

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie  
der Universität Würzburg

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

Periphere Mechanismen von Elektroakupunktur bei Entzündungsschmerz

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg  
vorgelegt von  
Rebekka Gehringer  
aus Naumburg/Saale

Würzburg, April 2016

Referent bzw. Referentin: Prof. Dr. med. Heike Rittner

Korreferent bzw. Korreferentin: Prof. Dr. rer. nat. Erhard Wischmeyer

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2017

Die Promovendin ist Ärztin

Meinen Eltern

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Aktueller Stand der Forschung .....	1
1.1.1	Akupunktur und der Westen.....	1
1.1.2	Entzündungsschmerz.....	4
1.1.2.1	Zytokine .....	9
1.1.2.2	Chemokine.....	10
1.1.2.3	Die Rolle von Adenosin für Entzündung und Schmerz .....	11
1.1.3	Akupunkturanalgesie und -antinozipeption .....	12
1.1.3.1	Periphere Mechanismen von Elektroakupunktur bei Entzündungsschmerz .....	13
1.1.3.2	Antinozipeptive Wirkung von Elektroakupunktur durch das Chemokin CXCL10 .....	16
1.1.3.3	Adenosinrezeptoren und Akupunktur.....	20
1.2	Fragestellungen .....	23
2	Methoden und Material .....	24
2.1	Tierexperimente .....	24
2.1.1	Versuchstiere.....	24
2.1.2	Elektroakupunktur-Behandlung .....	25
2.1.3	Lokale Blockade der Adenosin-2B-Rezeptoren .....	26
2.1.4	ELISA .....	26
2.1.4.1	Prinzip.....	26
2.1.4.2	Durchführung .....	27
2.1.5	RNA-Isolierung und cDNA-Synthese.....	30
2.1.6	PCR.....	31
2.1.6.1	Prinzip.....	31
2.1.6.2	Durchführung und Auswertung.....	34
2.2	Statistik und Programme .....	36
2.3	Geräte und Software .....	37
2.4	Chemikalien, Kits und Antikörper.....	38
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Veränderungen im Zytokin- und Chemokinmuster durch Elektroakupunktur .....	41
3.1.1	Verminderung proinflammatorischer Zytokine durch Elektroakupunktur .....	41
3.1.2	Antiinflammatorische Zytokine .....	42
3.1.3	Erhöhung des Chemokins CXCL10 .....	43
3.1.4	Keine Änderung der CXCR3-Expression durch Elektroakupunktur .....	44

3.1.5	Keine Veränderung der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-13 und des Chemokins CXCL10 nach Sham-Akupunktur.....	45
3.2	Antiinflammatorische Wirkung von Elektroakupunktur durch Adenosin-2B-Rezeptoren....	46
3.2.1	A2BR-Blockade verhindert die Verminderung proinflammatorischer Zytokine und des Pfortenvolumens durch Elektroakupunktur .....	47
3.2.2	Veränderung der A2BR-Expression durch Elektroakupunktur .....	48
4	Diskussion.....	50
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse .....	50
4.2	Diskussion der Methoden .....	50
4.2.1	Proteinmessung mittels ELISA .....	50
4.2.2	mRNA-Quantifizierung .....	51
4.2.3	Immunhistochemie.....	52
4.2.4	Entzündliche Hyperalgesie durch CFA und Schmerzschwellenmessungen.....	52
4.2.5	Akupunkturmodell.....	54
4.3	Diskussion der Ergebnisse .....	56
4.3.1	Auswirkung von Elektroakupunktur auf die Zytokinproduktion .....	56
4.3.2	Antinozizeptive Wirkung von Elektroakupunktur durch CXCL10-getriggerte Freisetzung peripherer Opiode .....	58
4.3.3	Antiinflammatorische Wirkung von Elektroakupunktur durch A2BR .....	61
5	Zusammenfassung.....	64
6	Abkürzungsverzeichnis .....	65
7	Abbildungsverzeichnis.....	67
8	Literaturverzeichnis.....	70
9	Danksagung .....	
10	Lebenslauf .....	

