

Abbildung 11: Konfokale Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie von ICAM-1 (A, D, G) (rot) und CGRP- (B) oder TH (E, H) (grün) in FCA-entzündetem subkutanem Pfortengewebe. Kombinierte Aufnahmen von ICAM-1 und CGRP (C) sowie ICAM-1 und TH (F, I). CGRP-IR sensorische Nervenfasern (Pfeile) und TH-IR sympathische Nervenfasern (Pfeile) liegen in engem Kontakt zu ICAM-1 positiven Blutgefäßen (Pfeilspitzen) im entzündeten subkutanen Pfortengewebe.

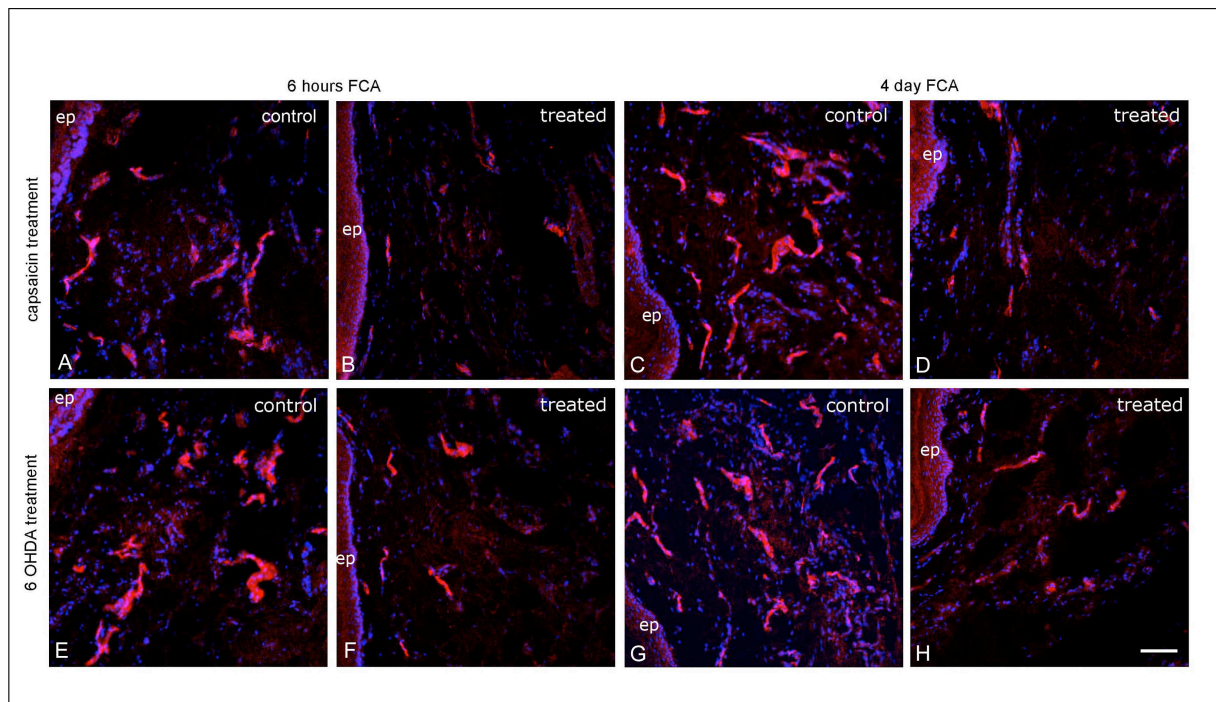


Abbildung 12: Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von ICAM-1 (A-H) (rot) im entzündeten subkutanen Pfortengewebe 6 h (A, B, E, F) und 4 d (C, D, G, H) nach FCA. Die Behandlung mit Cap (B, D) und 6-OHDA (F, H) führte in der frühen (6 h FCA) sowie in der späten (4 d FCA) Entzündungsphase zu einer signifikanten Reduktion ICAM-1-IR Blutgefäße im Vergleich zur Behandlung mit den jeweiligen Vehikeln (A, C und E, G). $p < 0,05$. ep, Epidermis; treated, Behandlung mit Cap oder 6-OHDA; control, Vehikelbehandlung

3.5 Verlust von subkutanen TH-IR sympathischen Nervenfasern nach 6-OHDA Behandlung

Nach der Behandlung mit 6-OHDA oder dem Vehikel untersuchten wir deren Einfluss auf die Veränderungen der postganglionären sympathischen Nervenfasern und ihrer die Blutgefäße innervierenden Nervenendigungen. Die Abbildungen 8 B, C, E, F zeigen TH-immunoreaktive Nervenfasern (grüne Fluoreszenz) in FCA-entzündetem subkutanem Pfortengewebe nach 6-OHDA Gabe (E, F) oder Vehikelbehandlung (B, C). Nach Behandlung mit 6-OHDA zeigte sich im Vergleich zur Vehikelbehandlung eine deutliche Reduktion von TH-IR sympathischen Nervenfasern innerhalb peripherer Nerven (nerve) der Haut (B, E) und von TH-IR sympathischen Nervenendigungen (C, F), die sich in der Wand der Blutgefäße dicht verzweigen. Balken = 20 μm . Die quantitative Analyse ergab eine signifikante Reduktion der TH-IR Nervenfasern um 45 % nach 6-OHDA Behandlung ($8,7 \pm 0,8/38,4 \text{ mm}^2$) verglichen mit der Vehikelbehandlung ($15,9 \pm 0,9/38,4 \text{ mm}^2$) ($P < 0,05$ ungepaarter Student t-Test).

3.6 Beitrag subkutaner sympathischer Nervenfasern zur Rekrutierung Opioidhaltiger Leukozyten während FCA-induzierter Entzündungsschmerzen

Während der frühen Phase des Entzündungsschmerzes (6 h nach FCA) konnten wir die Opioidpeptide vorwiegend in PMN (in Abbildung 13 I mit 1 markiert) darstellen. PMN bildeten zu diesem Zeitpunkt die Hauptpopulation der in das subkutane Pfortengewebe eingewanderten Leukozyten (Abbildung 13 A-D, Balken = 40 μm). B, D zeigen, dass die 6-OHDA Behandlung eine signifikante Abnahme der Rekrutierung END- (B) oder ENK-IR (D) PMN in das entzündete subkutane Gewebe im Vergleich zur Vehikelbehandlung (A, C) bewirkte. In der quantitativen Analyse (Abbildung 13 II) stellten wir fest, dass die Degeneration der TH-IR Nervenfasern durch 6-OHDA (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 13 E, F). Die Anzahl mononukleärer Zellen (Monozyten/Makrophagen, Lymphozyten, in Abbildung 13 I mit 2 markiert) war 6 h nach FCA vergleichsweise gering und zeigte keine signifikanten Veränderungen. Die Daten in Abbildung 13 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 6-OHDA (B, E) oder Vehikelbehandlung (A, D) wird in Abbildung 14 I dargestellt. Während der späten Phase des Entzündungsschmerzes waren die Opioidpeptide vorwiegend in mononukleären Zellen (in Abbildung 14 I markiert mit 2) lokalisiert. Wir konnten demonstrieren, dass mononukleäre Immunzellen 4 d nach FCA die überwiegende Leukozytenpopulation im FCA-entzündeten subkutanen Pfortengewebe darstellen. B, E zeigen, dass die 6-OHDA Behandlung eine signifikante Abnahme der Rekrutierung END-IR (B) oder ENK-IR (E) mononukleärer Zellen in das entzündete subkutane Gewebe im Vergleich zur Vehikelbehandlung (A, D) zur Folge hatte. Balken = 20 μm . Mit Hilfe der quantitativen Analyse (Abbildung 14 II) gelang uns der Nachweis einer signifikanten Abnahme von END-IR (E) und ENK-IR mononukleären Immunzellen (F) nach Degeneration der TH-IR Nervenfasern durch 6-OHDA (schwarze Balken) im Vergleich zur Vehikelbehandlung (graue Balken) (* $P < 0,05$, ungepaarter Student t-Test). Die Anzahl PMN (in Abbildung 14 I mit 1 markiert) war 4 d nach FCA vergleichsweise gering und zeigte keine signifikanten Veränderungen. Die Daten in Abbildung 14 II E, F sind als Mittelwert \pm S.E.M angegeben.

