

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Jens Volkmann

**CHARAKTERISIERUNG VON IL-4 KNOCKOUT-MÄUSEN UND
IHRER ZYTOKIN- UND OPIOIDREZEPTOR-EXPRESSION IM
PERIPHEREN UND ZENTRALEN NERVENSYSTEM**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von

Tengü Topuzoğlu
aus Würzburg

Würzburg, Dezember 2011

Referentin: Professor Dr. med. Claudia Sommer
Koreferent: Professor Dr. med. Andreas Reif
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20.07.2012

Die Promovendin ist Ärztin.

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Der Neuropathische Schmerz.....	1
1.1.1 Charakteristik des neuropathischen Schmerzes und Unterschiede zum nozizeptiven Schmerz	1
1.1.2 Pathophysiologische Mechanismen und Einflussfaktoren bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen	2
1.2 Pathophysiologische Rolle von Zytokinen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen.....	5
1.2.1 Interleukin 4 (IL-4)	6
1.2.2 Interleukin 13 (IL-13)	7
1.2.3 Interleukin 10 (IL-10)	8
1.2.4 Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF)	8
1.2.5 Interleukin 1 beta (IL-1 beta)	9
1.2.6 Zytokine und Schmerz.....	10
1.3 Opioide	20
1.3.1 Opioidwirkung.....	20
1.3.2 Unterschiedliche Rezeptorpopulationen für die Wirkungsvermittlung der Opioide.....	22
1.3.3 Topographische Verteilung der Opioidrezeptoren	23
1.3.4 Endogene Opioide.....	24
1.3.5 Einfluss von Zytokinen auf die Opioid-Rezeptor-Produktion.....	25
1.4 Zielsetzung der Studie.....	26
2. Material und Methoden	27
2.1 Versuchstiere und Tierhaltung	27
2.2 Modell der CCI.....	27
2.3 Verhaltenstestungen	28
2.3.1 Bestimmung der thermischen Wegzugslatenz	28

2.3.2 Bestimmung der mechanischen Wegzugsschwelle.....	29
2.4 Analgetische Behandlung.....	29
2.5 Gewebeentnahme.....	30
2.6 Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression von Zytokinen und Opioid-Rezeptoren.....	30
2.6.1 RNA-Extraktion.....	30
2.6.2 Reverse Transkriptions-PCR.....	32
2.6.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR).....	33
2.7 Statistische Auswertung.....	35
3. Ergebnisse.....	36
3.1 Verhaltenstestungen.....	36
3.1.1 Einfluss der CCI auf die thermische Wegzugslatenz bei wt- und IL-4 ko-Mäusen.....	36
3.1.2 Einfluss der CCI auf die mechanische Wegzugsschwelle bei wt- und IL-4 ko-Mäusen.....	37
3.1.3 Analgetische Wirkung von Morphin bei wt- und IL-4 ko-Mäusen.....	38
3.2 Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im N. ischiadicus 28 Tage nach CCI.....	41
3.2.1 TNF.....	41
3.2.2 IL-1 beta.....	41
3.2.3 IL-10.....	42
3.2.4 IL-13.....	42
3.3 Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im lumbalen und zervikalen Rückenmark 28 Tage nach CCI.....	42
3.3.1 TNF.....	42
3.3.2 IL-1 beta.....	43
3.3.3 IL-10.....	43
3.3.4 IL-13.....	43

3.4 Genexpression der Opioid-Rezeptoren μ, κ und δ im zentralen Nervensystem 28 Tage nach CCI	44
3.4.1 MOR-Genexpression im zentralen Nervensystem nach CCI.....	44
3.4.2 DOR-Genexpression im zentralen Nervensystem nach CCI.....	45
3.4.3 KOR-Genexpression im zentralen Nervensystem nach CCI	46
4. Diskussion	48
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	48
4.2 IL-4 ko-Mäuse als Schmerzmodell für mechanische Hyperalgesie.....	49
4.2.1 Unterschiede in der Vermittlung mechanischer und thermischer Hyperalgesie	50
4.2.2 Einfluss von Zytokinen auf die Entwicklung mechanischer und thermischer Hyperalgesie	53
4.3 Regulation von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im peripheren und zentralen Nervensystem von IL-4 ko-Mäusen	56
4.4 Morphinwirkung und Regulation der Genexpression von Opioid-rezeptoren im zentralen Nervensystem von IL-4 ko-Mäusen.....	60
5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen.....	63
6. Literaturverzeichnis	65
7. Materialienliste	87

1. Einleitung

1.1 Der Neuropathische Schmerz

1.1.1 Charakteristik des neuropathischen Schmerzes und Unterschiede zum nozizeptiven Schmerz

Der *neuropathische* Schmerz wird vom *nozizeptiven* Schmerz abgegrenzt. Der nozizeptive Schmerz ist die Antwort des Organismus auf einen schädigenden Stimulus (mechanisch, thermisch oder chemisch) und dient als „Warnsignal“. Der Stimulus erregt direkt Nervenendigungen von afferenten, dünn myelinisierten A δ -Fasern und/oder C-Fasern. Wirkt der Stimulus nicht mehr ein, sistiert der Schmerz. Hingegen ist für den neuropathischen Schmerz charakteristisch, dass er die Einwirkzeit des schmerzhaften Stimulus überdauert und unabhängig davon fortbesteht. Neuropathische Schmerzen entstehen durch eine Schädigung oder Erkrankung des somatosensorischen Nervensystems (Treede et al. 2008) und stellen, als Ausdruck einer neuronalen Plastizität, eine fehlerhafte Anpassung des Nervensystems an diese Schädigung dar (Costigan et al. 2009). Diese Schädigung oder Erkrankung kann sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem liegen und verschiedene Ursachen haben. Beispielsweise können dies metabolische (z. B. diabetische Polyneuropathie), autoimmune (z. B. Schmerzen bei multipler Sklerose), infektiöse (z. B. post-herpetische Neuralgie), mechanische (z. B. Karpaltunnel-syndrom) oder vaskuläre (z. B. zentrale Schmerzen nach ischämischem Hirninfarkt) Ursachen sein. Charakteristisch für neuropathische Schmerzen sind meist brennende oder elektrisierende Dauerschmerzen bzw. Schmerzattacken sowie evozierte Schmerzen, im Sinne einer Allodynie (Schmerzempfindung auf einen normalerweise nicht schmerzhaften Stimulus) oder Hyperalgesie (vermehrte Schmerzempfindung auf einen schmerzhaften Stimulus) (Baron et al. 2010).

1.1.2 Pathophysiologische Mechanismen und Einflussfaktoren bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen

Zur Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen tragen unterschiedliche Mechanismen im peripheren und zentralen Nervensystem bei. Da eine Vielzahl verschiedener Moleküle daran beteiligt ist, sind die pathophysiologischen Zusammenhänge komplex.

1. Wachstums- und Transkriptionsfaktoren

Nach einer Nervenschädigung kommt es zu einem Anstieg von Wachstums- (z. B. engl. nerve growth factor, NGF u.a.) und Transkriptionsfaktoren wie Sox11, c-Jun oder ATF3 (Costigan et al. 2009), unter deren Einfluss regenerative Vorgänge wie z. B. die Aussprossung von Nervenfasern stattfinden. Darüber hinaus bewirken sie eine Veränderung der Genexpression und somit eine veränderte Synthese von neuronalen Rezeptoren, Ionenkanälen und Neuropeptiden (s.u.) (Baron et al. 2010).

2. Entstehung ektooper Aktivität

Als wichtiges Merkmal von neuropathischen Schmerzen gilt die Entstehung von Schmerz ohne einen einwirkenden Stimulus im Sinne einer ektooper, spontanen Aktivität. Spontanaktivität nach einer Nervenschädigung kann im geschädigten Nerven selbst, in den Spinalganglien (Amir et al. 2005), sekundären nozizeptiven Neuronen des Rückenmarks (Devor 1999) oder in benachbarten intakten C-Fasern entstehen (Wu et al. 2002).

Wie beschrieben kommt es unter dem Einfluss von Wachstums- und Transkriptionsfaktoren zu einer veränderten Verteilung und Aktivität von Ionenkanälen entlang der axonalen Nervenmembran. Insbesondere die Untergruppen der Tetrodotoxin-resistenten (TTX-R), spannungsabhängigen Natriumkanäle Nav1.8 und Nav1.7 akkumulieren nach einer Nervenläsion in distalen Enden regenerierender Axone und können dort Spontanaktivität oder Mechanosensitivität bewirken (Costigan et al. 2009). Außerdem sind durch

zyklische Nukleotide modulierte Schrittmacherkanäle (Luo et al. 2007) und Kalzium-abhängige Kalium-Kanäle, welche ektope Aktivität in Spinalganglien verursachen können (Sarantopoulos et al. 2007), sowie N-Typ Kalzium-Kanäle Cav2.2 an der Entstehung von Spontanaktivität beteiligt (Saegusa et al. 2001; McGivern 2006). Diese Veränderungen scheinen für die Entstehung typischer Charakteristika von neuropathischen Schmerzen wie brennende Dauerschmerzen, Parästhesien und Dysästhesien mit verantwortlich zu sein (Niederberger et al. 2008).

3. Sensibilisierung von Neuronen

Die für neuropathische Schmerzen typischen Symptome sind auch durch eine Sensibilisierung von afferenten Neuronen bedingt. Beispielsweise werden Prostaglandine, Serotonin oder Bradykinin in der Umgebung einer Nervenschädigung und im dazugehörigen Spinalganglion hochreguliert (Schäfers et al. 2004; Basbaum et al. 2009). Sie werden als Folge einer Nervenläsion in Schwann-Zellen oder eingewanderten Makrophagen produziert bzw. aus C-Faserendigungen freigesetzt und können vor allem in Kombination die Erregbarkeitsschwelle von Axonen herabsetzen und so eine Sensibilisierung bewirken (Austin und Moalem-Taylor 2010). Auch Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide, NO) führt u.a. über Induktion spontaner Aktivität in Spinalganglien, Stimulierung der Prostaglandin-Synthese (Gühring et al. 2000) und Aktivierung von Nachbarzellen mit vermehrter Freisetzung von Neuropeptiden (Garry et al. 2000) sowie Zytokinen (Holguin et al. 2004) zu neuronaler Aktivierung und Sensibilisierung. Unter dem Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF) und Interleukin (IL) 1 beta kommt es zur vermehrten Produktion von AMPA (5-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure)- und NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren (Zhang et al. 2008), wodurch die Einwärtsströme der Tetrodotoxin-resistenten Natriumkanälen gesteigert (Jin et al. 2006) und die Auswärtsströme von Kaliumkanälen vermindert (Takeda et al. 2008) werden. Vermittelt wird dies vermutlich über Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

(Boettger et al. 2007).

4. Konzept der neuro-immunen Modulation

Es gibt Hinweise darauf, dass für die Sensibilisierung von Neuronen vor allem das Immunsystem, insbesondere Gliazellen und Zytokine, im Sinne einer neuro-immunen Modulation eine große Rolle spielen (Austin und Moalem-Taylor 2010). Neuropathische Schmerzen scheinen mit einer Neustrukturierung nozizeptiver Prozesse im peripheren Nervensystem (PNS) sowie im zentralen Nervensystem (ZNS) einherzugehen (Latremoliere et al. 2009). Insbesondere die nach Nervenläsion auftretende periphere und zentrale Sensibilisierung, welche zur Chronifizierung führen kann, scheint durch Gliazellen und proinflammatorische Zytokine ausgelöst zu werden (Costigan et al. 2009; Gao et al. 2010).

Im PNS werden nach einer Nervenläsion Makrophagen aktiviert, deren Aufgabe die Beseitigung von Zelldetritus ist. Durch die veränderte Antigenpräsentation auf ihrer Oberfläche aktivieren sie T-Lymphozyten. Sowohl Makrophagen als auch T-Lymphozyten schütten daraufhin als Schlüsselsubstanzen Zytokine sowie Chemokine aus und kommunizieren über diese mit Schwann-Zellen, Neuronen und Spinalganglien (Austin und Moalem-Taylor 2010).

Im Rückenmark kommt es nach peripherer Nervenläsion ebenfalls zur Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia, den Makrophagen des ZNS. Dies wird über aus Neuronen freigesetzte neuroexzitatorische Substanzen wie Fractalkin, Monozyten-Chemotaktisches Protein-1 (MCP-1, oder Chemokine-Ligand-2, CCL2), NO, Substanz P oder CGRP vermittelt. Diese Aktivierung führt wiederum zur Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine. Daneben werden Botenstoffe wie z. B. NGF, Chemokine, Prostaglandine, Adenosintriphosphat oder exzitatorische Aminosäuren (Watkins et al. 2009) aus den Gliazellen freigesetzt. Insgesamt führen diese Prozesse zu einer erhöhten neuronalen Exzitabilität sowie zur Ausschüttung von weiteren Neurotransmittern aus sensorischen Afferenzen (Liu et al. 2007; Milligan und Watkins 2009) mit Aufrechterhaltung der ektopen Aktivität und somit auch der neuropathischen Schmerzen. Proinflammatorische

Zytokine bewirken somit zusammenfassend eine langfristige Veränderung der synaptischen Prozesse im ZNS und spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung und Entstehung von neuropathischen Schmerzen (Austin und Moalem-Taylor 2010).

1.2 Pathophysiologische Rolle von Zytokinen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen

Zytokine sind kleine Glykoproteine oder Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ca. 30 kDa. Sie wirken als Botenstoffe der Zell-Zell-Kommunikation und werden vor allem von Zellen des Immunsystems, wie T-Lymphozyten, Mastzellen und Makrophagen, aber auch einer Vielzahl anderer Zellen wie z. B. Fibroblasten oder Schwann-Zellen, produziert. Klassischerweise werden Zytokine wie folgt unterteilt: Interleukine (ILs), Tumor-Nekrose-Faktoren (TNFs), Transforming Growth Factors (TGFs), Interferone (IFNs), Chemokine und Colony-stimulating-factors (CSFs) (Vilcek 2004). Zudem werden folgende Zytokinrezeptoren unterschieden: Klasse I-Rezeptoren (IL-6-, G-CSF-, IL-2- und IL-13-Rezeptoren), Klasse II-Rezeptoren (IFN- und IL-10-Rezeptoren), sowie TNF-, IL-1-, TGF- β - und Chemokin-Rezeptoren (Szente 2004). Zytokinrezeptoren finden sich auf nicht-neuronalen und neuronalen Zellen (Bartfai und Schultzberg 1993).

Zytokine entfalten ihre Wirkung in niedrigen Konzentrationen hauptsächlich autokrin (auf die produzierende Zelle selbst) oder parakrin (auf benachbarte Zellen). Sie haben vielfältige pleiotrope Effekte auf Zellwachstum, -differenzierung und -untergang sowie bei Entzündungsvorgängen und können in pro- oder antiinflammatorische Zytokine unterteilt werden. Zytokinen mit proinflammatorischen Eigenschaften werden eher algetische, mit antiinflammatorischen Eigenschaften eher analgetische Effekte zugeschrieben. Allerdings können einzelne Zytokine je nach Menge, Wirkungsort und chemischem Milieu sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften haben (Vilcek 2004).

1.2.1 Interleukin 4 (IL-4)

IL-4 ist ein Zytokin mit antiinflammatorischen Eigenschaften. Es hat ein Molekulargewicht von 15 kDa und wird von aktivierten CD4⁺ T-Zellen, natürlichen Killerzellen (NK), Mastzellen und basophilen Granulozyten produziert. Das IL-4 Gen besitzt mehrere potentielle Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, z. B. für STAT6 (engl. signal transducer and activator of transcription), durch die die Expression des Zytokins reguliert wird.

IL-4 bindet an zwei verschiedene Rezeptoren: Den „klassischen“ Rezeptor, der v.a. auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und den „alternativen“ Rezeptor, der überwiegend auf nicht-hämatopoetischen Zellen zu finden ist. An den „alternativen“ Rezeptor bindet auch das ebenfalls antiinflammatorische Zytokin IL-13, mit dem IL-4 viele Eigenschaften teilt. Nach Aktivierung des Rezeptors wird eine Signalkaskade über Janus-Tyrosin-Kinasen (JAK) und Transkriptionsfaktoren wie STAT6 gestartet, welche über Phosphoinositol-3-Kinase und weitere Transkriptionsfaktoren die Zellproliferation beeinflusst (Okada 2003).

IL-4 zeigt eine Wirkung auf T- und B-Lymphozyten, NK, Mastzellen, Synoviozyten und Endothelzellen. Es aktiviert und unterstützt das Wachstum von B-Lymphozyten, verbessert deren Antigen-präsentierenden Eigenschaften, erhöht die Expression von MHC-Klasse-II Antigenen und fördert die Bildung der Immunglobuline (Ig)G- und IgE mit immunstimulierender Wirkung. Seine antiinflammatorische Wirkung entfaltet IL-4 dadurch, dass es die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 und TNF durch aktivierte Monozyten reduziert. Es verhindert außerdem die IL-2-induzierte Aktivierung von NK, vermindert die Aktivierung sowie Zytotoxizität von Makrophagen und fördert die Differenzierung von T-Helferzellen zum TH2-Typ hin, welche sich von dem TH1-Typ in dem Muster der Zytokinexpression unterscheiden. TH1-Zellen sezernieren v. a. IL-2 und IFN γ , während TH2-Zellen IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 produzieren (Okada 2003).

Polymorphismen innerhalb des IL-4-Gens bzw. erhöhte IL-4-Serumspiegel wurden mit allergischen Erkrankungen, Asthma bronchiale und Morbus Crohn in

Verbindung gebracht (Okada 2003; Basehore et al. 2004; Borres und Bjorksten 2004; Wang et al. 2009). Erhöhte IL-4-Spiegel konnten auch bei Erkrankungen wie dem Systemischem Lupus Erythematodes (Okada 2003) oder der Sklerodermie beobachtet werden. Dies ist im Fall der Sklerodermie positiv mit der Schwere des Krankheitsverlaufes korreliert (Baraut et al. 2010). Im klinischen Bereich stellt daher die Gabe von IL-4-Antagonisten einen Ansatz in der Therapie von Erkrankungen des allergischen Formenkreises dar, wie z. B. in Kombination mit einem IL-13-Antagonisten, bei der Behandlung des allergischen Asthma bronchiale oder des allergischen Ekzems (Burmeister Getz et al. 2009; Antoniu 2010; Steinke 2010).

1.2.2 Interleukin 13 (IL-13)

IL-13 zählt ebenfalls zu den Zytokinen mit antiinflammatorischen Eigenschaften. Es verfügt über eine Molekularmasse von 12 kDa und wird von T-Lymphozyten, NK, basophilen und eosinophilen Granulozyten, sowie Mastzellen und dendritischen Zellen produziert. Rezeptoren für IL-13 finden sich auf B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, Endothelzellen und nicht-hämatopoetischen Zellen, jedoch nicht auf der Oberfläche von T-Lymphozyten. Nach Rezeptor-Aktivierung werden ähnliche Signalwege wie bei IL-4 gestartet, welche ebenfalls über JAK und STAT6 ablaufen. Die Wirkung wird indirekt vermittelt über eine verringerte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 beta, IL-6, IL-12, TNF, sowie von entzündungsfördernden Mediatoren wie Prostaglandin E2 (PGE2) und NO (Grünig 2003).

Ca. 25 % der kodierten Aminosäuren des IL-13-Gens stimmen mit denen von IL-4 überein und die Tertiärstruktur beider Proteine ist identisch. Deshalb, und auch aufgrund eines gemeinsam genutzten Rezeptors, teilen sich IL-13 und IL-4 viele ihrer immunstimulatorischen Eigenschaften, wie z. B. einen wachstumsfördernden Einfluss auf B-Zellen und Förderung der IgG- und IgE-Synthese. Durch die Eigenschaft von IL-4, die Differenzierung von T-Helferzellen zum TH2-Typ zu begünstigen, fördert es indirekt auch die Bildung von IL-13. Möglicherweise wird

IL-13 für die endgültige Aktivierung der TH2-Reaktion, wie auch der IgE-Produktion benötigt. IL-13 unterscheidet sich aber von IL-4 vor allem in dem Punkt, dass es auch einen Einfluss auf nicht-hämatopoetische Zellen wie Epithel- und Muskelzellen oder Fibroblasten hat und zudem keine Wirkung auf T-Zellen zeigt (Grünig 2003).

1.2.3 Interleukin 10 (IL-10)

Ein weiteres Zytokin mit überwiegend antiinflammatorischen und immunsuppressiven Wirkungen ist das IL-10. Das biologisch aktive, 18 kDa schwere Protein wird von aktivierten T- und B-Lymphozyten, Makrophagen, Mastzellen, Epithelzellen und Keratinozyten gebildet, wobei die Produktion von einer Reihe von Zytokinen gehemmt werden kann. Dazu gehören IL-4, IL-13, IFN γ und auch autoregulatorisch IL-10 selbst. Der IL-10-Rezeptor gehört zur Klasse II der Zytokinrezeptor-Familie und vermittelt seine Wirkung über den JAK/STAT-Signalweg.

Rezeptoren für IL-10 werden vor allem auf hämatopoetischen Zellen exprimiert. Nach deren Aktivierung kommt es über sogenannte SOCS-Proteine (engl. suppressor of cytokine signaling) zur Inhibition der Signalkaskaden bestimmter proinflammatorischer Zytokine. IL-10 hemmt außerdem die Cyclooxygenase-(COX)-2-Produktion und fördert die Ausschüttung von antiinflammatorischen Molekülen wie z. B. dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten (Ding 2004). Es verhindert aber auch direkt die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 beta, IL-6 und TNF (Poole et al. 1995).

1.2.4 Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF)

Den Namen verdankt das proinflammatorische TNF der Tatsache, dass es erstmals aufgrund seiner antikanzerösen Eigenschaften beschrieben wurde, die zum nekrotischen Zerfall von Sarkomen und anderen Tumoren führte (Carswell et al. 1975; Balkwill 2009). TNF wird von Makrophagen, Monozyten, B-Lymphozyten,

T-Lymphozyten, Fibroblasten, Schwann-Zellen und vielen weiteren Zellen produziert (Shubayev und Myers 2000; Shamash et al. 2002; Schuerwegh et al. 2003). Ein zunächst gebildetes, 26 kDa schweres, transmembranes Protein wird durch eine Metalloprotease in eine lösliche, biologisch aktive 17 kDa-Form überführt (Wang 2004). Dieses bildet in trimerischer Form den Ligand für zwei transmembrane Glycoproteinrezeptoren: den konstitutiv exprimierten TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) und den induzierbaren TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2). Rezeptoren für TNF wurden auf nahezu allen Körperzellen gefunden. Die Wirkung wird dabei hauptsächlich über den TNF-R1 vermittelt, der nach einer peripheren Nervenläsion oder Entzündung vermehrt produziert wird (Shubayev und Myers 2000; Ohtori et al. 2004; George et al. 2005). Durch Bindung an den Rezeptor wird nach Aktivierung von p38-MAPK (engl. mitogen-activated protein kinase) mittels Calcium und NO eine Signalkaskade gestartet (Ji et al. 2002; MacEwan 2002; Milligan et al. 2003; Schäfers et al. 2003), die zur Sensibilisierung von Nozizeptoren führt (Oprea et al. 2000; Pollock et al. 2002; Abe et al. 2003; Leung et al. 2010).

Seine proinflammatorische Wirkung entfaltet TNF indirekt über eine vermehrte Bildung von IL-1 und IL-6 in Monozyten, von IFN γ , sowie IL-2 in T-Lymphozyten, und durch eine vermehrte Produktion von Antikörpern aus B-Lymphozyten (Cunha et al. 1992; Schuerwegh et al. 2003).

1.2.5 Interleukin 1 beta (IL-1 beta)

IL-1 beta ist ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der proinflammatorischen Zytokine und gehört zur IL-1 Familie, die u.a. IL-1 alpha, IL-18 und den natürlich vorkommenden IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra) einschließt. IL-1 beta wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen als Vorläuferprotein produziert und durch eine intrazelluläre Cysteinprotease, das IL-1 beta-Converting-Enzyme, in seine biologisch aktive 17,5 kDa-Form gespalten. Die Bindung an Rezeptoren der IL-1-beta-Rezeptor-Familie führt zur Aktivierung von MAP-Kinasen und Entfaltung der proinflammatorischen Wirkung durch Induktion

von COX-2, Phospholipase A2 und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS). Ergänzend kommt es zu einer Expression von Adhäsionsmolekülen, die eine Extravasation von Immunzellen in entzündetes Gewebe ermöglichen (Dinarello 2004).

Einige Autoren konnten zeigen, dass die hyperalgetische Wirkung von IL-1 beta zudem indirekt über Bradykinin-B1-Rezeptoren (Perkins et al. 1995) oder Prostaglandine (Samad et al. 2001) vermittelt wird. Andere fanden direkte Wirkungen auf die Erregbarkeit von Nervenfasern (Fukuoka et al. 1994). Frühe Studien haben gezeigt, dass das proinflammatorische Zytokin TNF seine Wirkung u.a. über eine Induktion von IL-1 beta entfaltet (Dinarello 2004). IL-1 hat dosisabhängige Wirkungen auf die Schmerzweiterleitung mit Begünstigung von Hyperalgesie in niedriger Konzentration und analgetischer Wirkung in höherer Dosierung (Oka et al. 1993; Oka et al. 1994; Bianchi et al. 1998).

1.2.6 Zytokine und Schmerz

Die Bedeutung von Zytokinen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen wurde bisher in zahlreichen Studien belegt (Austin und Moalem-Taylor 2010). Zum Verständnis, über welche Mechanismen Zytokine zu Schmerzen führen, sind zwei Ansätze wichtig: (a) Zytokine wirken direkt auf Anteile des PNS bzw. ZNS, indem sie z. B. zu molekularen und elektrophysiologischen Veränderungen in sensiblen Neuronen führen und nachfolgend deren Aktivität modulieren. (b) Zytokine können sowohl die Produktion anderer pro- bzw. antiinflammatorischer Zytokine, als auch die von Schmerzmediatoren erhöhen oder vermindern und verursachen so indirekt Schmerzen.