# 1 Einleitung

---

Akupunktur ist eine Jahrtausende alte asiatische Heilmethode, die gemeinsam mit anderen therapeutischen Anwendungen wie Massagetechniken und Kräutermédisin bei einer Vielzahl von Leiden praktiziert wird. Sie weckte schon früh das Interesse von neugierigen, europäischen Reisenden und erlebt in den letzten Jahren in der westlichen Médisinwelt einen steilen Aufschwung – nicht nur in alternativ-médisinisch affinen Kreisen. Auch die experimentelle Forschung versucht dieser alten Nadeltechnik zugrunde liegende Mechanismen zu verstehen, besonders die schmerzlindernden Aspekte werden intensiv untersucht. In diesem Gebiet ist auch die vorliegende Arbeit angesiedelt, die versucht herauszufinden, welche Vorgänge zu antiinflammatorischen und antinozizeptiven Wirkungen von Akupunktur bei Entzündungsschmerz beitragen.

Im folgenden Kapitel wird die historische Entwicklung der Akupunkturwahrnehmung durch westliche Berichterstatter umrissen. Anschließend werden grundlegende pathophysiologische Vorgänge des Entzündungsschmerzes erklärt. Die Rolle von Zytokinen, Chemokinen und Adenosin für Entzündung und Schmerz wird genauer beleuchtet, da sich die folgenden Experimente auf sie konzentrieren. Bereits bekannte antinozizeptive Mechanismen von Akupunktur mit dem Schwerpunkt auf wichtigen Voraussetzungen und Erkenntnissen auf denen diese Arbeit basiert und die sich daraus ergebenden Fragestellungen werden abschließend vorgestellt.

## 1.1 Aktueller Stand der Forschung

### 1.1.1 Akupunktur und der Westen

Akupunktur wird wohl schon seit der Steinzeit in Asien praktiziert. Während man zuerst Stein- und Knochensplitter nutzte, verwendete man später Metallnadeln aus Bronze oder Kupfer [1]. Die Methode wird erstmals im ältesten Standardwerk der chinesischen Médisin, dem „Huang Di Nei Jing, Su Wên“ (Buch des gelben Kaisers zur Inneren Médisin, ca. zweites Jahrhundert v.Chr.) schriftlich erwähnt. Die erste Notiz über Akupunktur von einem westlichen Entdecker der asiatischen Heilkunde stammt von dem Chirurgen Dane Jakob de Bondt (1592-1631), laut ihm würden die Ergebnisse der japanischen Akupunktur sogar Wunder übertreffen [2]. Die Beobachtungen und Überlegungen, die westliche Missi-