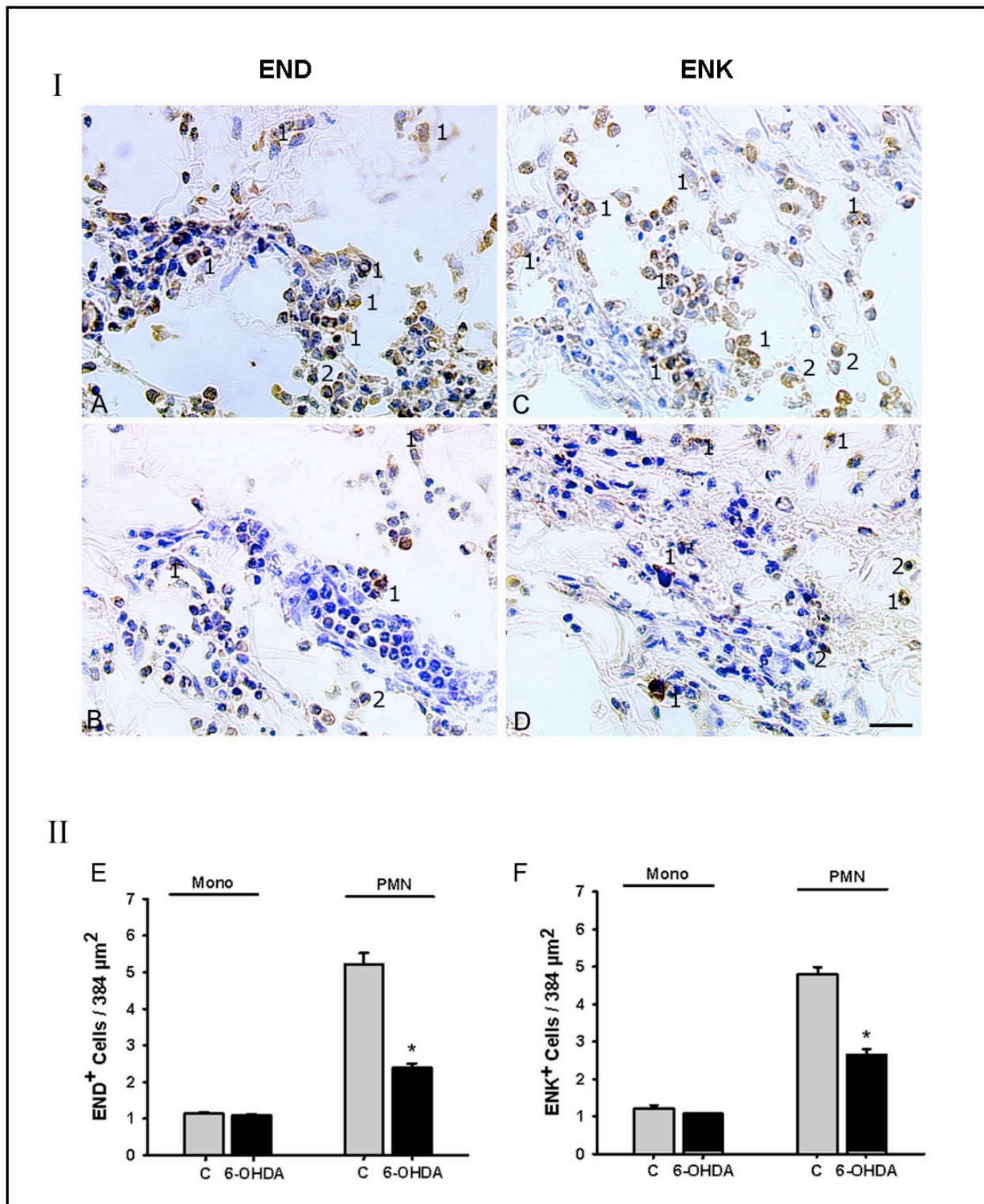


Abbildung 13: Immunhistochemische Lokalisation (I) und quantitative Analyse (II) von END-IR (A, B, E) und ENK-IR (C, D, F) Immunezellen 6 h nach FCA, 6-OHDA (B, D) vs. Vehikel (A, C). 6 h nach FCA immigrierten vorwiegend Opioid-haltige PMN (mit 1 markiert) in das Entzündungsgebiet. Die Degeneration der TH-IR sympathischen Nervenfasern durch 6-OHDA 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 6-OHDA- oder Vehikelbehandlung. * $P < 0,05$; 6-OHDA-Behandlung, schwarze Balken; Vehikelbehandlung, graue Balken; Mono, mononukleäre Immunezellen

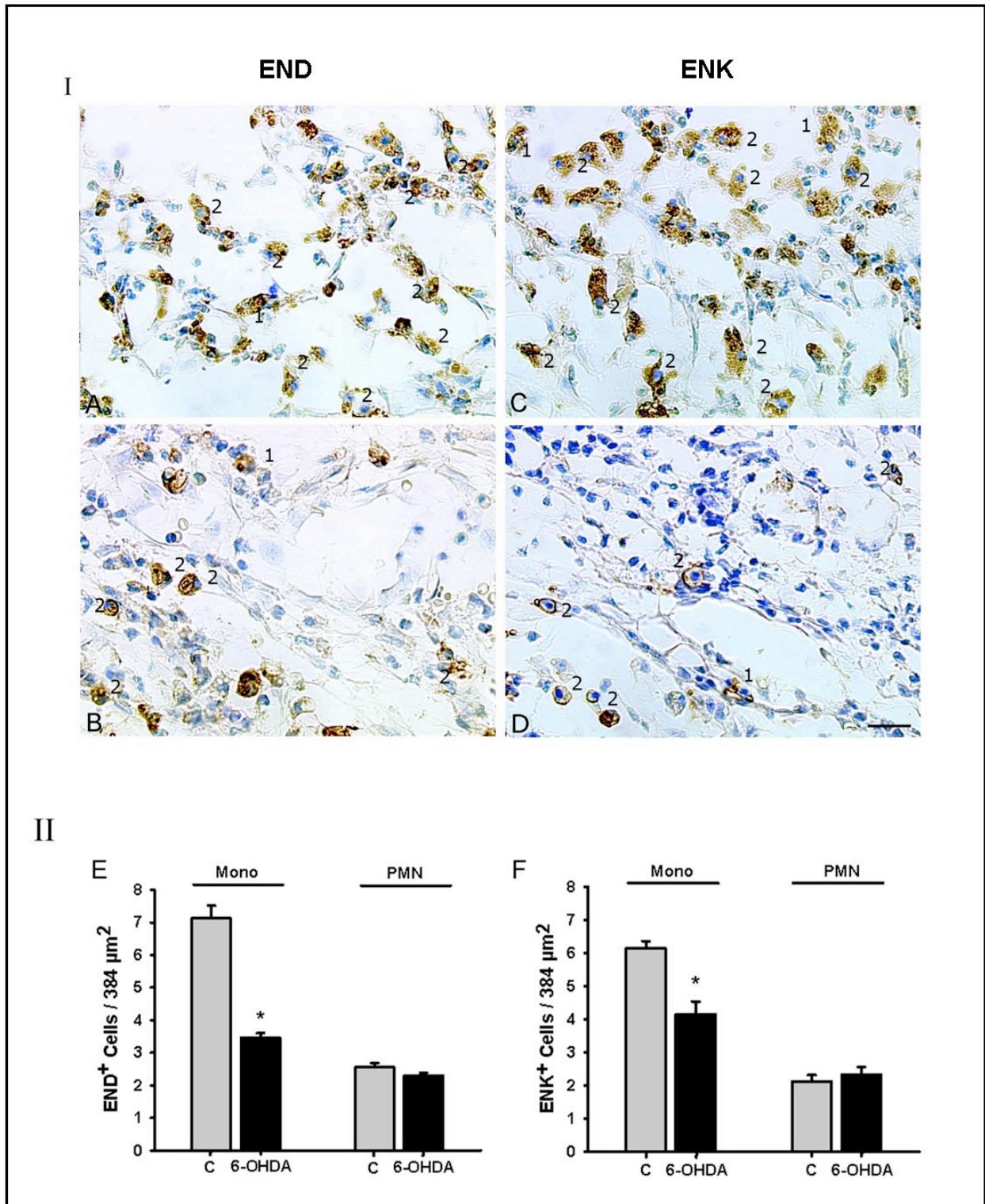


Abbildung 14: Immunhistochemische Lokalisation (I) und quantitative Analyse (II) von END-IR (A, B, E) und ENK-IR (C, D, F) Immunzellen 4 d nach FCA, 6-OHDA (B, D) vs. Vehikel (A, C). 4 d nach FCA waren Opioid-haltige mononukleäre Zellen (mit 2 markiert) im Entzündungsgebiet vorherrschend. Die Degeneration der TH-IR sympathischen Nervenfasern durch 6-OHDA führte zu einer signifikanten Abnahme von END-IR und ENK-IR mononukleären Zellen im Vergleich zur Vehikelbehandlung. PMN (mit 1 markiert) waren nur in geringer Anzahl vorhanden und zeigten keine signifikanten Veränderungen nach 6-OHDA- oder Vehikelbehandlung. * $P < 0,05$; 6-OHDA-Behandlung, schwarze Balken; Vehikelbehandlung, graue Balken; Mono, mononukleäre Immunzellen

3.7 Veränderungen der Expression von Gefäßendothel ICAM-1 durch die Degeneration subkutaner sympathischer Nervenfasern während einer schmerzhaften Entzündung

In den Abbildungen 12 E, F, G, H zeigen wir anhand der konfokalen Mikroskopie der ICAM-1 Immunfluoreszenzfärbung (rote Fluoreszenz) die deutlichen Veränderungen der Expression von Gefäßendothel ICAM-1 im subkutanen Pfortengewebe nach 6-OHDA Behandlung im Vergleich zum Vehikel 6 h (E, F) und 4 d nach FCA-Gabe (G, H). Balken = 20 μm . Die quantitative Analyse von ICAM-1-IR Blutgefäßen im entzündeten subkutanen Pfortengewebe 6 h nach FCA ergab eine signifikante Reduktion der ICAM-1-IR Blutgefäße nach 6-OHDA Behandlung (E) verglichen mit dem Vehikel (F) (6-OHDA: $5,5 \pm 0,4/38,4 \text{ mm}^2$ vs. Vehikel: $9,0 \pm 0,1/38,4 \text{ mm}^2$) ($P < 0,05$). Vier Tage nach FCA-Gabe war die Anzahl der ICAM-1-IR Blutgefäße nach 6-OHDA Behandlung (G) ebenfalls signifikant reduziert (6-OHDA: $6,2 \pm 0,5/38,4 \text{ mm}^2$ vs. Vehikel: $10,82 \pm 0,36/38,4 \text{ mm}^2$) im Vergleich zur ICAM-1-IR bei den mit dem Vehikel (H) behandelten Ratten ($P < 0,05$).