1. Ergebnisse aus tierexperimentellen Studien

a) Molekularebene

Ein Großteil der Ergebnisse zur Bedeutung von Zytokinen bei neuropathischen Schmerzen wurde im tierexperimentellen Ansatz gewonnen. Wie oben erwähnt

fördern proinflammatorische Zytokine die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine und schmerzfördernder Mediatoren. Beispielsweise ist dies für TNF und IL-1 beta bekannt, die zur Freisetzung von Bradykinin, Prostaglandinen, NGF, NO und CGRP führen (Marceau 1995; Manni und Aloe 1998; Schäfers et al. 2003). IL-1 beta fördert darüber hinaus die Produktion von Proteinkinase-C (PK-C) sowie Preprotachykinin, und vermittelt über Tyrosinkinasen die Sensibilisierung von sensorischen Neuronen (Obreja et al. 2002), u.a. über die Produktion von Substanz P (Igwe 2003). Direkte Wirkung entfalten IL-1 beta oder TNF durch gesteigerte Transkription von Säure-empfindlichen Ionenkanälen, die wiederum die neuronale Aktivität erhöhen (Mamet et al. 2002; Jin und Gereau 2006), oder über eine direkte Aktivierung und Sensibilisierung von Nozizeptoren (Junger und Sorkin 2000; Sommer und Kress 2004).

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 vermittelt seine Wirkung im ZNS, indem es Gene supprimiert, die für die Produktion proinflammatorischer Zytokine kodieren, deren Translation verhindert und eine Down-Regulation ihrer Rezeptoren bewirkt (Strle et al. 2001).

b) Läsionsmodelle

Nervenläsionsmodelle sind aufgrund der Vergleichbarkeit zu den beim Menschen auftretenden pathophysiologischen Vorgängen und der guten Möglichkeit für Verhaltenstestungen eine oft gewählte Methode zur Erforschung neuropathischer Schmerzen. Viele Informationen über die Rolle von Zytokinen im peripheren und zentralen Nervensystem bei der Entstehung dieser Phänomene wurden anhand verschiedener Nervenläsionsmodelle gewonnen.

Peripheres Nervensystem (PNS)

Beispielsweise wurde nach Schmerzmodellen einer peripheren Nervenschädigung an Mäusen, wie der chronisch konstriktiven Läsion des Nervus (N.) ischiadicus (engl. chronic constrictive injury, CCI) oder einer Quetschläsion des N. ischiadicus, ein Anstieg der Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie TNF und IL-1

beta im geschädigten Nerven nachgewiesen. Dies ging mit einem verstärkten schmerzassoziierten Verhalten einher (Okamoto et al. 2001; Schäfers et al. 2003; Kleinschnitz et al. 2004). Eine erhöhte Genexpression des proinflammatorischen Zytokins TNF konnte nach CCI bei Mäusen im geschädigten N. ischiadicus bereits nach einer Stunde (h) gemessen werden; Untersuchungen zur Proteinexpression nach CCI bei Ratten zeigten eine schnell ansteigende endoneurale Proteinexpression mit einem Maximum 12 h nach CCI, was dessen besondere Bedeutung in der frühen Phase der Entwicklung von neuropathischen Schmerzen unterstreicht (George et al. 1999; Üçeyler et al. 2007c).

Nach CCI kommt es bei Mäusen auch zu einer schnellen Hochregulation der Genexpression von IL-1, welches bereits 1 h nach CCI im lädierten Nerven gemessen werden kann und auch im zeitlichen Verlauf erhöht bleibt (Üçeyler et al. 2007c). Auch im entsprechenden kontralateralen Nervenabschnitt wurde eine erhöhte Genexpression von IL-1 beta gemessen; allerdings fand sich dies nicht in den die Läsion umgebenden Nerven, wie beispielsweise dem N. femoralis (Kleinschnitz et al. 2005). Dies weist möglicherweise auf spinale Mechanismen hin, welche nach unilateraler Nervenverletzung zu einer Erhöhung der Zytokinexpression auf der kontralateralen Seite führen (Ruohonen et al. 2002; Kleinschnitz et al. 2005). In zwei verschiedenen Nervenläsionsmodellen (SNL, engl. spinal nerve ligation, s.u., und CCI) verminderte das Fehlen von IL-1 bei IL-1 knockout-(ko)-Mäusen das Ausmaß und die Dauer schmerzassoziierten Verhaltens und führte zudem zu einem verspäteten Eintreten mechanischer Allodynie (Honore et al. 2006).

Auch die Expression von antiinflammatorischen Zytokinen wurde in tierexperimentellen Studien untersucht. Nach CCI des N. ischiadicus bei Mäusen wurde bereits nach 1 h im geschädigten Nerven eine erhöhte Genexpression von IL-10 gemessen (Kleinschnitz et al. 2004; Üçeyler et al. 2007c), welche bis 45 Tage nach CCI erhöht blieb (Okamoto et al. 2001). Allerdings zeigten sich nach CCI oder Quetschläsion des N. ischiadicus bei Ratten im geschädigten Nerven selbst erniedrigte IL-10-Protein-Werte, möglicherweise durch dessen erhöhten

Verbrauch (George et al. 2004). Einige Autoren fanden einen zweiten Gipfel der Genexpression von IL-10 im zeitlichen Verlauf nach Durchtrennung des N. ischiadicus bei Ratten (Ruohonen et al. 2005), was auf eine Bedeutung von IL-10 in der Regeneration des Nerven und Remission der entstandenen Hyperalgesie hinweist (George et al. 2004).

Zentrales Nervensystem (ZNS)

Auch im ZNS tragen proinflammatorische Zytokine zur Schmerzmodulation nach peripherer Nervenläsion bei. Möglicherweise wirken diese zentral ebenfalls über eine Erhöhung schmerzvermittelnder Mediatoren wie Prostaglandine (Samad et al. 2001) oder über die Aktivierung von Mikrogliazellen mit folgender Freisetzung von Wachstumsfaktoren und weiteren Zytokinen (Wieseler-Frank et al. 2004), welche dann die Aktivität spinaler Nozizeptoren verstärken.

Nach peripherer Nervenläsion konnte nicht nur lokal im PNS, sondern auch in Teilen des ZNS eine gesteigerte Zytokinexpression nachgewiesen werden. Im Hippocampus und Locus coeruleus wurde beispielsweise nach CCI des N. ischiadicus bei Ratten ein Anstieg der Genexpression von TNF beschrieben (Ignatowski et al. 1999; Covey et al. 2000; Covey et al. 2002).

Nach gezielter traumatischer Rückenmarksläsion im Rahmen eines Schmerzmodells bei Ratten (engl. spinal cord injury) wurde analog zur peripheren Nervenläsion bereits 1 h nach Läsion im Bereich der Nervenschädigung eine gesteigerte Genexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF (Yune et al. 2003; Yang et al. 2005) und im Verlauf auch von IL-1 beta und IL-6 gemessen. Die maximalen Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-1 beta und IL-6 waren bereits 6 h nach Läsion nachzuweisen (Yune et al. 2003). Eine erhöhte Mikrogliaaktivierung und TNF-Proteinausschüttung trug in einem Modell einer inkompletten Rückenmarksschädigung bei Ratten, einer sog. partial spinal nerve injury, zur Entstehung schmerzassozierten Verhaltens unterhalb der verletzten Rückenmarksebene bei (Peng et al. 2006).

Ähnlich zeigte sich in anderen Schmerzmodellen mit rückenmarksnahen Läsionen,

z. B. bei einer Durchtrennung von Spinalnerven an Mäusen bzw. Ratten (engl. spinal nerve transection, SNT), eine vermehrte Aktivierung spinaler Gliazellen und in der Folge eine erhöhte Genexpression von TNF, IL-1 beta, IL-6 sowie IL-10. Die Aktivierung spinaler Gliazellen wird hierbei über Toll-like-Rezeptoren vermittelt (Winkelstein et al. 2001; Kim et al. 2007). Nach SNT bei Ratten konnten zudem erhöhte Proteinspiegel von TNF, IL-6 und IL-1 im gesamten Gehirn bzw. in der zur Läsion kontralateralen Gehirnhälfte (Xie et al. 2006; Liu et al. 2007) gemessen werden. Eine anschließende Behandlung mit Kortikoidsteroiden oder Pentoxifyllin, einer zytokinhemmenden Substanz, führte zur Verminderung der Proteinspiegel der proinflammatorischen Zytokine TNF, IL-6 und IL-1 und zur Steigerung der Proteinspiegel des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Das nach SNT auftretende schmerzassoziierte Verhalten konnte dadurch vermindert werden (Xie et al. 2006; Liu et al. 2007). In Studien, in denen genetisch veränderte Mäuse TNF in Astrozyten spezifisch überexprimieren, reagierten diese nach SNT mit einer stärker ausgeprägten mechanischen Allodynie (DeLeo et al. 2000).

Auch in anderen Schmerzmodellen mit rückenmarksnahen Läsionen wie z. B. des „spinal nerve ligation“ Modells (SNL), in dem eine gezielte Ligatur eines Spinalnerven durchgeführt wird, fanden sich postläsionell erhöhte Proteinspiegel für TNF, IL-1 beta, IL-6 sowie IFN γ bei Maus und Ratte (Tanga et al. 2005) und nach einer sog. spared nerve injury ließ sich bei Mäusen im präfrontalen Cortex eine erhöhte Genexpression für IL-1 beta nachweisen (Norman et al. 2010).

Bekannt ist auch, dass nach einem Schmerzmodell mit gezielter spinaler Nervenschädigung (engl. spinal nerve injury, SNI) bei Ratten eine vorherige subkutane (s.c.) Genterapie mit IL-4 den Beginn mechanischer Allodynie und thermaler Hyperalgesie verzögert. Erhielten die Ratten die Genterapie erst nach SNI, beobachtete man einen Rückgang des Schmerzverhaltens (Hao et al. 2006). Dies wurde von einer verminderten spinalen Freisetzung von IL-1 beta und PGE2 sowie einer Reduktion der phosphorylierten MAP-Kinase (pMAPK), einem Hinweis für eine reduzierte Anzahl aktivierter Mikroglia, begleitet (Austin und Moalem-Taylor 2010).

Bei einem Mausmodell für Multiple Sklerose, der experimentell ausgelösten autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), zeigten IL-4 ko-Mäuse ausgeprägtere Symptome und einen deutlicheren Anstieg proinflammatorischer Zytokine als Wildtyp (wt)-Mäuse (Falcone et al. 1998). Eine EAE bei Mäusen verlief deutlich schwächer, wenn vorher IL-4 über verschiedene Vektoren, z. B. über einen attenuierten Herpes simplex Virus (HSV), appliziert wurde (Shaw et al. 1997; Furlan et al. 1998). IL-4 scheint daher auch zentral antiinflammatorisch und neuroprotektiv zu wirken (Ponomarev et al. 2007).

Allerdings haben andere Studien zu diesen Beobachtungen widersprüchliche Ergebnisse gezeigt. Eine CCI bei Mäusen veränderte die IL-1-beta-Produktion im Hirnstamm und Kortex im Vergleich zu Kontrolltieren nicht. Es fand sich sogar eine reduzierte proinflammatorische Zytokinproduktion. Nach CCI beobachtete man innerhalb der ersten 6 h eine verminderte Genexpression der Zytokine TNF und IL-4 im frontalen Kortex, Hypothalamus, Thalamus und Hippocampus sowie eine verminderte Genexpression von IL-1 beta im frontalen Kortex und Rückenmark. Allerdings konnte auch ein Anstieg der Genexpression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 im Thalamus und Rückenmark nachgewiesen werden (Üçeyler et al. 2008d).

c) Injektionsversuche

Verschiedene Versuchsmodelle mit Injektion einzelner Zytokine oder Zytokinrezeptorantagonisten haben ergänzende Informationen über deren pro- bzw. antiinflammatorische Eigenschaften erbracht.

Die analgetische Wirkung antiinflammatorischer Zytokine konnte in verschiedenen Injektionsmodellen beobachtet werden. In einem Modell zur mechanischen Hyperalgesie bei Ratten mit intraplantarer (i.pl.) Injektion analgetischer Substanzen wie TNF, Carrageenin oder Bradykinin verminderte die vorherige Gabe von IL-4 ein schmerzassoziiertes Verhalten (Cunha et al. 1999).

Die vorherige intraperitoneale (i.p.) Applikation der antiinflammatorischen Zytokine

IL-4 und IL-10 verminderte das durch Essigsäure oder Zymosan hervorgerufene Schmerzverhalten bei Mäusen und Ratten (Vale et al. 2003). Dabei konnte eine verminderte Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF nachgewiesen werden (Austin und Moalem-Taylor 2010). Analog führte die s.c. Gabe von IL-10 über HSV als Vektor 10 Tage vor einer i.pl. Formalin-Injektion bei Ratten zu einem Rückgang schmerzassozierten Verhaltens. Begleitend ließ sich zudem eine verminderte Proteinexpression von TNF im Rückenmark nachweisen (Zhou et al. 2008). Die Injektion von IL-10 verminderte bei Ratten die Hyperalgesie sowohl nach Injektion algetischer Substanzen wie Carrageenin bzw. proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 beta, IL-6 und TNF (Poole et al. 1995) als auch nach Durchführung einer CCI (Wagner et al. 1998). Die intrathekale Gabe von IL-10-DNA über virale Vektoren oder für IL-10-DNA kodierende Plasmide reduzierte bei Ratten ebenfalls eine durch CCI oder Paclitaxel (ein Chemotherapeutikum) induzierte Neuropathie (Milligan et al. 2005; Milligan et al. 2006; Ledebøer et al. 2007).

Umgekehrt erzeugt die i.pl. bzw. intraneurale Injektion (N. ischiadicus) von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. TNF bei Ratten ein verstärktes Schmerzverhalten mit einer verminderten Reizschwelle für mechanische Stimuli (Cunha et al. 1992; Zelenka et al. 2005). Auch die intrathekale Injektion von TNF reduzierte die Wegzugslatenz für thermische Stimuli bei Ratten (Oka et al. 1996). Die Applikation von TNF in den N. ischiadicus oder in Spinalganglien bei Ratten führt zu veränderten Eigenschaften der Neurone, wie z. B. einer ektopen Aktivität von A β -, A δ - und C-Fasern (Sorkin et al. 1997; Zhang et al. 2002) und damit einhergehend einer verminderten Erregungsschwelle (Junger und Sorkin 2000; Ozaktay et al. 2006). Die präläsionelle, systemische Gabe von Thalidomid, welches u.a. die Produktion von TNF hemmt, reduzierte das Schmerzverhalten von Ratten nach CCI (Sommer et al. 1998). Wurde die Wirkung von TNF, z. B. durch einen TNF-Inhibitor wie Etanercept, neutralisiert, verminderte dies ebenfalls das Schmerzverhalten von Mäusen nach CCI (Sommer et al. 2001).

Nach lokaler Injektion von IL-1 beta fand sich in tierexperimentellen Studien ebenfalls eine erhöhte elektrische Aktivität von sensorischen Nervenfasern mit vermehrter Hyperalgesie (Ferreira et al. 1988; Fukuoka et al. 1994; Zelenka et al. 2005). Die intrathekale Applikation von IL-1 beta erzeugte bei Ratten eine messbare Hyperalgesie (Oka et al. 1996) durch Aktivierung der iNOS (Sung et al. 2004). Die Antagonisierung der Wirkung von IL-1 beta z. B. durch die Gabe von IL-1-beta-Antagonisten vermindert eine durch das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV) über das Protein gp120 ausgelöste Neuropathie (Milligan et al. 2001). Auch eine durch inkomplette Ligatur des N. ischiadicus (engl. partial sciatic nerve ligation) hervorgerufene Hyperalgesie bei Mäusen konnte durch Gabe von IL-1-beta-Antagonisten vermindert werden (Kiguchi et al. 2010). Genetisch veränderte Mäuse, die den IL-1-beta-Rezeptor nicht produzieren können, entwickelten nach einer teilweisen Durchtrennung eines Spinalnerven (L5) keine Hyperalgesie und wiesen außerdem eine reduzierte spontane elektrische Aktivität in Spinalganglien im Vergleich zu wt-Mäusen auf (Wolf et al. 2006).

Interessant ist, dass die Dosierung der Zytokine bezüglich ihrer Eigenschaften eine Rolle zu spielen scheint. Die intraneurale Applikation des proinflammatorischen Zytokins IL-1 beta im picogramm-Bereich erzeugte verstärktes Schmerzverhalten, allerdings bewirkten wiederum höhere Dosen dies nicht (Sommer 2006). Die intrathekale Applikation hoher IL-1 Dosen im nanogramm-Bereich zeigte hingegen eine analgetische Wirkung (Nakamura et al. 1988; Bianchi et al. 1992).

2. Ergebnisse aus klinischen Studien

Ausgehend von den Ergebnissen tierexperimenteller Studien wurde eine Reihe von klinischen Studien durchgeführt, um die Rolle von Zytokinen bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischen Schmerzen zu untersuchen.

Erste klinische Untersuchungen bei Patienten mit schmerzhaftem Erythema nodosum leprosum zeigten eine erhöhte TNF-Serumkonzentration. Durch

Thalidomid kam es zu einer deutlichen Linderung der Schmerzen, begleitet von einer Senkung der Serum-TNF-Spiegel (Sampaio et al. 1993). Bei Patienten mit einer rein neuritischen Lepraform konnte in Nervenbiopsien eine erhöhte Genexpression für TNF nachgewiesen werden (Teles et al. 2007).

Bei Patienten mit anderen Ursachen chronischer Schmerzsyndrome, wie z. B. dem Fibromyalgiesyndrom, dem komplexen regionalen Schmerzsyndrom (engl. chronic regional pain syndrome, CRPS), der Neuropathie der kleinen Fasern (engl. small fiber neuropathy, SFN) oder chronischen Schmerzen in mehreren Körperregionen (engl. chronic widespread pain, CWP), konnte in klinischen Studien ein im Vergleich zu gesunden Probanden unterschiedliches Zytokinmuster festgestellt werden (Üçeyler und Sommer 2008a). Bei dem CRPS, das nach einem Trauma mit oder ohne Nervenverletzung entstehen kann, war z. B. im Serum der Patienten die Genexpression der antiinflammatorischen und analgetischen Zytokine IL-4 und IL-10 erniedrigt, unabhängig davon wie lange die Erkrankung bereits bestand (Üçeyler et al. 2007a). Die Genexpression proinflammatorischer Zytokine (IL-2, IL-6, TNF) war bei diesen Patienten hingegen erhöht (Alexander et al. 2007; Üçeyler et al. 2007a). Auch im Liquor von Patienten mit CRPS oder in künstlich erzeugten Hautblasen der betroffenen Extremität, konnte eine höhere Konzentration proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden (Huygen et al. 2002; Alexander et al. 2005; Maihofner et al. 2005; Schinkel et al. 2006; Üçeyler et al. 2007a). In einem tierexperimentellen Schmerzmodell zum CRPS wirkte bei Ratten die Therapie mittels Pentoxifyllin schmerzlindernd (Wei et al. 2009).

Dagegen fand sich bei Patienten mit schmerzloser Polyneuropathie eine erhöhte Genexpression von IL-4 und IL-10 im Vergleich zu Patienten mit schmerzhafter Polyneuropathie. In der Gruppe der schmerzhaften Polyneuropathien ließ sich zudem eine vermehrte Gen- und Proteinexpression von TNF und IL-2 nachweisen (Üçeyler et al. 2007b). In Nervenbiopsien ließ sich bei Patienten mit schmerzhaften Polyneuropathien ebenfalls im Vergleich zu Patienten mit schmerzlosen Polyneuropathien eine vermehrte Aktivität von TNF nachweisen. Bei Patienten mit einer mechanischen Allodynie war zudem der lösliche TNF-Rezeptor vermehrt

(Empl et al. 2001).

Patienten mit SFN wiesen in Biopsien aus den betroffenen Hautarealen eine erhöhte Genexpression proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-8) im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe auf (Üçeyler et al. 2010b). Patienten mit Fibromyalgiesyndrom zeigten sowohl im Serum, als auch in Hautbiopsien im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe eine erhöhte Genexpression von IL-1 beta, IL-6 und TNF (Salemi et al. 2003). Insbesondere die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 scheinen die Symptome der Fibromyalgie zu beeinflussen (Wallace et al. 2001). Auch gelang es ein klinisches Bild ähnlich dem Fibromyalgiesyndrom durch Applikation von IL-2 auszulösen (Wallace et al. 1988). In Untersuchungen von Biopsien des N. suralis bei Patienten mit Neuropathien unterschiedlicher Ätiologie (Vaskulitis, inflammatorisch oder nicht-inflammatorisch) war die Immunoreaktivität der proinflammatorischen Zytokine IL-1 beta, IL-6 und TNF positiv mit dem Ausmaß der axonalen Degeneration und der Anzahl von endoneuralen Makrophagen oder epineuralen T-Lymphozyten korreliert (Lindenlaub und Sommer 2003). Im Vergleich zu Patienten mit moderater Polyneuropathie war die Proteinexpression von IL-6 und TNF im Serum bei Patienten mit schwerer Polyneuropathie höher und positiv mit dem Ausmaß der Symptomatik korreliert. Interessanterweise hatten diejenigen Patienten mit einer mechanischen Allodynie erhöhte TNF-Konzentrationen im Serum im Vergleich zu denen, die dieses Merkmal nicht aufwiesen (Ludwig et al. 2008).

Im Liquor von Patienten mit schmerzhafter, nicht-diabetischer und post-traumatischer Neuralgie fand sich eine erhöhte Konzentration von IL-1 sowie des löslichen TNF-Rezeptors, was positiv mit dem Schmerzausmaß korreliert war. Gleichzeitig wiesen diese Patienten eine verminderte Konzentration des antiinflammatorischen IL-10 auf, welche eine negative Korrelation mit dem Schmerzausmaß zeigte (Backonja et al. 2008).

In einer bislang nicht reproduzierten Studie wiesen Patienten mit postherpetischer Neuralgie nach einer akuten Herpes-zoster-Infektion im Liquor häufiger erhöhte Spiegel des proinflammatorischen Zytokins IL-8 auf mit hohem positivem

prädiktivem Wert. Erhöhte IL-8-Spiegel während dem Vollbild einer Herpes-zoster-Infektion stellten dabei einen Risikofaktor für eine spätere postherpetische Neuralgie dar (Kotani et al. 2004).

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen zu Zytokineigenschaften, kam es zur Entwicklung von Medikamenten, die die Zytokinwirkung beeinflussen können. Die Entstehung von neuropathischen Schmerzen konnte durch Antikörper gegen den TNF-Rezeptor TNF-R1 und Pharmaka wie Etanercept (TNF-Fusionsprotein) oder das oben genannte Thalidomid (TNF-Inhibitor) verhindert werden (Sommer et al. 2001; Schäfers und Sommer 2007).

In Zusammenschau weisen diese Befunde aus klinischen Studien darauf hin, dass bei Patienten mit chronischen Schmerzsyndromen ein Ungleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen vorliegt. Dies scheint ein vermehrtes Schmerzempfinden zu begünstigen. Eine Verminderung des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 scheint nach den Ergebnissen klinischer Studien hierbei eine besondere Rolle zu spielen. Darüber hinaus gibt es auch starke Verbindungen zwischen Zytokinen und dem Opioidsystem (Peterson et al. 1998; Karaji et al. 2010). Die für die Schmerzhemmung wichtige Verbindung des Zytokinsystems mit Opioiden bzw. deren Rezeptoren wird im Folgenden näher ausgeführt.

1.3 Opiode

1.3.1 Opioidwirkung

Opiode leiten sich zum größten Teil von Alkaloiden ab, die für medizinische Zwecke aus dem Schlafmohn (*Papaver somniferum*) extrahiert werden, wobei Morphin das Hauptalkaloid darstellt. Sie sind indiziert bei starken Schmerzen und binden an spezielle Opioidrezeptoren (OR). Morphin als Prototyp der Opiode beeinflusst die Schmerzfortleitung, indem es auf Rückenmarksebene eine

Aktivierung des absteigenden, antinozizeptiven Systems auslöst, woraufhin es zur Ausschüttung von endogenen Opioiden, wie z. B. Enkephalinen, kommt. Nach Bindung des Liganden an präsynaptische Nervenendigungen kommt es auf zellulärer Ebene zur G-Protein-vermittelten Erhöhung der Kalium- und/oder Erniedrigung der Kalzium-Permeabilität. Die Membrandepolarisation wird erschwert und somit auch die Übertragung von Erregungen und folglich die Schmerzfortleitung. Die aus der Peripherie kommenden Schmerzafferenzen schalten in der Substantia gelatinosa auf das zweite Neuron um. Dies wird durch Substanz P vermittelt, wobei Morphin und endogene Opiode die Freisetzung von Substanz P hemmen (Lüllmann H. 2006; Stein und Lang 2009).

Der Einfluss der Opiode auf die Schmerzverarbeitung findet im Thalamus und im limbischen System statt, wo OR in hoher Dichte nachgewiesen wurden. Der Einfluss auf das limbische System wird mit der euphorisierenden Wirkung und dem Suchtpotential von Opioiden in Verbindung gebracht (Lüllmann H. 2006).

Opiode hemmen nicht nur die Schmerzwahrnehmung, sie aktivieren auch eine endogene Gegenregulation ihrer eigenen Wirkung, welche im Verlauf zu einer Wirkungsabschwächung, Opioidtoleranz und -abhängigkeit führt. Diese werden unter anderem über endogene Peptide mit anti-opioider Wirkung (z. B. Cholezystokinin), Internalisierung oder Desensibilisierung von OR sowie Änderungen ihrer Signalkaskade vermittelt (Ueda 2009; Watkins et al. 2009). Diese unerwünschten Wirkungen (Abhängigkeit, Opioidtoleranz, Atemdepression) werden über eine opioid-induzierte Glia-Aktivierung bewirkt, die nicht über OR, sondern über Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) vermittelt wird. TLR4 ist ein Glia-Schlüsselrezeptor der auch bei der Manifestation von neuropathischen Schmerzen eine Rolle spielt (Watkins et al. 2009).

In Nervenläsionsmodellen führte die lokale Gabe von OR-Agonisten in Abhängigkeit von der gewählten Dosis zu einer verminderten thermischen und mechanischen Hyperalgesie. Die analgetisch wirksame Dosis lag dabei aber deutlich höher als diejenige bei inflammatorisch bedingten Schmerzen (Stein et al. 1990).