## Einleitung

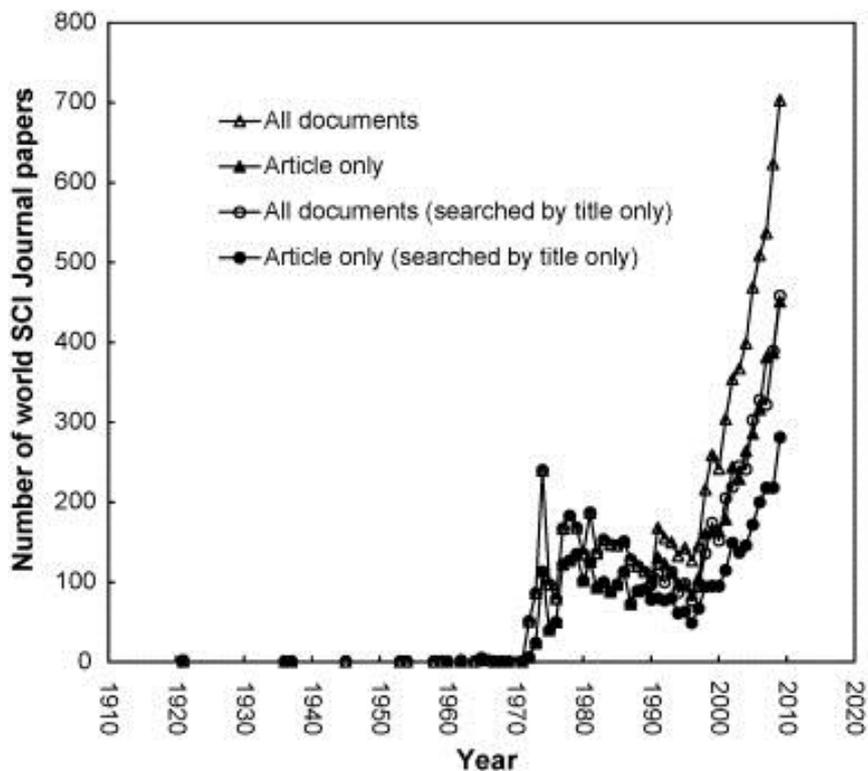
onare und Mediziner zu ihren Begegnungen mit Akupunktur anstellten, sind von Anfang an hin- und hergerissen zwischen Bewunderung, Skepsis und Unverständnis. Häufig wurde die Ablehnung mit der Tatsache begründet, dass anatomische Kenntnisse in China kaum vorhanden waren. Denn Sektionen waren im Konfuzianismus verboten, da man glaubte, diese würden den, von den Eltern geschenkten, Körper zerstören [3]. Wie sollte eine Methode wirken, die ohne anatomische Erklärungen auskam? Nur wenige Autoren, wie van Swieten (1755), konnten die empirische Grundlage aus Jahrtausende alter praktischer Erfahrung anerkennen [4]. Andere wiederum reduzierten die Wirkung auf ein Ergebnis von Imagination und Glaube [5]. Abwägender und weniger überheblich schließt der europäische Chirurg Dujardin solchen Überlegungen noch an: *„Among us, the study of the parts has made [us] neglect the practical sciences of the whole ... in this alone, the medicine of the Chinese, as empirical and imperfect as it is, even in this respect is worthy some attention.“* (Das Erforschen der einzelnen Teile lies [uns] die praktische Wissenschaft des Ganzen vergessen ... allein in diesem Aspekt verdient die chinesische Medizin, so empirisch und unperfekt sie auch sein möge, unsere Aufmerksamkeit.) [6]. Der hier erwähnte ganzheitliche Ansatz der chinesischen Medizin, oft überschrieben als „induktiv synthetisches Denken“, wird häufig der mechanistisch-analytischen Herangehensweise des Westens gegenübergestellt [7]. In China wird alles als Teil eines großen Ganzen gesehen. In dieser Sicht der Welt wird auch der menschliche Körper zu einem Miniaturspiegel des gesamten Kosmos [8]. Alles steht in einer dynamischen Beziehung zueinander. So wird Krankheit als eine Disharmonie in Körper und Geist verstanden. Yin (ursprünglich die Schattenseite des Berges) und Yang (die Sonnenseite) helfen, dieses Ungleichgewicht durch Zuordnung unterschiedlicher Qualitäten zu beschreiben. Sie veranschaulichen das Verhältnis der verschiedenen Aspekte zueinander und sind durch Qi miteinander verbunden. Qi ist im asiatischen Denken die Verbindung zum Kosmos, durch welche Veränderungen und Verknüpfungen erklärt werden können. Bei Krankheit kann es nicht mehr ungehindert auf den Leitbahnen durch den Körper fließen [9]. Hier setzt Akupunktur an, welche zu einer Deblockierung und Harmonisierung beiträgt. Sie wird allerdings in der chinesischen Medizin zusammen mit Kräutertherapie, anderen physikalischen Methoden und grundsätz-

## Einleitung

lichen Lebensstiländerungen angewendet, deren Wirkungen sich gegenseitig ergänzen [10].