3.8 Einfluss der peripheren sensorischen und sympathischen Nervenfasern auf die lokale Opioid-vermittelte, Schwimmstress-induzierte Inhibition von Entzündungsschmerzen

In Abbildung 15 A stellen wir den Zeitverlauf des PPT nach CWS in der entzündeten (gefüllte Kreise) im Vergleich zur kontralateralen, nicht entzündeten Pfote (leere Kreise) von Ratten mit FCA-induzierter unilateraler Hinterpfotenzündung dar. Bei Ratten mit FCA-entzündeter Pfote waren die PPT-Werte in der entzündeten, nicht aber in der gesunden Pfote, 1 min. und 5 min. nach CWS signifikant erhöht (Abbildung 15 A). Diese stressinduzierte PPT-Elevation hatte ihren Höhepunkt nach 1 min. und klang in den folgenden 20-30 min. wieder ab. Die Abbildung 15 B stellt zum einen den Einfluss der intraplantaren Injektion von Naloxon auf den Maximaleffekt der CWS-induzierten PPT-Erhöhung dar. Die Gabe von 18 μg Naloxon i.pl. reduzierte den Maximaleffekt der CWS-induzierten PPT-Erhöhung signifikant. Desweiteren wird die Auswirkung der Behandlung der Ratten mit 6-OHDA oder Cap verdeutlicht. Beide Neurotoxine verringerten signifikant den Maximaleffekt der CWS-induzierten PPT-Erhöhung (* $P < 0,05$, ungepaarter Student t-test) (Abbildung 15 B).

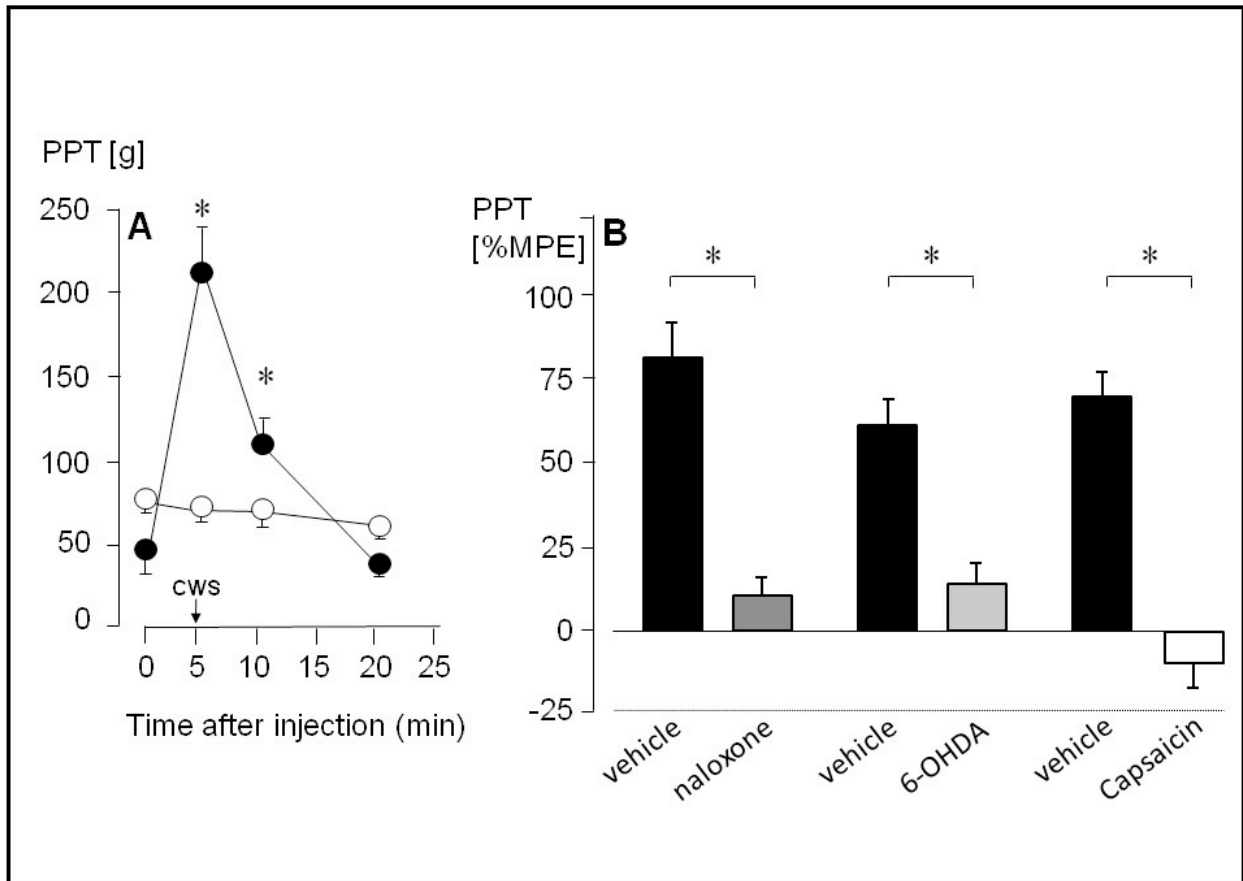


Abbildung 15: Zeitverlauf des PPT nach CWS in der entzündeten (gefüllte Kreise) im Vergleich zur kontralateralen nicht entzündeten (leere Kreise) Pfote nach FCA. Signifikante stressinduzierte PPT-Elevation nach CWS in der FCA-entzündeten Pfote (A). Einfluss von Naloxon (naloxone) i.pl., 6-OHDA i.p. und Cap s.c. auf den Maximaleffekt der CWS-induzierten PPT-Erhöhung. Naloxon i.pl. hob den Maximaleffekt der CWS-induzierten PPT-Erhöhung signifikant auf. 6-OHDA und Cap verringerten ebenfalls signifikant den Maximaleffekt der CWS-induzierten PPT-Erhöhung (B). * $P < 0,05$ (Ergebnisse dargestellt nach Mousa et al. 2010, *Barin Behav Immun* 24:1310-23).

4. Diskussion

Das Hauptergebnis dieser Studie ist, dass sensorische und sympathische Nervenfasern zu einer verstärkten Expression des Adhäsionsmoleküls Gefäßendothel-ICAM-1 bei einer lokalisierten schmerzhaften Entzündung beitragen. Simultan kommt es zu einer verstärkten Einwanderung Opioid-haltiger Leukozyten, was wiederum die endogene Opioid-vermittelte Hemmung der Entzündungsschmerzen fördert. Dies lässt sich durch die folgenden Punkte begründen: i) die signifikante Reduktion peripherer sensorischer und sympathischer Nervenfasern durch Einsatz ihrer entsprechenden Neurotoxine führt zu einer deutlichen Abnahme der Einwanderung Opioid-haltiger PMN (in der frühen Phase) und mononukleärer Immunzellen (in der späten Phase) im Rahmen einer schmerzhaften lokalen Entzündung; ii) die Lokalisation CGRP-IR und TH-IR Nervenfasern in enger Nachbarschaft zu ICAM-1-IR Blutgefäßen in entzündetem subkutanem Gewebe und die Innervation der ICAM-1-IR Blutgefäße durch TH-IR Nervenfasern; iii) die Hochregulation der Anzahl ICAM-1-IR Blutgefäße im Anschluss an die i.pl. Injektion von FCA und die Hemmung dieser Hochregulation durch die Degeneration peripherer sensorischer und sympathischer Nervenfasern durch die Behandlung mit Cap bzw. 6-OHDA; iv) schliesslich die aufgehobene stressinduzierte Opioid-vermittelte Hemmung von Entzündungsschmerzen nach Naloxongabe oder nach Degeneration der peripheren sensorischen und/oder sympathischen Nervenfasern.

In dem von uns verwendeten Modell der lokalen schmerzhaften Entzündung bei Ratten wird die Einwanderung Opioid-haltiger Leukozyten in das Entzündungsgebiet durch verschiedene Adhäsionsmoleküle gesteuert. Dies konnte durch frühere Studien unserer Arbeitsgruppe belegt werden (Machelska H et al., 1998, 2002, 2004). Die Blockade von L- und P-Selektin durch Fucoidin und der Leukozytenintegrine $\alpha 4$ und $\beta 2$ durch die entsprechenden monoklonalen AK führte zu einer signifikanten Abnahme der Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten in das subkutane entzündete Pfortengewebe von Ratten in der frühen Phase des Entzündungsschmerzes (6 h nach FCA) und bewirkte eine vollständige Aufhebung der peripheren CWS-induzierten Antinozizeption (Machelska H et al., 1998, 2004). Die Blockade von ICAM-1 durch den monoklonalen AK Anti-ICAM-1 führte zu einer signifikanten Verminderung END-haltiger Immunzellen im entzündeten subkutanen Pfortengewebe (Machelska H et al., 2002). Durch Stimulation (z.B. 1 min. CWS) werden die Opiode aus den Leukozyten freigesetzt. Sie binden an in der Nähe befindlichen Opioidrezeptoren auf sensorischen Nervenfasern

und führen zu einer intrinsischen Schmerzhemmung (Schäfer M et al., 1994, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass das Ausmass dieser intrinsischen Schmerzhemmung proportional zur Anzahl der Opioidpeptid-produzierenden Leukozyten im subkutanen Gewebe ist. Verschiedene Leukozytensubpopulationen tragen zu der intrinsischen Schmerzhemmung an unterschiedlichen Entzündungszeitpunkten bei (Rittner H et al., 2001). Während der frühen Phase des Entzündungsschmerzes (6 h nach FCA) wandern überwiegend Opioid-haltige PMN (z.B. Granulozyten) in das entzündete subkutane Pfortengewebe ein. In der späten Phase des Entzündungsschmerzes (4 d nach FCA) bilden mononukleäre Immunzellen (70-75 % Monozyten/Makrophagen, < 5 % Lymphozyten) die Hauptpopulation einwandernder Opioid-haltiger Leukozyten (Mousa SA et al., 2000; Rittner H et al., 2001; Machelska H et al., 2003). Brack et al. konnten nachweisen, dass PMN in der frühen Entzündungsphase über verschiedene Chemokine in das Entzündungsgebiet rekrutiert werden und dass die von ihnen sezernierten Opioidpeptide verantwortlich sind für die Opioid-vermittelte Antinozizeption (Brack A et al., 2004). In der späten Entzündungsphase repräsentierten Monozyten/Makrophagen die grösste Leukozytensubpopulation und standen bezüglich der Opioidproduktion im Vordergrund (Brack A et al., 2004).