1.3.2 Unterschiedliche Rezeptorpopulationen für die Wirkungsvermittlung der Opiode

Ihre Wirkung entfalten Opiode über drei verschiedene OR. Im ZNS wurden sie erstmals 1973 nachgewiesen (Pert und Snyder 1973; Simon 1973). Nach erfolgreicher Klonierung dieser drei Subtypen erhielten sie laut Nomenklatur der International Union of Pharmacology (IUPHAR) die Bezeichnung OP3 (μ , MOR), OP2 (κ , KOR) und OP1 (δ , DOR) (Milligan 2005). Sie werden in Spinalganglien gebildet und zu Nervenendigungen nach peripher oder zentral transportiert (Sehgal et al. 2011). Man findet OR sowohl auf neuronalen Zellen im PNS und ZNS, als auch auf immunologischen Zellen (Sharp et al. 1998; Pol und Puig 2004; Stein und Zollner 2009). Alle OR haben ein extrazellulär liegendes N-terminales und ein intrazelluläres C-terminales Ende mit 7 transmembranen Domänen, welche die Bindungsstelle für den jeweiligen Liganden bilden. Ausgehend von der Erkenntnis, dass verschiedene Untergruppen von OR auch unterschiedliche Wirkungen vermitteln, wurde die Idee der Multiplizität von Bindungsstellen für Opiode abgeleitet. Dies bedeutet, dass das charakteristische Wirkungsspektrum eines Opioids durch unterschiedlich stark ausgeprägte Bindung an die einzelnen OR entsteht. Zudem ist die Affinität der verschiedenen Opiode zu den Rezeptoren unterschiedlich ausgeprägt. Die Präferenz der Bindung spiegelt sich daher in ihrer jeweiligen klinischen Wirkung wieder (Pasternak 2004). In Tabelle 1 sind die jeweiligen Wirkungen der OR-Subtypen aufgeführt (Freye 2009).

Opioidrezeptor	Wirkmechanismus	Wirkungen	Substanzbeispiel
μ	Inhibitorische Wirkung	Analgesie, Atemdepression, Abhängigkeitsentwicklung, Bradykardie, Hypothermie, Miosis	Morphin, Fentanyl, Sufentanil, Piritramid
κ	Hypnosedative Wirkung	Analgesie (jedoch geringer als μ), deutlich geringere Abhängigkeitsentwicklung, Sedierung	Ketocyclazocin
δ	Regulative, auf Schmerzreaktion übergeordnete Wirkung	Regulatorisch in der Schmerzverarbeitung, Beteiligung an der Auslösung verschiedener Verhaltensweisen eines Individuums, Regulation der Freisetzung von Hypophysenhormonen (Prolaktin, STH, ACTH, TSH)	Leukenkephalin

Tabelle 1: Wirkung einzelner Opioidrezeptoren.

1.3.3 Topographische Verteilung der Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren im peripheren Nervensystem

Die Schmerzhemmung durch Opioide findet nicht nur im ZNS statt. Immunreaktivität der drei OR-Subtypen wurde ebenso auf peripheren Endigungen von primär afferenten Neuronen bzw. in Spinalganglien von Tieren (Ratte) und beim Menschen nachgewiesen (Ji et al. 1995; Stein und Zollner 2009). Es konnte gezeigt werden, dass die pharmakologischen Charakteristika weitgehend denen zentraler OR entsprechen (Machelska 2000).

Nach einer peripheren Verletzung wandern Immunzellen in das Gewebe ein und beginnen nach Stimulation mit der Produktion von endogenen Opioiden. Unter anderem werden diese Prozesse durch Chemokine und proinflammatorische Zytokine getriggert. Es kommt zu einer Aktivierung peripherer OR, die eine analgetische Wirkung durch reduzierte Erregbarkeit von Neuronen oder über eine

verminderte Ausschüttung von proinflammatorischen Neuropeptiden bewirken. Nach einer inflammatorischen Entzündung kommt es darüber hinaus zu einer Erhöhung der OR-Population in den Spinalganglien (Pol und Puig 2004; Machelska und Stein 2006; Stein und Lang 2009). Möglicherweise stellt dies eine Reaktion des Körpers auf die durch Entzündung hervorgerufenen Schmerzen und die damit einhergehende erhöhte Ausschüttung von endogenen Opioiden dar (Borner et al. 2004). Die drei Rezeptortypen werden in Spinalganglien vermehrt gebildet und durch axonalen Transport zu peripheren Nervenendigungen befördert (Sehgal et al. 2011). Zusätzlich kommt es zur Aktivierung bereits vorhandener inaktiver Rezeptoren durch das im Rahmen der Entzündung veränderte chemische Milieu (Machelska 2000) sowie zum „sprouting“, also der Vermehrung von peripheren sensorischen Nervenendigungen in verletztem Gewebe (Weihe et al. 1988). Gegensätzlich ist die Reaktion nach der peripheren Schädigung eines Nerven: Hier wird eine Verminderung der OR-Produktion z. B. in Spinalganglien beobachtet, was eine Erklärung für die verminderte Wirksamkeit und benötigte höhere Dosierung von Opioiden bei neuropathischen Schmerzen bietet (Obara et al. 2009; Hervera et al. 2011).

Opioidrezeptoren im zentralen Nervensystem

Analog zum weiteren Verlauf der Schmerzleitung wurden OR im Rückenmark, in der Substantia gelatinosa und im Hinterhorn nachgewiesen (Kuhar et al. 1973; Pert et al. 1974). Auch dort sind sie über freigesetzte endogene Opioide für die körpereigene Modulation von Schmerzreizen verantwortlich. Weiter finden sich OR in verschiedenen höheren Schaltstellen und Hirnnervenkernen. Die spezifische Verteilung der OR-Subtypen weist auf unterschiedliche Wirkungsmechanismen in der Vermittlung der Analgesie hin (Mansour 1995; Pasternak 2004).

1.3.4 Endogene Opioide

Opioidpeptide sind die natürlichen Liganden der OR. Es wurden drei Familien von Opioidpeptiden im ZNS und im neuroendokrinen System beschrieben, die jeweils

von verschiedenen Vorläuferproteinen stammen: Proopiomelanocortin (POMC), Proenkephalin (PENK) und Prodynorphin (PDYN). Aus diesen entstehen die drei Prototypen der Opioidpeptide: Beta-Endorphin, Enkephalin und Dynorphin, die alle eine unterschiedliche Affinität zu den drei OR haben (Goldstein und Cox 1977; Hughes und Kosterlitz 1977). Zu MOR und DOR haben vor allem Beta-Endorphin und Enkephalin, zu KOR vor allem Dynorphin eine hohe Affinität (Machelska 2000). Im Verlauf wurden zwei weitere Peptide entdeckt, Endomorphin-1 und 2, die eine noch stärkere Affinität zum MOR besitzen, als die bisher bekannten Opioidpeptide (Zadina et al. 1997). Opioidpeptide wurden in Immunzellen in verschiedenen tierexperimentellen Studien sowie beim Menschen gefunden (Cabot 2001) und spielen eine herausragende Rolle bei der Regulierung von Schmerzen (Machelska und Stein 2006).

1.3.5 Einfluss von Zytokinen auf die Opioid-Rezeptor-Produktion

Das Nervensystem und das Immunsystem stehen über Zytokine und Neuropeptide eng miteinander in Verbindung. Zusätzlich zu ihrer immunologischen Funktion haben Zellen des Immunsystems auch die Fähigkeit zur intrinsischen Schmerzhemmung.

Wie beschrieben, führen Immunzellen, die Opiode freisetzen, in entzündetem Gewebe zu einer endogenen Analgesie (Machelska und Stein 2006). Opiode üben durch Einfluss auf Zellaktivierung sowie Zytokinaktivierung eine antiinflammatorische Wirkung aus (Sehgal et al. 2011). Umgekehrt stimulieren Zytokine wie IL-1 *in vitro* die Freisetzung von endogenen Opioiden in geschädigtem Gewebe (Stein et al. 1990; Przewlocki et al. 1992; Cabot et al. 2001). *In vivo* wirkt die Freisetzung von opioiden Peptiden vermittelt durch IL-1, IL-6 oder TNF analgetisch (Czlonkowski et al. 1993).

Als Zytokine mit sogenannten opioidergen Eigenschaften werden solche bezeichnet, die die Produktion von OR beeinflussen. Beispielsweise induziert IL-4 in Zellkulturen von Neuronen die Transkription von MOR und DOR (Börner et al. 2004). Neben IL-4 bewirken auch andere Zytokine wie z. B. IL-1, IL-6 und TNF in

verschiedenen Zellkulturen mit neuronalen und Zellen des Immunsystems eine Erhöhung der Transkription von MOR (Kraus 2009). IL-2 ist ein weiteres Beispiel für ein opioiderges Zytokin, welches über MOR das Membranpotential in Spinalganglien beeinflusst (Song et al. 2002). Analog zur Kenntnis von opioidergen Zytokinen weisen alle OR eine durch IL-13 und IL-4 beeinflusste Domäne auf (Law 1999). Zusammenfassend gibt es daher viele Hinweise auf eine dichte Vernetzung zwischen beiden Systemen. Einige Autoren zählen Opioide daher sogar zur Familie der Zytokine (Peterson et al. 1998).

1.4 Zielsetzung der Studie

Gegenstand dieser Studie war die Untersuchung der Bedeutung des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 bei der Entstehung neuropathischer Schmerzen sowie dessen Einfluss auf die Produktion weiterer anti- und proinflammatorischer Zytokine. Um diesen Zusammenhang genauer zu untersuchen, wurden die Experimente neben wt-Mäusen auch an IL-4 ko-Mäusen durchgeführt. Die Hypothese lautete, dass IL-4 ko-Mäuse mit einem stärkeren Schmerzverhalten auf ein chronisches Schmerzmodell wie das der CCI reagieren, und dass die Produktion proinflammatorischer Zytokine im Nervensystem von IL-4 ko-Mäusen stärker ausgeprägt sein würde als bei wt-Mäusen. Da sich IL-4 und IL-13 viele Eigenschaften teilen wurde in der vorliegenden Studie auch der Frage nachgegangen, ob bei IL-4 ko-Mäusen die Produktion von IL-13 kompensatorisch gesteigert ist.

Desweiteren wurde der Einfluss von IL-4 auf die Produktion von OR mit der Hypothese untersucht, dass IL-4 ko-Mäuse im Vergleich zu wt-Mäusen eine reduzierte OR-Expression aufweisen würden. Darüberhinaus war ein Ziel dieser Studie die Etablierung eines Mausmodells für generalisierte Schmerzsyndrome, wie z. B. das Fibromyalgiesyndrom, an dem in Zukunft weitere Untersuchungen durchgeführt werden können.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Versuche wurden 20 wt-Mäuse mit C57Bl/6J Hintergrund (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) und 20 IL-4 ko-Mäuse (Jackson Laboratories, Maine, USA) verwendet. Die acht Wochen alten, weiblichen Tiere mit einem mittleren Körpergewicht von 180 bis 220 g und einem mittleren Alter von 8-12 Wochen wurden in Gruppen von maximal fünf Tieren bei einer Umgebungstemperatur von 22-24°C in Käfigen gehalten. Ein Hell-Dunkel-Rhythmus von 12:12 Stunden wurde eingehalten und Trockenfutter sowie Wasser waren *ad libitum* vorhanden. Alle Tierversuche wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt.

2.2 Modell der CCI

Bei jeweils zehn wt- und IL-4 ko-Mäusen wurde eine einseitige CCI am rechten N. ischiadicus durchgeführt (Bennett 1988; Schäfers et al. 2004). Die übrigen zehn Mäuse in jeder Gruppe erhielten keine Nervenläsion und dienten als Kontrolltiere. Die CCI erfolgte unter Narkose mittels i.p. appliziertem Isofluran (Dosis: 10 mg/kg Körpergewicht).

Unter lichtmikroskopischer Sicht (WILD M3B Mikroskop, Leica, Bensheim, Germany) wurde zunächst die Haut über dem Oberschenkel am rechten Hinterlauf inzidiert und durch stumpfe Präparation entlang des Musculus (M.) biceps femoris der N. ischiadicus dargestellt. Anschließend wurden ca. 5 mm proximal der Nervenauftellung in N. peroneus communis und N. tibialis drei Ligaturen mittels 7-0 Prolene-Fäden in einem Abstand von 1 mm locker um den Nerven gelegt. Nach leichtem Anzug der Ligaturen, so dass es zu einer kurzen Zuckbewegung des Hinterlaufs kam, wurde die Wunde in anatomischen Schichten verschlossen.

2.3 Verhaltenstestungen

Für die Verhaltenstestungen wurden die 20 wt- und IL-4 ko-Mäuse nach CCI insgesamt über 28 Tage beobachtet. Es wurden Verhaltenstests zur Bestimmung der mechanischen Wegzugsschwelle sowie zur Bestimmung der thermischen Wegzugslatenz angewendet. Beide Tests führte derselbe, bezüglich Genotyp und durchgeführter Operation verblindete Untersucher zu gleichen Tageszeitpunkten durch, um externe Einflussfaktoren weitestgehend auszuschließen. Präoperativ fanden jeweils zwei Vortestungen statt, um Ausgangsdaten zu erhalten und um die Tiere an die Testverfahren zu gewöhnen. Die Nachttestungen erfolgten an den Tagen 3, 7, 8, 9, 14, 22 und 28 nach CCI.

Jeweils fünf Tieren der operierten wt- bzw. ko-Gruppe wurde darüber hinaus an den Tagen des Schmerzmaximums (Tag 7, 8 und 9) Morphin in gleicher Dosierung injiziert. Die restlichen fünf Tiere erhielten als Placebo die entsprechende Menge an physiologischer Kochsalzlösung (Natriumchlorid, NaCl).

2.3.1 Bestimmung der thermischen Wegzugslatenz

Zur Bestimmung der Wegzugslatenz auf einen thermischen Stimulus verwendete man die Methode von Hargreaves (Hargreaves 1988). Die Versuchstiere wurden dazu in einer Plexiglasbox auf eine Glasplatte mit 3 mm Stärke gesetzt und nach Gewöhnung der Tiere an die Testumgebung eine Hitzequelle (Ugo Basile Algesiometer, Comerio, Italien) unterhalb der rechten bzw. linken Hinterpfote platziert. Eine automatische Stoppuhr diente zur Messung der Zeit, bis die Maus die jeweils Hitze-stimulierte Pfote wegzog. Die Testung erfolgte abwechselnd an beiden Hinterpfoten mit einem Zeitintervall von mindestens fünf Minuten pro Pfote. Von jeder Seite wurden drei Werte bestimmt, aus denen dann ein Mittelwert gebildet wurde. Um hitzebedingte Gewebeschäden zu vermeiden, beschränkte sich die maximale Einwirkdauer der Hitzequelle auf 15 Sekunden.

2.3.2 Bestimmung der mechanischen Wegzugsschwelle

Die Testung der mechanischen Wegzugsschwelle erfolgte mittels von-Frey-Filamenten nach der Methode von Chaplan (Chaplan et al. 1994). Dafür setzte man die Mäuse in eine Plexiglasbox mit offenem Boden auf ein Drahtgittergestell. Ruhten alle vier Pfoten auf dem Gittergestell, wurde ein von-Frey-Filament in aufsteigender Stärke, beginnend mit 0,69 g, mit leichtem Druck auf die plantare Seite der ipsi- bzw. kontralateralen Hinterpfote gesetzt, so dass es sich leicht bog, und dann über drei Sekunden ein konstanter Druck ausgeübt. Es erfolgten abwechselnd sechs Messungen an jeder Pfote. Zwischen den Messungen betrug das Zeitintervall an derselben Pfote mindestens eine Minute und das zur kontralateralen Pfote mindestens 30 Sekunden. Zog die Maus bei der Anwendung eines von-Frey-Filaments die Pfote weg, wurde die Testung mit dem nächsten feineren Filament wiederholt. Wurde die Pfote nicht weggezogen, erfolgte die nächste Testung mit dem stärkeren Filament. Die Filamentstärke, die in der Hälfte der Messungen ein Wegziehen der Hinterpfote auslöste, wurde schließlich als mechanische Wegzugsschwelle in Gramm notiert.

2.4 Analgetische Behandlung

Die analgetische Behandlung der Tiere erfolgte zum Zeitpunkt des Schmerzmaximums nach CCI-Läsion am siebten, achten und neunten postoperativen Tag. Aus beiden Gruppen wurden jeweils fünf Tieren täglich eine Dosis Morphin i.p. (10 mg/kg Körpergewicht [KG]) injiziert; weitere fünf Tiere erhielten dasselbe Volumen NaCl i.p. Die verbliebenen zehn Mäuse pro Gruppe dienten als Kontrolle und erhielten keine Behandlung. Die Morphindosis von 10 mg/kg KG erwies sich in Vorversuchen als geeignet, da sie bei maximaler Analgesie zur geringsten Beeinträchtigung des Verhaltens führte. Die Verhaltenstestungen wurden zwei, vier und sechs Stunden nach Morphingabe durchgeführt.

2.5 Gewebeentnahme

Nach Beendigung der Verhaltenstestungen erfolgte an Tag 28 nach CCI die Gewebeentnahme. Zu diesem Zeitpunkt war das Schmerzverhalten in beiden Testverfahren noch nachweisbar. Die Tiere erhielten eine tiefe Isoflurannarkose und wurden anschließend durch Dekapitation getötet.

Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden Anteile des PNS und ZNS entnommen. Aus dem PNS wurde der zur Läsion ipsilaterale N. ischiadicus, welcher die drei Ligaturen bis 1 cm proximal mit einschloss, sowie ein analoges Segment aus dem kontralateralen Nerven entnommen. Die Anteile des ZNS beinhalteten lumbales und zervikales Rückenmark sowie Kortex, Thalamus, Hypothalamus, Pons und Striatum.

Die jeweiligen Anteile des PNS und ZNS wurden bei den Kontrolltieren von beiden Körperseiten gemeinsam untersucht, während das Gewebe bei den operierten Mäusen seitengetreunt entnommen wurde. Das Gewebe wurde nach Entnahme jeweils in sterilen Eppendorf Caps (0,2 ml, Eppendorf GmbH, Eppendorf, Germany) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

2.6 Molekularbiologische Untersuchungen zur Expression von Zytokinen und Opioid-Rezeptoren

2.6.1 RNA-Extraktion

Die Extraktion der mRNA wurde nach der Methode von Chomczynski durchgeführt (Chomczynski und Sacchi 1987). Sie fand unter den üblichen Sterilitätsbedingungen statt, wie z. B. Verwendung autoklavierter Pipettenspitzen, Gebrauch von Einmalhandschuhen und Arbeit unter Luftabzug sowie der Benutzung von RNase-freiem Wasser.

Das aufzureinigende Gewebe wurde zunächst auf Eis aufgetaut und zu jeder Probe 600 μ l Trizol[®]-Reagenz (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) zugegeben. Mit Hilfe eines Dispergierstabs (Polytron PT 1600 E[®], Kinematica, Luzern, Schweiz) wurde jede Probe mindestens 30 Sekunden homogenisiert, wobei der Dispergierstab zwischen den einzelnen Proben mit 75 prozentigem Ethanol und Diethylpyrocarbonat-behandeltem Wasser (1 Liter demineralisiertes Wasser + 1 ml DEPC (Diethyl-Pyrocarbonat)); DePC) gereinigt wurde. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten (min) bei Raumtemperatur wurde anschließend jeder Probe 300 μ l Chloroform hinzu gegeben, diese danach gründlich durchmischt (Vortex GLW L46, Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg, Germany) und die Proben bei 4°C und 13000 rpm für 15 min zentrifugiert. Die dadurch entstandene obere RNA-haltige Phase konnte anschließend abpipettiert und in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Cap übergeführt werden. Nach Zugabe von 1,1 μ l Glycogen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) sowie 600 μ l Isopropylalkohol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) wurden die einzelnen Proben abschließend durchmischt und über Nacht bei -20 °C inkubiert.

Die Weiterverarbeitung am nächsten Tag begann mit dem Zentrifugieren der Proben bei 4°C und 13000 rpm für 15 min und dem vorsichtigen Dekantieren des Überstandes. Zu jeder Probe wurde danach 1 ml 75-prozentiges Ethanol gegeben, diese durchmischt, bei 4°C und 13000 rpm für 10 min zentrifugiert und der Überstand erneut abgekippt. Die so ausgefällte und konzentrierte RNA konnte dann auf einem Heizblock (Liebisch, Bielefeld, Germany) bei 42°C 15 min getrocknet, in 33 μ l DEPC-Wasser gelöst und nach gründlicher Durchmischung und Inkubation bei 55°C für 10 min über Nacht bei -20°C aufbewahrt werden.

Zur Bestimmung der RNA-Ausbeute erfolgte die photometrische Messung der optischen Dichte der jeweiligen Probe (Eppendorf BioPhotometer, Eppendorf GmbH, Eppendorf, Deutschland). Dazu wurden die Proben auf Eis aufgetaut und 3 μ l jeder Probe in ein mit 87 μ l DEPC-Wasser gefülltes 1,5 ml Eppendorf-Cap gegeben. Die jeweilige RNA-Konzentration in ng/ μ l wurde als Mittelwert aus jeweils drei Messungen als Verhältnis von 260/280 nm ermittelt.

2.6.2 Reverse Transkriptions-PCR

Die reverse Transkription dient dazu RNA in cDNA (copy DNA) umzuschreiben. Dazu wurde von jeder Probe eine RNA-Menge von 500 ng eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in einem Gesamtvolumen von 100 μ l. Jedem Cap wurde zusätzlich zur jeweiligen RNA-Menge soviel DEPC-Wasser hinzugefügt, dass ein Volumen von 34,75 μ l erreicht wurde. Abschließend wurde zu jeder Probe 65,25 μ l eines Premixes aus den in Tabelle 2 angeführten Komponenten gegeben. Sämtliche Komponenten wurden von demselben Hersteller (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Komponente	Volumen
10 x RT Buffer	10,0 μl
25 mM MgCl ₂	22,0 μl
DesoxyNTPs Mixture	20,0 μl
Random Hexamers	5,0 μl
RNase Inhibitor	2,0 μl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50U/ μ l)	6,25 μl
Gesamtvolumen	65,25 μl

Tabelle 2: Komponenten des Premix zur Durchführung der reversen Transkription.

Nach Durchmischung der Proben konnte die reverse Transkription in einem Thermocycler (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) unter unten stehenden Bedingungen durchgeführt werden. Anschließend erfolgte die Lagerung der gewonnenen cDNA bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C.

	Primer-Bindung	Reverse Transkription	RT-Inaktivierung
Zeit	10 min	60 min	25 min
Temperatur	38°C	48°C	95°C

Tabelle 3: Thermocycler-Bedingungen zur Durchführung der reversen Transkription.

2.6.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Mittels qRT-PCR wurde die RNA-Expression bestimmt. Dabei handelt es sich um eine Weiterentwicklung der konventionellen PCR-Methode, die eine schnelle und automatisierte Quantifizierung von mRNA in Geweben auch bei sehr geringer Expression ermöglicht. Für jedes zu messende Zytokin bzw. für jeden Opioidrezeptor wurde ein primerspezifischer Premix vorbereitet. Dies erfolgte ebenfalls für die 18s-RNA, die als endogene Kontrolle diente. Alle Komponenten wurden von demselben Hersteller bezogen (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland).

Die Reaktion zur Messung des Zielgens erfolgte in einem Gesamtvolumen von 25 μ l. Es wurden jeweils 5 μ l der zu untersuchenden Probe mit 22,5 μ l Premix, bestehend aus RNase-freiem Wasser, Universal TaqMan Master Mix und dem jeweiligen target-spezifischen Primer, gemischt. Zur Quantifizierung der 18s-RNA wurden jeweils 2,5 μ l einer Probe mit 23,75 μ l Premix, bestehend aus RNase freiem Wasser, Universal TaqMan Master Mix und dem für die 18s-RNA spezifischen Primers, gemischt.

Die targetspezifischen Primer wurden als TaqMan gene expression Assays von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) bezogen. Nachfolgend sind die untersuchten Zielgene mit der jeweiligen Assay-ID zusammengestellt.

Murine primer	Assay-ID
TNF	Mm00443258_m1
IL-1 beta	Mm00434228_m1
IL-10	Mm00439616_m1
IL-13	Mm00434204_m1
MOR	Mm00440568_m1
DOR	Mm00443063_m1
KOR	Mm00440561_m1
18s	Hs99999901_s1

Tabelle 4: Zielgene der Primer mit dazugehöriger Assay-ID.

Auf einer 96-well-Platte erfolgte dann die Messung des Zielgens als Triplet (3 wells je cDNA-Probe), während die 18s-RNA als Doublet (2 wells je cDNA-Probe) pipettiert wurde. Als Nullkontrollen diente sowohl für die Zielgen-mRNA als auch für die 18s-RNA-Proben ein Triplet RNase-freies Wasser. Die Platte wurde abschließend mit Caps verschlossen und die Reaktion in dem GeneAmp 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) durchgeführt. Begonnen wurde mit einer Inkubationsphase bei 50°C für 2 min, der eine weitere bei 95°C für 10 min folgte. Schließlich wurden 40 Amplifikationszyklen für 15 Sekunden bei 95°C und für 1 min bei 60°C durchgeführt.

Die relative Quantifizierung der mRNA im untersuchten Gewebe erfolgte durch die komparative $\Delta\Delta Ct$ -Methode (Winer et al. 1999). Der Ct-Wert (engl. threshold cycle) einer Probe ist dabei derjenige von insgesamt 40 Amplifikationszyklen, bei dem das Fluoreszenzsignal erstmals detektiert wird. So bedeutet ein niedriger Ct-Wert eine hohe mRNA-Expression des zu untersuchenden Zielgens in der Probe; ein hoher Ct-Wert von 40 hingegen zeigt an, dass sich keine mRNA darin befindet. Von dem Ct-Wert der Ziel-mRNA wurde derjenige der endogenen Kontrolle abgezogen und dieser Wert wiederum zum Ct-Wert eines für jedes Gewebe und Ziel-mRNA spezifischen Kalibrators in Relation gesetzt und in $2^{-\Delta\Delta Ct}$ angegeben ($\Delta\Delta Ct = [Ct \text{ Ziel (Unbekannte Probe)} - Ct \text{ Endogene Kontrolle (Unbekannte Probe)}] - [Ct \text{ Ziel (Kalibrator)} - Ct \text{ Endogene Kontrolle (Kalibrator)}]$). Die Bestimmung des Kalibrators erfolgte aus Gewebe unbehandelter und nicht operierter Kontrolltiere und wurde auf jeder Platte erneut

hinzupipettiert und gemessen. Bei jeder Messung sollte dieser denselben Wert ergeben und eine Vergleichbarkeit zwischen den Platten ermöglichen. Bei der Auswertung wurden Abweichungen von dem zu erwarteten Ct-Wert des Kalibrators von +/- 1 toleriert.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und Erstellung der Graphen wurde mit der Software SPSS Version 17.0 durchgeführt (SPSS Inc., Chicago, USA). Die Ergebnisse der Verhaltenstests zeigten im Kolmogorow-Smirnow-Test eine Normalverteilung, so dass zur Untersuchung von Gruppenunterschieden ein ANOVA (engl. analysis of variance) angewandt wurde. Durch eine post-hoc-Tukey-Korrektur konnten die einzelnen Testtage analysiert werden. Da die mRNA-Ergebnisse nicht normalverteilt waren, wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test zum Paarvergleich der verschiedenen Zeitpunkte mit einer Bonferroni-Korrektur angewandt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit wurde mit 5 % festgesetzt. Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. Die Ergebnisse der Verhaltenstests wurden zur Veranschaulichung der Mittelwerte und deren Standardabweichung als Streudiagramme dargestellt. Die Darstellung der Daten aus der qRT-PCR erfolgte durch Boxplot-Diagramme zur Veranschaulichung des Medians, der oberen 75%igen und unteren 25%igen Quartile, sowie des kleinsten und größten Wertes.

