

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. N. Roewer

**„Reaktive Sauerstoffradikale bei der Schmerzentstehung“**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Annick Nathalie Neumann

aus Reutlingen

Würzburg, Januar 2014

Referentin: PD Dr. Heike Rittner

Koreferent/Koreferentin: Prof. Erhard Wischmeyer

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16.7.2014

Die Promovendin ist Ärztin

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Stand der Forschung .....	1
1.2 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Molekulare Schmerzforschung.....	14
1.3 Fragestellung der Promotion.....	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1 Isolation humaner Monozyten (MACS Separation).....	19
2.2 Isolation humaner neutrophiler Granulozyten .....	20
2.3 Versuchstiere .....	21
2.4 Isolation von Peritonealmakrophagen aus Ratten .....	21
2.5 Isolation von neutrophilen Granulozyten aus Ratten .....	22
2.6 Auszählung der Zellen .....	22
2.7 Präparation von Pfortengewebe der Ratte und Probenaufarbeitung für HNE-His Adduct ELISA .....	23
2.8 Vorbehandlung der Dark Agouti Ratten mit Phytol .....	23
2.9 Stimulation der Zellen mit CCL2 und Messung des oxidativen Burst (Phagoburst Kit).....	23
2.10 Nachweis der Rezeptorexpression durch Antikörperfärbung .....	24
2.11 Durchflusszytometrie / Fluorescence activated cell sorting (FACS).....	25
2.12 Proteinquantifizierung für enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) BCA-Test.....	26
2.13 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA) .....	26
2.14 Verhaltensexperimente .....	27
2.15 Verwendete Chemikalien, Antikörper, Puffer und Kits .....	28
2.16 Geräte, sonstige Materialien und Software .....	31
2.17 Statistik und Auswertung .....	32
3. Ergebnisse .....	33
3.1 Reinheit der isolierten humanen CD14 <sup>+</sup> Monozyten .....	33
3.2 Expression des CCR2 Rezeptors .....	35
3.3 Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale nach CCL2 Stimulation (Phagoburst).....	36

3.4 Bildung von Lipidperoxidationsprodukten nach intraplantarer CCL2 Injektion .....	41
3.5 Signalweg der CCL2-induzierten Hyperalgesie .....	43
4. Diskussion .....	45
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse .....	45
4.2 Diskussion der Methoden .....	45
4.3 Diskussion der Ergebnisse .....	49
5. Zusammenfassung .....	58
6. Literaturverzeichnis .....	59
7. Abbildungsverzeichnis .....	63
8. Tabellenverzeichnis .....	64
9. Abkürzungsverzeichnis .....	64
10. Anhang .....	68
10.1 Danksagung .....	68
10.2 Lebenslauf .....	69

# **1. Einleitung**

## **1.1 Stand der Forschung**

### *1.1.1 Allgemeine Einführung*

Die internationale Fachgesellschaft zum Studium des Schmerzes (IASP) definiert Schmerz als „unangenehme sensorische und emotionale Empfindung mit tatsächlicher oder möglicher Gewebeschädigung“ (International Association for the Study of Pain (IASP) Taxonomy 2011, 1.10.2012, [www.iasp-pain.org](http://www.iasp-pain.org)). Die IASP hat wichtige Begriffe für die Schmerzmedizin und –forschung definiert. Der Begriff Hyperalgesie bezeichnet ein gesteigertes Schmerzempfinden auf einen normalerweise bereits schmerzhaften Reiz, beispielsweise Druck auf eine Körperstelle. Unter Entzündungsbedingungen führen verschiedene proalgetische Mediatoren zu Nozizeptorsensitivierung und zur Entwicklung einer inflammatorischen Hyperalgesie. Ein Schmerzempfinden auf einen normalerweise nicht schmerzhaften Reiz wird als Allodynie bezeichnet. Beispielsweise ein Schmerzempfinden bei leichter Berührung der Haut oder durch das Gewicht von Kleidung auf der Haut. Analgesie bedeutet im Gegensatz dazu die Abwesenheit von Schmerz bei einer normalerweise schmerzhaften Stimulation. Nozizeption ist der physiologische Prozess der Schmerzentstehung auf peripherer und zentraler neuronaler Ebene. Als Nozizeptoren werden sensorische Nerven bezeichnet, die durch noxische Stimuli erregbar sind. Nozizeptorsensitivierung ist eine erleichterte Erregbarkeit des Nozizeptors bei Kontakt mit noxischen Stimuli ([www.iasp-pain.org](http://www.iasp-pain.org), 1.10.2012).

Im klinischen Alltag werden verschiedene Schmerzformen unterschieden. Der akute, nozizeptive Schmerz ist die Reaktion auf einen akut schädigenden Stimulus und hat eine wichtige, physiologische Schutzfunktion für den Körper, beispielsweise vor weiterer Schädigung des Gewebes. Inflammatorischer Schmerz entsteht durch Aktivierung des Immunsystems nach Gewebeschädigung und unterstützt indirekt die Heilung, beispielsweise bei der chirurgischen Wundheilung. Im betroffenen Gewebe besteht eine Hyperalgesie, die das geschädigte Gewebe vor weiterer Schädigung schützen soll. Pathologische Schmerzformen

sind neuropathische Schmerzen nach Nervenschädigung und dysfunktionaler Schmerz beispielsweise bei Fibromyalgie, dabei besteht weder eine Nervenschädigung noch eine Entzündung (Woolf 2010).

Schmerzen sind ein Hauptsymptom der Entzündung. Während einer Entzündung treten klassische Symptome auf: Schmerz (Dolor), Überwärmung (Calor), Rötung (Rubor), Schwellung (Tumor) und Funktionsverlust (Functio laesa) (Marchand, Perretti et al. 2005). Bei einer inflammatorischen Hyperalgesie besteht eine gesteigerte Empfindlichkeit für mechanische und thermische Stimuli im entzündeten Gewebe (Sommer and Kress 2004). Ein wichtiger Bestandteil der Entzündungsreaktion ist die Rekrutierung von im Blut zirkulierenden Leukozyten ins geschädigte Gewebe. Bestandteile der Zellwand von Bakterien (Lipopolysaccharide (LPS)) oder chemische Stoffe (z.B.: Carrageen) können die Einwanderung von Leukozyten ins Gewebe auslösen (Marchand, Perretti et al. 2005). Während in der ersten Phase der Entzündung zunächst neutrophile Granulozyten als Vermittler der unspezifischen Immunabwehr einwandern (Marchand, Perretti et al. 2005), spielen in der zweiten Phase Monozyten/Makrophagen und Lymphozyten als Teil der spezifischen Immunabwehr eine wichtige Rolle (Brack, Labuz et al. 2004). Neben Aufgaben wie Immunabwehr und Regenerierung von geschädigtem Gewebe spielen Leukozyten auch bei der Entstehung der inflammatorischen Hyperalgesie eine entscheidende Rolle. Die Bedeutung einzelner Leukozytensubpopulationen sowie die Interaktion zwischen Leukozytensubpopulationen und Nozizeptoren für die Entstehung der inflammatorischen Hyperalgesie sind noch Gegenstand der Forschung.

Eine Vielzahl proalgetischer Mediatoren werden bei Gewebeschädigung freigesetzt und entfalten entweder direkt an nozizeptiven Neuronen oder indirekt über Nozizeptorsensitivierung ihre Wirkung (Rittner, Machelska et al. 2005). Proalgetische Mediatoren sind beispielsweise Zytokine und reaktive Sauerstoffradikale (ROS). In dieser Arbeit soll die Bedeutung von ROS und deren Folgeprodukte, den Lipidperoxidationsprodukten (4-Hydroxynoneal (4-HNE)), untersucht werden. Ein genaueres Verständnis der Mechanismen der Entstehung der inflammatorischen Hyperalgesie könnte die Basis für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze in der Schmerztherapie sein.

### *1.1.2 Leukozyten und inflammatorische Hyperalgesie*

Für die wissenschaftliche Untersuchung der inflammatorischen Hyperalgesie werden verschiedene Entzündungsmodelle verwendet. Folgende Substanzen können zur Induktion einer Entzündung im Tiermodell verwendet werden: Carrageen, komplettes Freund's Adjuvans (complete Freund's adjuvant (CFA)), LPS, Zymosan oder Glykogen (Rittner, Machelska et al. 2005). Entzündetes Gewebe wird von verschiedenen Leukozytensubpopulationen (neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen oder Lymphozyten) infiltriert. Deren Bedeutung für die Entstehung der inflammatorischen Hyperalgesie ist noch nicht gänzlich geklärt. Eine Vielzahl von Arbeiten zeigt, dass Leukozyten essentiell für die Entwicklung der inflammatorischen Hyperalgesie sind.

Cunha et al. zeigen im Modell der Carrageen-induzierten Entzündung die Bedeutung von neutrophilen Granulozyten für die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie. Durch Vorbehandlung von Wistar Ratten mit Fucoidin, einem Leukozytenadhäsionsinhibitor, kann die Carrageen-induzierte mechanische Hyperalgesie dosis- und zeitabhängig inhibiert werden (Cunha, Verri et al. 2008). Unsere Arbeitsgruppe zeigt hingegen, dass nach i.pl. Injektion der Chemokine CXCL1 oder CXCL2/3 selektiv dosis- und zeitabhängig neutrophile Granulozyten ins Gewebe rekrutiert werden, die Versuchstiere jedoch keine mechanische oder thermische Hyperalgesie entwickeln. Im Modell der CFA-induzierten Entzündung werden neutrophile Granulozyten ins Gewebe rekrutiert und die Versuchstiere entwickeln eine mechanische und thermische Hyperalgesie (Rittner, Mousa et al. 2006; Rittner, Hackel et al. 2009a). Noxische und inflammatorische Stimuli induzieren im Hinterhorn des Rückenmarks die Expression von c-Fos. Die Bestimmung der c-Fos Expression bietet eine biochemische Ergänzung zur Beurteilung von Schmerzen zu Verhaltensexperimenten. Die c-Fos Expression und die lokale Prostaglandin E<sub>2</sub> Produktion bleiben nach Injektion der Chemokine CXCL1 oder CXCL2/3, die selektiv neutrophile Granulozyten ins Gewebe rekrutieren, unverändert. Bei CFA-induzierter Hyperalgesie wird lokal Prostaglandin E<sub>2</sub> gebildet und im Hinterhorn des Rückenmarks die Expression von c-Fos induziert. Folglich sind neutrophile Granulozyten vermutlich nicht allein für die Entstehung der inflammatorischen

Hyperalgesie verantwortlich (Rittner, Mousa et al. 2006). Monozyten/Makrophagen könnten bedeutend für die Entwicklung der inflammatorischen Hyperalgesie sein. Nach CFA-induzierter Hyperalgesie besteht das zelluläre Infiltrat des entzündeten Gewebes nach 48 h und 96 h hauptsächlich aus Monozyten/Makrophagen (Brack, Labuz et al. 2004). Außerdem schwächt die Depletion von Monozyten/Makrophagen die inflammatorische Hyperalgesie im Modell der chemisch induzierten Peritonitis ab (Ribeiro, Vale et al. 2000).

Monozyten sind eine heterogene Gruppe und übernehmen im Organismus vielfältige Aufgaben: Abwehr von Pathogenen, Phagozytose, Antigenpräsentation, immunmodulatorische Aufgaben und Wundheilung. Im Blut zirkulierende Monozyten wandern aus Blutgefäßen ins Gewebe ein und differenzieren zu Makrophagen (Gordon and Taylor 2005; Dale, Boxer et al. 2008).

Im menschlichen Organismus charakterisiert das Oberflächenmolekül CD14 Monozyten. Anhand ihrer Oberflächenmoleküle können Monozyten in zwei Gruppen unterteilt werden: zirkulierende, „klassische“  $CD14^+ CD16^-$  Monozyten und residente  $CD14^+ CD16^+$  Gewebemakrophagen. Zusätzlich exprimieren sie Chemokinrezeptoren.  $CD14^+ CD16^+$  Makrophagen exprimieren den Chemokinrezeptor 5 (CCR5) und  $CD14^+ CD16^-$  den Chemokinrezeptor 2 (CCR2) (Weber, Belge et al. 2000). Bei Ratten wird das Oberflächenmolekül CD43 zur Identifikation von Monozyten verwendet (Ahuja, Miller et al. 1995; Gordon and Taylor 2005).  $CD43^{low}$  Monozyten exprimieren vermehrt CCR2. Im Modell der sterilen Peritonitis wandern inflammatorische  $CD43^{low} CCR2^+$  Monozyten ins Peritoneum ein (Gordon and Taylor 2005). Monozyten/Makrophagen aus Ratten können in  $CCR2^{high} CX_3CR1^{low} CD43^{low}$  und  $CCR2^{low} CX_3CR1^{high} CD43^{high}$  Monozyten/Makrophagen unterteilt werden (Yrlid, Jenkins et al. 2006). ED1 (CD68) und ED2 (CD163) sind weitere Oberflächenmoleküle anhand derer Monozyten/Makrophagen aus Ratten identifiziert werden können. ED1 wird von Monozyten im peripheren Blut und Makrophagen exprimiert und ED2 von Gewebemakrophagen (Dijkstra, Dopp et al. 1985).

Neutrophile Granulozyten und Monozyten/Makrophagen exprimieren das Enzym NADPH-Oxidase, dadurch sind sie zu der Bildung von Superoxidanionen ( $O_2^-$ ) fähig und folglich weiterer ROS (Babior 1999). Die Bildung von ROS in



neutrophilen Granulozyten und Monozyten/Makrophagen wird respiratorischer oder oxidativer Burst genannt (de Oliveira-Junior, Bustamante et al. 2011). Für die Abwehr von pathogenen Mikroorganismen ist der oxidative Burst ein essentieller Schritt (Djaldeiti, Salman et al. 2002; de Oliveira-Junior, Bustamante et al. 2011).

### *1.1.3 Proalgetische Entzündungsmediatoren*

Monozyten/Makrophagen bilden verschiedene nozizeptive, proinflammatorische Mediatoren. Dazu gehören proinflammatorischen Zytokine wie Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), Interleukin 1 $\beta$  und 6 (IL-1 $\beta$  und IL-6), nerve growth factor (NGF). Aber auch Stickstoffoxid (NO), Arachidonsäure und deren Derivate, ROS und Lipidperoxidationsprodukte wie 4-HNE (Ribeiro, Vale et al. 2000; Marchand, Perretti et al. 2005).

#### 1.1.3.1 Chemokine

Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine und ein essentieller Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Chemotaxis bedeutet das „Anlocken“ von Zellen ins Gewebe, also ein Wandern der Zellen zu höheren Konzentrationen des Chemokins. Gewebeschädigung und Entzündungsprozesse führen zur Sekretion von Chemokinen und dadurch zur Einwanderung von Leukozyten. Das Chemokin CCL2 wirkt chemotaktisch auf Monozyten/Makrophagen, d.h. es bewirkt die Einwanderung von CCR2<sup>+</sup> Monozyten (inflammatorische Monozyten) ins Gewebe (Palframan, Jung et al. 2001; Deshmane, Kremlev et al. 2009). Chemokine sind niedermolekulare Proteine, die durch ihre N-terminale Cysteinsequenz in vier Gruppen eingeteilt werden. Bei den  $\alpha$ -Chemokinen trennt eine Aminosäure die beiden Cysteine (CXC), die  $\beta$ -Chemokine haben benachbarte Cysteine (CC), die Lymphotaktine ein einzelnes Cystein und bei Fraktalkinen sind die Cysteine durch drei Aminosäuren getrennt (CX<sub>3</sub>C). In der Nomenklatur der Chemokine wird die chemische Gruppe, ein L für Ligand und eine Nummer angegeben. Die Rezeptoren werden entsprechend mit R benannt. Die Rezeptoren der Chemokine gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembranrezeptoren. Chemokinrezeptoren können durch verschiedene Chemokine aktiviert werden. CCL2 aktiviert ausschließlich CCR2, dieser kann

wiederum auch durch andere Chemokine aktiviert werden (White and Wilson 2008).

Um die Bedeutung von Chemokinen für die Schmerzentstehung zu untersuchen, wurden in einer Metaanalyse von LaCroix–Fralish et al. die Ergebnisse verschiedener Microarray Geneexpressionsstudien verglichen. Die Gene des Chemokins CCL2 und von Reg3b, einem mit Pankreatitis assoziierten Protein, wurden als wichtige pronozizeptive Faktoren in verschiedenen Schmerzmodellen, einschließlich des Entzündungsschmerzes, identifiziert (LaCroix-Fralish, Austin et al. 2011).

Die Arbeitsgruppe Wang et al. untersuchte die Veränderungen der Genexpression verschiedener Zytokine während der akuten Entzündungsreaktion sowie deren Korrelation zur Schmerzintensität bei freiwilligen Probanden nach Zahnoperationen. Gewebeschädigung führt zu einer signifikant gesteigerten Expression der Gene von IL-6, IL-8 und den Chemokinen CCL2, CXCL1 und CXCL2. Diese Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der akuten Entzündungsreaktion. IL-6 kontrolliert die Leukozytenrekrutierung und bewirkt die Freisetzung weiterer Zytokine (IL-8, CXCL1, CXCL2 und CCL2) aus Leukozyten. IL-8, CXCL1 und CXCL2 sind wichtige chemotaktische Mediatoren für die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe, beziehungsweise CCL2 für Monozyten. Drei Stunden postoperativ korreliert die gesteigerte Genexpression von IL-6, IL-8 und CCL2 mit der Schmerzintensität. Diese Ergebnisse zeigen die Bedeutung von IL-6, IL-8 und CCL2 für die Entstehung der akuten Entzündung und des Entzündungsschmerzes. Zusätzlich wurde der Effekt der Einnahme von Ketorolac, einem nichtsteroidalen Antiphlogistikum, auf die Genexpression untersucht. Die Schmerztherapie mit Ketorolac verhindert eine signifikante Steigerung der Genexpression von CXCL1, CXCL2 und IL-8, jedoch nicht von IL-6 und CCL2 (Wang, Hamza et al. 2009).

Die Arbeitsgruppe Abbadie et al. hat die Bedeutung des Chemokinrezeptors für die Schmerzentstehung anhand einer *CCR2* Knockout Maus (*CCR2*<sup>-/-</sup>) untersucht. *CCR2*<sup>-/-</sup> zeigen nach verschiedenen inflammatorischen Stimuli eine deutlich reduzierte Monozytenrekrutierung ins Gewebe und eine geringere Ausprägung entzündeter Läsionen bei demyelinisierenden Erkrankungen im zentralen

Nervensystem. Im Akutschmerz besteht zwischen Wildtyp und CCR2<sup>-/-</sup> kein Unterschied. Im inflammatorischen Schmerzmodell nach i.pl. Formalin Injektion zeigen CCR2<sup>-/-</sup> in der zweiten Phase (15 – 50 min nach Injektion) eine deutliche Reduktion schmerzassoziierter Verhaltensweisen (Ablecken oder Anheben der Pfote). Nach CFA-induzierter Entzündung ist die mechanische Allodynie bei CCR2<sup>-/-</sup> verringert. Dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant. Für die thermische Hyperalgesie konnte zwischen beiden Genotypen kein Unterschied gezeigt werden. Als Modell für neuropathische Schmerzen wurde der Nervus ischiadicus durch Ligatur geschädigt. Wildtypmäuse entwickeln daraufhin nach 3 Tagen eine mechanische Allodynie, deutlich durch eine signifikante Reduktion der Pfootendruckschwellen. Im Gegensatz dazu entwickeln CCR2<sup>-/-</sup> keine mechanische Allodynie. I.pl. CFA Injektion führt beim Wildtyp zu einer Erhöhung des Gehaltes an CCR2 mRNA in der Haut, in geringerem Ausmaß auch im Nervus ischiadicus und im Hinterhornganglion. Auch nach Nervenschädigung wird vermehrt CCR2 mRNA im Nerv und im Hinterhornganglion exprimiert. Gleichzeitig infiltrieren CCR2<sup>+</sup> Monozyten/Makrophagen das geschädigte Gewebe. CCR2 sowie die Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten/Makrophagen sind bedeutend für die Entwicklung neuropathischer und inflammatorischer Schmerzzustände (Abbadie, Lindia et al. 2003).

CCL2 beeinflusst die Aktivität des Tetrodotoxin-resistenten Natriumkanals Na<sub>v</sub>1.8. Veränderungen der Aktivität dieses Ionenkanals ermöglichen die Entwicklung einer peripheren Hypersensitivität in neuropathischen und inflammatorischen Schmerzzuständen. CCR2 wird mit Na<sub>v</sub>1.8 zusammen auf kleinen bis mittelgroßen sensorischen Neuronen exprimiert. Nach CCL2 Inkubation kann in Patch-Clamp Experimenten eine Verstärkung der Amplitude des Einwärtsstroms durch Na<sub>v</sub>1.8 und eine Hyperpolarisation gezeigt werden. CCR2 Antagonisten blockieren diesen Effekt. Die Aktivierung von CCR2 durch CCL2 beeinflusst vermutlich über einen Gβγ-Protein abhängigen Mechanismus die Aktivität von Na<sub>v</sub> 1.8 und führt zur Sensitivierung von primär sensorischen Neuronen (Belkouch, Dansereau et al. 2011).

### 1.1.3.2 Reaktive Sauerstoffradikale und Lipidperoxidationsprodukte

Superoxidanionen ( $O_2^-$ ), Hydroxylradikale ( $OH^-$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) werden unter dem Begriff reaktive Sauerstoffradikale (ROS) zusammengefasst. ROS Bildung findet in Makrophagen und anderen Leukozyten statt und wird respiratorischer Burst genannt (Forman and Torres 2001).