In den vergangenen vier Jahrzehnten ist das Interesse der westlichen Medizin, das traditionelle Verständnis der Wirkmechanismen von Akupunktur in die Sprache evidenzbasierter Schulmedizin zu übersetzen, rasant gestiegen [11]. Den westlichen Denkmustern entsprechend wird Akupunktur isoliert untersucht, unabhängig von ihrem philosophisch-kulturellen und medizinischen Kontext.

Die intensive Forschung der letzten Jahre hat ohne Zweifel zu einem besseren Verständnis der physiologischen Mechanismen dieser traditionellen, asiatischen Heilpraktik beigetragen. Sie hat jedoch auch die alten Zweifel, ob die Wirkungen allein durch Glaube und Imagination zu erklären sind, wieder aufgeworfen.



**Abbildung 1: Veröffentlichungen zum Thema Akupunktur seit 1900**

Anzahl aller SCI-Veröffentlichungen unter den Stichwörtern: „electroacupuncture“, „electroacupuncture“, „acupoint“, „acupuncture“ und „percutaneous electrical nerve stimulation“ seit 1900 [11]

### **1.1.2 Entzündungsschmerz**

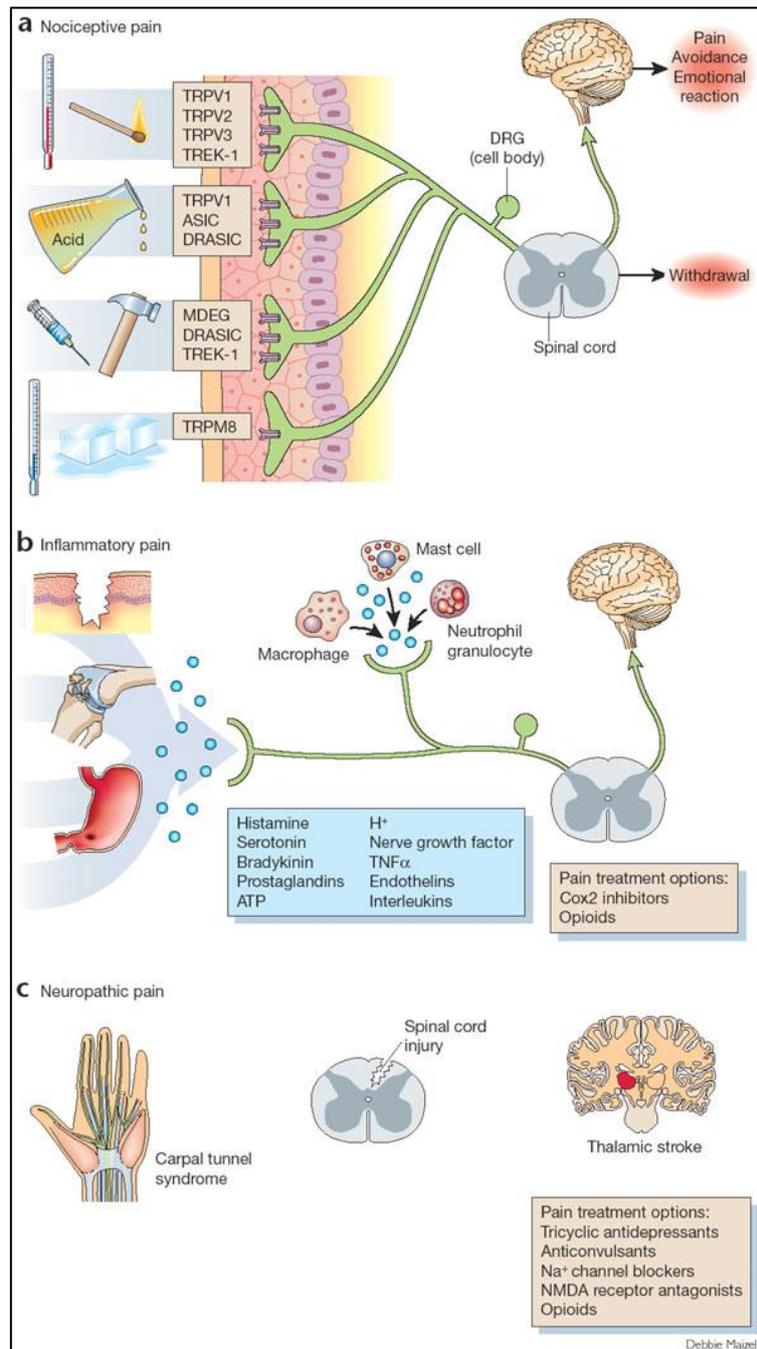