Im ersten Teil dieser Studie untersuchten wir die potentielle Rolle des peripheren sensorischen Nervensystems zur Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten während zweier Entzündungszeitpunkte, 6 h und 4 d nach Entzündungsinduktion mit FCA. Wir behandelten die Ratten mit Cap, einem Neurotoxin, welches die peripheren sensorischen Nervenfasern selektiv zerstört (Bartho L et al., 1990; Sann H et al., 1995). Es ist bekannt, dass der neurotoxische Effekt von Cap dosisabhängig ist: niedrige Dosen bewirken eine Entleerung der Speicher für CGRP und SP, hohe Dosen von 50-100 mg/kg – sogar bereits eine einzelne Injektion – führen dahingegen zu einer substantiellen Degeneration sensorischer Nerven im Rückenmark, in den sensiblen Rückenmarksganglien sowie peripher im Subkutangewebe [zusammengefasst von Holzer P, 1991]. In unserer Studie führte die Behandlung mit Cap zu einer selektiven Reduktion CGRP-IR sensorischer Nervenendigungen im subkutanen Gewebe, was im Einklang mit früheren Studien steht (Zhang Q et al., 1998; Zhou L et al., 1998; Malmberg AB et al., 2004). Zusätzlich war die Rekrutierung von Opioid-haltigen Leukozyten aus der Zirkulation in das entzündete subkutane Pfortengewebe nach Degeneration der sensorischen Nervenfasern mit Capsaicin deutlich reduziert. In der

frühen Phase des Entzündungsschmerzes (6 h nach FCA) wirkte sich diese Abnahme vorwiegend auf PMN aus. In der Spätphase des Entzündungsschmerzes (4 d nach FCA) betraf die verminderte Rekrutierung in das Entzündungsgebiet vor allem die mononukleären Immunzellen. Die Experimente mittels Durchflusszytometrie von Al-Khrasani und Fürst konnten zeigen, dass sich nach Degeneration der sensorischen Nervenfasern mit Capsaicin bei Ratten mit einer FCA-induzierten Hinterpfotenentzündung 6 h und 4 d nach FCA Gabe der prozentuale Anteil Opioid-haltiger ($3E7^+$) Leukozyten in der Blutzirkulation nicht verändert (Mousa SA et al., 2010). Diese Entdeckung deutet darauf hin, dass die Verminderung Opioid-haltiger Immunzellen im entzündeten subkutanen Gewebe nicht mit einer Cap-induzierten Abnahme Opioid-haltiger Leukozyten im Blut zusammenhängt, sondern tatsächlich auf einer Beeinträchtigung der Immunzellrekrutierung beruht.

Eine ähnliche Beteiligung sensorischer Nerven und ihrer Neuropeptide SP und CGRP an der Rekrutierung von Leukozyten wurde im Vorfeld bereits in verschiedenen anderen Entzündungsmodellen gezeigt (Nordling L et al., 1992; Bhatia M et al., 1998; Nathan JD et al., 2002; Neuhuber WL, Tieg G, 2004). Nordling et al. untersuchten den Beitrag des sensorischen Nervensystems am Beispiel der experimentellen Urethritis bei Ratten. Die Entzündung wurde durch Einlage eines Latexstreifens in die Urethra ausgelöst und anhand einer auf histologischen Befunden beruhenden Entzündungsskala, welche die Einwanderung von Leukozyten in das entzündete Gewebe mit einschloss, ausgewertet. Die Autoren demonstrierten nach Behandlung der Ratten mit Cap eine signifikante Abschwächung der Urethritis (Nordling L et al., 1992). In einem Modell für experimentelle Pankreatitis in Ratten konnte der wichtige Beitrag sensorischer Nerven für die Leukozytenrekrutierung ebenfalls dargestellt werden (Bhatia M et al., 1998; Nathan JD et al., 2002). Nach regelmäßigen Injektionen von Caerulein entwickelten die Ratten der Interventionsgruppe eine schwere Pankreatitis, die histologisch durch eine ödematöse Schwellung, eine ausgeprägte Neutrophileninfiltration sowie Parenchymnekrosen charakterisiert war. Durch Capsaicingabe vor der Entzündungsinduktion konnte die Neutrophileninfiltration des Pankreasgewebes bei der Caerulein-induzierten Pankreatitis signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert werden (Nathan JD et al., 2002). Eine frühere Studie an NK-1R defizienten Mäusen mit Caerulein-induzierter Pankreatitis konnte anhand einer verringerten Granulozyteninfiltration ebenfalls die Rolle von SP für die Immunzellrekrutierung

aufzeigen (Bhatia M et al., 1998). In unterschiedlichen Modellen für experimentelle Hepatitis in Mäusen zeigte sich nach Vorbehandlung mit Capsaicin ein nahezu vollständiges Ausbleiben der entzündlichen Veränderungen auf morphologischer und molekularer Basis. Nach Blockade des NK-1R mit zwei verschiedenen Antagonisten zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Die anti-entzündliche Wirkung von Capsaicin und den NK-1R-Antagonisten war durch die Gabe von SP reversibel (Neuhuber WL, Tieggs G, 2004).

Wie durch die dargelegten Studien veranschaulicht, gibt es zunehmend Hinweise dafür, dass freigesetzte Neuropeptide von sensorischen Nerven (z.B. SP und CRGP) zu einer verstärkten Entzündungsantwort beitragen (zusammengefasst von Mousa SA, 2004). Welche Mechanismen hieran beteiligt sind, ist aktuell noch unbekannt. Eine vermeintliche Beteiligung des sensorischen Nervensystems an der Expression von Adhäsionsmolekülen wurde bisher noch nicht eingehend untersucht.

Interessanterweise wies die konfokale Doppelimmunfluoreszenz-Mikroskopie in der vorliegenden Studie eine enge Lagebeziehung von CGRP-IR Nervenfasern und subkutanen ICAM-1-IR Blutgefäßen nach. Die Anzahl ICAM-1-IR Blutgefäße pro Gewebeabschnitt des subkutanen Pfortengewebes stieg bei Tieren mit Entzündungsschmerzen signifikant an. Der Verlust der sensorischen Innervation infolge der Cap-induzierten Degeneration sensorischer Nervenendigungen verhinderte dagegen die Hochregulation der ICAM-1-IR Blutgefäße und suggeriert dadurch eine mögliche Verbindung zwischen dem peripheren Nervensystem und dem Immunsystem.

Unsere Entdeckung wird durch eine Studie unterstützt, in der nach Injektion von SP, CGRP und VIP in gesunde menschliche Haut innerhalb von wenigen Minuten bis Stunden eine subkutane Einwanderung von Granulozyten nachgewiesen wurde (Smith CH et al., 1993). Parallel dazu kam es zu einer signifikanten Hochregulation vaskulärer endothelialer Adhäsionsmoleküle. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass SP in der Lage ist direkt Endothelzellen menschlicher Umbilikalvenen und Hautgefäße zu einer verstärkten Expression von ICAM-1 anzuregen (Nakagawa N et al., 1993; Quinlan KL et al., 1998). Zusätzlich demonstrierte eine weitere Studie, dass SP die Adhäsion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen vorwiegend über LFA-1 (Lymphozytenfunktions-assoziiertes Antigen) /ICAM-1 Interaktionen fördert (Vishwanath R, Mukherjee R, 1996).

Quinlan et al. konnten sogar spezifische Elemente in der regulatorischen Domäne von ICAM-1 für die SP-abhängige Aktivierung der Transkription identifizieren (Quinlan KL et al., 1999). Gefäßendothel ICAM-1 ist eines der wichtigsten Moleküle für die feste Adhäsion und Diapedese der Leukozyten (Springer TA, 1990; Butcher EC, Picker LJ, 1996; Petruzzelli L et al., 1999). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 die Rekrutierung von Opioid-haltigen Leukozyten vermittelt. Die Blockade von ICAM-1 beeinträchtigte signifikant die periphere Opioid-vermittelte Antinozizeption (Machelska H et al., 2002). Basierend auf diesen Ergebnissen untersuchten wir die Hypothese, ob das sensorische Nervensystem zur peripheren endogenen Opioidpeptid-vermittelten Antinozizeption beiträgt. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die Degeneration der sensorischen Nervenfasern durch Capsaicin die CWS-induzierte Antinozizeption signifikant reduzierte. Da sich die CWS-induzierte Antinozizeption nur in der schmerzhaften, entzündeten Pfote nachweisen liess, in welcher Opioidpeptide präsent sind und die i.pl. Injektion von Naloxon die CWS-induzierte Antinozizeption vollständig antagonisierte, deuten unsere Resultate darauf hin, dass diese Antinozizeption vorwiegend auf der Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten und der kurzzeitigen Freisetzung ihrer Opioidpeptide beruht. Zu einer ähnlichen Abschwächung der CWS-induzierten Antinozizeption führte die Immunsuppression durch Ganzkörperbestrahlung (Stein C et al., 1990), durch Cyclosporin-A-Behandlung (Schäfer M et al, 1994) oder Cyclophosphamidgabe (Zöllner C et al., 2008). Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit unseren Resultaten. Zusammengefasst deuten unsere Ergebnisse auf eine mögliche regulierende Funktion der sensorischen Nervenfasern auf die ICAM-1 Expression auf Endothelzellen subkutaner Blutgefäße hin, was zu einer verstärkten Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten in ein Entzündungsgebiet führt und letztendlich die endogene Opioidpeptid-vermittelte Antinozizeption steuert.