ROS werden nach Schädigung peripherer Nerven und in entzündetem Gewebe gebildet (Schwartz, Kim et al. 2009). Die NADPH-Oxidase, das für die ROS Bildung verantwortliche Enzym, besteht aus 5 Untereinheiten. Im inaktiven Zustand liegen diese Untereinheiten in der Zelle getrennt vor. Im Zytosol liegen  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$  und  $p67^{phox}$  als Komplex vor und  $p22^{phox}$  und  $gp91^{phox}$  membrangebunden an sekretorischen Vesikeln.  $p22^{phox}$  und  $gp91^{phox}$  bilden ein heterodimeres Flavohämoprotein (Cytochrom  $b_{558}$ ). Durch Trennung der Untereinheiten ist sichergestellt, dass in der inaktiven Zelle keine ROS gebildet werden. Eine Aktivierung der Zelle führt zur Phosphorylierung des zytosolischen Komplexes, vor allem von  $p47^{phox}$ . Der phosphorylierte zytosolische Komplex wandert zur Zellmembran der Vesikel und assoziiert mit Cytochrom  $b_{558}$  zur aktiven NADPH-Oxidase. Die aktive NADPH-Oxidase kann Elektronen von ihrem Substrat NADPH auf Sauerstoff übertragen ( $2 O_2 + NADPH \rightarrow 2O_2^- + NADP^+ + H^+$ ) und dadurch die Bildung weiterer ROS einleiten. Zwei weitere Proteine sind für die Funktion der NADPH-Oxidase entscheidend: Rac2 und Rap1A. Rac2 ist ein GTP bindendes Protein und wandert gemeinsam mit dem zytosolischen Komplex zur Zellmembran. Rap1A ist ein membranständiges Protein, assoziiert mit Cytochrom  $b_{558}$ .  $O_2^-$  wird an der Membranaußenseite gebildet. Bei der Phagozytose wird die Zellmembran eingestülpt und die ehemalige Membranaußenseite zeigt nun zum Inneren der Vesikel. In diesen Vesikeln können  $O_2^-$  akkumulieren, beispielsweise zur mikrobiellen Abwehr (Babior 1999).

4-HNE, ein Lipidperoxidationsprodukt, entsteht während oxidativem Stress und ist ein physiologischer Inhibitor der NADPH-Oxidase. In unseren Experimenten wird Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als Positivkontrolle für Aktivierung der NADPH-Oxidase und ROS Bildung verwendet. PMA aktiviert als unphysiologischer Stimulus die Proteinkinase C, dies führt zur Phosphorylierung der zyto-

solischen Untereinheiten und folglich zur Aktivierung der NADPH-Oxidase und ROS Bildung (Babior 1999).

Antioxidanzien und ROS abbauende Enzyme wirken analgetisch bei neuropathischen und inflammatorischen Schmerzen. Radikalfänger vermitteln einen signifikanten analgetischen Effekt in der Capsaicin-vermittelten sekundären Hyperalgesie. I.pl. Capsaicin Injektion bewirkt durch periphere Sensitivierung eine primäre Hyperalgesie und durch zentrale Sensitivierung eine sekundäre Hyperalgesie (Schwartz, Kim et al. 2009). Akkumulation von  $O_2^-$  ist für die Veränderung der sensorischen Impulsverarbeitung im Rückenmark nach Capsaicin-induzierter sekundärer Hyperalgesie verantwortlich. Eine abgeschwächte Aktivität des ROS abbauenden Enzyms Superoxiddismutase (SOD) auf spinaler Ebene ist für die ROS Akkumulation verantwortlich. Während oxidativem Stress wird die SOD durch Nitrierung inaktiviert, beispielsweise durch Peroxinitrit (Schwartz, Kim et al. 2009). Beim Abbau von  $O_2^-$  durch die SOD entsteht Wasserstoffperoxid ( $2O_2^- + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ) (Baker, Corry et al. 1985). Dieses wird wiederum durch das Enzym Katalase zu Wasser und molekularem Sauerstoff abgebaut ( $H_2O_2 \rightarrow O_2 + H_2O$ ) (Pospisil 2012).

$H_2O_2$  ist ein wichtiger Mediator der inflammatorischen Hyperalgesie. I.pl.  $H_2O_2$  Injektion führt in Mäusen dosis- und zeitabhängig zu einer mechanischen und thermischen Hyperalgesie. Der Gehalt von  $H_2O_2$  in der Pfote ist in der Carrageen-induzierten Entzündung signifikant erhöht. Dies spricht für eine endogene Bildung von ROS in der Pfote. Gleichzeitige i.pl. Injektion von Carrageen mit den Enzymen SOD und Katalase reduziert die mechanische und thermische Hyperalgesie (Keeble, Bodkin et al. 2009). I.pl. Injektion von Kaliumsuperoxid bewirkt sofort eine thermische Hyperalgesie, die durch Applikation des Superoxiddismutasemimetikums M40403 verhindert werden kann. Des Weiteren wurde die Bedeutung von  $O_2^-$  in der Carrageen-induzierten Entzündung untersucht. Ratten entwickeln nach i.pl. Carrageen Injektion zeitabhängig eine inflammatorische, thermische Hyperalgesie, die ebenfalls durch vorherige Gabe des Superoxiddismutasemimetikums M40403 vermindert werden kann. In unbehandelten Ratten hat das Superoxiddismutasemimetikum keinen antinozizeptiven Effekt.  $O_2^-$  hat folglich keine Relevanz für die akute Nozizeption,

spielt aber eine wichtige Rolle bei der inflammatorischen Hyperalgesie (Wang, Porreca et al. 2004).

4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N-oxyl (TEMPOL) katalysiert die Reaktion von  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$  und wird daher als Superoxiddismutasemimetikum bezeichnet (Wilcox 2010). TEMPOL vermindert zeit- und dosisabhängig die Carrageen-induzierte Hyperalgesie (Khattab 2006).

*Nox1* ist das Gen der katalytischen Untereinheit der NADPH-Oxidase. *Nox1* entspricht der Untereinheit gp91<sup>phox</sup>. *Nox1*<sup>-/-</sup> Mäuse entwickeln eine signifikant reduzierte thermische und mechanische Hyperalgesie nach i.pl. Carrageen Injektion. Bei der Reaktion auf akute thermische und mechanische Stimuli besteht kein Unterschied zwischen Knockout und Wildtyp Maus (Ibi, Matsuno et al. 2008).

ROS Bildung führt zur Bildung von Lipidperoxidationsprodukten. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind ein Bestandteil der Phospholipidmembran der Zelle. Sie verfügen über mindestens eine Doppelbindung und sind anfällig für Oxidation durch ROS. Initial reagiert ein Hydroxylion ( $OH^\cdot$ ) mit ungesättigten Fettsäuren: ein Lipidradikal entsteht. Dieses reagiert mit molekularem Sauerstoff zum Lipidperoxyradikal und weiter mit Wasserstoff von umgebenden Fettsäuren zu Lipidhydroperoxid. Dabei entsteht ein weiteres Lipidradikal. Lipidhydroperoxide zerfallen in reaktive Aldehyde, wie 4-HNE, Malondialdehyd (MDA) und 4-Hydroxy-2-hexenal (4-HHE). Diese Aldehyde sind konzentrationsabhängig zytotoxisch und schädigen Proteine, Phospholipide und DNA. 4-HNE entsteht hauptsächlich als sekundäres Produkt während Lipidperoxidation von mehrfach ungesättigten  $\omega_6$  Fettsäuren (Linolsäure (C18:2  $\omega_6$ ) oder Arachidonsäure (C20:4  $\omega_6$ )) und ist ein Indikator für oxidativen Stress (Catala 2009).

4-HNE ist nicht nur zytotoxisch, sondern ist auch an verschiedenen Signalwegen beteiligt. Beispielsweise der Regulation verschiedener Kinasen (p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) und Proteinkinase C), Tyrosin kinaserezeptoren oder der Genexpression (über Aktivierung des peroxisome proliferator-activated receptor). Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B durch 4-HNE vermittelt proinflammatorische Effekte (Forman, Fukuto et al. 2008; Riahi, Cohen et al. 2010). Die Aldehyddehydrogenase „fatty aldehyde

dehydrogenase“ (FALDH), die Alkoholdehydrogenase und die Glutathion-S-transferase sind wichtige Enzyme für den Abbau von 4-HNE (Forman, Fukuto et al. 2008; Riahi, Cohen et al. 2010).

COX-2 ist ein wichtiges Enzym der Prostaglandinsynthese aus Arachidonsäure während Entzündungen und Immunreaktionen. In Gewebeproben aus artherosklerotisch veränderten Koronargefäßen liegt proteingebundenes 4-HNE zusammen mit COX-2 im Zytoplasma von Schaumzellen (fettbeladene Makrophagen) vor. In der murinen Makrophagenzellreihe RAW264.7 induziert nur 4-HNE und kein anderes Lipidperoxidationsprodukt dosisabhängig die Expression von COX-2 mRNA und Protein über einen p38 MAPK-abhängigen Signalweg. Dieser Effekt kann durch den selektiven Inhibitor der p38 MAPK SB203580 unterdrückt werden. 4-HNE ist ein bedeutender inflammatorischer Mediator in Makrophagen (Kumagai, Matsukawa et al. 2004).

#### *1.1.4 Nozizeptorsensitivierung und Schmerzweiterleitung*

TRPA1 und TRPV1 sind nicht selektive Kationkanäle mit 6 Transmembrandomänen aus der Familie der transient receptor potential channels (TRP) (Andersson, Gentry et al. 2008; Westlund, Kochukov et al. 2010).

TRPA1 wird auf primär afferenten, nozizeptiven Neuronen exprimiert. Aktivierende Substanzen dieses Kanals sind beispielsweise Acrolein, Stoffe aus der Senfpflanze (Allylisothiocyanat), Zimt (Zimtaldehyd) und inflammatorische Mediatoren wie Bradykinin. Eine Aktivierung des TRPA1 Kanals führt zu akuten Schmerzen (Trevisani, Siemens et al. 2007; Andersson, Gentry et al. 2008).

ROS und Lipidperoxidationsprodukte spielen eine wichtige Rolle in der Entstehung der inflammatorischen Hyperalgesie und vermitteln ihre Effekte über TRPA1 Kanäle. Unter Bedingungen des oxidativen Stresses während einer Entzündung werden ROS ( $H_2O_2$ ) und Lipidperoxidationsprodukte (4-HNE) gebildet.  $H_2O_2$ , 4-HNE und Prostaglandin  $J_2$  aktivieren dosisabhängig den TRPA1. Auch i.pl. Injektion von  $H_2O_2$  in die Hinterpfote von Wildtyp Mäusen ruft dosisabhängig schmerzassoziiertes Verhalten hervor, nicht jedoch bei *TRPA1*<sup>-/-</sup> Mäusen (Andersson, Gentry et al. 2008). I.pl. 4-HNE Injektion löst bei Ratten eine dosisabhängige, mechanische Hyperalgesie aus. Dieser Effekt ist durch TRPA1 Antagonisten wie Camphor und Gentamycin aufhebbar, nicht je-

doch durch TRPV1 Antagonisten. Bei *TRPA1*<sup>-/-</sup> Mäusen führt die i.pl. 4-HNE Injektion nicht zur Entwicklung einer Hyperalgesie. Auch in vivo vermittelt 4-HNE seinen proalgetischen Effekt über TRPA1 Kanäle (Trevisani, Siemens et al. 2007).

Der TRPV1 Kanal wird ebenfalls auf sensiblen, schmerzleitenden Nervenfasern (A $\delta$ - und C-Fasern) exprimiert. Klassische aktivierende Substanzen dieses Kanals sind Hitze (>43 °C), Capsaicin und Protonen (Ibi, Matsuno et al. 2008).

Bei *TRPV1*<sup>-/-</sup> Mäusen ist die thermische, nicht jedoch die mechanische Hyperalgesie, nach i.pl. Injektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> deutlich verkürzt. TRPV1 ist ein Zielmolekül für ROS, durch dessen Sensitivierung die thermischen Hyperalgesie ermöglicht wird (Keeble, Bodkin et al. 2009). ROS Bildung durch die NADPH-Oxidase führt zur Oxidation der C1A Untereinheit der Proteinkinase C $\epsilon$ , dadurch wird die Translokation der Proteinkinase C $\epsilon$  zur Zellmembran beschleunigt und durch verstärkte Phosphorylierung TRPV1 sensitiviert (Ibi, Matsuno et al. 2008).

Chronische Nervenschädigung führt zu einer Hochregulation von CCL2 und CCR2 auf Hinterwurzelganglien (DRG) (White, Sun et al. 2005). Die Bindung von CCL2 an CCR2 führt zur Membrandepolarisation und durch die Aktivierung der TRPV1 und TRPA1 Kanäle zur Nozizeptorsensitivierung mit gesteigerter Erregbarkeit von sensorischen Neuronen (White, Sun et al. 2005; Jung, Toth et al. 2008). Es ist wahrscheinlich, dass diese Prozesse unter bestimmten Voraussetzungen zur Pathogenese des neuropathischen Schmerzes beitragen (White and Wilson 2008). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigen, dass die auf Nozizeptoren exprimierten Kanäle TRPA1 und TRPV1 durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 4-HNE aktiviert werden. Deren Sensitivierung ist Voraussetzung für die Entstehung der Hyperalgesie unter Entzündungsbedingungen.

#### *1.1.5 Dark Agouti Ratten*

Dark Agouti (DA) Ratten sind durch einen Polymorphismus im Gen *Ncf1* für den Neutrophil Cytosolic Factor (*Ncf1*) charakterisiert. Das Gen *Ncf1* kodiert das Protein p47<sup>phox</sup>, eine wichtige Untereinheit der NADPH-Oxidase. Aufgrund des Polymorphismus besitzt die NADPH-Oxidase bei DA Ratten eine geringere Aktivität. Folglich verfügen DA Ratten über einen abgeschwächten oxidativen Burst verglichen mit Wistar Ratten (Hultqvist, Olofsson et al. 2006).



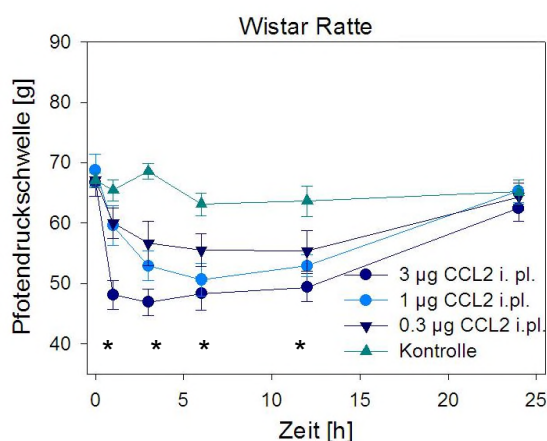
DA Ratten werden als etabliertes Tiermodell der rheumatoiden Arthritis verwendet. Durch eine einmalige subkutane Injektion von Pristan kann eine Arthritis induziert werden (Vingsbo, Sahlstrand et al. 1996). Die Pristan-induzierte Arthritis (PIA) hat viele Ähnlichkeiten mit der rheumatoiden Arthritis beim Menschen (Yao, Guo et al. 2008). Aus dem verringerten oxidativen Burst resultiert eine verminderte Hemmung der T-Zellen, deren folglich gesteigerte Aktivität begünstigt die Entwicklung einer Arthritis. ROS entfalten in der Pathogenese der Arthritis einen protektiven Effekt (Gelderman, Hultqvist et al. 2007). Im basalen Verhalten reagieren DA Ratten in Verhaltensexperimenten im Vergleich zu Wistar Ratten weniger empfindlich auf Stimulation mit mechanischen oder thermischen Reizen (Xu, Plesan et al. 2001). In den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Verhaltensexperimenten unterscheiden sich DA und Wistar Ratten in der basalen Empfindlichkeit auf Schmerzreize hingegen nicht. Bei Schädigung des Nervus ischiadicus zeigt sich bei DA Ratten im mikroskopischen Bild eine geringere intraneuronale Schädigung und eine geringer ausgeprägte mechanische und thermische Hyperalgesie als bei anderen Rattenstämmen (Xu, Plesan et al. 2001).

Die Arbeitsgruppe Hultqvist et al. untersuchte verschiedene Alkane auf ihre Fähigkeit zur Stimulation des oxidativen Burst. Das Alkan Phytol induziert *in vitro* den oxidativen Burst und verhindert *in vivo* die Entstehung der PIA. Eine Induktion des oxidativen Burst konnte auch *in vivo* nach s.c. Injektion von Phytol bei neutrophilen Granulozyten, die 5 Tage später mit PMA stimuliert wurden, gezeigt werden (Hultqvist, Olofsson et al. 2006).

## 1.2 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Molekulare Schmerzforschung

### 1.2.1 CCL2-induzierte Hyperalgesie in Wistar Ratten

In Verhaltensexperimenten (von Dr. rer. nat. Dagmar Hackel durchgeführt) mit Wistar Ratten verursacht i.pl. CCL2 Injektion in die Hinterpfote dosisabhängig eine mechanische Hyperalgesie (Abbildung 1). 0,9%ige NaCl-Lösung wurde als Kontrolle verwendet. Die mechanische Hyperalgesie ist an einem Absinken der Pfortendruckschwelle im modifizierten Randall Selitto Test (Ugo Basile, Comerio, Italien) zu erkennen.



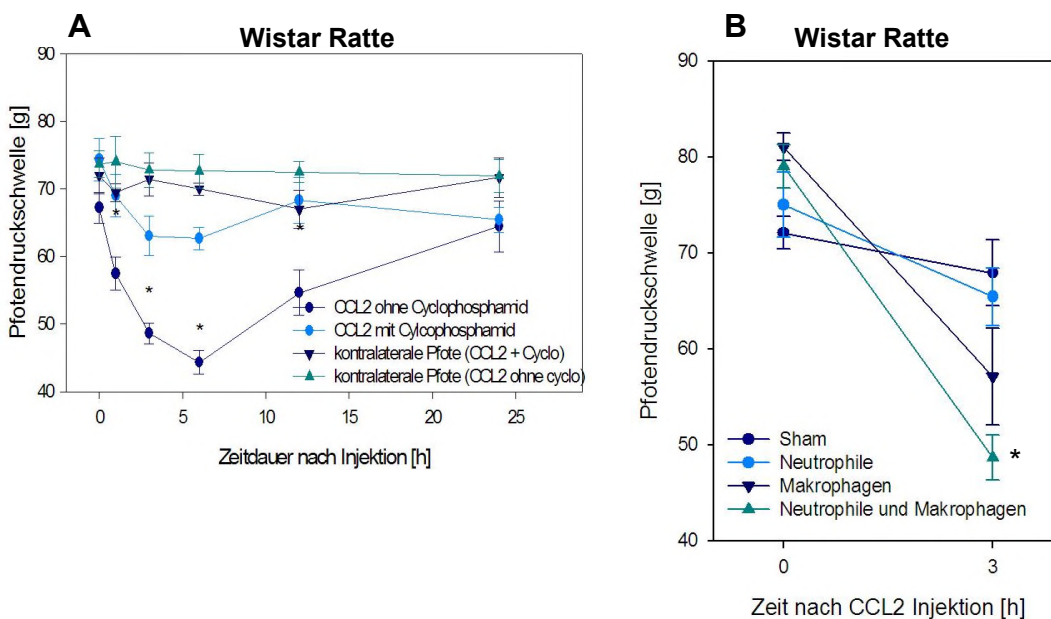
#### Abbildung 1: CCL2-induzierte Hyperalgesie in Wistar Ratten

Bestimmung der mechanischen Pfortendruckschwellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.pl. CCL2 Injektion (0,3µg, 1µg und 3µg) bei Wistar Ratten. Kontrolle 0,9%ige NaCl Lösung. (Two way RM ANOVA, Student-Newman-Keuls Methode, \*p < 0,05, Mittelwert +/- SEM)

### 1.2.2 Leukozyten und Hyperalgesie

Zur Beurteilung, ob es sich um einen direkten Effekt von CCL2 auf den Nozizeptor handelt oder um einen indirekten durch Leukozytenrekrutierung und Bildung proalgetischer Mediatoren, wurden Wistar Ratten zur Leukozytendepletion mit Cyclophosphamid behandelt. Diese Tiere entwickeln nach i.pl. CCL2 Injektion keine mechanische Hyperalgesie (Abbildung 2A). Die CCL2-induzierte Hyperalgesie ist somit abhängig von Leukozyten. Es handelt sich nicht um einen direkten Effekt von CCL2 am Nozizeptor. CCL2 entwickelt nur einen lokalen Effekt, da die Pfortendruckschwellen der kontralateralen Pfoten unverändert bleiben.

Im zellulären Infiltrat, entstanden nach CCL2 Injektion, befinden sich neben Monozyten zusätzlich neutrophile Granulozyten. Um die Bedeutung einzelner Leukozytensubpopulationen für die Entwicklung einer Hyperalgesie zu untersuchen, wurden Rekonstitutionsexperimente mit Leukozyten-depletierten Wistar Ratten durchgeführt. Durch alleinige Rekonstitution mit neutrophilen Granulozyten entsteht keine Veränderung der Pfortendruckschwellen beziehungsweise keine mechanische Hyperalgesie. Rekonstitution mit Makrophagen führt teilweise zur Wiederherstellung der CCL2-induzierten Hyperalgesie und die gemeinsame Rekonstitution von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten führt zur vollständigen Wiederherstellung der CCL2-induzierten, mechanischen Hyperalgesie (Abbildung 2B). Makrophagen und neutrophile Granulozyten sind essentiell für die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie (Hackel, Pflucke et al. 2013).