3. Ergebnisse

3.1 Verhaltenstestungen

3.1.1 Einfluss der CCI auf die thermische Wegzugslatenz bei wt- und IL-4 ko-Mäusen

Zwischen unbehandelten wt- und IL-4 ko-Mäusen gab es im Hitzetest bei Erhebung der Ausgangswerte keinen Unterschied in der Reaktion auf einen thermischen Stimulus. Nach CCI zeigte sich an der ipsilateralen Pfote sowohl bei wt- als auch bei IL-4 ko-Mäusen eine verminderte Wegzugslatenz auf den thermischen Stimulus. Dabei gab es zwischen beiden Gruppen keinen Unterschied (wt und ko $p < 0,001$; Abb. 1). Der Effekt an der ipsilateralen Pfote konnte bereits am dritten Tag nach CCI beobachtet werden und blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes (Tag 28) bestehen. An der kontralateralen Pfote änderte sich die thermische Wegzugslatenz nicht.

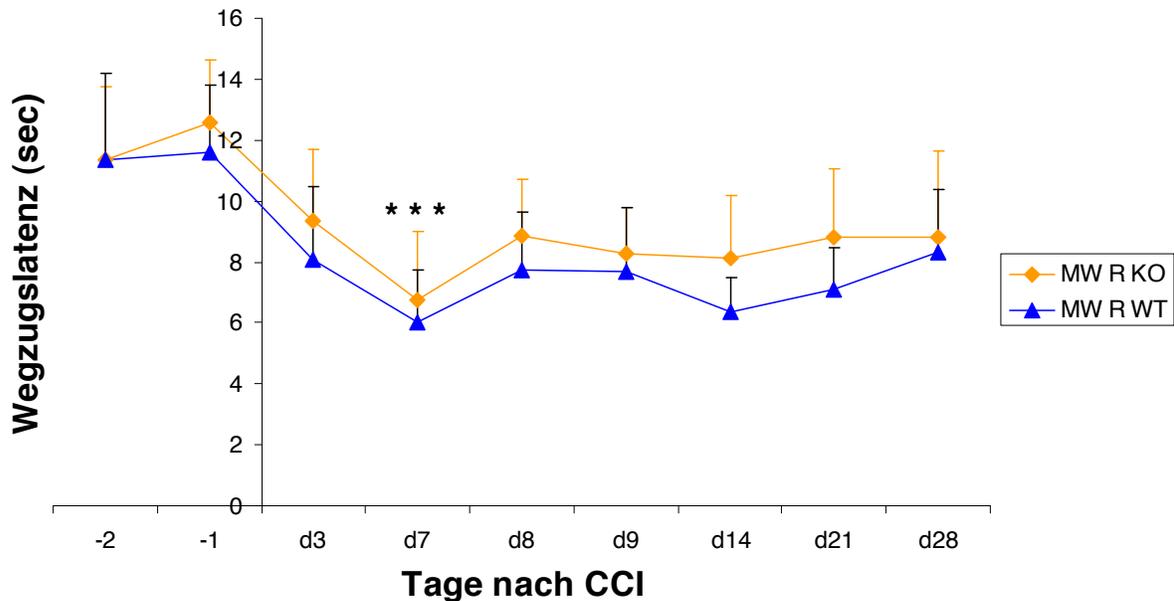


Abb. 1: Thermische Wegzugslatenz vor und nach CCI. Beide Gruppen zeigen nach CCI eine verminderte Wegzugslatenz auf thermische Stimuli (** $p < 0,001$).

3.1.2 Einfluss der CCI auf die mechanische Wegzugsschwelle bei wt- und IL-4 ko-Mäusen

Bei der Testung der mechanischen Wegzugsschwelle mittels von-Frey-Filamenten zeigten unbehandelte IL-4 ko-Mäuse eine deutliche Überempfindlichkeit im Vergleich zu wt-Mäusen ($p < 0,001$; Abb. 2a). Nach CCI fand sich an der ipsilateralen Pfote bei wt- und IL-4 ko-Mäusen bereits am dritten Tag eine Verminderung der Wegzugsschwelle im von-Frey-Test. Die mechanische Wegzugsschwelle von IL-4 ko-Mäusen sank jedoch im Vergleich zu den wt-Tieren nach CCI nicht noch weiter ab (wt: $p = 0,009$; ko: $p = 0,001$; Abb. 2b). Die verminderte Wegzugsschwelle blieb bis zum 28. postoperativen Tag bestehen. An der kontralateralen Pfote änderte sich die Wegzugsschwelle auf mechanische Stimulation nicht.

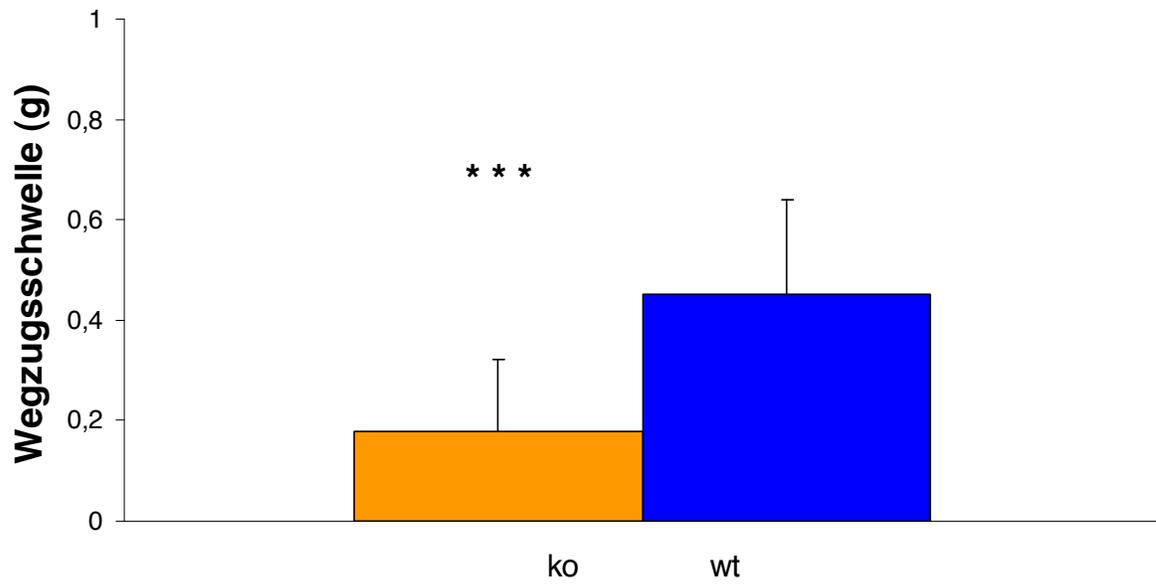


Abb. 2a: Mechanische Wegzugsschwelle vor CCI. Bei IL-4 ko-Mäusen zeigt sich eine verminderte mechanische Wegzugsschwelle (** $p < 0,001$).

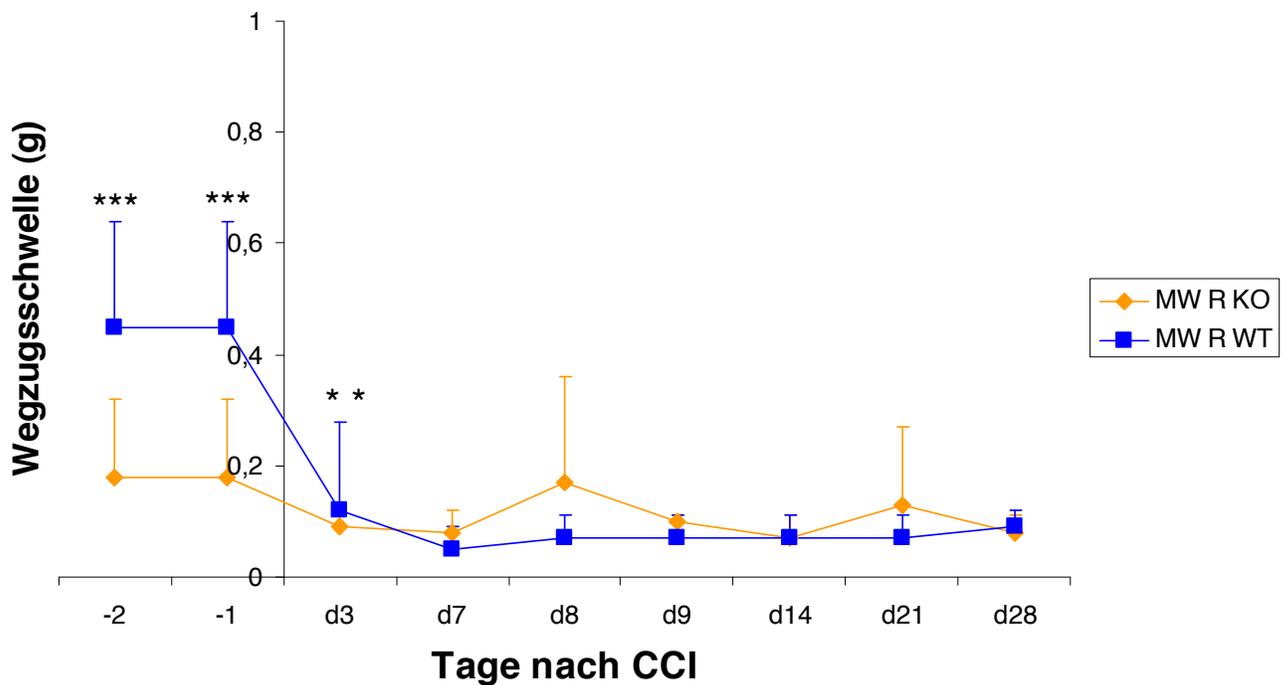


Abb. 2b: Mechanische Wegzugsschwelle nach CCI. Bei beiden Genotypen ließ sich bereits am dritten Tag nach CCI eine verminderte mechanische Wegzugsschwelle feststellen (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.1.3 Analgetische Wirkung von Morphin bei wt- und IL-4 ko-Mäusen

Im nächsten Schritt wurde die analgetische Wirkung von Morphin zum Zeitpunkt des Schmerzmaximums nach CCI untersucht. Da IL-4, wie oben beschrieben, die Transkription von MOR und DOR induziert, war zu erwarten, dass die Wirkung von Morphin bei IL-4 ko-Mäusen schwächer ausfallen würde als bei wt-Mäusen. IL-4 ko-Mäuse zeigten jedoch schon zwei Stunden nach i.p. Injektion von Morphin am siebten postoperativen Tag eine Normalisierung der Wegzugsschwelle für thermische ($p=0,02$, Abb. 3) sowie der Wegzugsschwelle für mechanische Reize ($p=0,046$, Abb. 4). Bei wt-Mäusen war dieser Effekt am siebten postoperativen Tag erst vier

Stunden nach Injektion zu beobachten. Mäuse der IL-4 ko-Gruppe reagierten also schneller auf die Gabe von Morphin.

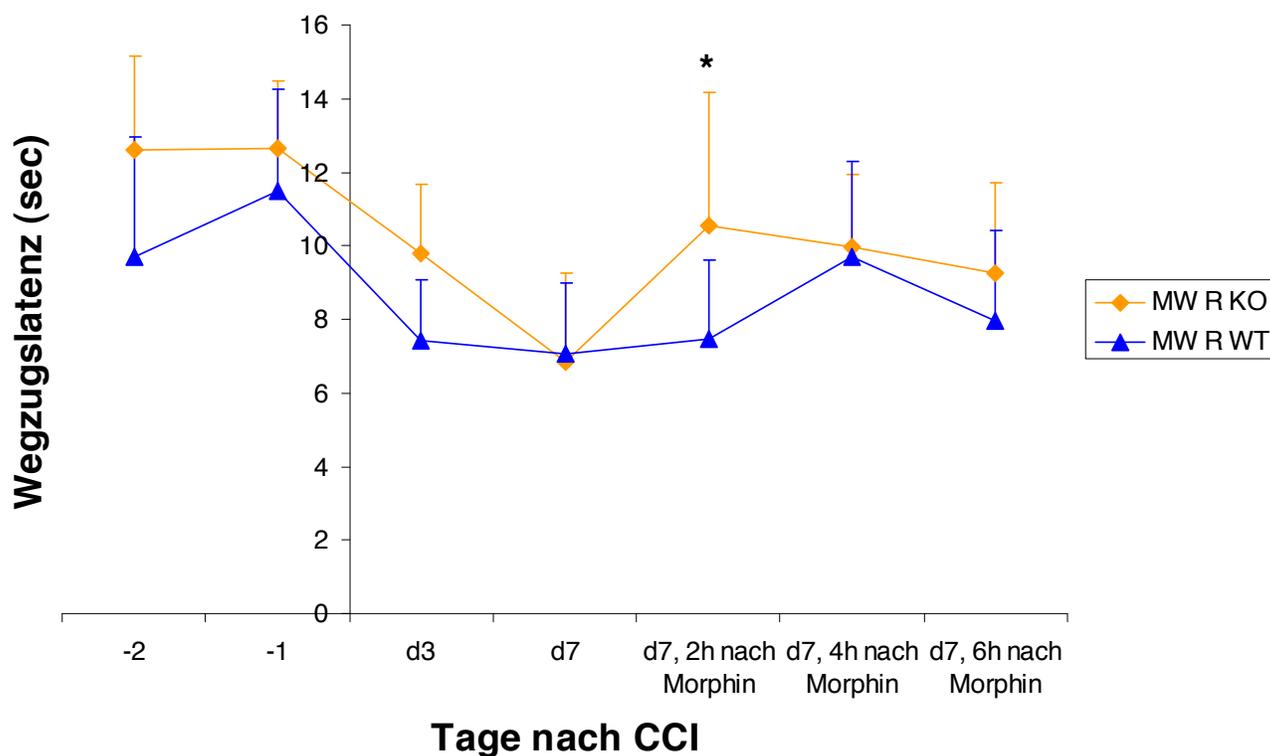


Abb. 3: Einfluss von Morphin auf die thermische Wegzugslatenz nach CCI an Tag 7 nach CCI. IL-4 ko-Mäuse sprechen schneller auf Morphingabe an (* $p < 0,05$).

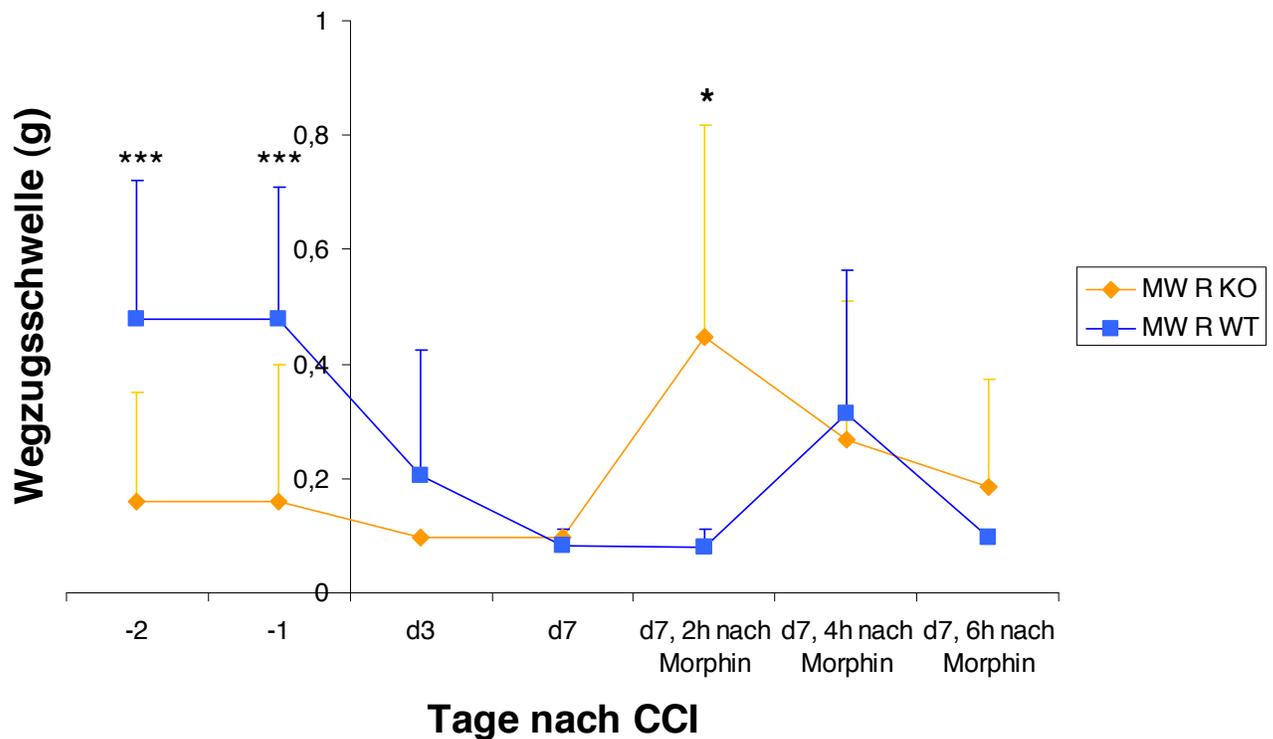


Abb. 4: Einfluss von Morphin auf die mechanische Wegzugsschwelle nach CCI. IL-4 ko-Mäusen sprechen schneller auf Morphingabe an (* $p < 0,05$).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass unbehandelte IL-4 ko-Mäuse im Vergleich zur Gruppe der wt-Mäuse eine verminderte mechanische Wegzugsschwelle und somit eine gesteigerte Empfindlichkeit auf mechanische Stimulation zeigen. Bezüglich thermischer Stimuli war zwischen beiden Genotypen im unbehandelten Zustand kein Unterschied zu beobachten. Nach CCI war zwischen beiden Genotypen kein Unterschied mehr in der Reaktion auf thermische oder mechanische Stimulation nachzuweisen. Zum Zeitpunkt des Schmerzmaximums nach CCI sprachen IL-4 ko-Mäuse schneller auf Morphingabe an als die Gruppe der wt-Tiere.

Nach Beendigung der Verhaltenstests erfolgte am 28. postoperativen Tag die Gewebeentnahme für die nachfolgenden Untersuchungen zur Messung der Zytokin- und Opioidrezeptorexpression.

3.2 Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im N. ischiadicus 28 Tage nach CCI

3.2.1 TNF

Zwischen beiden Genotypen gab es im N. ischiadicus bezüglich der Ausgangswerte für TNF keinen Unterschied. Nach CCI zeigten sowohl IL-4 ko- als auch wt-Mäuse am 28. postoperativen Tag im ipsilateralen N. ischiadicus eine vermehrte Genexpression von TNF im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren (ko: $p < 0,001$; wt: $p = 0,007$; Abb. 5). Dieser Effekt war bei den IL-4 ko-Mäusen stärker ausgeprägt (nicht signifikant). Im kontralateralen N. ischiadicus war die TNF-Genexpression bei mit CCI behandelten Tieren beider Genotypen genauso stark ausgeprägt wie bei unbehandelten Kontrolltieren.

3.2.2 IL-1 beta

Die IL-1-beta-Genexpression im ipsilateralen N. ischiadicus unterschied sich zwischen unbehandelten IL-4 ko- und wt-Mäusen nicht. Vier Wochen nach CCI war bei IL-4 ko- und wt-Mäusen im ipsilateralen N. ischiadicus eine im Vergleich zu Kontrolltieren erhöhte Genexpression von IL-1 beta zu beobachten ($p < 0,001$ ko und wt; Abb. 5). Dies war bei den IL-4 ko-Mäusen stärker ausgeprägt ($p < 0,001$). Im kontralateralen N. ischiadicus gab es dagegen keine Differenz zwischen behandelten und unbehandelten Tieren.

3.2.3 IL-10

Zwischen IL-4 ko- und wt-Mäusen fand sich im ipsilateralen N. ischiadicus vor CCI kein Unterschied in der Genexpression von IL-10. Vier Wochen postoperativ zeigten lediglich IL-4 ko-Mäuse einen Anstieg der Genexpression für IL-10 ($p = 0,014$; Abb. 5). Im kontralateralen Nerven gab es keinen Unterschied der IL-10 Genexpression zwischen beiden Genotypen.

N. ischiadicus, ipsilateral

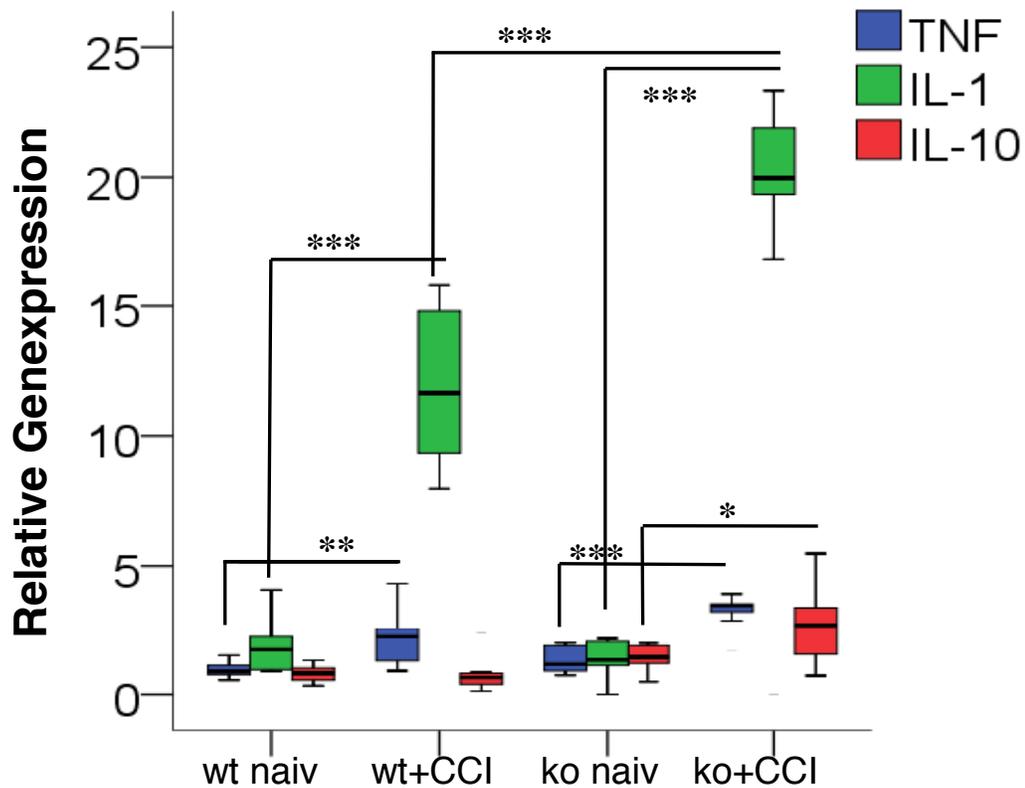


Abb. 5: Relative Genexpression der Zytokine TNF, IL-1 beta und IL-10 im ipsilateralen N. ischiadicus nach CCI (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

3.2.4 IL-13

Weder bei unbehandelten Kontrolltieren noch bei den mit CCI behandelten Tieren beider Genotypen konnte eine IL-13-Genexpression im ipsilateralen oder kontralateralen N. ischiadicus festgestellt werden (ohne Abbildung). Diesem Ergebnis entsprechend gelang auch anderen Arbeitsgruppen der Nachweis von IL-13 im N. ischiadicus nicht (Saadoun et al. 2005).

3.3 Genexpression von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im lumbalen und zervikalen Rückenmark 28 Tage nach CCI

3.3.1 TNF

Zwischen unbehandelten IL-4 ko- und wt-Mäusen zeigte sich im lumbalen Rückenmark kein Unterschied in der konstitutiven TNF-Genexpression. Vier Wochen nach CCI fand sich nur bei IL-4 ko-Mäusen eine erhöhte Expression für TNF im ipsilateralen lumbalen Rückenmark ($p=0,001$; Abb. 6). Im kontralateralen lumbalen Rückenmark zeigte sich zwischen beiden Genotypen behandelte und unbehandelte Mäuse dagegen kein Unterschied.

Im zervikalen Rückenmark waren die Ausgangswerte der TNF-Genexpression sowohl bei Kontrolltieren als auch bei mit einer CCI behandelten Tieren beider Genotypen gleich stark ausgeprägt.

3.3.2 IL-1 beta

Die Ausgangswerte der IL-1-beta-Genexpression im lumbalen Rückenmark differierten zwischen naiven IL-4 ko- und wt-Mäusen nicht. Vier Wochen nach CCI zeigte sich im ipsilateralen Rückenmark nur bei IL-4 ko-Mäusen eine vermehrte Expression von IL-1 beta ($p=0,024$; Abb. 6). Im kontralateralen und zervikalen Rückenmark fand sich kein Unterschied in der Genexpression zwischen behandelten und unbehandelten Mäusen beider Genotypen.

3.3.3 IL-10

Zwischen unbehandelten IL-4 ko- und wt-Mäusen war im lumbalen Rückenmark kein Unterschied in den Ausgangswerten der IL-10-Genexpression festzustellen. Vier Wochen nach CCI fand sich ebenfalls ausschließlich bei IL-4 ko-Mäusen ein Anstieg der IL-10-Expression ($p=0,032$; Abb. 6). Im kontralateralen und zervikalen Rückenmark zeigte sich hingegen keine Differenz in der Genexpression von IL-10 bei behandelten und unbehandelten Tieren beider Genotypen.