Im zweiten Teil unserer Studie untersuchten wir die potenzielle Rolle des sympathischen Nervensystems durch chemische Sympathektomie. Die chemische Sympathektomie erfolgte durch die dreitägige Behandlung mit 6-OHDA, einem Neurotoxin, welches selektiv zur Degeneration sympathischer postganglionärer Nervenfasern führt (Levine JD et al., 1986; Hyatt-Sachs H et al., 1996; Zhou L et al., 1998). Übereinstimmend damit konnten wir nach Behandlung der Ratten mit 6-OHDA eine signifikante Abnahme der subkutanen TH-IR, also sympathischen postganglionären, Nervenfasern nachweisen. Zusätzlich reduzierte die chemische

Sympathektomie die Einwanderung Opioid-haltiger Leukozyten von der Zirkulation in das entzündete subkutane Pfortengewebe. Betroffen waren vorwiegend die PMN in der frühen (6 h nach FCA) und die mononukleären Immunzellen in der späten Phase (4 d nach FCA) der Entzündungsschmerzen. Die Experimente mittels Durchflusszytometrie von Al-Khrasani und Fürst konnten zeigen, dass sich nach Degeneration der sympathischen Nervenfasern mit 6-OHDA bei Ratten mit einer FCA-induzierten Hinterpfotenentzündung 6 h und 4 d nach FCA Gabe der prozentuale Anteil Opioid-haltiger ($3E7^+$) Leukozyten in der Blutzirkulation nicht verändert (Mousa SA et al., 2010). Diese Entdeckung zeigt, dass die Verminderung Opioid-haltiger Immunzellen im entzündeten subkutanen Gewebe nicht mit einer 6-OHDA-induzierten Abnahme Opioid-haltiger Leukozyten im Blut zusammenhängt, sondern auf einer Beeinträchtigung der Immunzellrekrutierung beruht.

In Einklang zu unseren Ergebnissen stehen frühere Studien, welche ebenfalls nach systemischer Sympathektomie eine verminderte Leukozyteneinwanderung in das Entzündungsgebiet bei verschiedenen Entzündungs- und Wundheilungsmodellen registrierten. Nordling et al. demonstrierten eine Abschwächung der experimentellen Urethritis nach chemischer Sympathektomie. Die Behandlung von Ratten mit Reserpin oder Guanethidin vor Entzündungsauslösung (Einlage von Latexstreifen in die Urethra) führte dabei zu einer signifikanten Verminderung der Entzündung, was sich unter anderem durch eine verminderte Leukozyteninfiltration darstellte (Nordling L et al., 1992). In einer weiteren Studie bewirkte die systemische Sympathektomie durch 6-OHDA eine verminderte Neutrophilen- und Makrophageninfiltration in das Wundgebiet und ging mit einer verzögerten Wundheilung von Exzisionswunden an Mäusen und Wistar-Ratten einher (Kim LR et al., 1998; Gosain A et al., 2006).

Studien, in denen eine lokale Sympathektomie durchgeführt wurde, unterstützen ebenfalls unsere Resultate, indem dort gezeigt wurde, dass auch durch das lokale Fehlen der peripheren sympathischen Nervenfunktionen die Rekrutierung von Opioid-haltigen Leukozyten verringert ist. Csillag et al. konnten nachweisen, dass es nach lokaler Sympathektomie zu einer Beeinträchtigung der Granulozytenrekrutierung im Rahmen der experimentellen kieferorthopädischen Zahnbewegung kommt (Csillag M et al., 2004).

Es liegen Hinweise dafür vor, dass das sympathische Nervensystem an der Steuerung der Expression von zellulären Adhäsionsmolekülen beteiligt ist. Redwine et al. konnten

zeigen, dass akuter psychologischer Stress bei Menschen zu erhöhten Katecholaminspiegeln im Blut führte und mit einer verstärkten Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle einherging (Redwine L et al., 2003). Griffis et al. wiesen bei Menschen einen Zusammenhang zwischen akuten Schmerzen, dem sympathischen Nervensystem und der Expression des Leukozyten-Integrins LFA-1 nach. Bei den untersuchten Probanden führten die Schmerzen zu einer Aktivierung des Sympathikus, zu einer Zunahme von zirkulierenden LFA-1 exprimierenden Leukozyten sowie zu einer erhöhten Dichte von LFA-1 Molekülen auf der Leukozytenoberfläche. Die Adhäsion zwischen Lymphozyten und Endothelzellen als wichtiger Schritt der Leukozyten-Rekrutierung findet vorwiegend über LFA-1/ICAM-1 Interaktionen statt (Griffis CA et al., 2007).

In der vorliegenden Studie konnten wir TH-IR sympathische Nervenendigungen in grosser Anzahl in engem Kontakt zu subkutanen Blutgefäßen finden, deren Äste sich um und in den ICAM-1-IR Blutgefäßen verzweigten. Die Degeneration der sympathischen postganglionären Nervenfasern durch das Neurotoxin 6-OHDA bewirkte eine signifikante Abnahme der Hochregulation der endothelialen ICAM-1-Expression im Zusammenhang mit den FCA-induzierten Entzündungsschmerzen, was mit einer deutlich verringerten Einwanderung Opioid-haltiger Leukozyten einherging.

Umweltstimuli (z.B. Stress) können über die Wirkung von Releasing-Substanzen (CRH, Zytokine und Kathecholamine) die rekrutierten Leukozyten zur Freisetzung ihrer Opioidpeptide aktivieren (Kavelaars A et al., 1990; Cabot PJ et al., 1997) und auf diesem Weg Entzündungsschmerzen über eine Interaktion mit peripheren Opioidrezeptoren hemmen (Cabot PJ et al., 1997; Machelska H et al., 1998). Die Freisetzung von Opioidpeptiden aus Leukozyten ist calciumabhängig und wird durch Kalium stimuliert, übereinstimmend mit der sogenannten vesikulären Freisetzung. Darüberhinaus konnte in unseren früheren Studien gezeigt werden, dass ICAM-1 die Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten vermittelt und dass die Blockade von ICAM-1 die Opioid-vermittelte periphere Antinozizeption während der FCA-induzierten Pfotenentzündung abschwächt (Machelska H et al., 1998, 2002). Daher untersuchten wir in der vorliegenden Studie die Hypothese, ob zusätzlich zum sensorischen Nervensystem auch das sympathische Nervensystem die endogene Opioid-vermittelte Antinozizeption unterstützt. In unseren Experimenten war der antinozizeptive Effekt des

CWS nach Degeneration der sympathischen Nervenfasern durch das Neurotoxin 6-OHDA signifikant abgeschwächt.

Da sich die CWS-induzierte Antinozizeption nur in der schmerzhaften, entzündeten Pfote nachweisen liess, in welcher Opioidpeptide präsent sind und die i.pl. Injektion von Naloxon die CWS-induzierte Antinozizeption vollständig inhibierte, weisen unsere Ergebnisse darauf hin, dass sich diese Antinozizeption vorwiegend durch die Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten begründen lässt. Sympathische Nervenfasern scheinen daher, ebenso wie sensorische Nervenfasern, an der Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten über eine verstärkte Expression von Gefässendothel ICAM-1 beteiligt zu sein und dadurch zur lokalen Kontrolle von Entzündungsschmerzen beizutragen. Zusätzlich evaluierte eine Studie den Beitrag von Zelladhäsionsmolekülen wie dem neuronalen Zelladhäsionsmolekül (N-CAM) an der direkten Zelladhäsion zwischen Opioid-haltigen Leukozyten und peripheren sensorischen Nerven und den Zusammenhang mit der peripheren Antinozizeption. Die Autoren demonstrierten, dass der AK Anti-N-CAM die Adhäsion zwischen Lymphozyten und DRG Neuronen abschwächte und die CWS-induzierte periphere Opioid-vermittelte Antinozizeption verhinderte (Hua S et al., 2006).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass in unserem Modell für lokale Entzündungsschmerzen, periphere sensorische und sympathische Nervenendigungen in enger Nachbarschaft zu subkutanen Blutgefässen liegen. Beide verstärken die Expression von endothelialelem ICAM-1 und steuern dadurch die Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten. Infolge bestimmter Stimuli, beispielsweise Stress, werden die Opioidpeptide freigesetzt und bewirken die endogene Opioid-vermittelte Hemmung der Entzündungsschmerzen. Das periphere sensorische sowie das sympathische Nervensystem scheinen eine wichtige Rolle für die Regulation bestimmter Entzündungs-induzierter vaskulärer Adhäsionsmoleküle wie z.B. ICAM-1 zu spielen. Sie tragen anscheinend zur Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten bei und bestimmen auf diesem Weg das Ausmass der intrinsischen Schmerzhemmung. Unsere Ergebnisse unterstützen deutlich bereits vorliegende Hinweise für eine enge anatomische und funktionelle Verbindung zwischen dem Nerven- und Immunsystem (Elenkov IJ et al., 2000).

5. Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass periphere sensorische - und sympathische Nerven zu einer gesteigerten Expression von Gefäßendothel ICAM-1 im Rahmen einer lokalen schmerzhaften Entzündung beitragen, simultan dazu die Rekrutierung von Opioid-haltigen Leukozyten fördern und als Konsequenz davon die periphere endogene Opioid-vermittelte Analgesie unterstützen. Zentrale Opioid-vermittelte Nebenwirkungen wie Atemdepression, Sedation, Dysphorie oder Abhängigkeit treten bei der peripheren Opioid-vermittelten Analgesie nicht auf.