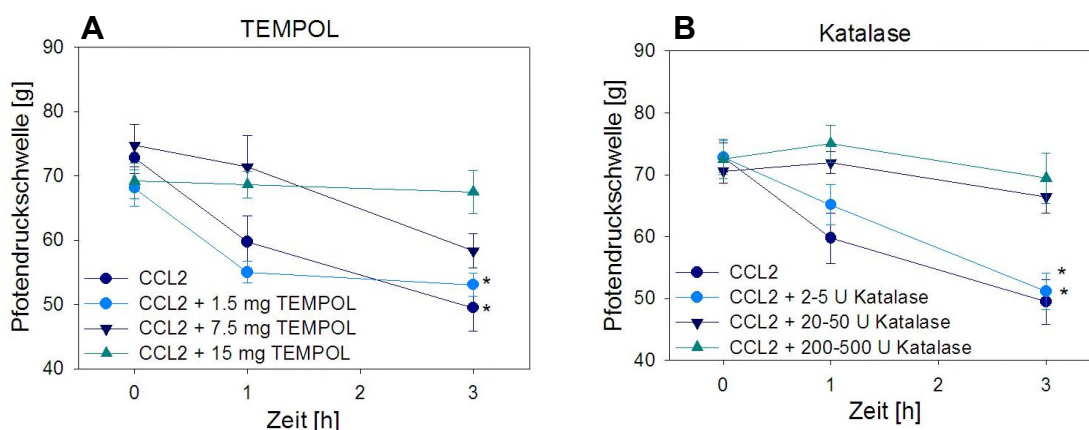


**Abbildung 2: CCL2-induzierte Hyperalgesie ist Leukozyten-abhängig**

Bestimmung der mechanischen Pfortendruckschwelle bei mit Cyclophosphamid Leukozyten-depletierten Wistar Ratten nach i. pl. CCL2 Injektion und Vergleich mit nicht Leukozyten-depletierten Wistar Ratten (A). Bestimmung der mechanischen Pfortendruckschwellen bei Leukozyten-depletierten Wistar Ratten, denen zusammen mit CCL2 entweder neutrophile Granulozyten, Makrophagen oder beide Leukozytenpopulationen i.pl. injiziert wurden (B). (Two way RM ANOVA, Student-Newman-Keuls Methode, \*p < 0,05, Mittelwert +/- SEM)

### 1.2.3 Effekt von Radikalfängern

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss von ROS abbauenden Enzymen auf die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie nach i.pl. CCL2 Injektion untersucht. Das Superoxiddismutase-Mimetikum TEMPOL (Abbildung 3A) und das Enzym Katalase (Abbildung 3B) hemmen dosisabhängig die CCL2-induzierte Hyperalgesie. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ROS wichtige proalgetische Mediatoren für die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie sind (Hackel, Pflucke et al. 2013).

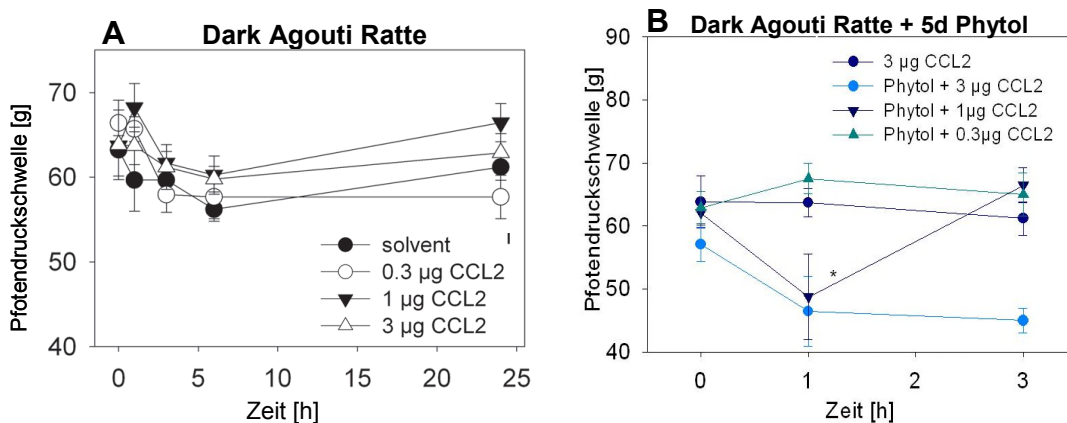


**Abbildung 3: Antioxidanzien verhindern die Entwicklung einer CCL2-induzierten Hyperalgesie**

Bestimmung der mechanischen Pfotendruckschwellen bei Wistar Ratten nach i.pl. CCL2 Injektion zusammen mit verschiedenen Konzentrationen von TEMPOL (A) oder Katalase (B). Als Kontrolle diente die alleinige i.pl. Injektion von CCL2. (Two way RM ANOVA, Student-Newman Keuls Methode, \* $p < 0,05$ , Mittelwert  $\pm$  SEM)

### 1.2.4 Fehlende CCL2-induzierte Hyperalgesie bei Dark Agouti Ratten

DA Ratten entwickeln nach i.pl. CCL2 Injektion bei keiner der getesteten Konzentrationen eine mechanische Hyperalgesie (Abbildung 4A). Nach i.pl. CFA Injektion entwickeln sie hingegen eine ausgeprägte Hyperalgesie. In den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Verhaltensexperimenten unterschieden sich Wistar und DA Ratten in der basalen Nozizeption nicht. Dagegen ermöglicht eine Vorbehandlung mit Phytol (s.c.) 5 Tage vor i.pl. CCL2 Injektion bei DA Ratten dosisabhängig eine mechanische Hyperalgesie (Abbildung 4B) (Hackel, Pflucke et al. 2013).

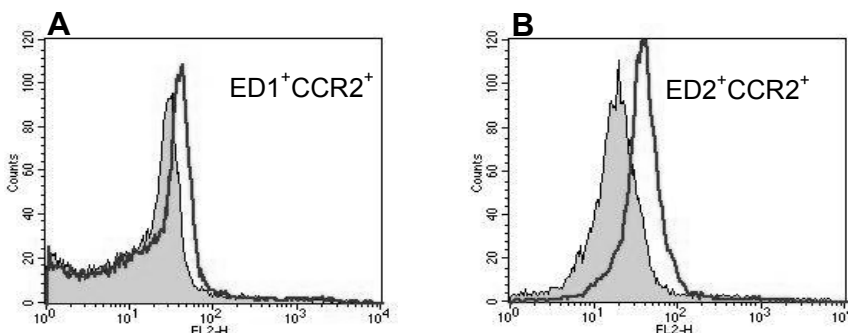


**Abbildung 4: Dark Agouti Ratten entwickeln keine CCL2-abhängige Hyperalgesie**

Bestimmung der mechanischen Pfotendruckschwel­len bei DA Ratten (A) und bei 5 Tage zuvor mit Phytol s.c. vorbehandelten DA Ratten (B) nach i.pl. CCL2 Injektion (0,3µg, 1µg und 3µg). Als Kontrolle diente die Injektion von 0,9% NaCl (A) bzw. CCL2 allein (B). (Two way RM ANOVA, Student-Newman-Keuls Methode, \*p < 0,05, Mittelwert +/- SEM)

### 1.2.5 Expression des CCR2 Rezeptors auf Makrophagen von Wistar Ratten

Auf Peritonealmakrophagen aus Wistar Ratten wurde die Expression von CCR2 durchflusszytometrisch von Diana Pflücke untersucht. Als Marker zur Identifikation von Rattenmakrophagen werden zwei verschiedene Oberflächenmoleküle verwendet: ED1 (CD68) und ED2 (CD163). Abbildung 5A zeigt exemplarisch die Expression von CCR2 auf ED1<sup>+</sup> Makrophagen. Abbildung 5B die Expression auf ED2<sup>+</sup> Makrophagen. Auf beiden Makrophagenpopulationen zeigt sich eine deutliche Expression von CCR2.



**Abbildung 5: CCR2 Expression auf Makrophagen aus Wistar Ratten**

Peritonealmakrophagen aus Wistar Ratten wurden mit 1% PFA fixiert, die Zellmembran mit Saponinpuffer permeabilisiert und mit einem CRK-2B/anti-goat IgG PE Antikörper (CCR2 1. Antikörper, erkennt eine intrazelluläre Domäne von CCR2), PE-conj. bovine anti-goat IgG (2. Antikörper) und ED1-FITC (CD68) (A) bzw. ED2-FITC (CD163) (B) gefärbt, ausgewertet und mit der Isotypenkontrolle (goat IgG) verglichen. CCR2 Expression als schwarze Linie und Isotypenkontrolle grau hinterlegt dargestellt.

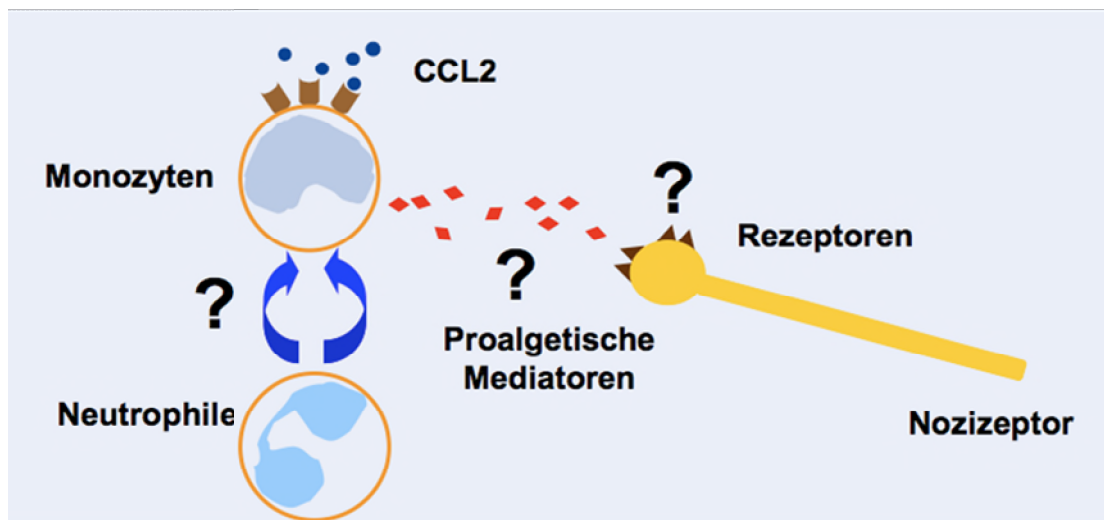
### 1.3 Fragestellung der Promotion

In dieser Promotion soll die Rolle von ROS aus Monozyten/Makrophagen für die Entwicklung des Entzündungsschmerzes untersucht werden. Folgende Arbeitshypothese wird untersucht:

Die CCL2-induzierte Hyperalgesie und Nozizeptorsensitivierung beruht auf der Sekretion proalgetischer Mediatoren, insbesondere ROS aus Monozyten/Makrophagen (Abbildung 6). Darüber hinaus spielt möglicherweise die Interaktion zwischen Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten eine wichtige Rolle für die Ausbildung der inflammatorischen Hyperalgesie.

Ziel der Promotion ist, *in vitro* die Mechanismen der ROS Bildung nach Stimulation von Monozyten/Makrophagen und Kokulturen aus Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten mit CCL2 nachzuweisen.

Diese Promotion ist Teil des Projekts des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung der Universität Würzburg „Neuroimmunologie der Schmerzentstehung“ N-112, Teilprojekt C: Proalgetische Mediatoren aus neutrophilen Granulozyten und/oder Monozyten.



**Abbildung 6: Arbeitshypothese**

Leukozyten und proalgetische Mediatoren vermitteln die Entstehung der CCL2-induzierten Hyperalgesie.

## **2. Material und Methoden**

### ***2.1 Isolation humaner Monozyten (MACS Separation)***

Humane Monozyten von gesunden Spendern wurden durch MACS Separation (Miltenyi Biotec) aus Thrombozytenapheresefiltern, zur Verfügung gestellt vom Institut für klinische Transfusionsmedizin und Hämotherapie des Universitätsklinikums Würzburg, isoliert.

#### *2.1.1 Prinzip*

Das Prinzip der MACS Separation basiert auf der Markierung von Zellpopulation mit an Antikörper gebundenen Magnetpartikeln, den MicroBeads. Durch die Bindung der zu isolierenden Zellen an die MicroBeads ist es möglich, sie beim Durchtritt durch ein Magnetfeld von anderen Zellen zu trennen. In diesem Fall diente dieses Prinzip als Positivselektionsverfahren. Monozyten exprimieren als charakteristisches Oberflächenmolekül CD14. Die Trennung der Monozytenpopulation von anderen Leukozyten erfolgte durch CD14<sup>+</sup> MicroBeads. Die magnetisch markierten CD14<sup>+</sup> Monozyten verbleiben dabei in der Säule und unmarkierte Zellen durchlaufen das Magnetfeld ungehindert. Die Bindung des CD14-Antikörpers an den CD14-Rezeptor führt laut Angaben des Herstellers nicht zu einer Aktivierung der Zelle, da der CD14-Rezeptor keine zytoplasmatische Domäne hat.

#### *2.1.2 Durchführung*

Zunächst erfolgte die Spülung des Thrombozytenapheresefilters mit phosphate buffer saline (PBS). Der nächste Schritt war ein 15 minütiges Lysieren auf Eis der Erythrozyten mit kaltem EL Puffer (erythrocyte lysis buffer). Die Leukozytensuspension wurde für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach einer erneuten Resuspendierung der Leukozyten in kaltem, entgastem MACS Puffer und dem Verdünnen mit Trypanblau erfolgte die Auszählung. Bei der Inkubation der Leukozyten über 15 min kam zunächst das vom Hersteller vorgegebene Verhältnis von 200 µl MicroBeads und 800 µl MACS Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen zur Anwendung. Bessere Ergebnisse bei der Auf-

reinigung erreichten jedoch 50  $\mu$ l MicroBeads und 950  $\mu$ l MACS Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen. Nach Waschen der Zellen mit MACS Puffer erfolgte die erneute Aufnahme der markierten Leukozyten in MACS Puffer. Zur Zellseparation kamen die LS column, ein Preseparation-Filter und ein MACS Separator mit Magnet (alles Miltenyi Biotec) zum Einsatz. Die auf die Säule und den Filter aufgetragene Leukozytensuspension durchlief das Magnetfeld, wurde viermal mit MACS Puffer gewaschen und dann aus dem MACS Separator herausgenommen. MACS Puffer spülte die CD14<sup>+</sup> Monozyten aus der Säule. Es folgte die Auszählung der CD14<sup>+</sup> Monozyten (siehe Kapitel 2.6) und Aufnahme in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium oder Komplettmedium in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$ /ml.

### *2.1.3 Kontrolle der Ausbeute und der Reinheit der Monozyten*

Die Überprüfung der Reinheit und Ausbeute der isolierten Monozyten erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten während der Aufreinigung durch Probenentnahme aus dem Leukozytengemisch: zwei 50  $\mu$ l Proben (pre) vor Auftragung der Leukozytensuspension auf die Säule, eine 50  $\mu$ l Probe der CD14<sup>-</sup> Zellen (Negativkontrolle) und 50  $\mu$ l Probe der CD14<sup>+</sup> Zellen (Positivkontrolle). Drei (pre, negativ und positiv) Proben wurden mit 3  $\mu$ l anti-CD14<sup>+</sup>-FITC gefärbt, mindestens 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit PBS gewaschen und anschließend in PBS aufgenommen. Die ungefärbte pre Probe diente der Einstellung der Parameter am Durchflusszytometer.

## **2.2 Isolation humaner neutrophiler Granulozyten**

Zuerst erfolgte die Verdünnung von heparinisiertem Vollblut von gesunden Spendern 1:1 mit Komplettmedium (500 ml RPMI + 10% FCS + 5 ml Penicillin/Streptomycin). 25 ml des verdünnten Vollbluts wurden auf 25 ml 3%ige Dextranlösung aufgetragen, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann der leukozytenreiche Überstand abpipettiert und für 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet zweimal mit Komplettmedium gewaschen und darin resuspendiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Aufteilung der Leukozytensuspension in kleine Mengen, je 4 ml Leukozytensuspension wurden zu Trennung auf je 6 ml Ficoll aufgetragen und für 40 min



bei 400 g ohne Bremse zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands fand eine erneute Resuspendierung des Pellets aus neutrophilen Granulozyten statt, und zwar in RPMI Medium mit anschließender Aufnahme in ein neues Falcon Röhrchen, um eine Kontamination mit Monozyten zu vermeiden. Durch Zugabe eiskalter 0,2%iger NaCl-Lösung für 30 s erfolgte eine hypotone Lyse der Erythrozyten, diese wurde mit 1,6%iger NaCl-Lösung neutralisiert. Es folgte die Zentrifugation der Proben für 5 min bei 1200 rpm, Verwerfen des Überstands, falls nötig Wiederholung der hypotonen Lyse, Aufnahme der neutrophilen Granulozyten in RPMI Medium und deren Auszählung (siehe Kapitel 2.6). Verdünnung der neutrophilen Granulozyten mit RPMI Medium auf die Konzentration  $1 \times 10^7$ /ml (Rittner, Labuz et al. 2006).

### **2.3 Versuchstiere**

Männliche Wistar und DA Ratten (Harlan, Niederlande) mit einem Gewicht von 150 – 220 g wurden in einem 12 h-Tag/Nachtrhythmus gehalten. Wasser und Trockenfutter stand den Tieren zur freien Verfügung, teilweise durch Sonnenblumenkerne ergänzt. Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche begannen die Experimente. Die Genehmigung der Tierversuche erfolgte durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin (G0431/09) und die Regierung von Unterfranken, Bayern (55.2-2531-01-22/10).

### **2.4 Isolation von Peritonealmakrophagen aus Ratten**

Für die Gewinnung von Peritonealmakrophagen von Wistar oder DA Ratten wurden die Tiere 4 Tage vor Entnahme der Peritonealmakrophagen mit einer 3%igen Thioglykollatlösung behandelt (Alvarez, Leiro et al. 2002). Intrapitoneale Injektion von 1 ml steriler 3%iger Thioglykollatlösung ruft eine sterile Peritonitis hervor. Thioglykollat stimuliert die Auswanderung von Monozyten aus der Blutbahn in die Bauchhöhle und folglich zur Differenzierung zu Makrophagen. Nach 4 Tagen erfolgte die Entnahme der Peritonealmakrophagen. Die Tiere wurden in Narkose durch intrakardiale Injektion von 200 µl T61 getötet. T61 ist ein Kombinationspräparat aus Embutramid, Mebenzonium und Tetracain und verursacht eine Betäubung, sowie Herz- und Atemstillstand. Die Zellernte erfolgt durch peritoneale Lavage, mit Injektion von 20 ml PBS mit 1 mM

EDTA in die Bauchhöhle. Im Anschluss wurde das Fell auf dem Bauch der Tiere mit einer Schere und einer chirurgischen Pinzette abpräpariert und die Bauchhöhle längs eröffnet. Die Lavageflüssigkeit enthielt Peritonealmakrophagen und wurde in 30 ml PBS mit 3 mM EDTA zur Antikoagulation aufgenommen, auf Eis gekühlt und 10 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands wurde das Pellet aus Peritonealmakrophagen in PBS oder RPMI Medium resuspendiert (Alvarez, Leiro et al. 2002). Abhängig von der Menge an Erythrozyten über dem Pellet folgte eine hypotone Lyse (siehe Isolation humaner neutrophiler Granulozyten, Kapitel 2.2).

### ***2.5 Isolation von neutrophilen Granulozyten aus Ratten***

Die Gewinnung von neutrophilen Granulozyten aus Ratten erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Isolation von Peritonealmakrophagen aus Wistar Ratten durch intraperitoneale Injektion von 20 ml steriler 1%iger Glykogenlösung 4 h vor Zellentnahme. Dadurch wandern neutrophile Granulozyten in die Bauchhöhle ein. Nach bereits beschriebener Tötung der Tiere erfolgte die Entnahme der Zellen durch peritoneale Lavage mit 10 ml PBS und 2 mM EDTA des Bauchraums. Anschließend folgte die Zentrifugation der Lavageflüssigkeit für 10 min bei 1200 rpm, Verwerfen des Überstands und Resuspendierung des Pellets aus neutrophilen Granulozyten in PBS oder RPMI resuspendiert (Rittner, Labuz et al. 2006). Auch hier wurde bei Bedarf eine hypotone Lyse durchgeführt.

### ***2.6 Auszählung der Zellen***

Für die Auszählung der Zellen aus Mensch und Ratte erfolgte entweder 1:50 oder 1:100 eine Verdünnung mit 0,05%iger Trypanblaulösung. Mit der Trypanblaufärbung können lebende von abgestorbenen Zellen unterschieden werden. Vitale Zellen nehmen den Farbstoff Trypanblau aufgrund ihrer intakten Zellmembran im Gegensatz zu abgestorbenen Zellen nicht auf, während tote Zellen blau erscheinen. Unter dem Lichtmikroskop wurden 4 große Quadrate der Zählkammer Neubauer „improved“ ausgezählt und der Mittelwert für die Berechnung der Zellzahl verwendet. Die Zellzahl/ml wurde mit folgender Formel berechnet: Mittelwert der gezählten Zellzahl x Verdünnungsfaktor (50 bzw. 100) x  $10^4$ .

## **2.7 Präparation von Pfortengewebe der Ratte und Probenaufarbeitung für HNE-His Adduct ELISA**

Den Tieren wurden 100 µl CCL2-Lösung (0,03 mg/ml) intraplantar in die Hinterpfote injiziert und 100 µl 0,9%ige NaCl-Lösung in die kontralaterale Pfote als Kontrolle. Nach 3 h wurde für die Gewebeisolation distal des Calcaneus der Ratte ein Querschnitt gesetzt, sowie links und rechts des Querschnitts an der Fellgrenze zwei Längsschnitte, das Gewebe von der tiefen Beugesehne abpräpariert und in eiskalten 20 mM Tris-Puffer aufgenommen. Im Anschluss folgte die Abpräparation des subkutanen Gewebes von der Haut, die Zerkleinerung des Gewebes, erneute Aufnahme in 300 µl 20 mM Tris-Puffer, Homogenisierung des Gewebes mit Schere und Minipistille und Zentrifugation bei 5000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde bei -20 °C eingefroren (Rittner, Brack et al. 2001).

## **2.8 Vorbehandlung der Dark Agouti Ratten mit Phytol**

Nachdem DA Ratten mit 200 µl Phytol (0,85 g/ml) subkutan an der Schwanzbasis für 5 Tage behandelt waren (Hultqvist, Olofsson et al. 2006), erfolgten die Experimente mit Peritonealmakrophagen (siehe Kapitel 2.4) oder Pfortengewebe (siehe Kapitel 2.7).

