

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

DISSERTATION

Granulozyten tragen zur Schmerzkontrolle, nicht jedoch zur Schmerzentstehung in entzündetem
Gewebe bei

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité -
Universitätsmedizin Berlin

von
Karin Beschmann
aus Groß-Gerau

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Schäfer

Gutachter: 2. Prof. Dr. med. O. Liesenfeld

Gutachter: 3. Prof. Dr. med. M. Bauer

Datum der Promotion: 22.03.2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Allgemeine Einführung	5
1.2	Analgetische Wirkung von Immunzellen	5
1.3	Hyperalgetische Wirkung von Immunzellen	7
1.4	Methoden zur Quantifizierung einer Hyperalgesie und Analgesie	9
1.5	Fragestellung.....	11
2	Material und Methoden	12
2.1	Versuchstiere und Entzündungsmodell	12
2.2	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	12
2.2.1	Funktionsprinzip der konventionellen PCR.....	12
2.2.2	Funktionsprinzip der Light Cycler-PCR.....	13
2.2.3	Entnahme des Pfotengewebes und des Rückenmarkes	14
2.2.4	RNA-Isolation und cDNA-Synthese	15
2.2.5	Anwendung konventionelle PCR und Herstellung eines Standards.....	16
2.2.6	Anwendung Light Cycler-PCR.....	17
2.3	Zellmigration.....	18
2.4	Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Staining, FACS).....	20
2.4.1	Gewebeentnahme und Aufbereitung	20
2.4.2	Antikörper und Protokolle der Färbung.....	21
2.4.3	Durchflusszytometrische Analyse	22
2.5	Verwendete Lösungen und Substanzen.....	23
2.6	Geräte	23
2.7	Messung der Schmerzschwellen durch den Hargreaves-Test.....	24
2.8	Versuchsprotokolle.....	24
2.8.1	Chemokin-mRNA-Expression in der entzündeten Pfote.....	24
2.8.2	Migration gegen MIP-2	24
2.8.3	MIP-2-Injektion in die nicht entzündete Pfote.....	25
2.8.4	MIP-2-Injektion in die entzündete Pfote	25
2.8.5	Granulozytendepletion in der entzündeten Pfote	25
2.8.6	Thermale Hyperalgesie in der entzündeten und nicht entzündeten Pfote.....	25
2.8.7	c-fos-mRNA-Expression im Rückenmark bei entzündeter Pfote	26

2.9	Statistische und graphische Auswertung, Software	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Chemokin-mRNA-Expression in der entzündeten Pfote	27
3.2	Migration gegen MIP-2	28
3.3	MIP-2-Injektion in die nicht entzündete Pfote.....	29
3.4	MIP-2-Injektion in die entzündete Pfote	31
3.5	Granulozytendepletion in der entzündeten Pfote	33
3.6	Thermale Hyperalgesie.....	35
3.7	c-fos-mRNA-Expression im Rückenmark bei entzündeter Pfote	36
4	Diskussion	37
4.1	Chemokinexpression im Entzündungszeitverlauf.....	37
4.2	Chemotaktische Effekte von Chemokinen	38
4.3	Granulozyten und Hyperalgesie (nicht entzündete Pfote).....	39
4.4	Granulozyten, Chemokine und Hyperalgesie (nicht entzündete Pfote)	40
4.5	Granulozyten und Hyperalgesie (FCA entzündete Pfote).....	42
4.6	Spinale c-fos-mRNA-Expression als Hyperalgesiemarker	43
4.7	Methodenkritik.....	44
5	Zusammenfassung.....	48
6	Abkürzungen.....	51
7	Literatur.....	53
8	Danksagung	57
9	Lebenslauf	58
10	Erklärung.....	59

6 Abkürzungen

Ak	Antikörper
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
CD	Cluster of Differentiation
CD45	Marker für hämatopoetische Zellen (Leukozyten), Antikörper gegen Protein Tyrosin Phosphatase (PTP)
CINC-2	cytokine-induced chemokine-2
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
COX	Cyclooxygenase
CRF	Corticotropin Releasing Factor
CWS	Cold Water Swim Stress
CXCR2	CX-Chemokine receptor-2
CyChrome	Cy5 + Phycoerythrin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure, desoxyribonukleid acid
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuraciltriphosphat
DYN	Dynorphin
ED1	Marker für Monozyten/Makrophagen, Antikörper gegen ein lysosomales Membranantigen (CD68)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure, ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
END	Endorphin
ENK	Enkephalin
FACS	Durchflusszytometrie, Fluorescence Activated Cell Staining
FCA	komplettes Freundsches Adjuvanz, Freund's Complete Adjuvant
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
fMLP	formyl Methionyl Peptide

FSC	Vorwärtsstreulicht, forward scatter
Hepes	Puffer
i.pl.	intraplantar
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
i.v.	intravenös
KC	keratinocyte derived chemokine
LIX	lipopolysaccharide-induced chemokine
LPS	Lipopolysaccharid
LTB4	Leukotrien B4
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure, messenger ribonucleic acid
NaN ₃	Natriumazid
NGF	Nerve Growth Factor
PBS	Phosphat-gepuffertes Kochsalz, phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion, polymerase chain reaction
PE	Phycoerythrin
PENK	Proenkephalin
PFA	Paraformaldehyd
PMN	Polymorphnukleäre Zellen, polymorphnuclear cells
PNS	peripheres Nervensystem
RAM	Kaninchen (= rabbit) anti-Maus Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure, ribonucleic acid
RPL-19	ribosomales Protein-19, ribosomal protein-19
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure, ribosomal ribonucleic acid
SSC	Seitwärtsstreulicht, sideward scatter
TBE	Puffer bestehend aus Trisma Base, Borsäure und EDTA
TNF	Tumornekrosefaktor
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure, transfer ribonucleic acid
ZNS	zentrales Nervensystem

8 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. Schäfer für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bedanken. Herrn Dr. med. Alexander Brack und Frau Dr. med. Heike Rittner danke ich sehr herzlich für die ausgezeichnete theoretische und praktische Hilfe, sowohl bei der Planung und Durchführung der Experimente, als auch bei der Datenverarbeitung. Zudem danke ich beiden für die persönliche Unterstützung und die große Geduld. Frau Susanne Kotré danke ich für die Hilfe bei der praktischen Umsetzung zahlreicher Experimente. Frau Dr. Dominica Labuz bin ich für die Einführung in die Testung der thermalen Hyperalgesie zu großem Dank verpflichtet. Ebenso danke ich Mohammed Shaqura für den Erfindungsgeist und die Hilfe bei der Entwicklung einer Methode zur Isolation des lumbalen Anteils des Rückenmarks. Frau Dr. med. Wiebke Pühler danke ich für die Einführung in die Technik der Light Cyclers-PCR.

Ein großes Dankeschön gebührt meiner Familie und meinem Freund Stefan Fuchs, ohne deren finanzielle und persönliche Unterstützung, sowie deren gute Ratschläge und Kommentare mir die Durchführung dieser Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

10 Erklärung

Ich, Karin Beschmann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Granulozyten tragen zur Schmerzkontrolle, nicht jedoch zur Schmerzentstehung in entzündetem Gewebe bei“ 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.“