3.3.4 IL-13

Bei unbehandelten IL-4 ko- und wt-Mäusen war die Genexpression für IL-13 im lumbalen Rückenmark in gleicher Höhe zu messen. Vier Wochen postoperativ zeigten lediglich IL-4 ko-Mäuse eine vermehrte IL-13-Genexpression ($p=0,001$; Abb. 6). Im kontralateralen und zervikalen Rückenmark von unbehandelten und mit CCI behandelten Tieren gab es keinen Unterschied der Genexpression von IL-13.

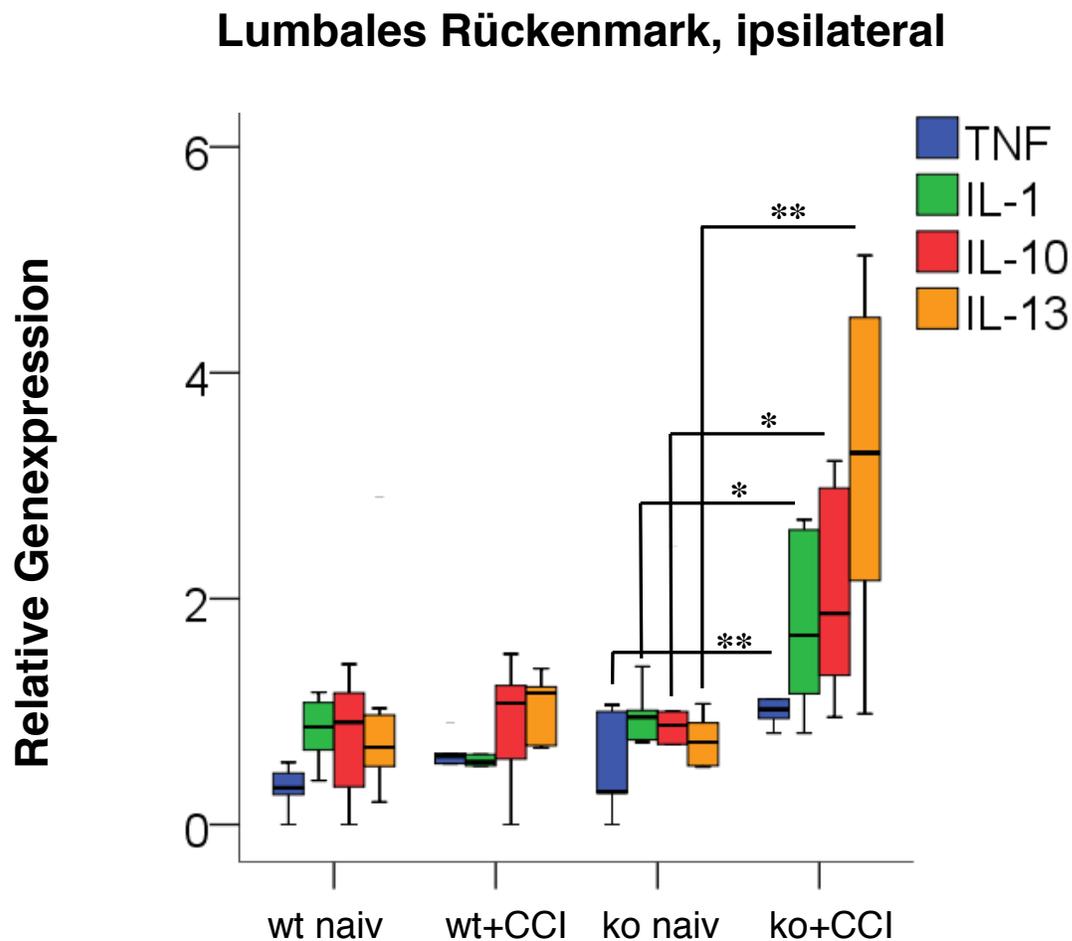


Abb. 6: Relative Genexpression der Zytokine TNF, IL-1 beta, IL-10 und IL-13 im ipsilateralen lumbalen Rückenmark nach CCI (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass vor CCI die Genexpression der pro- bzw. antiinflammatorischen Zytokine TNF, IL-10, IL-13 und IL-1 beta im N. ischiadicus sowie im lumbalen und zervikalen Rückenmark bei IL-4 ko- und wt-Mäusen gleich stark ausgeprägt war. Nach CCI fand sich noch vier Wochen postoperativ im N. ischiadicus von IL-4 ko-Mäusen eine im Vergleich zu wt-Tieren deutlich höhere Genexpression des proinflammatorischen Zytokins IL-1 beta. Nur bei IL-4 ko-Mäusen ließ sich nach CCI im ipsilateralen Rückenmark eine erhöhte Genexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 beta sowie der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 nachweisen.

3.4 Genexpression der Opioid-Rezeptoren μ , κ und δ im zentralen Nervensystem 28 Tage nach CCI

3.4.1 MOR-Genexpression im zentralen Nervensystem nach CCI

Die Genexpression von MOR in den untersuchten Anteilen des ZNS (Cortex, Striatum, Pons, Thalamus und Hypothalamus) unterschied sich im unbehandelten Zustand zwischen beiden Genotypen nicht. Nach CCI gab es in Pons und Hypothalamus, welche als Kontrollregionen dienten, keine vermehrte Genexpression von MOR. Im kontralateralen frontalen Kortex konnte man 28 Tage nach CCI bei IL-4 ko- und wt-Mäusen hingegen eine Reduktion der Expression von MOR beobachten (ko: $p=0,003$; wt: $p=0,004$; Abb. 7).

Im Striatum war im ipsilateralen Anteil bei IL-4 ko- und wt-Mäusen nach CCI ebenfalls eine reduzierte Genexpression für MOR festzustellen, wobei diese nicht statistisch signifikant war. Im kontralateralen Striatum fand sich bei wt-Mäusen eine Tendenz zur verminderten Expression. In der IL-4 ko-Gruppe war dagegen keine Veränderung bezüglich der Genexpression von MOR zu messen.

Sowohl im ipsilateralen als auch im kontralateralen Thalamus war nach CCI kein signifikanter Unterschied in der Genexpression von MOR zwischen beiden

Genotypen zu beobachten; sie war jedoch bei IL-4 ko-Mäusen insgesamt höher als bei den wt-Tieren.

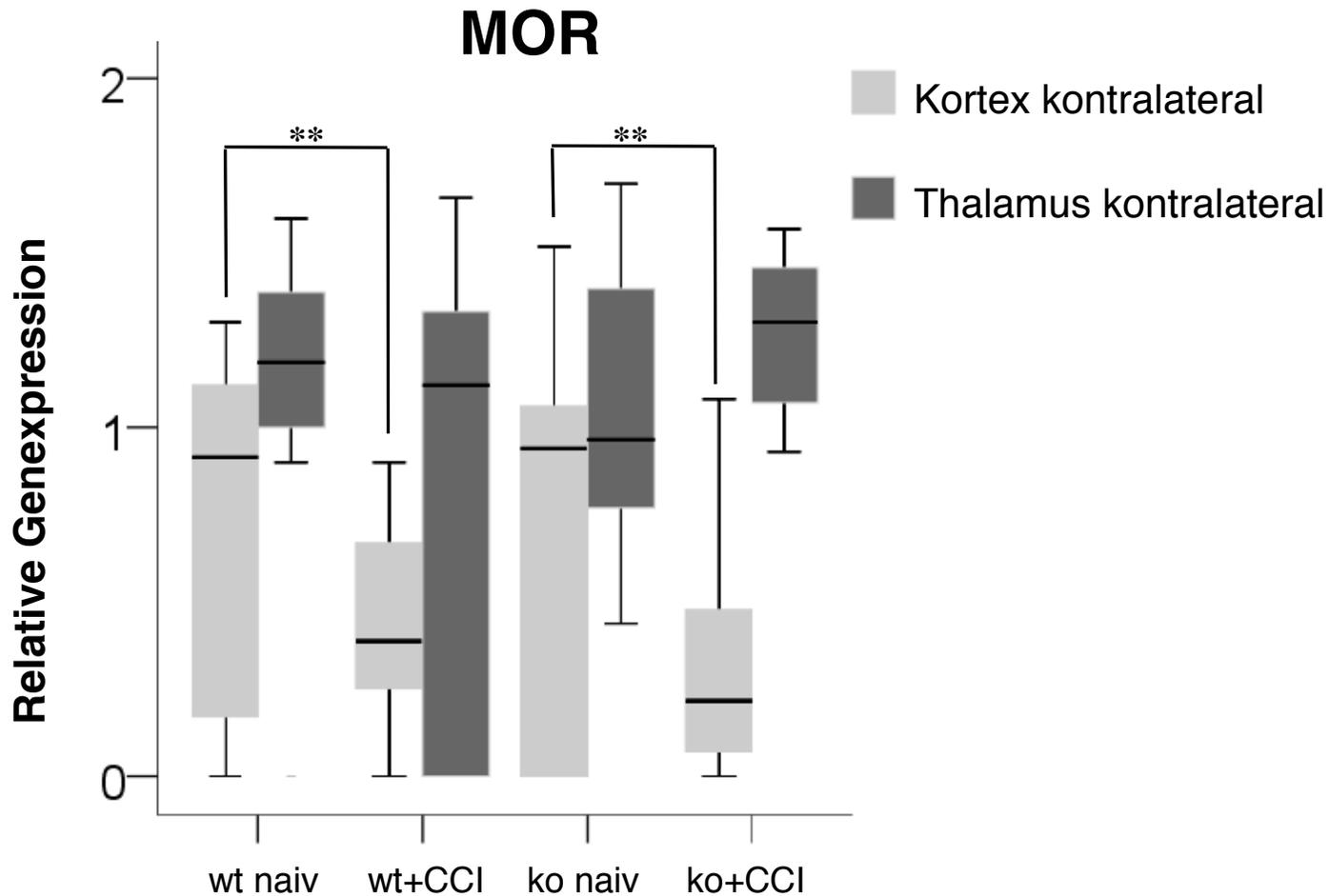


Abb. 7: Relative Genexpression von MOR im kontralateralen Kortex sowie kontralateralen Thalamus nach CCI (**p<0,01).

3.4.2 DOR-Genexpression im zentralen Nervensystem nach CCI

Zwischen den unbehandelten Genotypen gab es bezüglich der konstitutiven Genexpression von DOR in den untersuchten Anteilen des zentralen Nervensystems keinen Unterschied. Nach CCI gab es in Pons und Hypothalamus,

aber auch in den untersuchten Anteilen des Cortex und Striatums, keinen Anstieg der Genexpression von DOR. Im kontralateralen Thalamus fand sich dagegen sowohl bei IL-4 ko- als auch bei wt-Mäusen 28 Tage nach CCI eine gesteigerte Genexpression ($p < 0,001$, Abb. 8). Dieser Anstieg war bei IL-4 ko-Mäusen stärker ausgeprägt. Im ipsilateralen Thalamus ließ sich kein Anstieg der Genexpression von DOR feststellen.

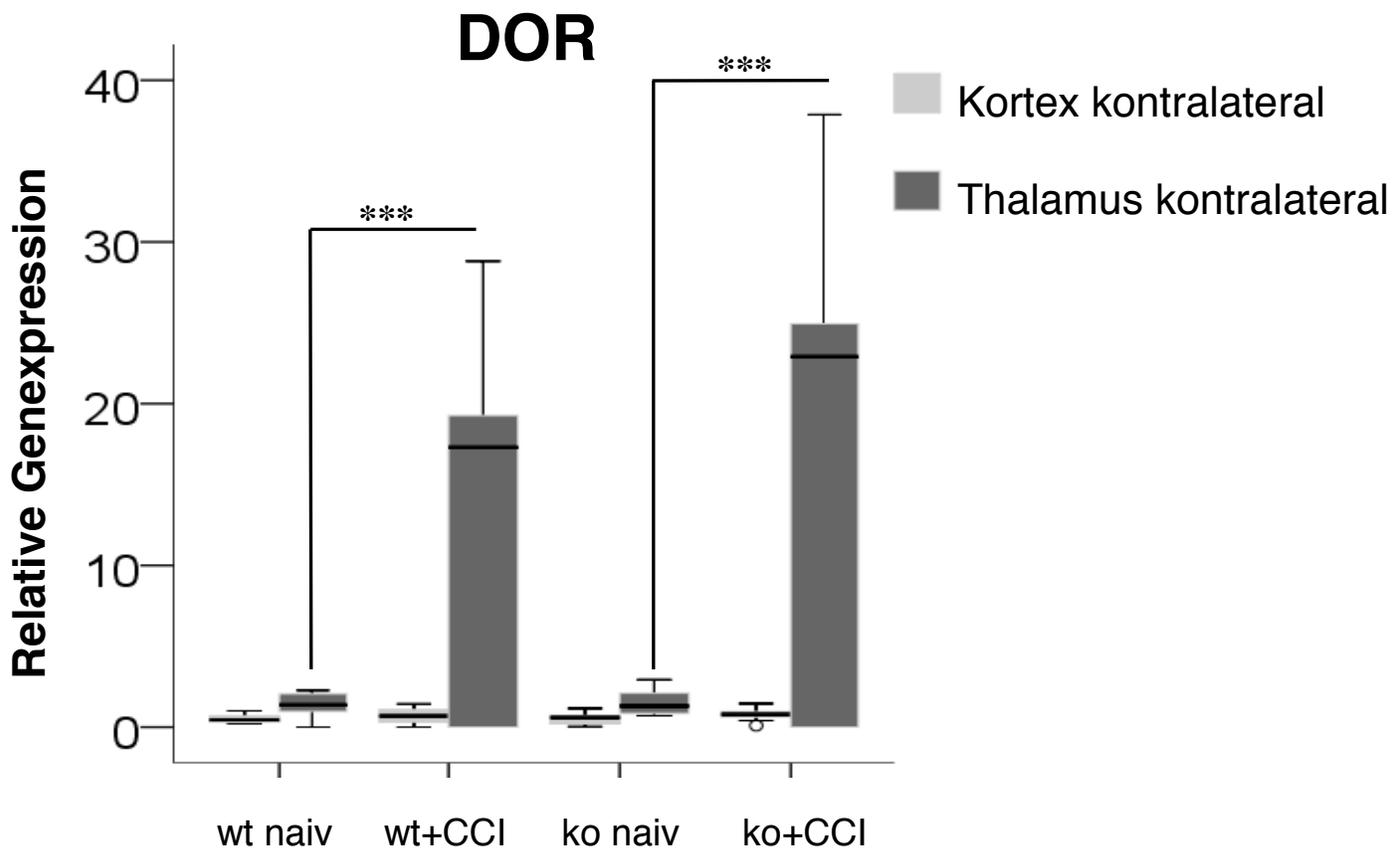


Abb. 8: Relative Genexpression von DOR im kontralateralen Kortex sowie kontralateralen Thalamus nach CCI (** $p < 0,001$).

3.4.3 KOR-Genexpression im zentralen Nervensystem nach CCI

Zwischen beiden unbehandelten Genotypen konnte bezüglich der Genexpression von KOR in zentralen Anteilen des Nervensystems keine Differenz festgestellt werden. Nach CCI war die Genexpression in Pons und Hypothalamus nicht erhöht. Dagegen verringerte sich die Genexpression von KOR im kontralateralen Cortex von IL-4 ko- und wt-Mäusen nach CCI. Dies war bei IL-4 ko-Mäusen im Vergleich zu wt-Mäusen stärker ausgeprägt (ko: $p < 0,001$; Abb. 9).

Im Striatum fand sich nach CCI ipsilateral bei beiden Genotypen eine Tendenz zur Reduktion der Expression von KOR, welche allerdings statistisch nicht signifikant war. Im kontralateralen Anteil des Striatums zeigte sich nach CCI bei wt-Mäusen eine Tendenz zur Reduktion. Bei ko-Mäusen war postoperativ dagegen keine veränderte Genexpression für KOR zu beobachten.

Im kontralateralen Thalamus war 28 Tage nach CCI lediglich bei IL-4 ko-Mäusen ein Anstieg der Genexpression von KOR zu messen ($p < 0,001$; Abb. 9). In der wt-Gruppe gab es dagegen nach durchgeführter CCI keine erhöhte Expression von KOR.

KOR

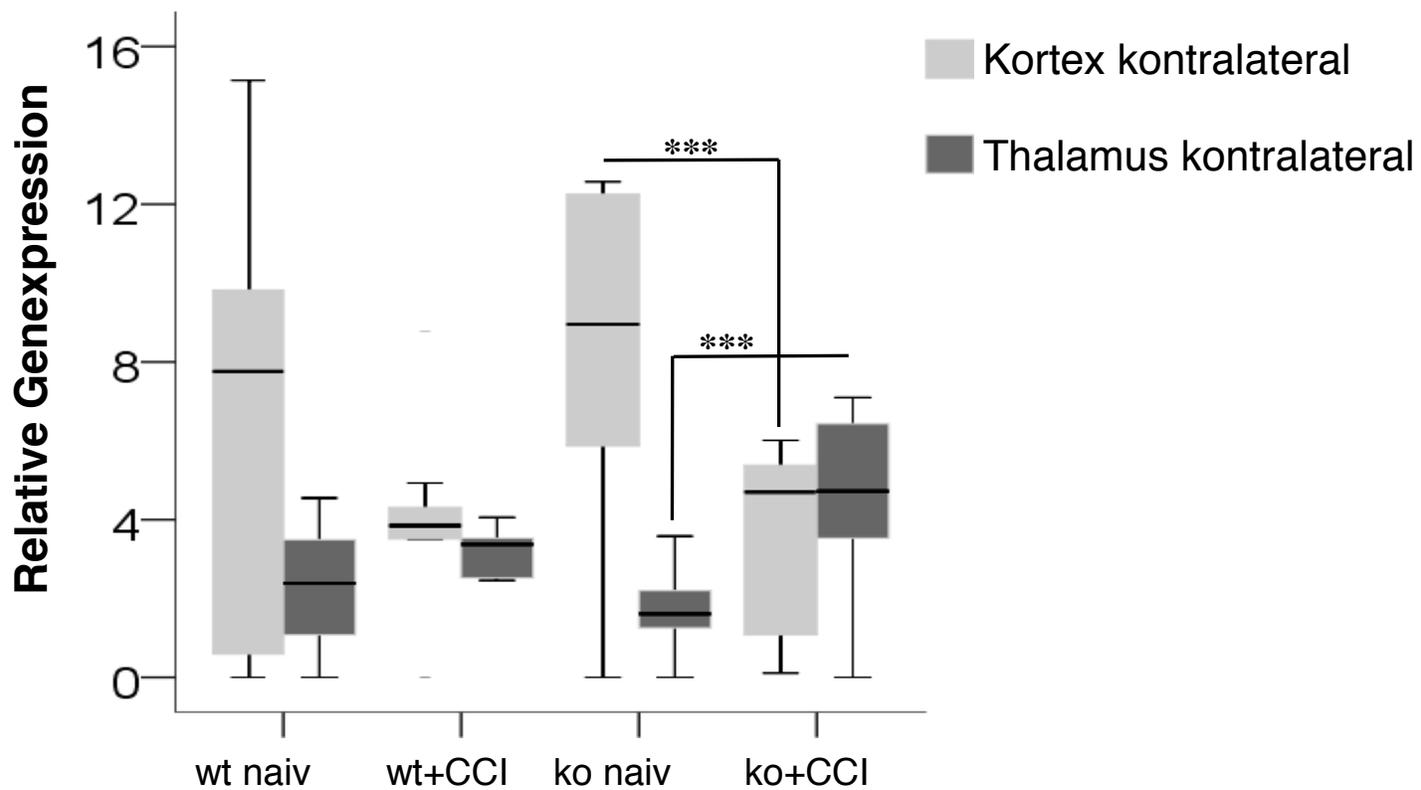


Abb. 9: Relative Genexpression von KOR im kontralateralen Kortex und Thalamus nach CCI (** $p < 0,001$).

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Anhand dieser Studie konnten anhand eines Mausmodells für neuropathische Schmerzen die Auswirkungen eines IL-4-Mangels auf die Entwicklung von schmerzassoziiertem Verhalten, auf die Genexpression anderer pro- und antiinflammatorischer Zytokine, sowie auf die Genexpression von Opioidrezeptoren gezeigt werden:

- 1) In Verhaltenstests ließ sich vor CCI bei unbehandelten IL-4 ko-Mäusen im Vergleich zu wt-Mäusen eine mechanische Überempfindlichkeit im Sinne einer verminderten Wegzugsschwelle nachweisen. *Nach CCI* zeigten beide Genotypen eine Zunahme der mechanischen Empfindlichkeit, wobei sich diese zwischen den beiden Gruppen im Ausmaß jetzt nicht mehr unterschied.

Bezüglich thermischer Stimuli zeigten sich zwischen IL-4 ko-Mäusen und wt-Mäusen im unbehandelten Zustand keine Unterschiede. *Nach CCI* ließ sich bei beiden Genotypen eine gesteigerte Empfindlichkeit auf thermische Stimuli beobachten, wobei sich diese zwischen beiden Gruppen nicht unterschied.

- 2) Vor Durchführung einer CCI zeigte sich zwischen beiden Genotypen auf molekularer Ebene kein Unterschied im pro- und antiinflammatorischen Zytokinmuster. Insbesondere ließ sich bei IL-4 ko-Mäusen keine kompensatorische Hochregulation anderer Zytokine (v.a. von IL-13) nachweisen. *Nach CCI* war bei IL-4 ko-Mäusen im N. ischiadicus eine im Vergleich zu wt-Tieren deutlich erhöhte Genexpression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 beta und TNF nachzuweisen. Auch war im N. ischiadicus nur bei IL-4 ko-Mäusen eine verstärkte Genexpression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zu beobachten.

Im ipsilateralen Rückenmark fand sich zudem nur bei IL-4 ko-Mäusen nach CCI eine erhöhte Genexpression der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 beta sowie der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13.

- 3) Zum Zeitpunkt des Schmerzmaximums nach CCI sprachen IL-4 ko-Mäuse schneller auf Morphingabe an als wt-Tiere. Bereits zwei Stunden nach Morphingabe zeigte sich bei IL-4 ko-Mäusen eine analgetische Wirkung, wobei dies bei wt-Tieren erst nach vier Stunden beobachtet werden konnte.
- 4) Bezüglich der Genexpression von OR waren zwischen den unbehandelten Genotypen keine Unterschiede im ZNS festzustellen. *Nach CCI* fand sich bei IL-4 ko-Mäusen im kontralateralen Thalamus ein im Vergleich zu wt-Tieren stärkerer Anstieg der Genexpression von DOR. Eine erhöhte Genexpression von KOR im kontralateralen Thalamus war nach CCI nur in der Gruppe der IL-4 ko-Mäuse zu beobachten.

4.2 IL-4 ko-Mäuse als Schmerzmodell für mechanische Hyperalgesie

Beide in dieser Studie verwendeten Methoden der Verhaltenstestung sind gut etabliert zur Objektivierung von schmerzassoziiertem Verhalten vor und nach Durchführung verschiedener Schmerzmodelle, wie z. B. der hier verwendeten CCI (Hargreaves 1988; Chaplan et al. 1994).

Ein Mangel des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 führt bei unbehandelten IL-4 ko-Mäusen schon *vor CCI* zu einer Überempfindlichkeit auf mechanische Stimuli. Die Empfindlichkeit hinsichtlich thermischer Stimuli wurde durch den IL-4-Mangel dagegen nicht beeinflusst. Das Zytokin IL-4 scheint also eine zentrale Rolle in der Entwicklung mechanischer Sensibilität zu spielen, aber nicht in gleicher Weise auf andere Empfindungsqualitäten, in diesem Fall die thermische Sensibilität, einzuwirken.

4.2.1 Unterschiede in der Vermittlung mechanischer und thermischer Hyperalgesie

In mehreren Nervenläsionsmodellen wurden nach Modulation der Schmerzverarbeitung oder -wahrnehmung unterschiedliche Einflüsse auf die Entstehung mechanischer bzw. thermischer Hyperalgesie aufgezeigt und verschiedene Ansatzpunkte zur Erklärung der einzelnen Mechanismen diskutiert. Die bei neuropathischen Schmerzen auftretende mechanische bzw. thermische Hyperalgesie scheint durch unterschiedliche Mechanismen hervorgerufen sowie verschiedenartig spinal vermittelt zu werden (Basbaum et al. 2009).

a) Anatomische Unterschiede

Nach der "labeled line theory" gibt es verschiedene Schmerzpfade mit jeweils eigenen anatomischen Strukturen, die unterschiedliche nozizeptive Informationen transportieren (Craig 2003; Braz et al. 2005). So haben Untersuchungen bei Patienten mit neuropathischen Schmerzen durch gezielte Blockade schmerzleitender Nervenfasern gezeigt, dass mechanische Hyperalgesie vor allem durch große, myelinisierte A β -Fasern, thermische Hyperalgesie hingegen durch nicht-myelinisierte C-Fasern vermittelt wird (Campbell et al. 1988; Koltzenburg et al. 1992; Koltzenburg et al. 1994). A β -Fasern und C-Fasern weisen unterschiedliche Eigenschaften auf. A β -Fasern werden durch niedrig-schwellige Stimuli erregt, projizieren direkt zu supraspinal gelegenen Nuclei der Hinterstrangbahn, senden Kollateralen zu Lamina III und IV der Hinterhörner des Rückenmarks und können keine Opioidrezeptoren exprimieren. Dagegen sind C-Fasern zur Exprimierung von Opioidrezeptoren in der Lage (Braz und Basbaum 2009).

Mechanische Hyperalgesie scheint zudem überwiegend zentral, thermische Hyperalgesie dagegen vor allem peripher moduliert zu werden (Treede et al. 1992). Bei Mäusen fanden Braz et al. durch Anwendung eines neuronalen Tracers heraus, dass nach peripherer Nervendurchtrennung myelinisierte und nicht-myelinisierte Fasern nozizeptive Informationen an unterschiedliche und räumlich

voneinander getrennte Populationen postsynaptischer Neuronen weiterleiten (Braz und Basbaum 2009). Bei Ratten verhinderte die Verletzung der Hinterstrangbahn ipsilateral zu einer an L5 durchgeführten SNL die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie. Ebenso verhinderte die Mikroinjektion des Lokalanästhetikums Lidocain in den ipsilateral zur SNL gelegenen Nucleus gracilis eine mechanische Hyperalgesie, aber nicht die Entwicklung einer thermischen Hyperalgesie (Sun et al. 2001).