## **2.9 Stimulation der Zellen mit CCL2 und Messung des oxidativen Burst (Phagoburst Kit)**

### **2.9.1 Prinzip des Phagoburst Kits**

Mit dem Phagoburst Kit kann der oxidative Burst von Leukozyten im Durchflusszytometer (fluorescence activated cell sorting (FACS)) quantitativ bestimmt werden. Das Prinzip des Tests beruht auf der Oxidation des Farbstoffs Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) zu Rhodamin 123 (R 123), einer grünfluoreszierenden Substanz. Die Fluoreszenzintensität wird durchflusszytometrisch bestimmt. Nach den Herstellerangaben ist diese Methode kompatibel für Zellen von Menschen und Ratten. Die zugehörige Anleitung wurde angepasst an Zellsuspensionen.

### *2.9.2 Durchführung*

Unabhängig von der Spezies wurden aufgereinigte Monozyten/Makrophagen oder neutrophile Granulozyten von Ratte oder Mensch in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in RPMI Medium oder Kompletmedium aufgenommen. Für Kokulturrexperimente bestanden die Kokulturen aus Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Verhältnis 1:1, ebenfalls in einer Gesamtkonzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml. Für beide Spezies wurden gleiche Chemokinkonzentrationen und Inkubationszeiten verwendet. Für die Stimulation der Zellen (100  $\mu$ l Zellsuspension pro Ansatz) wurden Positiv- und Negativkontrollen aus dem Phagoburst Kit übernommen und CCL2 verwendet. 20  $\mu$ l Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) als Aktivator der Proteinkinase C diente als Positivkontrolle; als Negativkontrolle wie vorgegeben 20  $\mu$ l Pufferlösung. Ziel dieses Experiments war, den Effekt des Chemokins CCL2 auf den oxidativen Burst zu untersuchen. Die Durchführung der Experimente erfolgte mit zwei verschiedenen Konzentrationen des Chemokins (2  $\mu$ g/ml und 0,5  $\mu$ g/ml), hergestellt aus einer Stocklösung (0,1 mg/ml). Die Inkubationszeiten betragen 10 min, 30 min, 60 min und 120 min bei 37 °C im geschlossenen Wasserbad. Im Anschluss an die Inkubation wurde entsprechend der Herstelleranleitung zu jeder Probe 20  $\mu$ l Substratlösung hinzu gegeben und die Proben für weitere 10 min bei 37 °C im geschlossenen Wasserbad inkubiert. Der in der Anleitung des Phagoburst Kit vorgesehene Lyseschritt war nicht erforderlich, da bereits isolierte Monozyten/Makrophagen beziehungsweise neutrophile Granulozyten verwendet wurden. Nach Waschen der Zellen erfolgte die Aufnahme in 250  $\mu$ l PBS und Analyse der grünen Fluoreszenzaktivität des oxidierten Farbstoffs im Durchflusszytometer.

### **2.10 Nachweis der Rezeptorexpression durch Antikörperfärbung**

Der Nachweis der Expression von CCR2 auf humanen CD14<sup>+</sup>-Monozyten geschah durch Färbung mit folgenden Antikörpern: einem monoklonalen Allophycocyanin (APC)-konjugierten anti-human CCR2-Antikörper, einem CD14-FITC konjugierten und einem CD16-PE konjugierten Antikörper, zur Darstellung des Anteils an CCR2<sup>+</sup> CD14<sup>+</sup>-Monozyten. Nach Inkubation von 50  $\mu$ l Mono-

zytensuspension ( $0,5 \times 10^6$  Zellen) mit den genannten Antikörpern für 30 min bei Raumtemperatur erfolgte das Waschen der Zellen mit 2 ml PBS, Zentrifugation für 5 min bei 1200 rpm, Resuspendierung und Fixierung in 250  $\mu$ l Paraformaldehyd (PFA), sowie Auswertung der Fluoreszenzintensität am Durchflusszytometer. Die Intensität der Fluoreszenz ist proportional zur Dichte der Expression des CCR2 auf den Monozyten. Den Nachweis des CCR2 auf Peritonealmakrophagen von Wistar Ratten (siehe Kapitel 1.2.5) führte Diana Pflücke aus der Arbeitsgruppe Molekulare Schmerzforschung an der Universität Würzburg durch.

### **2.11 Durchflusszytometrie / Fluorescence activated cell sorting (FACS)**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, bei der vitale Zellen quantitativ und anhand ihrer Oberflächenmoleküle charakterisiert werden können. Die Messung von Lichtstreuung und Fluoreszenz bildet die Grundlage. Durch hydrodynamische Fokussierung durchwandern Zellen einen Laserstrahl einzeln hintereinander. Es ist möglich, die Lichtstreuung des Lasers auf Photodetektoren an zwei Punkten zu messen. In einem engen Winkel zum Laserstrahl wird das Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) gemessen. Der FSC ist ein Maß für die Größe der Zellen. In einem Winkel von 90 Grad zum Laserstrahl wird das Seitwärtstreulicht (side scatter, SSC) detektiert. Der SSC bildet die Granularität der Zellen ab. So können beispielsweise Leukozytenpopulationen aufgrund ihrer Zellgröße und -granularität unterschieden werden. In einem Diagramm, das FSC gegen SSC darstellt, können die einzelnen Subpopulationen Lymphozyten, Granulozyten und Monozyten dargestellt werden.

Außerdem kommen spezifische Färbungen mit verschiedenen Farbstoffen zum Einsatz, um verschiedene Fluoreszenzsignale zu detektieren, die mit spezifischen Detektoren aufgenommen werden (z.B.: FL-1 und FL-2). Die Farbstoffe emittieren Photonen bei verschiedenen Wellenlängen. Wird beispielsweise zur Anregung das blaue Licht eines Argonlasers verwendet, fluoresziert Fluoresceinisoithiocyanat (FITC) grünlich und Phycoerythrin (PE) orange. Entsprechend können Antikörper mit diesen fluoreszierenden Farbstoffen konjugiert und zur Analyse der Expression eines Oberflächenrezeptors verwendet werden. Abhängig von dem Durchflusszytometer ist auch die Verwendung an-

derer Farbstoffe wie z.B. APC möglich. Die Photodetektoren wandeln Licht in elektrische Signale um. Ausgewertet wurden die Daten mit dem Programm BD Cellquest Pro. Zwei graphische Darstellungsweisen waren Basis der Auswertung. Das Punktdiagramm wurde für die Darstellung von Zellpopulationen verwendet. Die Vorwärtsstreuung war gegen die Seitwärtsstreuung aufgetragen und die gemessenen Ereignisse als Punkte dargestellt. Einer Zellpopulation konnte ein Fenster (Gate) zugewiesen und im Histogramm weiter analysiert werden. Im Histogramm sind u.a. die Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation als einzelne Spitzen auf einer logarithmischen Skala dargestellt. Dafür wurde FL-1 gegen die Anzahl aufgetragen (aus Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G.: Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie. Basel, Karger, 2007, pp 27 – 70).

### ***2.12 Proteinquantifizierung für enzymgekoppelten Immunadsorptionstest (ELISA) BCA-Test***

Das Pierce<sup>®</sup> BCA Protein Assay Kit stand für die Quantifizierung des Proteingehalts der Proben aus Rattenpfoten zur Verfügung. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$ . Einfach positiv geladenes Kupfer bildet Chelate mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA). Es entsteht ein lilafarbenes Produkt mit einem Absorptionsmaximum für Licht bei 562 nm. Die Absorption ist fast linear zu Proteinkonzentrationen im Bereich von 20 – 2000  $\mu\text{g/ml}$ . Zum Vergleich diente eine Standardkurve aus verdünntem Albumin (bovine serum albumin, BSA). Es wurden Mikroplatten für 25  $\mu\text{l}$  Probenvolumen verwendet, verdünnt in Triplikaten 1:10 mit 20 mM Tris-Puffer. Die Auswertung erfolgte am ELISA Reader Tecan Sunrise bei einer Wellenlänge von 562 nm und mit dem Programm Microsoft Excel 2003.

### ***2.13 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)***

Zum Nachweis von Lipidperoxidationsprodukten diente das OxiSelect<sup>™</sup> HNE-His Adduct ELISA Kit.

### *2.13.1 Prinzip des ELISA*

Der HNE-His Adduct ELISA funktioniert nach dem Prinzip eines Sandwich ELISA. Zuerst werden Proben und HNE-BSA Proteinstandard auf eine Proteinbindungsplatte gegeben und inkubiert. Es folgt die Zugabe des Erstantikörpers, ein anti-HNE Antikörper. Dieser bindet an HNE-Proteinaddukte, welche wiederum auf der Platte gebunden sind. Danach werden die Proben mit einem zweiten Meerrettichperoxidase (engl.: horseradish peroxidase, HRP)-konjugierten Antikörper inkubiert. Die Meerrettichperoxidase wandelt das im Anschluss hinzugefügte Substrat in einen blauen Farbstoff um. Diese enzymatische Reaktion wird durch Zugabe einer Stopplösung unterbrochen. Es entsteht ein gelber Farbstoff. Die Absorption wird bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA Reader Tecan Sunrise gemessen. Der HNE-BSA Proteinstandard wird für die Auswertung des Proteingehalts der unbekanntenen Proben benötigt.

### *2.13.2 Durchführung*

Bei der Durchführung wurden an der Herstelleranleitung des OxiSelect™ HNE-His Adduct ELISA Kits keine Veränderungen vorgenommen: Inkubation der Proben und des Standards in Duplikaten erfolgte bei 4 °C über Nacht auf der Proteinbindungsplatte.

## **2.14 Verhaltensexperimente**

Dr. Dagmar Hackel und Diana Pflücke aus der Arbeitsgruppe Molekulare Schmerzforschung am Universitätsklinikum Würzburg führten alle Verhaltensexperimente durch. Für die Algesimetrie wurden zwei verschiedenen Verhaltentests verwendet: Zur Bestimmung der mechanischen Pfotendruckschwelle der modifizierte Randall Selitto Test (Ugo Basile, Comerio, Italien) und für die thermische Schmerzschwelle der Hargreaves Test. Beim Randall Selitto Test wird mittels Stempel Druck auf die Hinterpfote der Ratte ausgeübt. Als mechanische Pfotendruckschwellen (PPT, paw pressure threshold) wird der Druck dokumentiert, welcher ein Wegziehen der Pfote bewirkt. Die mechanische Hyperalgesie ist an einem Absinken der Pfotendruckschwelle zu erkennen (Stein, Hassan et al. 1990). Beim Hargreaves Test wird die Zeit bestimmt, bis die Ratte die Pfote aufgrund der Strahlungshitze einer Glühlampe mit hoher

Intensität zurückzieht (PWL, paw withdrawl latency) (Hackel, Pflucke et al. 2013).

## 2.15 Verwendete Chemikalien, Antikörper, Puffer und Kits

**Tabelle 1: Verwendete Chemikalien**

Aqua B. Braun	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
0,5% bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
CCL2 (= MCP-1) human	PeptoTech GmbH, Hamburg, Deutschland
CCL2 (= MCP-1) Ratte	PeptoTech GmbH, Hamburg, Deutschland
CD14 MircoBeads human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Dextran T 500	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure Tetra-natriumsalz (EDTA) 2 mM	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Erythrozytenlyse Puffer (EL buffer)	Qiagen, Hilden, Deutschland
FCS (fetal calf serum)	PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland
Ficoll-Paque Plus	GE Healthcare, München, Deutschland
Glykogen from oyster Type II	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 ratiopharm	Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Isofluran (Forene)	Abbott, Wiesbaden-Delkenheim, Deutschland
0,9% NaCl	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland



Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
Phytol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Phosphate buffered saline (PBS) Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
RPMI-1640	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Streptomycin	Biochrome AG, Berlin, Deutschland
T61 (Embutramid, Mebenzonium, Tet- racain)	Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Thioglycollate medium	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Tris	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypanblau 0,5%	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

**Tabelle 2: Verwendete Antikörper**

CCR2 APC = anti-hCCR2 allophycocy- anin conj. Mouse IgG 2B	R&D Systems, Minneapolis, USA
CD14 FITC (fluoresceinisothiocyanat) = FITC labeled anti-human CD14	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
CD16 PE human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
CKR-2B (C-20) goat polyclonal IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
PE-conj. bovine anti-goat IgG	Serotec, Raleigh, NC, USA
FITC-conj. mouse anti-rat ED1	Serotec, Raleigh, NC, USA
FITC-conj. mouse anti-rat ED2	Serotec, Raleigh, NC, USA

**Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Puffer**

3% Dextranlösung	3g Dextran in 100ml 0,9% NaCl
CCL2	Aufgelöst in NaCl; Konzentrationen: 1µg/µl & 0,1µg/µl
0,2 M EDTA-Lösung	2,92g EDTA in 50ml H <sub>2</sub> O
Erythrozytenlyse Puffer (EL buffer, Qiagen)	Zur Lyse der Erythrozyten vor Isolierung der Monozyten aus Leukozyten-apheresefiltern
1% Glykogenlösung	0,2g Glykogen in 20ml PBS
HBSS (Hanks balanced sodium solution)	1 Röhrchen HBSS in 100ml Aqua + 0,35g Natriumbicarbonat, aufgefüllt auf 1l, pH 7,35
MACS Puffer	500ml PBS + 2,5g BSA (0,5%) + 372mg EDTA-Lösung (2mM)
PBS (phosphate buffered saline) Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
1% PFA	1g in 100ml PBS gelöst, pH 7,4
3% Thioglykollatlösung	0,3g Thioglykollat in 10ml PBS
20 mM Tris Puffer	0,242g Tris auf 100ml PBS, pH 7,4
0,05% Trypanblau	10ml 0,5% Trypanblau in 90ml PBS
Zellmedium: Kompletmedium	500 ml RPMI + 10% FCS + 5ml Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml)

**Tabelle 4: Verwendete Kits**

OxiSelect™ HNE-His Adduct ELISA Kit	Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA
Phagoburst® (Bursttest)	Orpegen Pharma, Heidelberg, Deutschland
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific, Rockford, USA

## 2.16 Geräte, sonstige Materialien und Software

**Tabelle 5: Geräte**

Durchflusszytometer FACS Scan	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ELISA Reader Tecan Sunrise	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland
MACS Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Zählkammer: Neubauer improved	Paul Marienfeld GmbH, Lauda Königshofen, Deutschland
Zentrifuge: centrifuge 5418R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge: Megafuge 1.0 R	Heraeus, Sepatech, Osterode, Deutschland

**Tabelle 6: Sonstige Materialien**

BD Falcon, FACS Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Truecount™ tubes	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
MACS Pre-Separation filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS LS column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Nunclon™ Microwell 96F	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland

**Tabelle 7: Software**

BD Cellquest Pro	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Endnote X4	Thomson Reuters, Carlsbad, USA

TK Magellan	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Microsoft Office Excel 2003	Redmond, Washington, USA
Microsoft Office Word 2003	Redmond, Washington, USA
SigmaPlot 11.0	Systat Software Inc., Chicago, USA
SigmaStat 3.5	Systat Software Inc., Chicago, USA

### ***2.17 Statistik und Auswertung***

Die Zusammenstellung der Ergebnisse erfolgte mit Microsoft Excel 2003 in Tabellen und die statistische Auswertung mit SigmaStat und SigmaPlot.

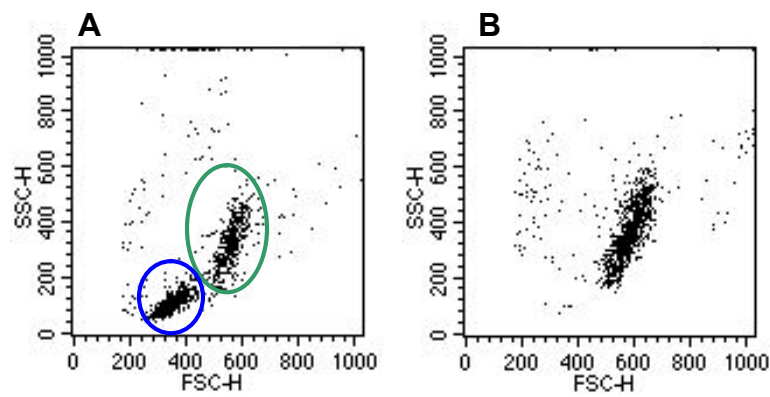
Die Rohdaten der ROS Bildung wurden im Bezug zum Mittelwert der Behandlungsgruppe normiert. Bei den übrigen Experimenten wurden Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) berechnet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels gepaartem t-test beziehungsweise ANOVA. Die Daten wurden auf Normalverteilung getestet. Bei wiederholten Messungen und verschiedenen Einflussfaktoren wurde bei Normalverteilung der Daten die Two Way repeated measures (RM) ANOVA durchgeführt, beziehungsweise bei nur einem Einflussfaktor die One Way RM ANOVA. Als Post-hoc Test im Anschluss an ANOVA erfolgte der Student-Newman-Keuls Test. Unterschiede wurden als signifikant interpretiert, wenn  $p < 0,05$ .

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Reinheit der isolierten humanen CD14<sup>+</sup> Monozyten

Humane Monozyten exprimieren auf ihrer Oberfläche spezifisch CD14, daher wurden sie mittels CD14<sup>+</sup> MACS Separation aus Thrombozytenapheresefiltern von gesunden Spendern isoliert und im Anschluss die Reinheit und Ausbeute der Zellaufreinigung überprüft. Abbildung 7A zeigt exemplarisch die in Blutproben aus Thrombozytenapheresefiltern enthaltenen Leukozyten vor CD14<sup>+</sup> MACS Separation.

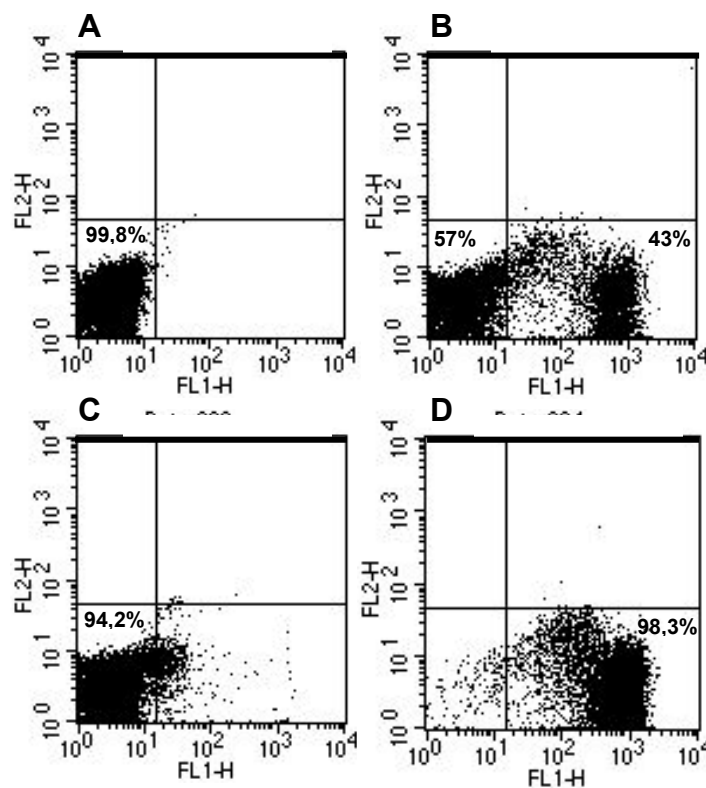


**Abbildung 7: Leukozytenpopulationen in Thrombozytenapheresefiltern**

Isolierung von humanen Monozyten aus Thrombozytenapheresefiltern mittels CD14<sup>+</sup> MACS Separation und durchflusszytometrische Analyse. Leukozytenpopulationen vor MACS Separation (A), Lymphozyten (blauer Kreis) und Monozyten (grüner Kreis), sowie Monozyten nach CD14<sup>+</sup> MACS Separation (B).

Mittels der durchflusszytometrischen Parametern FSC und SSC können Leukozyten anhand ihrer Größe und Granularität unterschieden werden. Lymphozyten (blauer Kreis) zeichnen sich im Vergleich zu Monozyten (grüner Kreis) durch eine kleinere Zellgröße und geringere Granularität aus. Aufgrund der Strömungsbedingungen während der Thrombozytenapherese enthalten die verwendeten Filter kaum neutrophile Granulozyten. In Abbildung 7B ist die Monozytenpopulation nach CD14<sup>+</sup> MACS Separation dargestellt, die Zellsuspension enthält fast ausschließlich CD14<sup>+</sup> Monozyten. Abbildung 8 fasst exemplarisch und repräsentativ die verschiedenen Schritte der MACS Separation zusammen. Dargestellt sind durchflusszytometrische Daten als Punktdiagramm, in denen die Signale der Fluoreszenzintensität gegeneinander aufgetragen sind, FL1 gegen FL2. Abbildung 8A zeigt ungefärbte Leukozyten vor

MACS Separation, verwendet zur Einstellung der Parameter des Durchflusszytometers. Vor MACS Separation binden 43% der Leukozyten aus einem Thrombozytenapheresefilter CD14-FITC auf ihrer Oberfläche (Abbildung 8B). Die Zellen in der Negativ-Probe exprimieren kaum CD14 auf ihrer Oberfläche (94,2% CD14<sup>-</sup> Zellen), folglich sind kaum noch CD14<sup>+</sup> Monozyten in der Negativ-Probe vorhanden (Abbildung 8C). Nach CD14 Positivselektion sind die isolierten Zellen zu 98,3% CD14<sup>+</sup>, also Monozyten (Abbildung 8D). Bei der Aufreinigung der humanen Monozyten wurden Reinheiten zwischen 94 und 98% erreicht.