„Schmerz ist ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potenzieller Gewebeschädigung einhergeht, oder von betroffenen Personen so beschrieben wird, als wäre eine solche Gewebeschädigung die Ursache.“ [12] So lautet die aktuelle Definition der International Association for the Study of Pain. Die daran anschließende Ausführung betont, dass Schmerz immer subjektiv ist, eine erlernte Bezeichnung, verwoben mit Erinnerungen an frühere Verletzungen. Ob eine objektivierbare, organische Ursache zu Grunde liegt, oder ob kein somatisches Korrelat gefunden werden kann, sowohl seelische als auch körperliche Schmerzen zeigen in fMRT Studien eine ähnliche Aktivierung neuroanatomischer Strukturen [13-15]. Da Schmerz als subjektive Erfahrung als ausschließlich menschliches Merkmal angesehen wird [16], spricht man bei Tieren von Nozizeption - einem neuronalen Prozess, der für nozizeptive Stimuli kodiert. Ist die Wahrnehmung eines nozizeptiven Stimulus verstärkt spricht man von Hyperalgesie, ist sie vermindert nennt man es Antinozizeption. Analgesie ist als Abwesenheit von Schmerz als Antwort auf einen eigentlich schmerzhaften Stimulus definiert. In den folgenden Ausführungen wird von Schmerz und Analgesie die Rede sein, wenn es sich um menschliche Empfindungen handelt. Im Kontext von Tierversuchen werden die Begriffe Hyperalgesie und Antinozizeption verwendet [12].