Mechanische Hyperalgesie wird jedoch nicht nur über eigene anatomische Strukturen, sondern auch über spezifische Transmitter, Transkriptionsfaktoren und Elektrolytkanäle vermittelt. Dies konnte ebenfalls in tierexperimentellen Studien aufgezeigt werden (Basbaum et al. 2009).

b) Kinasen, Transmitter und Transkriptionsfaktoren

Die Blockade der c-Jun-N-terminalen-Kinase (JNK) bei Ratten verhinderte die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie nach SNL, ohne die Entwicklung einer thermischen Hyperalgesie zu beeinflussen (Zhuang et al. 2006; Son et al. 2007). Unter anderem reguliert der Transkriptionsfaktor c-Jun die Expression der Neurotransmitter Neuropeptid Y und Vasoaktives intestinales Peptid (VIP) in Spinalganglien, welche nach peripherer Nervenschädigung dort erhöht zu messen sind (Son et al. 2007). In einer Studie mit Anwendung eines spinalen Nervenläsionsmodells an Ratten konnte ebenfalls das Neuropeptid Y im Rückenmark, Spinalganglion und Nucleus gracilis gemessen werden und scheint an der Entwicklung mechanischer Hyperalgesie beteiligt zu sein (Ossipov et al. 2002).

Blockiert man nach einer SNL bei Ratten die extrazelluläre signalregulierte Proteinkinase (ERK), p38-MAPK sowie JNK durch intrathekale Gabe der entsprechenden Inhibitoren, bildete sich hierunter die entstandene mechanische Hyperalgesie zurück. Nur die Gabe des p38-MAPK-Inhibitors verbesserte dabei auch eine thermische Hyperalgesie (Obata et al. 2004). NMDA-Antagonisten

verringerten bei Ratten nach inkompletter spinaler Nervenläsion dosisabhängig eine mechanische, aber keine thermische Hyperalgesie (Bennett et al. 2000; Hama et al. 2003) und Neurokinin-1 ko-Mäuse hatten nach SNL eine im Vergleich zu wt-Tieren verminderte mechanische, aber unveränderte thermische Hyperalgesie (Mansikka et al. 2000).

c) Elektrolytkanäle und Rezeptoren

Nach einer SNL an Ratten fand sich in Spinalganglien eine verminderte Proteinexpression einer Untergruppe spannungsabhängiger Kaliumkanäle vom A-Typ (Kv3.4 und Kv4.3). Durch gezielte Blockade dieser Kaliumkanäle konnte bei unbehandelten Ratten eine mechanische Hyperalgesie induziert werden; eine thermische Hyperalgesie trat unter der Blockade nicht auf (Chien et al. 2007). Bei der Entstehung einer, durch intradermale Injektion von Capsaicin in die Hinterpfote von Ratten induzierten mechanischen Hyperalgesie sind metabotrope Glutamatrezeptoren von Bedeutung, während diese bei der Entwicklung thermischer Hyperalgesie nur eine untergeordnete Rolle spielen (Soliman et al. 2005).

Darüber hinaus kam es bei genetisch veränderten Mäusen, die eine Untergruppe von Cannabinoid-Rezeptoren (GPR55) nicht exprimieren können, nach Anwendung eines neuropathischen und inflammatorischen Schmerzmodells (inkomplette Nervenligatur und i.pl. Injektion von Complete Freund's Adjuvant (CFA)) im Vergleich zu wt-Mäusen nicht zur Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie. Interessanterweise wurde bei den GPR55-ko-Mäusen zudem nach Injektion von CFA eine deutlich höhere Genexpression der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 gemessen (Staton et al. 2008). Diese Befunde decken sich mit dem Ergebnis dieser Studie, dass IL-4 vor der Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie schützt. Im Rahmen anderer bisher durchgeführter Studien an verschiedenen ko-Mäusen wurden weitere pro- sowie antiinflammatorische Zytokine hinsichtlich ihres Einflusses auf die Entstehung thermischer und mechanischer Hyperalgesie untersucht.

4.2.2 Einfluss von Zytokinen auf die Entwicklung mechanischer und thermischer Hyperalgesie

Das Schmerzverhalten von Zytokin-ko-Mäusen ist abhängig vom Zustand (unbehandelt vs. post interventionem) und von der untersuchten Modalität (mechanische vs. thermische Hyperalgesie) (Vidal et al. 1998; Gendron et al. 2006; Puehler et al. 2006; Vogel et al. 2006).

Beispielsweise konnten in einer Studie an ko-Mäusen, denen das proinflammatorische Zytokin IL-1 fehlte, im unbehandelten Zustand keine Verhaltensunterschiede zwischen ko- und wt-Mäusen beobachtet werden. Nach Durchführung einer CCI zeigten IL-1 ko-Mäuse allerdings im Vergleich zu Kontrolltieren eine später eintretende sowie in der Ausprägung und Dauer verminderte mechanische Hyperalgesie (Honore et al. 2006). Auch in einer anderen Studie an IL-1 und IL-6 ko-Mäusen konnte sowohl im unbehandelten Zustand als auch nach Nervenläsion ein vermindertes Schmerzverhalten beobachtet werden (Kawasaki et al. 2008; Gabay et al. 2011).

Es ist bekannt, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF die elektrischen Eigenschaften von Neuronen im Rückenmark modulieren, indem sie zur Veränderung von Ionenströmen sowie zur Förderung exzitatorischer bzw. Verminderung inhibitorischer synaptischer Transmission führen. Die Folge ist eine veränderte periphere und zentrale Neurotransmission (Kawasaki et al. 2008). Die Auslösung einer mechanischen Hyperalgesie durch periphere Injektion von TNF bei Mäusen wird beispielsweise durch eine p38-abhängige Modulation von TTX-resistenten Natriumkanälen vermittelt. TNF löst diese Modulation über Bindung an den auf primär afferenten Neuronen gelegenen TNF-Rezeptor-1 aus (Jin und Gereau 2006).

Auch bezüglich antiinflammatorischer Zytokine existieren Studien mit ko-Ansatz. Eine Defizienz des Zytokins IL-10 ist mit einem gesteigerten Schmerzverhalten assoziiert (Tu et al. 2003). Ko-Mäuse, die das Molekül B7-H1 nicht mehr exprimieren können, welches als Co-Inhibitor unter anderem T-Zell-Proliferation

und Zytokin-Genexpression vermindert, zeigen nach CCI eine im Vergleich zu wt-Mäusen gesteigerte mechanische Hyperalgesie sowie eine gesteigerte proinflammatorische Zytokin-Genexpression. Nach CCI kam es bei B7-H1 ko-Mäusen zudem zu einem länger anhaltenden schmerzassoziierten Verhalten (Üçeyler et al. 2010a).

Bisher haben nur wenige Studien untersucht, wie das antiinflammatorische Zytokin IL-4 die neuronale Erregbarkeit beeinflusst. Es konnte z. B. gezeigt werden, dass IL-4 direkt Ionenkanäle auf B-Lymphozyten aktiviert (McCann et al. 1991) und elektrische Eigenschaften spinaler Neuronen durch Modifikation von Ionenströmen verändern kann (Kawasaki et al. 2008). IL-4 induziert zudem in Zellkulturen menschlicher glatter Muskelzellen eine schnelle und deutliche Steigerung der Aktivität kalzium-abhängiger Kaliumkanäle (Martin et al. 2008). Die Induktion von spinalen IL-4- und IL-10-produzierenden T-Lymphozyten bei Ratten verminderte eine mechanische Überempfindlichkeit (Leger et al. 2011).

Passend zu dem Ergebnis dieser Studie kann eine gesteigerte IL-4-Expression auch bei Patienten, die an dem generalisiertem Schmerzsyndrom Chronic Widespread Pain (CWP) leiden, eine mechanische Allodynie abschwächen (Üçeyler et al. 2006). Der genaue molekulare Mechanismus über den IL-4 die Verminderung der mechanischen Hyperalgesie ausübt, ist jedoch unklar.

Möglicherweise werden bei unbehandelten IL-4 ko-Mäusen durch den Mangel an IL-4 zentrale inhibitorische Mechanismen vermindert und dadurch eine mechanische Hyperalgesie begünstigt. In Pilotstudien zeigten sich Hinweise, dass bei IL-4 ko-Mäusen die elektrische Aktivität sensorischer Neuronen gesteigert ist. So konnte bei IL-4 ko-Mäusen nach Stimulation mit einem von-Frey-Filament in sensorischen Neuronen der Lamina V eine gesteigerte elektrische Aktivität nachgewiesen werden (Schießer, Üçeyler, Sommer, unveröffentlichte Daten).

Die Tatsache, dass Unterschiede im Verhalten zwischen beiden Gruppen lediglich im unbehandelten Zustand zu erheben sind, lässt vermuten, dass IL-4 auf die Entstehung und Weiterleitung von Empfindungsqualitäten im unbehandelten

Zustand einen größeren Einfluss ausübt, als auf die Vorgänge nach einer Nervenschädigung wie der CCI. Da die Genexpression der wichtigsten pro- und antiinflammatorischen Zytokine bei unbehandelten IL-4 ko- und wt-Mäusen gleich ausgeprägt war, ist die mechanische Hyperalgesie höchstwahrscheinlich direkt auf den IL-4-Mangel zurück zu führen.

In der vorliegenden Studie zeigte nach CCI sowohl die Gruppe der IL-4 ko- als auch die der wt-Mäuse ein schmerzabhängiges Verhalten, wobei sich zwischen beiden Genotypen kein Unterschied mehr in der Ausprägung dieses Verhaltens beobachten ließ. Insgesamt scheint nach einer CCI das Fehlen von IL-4 keinen objektivierbaren Einfluss mehr auf das Schmerzverhalten zu haben.

Eine Erklärung dafür könnte die bei IL-4 ko-Mäusen im ipsilateralen Rückenmark deutlich stärker ausgeprägte Genexpression pro- aber insbesondere antiinflammatorischer Zytokine sein. Wie oben beschrieben kann eine gesteigerte Genexpression der antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 eine mechanische Allodynie vermindern (Leger et al. 2011). Der alleinige IL-4-Mangel ohne einen hinzukommenden kompensatorischen Mechanismus resultiert in der Entwicklung mechanischer Hyperalgesie. Kommt allerdings ein Schmerzreiz (CCI) hinzu, wird bei IL-4 ko-Mäusen die Genexpression insbesondere der antiinflammatorischen und analgetischen Zytokine hochreguliert und verhindert so eine im Vergleich zu wt-Mäusen überproportionale Schmerzzunahme. Im Rahmen der gesteigerten pro- und insbesondere antiinflammatorischen Antwort nach CCI könnte daher die Abwesenheit von IL-4 durch andere Zytokine kompensiert werden und zu einem den wt-Tieren ähnlichen Schmerzverhalten führen bzw. eine weitere Zunahme des schmerzassoziierten Verhaltens bei IL-4 ko-Mäusen verhindern. Da im unbehandelten Zustand die reaktive kompensatorische Gegenregulation fehlt, könnte dies die vor CCI vorliegende vermehrte mechanische Sensibilität erklären.

Ein generelles Problem bei Tiermodellen mit ko-Ansatz bleiben die bei diesen Tieren einsetzenden verschiedenen regulatorischen Mechanismen. Der zeitliche Beginn und das Ausmaß der kompensatorischen Veränderungen und Genexpression, möglicherweise daraus resultierende pleiotrope Effekte, der Einfluss der ko-Region auf benachbarte Genregionen sowie eventuelle unspezifische Veränderungen, die zur Verhaltensänderung der Tiere führen können, sind in ihrer ganzen Auswirkung nur schwer einzuschätzen (Gingrich und Hen 2000).

Trotz der vielversprechenden Ergebnisse aus klinischen Untersuchungen, in denen verminderte IL-4-Serumspiegel bei Patienten mit verschiedenen Schmerzsyndromen nachgewiesen werden konnten (Üçeyler et al. 2006; Üçeyler et al. 2007b), führte der Mangel eines einzigen Zytokins in dieser Studie zwar zu einer objektivierbaren Verhaltensänderung im Sinne einer mechanischen Überempfindlichkeit bei IL-4 ko-Mäusen. Andere Empfindungsqualitäten wurden hiervon aber nicht beeinflusst, so dass die IL-4 ko-Maus nur eingeschränkt als Tiermodell für generalisierten Schmerz, wie z. B. das Fibromyalgiesyndrom, geeignet ist. Eine Verwendung der IL-4 ko-Maus als Modell für mechanische Hyperalgesie erscheint jedoch möglich.

4.3 Regulation von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen im peripheren und zentralen Nervensystem von IL-4 ko-Mäusen

Die Untersuchung der Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine vor CCI zeigte zwischen beiden Genotypen sowohl im PNS als auch im ZNS keine Unterschiede. Nach CCI konnte bei IL-4 ko-Mäusen im Vergleich zu wt-Mäusen eine insgesamt verstärkte Genexpression der untersuchten pro- und antiinflammatorischen Zytokine beobachtet werden. IL-4 ko-Mäuse wiesen im N. ischiadicus eine im Vergleich zu wt-Tieren deutlich erhöhte Genexpression der

proinflammatorischen Zytokine IL-1 beta und TNF auf. Auch war nur bei IL-4 ko-Mäusen im N. ischiadicus eine verstärkte Genexpression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 zu beobachten. Im ipsilateralen Rückenmark fand sich nach CCI nur bei IL-4 ko-Mäusen eine erhöhte Genexpression der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-13 sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 beta. Dies war dagegen bei wt-Mäusen nach CCI nicht zu beobachten.

Sich an diese Studie anschließende Folgestudien an IL-4 ko-Mäusen mit Anwendung eines inflammatorischen Schmerzmodells, der i.pl. Injektion von TNF, haben bei IL-4 ko-Mäusen ebenfalls eine verstärkte pro- und antiinflammatorische Zytokinantwort gezeigt (unveröffentlichte Daten). Nach i.pl. Injektion von CFA fand sich nur bei IL-4 ko-Mäusen in Spinalganglien ein Anstieg der Genexpression von IL-1 beta (unveröffentlichte Daten).

Wie bereits beschrieben kommt es nach peripherer Nervenläsion im Rückenmark, getriggert durch aus Neuronen freigesetzten neuroexzitatorischen Stoffen, zu einer Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia. Dies führt insbesondere zur Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine und weiterer Botenstoffe wie z. B. NGF, Chemokinen, Prostaglandinen, ATP oder exzitatorischer Aminosäuren (Watkins et al. 2009). Frühere Studien haben allerdings ebenfalls gezeigt, dass die Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine bei wt-Tieren nach CCI nicht anhaltend über einen längeren Zeitraum erhöht ist. Beispielsweise war bei wt-Mäusen der gleichen Mausstranglinie wie in der vorliegenden Studie in der Frühphase nach CCI (6 h) die Genexpression proinflammatorischer Zytokine (TNF, IL-1) im lumbalen Rückenmark vermindert, erreichte jedoch 10 bis 12 h postoperativ erneut normalisierte Werte (Üçeyler et al. 2008d). In einer anderen Studie an Ratten war nach CCI die maximale TNF- und IL-1-Genexpression am postoperativen Tag 1 sowie eine maximale IL-6-Genexpression drei Tage nach CCI im lumbalen Rückenmark zu messen (Lee et al. 2004). Und in einer weiteren Studie an Ratten ließ sich im Rückenmark bis 6 Tage nach CCI keine veränderte

Immunoreaktivität von TNF und IL-1beta nachweisen (DeLeo et al. 1997). Diese Ergebnisse decken sich daher mit dem in dieser Studie beobachteten fehlenden Anstieg der pro- und antiinflammatorischen Zytokinantwort in der wt-Gruppe. Die Verminderung von proinflammatorischen Zytokinen im ZNS stellt möglicherweise einen regulatorischen Schutzmechanismus dar, über den eine zentrale Beeinträchtigung nach peripherer Nervenschädigung verhindert wird.

IL-4 wirkt auch im ZNS antiinflammatorisch und neuroprotektiv (Paintlia et al. 2006; Ponomarev et al. 2007). Antiinflammatorische Eigenschaften übt es über eine verminderte Ausschüttung von TNF und IL-1 durch Mikroglia, Induktion der Proliferation von Th2-Lymphozyten mit Zytokinausschüttung nach dem antiinflammatorischen Th2-Profil sowie über eine verminderte Ausreifung von Th1-Lymphozyten aus (Karulin et al. 2002; Paintlia et al. 2006). Es wirkt darüber hinaus neuroprotektiv über eine verminderte Produktion von iNOS, Förderung der Ausschüttung neuronaler Wachstumsfaktoren (NGF) und schützt vor regenerativer Narbenbildung im ZNS nach Demyelinisierung (Norenberg 1994; Brodie et al. 1998).

Versuche mit Mäusen, die im ZNS kein IL-4 mehr produzieren können, jedoch peripher noch dazu in der Lage sind, reagierten auf eine experimentell ausgelöste autoimmune Enzephalomyelitis (EAE), einem Mausmodell der Multiplen Sklerose, mit verstärkten Symptomen (Bettelli et al. 1998; Falcone et al. 1998) und die zentrale Gabe von IL-4, z. B. über einen viralen Vektor, resultierte in einer abgeschwächten Reaktion der EAE (Shaw et al. 1997; Furlan et al. 1998).

Zentral wird IL-4 vermutlich vor allem durch Mikroglia produziert, aber auch durch T- und B-Lymphozyten (Ponomarev et al. 2007), Astrozyten (Hulshof et al. 2002) oder Mastzellen, wobei diese vermehrt außerhalb des ZNS ihre Wirkung ausüben (Tanzola et al. 2003). Da IL-4 im unbeschädigten ZNS nicht nachweisbar ist, wird es in Astrozyten vermutlich nur nach Schädigung durch bestimmte Signale aus dem Umgebungsmilieu ausgeschüttet (Ponomarev et al. 2007).

Es ist anzunehmen, dass durch einen IL-4-Mangel die beschriebene zentrale antiinflammatorische und neuroprotektive Wirkung ausbleibt und es zu einer verstärkten proinflammatorischen Zytokinantwort kommt. Die bei IL-4 ko-Mäusen ebenfalls vermehrte antiinflammatorische Zytokinausschüttung könnte durch den Mangel an IL-4 kompensatorisch bedingt sein oder aber eine Reaktion auf die proinflammatorische Antwort nach Nervenschädigung darstellen. Wie oben bereits beschrieben sind die vor CCI nachweisbaren Unterschiede im Schmerzverhalten nach CCI nicht mehr vorhanden. Die vermehrte Genexpression pro- und insbesondere antiinflammatorischer Zytokine nach CCI stellt vermutlich einen Regulationsmechanismus des Zytokinsystems dar, den Mangel des antiinflammatorischen Zytokins IL-4 auszugleichen. Interessant wären daher Studien mit IL-4 ko-Mäusen zur Zytokinproduktion nach CCI in anderen Bereichen des ZNS wie z. B. Cortex oder Thalamus, um zu untersuchen, ob es in diesen für die Schmerzverarbeitung wichtigen Arealen ebenfalls zu einer verstärkten Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine kommt.

Da sich die beiden antiinflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-13 viele ihrer Eigenschaften teilen (Grünig 2003) stellte sich auch die Frage, ob es bei einem IL-4-Mangel zur kompensatorisch vermehrten Genexpression von IL-13 kommen würde. Im PNS (N. ischiadicus) behandelte oder unbehandelte Tiere beider Genotypen konnten wir jedoch weder vor, noch nach CCI eine Genexpression von IL-13 nachweisen. Auch anderen Arbeitsgruppen gelang der Nachweis von IL-13 im N. ischiadicus nicht (Saadoun et al. 2005). Interessant wäre, auch anderes Gewebe oder Zielsubstrate in der Umgebung einer Nervenläsion auf eine Ausschüttung von IL-13 hin zu untersuchen. Beispielsweise gelang in einem Schmerzmodell zu einer autoimmun bedingten peripheren Nervenschädigung ein Nachweis von IL-13 in Zellreihen von NK (Im et al. 2006).

Im ZNS kam es nach CCI im ipsilateralen lumbalen Rückenmark lediglich bei IL-4 ko-Mäusen zu einer gesteigerten Genexpression von IL-13. Dies könnte durchaus einer kompensatorischen Gegenregulation bei IL-4-Mangel entsprechen, da sich

nach CCI im ipsilateralen Rückenmark von wt-Mäusen keine IL-13-Genexpression nachweisen ließ. Es stellt sich aber auch die Frage, welche Aufgaben IL-13 im PNS und ZNS übernimmt und warum es nach peripherer Nervenläsion im lumbalen Rückenmark, nicht aber im peripheren Nerven nachzuweisen ist. Im zentralen Nervensystem entfaltet IL-13 antiinflammatorische Eigenschaften und schützt beispielsweise vor der Manifestation einer EAE (Ochoa-Reparaz et al. 2008).

4.4 Morphinwirkung und Regulation der Genexpression von Opioidrezeptoren im zentralen Nervensystem von IL-4 ko-Mäusen

Das proinflammatorische Zytokin IL-4 begünstigt die Transkription von Opioidrezeptoren (Kraus et al. 2001; Börner et al. 2004). Trotz des fehlenden IL-4 zeigten aber IL-4 ko-Mäuse zum Zeitpunkt des Schmerzmaximums nach CCI (Tag 7, 8 und 9 postoperativ) eine deutlich schneller eintretende Analgesie nach systemischer Morphintherapie als wt-Mäuse.

Untersucht man die Genexpression der Opioidrezeptoren im ZNS vier Wochen nach CCI, ließ sich dazu passend bei IL-4 ko-Mäusen im kontralateralen Thalamus eine im Vergleich zu wt-Tieren deutlich höhere Genexpression von DOR feststellen. Nach CCI konnte zudem nur bei IL-4 ko-Mäusen im kontralateralen Thalamus eine erhöhte Genexpression von KOR beobachtet werden. Da der Thalamus einen der wichtigsten Orte der Schmerzverarbeitung darstellt, könnte dies die bessere analgetische Wirkung von Morphin bei IL-4 ko-Mäusen erklären.

In einer Studie zum Einfluss von peripher exprimiertem DOR auf die endogene Schmerzkontrolle zeigten ko-Mäuse, die DOR auf primären nozizeptiven Neuronen nicht exprimieren konnten, im unbehandelten Zustand bezüglich thermischer und mechanischer Stimuli keinen Unterschied im Vergleich zu wt-Tieren. Nach einer CCI kam es aber bei DOR-ko-Mäusen im Vergleich zu wt-Mäusen zu einer stärker

ausgeprägten mechanischen Hyperalgesie; die Reaktion auf thermische Stimuli blieb bei DOR-ko-Mäusen unverändert. Nach Gabe eines DOR-Agonisten kam es bei wt-Mäusen zu einer Reduktion der mechanischen Hyperalgesie; dies war in der DOR-ko-Gruppe nicht der Fall. DOR scheinen auf primären nozizeptiven Neuronen daher eine wichtige Rolle bei der endogenen Schmerzkontrolle zu spielen und vor mechanischer Hyperalgesie nach einer peripheren Nervenläsion zu schützen (Gaveriaux-Ruff et al. 2011).

Im unbehandelten Zustand war in dieser Studie kein Unterschied in der zentralen OR-Expression zwischen wt- und ko-Mäusen zu beobachten. Da die mechanische Hyperalgesie bei IL-4 ko-Mäusen aber stärker ausgeprägt war, ist DOR möglicherweise durch den Mangel an IL-4 relativ unterexprimiert und begünstigt neben dem IL-4-Mangel die Entwicklung der mechanischen Hyperalgesie in dieser Gruppe. Nach CCI kommt es im Vergleich zu wt-Tieren zu einem kompensatorischen Anstieg von DOR und somit zu einer den wt-Tieren angeglichenen mechanischen Hyperalgesie.

Obwohl IL-4 in dem vorliegenden Studienmodell als wichtiger Induktor der Genexpression für OR fehlt, konnte es bei IL-4 ko-Mäusen nach CCI zu einer im Vergleich zu wt-Mäusen erhöhten OR-Genexpression kommen. Da sich IL-4 ko-Mäuse im unbehandelten Zustand in ihrer OR-Genexpression nicht von wt-Tieren unterscheiden, ist daher davon auszugehen, dass bei IL-4 ko-Mäusen weitere Trigger für die Transkription von OR vorhanden sind, die insbesondere bei fehlendem IL-4 aktiv bzw. sogar kompensatorisch vermehrt aktiv sind.

Es ist bekannt, dass bereits ein Schmerzreiz als starker Induktor für die Transkription zentraler OR wirkt (Gendron et al. 2006). Womöglich führt alleine die Durchführung einer CCI bereits zu einem stärkeren Anstieg der Expression von OR bei IL-4 ko-Mäusen.

Außer IL-4 wurden auch weitere Zytokine wie z. B. IL-1, IL-6 oder TNF als wirksame Induktoren der Genexpression von OR beschrieben (Vidal et al. 1998; Puehler et al. 2004; Puehler et al. 2006; Kraus 2009). Da IL-4 ko-Mäuse nach CCI

insgesamt eine stärkere pro- und antiinflammatorische Zytokinantwort zeigen, kann dies wiederum die gesteigerte Produktion von Opioidrezeptoren begünstigen.

Sowohl bei IL-4 ko- als auch bei wt-Mäusen zeigte sich in dieser Studie eine verminderte Genexpression von MOR im ZNS (Kortex). Eine verminderte Genexpression von MOR nach peripherer Nervenschädigung, z. B. in Spinalganglien, wurde bereits in früheren Studien nachgewiesen. So ließ sich nach peripherer Nervenläsion keine Veränderung bzw. eine Verminderung der KOR- und MOR-Genexpression im kontralateralen Kortex und Thalamus nachweisen (Niikura et al. 2010). Auch in Spinalganglien zeigte sich nach peripherer Nervenschädigung eine verminderte Genexpression von MOR (Pol et al. 2006; Obara et al. 2009). Auch DOR wurde nach CCI oder anderen Nervenläsionsmodellen im ipsilateralen lumbalen Rückenmark vermindert gemessen (Stone et al. 2004). Diese Regulation der Expression von MOR und DOR in bestimmten Schmerzstudien scheint über NO vermittelt zu werden (Pol 2007; Hervera et al. 2010; Hervera et al. 2011).