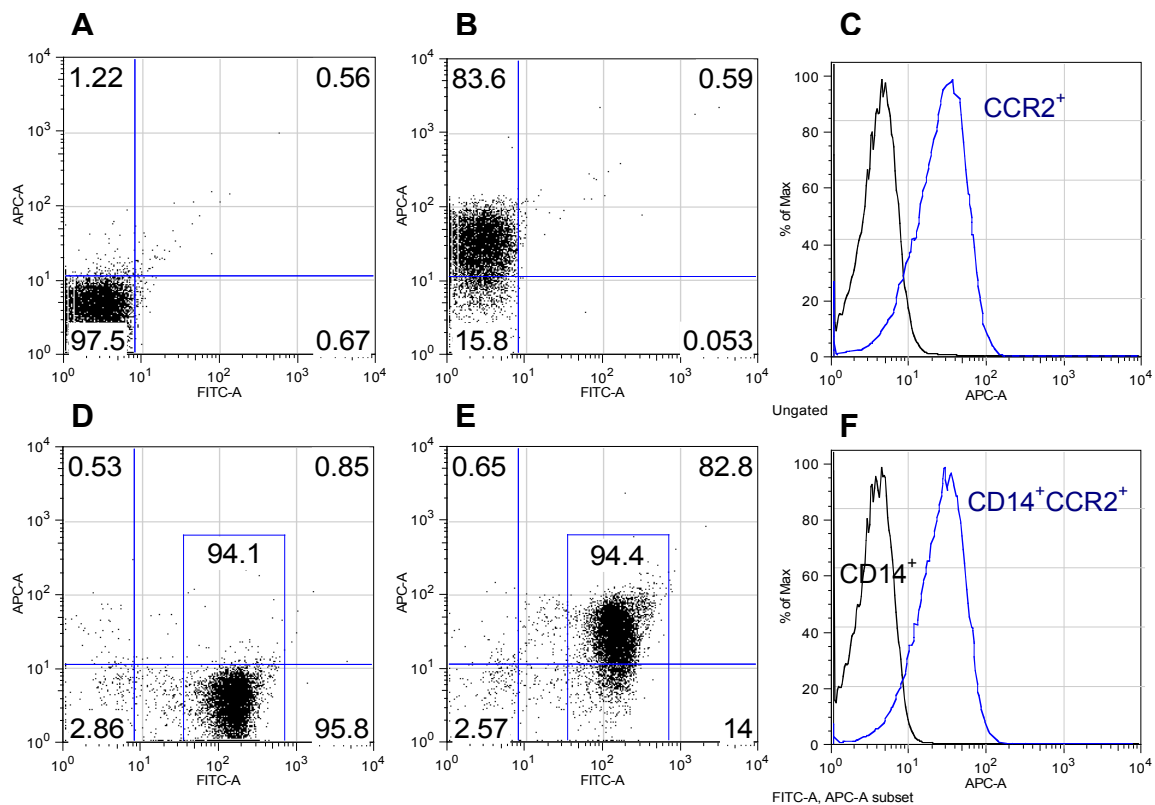


**Abbildung 8: Reinheit humaner Monozyten nach CD14 MACS Separation**

Zu verschiedenen Phasen der CD14<sup>+</sup> MACS Separation entnommene Proben wurden mit einem CD14<sup>+</sup>-FITC Antikörper gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Ungefärbte Leukozyten vor CD14<sup>+</sup> MACS Separation (A). Färbung der Leukozyten aus Thrombozytenapheresefiltern vor CD14<sup>+</sup> MACS Separation (B). Leukozytenpopulation nach Positivselektion, diese Leukozyten exprimieren kaum CD14 (C). Nach CD14<sup>+</sup> MACS Separation besteht die Zellsuspension fast ausschließlich aus CD14 Monozyten (D).

### 3.2 Expression des CCR2 Rezeptors

Im Folgenden wurde die Expression von CCR2 auf humanen Monozyten untersucht (Abbildung 9). Die Einstellung der Parameter am Durchflusszytometer erfolgte mit einer Probe ungefärbter Monozyten (Abbildung 9A), dargestellt als Punktdiagramm von FITC und APC. Nach Einfachfärbung der isolierten Monozyten exprimieren ungefähr 84% der isolierten Zellen CCR2 (Abbildung 9B). Im Histogramm zeigt sich eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität für APC in der gefärbten Probe (blaue Linie) im Vergleich zu den ungefärbten Zellen (schwarze Linie) gleichbedeutend mit einer Expression von CCR2 (Abbildung 9C).



**Abbildung 9: Expression des Chemokinrezeptors CCR2 auf humanen Monozyten**

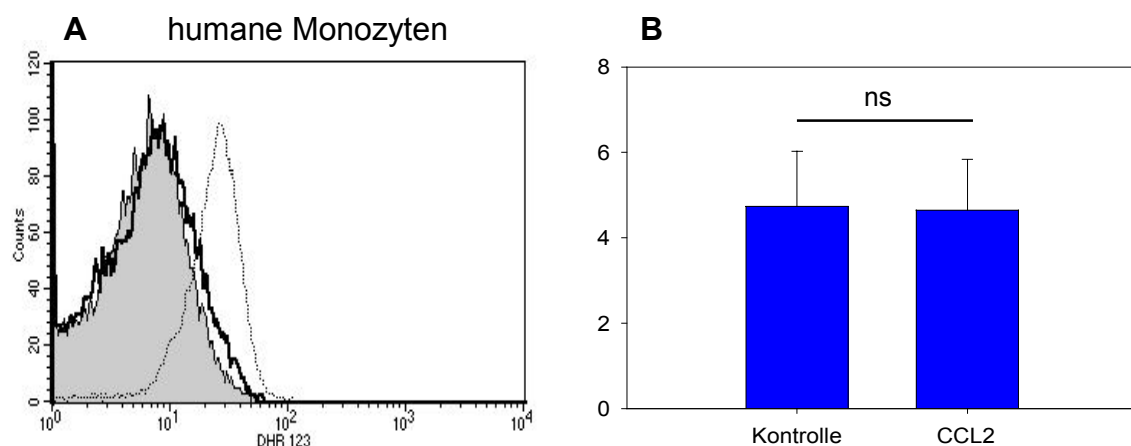
Extrazelluläre Antikörperfärbung mit einem APC-konjugierten CCR2 Antikörper von humanen Monozyten nach CD14<sup>+</sup> MACS Separation und durchflusszytometrische Auswertung (jeweils repräsentative Abbildung). Ungefärbte Zellen nach CD14<sup>+</sup> MACS Separation (A) und Färbung dieser Zellen mit einem CCR2-Antikörper (B). Die mit CD14<sup>+</sup> MACS Separation isolierten Zellen exprimieren CCR2 (C). Färbung der nach MACS Separation isolierten Zellen mit einem FITC-konjugierten CD14 Antikörper (D) und Doppelfärbung der isolierten Monozyten mit CD14-FITC und CCR2-APC (E). Die CD14<sup>+</sup> Monozyten exprimieren gleichzeitig CCR2 (F)

Um zu untersuchen welche Zellen CCR2 exprimieren, wurde eine Doppelfärbung CD14-FITC und CCR2-APC durchgeführt. In Abbildung 9D sind mehr als 96% CD14<sup>+</sup>. Ungefähr 83% der isolierten Zellen sind CD14<sup>+</sup> Monozyten und exprimieren CCR2 (Abbildung 9E). Dies zeigt sich auch in der Rechtsverschiebung im Histogramm (Abbildung 9F). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die mittels MACS Separation isolierten Zellen CD14<sup>+</sup> Monozyten sind und gleichzeitig CCR2 exprimieren.

### 3.3 Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale nach CCL2 Stimulation (Phagoburst)

#### 3.3.1 Humane Monozyten

Die Stimulation humaner Monozyten mit CCL2 führt nicht zu einer Steigerung der ROS Bildung. PMA jedoch verursacht eine Rechtsverschiebung des Kurvenmaximums im Histogramm, also einer Zunahme der ROS Bildung (Abbildung 10A). Im Gegensatz dazu kommt es nach Stimulation mit CCL2 (2ng/μl) nur zu einer minimalen Rechtsverschiebung. Auch bei niedrigeren Konzentrationen von CCL2 (0,5 ng/μl) konnte keine Steigerung der ROS Bildung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Auch in der statistischen Zusam-



**Abbildung 10: CCL2 steigert nicht die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in humanen Monozyten**

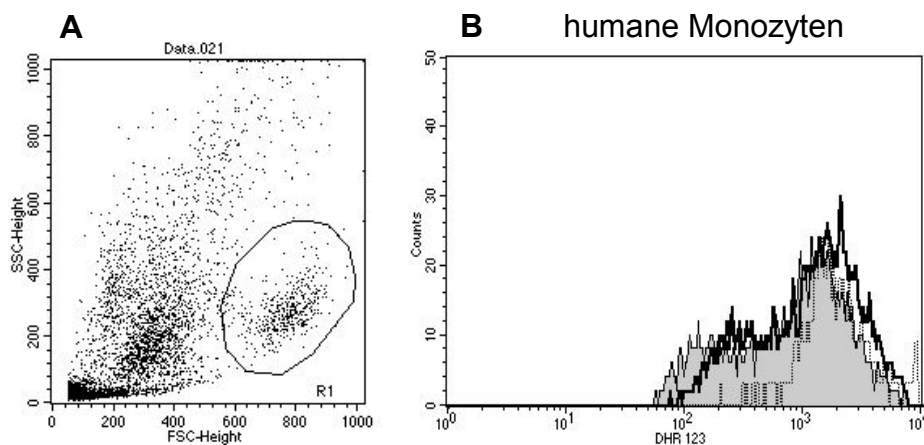
Humane Monozyten, isoliert mittels CD14<sup>+</sup> MACS Separation, wurden mit CCL2 (2 μg/ml) für 1 h stimuliert. Die ROS Bildung wurde mittels Phagoburst Test durchflusszytometrisch untersucht. Kontrolle (grau hinterlegte Kurve), PMA (Positivkontrolle, gestrichelte Linie) und CCL2 (schwarze Linie) (A). Die Stimulation mit CCL2 führt in humanen Monozyten nicht zu einer signifikanten Steigerung der ROS Bildung. (gepaarter t-test,  $p > 0,05$ ,  $n = 6$ , Geo Mean Mittelwert  $\pm$  SEM) (B).



menfassung besteht zwischen CCL2 stimulierter Gruppe und Kontrollgruppe kein Unterschied in der ROS Bildung (Abbildung 10B).

### 3.3.2 Kokultur von humanen Monozyten und neutrophilen Granulozyten

In Kokultorexperimenten sollte die Bedeutung der Interaktion zwischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten für die ROS Bildung untersucht werden. Aufgereinigte Monozyten wurden mit neutrophilen Granulozyten von einem anderen Spender mit CCL2 in verschiedenen Konzentrationen sowie PMA als Positivkontrolle inkubiert, ohne dass sich Unterschiede zeigten (Abbildung 11).



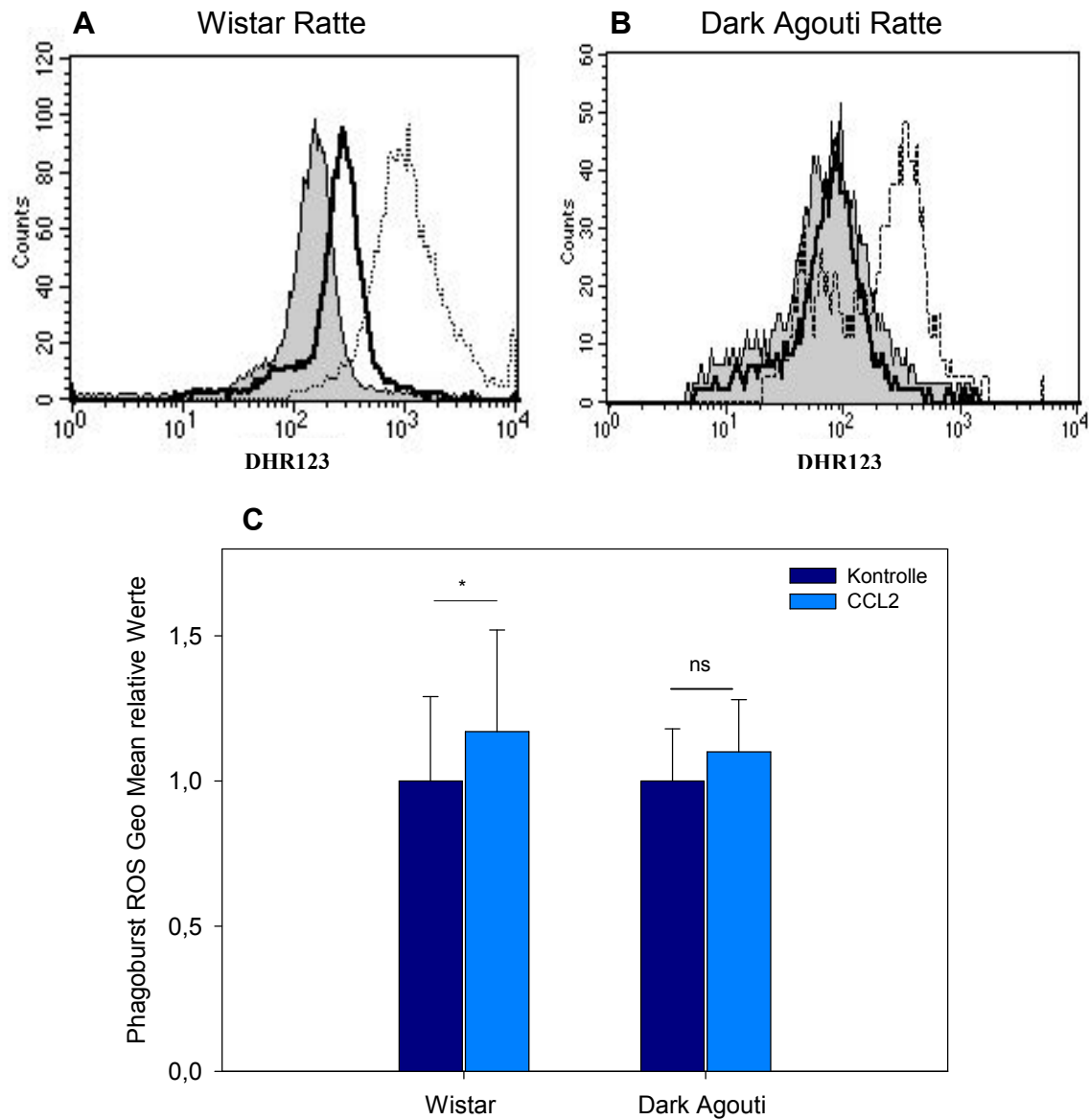
#### **Abbildung 11: CCL2 steigert nicht die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Kokultur humaner Monozyten mit neutrophilen Granulozyten**

Humane neutrophile Granulozyten wurden gemeinsam mit humanen Monozyten 1 h mit CCL2 stimuliert. Die ROS Bildung wurde mittels Phagoburst Test durchflusszytometrisch untersucht. Fenster um Monozytenpopulation und Auswertung der Bildung von ROS durch Monozyten (A). Kontrolle (graue Linie), PMA (Positivkontrolle, gestrichelte Linie) und CCL2 (schwarze Linie) (B). Nach Stimulation der Kokultur mit PMA und CCL2 konnte kein Unterschied zur Kontrolle nachgewiesen werden.

### 3.3.3 Makrophagen aus Wistar und Dark Agouti Ratten

Um den Effekt von CCL2 auf differenzierte Makrophagen zu untersuchen, wurden Peritonealmakrophagen aus Wistar Ratten verwendet. In vitro führt die Stimulation der Peritonealmakrophagen mit CCL2 zu einer signifikant gesteigerten ROS Bildung (Abbildung 12A), nicht jedoch bei Peritonealmakrophagen aus DA Ratten (Abbildung 12B). Leukozyten aus DA Ratten besitzen aufgrund eines Polymorphismus im Gen *Ncf1* eine geringere Kapazität für den oxidativen Burst (Hultqvist, Olofsson et al. 2006). Abbildung 12C fasst die Ergebnisse aus beiden Tierstämmen zusammen. Aufgrund von interindividuell unterschiedlichen

Basalwerten und Parametern des Durchflusszytometers wurden die Daten für die statistische Auswertung normalisiert.

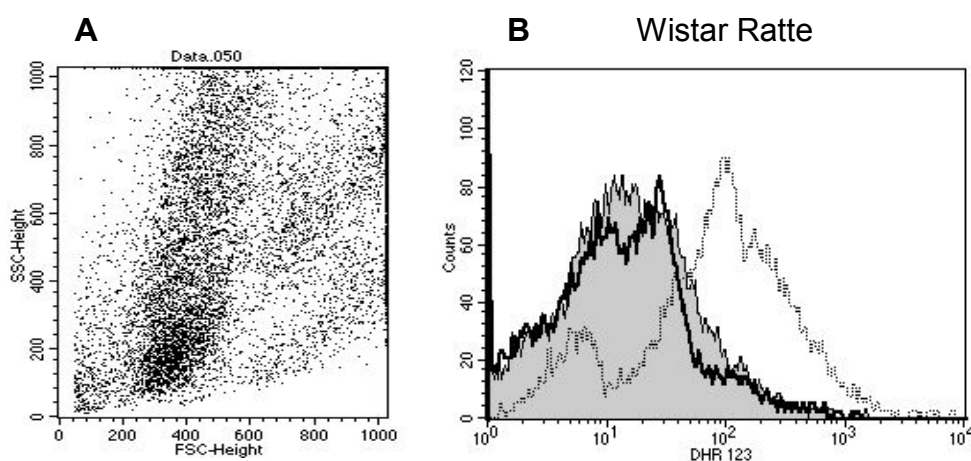


**Abbildung 12: CCL2 steigert die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Makrophagen aus Wistar Ratten, nicht jedoch in Makrophagen aus Dark Agouti Ratten**

Peritonealmakrophagen aus Wistar und DA Ratten wurden für 1 h mit CCL2 stimuliert und die ROS Bildung mittels Phagoburst Test durchflusszytometrisch ausgewertet. Die Stimulation von Makrophagen aus Wistar Ratten mit CCL2 (schwarze Kurve) bzw. PMA (gestrichelt) führt zu einer gesteigerten ROS Bildung (repräsentative Abb.) (A). In Makrophagen aus DA Ratten konnte nach Stimulation mit CCL2 gesteigerte ROS Bildung nachgewiesen werden (repräsentative Abb.) (B). Statistische Zusammenfassung der Stimulationsexperimente: CCL2 erhöht die ROS Bildung in Makrophagen aus Wistar Ratten signifikant (C) (Two way repeated measures ANOVA, Student-Newman-Keuls Method, \*  $p < 0,05$ , rel. Geo Mean Mittelwert  $\pm$  SEM, Wistar  $n = 12$ , DA  $n = 8$ ).

### 3.3.4 Kokultur von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten der Wistar Ratte

Kokultorexperimente wurden mit Zellen aus Ratten wiederholt. Durch die große Bandbreite der Eigenschaften für Zellgröße und –granularität konnte auf Makrophagen kein Auswertungsfenster gelegt werden (Abbildung 13A). In der Analyse aller Zellen kann die ROS Bildung durch PMA stimuliert werden, CCL2 hat jedoch keine Wirkung.

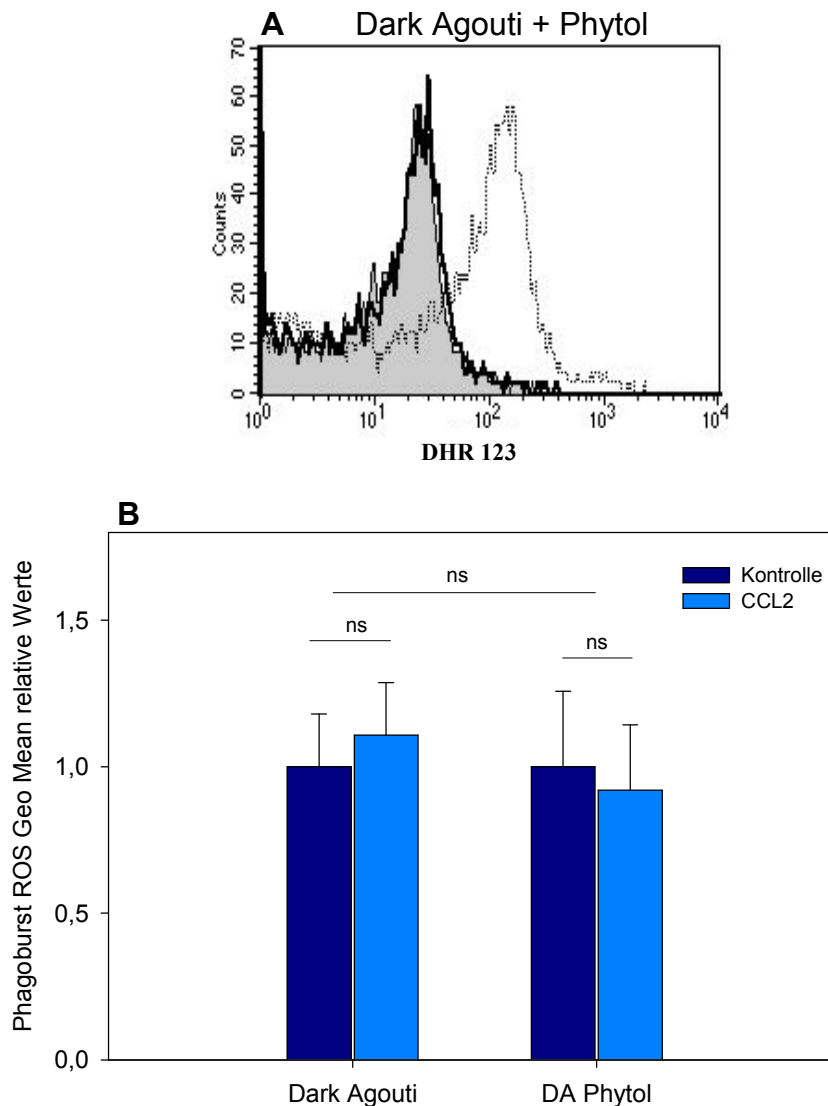


#### **Abbildung 13: CCL2 steigert nicht die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Kokultur von Makrophagen mit neutrophilen Granulozyten aus Wistar Ratten**

Makrophagen und neutrophile Granulozyten wurden mittels peritonealer Lavage aus Wistar Ratten entnommen. Diese Kokultur wurde mit CCL2 für 1 h stimuliert und die ROS Bildung mittels Phagoburst Test durchflusszytometrisch untersucht. Leukozytenpopulationen in Kokultur (A) und Stimulation mit CCL2 (schwarz) und PMA (gestrichelt), Kontrolle (grau) (B). PMA, nicht jedoch CCL2 steigert die ROS Bildung in der Kokultur von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten.