Akuter Schmerz dient normalerweise immer als Warnsignal, als Hinweis auf eine beginnende oder drohende Gewebeschädigung. Diese wichtige Schutzfunktion des Schmerzes wird besonders deutlich in Familien mit einer Mutation eines spannungsgesteuerten Natriumkanals (SCN9A), die dazu führt, dass in Nozizeptoren kein Aktionspotential mehr generiert werden kann und dass das endogene Opioidpeptidsystem heraufreguliert wird. Die Patienten mit dieser sehr seltenen Erkrankung haben die Fähigkeit Schmerzen wahrzunehmen verloren, sie fügen sich selbst schwerste Verletzungen zu und haben eine verminderte Lebenserwartung [17, 18]. Eine intakte Nozizeption alarmiert den Organismus, um eine fortschreitende Gewebeschädigung zu verhindern. Dieser also eher physiologische Prozess kann verschiedene Ursachen haben. Entsprechend unterteilt man in nozizeptiven, neuropathischen und entzündlichen Schmerz. Von nozizeptivem Schmerz spricht man, wenn Kälte, Hitze, mechanische Kräfte, chemische Substanzen über die Aktivierung von Rezeptoren oder

## Einleitung

die Öffnung von Ionenkanälen ein Aktionspotential in A $\delta$ - oder C-Fasern generieren. Dieses wird in das Hinterhorn des Rückenmarks weitergeleitet, hier findet die Umschaltung auf ein zweites Neuron statt. Über den Tractus spinothalamicus anterior und lateralis erfolgt die Projektion in den somatosensorischen Kortex, wodurch eine Lokalisation des Schmerzreizes möglich ist. Die affektive Komponente wird vor allem über spinoretikuläre Verbindungen in das limbische System vermittelt. Diese Bahnen aktivieren auch Hirnstammkerne, die der Ursprung absteigender Schmerzhemmung in Thalamus und Rückenmark sind. Signale aus dem Kopfbereich werden über trigeminale Bahnen (Tractus spinalis nervi trigemini) weitergeleitet. Die Verletzung oder Dysfunktion von peripheren Nerven oder Strukturen des zentralen Nervensystems führt zu neuropathischem Schmerz, der häufig mit neurologischen Ausfällen einhergeht. Bei der Destruktion anderer Gewebeentitäten durch entzündliches Geschehen oder Tumorstadium kommt es zur Einwanderung von Entzündungszellen. Diese sezernieren verschiedene Mediatoren wie Zytokine, Kinine, Purine, Ionen, Wachstumsfaktoren, etc., welche über die direkte Aktivierung von Nozizeptoren oder deren Sensibilisierung, weitergeleitet über die oben beschriebene Schmerzbahn, zur Wahrnehmung von Entzündungsschmerz führen [19] (Abbildung 2).

Die bei einer entzündlichen Gewebedestruktion aus dem Blut angelockten oder gewebebeständigen Immunzellen schütten jedoch nicht nur Schmerzfasern aktivierende Substanzen aus. Sie besitzen auch Granula mit endogenen Opioiden ( $\beta$ -Endorphin, Met-Enkephalin, Dynorphin), deren Freisetzung dem entzündlichen Schmerz entgegenwirkt und zu einer potenten peripheren Analgesie führt [20, 21]. Die verschiedenen Etappen dieser peripheren Opioid-vermittelten Schmerzhemmung wurden im experimentellen Rattenmodell mit einer CFA-(Complete Freund's Adjuvant)-induzierten lokalen Pfotenentzündung in den vergangenen Jahrzehnten intensiv untersucht und werden im Folgenden umrissen.



**Abbildung 2: nozizeptiver, inflammatorischer und neuropathischer Schmerz**

(A): Mechanische, thermische und chemische Reize lösen ein Aktionspotential in A $\delta$ - und C-Fasern aus, welches über das Hinterhorn und den Vorderseitenstrang an höhere Zentren weitergeleitet wird und sowohl unwillkürliche als auch willkürliche Reaktionen auslöst. (B): Bei Gewebedestruktion durch Entzündungen oder Tumorwachstum wandern Entzündungszellen ein, die von ihnen ausgeschütteten Mediatoren sensibilisieren Nozizeptoren oder lösen direkt Aktionspotentiale aus. (C): Neuropathischer Schmerz entsteht bei der Verletzung oder Dysfunktion von Nervengewebe und führt häufig zu neurologischen Ausfällen. [19]

Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: Nature Neuroscience, Vol. 5, Joachim Scholz and Clifford J. Woolf, Can we conquer pain? copyright (2002)

Im Blut zirkulierende Leukozyten werden durch verschiedene Botenstoffe zum Ort der Entzündung gelockt. Dabei werden sie von Chemokinen und Neuropep-