In einer Studie mit MOR-ko-Mäusen entwickelten diese im Vergleich zu wt-Mäusen nach SNL nicht nur eine deutlich stärkere, zur Läsion ipsilaterale mechanische Hyperalgesie, sondern auch eine signifikante mechanische Hyperalgesie an der kontralateralen Pfote. Die Reaktion auf thermische Stimuli zwischen MOR-ko- und wt-Mäusen nach SNL war dabei gleich ausgeprägt. Vermutlich induziert die einseitige Nervenläsion eine bilaterale Aktivierung einer endogenen MOR-vermittelten Schmerzhemmung, welche die Entwicklung einer mechanischen Hyperalgesie, aber nicht einer thermischen Hyperalgesie vermindert (Mansikka et al. 2004). Möglicherweise ist diese endogene Schmerzhemmung bei IL-4 ko-Mäusen durch die fehlende Induktion der MOR-Transkription vermindert.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines Mangels des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin(IL)-4 am Tiermodell einer experimentellen Mononeuropathie (engl. chronic constriction injury, CCI) untersucht. Zentrale Fragestellung der Studie war, ob IL-4 knockout(ko)-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp(wt)-Mäusen mit einem gesteigerten Schmerzverhalten sowie einer veränderten Zytokinantwort und Opioidrezeptor-Expression nach Anwendung eines neuropathischen Schmerzmodells (CCI) reagieren.

In mehreren Tierstudien war zuvor eine antiinflammatorische und analgetische Wirkung von IL-4 belegt worden (Vale et al. 2003; Hao et al. 2006) und in klinischen Studien war ein verminderter IL-4-Spiegel bei Patienten mit verschiedenen neuropathischen Schmerzsyndromen mit einer gesteigerten Schmerzempfindung verbunden (Üçeyler et al. 2006; Üçeyler et al. 2007b). Da IL-4 die Transkription von Opioidrezeptoren induziert (Kraus et al. 2001; Börner et al. 2004), wurde zudem das Ansprechen von IL-4 ko-Mäusen auf Morphin und die Genexpression zentraler Opioidrezeptoren untersucht.

Vor sowie bis vier Wochen *nach* Durchführung einer CCI wurden IL-4 ko- sowie wt-Mäuse hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit auf mechanische und thermische Stimuli analysiert. Zum Zeitpunkt des Schmerzmaximums nach CCI (Tag 7 bis 9) wurde zudem das Ansprechen beider Genotypen auf Morphin untersucht. Die Genexpression pro- (IL-1 beta, TNF) und antiinflammatorischer Zytokine (IL-10, IL-13) im peripheren (N. ischiadicus) und zentralen Nervensystem (lumbales und zervikales Rückenmark, Pons, Thalamus, Hypothalamus, Striatum, Kortex) sowie die Genexpression zentraler Opioidrezeptoren (μ -OR, δ -OR, κ -OR) wurde bei beiden Genotypen *vor* sowie vier Wochen *nach* CCI mittels Real-Time-PCR bestimmt.

Unbehandelte IL-4 ko-Mäuse zeigten im Vergleich zu wt-Mäusen bereits vor Durchführung einer CCI eine mechanische Überempfindlichkeit (Hyperalgesie), was möglicherweise durch die bei IL-4-Mangel fehlenden zentralen inhibitorischen Mechanismen bedingt ist. Nach CCI entwickelten sowohl IL-4 ko- als auch wt-

Mäuse eine gleich ausgeprägte mechanische und thermische Hyperalgesie. Die Tatsache, dass die mechanische Überempfindlichkeit bei IL-4 ko-Mäusen nach Nervenläsion nicht überproportional steigt, kann Ausdruck der nachgewiesenen kompensatorisch stärker ausgeprägten Genexpression proinflammatorischer, aber insbesondere auch antiinflammatorischer Zytokine in diesem Genotyp sein. Nur bei IL-4 ko-Mäusen war vier Wochen nach CCI die Genexpression der antiinflammatorischen Zytokine im N. ischiadicus (IL-10) und ipsilateralen Rückenmark (IL-10, IL-13), jedoch auch die der proinflammatorischen Zytokine im ipsilateralen Rückenmark (TNF, IL-1 beta) erhöht. Nach CCI sprachen IL-4 ko-Mäuse schneller auf Morphingabe an als wt-Mäuse, was durch den bei diesem Genotyp stärker ausgeprägten Anstieg der Genexpression der Opioidrezeptortypen δ -OR und κ -OR im kontralateralen Thalamus bedingt sein kann.

Die vorliegende Studie kann zu einem besseren Verständnis der Rolle von IL-4 in der Vermittlung neuropathischer Schmerzen, im Speziellen der mechanischen Hyperalgesie, beitragen. Nach peripherer Nervenläsion konnte zudem ein IL-4-abhängiges Zytokin- und Opioidrezeptor-Expressionsmuster charakterisiert werden. Die bedeutende Rolle von IL-4 bei der Entstehung mechanischer Hyperalgesie kann Ansatzpunkt für eine spezifische Therapie, z. B. mit Induktoren der IL-4-Zytokinexpression, sein. Weitere Studien sind jedoch notwendig um die regulativen Mechanismen der peripheren und zentralen Zytokinproduktion nach peripheren Nervenläsionen besser zu verstehen.

6. Literaturverzeichnis

- Abe, S., I. Mizusawa, et al. (2003). "Nitric oxide synthase expressions in rat dorsal root ganglion after a hind limb tourniquet." Neuroreport **14**(17): 2267-70.
- Alexander, G. M., M. J. Perreault, et al. (2007). "Changes in immune and glial markers in the CSF of patients with Complex Regional Pain Syndrome." Brain Behav Immun **21**(5): 668-76.
- Alexander, G. M., M. A. van Rijn, et al. (2005). "Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS." Pain **116**(3): 213-9.
- Amir, R., J. D. Kocsis, et al. (2005). "Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons." J Neurosci **25**(10): 2576-85.
- Antoniu, S. A. (2010). "Pitrakinra, a dual IL-4/IL-13 antagonist for the potential treatment of asthma and eczema." Curr Opin Investig Drugs **11**(11): 1286-94.
- Austin, P. J. und G. Moalem-Taylor (2010). "The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines." J Neuroimmunol **229**(1-2): 26-50.
- Backonja, M. M., C. L. Coe, et al. (2008). "Altered cytokine levels in the blood and cerebrospinal fluid of chronic pain patients." J Neuroimmunol **195**(1-2): 157-63.
- Balkwill, F. (2009). "Tumour necrosis factor and cancer." Nat Rev Cancer **9**(5): 361-71.
- Baraut, J., L. Michel, et al. (2010). "Relationship between cytokine profiles and clinical outcomes in patients with systemic sclerosis." Autoimmun Rev **10**(2): 65-73.
- Baron, R., A. Binder, et al. (2010). "Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment." Lancet Neurol **9**(8): 807-19.
- Bartfai und Schultzberg, T. (1993). "Cytokines in neuronal cell types." Neurochem Int **22**(5): 435-44.

- Basbaum, A. I., D. M. Bautista, et al. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." Cell **139**(2): 267-84.
- Basehore, M. J., T. D. Howard, et al. (2004). "A comprehensive evaluation of IL4 variants in ethnically diverse populations: association of total serum IgE levels and asthma in white subjects." J Allergy Clin Immunol **114**(1): 80-7.
- Bennett, A. D., A. W. Everhart, et al. (2000). "Intrathecal administration of an NMDA or a non-NMDA receptor antagonist reduces mechanical but not thermal allodynia in a rodent model of chronic central pain after spinal cord injury." Brain Res **859**(1): 72-82.
- Bennett, G. a. X., Y. (1988). "A peripheral mono-neuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. ." Pain(33): 87-107.
- Bettelli, E., M. P. Das, et al. (1998). "IL-10 is critical in the regulation of autoimmune encephalomyelitis as demonstrated by studies of IL-10- and IL-4-deficient and transgenic mice." J Immunol **161**(7): 3299-306.
- Bianchi, M., B. Dib, et al. (1998). "Interleukin-1 and nociception in the rat." J Neurosci Res **53**(6): 645-50.
- Bianchi, M., P. Sacerdote, et al. (1992). "Central effects of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha on nociceptive thresholds and spontaneous locomotor activity." Neurosci Lett **148**(1-2): 76-80.
- Boettger, M. K., N. Uceyler, et al. (2007). "Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice." Eur J Pain **11**(7): 810-8.
- Borner, C., J. Kraus, et al. (2004). "Transcriptional regulation of the human mu-opioid receptor gene by interleukin-6." Mol Pharmacol **66**(6): 1719-26.
- Börner, C., M. Woltje, et al. (2004). "STAT6 transcription factor binding sites with mismatches within the canonical 5'-TTC...GAA-3' motif involved in regulation of delta- and mu-opioid receptors." J Neurochem **91**(6): 1493-500.
- Borres, M. P. und B. Bjorksten (2004). "Peripheral blood eosinophils and IL-4 in infancy in relation to the appearance of allergic disease during the first 6 years of life." Pediatr Allergy Immunol **15**(3): 216-20.

- Braz, J. M., M. A. Nassar, et al. (2005). "Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor." Neuron **47**(6): 787-93.
- Braz und Basbaum, J. M. (2009). "Triggering genetically-expressed transneuronal tracers by peripheral axotomy reveals convergent and segregated sensory neuron-spinal cord connectivity." Neuroscience **163**(4): 1220-32.
- Brodie, C., N. Goldreich, et al. (1998). "Functional IL-4 receptors on mouse astrocytes: IL-4 inhibits astrocyte activation and induces NGF secretion." J Neuroimmunol **81**(1-2): 20-30.
- Burmeister Getz, E., D. M. Fisher, et al. (2009). "Human pharmacokinetics/pharmacodynamics of an interleukin-4 and interleukin-13 dual antagonist in asthma." J Clin Pharmacol **49**(9): 1025-36.
- Cabot, P. J. (2001). "Immune-derived opioids and peripheral antinociception." Clin Exp Pharmacol Physiol **28**(3): 230-2.
- Cabot, P. J., L. Carter, et al. (2001). "Methionine-enkephalin-and Dynorphin A-release from immune cells and control of inflammatory pain." Pain **93**(3): 207-12.
- Campbell, J. N., S. N. Raja, et al. (1988). "Myelinated afferents signal the hyperalgesia associated with nerve injury." Pain **32**(1): 89-94.
- Carswell, E. A., L. J. Old, et al. (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-70.
- Chaplan, S. R., F. W. Bach, et al. (1994). "Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw." J Neurosci Methods **53**(1): 55-63.
- Chien, L. Y., J. K. Cheng, et al. (2007). "Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity." J Neurosci **27**(37): 9855-65.
- Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-9.
- Costigan, M., J. Scholz, et al. (2009). "Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage." Annu Rev Neurosci **32**: 1-32.

- Covey, W. C., T. A. Ignatowski, et al. (2000). "Brain-derived TNF α : involvement in neuroplastic changes implicated in the conscious perception of persistent pain." Brain Res **859**(1): 113-22.
- Covey, W. C., T. A. Ignatowski, et al. (2002). "Expression of neuron-associated tumor necrosis factor alpha in the brain is increased during persistent pain." Reg Anesth Pain Med **27**(4): 357-66.
- Craig, A. D. (2003). "Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing." Annu Rev Neurosci **26**: 1-30.
- Cunha, F. Q., S. Poole, et al. (1992). "The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia." Br J Pharmacol **107**(3): 660-4.
- Cunha, F. Q., S. Poole, et al. (1999). "Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-4." Br J Pharmacol **126**(1): 45-50.
- Czlonkowski, A., C. Stein, et al. (1993). "Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines." Eur J Pharmacol **242**(3): 229-35.
- DeLeo, J. A., R. W. Colburn, et al. (1997). "Cytokine and growth factor immunohistochemical spinal profiles in two animal models of mononeuropathy." Brain Res **759**(1): 50-7.
- DeLeo, J. A., M. D. Rutkowski, et al. (2000). "Transgenic expression of TNF by astrocytes increases mechanical allodynia in a mouse neuropathy model." Neuroreport **11**(3): 599-602.
- Devor, M. (1999). "Unexplained peculiarities of the dorsal root ganglion." Pain Suppl **6**: S27-35.
- Dinarello, C. A. (2004). "Interleukin-1 family (IL-1F1, F2). In: Thomson, A.W., Lotze, M. T., eds. The cytokine handbook. New York: Academic Press, 643-668."
- Ding, Y. Z., Fu, S., Zamarin, D., Bromberg, J. (2004). " Interleukin 10. In: Thomson, A.W., Lotze, M. T., eds. The cytokine handbook. New York: Academic Press, 603-625."

- Empl, M., S. Renaud, et al. (2001). "TNF-alpha expression in painful and nonpainful neuropathies." Neurology **56**(10): 1371-7.
- Falcone, M., A. J. Rajan, et al. (1998). "A critical role for IL-4 in regulating disease severity in experimental allergic encephalomyelitis as demonstrated in IL-4-deficient C57BL/6 mice and BALB/c mice." J Immunol **160**(10): 4822-30.
- Ferreira, S. H., B. B. Lorenzetti, et al. (1988). "Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue." Nature **334**(6184): 698-700.
- Freye, E. (2009). Opioide in der Medizin, Springer Verlag.
- Fukuoka, H., M. Kawatani, et al. (1994). "Cutaneous hyperalgesia induced by peripheral injection of interleukin-1 beta in the rat." Brain Res **657**(1-2): 133-40.
- Furlan, R., P. L. Poliani, et al. (1998). "Central nervous system delivery of interleukin 4 by a nonreplicative herpes simplex type 1 viral vector ameliorates autoimmune demyelination." Hum Gene Ther **9**(17): 2605-17.
- Gabay, E., G. Wolf, et al. (2011). "Chronic blockade of interleukin-1 (IL-1) prevents and attenuates neuropathic pain behavior and spontaneous ectopic neuronal activity following nerve injury." Eur J Pain **15**(3): 242-8.
- Gao et al., Y. J. (2010). "Targeting astrocyte signaling for chronic pain." Neurotherapeutics **7**(4): 482-93.
- Garry, M. G., L. P. Walton, et al. (2000). "Capsaicin-evoked release of immunoreactive calcitonin gene-related peptide from the spinal cord is mediated by nitric oxide but not by cyclic GMP." Brain Res **861**(2): 208-19.
- Gaveriaux-Ruff, C., C. Nozaki, et al. (2011). "Genetic ablation of delta opioid receptors in nociceptive sensory neurons increases chronic pain and abolishes opioid analgesia." Pain **152**(6): 1238-48.
- Gendron, L., A. L. Lucido, et al. (2006). "Morphine and pain-related stimuli enhance cell surface availability of somatic delta-opioid receptors in rat dorsal root ganglia." J Neurosci **26**(3): 953-62.

- George, A., A. Buehl, et al. (2005). "Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 proteins are differentially regulated during Wallerian degeneration of mouse sciatic nerve." Exp Neurol **192**(1): 163-6.
- George, A., C. Kleinschnitz, et al. (2004). "Wallerian degeneration after crush or chronic constriction injury of rodent sciatic nerve is associated with a depletion of endoneurial interleukin-10 protein." Exp Neurol **188**(1): 187-91.
- George, A., C. Schmidt, et al. (1999). "Serial determination of tumor necrosis factor-alpha content in rat sciatic nerve after chronic constriction injury." Exp Neurol **160**(1): 124-32.
- Gingrich und Hen, J. A. (2000). "The broken mouse: the role of development, plasticity and environment in the interpretation of phenotypic changes in knockout mice." Curr Opin Neurobiol **10**(1): 146-52.
- Goldstein, A. und B. M. Cox (1977). "Opioid peptides (endorphins) in pituitary and brain." Psychoneuroendocrinology **2**(1): 11-6.
- Grünig, G., de Vries, J.E., de Waal Malefyt, R. (2003). "Interleukin 13. In: Thomson, A.W., Lotze, M. T., eds. The cytokine handbook. New York: Academic Press, 409-429".
- Gühring, H., M. Gorig, et al. (2000). "Suppressed injury-induced rise in spinal prostaglandin E2 production and reduced early thermal hyperalgesia in iNOS-deficient mice." J Neurosci **20**(17): 6714-20.
- Hama, A., J. Woon Lee, et al. (2003). "Differential efficacy of intrathecal NMDA receptor antagonists on inflammatory mechanical and thermal hyperalgesia in rats." Eur J Pharmacol **459**(1): 49-58.
- Hao, S., M. Mata, et al. (2006). "HSV-mediated expression of interleukin-4 in dorsal root ganglion neurons reduces neuropathic pain." Mol Pain **2**: 6.
- Hargreaves, R. (1988). "A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia." Pain(32): 77-88.
- Hervera, A., R. Negrete, et al. (2010). "The role of nitric oxide in the local antiallodynic and antihyperalgesic effects and expression of delta-opioid and

- cannabinoid-2 receptors during neuropathic pain in mice." J Pharmacol Exp Ther **334**(3): 887-96.
- Hervera, A., R. Negrete, et al. (2011). "Peripheral effects of morphine and expression of mu-opioid receptors in the dorsal root ganglia during neuropathic pain: nitric oxide signaling." Mol Pain **7**: 25.
- Holguin, A., K. A. O'Connor, et al. (2004). "HIV-1 gp120 stimulates proinflammatory cytokine-mediated pain facilitation via activation of nitric oxide synthase-I (nNOS)." Pain **110**(3): 517-30.
- Honore, P., C. L. Wade, et al. (2006). "Interleukin-1alpha gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain." Behav Brain Res **167**(2): 355-64.
- Hughes, J. und H. W. Kosterlitz (1977). "Opioid peptides." Br Med Bull **33**(2): 157-61.
- Hulshof, S., L. Montagne, et al. (2002). "Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions." Glia **38**(1): 24-35.
- Huygen, F. J., A. G. De Bruijn, et al. (2002). "Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1." Mediators Inflamm **11**(1): 47-51.
- Ignatowski, T. A., W. C. Covey, et al. (1999). "Brain-derived TNFalpha mediates neuropathic pain." Brain Res **841**(1-2): 70-7.
- Igwe, O. J. (2003). "c-Src kinase activation regulates preprotachykinin gene expression and substance P secretion in rat sensory ganglia." Eur J Neurosci **18**(7): 1719-30.
- Im, J. S., N. Tapinos, et al. (2006). "Expression of CD1d molecules by human schwann cells and potential interactions with immunoregulatory invariant NK T cells." J Immunol **177**(8): 5226-35.
- Ji, R. R., T. A. Samad, et al. (2002). "p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia." Neuron **36**(1): 57-68.

- Ji, R. R., Q. Zhang, et al. (1995). "Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation." J Neurosci **15**(12): 8156-66.
- Jin et al., X. (2006). "Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha." J Neurosci **26**(1): 246-55.
- Jin, X. und R. W. t. Gereau (2006). "Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor-alpha." J Neurosci **26**(1): 246-55.
- Junger, H. und L. S. Sorkin (2000). "Nociceptive and inflammatory effects of subcutaneous TNFalpha." Pain **85**(1-2): 145-51.
- Karaji, A. G., D. Reiss, et al. (2010). "Influence of endogenous opioid systems on T lymphocytes as assessed by the knockout of mu, delta and kappa opioid receptors." J Neuroimmune Pharmacol **6**(4): 608-16.
- Karulin, A. Y., M. D. Hesse, et al. (2002). "Indirect IL-4 pathway in type 1 immunity." J Immunol **168**(2): 545-53.
- Kawasaki, Y., L. Zhang, et al. (2008). "Cytokine mechanisms of central sensitization: distinct and overlapping role of interleukin-1beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in regulating synaptic and neuronal activity in the superficial spinal cord." J Neurosci **28**(20): 5189-94.
- Kiguchi, N., T. Maeda, et al. (2010). "Macrophage inflammatory protein-1alpha mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1beta up-regulation." Pain **149**(2): 305-15.
- Kim, D., M. A. Kim, et al. (2007). "A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity." J Biol Chem **282**(20): 14975-83.
- Kleinschnitz, C., J. Brinkhoff, et al. (2005). "Contralateral cytokine gene induction after peripheral nerve lesions: dependence on the mode of injury and NMDA receptor signaling." Brain Res Mol Brain Res **136**(1-2): 23-8.

- Kleinschnitz, C., J. Brinkhoff, et al. (2004). "The extent of cytokine induction in peripheral nerve lesions depends on the mode of injury and NMDA receptor signaling." J Neuroimmunol **149**(1-2): 77-83.
- Koltzenburg, M., L. E. Lundberg, et al. (1992). "Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin." Pain **51**(2): 207-19.
- Koltzenburg, M., H. E. Torebjork, et al. (1994). "Nociceptor modulated central sensitization causes mechanical hyperalgesia in acute chemogenic and chronic neuropathic pain." Brain **117 (Pt 3)**: 579-91.
- Kotani, N., R. Kudo, et al. (2004). "Cerebrospinal fluid interleukin 8 concentrations and the subsequent development of postherpetic neuralgia." Am J Med **116**(5): 318-24.
- Kraus, J. (2009). "Regulation of mu-opioid receptors by cytokines." Front Biosci (Schol Ed) **1**: 164-70.
- Kraus, J., C. Borner, et al. (2001). "Regulation of mu-opioid receptor gene transcription by interleukin-4 and influence of an allelic variation within a STAT6 transcription factor binding site." J Biol Chem **276**(47): 43901-8.
- Kuhar, M. J., C. B. Pert, et al. (1973). "Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain." Nature **245**(5426): 447-50.
- Latremoliere et al., A. (2009). "Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity." J Pain **10**(9): 895-926.
- Law, L. (1999). "Regulation of OR activities." The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics
- Ledeboer, A., B. M. Jekich, et al. (2007). "Intrathecal interleukin-10 gene therapy attenuates paclitaxel-induced mechanical allodynia and proinflammatory cytokine expression in dorsal root ganglia in rats." Brain Behav Immun **21**(5): 686-98.
- Lee, H. L., K. M. Lee, et al. (2004). "Temporal expression of cytokines and their receptors mRNAs in a neuropathic pain model." Neuroreport **15**(18): 2807-11.

- Leger, T., J. Grist, et al. (2011). "Glatiramer acetate attenuates neuropathic allodynia through modulation of adaptive immune cells." J Neuroimmunol **234**(1-2): 19-26.
- Leung et al., L. (2010). "TNF-alpha and neuropathic pain--a review." J Neuroinflammation **7**: 27.
- Lindenlaub, T. und C. Sommer (2003). "Cytokines in sural nerve biopsies from inflammatory and non-inflammatory neuropathies." Acta Neuropathol **105**(6): 593-602.
- Liu, J., X. Feng, et al. (2007). "Pentoxifylline attenuates the development of hyperalgesia in a rat model of neuropathic pain." Neurosci Lett **412**(3): 268-72.
- Ludwig, J., A. Binder, et al. (2008). "Cytokine expression in serum and cerebrospinal fluid in non-inflammatory polyneuropathies." J Neurol Neurosurg Psychiatry **79**(11): 1268-73.
- Lüllmann H., M. K., Wehling M. (2006). Pharmakologie und Toxikologie, Georg Thieme Verlag.
- Luo, L., L. Chang, et al. (2007). "Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat." Neuroscience **144**(4): 1477-85.
- MacEwan, D. J. (2002). "TNF ligands and receptors--a matter of life and death." Br J Pharmacol **135**(4): 855-75.
- Machelska, S. (2000). "Pain Control by immune-derived opioids." Clinical and experimental pharmacology and physiology.
- Machelska und Stein, C. (2006). "Leukocyte-derived opioid peptides and inhibition of pain." J Neuroimmune Pharmacol **1**(1): 90-7.
- Maihofner, C., H. O. Handwerker, et al. (2005). "Mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: a role for TNF-alpha?" Neurology **65**(2): 311-3.
- Mamet, J., A. Baron, et al. (2002). "Proinflammatory mediators, stimulators of sensory neuron excitability via the expression of acid-sensing ion channels." J Neurosci **22**(24): 10662-70.

- Manni, L. und L. Aloe (1998). "Role of IL-1 beta and TNF-alpha in the regulation of NGF in experimentally induced arthritis in mice." Rheumatol Int **18**(3): 97-102.
- Mansikka, H., R. N. Sheth, et al. (2000). "Nerve injury-induced mechanical but not thermal hyperalgesia is attenuated in neurokinin-1 receptor knockout mice." Exp Neurol **162**(2): 343-9.
- Mansikka, H., C. Zhao, et al. (2004). "Nerve injury induces a tonic bilateral mu-opioid receptor-mediated inhibitory effect on mechanical allodynia in mice." Anesthesiology **100**(4): 912-21.
- Mansour (1995). "Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications." Trends Neurosciences.
- Marceau, F. (1995). "Kinin B1 receptors: a review." Immunopharmacology **30**(1): 1-26.
- Martin, G., R. J. O'Connell, et al. (2008). "Interleukin-4 activates large-conductance, calcium-activated potassium (BKCa) channels in human airway smooth muscle cells." Exp Physiol **93**(7): 908-18.
- McCann, F. V., D. C. McCarthy, et al. (1991). "Interleukin-4 activates ion channels in B lymphocytes." Cell Signal **3**(5): 483-90.
- McGivern, J. G. (2006). "Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain." Drug Discov Today **11**(5-6): 245-53.
- Milligan, E. D., K. A. O'Connor, et al. (2001). "Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines." J Neurosci **21**(8): 2808-19.
- Milligan, E. D., E. M. Sloane, et al. (2005). "Controlling neuropathic pain by adeno-associated virus driven production of the anti-inflammatory cytokine, interleukin-10." Mol Pain **1**: 9.
- Milligan, E. D., E. M. Sloane, et al. (2006). "Repeated intrathecal injections of plasmid DNA encoding interleukin-10 produce prolonged reversal of neuropathic pain." Pain **126**(1-3): 294-308.