Entzündung ist ein zentraler Bestandteil vieler akuter und chronischer Schmerzzustände. Prominente klinische Beispiele stellen postoperative Schmerzzustände und die chronische Arthritis dar. Die Epiduralanästhesie (EDA) wird häufig im Rahmen der postoperativen Analgesie nach abdominalchirurgischen Eingriffen verwendet. Es zeigte sich eine verminderte Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten in die Abdominalwunde bei Patienten mit EDA (Heurich M et al., 2007), was verdeutlicht, wie leicht die endogenen Mechanismen der peripheren Schmerzhemmung durch externe Manipulation verändert werden können. Die klinische Relevanz der peripheren Opioid-vermittelten Analgesie wird durch folgende Studien verständlich. Bei Patienten, die einer Kniearthroskopie wegen eines akuten Traumas oder einer chronisch degenerativen Kniegelenkserkrankung unterzogen wurden, ließen sich Opioid-haltige Leukozyten in der entzündeten Synovia immunhistochemisch nachweisen. Die Blockade der intraartikulären Opioidrezeptoren durch die lokale Administration des Opioidantagonisten Naloxon führte bei diesen Patienten zu signifikant stärkeren Knieschmerzen innerhalb der ersten 4 h postoperativ und zu einer signifikanten Zunahme der zusätzlichen Einnahme von Analgetika (Stein C et al., 1993). Desweiteren konnte durch die intraoperative Injektion von kleinen, systemisch inaktiven Dosen Morphin in das Kniegelenk im Anschluss an eine Arthroskopie im Vergleich zur intravenösen oder epiduralen Verabreichung von Morphin der zusätzliche Analgetikakonsum und die Nebenwirkungen innerhalb der ersten 24 h postoperativ signifikant eingeschränkt werden (Ho ST et al., 2000), was verdeutlicht wie die peripheren Opioidrezeptoren im klinischen Alltag potenziell genutzt werden können.

Das Wissen über die Beteiligung peripherer sensorischer und sympathischer Nerven an der gesteigerten Expression von Adhäsionsmolekülen wie dem Gefäßendothel ICAM-1

und der parallel damit einhergehenden verstärkten Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten eröffnet innovative Strategien für die Behandlung akuter und daraus resultierender chronischer Schmerz- und Entzündungszustände. Die Rekrutierung der Opioid-haltigen Leukozyten an den Entzündungsort stellt einen wichtigen Schritt im Rahmen der endogenen peripheren Analgesie dar. Zukünftige Studien sollten daher die Mechanismen der Rekrutierung weiter im Detail untersuchen. Durch eine gezielte, lokale Stimulation peripherer sensorischer oder sympathischer Nerven könnte es in Zukunft gelingen, Adhäsionsmoleküle gesteigert am Ort der Entzündung zu exprimieren und darüber Opioid-haltige Leukozyten vermehrt in das entzündete, schmerzhafte Gewebe zu dirigieren und die periphere endogene Analgesie zu verbessern. Die systemische Verabreichung von Analgetika und folglich auch deren Nebenwirkungen könnten auf diesem Wege eingeschränkt werden.

6. Zusammenfassung

Endogene Opioidpeptide können in bestimmten Regionen des Gehirns als Antwort auf Stress-Stimuli freigesetzt werden. Kürzlich wurden Leukozyten als zusätzliche Quelle endogener Opioide nachgewiesen. Infolge von Stress oder Releasing-Faktoren setzen sie ihre Opioidpeptide frei, welche als endogene Liganden an Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Nerven binden. Durch die Inhibition exzitatorischer Nerven und/oder Hemmung der Freisetzung exzitatorischer Neuropeptide führen Opioidpeptide zur potenten Hemmung entzündungsbedingter Schmerzen. Die Opioidwirkung bleibt auf das periphere Entzündungsgebiet beschränkt. Die unangenehmen, Opioid-induzierten zentralen Nebenwirkungen wie Atemdepression oder Abhängigkeit treten hierbei nicht auf. Eine wichtige Voraussetzung für die Rekrutierung der Leukozyten aus der Zirkulation in das entzündete Gewebe ist die Expression des intrazellulären Adhäsionsmoleküls 1 (ICAM-1) in Blutgefäßen im entzündeten Gewebe.

In der vorliegenden Studie untersuchten wir unter Entzündungsbedingungen den Einfluss peripherer sensorischer und/oder sympathischer Nerven auf die gesteigerte Expression von ICAM-1 und die simultan damit einhergehende Rekrutierung Opioidhaltiger Leukozyten zur Förderung einer potenten Inhibition von Entzündungsschmerzen. Die selektive Degeneration von peripheren sensorischen oder sympathischen Nervenfasern durch ihre entsprechenden Neurotoxine, Capsaicin oder 6-Hydroxydopamin, verringerte signifikant die subkutane Einwanderung β -Endorphin- (END-) und Met-Enkephalin- (ENK-) haltiger polymorphonukleärer Leukozyten (PMN) (in der frühen Phase) und mononukleärer Leukozyten (in der späten Phase) während der schmerzhaften Freund's complete Adjuvant- (FCA-) induzierten Hinterpfotenentzündung in Ratten. Calcitonin Gene-Related Peptide- (CGRP-) und Thyrosinhydroxylase- (TH-) immunoreaktive (IR) Nervenfasern befanden sich in engem Kontakt zu ICAM-1-IR Blutgefäßen innerhalb des entzündeten subkutanen Gewebes. Die selektive Degeneration der sensorischen oder sympathischen Nervenfasern schwächte die verstärkte Expression von Gefäßendothel ICAM-1 nach intraplantarer (i.pl.) Injektion von FCA ab und führte zur Aufhebung der peripheren endogenen Opioidpeptid-vermittelten Analgesie.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass periphere sensorische und sympathische Nerven im Rahmen einer lokalen schmerzhaften Entzündung die Expression von

Gefässendothel ICAM-1 steigern und simultan zu einer verstärkten Rekrutierung Opioid-haltiger Leukozyten führen, was infolgedessen die endogene Opioidpeptid-vermittelte Hemmung von Entzündungsschmerzen fördert. Unsere Resultate unterstützen die bereits existierenden Hinweise auf eine enge Verbindung zwischen peripherem Nerven- und Immunsystem.

7. Referenzen

1. Abrass CK, O'Connor SW, Scarpace PJ, Abrass IB. Characterization of the beta-adrenergic receptor of the rat peritoneal macrophage. *J Immunol* 1985;135(2):1338-41.
2. Bartho L, Stein C, Herz A. Involvement of capsaicin-sensitive neurones in hyperalgesia and enhanced opioid antinociception in inflammation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990;342(6):666-70.
3. Basbaum AI, Fields HL. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. *Annu Rev Neurosci* 1984;7:309-38.
4. Benjannet S, Rondeau N, Day R, Chretien M, Seidah NG. PC1 and PC2 are proprotein convertases capable of cleaving proopiomelanocortin at distinct pairs of basic residues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(9):3564-8.
5. Bhatia M, Saluja AK, Hofbauer B, et al. Role of substance P and the neurokinin 1 receptor in acute pancreatitis and pancreatitis-associated lung injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(8):4760-5.
6. Binder W, Mousa SA, Sitte N, Kaiser M, Stein C, Schafer M. Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue. *Eur J Neurosci* 2004;20(1):92-100.
7. Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 1994;15(11):504-11.
8. Borgland SL, Connor M, Christie MJ. Nociceptin inhibits calcium channel currents in a subpopulation of small nociceptive trigeminal ganglion neurons in mouse. *J Physiol* 2001;536(Pt 1):35-47.
9. Brack A, Labuz D, Schiltz A, et al. Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. *Anesthesiology* 2004;101(1):204-11.
10. Brack A, Rittner HL, Machelska H, et al. Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. *Pain* 2004;112(3):229-38.
11. Brown E. Neutrophil adhesion and the therapy of inflammation. *Semin Hematol* 1997;34(4):319-26.

12. Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272(5258):60-6.
13. Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, et al. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. *J Clin Invest* 1997;100(1):142-8.
14. Cabot PJ, Carter L, Schafer M, Stein C. Methionine-enkephalin-and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain. *Pain* 2001;93(3):207-12.
15. Cao T, Pinter E, Al-Rashed S, Gerard N, Hoult JR, Brain SD. Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cutaneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J Immunol* 2000;164(10):5424-9.
16. Carr DJ. The role of endogenous opioids and their receptors in the immune system. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991;198(2):710-20.
17. Cenac N, Garcia-Villar R, Ferrier L, et al. Proteinase-activated receptor-2-induced colonic inflammation in mice: possible involvement of afferent neurons, nitric oxide, and paracellular permeability. *J Immunol* 2003;170(8):4296-300.
18. Chard PS, Bleakman D, Savidge JR, Miller RJ. Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience* 1995;65(4):1099-108.
19. Crofford LJ, Sano H, Karalis K, et al. Local secretion of corticotropin-releasing hormone in the joints of Lewis rats with inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 1992;90(6):2555-64.
20. Csillag M, Berggreen E, Fristad I, Haug SR, Bletsa A, Heyeraas KJ. Effect of electrical tooth stimulation on blood flow and immunocompetent cells in rat dental pulp after sympathectomy. *Acta Odontol Scand* 2004;62(6):305-12.
21. Donnerer J, Schuligoi R, Stein C. Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 1992;49(3):693-8.
22. Drouin J, Chamberland M, Charron J, Jeannotte L, Nemer M. Structure of the rat pro-opiomelanocortin (POMC) gene. *FEBS Lett* 1985;193(1):54-8.

