe 6 h (A, B, E, F) oder 4 d (C, D, G, H) nach FCA-Gabe konnten wir eine deutliche Hochregulation von ICAM-1 am Gefäßendothel darstellen. Nach Behandlung mit Cap zeigte sich in der quantitativen Analyse eine signifikante Abnahme ICAM-1-IR Blutgefäße 6 h nach FCA-Gabe (B) (Cap:  $4,9 \pm 0,5/384 \text{ mm}^2$  vs. Vehikel:  $8,5 \pm 0,2/384 \text{ mm}^2$ ) ( $p < 0,05$ ). Vier Tage nach FCA-Gabe war das gefäßendotheliale ICAM-1 ebenfalls signifikant reduziert (D) (Cap:  $5,9 \pm 0,3/384 \text{ mm}^2$  vs. Vehikel:  $11,2 \pm 0,6/384 \text{ mm}^2$ ) ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zur Vehikelbehandlung (A, C).