### 3.3.5 Makrophagen aus mit Phytol behandelten Dark Agouti Ratten

In den folgenden Experimenten wurde die Fähigkeit von Phytol zur Induktion des oxidativen Burst untersucht. Der Burstinducer Phytol wurde DA Ratten 5 Tage vor Entnahme der Peritonealmakrophagen s.c. injiziert. Trotzdem führte die Stimulation mit CCL2 nicht zu einer Steigerung der ROS Bildung in Makrophagen aus mit Phytol behandelten DA Ratten (Abbildung 14A). Stimulation mit PMA steigerte die ROS Bildung. (Abbildung 14B). Auch im statistischen Vergleich mit unbehandelten DA Ratten besteht weder zwischen den Kontrollgruppen, noch den Chemokin stimulierten Gruppen ein Unterschied in der ROS Bildung.



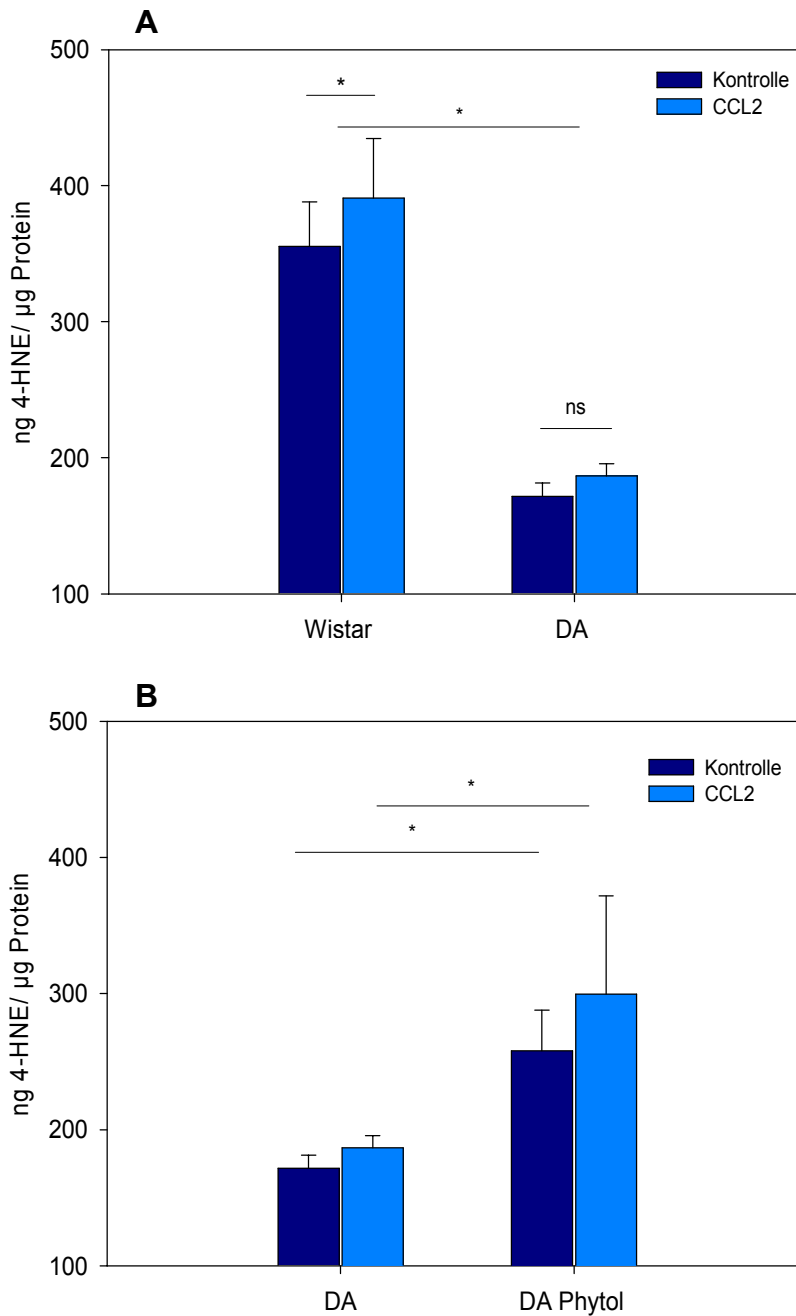
**Abbildung 14: CCL2 steigert nicht die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Makrophagen aus mit Phytol behandelten Dark Agouti Ratten**

DA Ratten wurde 5 Tage vor Entnahme der Peritonealmakrophagen der Burstinducer Phytol s.c. injiziert. Die Peritonealmakrophagen wurden für 1 h mit CCL2 stimuliert und die ROS Bildung mittels Phagoburst Test durchflusszytometrisch analysiert. Stimulation von Makrophagen aus mit Phytol behandelten DA Ratten mit CCL2 (schwarze Kurve) führt im Gegensatz zu PMA (gestrichelt) nicht zur Steigerung der ROS Bildung (repräsentative Abb.) (A). CCL2 führt weder in Makrophagen aus DA Ratten, noch in mit Phytol behandelten DA Ratten zu einer Steigerung der ROS Bildung. Auch zwischen unbehandelten und behandelten DA Ratten konnte kein Unterschied in der ROS Bildung gezeigt werden (B) (Two way repeated measures ANOVA, Student-Newman-Keuls Method,  $p > 0,05$ , rel. Geo Mean Mittelwert  $\pm$  SEM, DA + Phytol  $n = 6$ , DA  $n = 8$ ).

### **3.4 Bildung von Lipidperoxidationsprodukten nach intraplantarer CCL2 Injektion**

Unter Bedingungen des oxidativen Stresses kommt es im betroffenen Gewebe zur Bildung von Lipidperoxidationsprodukten wie 4-HNE, einem indirekten Nachweis für die Bildung von ROS im Gewebe (Catala 2009). In diesem Experiment wurde die Bildung von 4-HNE nach i.pl. CCL2 Injektion im Pfortengewebe von Wistar, DA und mit Phytol behandelten DA Ratten mittels ELISA untersucht. In der Kontrollgruppe wurde in die kontralateralen Pforten der Tiere 0,9%ige Kochsalzlösung injiziert.

Im Pfortengewebe von Wistar Ratten ist nach i.pl. CCL2 Injektion ein signifikant gesteigerter Gehalt von 4-HNE nachweisbar (Abbildung 15A). Bei DA Ratten besteht kein Unterschied in der Bildung von 4-HNE nach i.pl. Injektion von CCL2. Generell ist der 4-HNE Gehalt in DA Ratten niedriger. Abbildung 15B vergleicht den 4-HNE Gehalt im Pfortengewebe von DA Ratten und mit dem Burstinducer Phytol behandelten DA Ratten. Trotz der Vorbehandlung besteht kein Unterschied in der 4-HNE Bildung. Im statistischen Vergleich von DA Ratten mit Phytol behandelten DA Ratten zeigt sich jedoch ein signifikant gesteigerter Gehalt an 4-HNE bei den behandelten DA Ratten sowohl in der Kontrolle als auch in der Chemokin Gruppe.



**Abbildung 15: Bildung des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE nach CCL2 Injektion in Wistar, Dark Agouti und Phytol behandelten Dark Agouti Ratten**

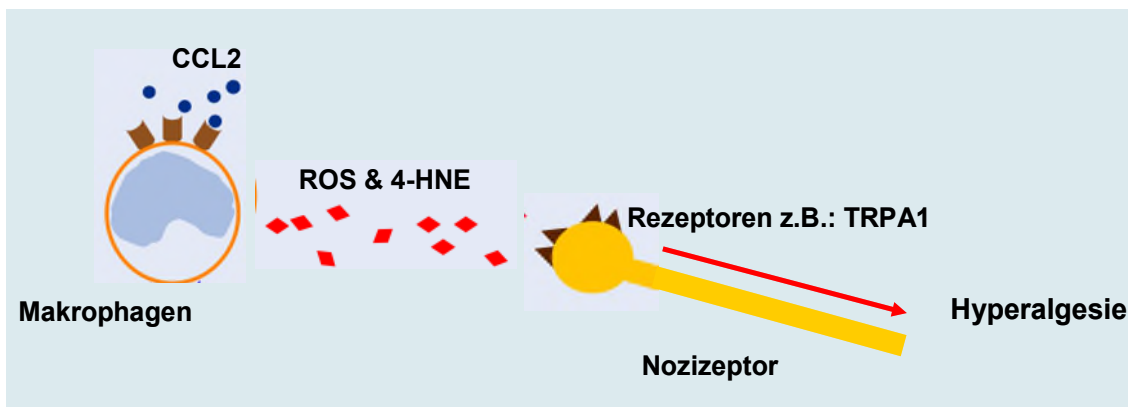
Wistar Ratten, DA Ratten und mit Phytol behandelten DA Ratten wurden 100 µl CCL2-Lösung (Konzentration 0,03 mg/ml) in die Hinterpfote injiziert, als Kontrolle diente 0,9%ige NaCl-Lösung. Nach 3 h wurde das Pfortengewebe entnommen und der 4-HNE Gehalt mittels ELISA untersucht. In Wistar Ratten führt die i.pl. Injektion von CCL2 zu einem signifikant gesteigerten Gehalt von 4-HNE im Pfortengewebe im Vergleich zur Kontrolle. Bei DA Ratten hingegen besteht nach i.pl. CCL2 kein Unterschied im Gehalt von 4-HNE zur Kontrolle (A). Bei mit Phytol behandelten DA Ratten besteht nach i.pl. CCL2 ebenfalls kein Unterschied im 4-HNE Gehalt der Pforten. Im Vergleich zu DA Ratten besteht bei mit Phytol behandelten DA Ratten ein signifikant erhöhter Gehalt an 4-HNE in der Kontroll- und der Chemokingruppe (B) (One way ANOVA, Student-Newman-Keuls Method, \* p < 0,05, Mittelwert +/- SEM, n = 6).

### 3.5 Signalweg der CCL2-induzierten Hyperalgesie

Die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie ist abhängig von Makrophagen. Durch Rekonstitution mit Makrophagen und CCL2 entwickeln auch Leukozyten-depletierte Ratten eine mechanische und thermische Hyperalgesie. Die alleinige Injektion von Makrophagen intraplantar verändert die nozizeptiven Schwellen der Tiere jedoch nicht (Pflucke, Hackel et al. 2013).

Die Rezeptoren TRPV1 und TRPA1 auf dem Nozizeptor spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie. Die Entstehung der CCL2-abhängigen thermischen Hyperalgesie kann durch den TRPV1 Antagonist BCTC verhindert werden. Der TRPA1 Antagonist HC30031 verhindert die Entwicklung einer CCL2-abhängigen mechanischen Hyperalgesie (Pflucke, Hackel et al. 2013). Auch der spezifische COX-2 Inhibitor Parecoxib verhindert die Entwicklung der CCL2-abhängigen Hyperalgesie.

CCL2 bewirkt in Makrophagen die Bildung von ROS und im Gewebe die Bildung des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE. CCL2 führt indirekt durch ROS und 4-HNE Bildung zur Induktion des Enzyms COX-2 im peripheren Gewebe. Diese Signalkaskade ermöglicht die Entwicklung einer Hyperalgesie (Pflucke, Hackel et al. 2013).



**Abbildung 16: Mechanismus der CCL2-induzierten Hyperalgesie**

CCL2 bewirkt zum einen die Einwanderung von Makrophagen ins Gewebe und zusätzlich die Stimulierung der Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Makrophagen. Reaktive Sauerstoffradikale (ROS) führen im Gewebe zur Bildung von Lipidperoxidationsprodukten (4-HNE). ROS und 4-HNE sensibilisieren die Rezeptoren TRPV1 und TRPA1 und ermöglichen dadurch die Entwicklung der CCL2-abhängigen, inflammatorischen Hyperalgesie.

DA Ratten entwickeln nach i.pl. Injektion von CCL2 im Gegensatz zu Wistar Ratten keine Hyperalgesie und die Einwanderung von Makrophagen bleibt aus. Im Vergleich zu Wistar Ratten weisen Makrophagen aus DA Ratten eine signifikant niedrigere Expression von CCR2 mRNA auf. Zusätzlich migrieren weniger Makrophagen aus DA Ratten in Chemotaxisexperimenten bei verschiedenen CCL2 Konzentrationen, folglich besteht ein Migrationsdefekt. Die in der Einleitung beschriebenen Rekonstitutionsexperimente an Leukozyten-depletierten Wistar und DA Ratten wurden ebenfalls mit Makrophagen aus DA Ratten als Spendertiere durchgeführt. Die Injektion von Makrophagen aus DA Ratten zusammen mit CCL2 führt nicht zu einer Änderung der nozizeptiven Schwellen. Die fehlende Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie bei DA Ratten hat folglich zwei Gründe: Zum einen besteht aufgrund der geringeren Expression des CCR2 ein Migrationsdefekt und zum anderen bilden Makrophagen aus DA Ratten aufgrund des Defekts der NADPH-Oxidase weniger ROS (Hackel, Pflucke et al. 2013).



## 4. Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Humane Monozyten, die mittels CD14 MACS Separation aus Thrombozytenapheresefiltern von gesunden Spendern isoliert wurden, besaßen eine hohe Reinheit. Durchflusszytometrisch konnte auf diesen CD14<sup>+</sup> Monozyten die Expression von CCR2 nachgewiesen werden. Nach Stimulation von humanen CD14<sup>+</sup>CCR2<sup>+</sup> Monozyten (oder zusammen mit neutrophilen Granulozyten) mit CCL2 konnte keine Veränderung in der ROS Bildung nachgewiesen werden.

Hingegen konnte in Peritonealmakrophagen aus Wistar Ratten nach Stimulation mit CCL2 eine signifikant gesteigerte ROS Bildung nachgewiesen werden. DA Ratten besitzen aufgrund eines Polymorphismus im Gen *Ncf1*, das die katalytische Untereinheit der NADPH-Oxidase kodiert, eine geringere Burstkapazität als Wistar Ratten. Peritonealmakrophagen von DA Ratten bildeten keine ROS nach CCL2 Stimulation, auch nicht durch Vorbehandlung mit Phytol. Im Pfortengewebe von Wistar Ratten bestand nach i.pl. CCL2 Injektion ein signifikant gesteigerter Gehalt des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE, verglichen mit der kontralateralen Pforte, in die Kochsalzlösung injiziert wurde. Im Pfortengewebe von DA Ratten blieb der 4-HNE Gehalt hingegen unverändert. Ebenso bestand im Pfortengewebe aus mit Phytol behandelten DA Ratten kein Unterschied im 4-HNE Gehalt.

### 4.2 Diskussion der Methoden

#### 4.2.1 Zellisolation und Stimulationsexperimente

Humane Monozyten wurden aus Thrombozytenapheresefiltern von gesunden Spendern mittels MACS Separation isoliert. Nach Angaben des Herstellers führt die Bindung der verwendeten CD14<sup>+</sup> MicroBeads an den CD14 Rezeptor auf der Zelloberfläche der Monozyten nicht zu einer Aktivierung. Eine gewisse Aktivierung der Monozyten durch die Aufreinigung und Isolation oder auch durch den Prozess der Thrombozytenapherese ist jedoch nicht auszuschließen. Möglicherweise war eine Voraktivierung der humanen Monozyten ursächlich dafür, dass ein stimulierender Einfluss von CCL2 auf die ROS Bildung nicht gezeigt

werden konnte. Durch Isolation der Monozyten aus humanen Vollblutproben, ohne dass die Zellen vorher die Thrombozytenapherese durchliefen, könnte dieser Aspekt untersucht werden.

Über die Bedeutung einer möglichen Interaktion zwischen Monozyten und neutrophilen Granulozyten für die ROS Bildung und der folgenden Entwicklung einer inflammatorischen Hyperalgesie konnte aufgrund einer möglichen allo-genen Stimulation durch die unterschiedlichen Spender der Leukozyten keine Aussage getroffen werden. Um den Effekt von CCL2 auf differenzierte Makro-phagen zu untersuchen, wurden die Stimulationsexperimente mit Peri-tonealmakrophagen aus Wistar und DA Ratten wiederholt. Zur Isolation der Peritonealmakrophagen verwendetes Thioglykollat ist ein starker Stimulus für Makrophagen. Dadurch konnte eine ausreichend hohe Zellzahl für die Stimula-tionsexperimente aus den Tieren entnommen werden ((Alvarez, Leiro et al. 2002), siehe auch Material und Methoden 2.4). Ein Nachteil dieser Methode ist, dass die verwendeten Makrophagen bereits zu einem gewissen Ausmaß akti-viert sind. Für die Untersuchung der Auswirkung des Burstinducers Phytol wur-de dieser noch vor Injektion von Thioglykollat DA Ratten s.c. injiziert und an-schließend Peritonealmakrophagen isoliert (siehe auch Material und Methoden 2.8).

Ebenso wie bei den Experimenten mit humanen Spenderzellen konnten auch bei Kokultorexperimenten mit Leukozyten aus Ratten keine Mono-zyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten aus ein und demselben Tier isoliert werden. Aus Ratten konnte jeweils nur eine Leukozytensubpopulation isoliert werden, da für die Isolation unterschiedliche Chemikalien und Stimulati-onszeiträume nötig waren und die Tiere nach peritonealer Lavage getötet wur-den. Daher bestand auch bei den isolierten Leukozyten aus verschiedenen Rat-ten eine Inkompatibilität untereinander. In den Kokultorexperimenten mit Zellen der Wistar Ratten ist ein stimulierender Effekt von PMA auf die ROS Bildung zu sehen. Aufgrund der großen Bandbreite der Eigenschaften für Zellgröße und -granularität in der durchflusszytometrischen Analyse, konnte die gesteigerte ROS Bildung nicht Makrophagen oder neutrophilen Granulozyten zugeordnet werden. Möglicherweise könnte diese Frage mit einer dreifach Färbung beant-

wortet werden. Durch die grüne Fluoreszenzfarbe von DHR 123 des Phagoburst Kits ist die Fluoreszenz für ROS vorgegeben. Folglich müssten die Makrophagen zusätzlich mittels CD68 (ED1) und CD163 (ED2) konjugiertem PE-Antikörper und die neutrophilen Granulozyten mit einem APC konjugierten Antikörper identifiziert werden. Problematisch ist, dass im Gegensatz zu humanen Monozyten Makrophagen aus Ratten über zwei Oberflächenmoleküle identifiziert werden sollten: CD68 und CD163.

Die Arbeitsgruppe Hultqvist et al. zeigt, dass Phytol in DA Ratten *in vivo* und *in vitro* den oxidativen Burst induzieren kann. Die Induktion des oxidativen Bursts durch Phytol *in vitro* konnte bei neutrophilen Granulozyten gezeigt werden (Hultqvist, Olofsson et al. 2006). Diese Ergebnisse konnten mit Peritonealmakrophagen aus DA Ratten nicht reproduziert werden. Die geringere Burstkapazität besteht generell in Leukozyten von DA Ratten und nicht nur selektiv in neutrophilen Granulozyten. Auch der Signalweg für die Burst induzierende Wirkung von Phytol ist unklar.

#### 4.2.2 Bestimmung des oxidativen Bursts (Phagoburst Kit)

Der oxidative Burst aus Leukozyten ist ein elementarer Mechanismus zur Abwehr von pathogenen Keimen. Für dessen Quantifizierung können verschiedene Methoden verwendet werden. Klassische Methoden sind Luminolchemilumineszenz und die Reduktion von Ferricytochrom c. Eine weitere Möglichkeit bieten die durchflusszytometrischen Assays mit den Substraten Dihydrorhodamin 123 (DHR 123) oder Dichlorofluoresceindiazetat (DCFH-DA). DHR 123 hat von den genannten Methoden die höchste Sensitivität zur Quantifizierung der ROS Bildung und bietet gleichzeitig die Möglichkeit, einzelne Zellpopulationen im Durchflusszytometer zu analysieren (Smith and Weidemann 1993).