- Milligan, E. D., C. Twining, et al. (2003). "Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats." J Neurosci **23**(3): 1026-40.
- Milligan, G. (2005). "Opioid receptors and their interacting proteins." Neuromolecular Med **7**(1-2): 51-9.
- Milligan und Watkins, E. D. (2009). "Pathological and protective roles of glia in chronic pain." Nat Rev Neurosci **10**(1): 23-36.
- Nakamura, H., K. Nakanishi, et al. (1988). "Interleukin-1 induces analgesia in mice by a central action." Eur J Pharmacol **149**(1-2): 49-54.
- Niederberger, E., H. Kuhlein, et al. (2008). "Update on the pathobiology of neuropathic pain." Expert Rev Proteomics **5**(6): 799-818.
- Niikura, K., M. Narita, et al. (2010). "Neuropathic and chronic pain stimuli downregulate central mu-opioid and dopaminergic transmission." Trends Pharmacol Sci **31**(7): 299-305.
- Norenberg, M. D. (1994). "Astrocyte responses to CNS injury." J Neuropathol Exp Neurol **53**(3): 213-20.
- Norman, G. J., K. Karelina, et al. (2010). "Social interaction prevents the development of depressive-like behavior post nerve injury in mice: a potential role for oxytocin." Psychosom Med **72**(6): 519-26.
- Obara, I., J. R. Parkitna, et al. (2009). "Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain." Pain **141**(3): 283-91.
- Obata, K., H. Yamanaka, et al. (2004). "Role of mitogen-activated protein kinase activation in injured and intact primary afferent neurons for mechanical and heat hypersensitivity after spinal nerve ligation." J Neurosci **24**(45): 10211-22.
- Obreja, O., P. K. Rathee, et al. (2002). "IL-1 beta potentiates heat-activated currents in rat sensory neurons: involvement of IL-1RI, tyrosine kinase, and protein kinase C." Faseb J **16**(12): 1497-503.

- Ochoa-Reparaz, J., A. Rynda, et al. (2008). "IL-13 production by regulatory T cells protects against experimental autoimmune encephalomyelitis independently of autoantigen." J Immunol **181**(2): 954-68.
- Ohtori, S., K. Takahashi, et al. (2004). "TNF-alpha and TNF-alpha receptor type 1 upregulation in glia and neurons after peripheral nerve injury: studies in murine DRG and spinal cord." Spine **29**(10): 1082-8.
- Oka, T., S. Aou, et al. (1993). "Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta induces hyperalgesia in rats." Brain Res **624**(1-2): 61-8.
- Oka, T., S. Aou, et al. (1994). "Intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta enhances nociceptive neuronal responses of the trigeminal nucleus caudalis in rats." Brain Res **656**(2): 236-44.
- Oka, T., K. Oka, et al. (1996). "Inhibition of peripheral interleukin-1 beta-induced hyperalgesia by the intracerebroventricular administration of diclofenac and alpha-melanocyte-stimulating hormone." Brain Res **736**(1-2): 237-42.
- Oka, T., Y. Wakugawa, et al. (1996). "Intracerebroventricular injection of tumor necrosis factor-alpha induces thermal hyperalgesia in rats." Neuroimmunomodulation **3**(2-3): 135-40.
- Okada, H., Banchereau, J., Lotze, M. T. (2003). "Interleukin 4. In: Thomson, A. W.; Lotze, M. T., eds. The cytokine handbook. New York: Academic Press; 227-262. ."
- Okamoto, K., D. P. Martin, et al. (2001). "Pro- and anti-inflammatory cytokine gene expression in rat sciatic nerve chronic constriction injury model of neuropathic pain." Exp Neurol **169**(2): 386-91.
- Oprea et al., A. (2000). "Involvement of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor-alpha, IL-1 beta, and IL-6 but not IL-8 in the development of heat hyperalgesia: effects on heat-evoked calcitonin gene-related peptide release from rat skin." J Neurosci **20**(16): 6289-93.
- Ossipov, M. H., E. T. Zhang, et al. (2002). "Selective mediation of nerve injury-induced tactile hypersensitivity by neuropeptide Y." J Neurosci **22**(22): 9858-67.

- Ozaktay, A. C., S. Kallakuri, et al. (2006). "Effects of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor on sensitivity of dorsal root ganglion and peripheral receptive fields in rats." Eur Spine J **15**(10): 1529-37.
- Paintlia, A. S., M. K. Paintlia, et al. (2006). "IL-4-induced peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation inhibits NF-kappaB trans activation in central nervous system (CNS) glial cells and protects oligodendrocyte progenitors under neuroinflammatory disease conditions: implication for CNS-demyelinating diseases." J Immunol **176**(7): 4385-98.
- Pasternak (2004). "Multiple OR-Review." Neuropharmacology.
- Pasternak, G. W. (2004). "Multiple opiate receptors: deja vu all over again." Neuropharmacology **47 Suppl 1**: 312-23.
- Peng, X. M., Z. G. Zhou, et al. (2006). "Tumor necrosis factor-alpha contributes to below-level neuropathic pain after spinal cord injury." Ann Neurol **59**(5): 843-51.
- Perkins, M. N., D. Kelly, et al. (1995). "Bradykinin B1 and B2 receptor mechanisms and cytokine-induced hyperalgesia in the rat." Can J Physiol Pharmacol **73**(7): 832-6.
- Pert, C. B., A. M. Snowman, et al. (1974). "Localization of opiate receptor binding in synaptic membranes of rat brain." Brain Res **70**(1): 184-8.
- Pert, C. B. und S. H. Snyder (1973). "Properties of opiate-receptor binding in rat brain." Proc Natl Acad Sci U S A **70**(8): 2243-7.
- Peterson, P. K., T. W. Molitor, et al. (1998). "The opioid-cytokine connection." J Neuroimmunol **83**(1-2): 63-9.
- Pol, O. (2007). "The involvement of the nitric oxide in the effects and expression of opioid receptors during peripheral inflammation." Curr Med Chem **14**(18): 1945-55.
- Pol, O., P. Murtra, et al. (2006). "Expression of opioid receptors and c-fos in CB1 knockout mice exposed to neuropathic pain." Neuropharmacology **50**(1): 123-32.

- Pol, O. und M. M. Puig (2004). "Expression of opioid receptors during peripheral inflammation." Curr Top Med Chem **4**(1): 51-61.
- Pollock, J., S. M. McFarlane, et al. (2002). "TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca²⁺ mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones." Neuropharmacology **42**(1): 93-106.
- Ponomarev, E. D., K. Maresz, et al. (2007). "CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells." J Neurosci **27**(40): 10714-21.
- Poole, S., F. Q. Cunha, et al. (1995). "Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-10." Br J Pharmacol **115**(4): 684-8.
- Przewlocki, R., A. H. Hassan, et al. (1992). "Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception." Neuroscience **48**(2): 491-500.
- Puehler, W., H. L. Rittner, et al. (2006). "Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mrna in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation." Neuroscience **141**(2): 989-98.
- Puehler, W., C. Zollner, et al. (2004). "Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction." Neuroscience **129**(2): 473-9.
- Ruohonen, S., M. Jagodi, et al. (2002). "Contralateral non-operated nerve to transected rat sciatic nerve shows increased expression of IL-1beta, TGF-beta1, TNF-alpha, and IL-10." J Neuroimmunol **132**(1-2): 11-7.
- Ruohonen, S., M. Khademi, et al. (2005). "Cytokine responses during chronic denervation." J Neuroinflammation **2**: 26.
- Saadoun, D., I. Bieche, et al. (2005). "Involvement of chemokines and type 1 cytokines in the pathogenesis of hepatitis C virus-associated mixed cryoglobulinemia vasculitis neuropathy." Arthritis Rheum **52**(9): 2917-25.
- Saegusa, H., T. Kurihara, et al. (2001). "Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel." Embo J **20**(10): 2349-56.

- Salemi, S., J. Rethage, et al. (2003). "Detection of interleukin 1beta (IL-1beta), IL-6, and tumor necrosis factor-alpha in skin of patients with fibromyalgia." J Rheumatol **30**(1): 146-50.
- Samad, T. A., K. A. Moore, et al. (2001). "Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity." Nature **410**(6827): 471-5.
- Sampaio, E. P., G. Kaplan, et al. (1993). "The influence of thalidomide on the clinical and immunologic manifestation of erythema nodosum leprosum." J Infect Dis **168**(2): 408-14.
- Sarantopoulos, C. D., J. B. McCallum, et al. (2007). "Opposing effects of spinal nerve ligation on calcium-activated potassium currents in axotomized and adjacent mammalian primary afferent neurons." Brain Res **1132**(1): 84-99.
- Schäfers, M., M. Marziniak, et al. (2004). "Cyclooxygenase inhibition in nerve-injury- and TNF-induced hyperalgesia in the rat." Exp Neurol **185**(1): 160-8.
- Schäfers, M. und C. Sommer (2007). "Anticytokine therapy in neuropathic pain management." Expert Rev Neurother **7**(11): 1613-27.
- Schäfers, M., L. S. Sorkin, et al. (2003). "Intramuscular injection of tumor necrosis factor-alpha induces muscle hyperalgesia in rats." Pain **104**(3): 579-88.
- Schäfers, M., C. I. Svensson, et al. (2003). "Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons." J Neurosci **23**(7): 2517-21.
- Schinkel, C., A. Gaertner, et al. (2006). "Inflammatory mediators are altered in the acute phase of posttraumatic complex regional pain syndrome." Clin J Pain **22**(3): 235-9.
- Schuerwegh, A. J., J. F. Van Offel, et al. (2003). "Influence of therapy with chimeric monoclonal tumour necrosis factor-alpha antibodies on intracellular cytokine profiles of T lymphocytes and monocytes in rheumatoid arthritis patients." Rheumatology (Oxford) **42**(4): 541-8.
- Sehgal, N., H. S. Smith, et al. (2011). "Peripherally acting opioids and clinical implications for pain control." Pain Physician **14**(3): 249-58.

- Shamash, S., F. Reichert, et al. (2002). "The cytokine network of Wallerian degeneration: tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1alpha, and interleukin-1beta." J Neurosci **22**(8): 3052-60.
- Sharp, B. M., S. Roy, et al. (1998). "Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system." J Neuroimmunol **83**(1-2): 45-56.
- Shaw, M. K., J. B. Lorens, et al. (1997). "Local delivery of interleukin 4 by retrovirus-transduced T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **185**(9): 1711-4.
- Shubayev, V. I. und R. R. Myers (2000). "Upregulation and interaction of TNFalpha and gelatinases A and B in painful peripheral nerve injury." Brain Res **855**(1): 83-9.
- Simon, E. J. (1973). "In search of the opiate receptor." Am J Med Sci **266**(3): 160-8.
- Soliman, A. C., J. S. Yu, et al. (2005). "mGlu and NMDA receptor contributions to capsaicin-induced thermal and mechanical hypersensitivity." Neuropharmacology **48**(3): 325-32.
- Sommer, C. (2006). Therapie neuropathischer Schmerzen. Bremen, Uni-med Verlag.
- Sommer, C. und M. Kress (2004). "Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia." Neurosci Lett **361**(1-3): 184-7.
- Sommer, C., M. Marziniak, et al. (1998). "The effect of thalidomide treatment on vascular pathology and hyperalgesia caused by chronic constriction injury of rat nerve." Pain **74**(1): 83-91.
- Sommer, C., M. Schafers, et al. (2001). "Etanercept reduces hyperalgesia in experimental painful neuropathy." J Peripher Nerv Syst **6**(2): 67-72.
- Son, S. J., K. M. Lee, et al. (2007). "Activation of transcription factor c-jun in dorsal root ganglia induces VIP and NPY upregulation and contributes to the pathogenesis of neuropathic pain." Exp Neurol **204**(1): 467-72.

- Song, P., W. Lie-Cheng, et al. (2002). "Interleukin-2 regulates membrane potentials and calcium channels via mu opioid receptors in rat dorsal root ganglion neurons." Neuropharmacology **43**(8): 1324-9.
- Sorkin, L. S., W. H. Xiao, et al. (1997). "Tumour necrosis factor-alpha induces ectopic activity in nociceptive primary afferent fibres." Neuroscience **81**(1): 255-62.
- Staton, P. C., J. P. Hatcher, et al. (2008). "The putative cannabinoid receptor GPR55 plays a role in mechanical hyperalgesia associated with inflammatory and neuropathic pain." Pain **139**(1): 225-36.
- Stein, C., C. Gramsch, et al. (1990). "Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin." J Neurosci **10**(4): 1292-8.
- Stein, C. und L. J. Lang (2009). "Peripheral mechanisms of opioid analgesia." Curr Opin Pharmacol **9**(1): 3-8.
- Stein, C. und C. Zollner (2009). "Opioids and sensory nerves." Handb Exp Pharmacol(194): 495-518.
- Steinke, J. W. (2010). "Current prospective of anti-IL-4, -IL-9, and -IL-13 therapies in allergic disease." Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov **4**(3): 222-30.
- Stone, L. S., L. Vulchanova, et al. (2004). "Effects of peripheral nerve injury on delta opioid receptor (DOR) immunoreactivity in the rat spinal cord." Neurosci Lett **361**(1-3): 208-11.
- Strle, K., J. H. Zhou, et al. (2001). "Interleukin-10 in the brain." Crit Rev Immunol **21**(5): 427-49.
- Sun, H., K. Ren, et al. (2001). "Nerve injury-induced tactile allodynia is mediated via ascending spinal dorsal column projections." Pain **90**(1-2): 105-11.
- Sung, C. S., Z. H. Wen, et al. (2004). "Intrathecal interleukin-1beta administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord." Brain Res **1015**(1-2): 145-53.
- Szente, E. B. (2004). "Cytokine signaling. In: Thomson, A. W.; Lotze, M. T., eds. The cytokine handbook. New York: Academic Press, 2004: 85-97."

- Takeda, M., J. Kitagawa, et al. (2008). "Activation of interleukin-1beta receptor suppresses the voltage-gated potassium currents in the small-diameter trigeminal ganglion neurons following peripheral inflammation." Pain **139**(3): 594-602.
- Tanga, F. Y., N. Nutile-McMenemy, et al. (2005). "The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(16): 5856-61.
- Tanzola, M. B., M. Robbie-Ryan, et al. (2003). "Mast cells exert effects outside the central nervous system to influence experimental allergic encephalomyelitis disease course." J Immunol **171**(8): 4385-91.
- Teles, R. M., S. L. Antunes, et al. (2007). "Expression of metalloproteinases (MMP-2, MMP-9, and TACE) and TNF-alpha in the nerves of leprosy patients." J Peripher Nerv Syst **12**(3): 195-204.
- Treede, R. D., T. S. Jensen, et al. (2008). "Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes." Neurology **70**(18): 1630-5.
- Treede, R. D., R. A. Meyer, et al. (1992). "Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia." Prog Neurobiol **38**(4): 397-421.
- Tu, H., T. Juelich, et al. (2003). "Evidence for endogenous interleukin-10 during nociception." J Neuroimmunol **139**(1-2): 145-9.
- Üçeyler und Sommer (2008a). "Zytokinregulation und Schmerz-Ergebnisse tierexperimenteller und klinischer Forschung." Schmerz.
- Üçeyler, N., T. Eberle, et al. (2007a). "Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome." Pain **132**(1-2): 195-205.
- Üçeyler, N., K. Gobel, et al. (2010a). "Deficiency of the negative immune regulator B7-H1 enhances inflammation and neuropathic pain after chronic constriction injury of mouse sciatic nerve." Exp Neurol **222**(1): 153-60.
- Üçeyler, N., W. Kafke, et al. (2010b). "Elevated proinflammatory cytokine expression in affected skin in small fiber neuropathy." Neurology **74**(22): 1806-13.

- Üçeyler, N., J. P. Rogausch, et al. (2007b). "Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies." Neurology **69**(1): 42-9.
- Üçeyler, N., A. Tschärke, et al. (2007c). "Early cytokine expression in mouse sciatic nerve after chronic constriction nerve injury depends on calpain." Brain Behav Immun **21**(5): 553-60.
- Üçeyler, N., A. Tschärke, et al. (2008d). "Early cytokine gene expression in mouse CNS after peripheral nerve lesion." Neurosci Lett **436**(2): 259-64.
- Üçeyler, N., R. Valenza, et al. (2006). "Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain." Arthritis Rheum **54**(8): 2656-64.
- Ueda, H. (2009). "[Anti-opioid action of glutamate-NMDA receptor systems underlying morphine analgesic tolerance]." Masui **58**(9): 1136-42.
- Vale, M. L., J. B. Marques, et al. (2003). "Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats." J Pharmacol Exp Ther **304**(1): 102-8.
- Vidal, E. L., N. A. Patel, et al. (1998). "Interleukin-1 induces the expression of mu opioid receptors in endothelial cells." Immunopharmacology **38**(3): 261-6.
- Vilcek, J. (2004). The cytokines: An overview. In: Thomson, A. W.; Lotze, M. T., eds. The cytokine handbook. New York: Academic Press; 3-18. .
- Vogel, C., S. Stallforth, et al. (2006). "Altered pain behavior and regeneration after nerve injury in TNF receptor deficient mice." J Peripher Nerv Syst **11**(4): 294-303.
- Wagner, R., M. Janjigian, et al. (1998). "Anti-inflammatory interleukin-10 therapy in CCI neuropathy decreases thermal hyperalgesia, macrophage recruitment, and endoneurial TNF-alpha expression." Pain **74**(1): 35-42.
- Wallace, D. J., M. Linker-Israeli, et al. (2001). "Cytokines play an aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study." Rheumatology (Oxford) **40**(7): 743-9.
- Wallace, D. J., K. Margolin, et al. (1988). "Fibromyalgia and interleukin-2 therapy for malignancy." Ann Intern Med **108**(6): 909.

- Wang, H., Czura, C. J., Tracey, K. J. (2004). "Tumor necrosis factor. In: Thomson, A.W., Lotze, M.T., eds. The cytokine handbook. New York: Academic Press, 837-857."
- Wang, X. H., W. Zhao, et al. (2009). "[Correlation of IL-4 and IL-13 gene polymorphisms with asthma and total serum IgE levels]." Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi **32**(3): 161-4.
- Watkins, L. R., M. R. Hutchinson, et al. (2009). "The "toll" of opioid-induced glial activation: improving the clinical efficacy of opioids by targeting glia." Trends Pharmacol Sci **30**(11): 581-91.
- Wei, T., I. Sabsovich, et al. (2009). "Pentoxifylline attenuates nociceptive sensitization and cytokine expression in a tibia fracture rat model of complex regional pain syndrome." Eur J Pain **13**(3): 253-62.
- Weihe, E., D. Nohr, et al. (1988). "Peptide neuroanatomy of adjuvant-induced arthritic inflammation in rat." Agents Actions **25**(3-4): 255-9.
- Wieseler-Frank, J., S. F. Maier, et al. (2004). "Glial activation and pathological pain." Neurochem Int **45**(2-3): 389-95.
- Winkelstein, B. A., M. D. Rutkowski, et al. (2001). "Nerve injury proximal or distal to the DRG induces similar spinal glial activation and selective cytokine expression but differential behavioral responses to pharmacologic treatment." J Comp Neurol **439**(2): 127-39.
- Wolf, G., E. Gabay, et al. (2006). "Genetic impairment of interleukin-1 signaling attenuates neuropathic pain, autotomy, and spontaneous ectopic neuronal activity, following nerve injury in mice." Pain **120**(3): 315-24.
- Wu, G., M. Ringkamp, et al. (2002). "Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents." J Neurosci **22**(17): 7746-53.
- Xie, W., S. Luo, et al. (2006). "Betamethasone affects cerebral expressions of NF-kappaB and cytokines that correlate with pain behavior in a rat model of neuropathy." Ann Clin Lab Sci **36**(1): 39-46.

- Yang, L., N. R. Jones, et al. (2005). "Severity-dependent expression of pro-inflammatory cytokines in traumatic spinal cord injury in the rat." J Clin Neurosci **12**(3): 276-84.
- Yune, T. Y., M. J. Chang, et al. (2003). "Increased production of tumor necrosis factor-alpha induces apoptosis after traumatic spinal cord injury in rats." J Neurotrauma **20**(2): 207-19.
- Zadina, J. E., L. Hackler, et al. (1997). "A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor." Nature **386**(6624): 499-502.
- Zelenka, M., M. Schafers, et al. (2005). "Intraneural injection of interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha into rat sciatic nerve at physiological doses induces signs of neuropathic pain." Pain **116**(3): 257-63.
- Zhang, J. M., H. Li, et al. (2002). "Acute topical application of tumor necrosis factor alpha evokes protein kinase A-dependent responses in rat sensory neurons." J Neurophysiol **88**(3): 1387-92.
- Zhang, R. X., B. Liu, et al. (2008). "Interleukin 1beta facilitates bone cancer pain in rats by enhancing NMDA receptor NR-1 subunit phosphorylation." Neuroscience **154**(4): 1533-8.
- Zhou, Z., X. Peng, et al. (2008). "HSV-mediated transfer of interleukin-10 reduces inflammatory pain through modulation of membrane tumor necrosis factor alpha in spinal cord microglia." Gene Ther **15**(3): 183-90.
- Zhuang, Z. Y., Y. R. Wen, et al. (2006). "A peptide c-Jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor blocks mechanical allodynia after spinal nerve ligation: respective roles of JNK activation in primary sensory neurons and spinal astrocytes for neuropathic pain development and maintenance." J Neurosci **26**(13): 3551-60.

7. Materialienliste

1. Geräte und Laborhilfen

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Absaugpumpe	ECOM-P 4153	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Drucker	PDU-414 Thermal Printer	Seiko Instruments, Japan
Heizblock		FA Liebisch, Bielefeld, Deutschland
Homogenisator	Polytron PT 1600	Kinematika AG, Luzern, Switzerland
Mikroskop	WILD M3B Mikroskop	Leica, Bensheim, Deutschland
Mikrotom	CM 3050 S	Leica, Wetzlar, Deutschland
PCR-Cycler für reverse Transkription	Gene Amp PCR-System 9700	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Pipetten	Pipetman Gilson 10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Real-Time PCR-Cycler	AbiPrism Gene Amp 7700 sequence detection System	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Schüttler	GLW L-40	Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg, Deutschland
Spectrometer	Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	GLW L-46	Gesellschaft für Laborbedarf Würzburg, Deutschland

Hitzequelle		Ugo Basile Algesiometer, Comerio, Italien
-------------	--	--

2. Verbrauchsmaterialien

Art	Bezeichnung	Hersteller
Caps	0,2; 1,5; 2 ml	Eppendorf GmbH, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	10; 100; 200; 1000 μ l	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Skalpelli		Braun, Tuttlingen, Deutschland
7-0 Prolene®- Nahtmaterial		Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland
von-Frey-Filament		Ugo Basile, Comerio, Italien
Reaktionsplatten für Real- Time-PCR	Micro Amp Optical 96- Well Reaction Plate	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Verschlusskappen für PCR-Reaktionsplatten	Micro Amp 8-Cap Strip	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

3. Mäuse

Art	Bezeichnung	Hersteller
wt-Mäuse	C57Bl/6J	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
IL-4 ko-Mäuse		Jackson Laboratories, Maine, USA

4. Medikamente

Art	Bezeichnung	Hersteller
Lokalanästhetikum	Scandicain 1%	
Isofluran		cp-pharma, Burgdorf, Deutschland
Morphin		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

5. Chemikalien, Puffer und Lösungen für die RNA-Extraktion aus Gewebe

Art	Bezeichnung/Inhalt	Hersteller
DEPC-Wasser	Diethyl-Pyro-Carbonat behandeltes Wasser	Laboreigene Herstellung aus Grundbestandteilen
Ethanol	75%	
Trizol [®] -Reagenz		Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform		
Glycogen		Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Isopropylalkohol		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

6. Enzyme, Primer, Puffer und Nukleinsäuren für die Reverse-Transkriptase PCR

Art	Bezeichnung	Hersteller
Nukleotide	dNTP's	Taq Man Reverse Transcription Reagents, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Primer	Oligo-DT	
	Random Hexamers	
Puffer	10x RT-Buffer	
	25 mM MgCl ₂	
Reverse Transkriptase	Multiscribe Reverse Transkriptase	
RNA'se Inhibitor		

7. Enzyme, Primer, Puffer und Nukleinsäuren für die Real-Time PCR

Primer/Puffer	Bezeichnung	Hersteller
IL-1 beta	Mm00434228_m1	Taq Man, Gene expression assay, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
TNF	Mm00443258_m1	
IL-10	Mm00439616_m1	
IL-13	Mm00434204_m1	
18s	Hs99999901_s1	
MOR	Mm00440568_m1	
DOR	Mm00443063_m1	
KOR	Mm00440561_m1	
Puffer, Nukleotide, DNA- Polymerase	Universal Master Mix, Taq Man	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland

8. Verwendete Software

Art	Bezeichnung	Hersteller
Textverarbeitung, Tabellenkalkulation	Office Paket 2007	Microsoft, USA
Statistische Auswertung	SPSS-Software, Version 17.0	SPSS Inc., Chicago, USA

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen, die alle zum erfolgreichen Abschluss meiner Doktorarbeit beigetragen haben:

- Frau Priv.-Doz. Dr. Nurcan Üçeyler und Frau Prof. Dr. Sommer für die jederzeit perfekte, gründliche und unermüdliche Betreuung, den zahlreichen Diskussionen und Ratschlägen sowie insbesondere für die unendliche Geduld in der Schlussphase meiner Arbeit.
- Herrn Prof. Dr. Andreas Reif für die Mühe und Bereitschaft, sich als Koreferent mit der Arbeit auseinander zu setzen.
- Herrn Prof. Dr. Volkmann für die hervorragende technische Ausstattung der Labore.
- Frau Lydia Biko, Frau Barbara Gado, Frau Sonja Peetz und Frau Barbara Dekant für die geduldige Einführung in die Techniken und Methoden und die sehr herzliche Zusammenarbeit.
- meiner Familie sowie meinem Freund Markus für ihre uneingeschränkte moralische Unterstützung.

Lebenslauf

Tengü Topuzoğlu

Geburtsdatum: 03.10.1980

Geburtsort: Bad Mergentheim

Ausbildung

1990 – 1999	Schönborn-Gymnasium, Würzburg, Abitur
1999 – 2006	Studium der Humanmedizin, Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
2002	Ärztliche Vorprüfung
2003	Erstes Staatsexamen
2005	Zweites Staatsexamen
2005	1. Terial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Viszeralchirurgie der Universitätsklinik Würzburg
2005	2. Terial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Universitätsklinik Würzburg
2005	2. Terial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Marmara Universitätsklinik, Istanbul, Türkei
2005 - 2006	3. Terial des Praktischen Jahres in der Abteilung für Innere Medizin, Stadtspital Triemli, Zürich, Schweiz
2006	Drittes Staatsexamen
07/2007 - 10/2011	Assistenzärztin in der Medizinischen Klinik II, Städtisches Klinikum Merheim, Köln
Seit 11/2011	Assistenzärztin im Zentrum für Endokrinologie, Diabetologie und Präventivmedizin, Universitätsklinik Köln

Köln, den 14. Dezember 2011