23. Dunzendorfer S, Kaser A, Meierhofer C, Tilg H, Wiedermann CJ. Cutting edge: peripheral neuropeptides attract immature and arrest mature blood-derived dendritic cells. *J Immunol* 2001;166(4):2167-72.
24. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000;52(4):595-638.
25. Engstad CS, Lund T, Osterud B. Epinephrine promotes IL-8 production in human leukocytes via an effect on platelets. *Thromb Haemost* 1999;81(1):139-45.
26. Erspamer V. The tachykinin peptide family. *Trends Neurosci* 1981;4:267-9.
27. Felten DL, Felten SY. Sympathetic noradrenergic innervation of immune organs. *Brain Behav Immun* 1988;2(4):293-300.
28. Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* 1987;100:225-60.
29. Felten DL, Felten SY, Carlson SL, Olschowka JA, Livnat S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J Immunol* 1985;135(2 Suppl):755s-65s.
30. Fields HL, Emson PC, Leigh BK, Gilbert RF, Iversen LL. Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature* 1980;284(5754):351-3.
31. Fiorucci S, Mencarelli A, Palazzetti B, et al. Proteinase-activated receptor 2 is an anti-inflammatory signal for colonic lamina propria lymphocytes in a mouse model of colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(24):13936-41.
32. Gosain A, Jones SB, Shankar R, Gamelli RL, DiPietro LA. Norepinephrine modulates the inflammatory and proliferative phases of wound healing. *J Trauma* 2006;60(4):736-44.
33. Griffis CA, Irwin MR, Martinez-Maza O, et al. Pain-related activation of leukocyte cellular adhesion molecules: preliminary findings. *Neuroimmunomodulation* 2007;14(5):224-8.
34. Hadden JW, Hadden EM, Middleton E, Jr. Lymphocyte blast transformation. I. Demonstration of adrenergic receptors in human peripheral lymphocytes. *Cell Immunol* 1970;1(6):583-95.

35. Hail N, Jr. Mechanisms of vanilloid-induced apoptosis. *Apoptosis* 2003;8(3):251-62.
36. Hassan AH, Ableitner A, Stein C, Herz A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* 1993;55(1):185-95.
37. Heikkila RE, Cohen G. 6-Hydroxydopamine: evidence for superoxide radical as an oxidative intermediate. *Science* 1973;181(98):456-7.
38. Hernanz A, Medina S, de Miguel E, Martin-Mola E. Effect of calcitonin gene-related peptide, neuropeptide Y, substance P, and vasoactive intestinal peptide on interleukin-1beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha production by peripheral whole blood cells from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Regul Pept* 2003;115(1):19-24.
39. Heurich M, Mousa SA, Lenzner M, et al. Influence of pain treatment by epidural fentanyl and bupivacaine on homing of opioid-containing leukocytes to surgical wounds. *Brain Behav Immun* 2007;21(5):544-52.
40. Ho ST, Wang TJ, Tang JS, Liaw WJ, Ho CM. Pain relief after arthroscopic knee surgery: intravenous morphine, epidural morphine, and intra-articular morphine. *Clin J Pain* 2000;16(2):105-9.
41. Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD. Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 1997;159(11):5654-60.
42. Ho WZ, Stavropoulos G, Lai JP, et al. Substance P C-terminal octapeptide analogues augment tumor necrosis factor-alpha release by human blood monocytes and macrophages. *J Neuroimmunol* 1998;82(2):126-32.
43. Höllt V. Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1986;26:59-77.
44. Holzer P. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience* 1988;24(3):739-68.
45. Holzer P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Adv Exp Med Biol* 1991;298:3-16.

46. Hoogerwerf WA, Zou L, Shenoy M, et al. The proteinase-activated receptor 2 is involved in nociception. *J Neurosci* 2001;21(22):9036-42.
47. Hua S, Hermanussen S, Tang L, Monteith GR, Cabot PJ. The neural cell adhesion molecule antibody blocks cold water swim stress-induced analgesia and cell adhesion between lymphocytes and cultured dorsal root ganglion neurons. *Anesth Analg* 2006;103(6):1558-64.
48. Hyatt-Sachs H, Bachoo M, Schreiber R, Vaccariello SA, Zigmond RE. Chemical sympathectomy and postganglionic nerve transection produce similar increases in galanin and VIP mRNA but differ in their effects on peptide content. *J Neurobiol* 1996;30(4):543-55.
49. Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hokfelt T. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci* 1995;15(12):8156-66.
50. Jiang M, Gold MS, Boulay G, et al. Multiple neurological abnormalities in mice deficient in the G protein Go. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(6):3269-74.
51. Kalies KU, Hartmann E. Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER)--two similar routes with different modes. *Eur J Biochem* 1998;254(1):1-5.
52. Kavelaars A, Berkenbosch F, Croiset G, Ballieux RE, Heijnen CJ. Induction of beta-endorphin secretion by lymphocytes after subcutaneous administration of corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* 1990;126(2):759-64.
53. Keates AC, Castagliuolo I, Qiu B, Nikulasson S, Sengupta A, Pothoulakis C. CGRP upregulation in dorsal root ganglia and ileal mucosa during *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *Am J Physiol* 1998;274(1 Pt 1):G196-202.
54. Kim LR, Whelpdale K, Zurowski M, Pomeranz B. Sympathetic denervation impairs epidermal healing in cutaneous wounds. *Wound Repair Regen* 1998;6(3):194-201.
55. Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. *Immunol Today* 2000;21(11):539-42.
56. Lai JP, Douglas SD, Ho WZ. Human lymphocytes express substance P and its receptor. *J Neuroimmunol* 1998;86(1):80-6.

57. Lansac G, Dong W, Dubois CM, et al. Lipopolysaccharide mediated regulation of neuroendocrine associated proprotein convertases and neuropeptide precursor processing in the rat spleen. *J Neuroimmunol* 2006;171(1-2):57-71.
58. Levine JD, Dardick SJ, Roizen MF, Helms C, Basbaum AI. Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *J Neurosci* 1986;6(12):3423-9.
59. Linner KM, Quist HE, Sharp BM. Expression and function of proenkephalin A messenger ribonucleic acid in murine fetal thymocytes. *Endocrinology* 1996;137(3):857-63.
60. Machelska H, Brack A, Mousa SA, et al. Selectins and integrins but not platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 regulate opioid inhibition of inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2004;142(4):772-80.
61. Machelska H, Cabot PJ, Mousa SA, Zhang Q, Stein C. Pain control in inflammation governed by selectins. *Nat Med* 1998;4(12):1425-8.
62. Machelska H, Mousa SA, Brack A, et al. Opioid control of inflammatory pain regulated by intercellular adhesion molecule-1. *J Neurosci* 2002;22(13):5588-96.
63. Machelska H, Schopohl JK, Mousa SA, Labuz D, Schafer M, Stein C. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *J Neuroimmunol* 2003;141(1-2):30-9.
64. Machelska H, Stein C. Pain control by immune-derived opioids. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2000;27(7):533-6.
65. Machelska H, Stein C. Immune mechanisms in pain control. *Anesth Analg* 2002;95(4):1002-8, table of contents.
66. Malmberg AB, Mizisin AP, Calcutt NA, von Stein T, Robbins WR, Bley KR. Reduced heat sensitivity and epidermal nerve fiber immunostaining following single applications of a high-concentration capsaicin patch. *Pain* 2004;111(3):360-7.
67. Marcinkiewicz M, Day R, Seidah NG, Chretien M. Ontogeny of the prohormone convertases PC1 and PC2 in the mouse hypophysis and their colocalization with corticotropin and alpha-melanotropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(11):4922-6.

68. Matucci-Cerinic M, Partsch G. The contribution of the peripheral nervous system and the neuropeptide network to the development of synovial inflammation. *Clin Exp Rheumatol* 1992;10(3):211-5.
69. Mbikay M, Seidah NG, Chretien M. Neuroendocrine secretory protein 7B2: structure, expression and functions. *Biochem J* 2001;357(Pt 2):329-42.
70. Middleton J, Patterson AM, Gardner L, Schmutz C, Ashton BA. Leukocyte extravasation: chemokine transport and presentation by the endothelium. *Blood* 2002;100(12):3853-60.
71. Millan MJ. Multiple opioid systems and pain. *Pain* 1986;27(3):303-47.
72. Mousa SA, Bopaiah CP, Richter JF, Yamdeu RS, Schafer M. Inhibition of inflammatory pain by CRF at peripheral, spinal and supraspinal sites: involvement of areas coexpressing CRF receptors and opioid peptides. *Neuropsychopharmacology* 2007;32(12):2530-42.
73. Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura M, et al. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain* 2007;130(Pt 2):502-13.
74. Mousa SA, Machelska H, Schafer M, Stein C. Co-expression of beta-endorphin with adhesion molecules in a model of inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 2000;108(1-2):160-70.
75. Mousa SA, Schafer M, Mitchell WM, Hassan AH, Stein C. Local upregulation of corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 receptors in rats with painful hindlimb inflammation. *Eur J Pharmacol* 1996;311(2-3):221-31.
76. Mousa SA, Shakibaei M, Sitte N, Schafer M, Stein C. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. *Endocrinology* 2004;145(3):1331-41.
77. 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;24(8):1310-23.
78. Mousa SA, Zhang Q, Sitte N, Ji R, Stein C. beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol* 2001;115(1-2):71-8.

79. Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 1984;5(1):25-44.
80. Nakagawa N, Iwamoto I, Yoshida S. Effect of substance P on the expression of an adhesion molecule ICAM-1 in human vascular endothelial cells. *Regul Pept* 1993;46(1-2):223-4.
81. Nathan JD, Peng RY, Wang Y, McVey DC, Vigna SR, Liddle RA. Primary sensory neurons: a common final pathway for inflammation in experimental pancreatitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283(4):G938-46.
82. Neuhuber WL, Tiegs G. Innervation of immune cells: evidence for neuroimmunomodulation in the liver. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004;280(1):884-92.
83. Nordling L, Lundeberg T, Brolin J, Liedberg H, Ekman P, Theodorsson E. The role of sensory nerves in catheter-induced urethral inflammation. *Eur Urol* 1992;21(1):75-8.
84. Nordling L, Lundeberg T, Ekman P, Liedberg H, Theodorsson E. Role of the autonomic nervous system in catheter-induced urethral inflammation. *Eur Urol* 1992;21(4):328-31.
85. Nystedt S, Larsson AK, Aberg H, Sundelin J. The mouse proteinase-activated receptor-2 cDNA and gene. Molecular cloning and functional expression. *J Biol Chem* 1995;270(11):5950-55.
86. Ottaviani E, Franchini A, Franceschi C. Pro-opiomelanocortin-derived peptides, cytokines, and nitric oxide in immune responses and stress: an evolutionary approach. *Int Rev Cytol* 1997;170:79-141.
87. Parsons CG, Czlankowski A, Stein C, Herz A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Activation by endogenous opioids and role of the pituitary-adrenal axis. *Pain* 1990;41(1):81-93.
88. Petruzzelli L, Takami M, Humes HD. Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 1999;106(4):467-76.
89. Pini A, Baranowski R, Lynn B. Long-Term Reduction in the Number of C-Fibre Nociceptors Following Capsaicin Treatment of a Cutaneous Nerve in Adult Rats. *Eur J Neurosci* 1990;2(1):89-97.

90. Przewlocki R, Hassan AH, Lason W, Epplen C, Herz A, Stein C. Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception. *Neuroscience* 1992;48(2):491-500.
91. Quinlan KL, Naik SM, Cannon G, et al. Substance P activates coincident NF-AT- and NF-kappa B-dependent adhesion molecule gene expression in microvascular endothelial cells through intracellular calcium mobilization. *J Immunol* 1999;163(10):5656-65.
92. Quinlan KL, Song IS, Bunnett NW, et al. Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. *Am J Physiol* 1998;275(6 Pt 1):C1580-90.
93. Redwine L, Snow S, Mills P, Irwin M. Acute psychological stress: effects on chemotaxis and cellular adhesion molecule expression. *Psychosom Med* 2003;65(4):598-603.
94. Reinisch N, Kirchmair R, Kahler CM, et al. Attraction of human monocytes by the neuropeptide secretoneurin. *FEBS Lett* 1993;334(1):41-4.
95. Rittner HL, Brack A, Machelska H, et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* 2001;95(2):500-8.
96. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-42.
97. Sann H, Jancso G, Ambrus A, Pierau FK. Capsaicin treatment induces selective sensory degeneration and increased sympathetic innervation in the rat ureter. *Neuroscience* 1995;67(4):953-66.
98. Schafer M, Carter L, Stein C. Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(10):4219-23.
99. Schafer M, Imai Y, Uhl GR, Stein C. Inflammation enhances peripheral mu-opioid receptor-mediated analgesia, but not mu-opioid receptor transcription in dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol* 1995;279(2-3):165-9.

100. Schafer M, Mousa SA, Zhang Q, Carter L, Stein C. Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(12):6096-100.
101. Schmitt TK, Mousa SA, Brack A, et al. Modulation of peripheral endogenous opioid analgesia by central afferent blockade. *Anesthesiology* 2003;98(1):195-202.
102. Schratzberger P, Reinisch N, Prodinger WM, et al. Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1997;158(8):3895-901.
103. Seidah NG, Benjannet S, Hamelin J, et al. The subtilisin/kexin family of precursor convertases. Emphasis on PC1, PC2/7B2, POMC and the novel enzyme SKI-1. *Ann N Y Acad Sci* 1999;885:57-74.
104. Sharp BM. Opioid receptor expression and signalling by cells involved in host defence and immunity. Georgetown: Landes Bioscience.
105. Sitte N, Busch M, Mousa SA, et al. Lymphocytes upregulate signal sequence-encoding proopiomelanocortin mRNA and beta-endorphin during painful inflammation in vivo. *J Neuroimmunol* 2007;183(1-2):133-45.
106. Smith CH, Barker JN, Morris RW, MacDonald DM, Lee TH. Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin. *J Immunol* 1993;151(6):3274-82.
107. Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346(6283):425-34.
108. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76(2):301-14.
109. Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Engl J Med* 1995;332(25):1685-90.
110. Stein C, Gramsch C, Hassan AH, et al. Local opioid receptors mediating antinociception in inflammation: endogenous ligands. *Prog Clin Biol Res* 1990;328:425-7.
111. Stein C, Gramsch C, Herz A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. *J Neurosci* 1990;10(4):1292-8.

112. Stein C, Hassan AH, Lehrberger K, Giefing J, Yassouridis A. Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet* 1993;342(8867):321-4.
113. Stein C, Hassan AH, Przewlocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87(15):5935-9.
114. Stein C, Machelska H, Binder W, Schafer M. Peripheral opioid analgesia. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(1):62-5.
115. Stein C, Machelska H, Schafer M. Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z Rheumatol* 2001;60(6):416-24.
116. Stein C, Millan MJ, Shippenberg TS, Peter K, Herz A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;248(3):1269-75.
117. Stein C, Pfluger M, Yassouridis A, et al. No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *J Clin Invest* 1996;98(3):793-9.
118. Steinhoff M, Vergnolle N, Young SH, et al. Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* 2000;6(2):151-8.
119. Straub RH, Mayer M, Kreutz M, Leeb S, Scholmerich J, Falk W. Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. *J Leukoc Biol* 2000;67(4):553-8.
120. Suzuki S, Toyabe S, Moroda T, et al. Circadian rhythm of leucocytes and lymphocytes subsets and its possible correlation with the function of the autonomic nervous system. *Clin Exp Immunol* 1997;110(3):500-8.
121. Takahashi HK, Morichika T, Iwagaki H, et al. Effect of beta 2-adrenergic receptor stimulation on interleukin-18-induced intercellular adhesion molecule-1 expression and cytokine production. *J Pharmacol Exp Ther* 2003;304(2):634-42.
122. Terman GW, Shavit Y, Lewis JW, Cannon JT, Liebeskind JC. Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science* 1984;226(4680):1270-7.

123. Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schutze E, Refior HJ, Messmer K. In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation* 1999;6(4):281-90.
124. Vishwanath R, Mukherjee R. Substance P promotes lymphocyte-endothelial cell adhesion preferentially via LFA-1/ICAM-1 interactions. *J Neuroimmunol* 1996;71(1-2):163-71.
125. Wang X, Fiscus RR, Yang L, Mathews HL. Suppression of the functional activity of IL-2-activated lymphocytes by CGRP. *Cell Immunol* 1995;162(1):105-13.
126. Zhang Q, Schaffer M, Elde R, Stein C. Effects of neurotoxins and hindpaw inflammation on opioid receptor immunoreactivities in dorsal root ganglia. *Neuroscience* 1998;85(1):281-91.
127. Zhou L, Zhang Q, Stein C, Schafer M. Contribution of opioid receptors on primary afferent versus sympathetic neurons to peripheral opioid analgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286(2):1000-6.
128. Zollner C, Mousa SA, Fischer O, et al. Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain. *J Clin Invest* 2008;118(3):1065-73.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit hat mich während und nach Abschluss des Studiums der Humanmedizin begleitet. Sie hat mich mit vielen interessanten Menschen zusammengebracht, von deren Wissen ich profitieren durfte und von denen ich viel über wissenschaftliches Arbeiten lernen konnte. Für ihre Unterstützung möchte ich mich gern bedanken.

An erster Stelle richtet sich mein Dank an Herrn Prof. Michael Schäfer für die Überlassung des Promotionsthemas und die Eröffnung der Möglichkeit in der Klinik für Anästhesie und operative Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin meine Dissertation durchführen zu dürfen. Ich möchte mich darüber hinaus für seine Geduld, die Bereitschaft und Zeit für Fragen und Diskussionen sowie die stets kompetente Unterstützung meiner Arbeit bedanken.

Herrn Ph.D. Shaaban A. Mousa gilt mein besonderer Dank für die zeitintensive, umfassende Betreuung während des experimentellen Teils der Arbeit. Seine Kompetenz und seine Begeisterung für die Immunhistochemie haben mich beeindruckt. Durch seine freundliche und humorvolle Art hat sich die Zusammenarbeit mit ihm stets sehr angenehm gestaltet. Dank seiner optimistischen Grundeinstellung wurde ich immer wieder ermutigt, was mir das Anfertigen dieser Arbeit sehr erleichtert hat.

Ebenso möchte ich mich bei den anderen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanken.

Abschliessend möchte ich meinen Eltern Klaus und Maja Brendl für ihre Anteilnahme und unermüdliche Unterstützung während der Erstellung meiner Dissertation von ganzem Herzen danken.

Curriculum Vitae

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

Publikationen & Vorträge

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;24(8):1310-23.

Brendl U., Kern B., von Flüe M. Evaluation of Localizing Modalities for Primary Hyperparathyroidism. SGC Kongress 2010

Brendl U., Chautems R., Roche B. in *Chirurgische Proktologie*, 2. Auflage. Lange, Möller, Girona (EDS.) Lokalanästhesieverfahren bei proktologischen Eingriffen.

Chautems R., Brendl U., Roche B. in *Chirurgische Proktologie*, 2. Auflage. Lange, Möller, Girona (EDS.) Anale Schmerzen beim Pudenduskompressionssyndrom.

Basel, 03.06.2012

Erklärung

„Ich, Ute Brendl, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Beitrag des sensorischen und sympathischen Nervensystems zur Expression des vaskulären Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und zur Rekrutierung Opioid-haltiger Immunzellen für die Inhibition von Entzündungsschmerzen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Basel, 03.06.2012