Aufgrund dessen wurde zur quantitativen Bestimmung des oxidativen Bursts in Leukozyten das Phagoburst Kit verwendet. Im klinischen Alltag findet dieser Test beispielsweise in der Diagnostik der chronischen Granulomatose Verwendung (siehe Anleitung Phagoburst Kit). Dabei handelt es sich um eine Erkrankung, die aufgrund verschiedener Genvarianten mit einer fehlenden oder deutlich verminderten NADPH-Oxidase Aktivität in neutrophilen Granulozyten

einhergeht. Symptome dieser Patienten sind wiederholte schwere Infektionskrankheiten, wie Abszesse oder Pneumonien. Der Phagoburst Test ist gut reproduzierbar und sowohl mit Vollblutproben als auch isolierten Zellen durchführbar (Kampen, Tollersrud et al. 2004). Zu beachten ist die Variabilität der Fluoreszenzintensität von Tag zu Tag, diese besteht jedoch auch bei DCFH-DA (Smith and Weidemann 1993; Kampen, Tollersrud et al. 2004). Der Phagoburst Test wurde verwendet um zu untersuchen, ob Monozyten/Makrophagen nach Stimulation mit CCL2 ROS produzieren. Als Hypothese wurde zu Beginn dieser Arbeit angenommen, dass ROS aus Monozyten/Makrophagen elementar für die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie sind. Möglicherweise ist die Menge freigesetzter ROS in der Entwicklung der Hyperalgesie beziehungsweise für interzelluläre Signalwege geringer, als beim oxidativen Burst zur mikrobiellen Abwehr. Die Analyse der stimulierten Proben erfolgte am Durchflusszytometer. Die Parameter des Durchflusszytometers wurden für jedes Experiment erneut gewählt. Zwischen den einzelnen Proben bestanden Schwankungen im basalen ROS Gehalt in den Kontrollproben der verschiedenen Spender beziehungsweise der Tiere. Die ermittelten Rohdaten wurden aufgrund dessen im Bezug zum Mittelwert der Gruppe normiert. Eine mögliche Limitation dieses Kits könnte die Identifizierung kleiner Unterschiede in der ROS Bildung sein. Bei den Erkrankungen, für die dieser Test entwickelt wurde, bestehen deutliche Einschränkungen in der Burstkapazität, daher ist eine Detektion geringer Schwankungen nicht erforderlich

#### *4.2.3 Bestimmung von Lipidperoxidationsprodukten (OxiSelect™ HNE-His Adduct ELISA Kit)*

Das ELISA Kit OxiSelect™ HNE-His Adduct ELISA Kit wurde für den Nachweis des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE (4-HNE-Addukten) im Pfortengewebe von Wistar und DA Ratten nach Chemokininjektion verwendet. Der Nachweis von Lipidperoxidationsprodukten ist ein indirekter Nachweis für die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale. Eine mögliche Fehlerquelle des verwendeten Assays ist die Interaktion der Proteinbindungsplatte mit Chemikalien, die zur Gewebearbeitung verwendet wurden. Während der Aufarbeitung des Pfortengewebes wurden keine Chemikalien verwendet, die nach Herstellerangaben mit der Pro-

teinbindungsplatte interagieren. Der Gehalt an 4-HNE war bereits in Kontrollpfoten von Wistar Ratten im Vergleich mit Kontrollpfoten von DA Ratten signifikant erhöht, obwohl Wistar Ratten an den Kontrollpfoten keine Hyperalgesie entwickelten. Die Injektion der isotonen Kochsalzlösung selbst, erscheint als Ursache unwahrscheinlich, da bei DA Ratten der Gehalt von 4-HNE in den Kontrollpfoten deutlich geringer war. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Untersuchung und der Vergleich des 4-HNE Gehalts in völlig unbehandelten Pfoten von Wistar und DA Ratten. Bereits in nicht entzündeten Pfoten bestand ein Unterschied im 4-HNE Gehalt zwischen Wistar und DA Ratten. Die geringe Steigerung der ROS Bildung durch CCL2 führte dazu, dass der Abbau durch die Enzyme Superoxiddismutase und Katalase nicht mehr ausreicht und Wistar Ratten folglich eine Hyperalgesie entwickeln.

Neben dem verwendeten ELISA gibt es weitere Methoden zum Nachweis von 4-HNE. Zur Bestimmung von freiem 4-HNE dient die Messung der Absorption bei 223 nm im Photometer. Der Nachweis von freiem 4-HNE ist nicht immer sinnvoll, da aufgrund der starken Reaktivität des Moleküls ein großer Teil an Proteine, DNA und Phospholipide (4-HNE Addukte) gebunden vorliegt. Für den Nachweis von 4-HNE Addukten existieren immunhistochemische Färbungen, spezifische ELISA und Westernblots. Eine Möglichkeit diese Addukte genauer zu untersuchen, bietet die Massenspektrometrie - ein aufwendiges Verfahren -, das gleichzeitig die Analyse der Proteine, an welche 4-HNE gebunden ist, ermöglicht (Spickett 2013).

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse**

#### *4.3.1 CCL2-induzierte Bildung reaktiver Sauerstoffradikale und Lipidperoxidationsprodukte*

In einer Metaanalyse verschiedener Schmerzmodelle wurden die Gene des Chemokins CCL2 und von Reg3b als wichtige pronozizeptive Faktoren identifiziert (LaCroix-Fralish, Austin et al. 2011). Postoperativ ist die Genexpression von IL-6, IL-8 und CCL2 gesteigert und korreliert 3 h postoperativ mit der Schmerzintensität der Patienten (Wang, Hamza et al. 2009). Bei *CCR2*<sup>-/-</sup> Mäusen ist die Hyperalgesie bei CFA-induzierter Entzündung geringer ausge-

prägt als bei Wildtypmäusen (Abbadie, Lindia et al. 2003). CCL2 und sein Rezeptor CCR2 spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung der inflammatorischen Hyperalgesie. I.pl. Injektion von CCL2 führt Leukozyten-abhängig in Wistar Ratten zur Entwicklung einer Hyperalgesie, nicht jedoch bei DA Ratten (Hackel, Pflucke et al. 2013).

Die Bedeutung von ROS für die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie wurde in dieser Arbeit untersucht. In humanen Monozyten konnte durch Stimulation mit CCL2 die Bildung von ROS nicht angeregt werden. Die verwendeten humanen Monozyten exprimieren CCR2. Möglicherweise ist die Differenzierung von im Blut zirkulierenden Monozyten zu Gewebemakrophagen ein wichtiger Faktor für die ROS Bildung. Um den Effekt von CCL2 auf differenzierte Makrophagen zu untersuchen, wurden die Stimulationsexperimente mit Peritonealmakrophagen aus Wistar Ratten wiederholt. *In vitro* bestand bei Wistar Ratten nach Stimulation von Peritonealmakrophagen mit CCL2 eine signifikant gesteigerte ROS Bildung. Die verwendeten Makrophagen exprimierten, wie auch humane Monozyten, CCR2. Die Bedeutung anderer molekularer Zielstrukturen, die Makrophagen nach Differenzierung exprimieren, und deren Interaktion mit CCR2 sind noch nicht bekannt. I.pl. Injektion von CCL2 führte in Wistar Ratten zur Entwicklung einer inflammatorischen, mechanischen Hyperalgesie. Zusätzlich war der Gehalt des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE in der Pfote nach i.pl. CCL2 Injektion bei Wistar Ratten signifikant erhöht.

DA Ratten entwickelten nach i.pl. Injektion von CCL2 keine mechanische Hyperalgesie. Auch die Stimulation von Peritonealmakrophagen aus DA Ratten mit CCL2 führte nicht zu einer Steigerung der ROS Bildung. Der Gehalt des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE blieb nach i.pl. CCL2 Injektion bei DA Ratten unverändert. Diese Ergebnisse bestätigen, dass reaktive Sauerstoffradikale und Lipidperoxidationsprodukte im Modell der CCL2-induzierten Hyperalgesie eine entscheidende Rolle spielen. Im Vergleich des intraplantaren Gehalts an 4-HNE von Wistar und DA Ratten zeigte sich, dass Wistar Ratten bereits in Kontrollpfoten einen erhöhten 4-HNE Gehalt besitzen.

Die Induktion des oxidativen Bursts in DA Ratten durch Behandlung der Tiere mit dem Burstinducer Phytol (Hultqvist, Olofsson et al. 2006) konnte weder in Stimulationsexperimenten mit Peritonealmakrophagen durch eine gesteigerte ROS Bildung, noch im Pfortengewebe durch einen Anstieg des Gehalts an 4-HNE nachvollzogen werden. In Verhaltensexperimenten entwickelten mit Phytol behandelte DA Ratten nach i.pl. CCL2 Injektion eine mechanische Hyperalgesie. Der Wirkmechanismus von Phytol ist unbekannt. Möglicherweise ist die Substanz Phytol selbst proalgetisch. Um dies zu untersuchen könnten die nozizeptiven Schwellen von DA Ratten, die nur mit Phytol behandelt wurden mit denen von unbehandelten DA Ratten verglichen werden.

Die Bedeutung einer Interaktion zwischen Makrophagen und neutrophilen Granulozyten konnte aufgrund methodischer Probleme weder im humanen Modell noch im Tiermodell zufrieden stellend untersucht werden.

#### *4.3.2 Bedeutung von reaktiven Sauerstoffradikalen und Lipidperoxidationsprodukten für die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie*

ROS aus ins Gewebe rekrutierten Makrophagen und 4-HNE vermittelten die CCL2-induzierte Hyperalgesie in Wistar Ratten. I.pl. Injektion von CFA führt bei Wistar und DA Ratten zur Entwicklung einer mechanischen und thermischen Hyperalgesie. DA Ratten hingegen entwickelten nach CCL2 Injektion keine Hyperalgesie.

DA Ratten besitzen eine verminderte oxidative Burstkapazität. Ursächlich hierfür ist ein Polymorphismus im Gen *Ncf1*. *Ncf1* kodiert die katalytische Untereinheit p47<sup>phox</sup> des für die ROS Bildung verantwortlichen Enzyms NADPH-Oxidase (Hultqvist, Olofsson et al. 2006). Gleichzeitig besteht bei DA Ratten eine gesteigerte T-Zellaktivität, da ihre Makrophagen aufgrund des Polymorphismus weniger ROS bilden und folglich deren hemmende Wirkung auf T-Zellen vermindert ist (Gelderman, Hultqvist et al. 2007). Möglicherweise spielt der basale Gehalt an Lipidperoxidationsprodukten in den Pfoten der Ratten auch bei der Empfindlichkeit der Tiere bei der akuten Nozizeption eine Rolle.

DA Ratten entwickeln nach Schädigung des N. ischiadicus in einem geringeren Ausmaß Schmerz-assoziierte Verhaltensweisen und eine geringere intraneuronale Schädigung als andere Rattenstämme. DA Ratten haben jedoch keinen

generellen Defekt der Nozizeptorfunktion beziehungsweise der akuten Schmerzwahrnehmung. Im Vergleich zu Wistar Ratten reagieren DA Ratten auf mechanische und thermische Stimuli weniger empfindlich (Xu, Plesan et al. 2001; Hackel, Pflucke et al. 2013). In den von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Verhaltensexperimenten konnte dies jedoch nicht bestätigt werden. Die basalen nozizeptiven Schwellen unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Rattenstämmen nicht (Hackel, Pflucke et al. 2013).

DA Ratten haben vermutlich nur in den Schmerzmodellen ein Defizit, welche von ROS Bildung abhängig sind. Die Bedeutung von ROS für die Entwicklung neuropathischer und inflammatorischer Schmerzen wird von den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen unterstützt (Wang, Porreca et al. 2004; Khattab 2006; Ibi, Matsuno et al. 2008; Keeble, Bodkin et al. 2009; Schwartz, Kim et al. 2009).

Eine mögliche molekulare Zielstruktur für ROS zur Vermittlung der inflammatorischen Hyperalgesie ist der TRPA1 Kanal. ROS führen im Gewebe zur Bildung von Lipidperoxidationsprodukten wie 4-HNE. I.pl. Injektion von 4-HNE in Hinterpfoten von Wistar Ratten führt dosisabhängig zur Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie. Dieser Effekt ist durch TRPA1 Antagonisten aufhebbar (Trevisani, Siemens et al. 2007). TRPA1 Knockout Mäuse entwickeln nach i.pl. Injektion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Gegensatz zu Wildtypmäusen keine thermische Hyperalgesie (Trevisani, Siemens et al. 2007; Andersson, Gentry et al. 2008). Andere Arbeitsgruppen postulieren eine Bedeutung des TRPV1 Kanals als molekulare Zielstruktur für ROS (Keeble, Bodkin et al. 2009). TRPV1 und TRPA1 Antagonisten verhindern in von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Verhaltensexperimenten ebenfalls die CCL2-induzierten Hyperalgesie (Pflucke, Hackel et al. 2013).

Die Bedeutung von ROS für die Entwicklung der inflammatorischen Hyperalgesie wird durch analgetische Effekte von Antioxidanzien, beispielsweise ROS abbauenden Enzymen oder Vitaminen, deutlich. Antioxidanzien reduzieren die Ausprägung der Hyperalgesie. Die Verhaltensexperimente unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass Applikation der Enzyme SOD und Katalase oder des Superoxiddismutasemimetikums TEMPOL die Entwicklung der CCL2-



abhängigen Hyperalgesie verhindert. I.pl. Carrageen Injektion führt in der Pfote von Mäusen zu einem erhöhten Gehalt an  $H_2O_2$  und zur Entwicklung einer Hyperalgesie. Durch Koinjektion mit den Enzymen Superoxiddismutase oder Katalase wird die Ausprägung der Hyperalgesie vermindert (Keeble, Bodkin et al. 2009).

TEMPO und das Enzym SOD reduzieren das Pfotenödem und die Hyperalgesie nach Carrageen-induzierter Entzündung bei Wistar Ratten deutlich (Khattab 2006). Die Vitamine C und E sind natürliche Radikalfänger. Die Kombination der Vitamine C und E bewirkt analgetische Effekte, sowohl bei inflammatorischen Schmerzen nach Formalin Injektion, als auch bei neuropathischen Schmerzen nach peripherer Nervenschädigung, jedoch nicht nach Injektion von CFA (Lu, Kallenborn-Gerhardt et al. 2011).

Das Enzym COX-2 ist während Entzündungsprozessen verantwortlich für die Synthese von Prostaglandinen. Prostaglandin E2 und Prostaglandin I2 bewirken durch Aktivierung ihrer Rezeptoren EP1 und EP4 eine Sensitivierung von TRPV1 (Moriyama, Higashi et al. 2005). *In vivo* ist im Pfortengewebe von Wistar Ratten nach i.pl. CCL2 Injektion die Expression der COX-2 mRNA gesteigert. Außerdem ist in den Pfoten eine gesteigerte Immunoreaktivität von 4-HNE und COX-2 nachweisbar, die mit infiltrierenden ED1<sup>+</sup> Makrophagen kolokalisiert ist. Die meisten 4-HNE positiven Zellen exprimieren auch COX-2. In Pfoten von Leukozyten-depletierten Wistar Ratten ist die Immunoreaktivität für 4-HNE und COX-2 nach i.pl. CCL2 unverändert. Systemische Therapie mit dem COX-2 Inhibitor Parecoxib verhindert die mechanische und thermische Hyperalgesie nach CCL2 Injektion. Auch durch lokale Therapie mit Parecoxib kann die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie verhindert werden. Folglich handelt es sich um einen peripheren Effekt von COX-2. COX-2 spielt zusammen mit ROS eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der CCL2-induzierten Hyperalgesie (Pflucke, Hackel et al. 2013).

Auch andere Arbeitsgruppen zeigen einen Zusammenhang zwischen COX-2 und 4-HNE. COX-2 und 4-HNE sind gemeinsam in Schaumzellen (Makrophagen) in artherosklerotischen Läsionen lokalisiert. 4-HNE induziert als ein-

ziges Lipidperoxidationsprodukt in RAW264.7 Makrophagen die Expression von COX-2 (Kumagai, Matsukawa et al. 2004).

#### 4.3.3 Leukozyten und Hyperalgesie

Die CCL2-induzierte Hyperalgesie ist Leukozyten-abhängig. Durch Cyclophosphamid Leukozyten-depletierte Wistar Ratten entwickeln nach CCL2 Injektion keine Hyperalgesie. Dadurch konnte in unserem Modell ein direkter Effekt von CCL2 am Nozizeptor ausgeschlossen werden. Andere Arbeitsgruppen wie beispielsweise Belkouch et al. beschreiben einen direkten erregenden Effekt des Chemokins CCL2 durch Interaktion von CCR2 mit dem Natriumkanal Nav1.8 auf kleinen primär sensorischen Neuronen (C-Fasern) (Belkouch, Dansereau et al. 2011). Die Arbeitsgruppe Cunha et al. zeigt, dass neutrophile Granulozyten entscheidend für die Entwicklung der mechanischen, Carrageen-induzierten Hyperalgesie sind. Eine Behandlung der Versuchstiere mit Fucoidin, einem Leukozytenadhäsionsinhibitor, verhindert dosisabhängig die Entwicklung der Carrageen-induzierten Hyperalgesie (Cunha, Verri et al. 2008).

In unseren Verhaltensexperimenten hingegen führt die alleinige Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe nicht zur Entwicklung einer Hyperalgesie (Rittner, Mousa et al. 2006). Aufgrund dessen untersuchten wir die Bedeutung von Makrophagen für die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie. Leukozyten-depletierten Wistar Ratten wurden Peritonealmakrophagen aus Wistar Ratten in die Pfote injiziert, woraufhin sie nach CCL2 Injektion erneut eine Hyperalgesie entwickelten. Auch DA Ratten wurden Peritonealmakrophagen aus Wistar Ratten injiziert und entwickelten daraufhin ebenfalls nach CCL2 Injektion eine Hyperalgesie. Die Rekonstitution von Leukozyten-depletierten Wistar beziehungsweise DA Ratten mit Peritonealmakrophagen aus DA Ratten hatte hingegen keinen proalgetischen Effekt. Außerdem war der Leukozytengehalt in der Pfote von DA Ratten nach CCL2 Injektion im Vergleich zu Wistar Ratten vermindert. *In vitro* konnte ein Migrationsdefekt von Makrophagen aus DA Ratten nachgewiesen werden. Ursächlich für die fehlende Entwicklung einer Hyperalgesie nach i.pl. CCL2 Injektion bei DA Ratten sind folglich die verminderte oxidative Burstkapazität in Makrophagen und ein Migrationsdefekt der Makrophagen (Hackel, Pflucke et al. 2013).

Die CCL2-induzierte Hyperalgesie beruht auf der Bildung von ROS aus Makrophagen. Über die Bedeutung einer Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen für die Entwicklung einer inflammatorischen Hyperalgesie können noch keine Aussagen getroffen werden. Das Chemokin CCL2 wird während Entzündungsprozessen freigesetzt. ROS spielen bei der Entstehung der inflammatorischen Hyperalgesie eine wichtige Rolle, sowie eine elementare Rolle für Zellmigration und die gerichtete Chemotaxis von Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Die Arbeitsgruppe Heo et al. zeigt die Bedeutung von ROS für die Expression der Chemokinrezeptoren 1 und 2, die Produktion proinflammatorischer Zytokine und Zellmigration (Heo, Yun et al. 2008). Oxidativer Stress erhöht demnach die transendotheliale Migration von Monozyten ähnlichen HL-60 Zellen. Dieser Effekt kann durch Antioxidanzien und Proteinkinase C Inhibitoren aufgehoben werden (Rattan, Shen et al. 1997). Die Chemokin abhängige Migration von neutrophilen Granulozyten ist abhängig von ROS Bildung durch die in Phagozyten exprimierte NADPH-Oxidase (Nox2). Radikalfänger und die Hemmung von Nox2 dämpfen die gerichtete Migration von neutrophilen Granulozyten (Kuiper, Sun et al. 2011).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass nach i.pl. Injektion des Chemokins CCL2 der Gehalt des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE in der Pfote von Wistar Ratten signifikant gesteigert war. Bei DA Ratten war dies nicht der Fall. Ursächlich hierfür ist zum einen der Migrationsdefekt der Makrophagen in DA Ratten und zum anderen die geringere Burstkapazität der Makrophagen selbst. DA Ratten entwickeln nach Vorbehandlung mit dem Burstinducer Phytol eine geringer ausgeprägte Arthritis als unbehandelte DA Ratten. *In vivo* ist die Bildung von ROS bzw. der oxidative Burst in neutrophilen Granulozyten aus mit Phytol behandelten DA Ratten nach Stimulation mit PMA gesteigert (Hultqvist, Olofsson et al. 2006). Nach Behandlung mit dem Burstinducer Phytol entwickeln DA Ratten im Gegensatz zu unbehandelten DA Ratten eine CCL2-abhängige Hyperalgesie (Hackel, Pflucke et al. 2013). Bei mit Phytol behandelten DA Ratten wurde entgegen der Erwartungen kein gesteigerter 4-HNE Gehalt in der Pfote nach CCL2 Injektion nachgewiesen. Der Burst induzierende Effekt von Phytol konnte in

Makrophagen ebenfalls nicht reproduziert werden. Die Wirkungsweise von Phytol ist unklar. Es ist nicht auszuschließen, dass Phytol selbst proalgetisch wirkt.

#### *4.3.4 Klinische Relevanz*

Möglicherweise ist die Anwendung von Antioxidanzien, wie beispielsweise die Vitamine C und E oder das Enzym SOD, ein neuer Ansatz zur Therapie des Entzündungsschmerzes. Auch über die potentiell analgetischen Effekte einer Blockade des Rezeptors CCR2 kann spekuliert werden. Problematisch könnten unerwünschte immunsuppressive Effekte sein, die mit dem analgetischen Effekt einhergehen.

Im Mausmodell haben die Antioxidanzien Vitamin C und Vitamin E antinozizeptive Effekte bei inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen. Die systemische Verabreichung einer Kombination der Vitamine C und E hemmt die frühen Schmerz assoziierten Verhaltensweisen nach Formalin Injektion und die neuropathischen Schmerzen nach peripherer Nervenschädigung. Im Modell des Entzündungsschmerzes durch CFA konnte kein analgetischer Effekt nach systemischer Gabe der Vitamine C und E nachgewiesen werden. Diese Erkenntnisse unterstreichen die Bedeutung von ROS für bestimmte Schmerzzustände (Lu, Kallenborn-Gerhardt et al. 2011).

Klinisch relevant könnten die Erkenntnisse über die Bedeutung von ROS in der Pathophysiologie von inflammatorischen Schmerzen auch für die Pathophysiologie des komplexen regionalen Schmerzsyndroms I (CRPS I, complex regional pain syndrome) sein. Das CRPS I wird auch als Morbus Sudeck bezeichnet und kann sich beispielsweise nach Verletzungen oder Operationen entwickeln. Klinisch besteht eine Trias aus motorischer, sensorischer und autonomer Störung. Die Erkrankung verläuft klassischerweise in drei Stadien. Im ersten Stadium besteht eine schmerzhafte Funktionseinschränkung, im zweiten Stadium eine Dystrophie, die durch Funktionseinschränkungen aufgrund morphologischer Veränderungen bedingt ist und im dritten Stadium eine Atrophie mit starker Funktionseinschränkung der betroffenen Extremität bis hin zum Funktionsverlust (Müller, M, Chirurgie für Studium und Praxis 2010/2011, S. 344 – 345, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach). Die Pathophysiologie, die zur Entwicklung dieses Krankheitsbildes führt, ist bisher unbe-

kannt. Die Arbeitsgruppe Tan et al. konnte zeigen, dass bei Patienten mit CRPS I eine signifikante Akkumulation von Leukozyten in der betroffenen Extremität besteht. Aufgrund dessen wird eine Beteiligung von Leukozyten in der Pathophysiologie des CRPS I vermutet (Tan, Oyen et al. 2005).

In einer Metaanalyse wurde der Zusammenhang des CRPS mit dem inflammatorischen Profil der Patienten untersucht. Das CRPS ist assoziiert mit der Expression proinflammatorischer Mediatoren im Blut. Das Expressionsprofil der proinflammatorischen Mediatoren unterscheidet sich beim akuten und beim chronischen CRPS. Im akuten CRPS sind die Konzentrationen von IL-8 und dem löslichen TNF Rezeptor I und II (sTNF-RI & II) im Blut signifikant erhöht. Beim chronischen CRPS sind beispielsweise TNF $\alpha$ , IL-2 und CCL2 signifikant erhöht (Parkitny, McAuley et al. 2013).

In der klinischen Therapie hat sich gezeigt, dass Radikalfänger die Symptomatik des CRPS I reduzieren können. Die Wirksamkeit von Radikalfängern in der Therapie lässt vermuten, dass ROS in der Pathophysiologie des CRPS I ebenfalls eine Rolle spielen. Beispielsweise ist die Konzentration des Lipidperoxidationsprodukts Malondialdehyd im Serum von CRPS I Patienten signifikant erhöht verglichen mit gesunden Probanden. Auch die Aktivität der Enzyme Peroxidase und SOD ist im Speichel von CRPS I Patienten erhöht (Eisenberg, Shtahl et al. 2008).

In der Zusammenschau unserer Daten mit denen anderer Arbeitsgruppen wird die Bedeutung von ROS und 4-HNE für die Entwicklung der inflammatorischen Hyperalgesie deutlich. Die CCL2-induzierte Hyperalgesie wird durch ROS und 4-HNE vermittelt. Radikalfänger entwickeln analgetische Effekte im entzündeten Gewebe. Sie stellen möglicherweise einen neuen therapeutischen Ansatz für die Therapie inflammatorischer Schmerzen dar.

## 5. Zusammenfassung

Ein Hauptsymptom der Entzündung sind Schmerzen. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung reaktiver Sauerstoffradikale (ROS) aus Monozyten/Makrophagen für die Entwicklung der inflammatorischen Hyperalgesie untersucht.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe Rittner wurde in Verhaltensexperimenten mit Wistar Ratten gezeigt, dass die alleinige Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten ins Gewebe durch CXCL2/3 nicht zur Entwicklung einer inflammatorischen Hyperalgesie führt. Des Weiteren wurde gezeigt, dass i.pl. CCL2 Injektion zu einer inflammatorischen Hyperalgesie führt. Dark Agouti Ratten (DA) entwickeln nach i.pl. CCL2 Injektion keine inflammatorische Hyperalgesie. Die CCL2-induzierte Hyperalgesie in Wistar Ratten kann durch Applikation von ROS abbauenden Enzymen (Superoxiddismutase (SOD) und Katalase) oder Chemikalien (TEMPOL) verhindert werden. *In vitro* führte die Stimulation von Peritonealmakrophagen aus Wistar Ratten mit CCL2 zu einer signifikanten Steigerung der ROS Bildung. In Peritonealmakrophagen aus DA Ratten, bei denen ein Defekt in der p47<sup>phox</sup> Untereinheit der NADPH-Oxidase bekannt ist, war dies nicht der Fall. In entzündetem Gewebe bilden Leukozyten verschiedene Chemokine, die weitere Leukozyten ins Gewebe rekrutierten. CCL2 wirkt chemotaktisch auf Makrophagen und stimuliert die Bildung und Freisetzung von ROS im Gewebe. ROS konnten als wichtige proalgetische Mediatoren für die Entwicklung der CCL2-induzierten Hyperalgesie identifiziert werden. ROS sind chemisch sehr reaktiv und führen im Gewebe zur Bildung von Lipidperoxidationsprodukten (4-HNE). I.pl. CCL2 Injektion führte bei Wistar Ratten zur Bildung von 4-HNE im Pfotengewebe, nicht jedoch bei DA Ratten. Gemeinsame molekulare Zielstrukturen für ROS und 4-HNE sind die Kanäle TRPV1 und TRPA1. Durch deren Sensitivierung entsteht die CCL2-induzierte, inflammatorische Hyperalgesie. Der Einfluss einer Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und Makrophagen auf die Entstehung der CCL2-induzierten Hyperalgesie konnte aufgrund von Limitationen in der Methode nicht geklärt werden. ROS sind eine mögliche Zielstruktur für die Entwicklung neuer Medikamente in der Therapie des Entzündungsschmerzes.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abbadie, C., J. A. Lindia, et al. (2003). "Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(13): 7947-7952.
- Ahuja, V., S. E. Miller, et al. (1995). "Identification of two subpopulations of rat monocytes expressing disparate molecular forms and quantities of CD43." Cellular immunology **163**(1): 59-69.
- Alvarez, E., J. Leiro, et al. (2002). "Effect of (-)-epigallocatechin-3-gallate on respiratory burst of rat macrophages." International immunopharmacology **2**(6): 849-855.
- Andersson, D. A., C. Gentry, et al. (2008). "Transient receptor potential A1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **28**(10): 2485-2494.
- Babior, B. M. (1999). "NADPH oxidase: an update." Blood **93**(5): 1464-1476.
- Baker, G. L., R. J. Corry, et al. (1985). "Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. Protective effect of superoxide dismutase." Ann Surg **202**(5): 628-641.
- Belkouch, M., M. A. Dansereau, et al. (2011). "The chemokine CCL2 increases Nav1.8 sodium channel activity in primary sensory neurons through a Gbetagamma-dependent mechanism." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **31**(50): 18381-18390.
- Brack, A., D. Labuz, et al. (2004). "Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception." Anesthesiology **101**(1): 204-211.
- Catala, A. (2009). "Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions." Chemistry and physics of lipids **157**(1): 1-11.
- Cunha, T. M., W. A. Verri, Jr., et al. (2008). "Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception." J Leukoc Biol **83**(4): 824-832.
- Dale, D. C., L. Boxer, et al. (2008). "The phagocytes: neutrophils and monocytes." Blood **112**(4): 935-945.
- de Oliveira-Junior, E. B., J. Bustamante, et al. (2011). "The human NADPH oxidase: primary and secondary defects impairing the respiratory burst function and the microbicidal ability of phagocytes." Scand J Immunol **73**(5): 420-427.
- Deshmane, S. L., S. Kremlev, et al. (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-326.
- Dijkstra, C. D., E. A. Dopp, et al. (1985). "The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3." Immunology **54**(3): 589-599.

- Djaldetti, M., H. Salman, et al. (2002). "Phagocytosis--the mighty weapon of the silent warriors." Microsc Res Tech **57**(6): 421-431.
- Eisenberg, E., S. Shtahl, et al. (2008). "Serum and salivary oxidative analysis in Complex Regional Pain Syndrome." Pain **138**(1): 226-232.
- Forman, H. J., J. M. Fukuto, et al. (2008). "The chemistry of cell signaling by reactive oxygen and nitrogen species and 4-hydroxynonenal." Archives of biochemistry and biophysics **477**(2): 183-195.
- Forman, H. J. and M. Torres (2001). "Signaling by the respiratory burst in macrophages." IUBMB life **51**(6): 365-371.
- Gelderman, K. A., M. Hultqvist, et al. (2007). "Macrophages suppress T cell responses and arthritis development in mice by producing reactive oxygen species." J Clin Invest **117**(10): 3020-3028.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-964.
- Hackel, D., D. Pflucke, et al. (2013). "The connection of monocytes and reactive oxygen species in pain." PloS one **8**(5): e63564.
- Heo, S. K., H. J. Yun, et al. (2008). "NADPH oxidase activation is required for migration by LIGHT in human monocytes." Biochem Biophys Res Commun **371**(4): 834-840.
- Hultqvist, M., P. Olofsson, et al. (2006). "A new arthritis therapy with oxidative burst inducers." PLoS medicine **3**(9): e348.
- Ibi, M., K. Matsuno, et al. (2008). "Reactive oxygen species derived from NOX1/NADPH oxidase enhance inflammatory pain." The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **28**(38): 9486-9494.
- Jung, H., P. T. Toth, et al. (2008). "Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons." J Neurochem **104**(1): 254-263.
- Kampen, A. H., T. Tollersrud, et al. (2004). "Repeatability of flow cytometric and classical measurement of phagocytosis and respiratory burst in bovine polymorphonuclear leukocytes." Vet Immunol Immunopathol **97**(1-2): 105-114.
- Keeble, J. E., J. V. Bodkin, et al. (2009). "Hydrogen peroxide is a novel mediator of inflammatory hyperalgesia, acting via transient receptor potential vanilloid 1-dependent and independent mechanisms." Pain **141**(1-2): 135-142.
- Khattab, M. M. (2006). "TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: a key role for superoxide anion." Eur J Pharmacol **548**(1-3): 167-173.
- Kuiper, J. W., C. Sun, et al. (2011). "Rac regulates PtdInsP(3) signaling and the chemotactic compass through a redox-mediated feedback loop." Blood **118**(23): 6164-6171.
- Kumagai, T., N. Matsukawa, et al. (2004). "A lipid peroxidation-derived inflammatory mediator: identification of 4-hydroxy-2-nonenal as a potential inducer of cyclooxygenase-2 in macrophages." The Journal of biological chemistry **279**(46): 48389-48396.



- LaCroix-Fralish, M. L., J. S. Austin, et al. (2011). "Patterns of pain: meta-analysis of microarray studies of pain." Pain **152**(8): 1888-1898.
- Lu, R., W. Kallenborn-Gerhardt, et al. (2011). "Additive antinociceptive effects of a combination of vitamin C and vitamin E after peripheral nerve injury." PloS one **6**(12): e29240.
- Marchand, F., M. Perretti, et al. (2005). "Role of the immune system in chronic pain." Nature reviews. Neuroscience **6**(7): 521-532.
- Moriyama, T., T. Higashi, et al. (2005). "Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins." Molecular pain **1**: 3.
- Palframan, R. T., S. Jung, et al. (2001). "Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues." The Journal of experimental medicine **194**(9): 1361-1373.
- Parkitny, L., J. H. McAuley, et al. (2013). "Inflammation in complex regional pain syndrome: a systematic review and meta-analysis." Neurology **80**(1): 106-117.
- Pflucke, D., D. Hackel, et al. (2013). "The Molecular Link Between C-C-Chemokine Ligand 2-Induced Leukocyte Recruitment and Hyperalgesia." J Pain.
- Pospisil, P. (2012). "Molecular mechanisms of production and scavenging of reactive oxygen species by photosystem II." Biochim Biophys Acta **1817**(1): 218-231.
- Rattan, V., Y. Shen, et al. (1997). "Diabetic RBC-induced oxidant stress leads to transendothelial migration of monocyte-like HL-60 cells." Am J Physiol **273**(2 Pt 1): E369-375.
- Riahi, Y., G. Cohen, et al. (2010). "Signaling and cytotoxic functions of 4-hydroxyalkenals." American journal of physiology. Endocrinology and metabolism **299**(6): E879-886.
- Ribeiro, R. A., M. L. Vale, et al. (2000). "Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice." Eur J Pharmacol **387**(1): 111-118.
- Rittner, H. L., A. Brack, et al. (2001). "Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain." Anesthesiology **95**(2): 500-508.
- Rittner, H. L., D. Hackel, et al. (2009a). "Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils." PLoS Pathog **5**(4): e1000362.
- Rittner, H. L., D. Labuz, et al. (2006). "Pain control by CXCR2 ligands through Ca<sup>2+</sup>-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells." FASEB J **20**(14): 2627-2629.
- Rittner, H. L., H. Machelska, et al. (2005). "Leukocytes in the regulation of pain and analgesia." J Leukoc Biol **78**(6): 1215-1222.
- Rittner, H. L., S. A. Mousa, et al. (2006). "Selective local PMN recruitment by CXCL1 or CXCL2/3 injection does not cause inflammatory pain." J Leukoc Biol **79**(5): 1022-1032.
- Schwartz, E. S., H. Y. Kim, et al. (2009). "Persistent pain is dependent on spinal mitochondrial antioxidant levels." J Neurosci **29**(1): 159-168.

- Smith, J. A. and M. J. Weidemann (1993). "Further characterization of the neutrophil oxidative burst by flow cytometry." J Immunol Methods **162**(2): 261-268.
- Sommer, C. and M. Kress (2004). "Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia." Neuroscience letters **361**(1-3): 184-187.
- Spickett, C. M. (2013). "The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal: Advances in chemistry and analysis." Redox Biol **1**(1): 145-152.
- Stein, C., A. H. Hassan, et al. (1990). "Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5935-5939.
- Tan, E. C., W. J. Oyen, et al. (2005). "Leukocytes in Complex Regional Pain Syndrome type I." Inflammation **29**(4-6): 182-186.
- Trevisani, M., J. Siemens, et al. (2007). "4-Hydroxynonenal, an endogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(33): 13519-13524.
- Vingsbo, C., P. Sahlstrand, et al. (1996). "Pristane-induced arthritis in rats: a new model for rheumatoid arthritis with a chronic disease course influenced by both major histocompatibility complex and non-major histocompatibility complex genes." The American journal of pathology **149**(5): 1675-1683.
- Wang, X. M., M. Hamza, et al. (2009). "Upregulation of IL-6, IL-8 and CCL2 gene expression after acute inflammation: Correlation to clinical pain." Pain **142**(3): 275-283.
- Wang, Z. Q., F. Porreca, et al. (2004). "A newly identified role for superoxide in inflammatory pain." J Pharmacol Exp Ther **309**(3): 869-878.
- Weber, C., K. U. Belge, et al. (2000). "Differential chemokine receptor expression and function in human monocyte subpopulations." J Leukoc Biol **67**(5): 699-704.
- Westlund, K. N., M. Y. Kochukov, et al. (2010). "Impact of central and peripheral TRPV1 and ROS levels on proinflammatory mediators and nociceptive behavior." Molecular pain **6**: 46.
- White, F. A., J. Sun, et al. (2005). "Excitatory monocyte chemoattractant protein-1 signaling is up-regulated in sensory neurons after chronic compression of the dorsal root ganglion." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 14092-14097.
- White, F. A. and N. M. Wilson (2008). "Chemokines as pain mediators and modulators." Current opinion in anaesthesiology **21**(5): 580-585.
- Wilcox, C. S. (2010). "Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress." Pharmacology & therapeutics **126**(2): 119-145.
- Woolf, C. J. (2010). "What is this thing called pain?" J Clin Invest **120**(11): 3742-3744.
- Xu, X. J., A. Plesan, et al. (2001). "Possible impact of genetic differences on the development of neuropathic pain-like behaviors after unilateral sciatic nerve ischemic injury in rats." Pain **89**(2-3): 135-145.

Yao, F., Y. Guo, et al. (2008). "Mechanical hyperalgesia is attenuated by local administration of octreotide in pristane-induced arthritis in Dark-Agouti rats." Life sciences **83**(21-22): 732-738.

Yrlid, U., C. D. Jenkins, et al. (2006). "Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions." J Immunol **176**(7): 4155-4162.

Websites und Bücher:

<http://www.iasp-pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions/default.htm> 1.10.2012

Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G.: Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, 2007 , pp 27 – 70, Basel

Müller, M, Chirurgie für Studium und Praxis 2010/2011, S. 344 – 345, Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach

## **7. Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1: CCL2-induzierte Hyperalgesie in Wistar Ratten.....	14
Abbildung 2: CCL2-induzierte Hyperalgesie ist Leukozyten-abhängig.....	15
Abbildung 3: Antioxidanzien verhindern die Entwicklung einer CCL2-induzierten Hyperalgesie .....	16
Abbildung 4: DA Ratten entwickeln keine CCL2-abhängige Hyperalgesie.....	17
Abbildung 5: CCR2 Expression auf Makrophagen aus Wistar Ratten.....	17
Abbildung 6: Arbeitshypothese.....	18
Abbildung 7: Leukozytenpopulationen in Thrombozytenapheresefiltern.....	33
Abbildung 8: Reinheit humaner Monozyten nach CD14 MACS Separation.....	34
Abbildung 9: Expression des Chemokinrezeptors CCR2 auf humanen Monozyten.....	35
Abbildung 10: CCL2 steigert nicht die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in humanen Monozyten .....	36
Abbildung 11: CCL2 steigert nicht die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Kokultur humaner Monozyten mit neutrophilen Granulozyten .....	37
Abbildung 12: CCL2 steigert die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Makrophagen aus Wistar Ratten, nicht jedoch in Makrophagen aus DA Ratten.....	38
Abbildung 13: CCL2 steigert nicht die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Kokultur von Makrophagen mit neutrophilen Granulozyten aus Wistar Ratten.....	39
Abbildung 14: CCL2 steigert nicht die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale in Makrophagen aus Phytol behandelten DA Ratten.....	40

Abbildung 15: Bildung des Lipidperoxidationsproduktes 4-HNE nach CCL2 Injektion in Wistar, DA und Phytol behandelten DA Ratten.....	42
Abbildung 16: Mechanismus der CCL2-induzierten Hyperalgesie.....	43

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Chemikalien.....	28
Tabelle 2: Verwendete Antikörper .....	29
Tabelle 3: Verwendete Lösungen und Puffer .....	30
Tabelle 4: Verwendete Kits.....	30
Tabelle 5: Geräte.....	31
Tabelle 6: Sonstige Materialien .....	31
Tabelle 7: Software .....	31

## 9. Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
ANOVA	Analysis of variance
BCA	bicinchoninic acid
BSA	bovine serum albumin
C	Celsius
CCL2 (= MCP-1)	chemokine (C-C motif) ligand 2; monocyte chemotactic protein-1
CCR2	Rezeptor des Chemokins CCL2
CCR5	Rezeptor des Chemokins CCL5 und anderer Chemokine
CD	cluster of differentiation
CFA	Komplettes Freund's Adjuvans
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CRPS	complex regional pain syndrome
COX-2	Cyclooxygenase 2
CXCL1	chemokine (C-X-C motif) ligand 1
CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2
CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3

DA	Dark Agouti
DCFH-DA	Dichlorofluoresceindiazetat
DHR 123	Dihydrorhodamin 123
DRG	Dorsal root ganglion, Hinterwurzelganglion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay; Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
FACS	Fluorescence activated cell sorting; Durchflussszytometrie
FALDH	Fatty aldehyde dehydrogenase
FCS	Fetal calf serum, fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinithiocyanat
FSC	forward scatter; Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBSS	Hanks balanced sodium solution
4-HHE	4-Hydroxyhexenal
4-HNE	4-Hydroxynonenal
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HRP	horseradish peroxidase; Meerrettichperoxidase
IASP	International Association for the study of pain
IL	Interleukin
i.pl.	intraplantar
l	Liter
LPS	Lipopolysaccharid

M	molar
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
µg	Microgramm
µl	Microliter
MDA	Malondialdehyd
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure (Boten-RNA)
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Reduzierte Form von Nicotinamidadenin- dinukleotidphosphat
Ncf1	Neutrophil cytosolic factor 1
NGF	Nerve growth factor
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OH <sup>-</sup>	Hydroxylradikal
PBS	phosphat buffered saline
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	pH-Wert
PIA	Pristan induzierte Arthritis
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMN	polymorphonuclear neutrophils, neutrophile Granulozyten
PPT	Paw pressure threshold, Pfortendruckschwelle
PWL	Paw withdrawl latency, Pfortenrückzuglatenz

R 123	Rhodamin 123
RM	Repeated measurements
ROS	Reaktive Sauerstoffradikale
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler des Mittelwerts
SOD	Superoxiddismutase
SSC	side scatter; Seitwärtstreulicht
T61	Kombipräparat aus Embutramid, Mebenzoni- um und Tetracain
TEMPOL	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine-N- oxyl
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor $\alpha$
TRPA1	transient receptor potential ankyrin 1
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1

## **10. Anhang**

### ***10.1 Danksagung***

Ganz herzlich möchte ich mich bei PD Dr. Heike Rittner für das Thema dieser Arbeit, die außerordentliche Betreuung und Hilfe bedanken.

Ich möchte mich außerdem bei Prof. Dr. Alexander Brack, Dr. Dagmar Hackel und Diana Pflücke für die Unterstützung bedanken. Mein Dank gilt darüber hinaus dem gesamten Team der Arbeitsgruppe Molekulare Schmerzforschung der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie am Universitätsklinikum Würzburg.

Ebenso möchte ich mich bei Anna Partheil, Alexander Böcker, Johannes Viebahn und Henrike Sahlbach für die schöne Zusammenarbeit bedanken.

Abschließend gilt meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Großeltern, meiner Familie und meinen Freunden besonderer Dank für die ihre Unterstützung und Motivation.



## 10.2 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 22.06.1986

Geburtsort: Reutlingen

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Berufliche Tätigkeit

Seit 11/2013            Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

---

### Hochschulstudium

6/2013                Staatsexamen  
8/2008                Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
4/2007                Studium Humanmedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
10/2005 – 02/2007   Studium Biomedizin an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

---

### Promotion

2012                 Promotionsstipendium der med. Fakultät der Universität Würzburg  
Seit 10/2009        Experimentelle Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg bei PD Dr. med. Heike Rittner

---

### Schulausbildung

1996 – 2005        Bildungszentrum Nord Gymnasium, Reutlingen,  
1992 - 1996        Grundschule in Pliezhausen Rübgarten

---

### Publikationen

Hackel, D., Pflücke, D., Neumann, A., Viebahn, J., Mousa, S., Wischmeyer, E., Roewer, N., Brack, A., and Rittner, H.L. (2013).

*The connection of monocytes and reactive oxygen species in pain.* PLoS One 8, e63564.

Pflücke, D., Hackel, D., Mousa, S.A., Partheil, A., Neumann, A., Brack, A., and Rittner, H.L. (2013).

*The Molecular Link Between C-C-Chemokine Ligand 2-Induced Leukocyte Recruitment and Hyperalgesia.* The journal of pain: official journal of the American Pain Society

Abstractpräsentation 26. Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI (10.- 11.2.2012):

Neumann, A., Hackel, D., Pflücke, D., Roewer, N., Brack, A., Rittner, H. (2012)

*Reaktive Sauerstoffradikale in der Schmerzentsstehung bei Ratten.* A & I, Anästhesiologie und Intensivmedizin, Juli/August 2012, S.402

---