## Einleitung

tiden chemotaktisch geleitet. Der Austritt in das Zielgewebe erfolgt über verschiedene Schritte, bei denen interzelluläre Adhäsionsmoleküle, Integrine und Selektine eine wichtige Rolle spielen. Blockiert man diese Wegweiser, namentlich ICAM-1, P- und L-Selektin sowie Integrin- $\alpha$ 4 und  $\alpha$ 2, oder die für die Chemotaxis wichtigen Chemokine CXCL1 und CXCL2/3 sowie den Neuropeptid Rezeptor NK<sub>1</sub>, so wird die Einwanderung opioidpeptidhaltiger Leukozyten in das entzündete Gewebe gehemmt. Als Resultat ist die periphere Opioid-induzierte Antinozizeption deutlich verringert [22-26]. Während in der frühen Entzündungsphase Granulozyten den überwiegenden Anteil der einwandernden Leukozyten repräsentieren, sind es in späteren Phasen (ca. 96 h nach CFA-Injektion) vor allem Monozyten und Makrophagen [27]. Zu diesen Zeitpunkten sind die beiden Zellpopulationen jeweils die Hauptquelle der peripheren Opioidproduktion. Der  $\beta$ -Endorphin-Vorläufer POMC, die zu seinem Abbau zu bioaktiven Proteinen nötigen Enzyme sowie  $\beta$ -Endorphin selbst findet man in Leukozyten kolokalisiert [28]. Das in der Zelle selbst produzierte  $\beta$ -Endorphin und auch Met-Enkephalin ist in Granulozyten in primären Granula zusammen mit bakteriziden Enzymen gespeichert. Die Ausschüttung dieser Vorräte kann durch folgende verschiedene endogene Signale ausgelöst werden: das bei Stress aus sympathischen Nerven freigesetzte Noradrenalin, lokale Entzündungsfaktoren wie CRF (Corticotropin releasing factor) und das Zytokin IL-1 $\beta$ , Agonisten an formylierten Peptidrezeptoren sowie die an die Rezeptoren CXCR1/2 bindenden Chemokine [29-33]. Noradrenalin bindet an  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 und  $\beta$ 1 Rezeptoren auf  $\beta$ -Endorphin haltigen Leukozyten, welche sich im entzündeten Gewebe auch in der Nähe von sympathischen Nerven aufhalten [34]. Die Rezeptoren für IL-1 $\beta$  und für CRF werden im Rahmen einer Entzündung vermehrt von den weißen Blutzellen exprimiert [31, 35]. Die Stimulation von CXCR1/2 führt zur Verschmelzung der intrazellulären Opioidspeicher mit der Zellmembran und damit zur Freisetzung des Granulainhalts. Dieser Mechanismus ist abhängig von der Mobilisation intrazellulären Calciums aus dem endoplasmatischen Retikulum, sowie von der Aktivierung der Enzyme Phosphoinositid-3-Kinase und p38-Mitogen-aktivierten-Proteinkinase [32, 36]. Auch bei einer Infektion mit Mykobakterien wird über formylierte Peptidrezeptoren auf Granulozyten die Freisetzung der intrazellulären Opiode getriggert und somit ein ausgleichendes Gegengewicht zum Entzündungsschmerz hergestellt [33].



## Einleitung

Rezeptordichte an den Nervenendigungen, ein Auseinanderreißen der perineuralen Barriere, die den Opioiden einen leichteren Zugang zu ihren Rezeptoren ermöglicht, sowie ein verminderter pH, der die Effektivität der Opioide verstärkt [45-47].

Ein großer Nachteil zentral wirkender Opioide ist häufig die Toleranzentwicklung, also die nachlassende analgetische Wirkung nach wiederholter Applikation. Die kontinuierliche Verfügbarkeit peripherer Opioide in der Entzündung hingegen scheint das Recyclen der Rezeptoren an den Nervenenden zu unterstützen und dadurch dem Verlust der Rezeptorfunktionalität vorzubeugen [48]. Dies und die Abwesenheit anderer zentraler, opioidvermittelter Nebenwirkungen wie Erbrechen, Atemdepression und Abhängigkeit machen die Entwicklung peripher wirkender Opioidrezeptoragonisten sehr attraktiv.

### 1.1.2.1 Zytokine

Zytokine sind kleine, wasserlösliche Proteine, die von nahezu allen kernhaltigen Zellen sezerniert werden und lokal wirken [49, 50]. In der Entzündung dirigieren sie die Differenzierung der Immunzellen und stellen die Weichen für eine zellulär oder humoral dominierte Immunantwort. Nach ihren Effekten unterscheidet man in pro- und antiinflammatorische Zytokine. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sind klassische Vertreter der ersten Fraktion. Sie induzieren die Phospholipase A2, die Cyclooxygenase 2, die Mobilisierung endothelialer Adhäsionsmoleküle und die Ausschüttung von Chemokinen. Diese Kaskade führt letztendlich zu einer verstärkten zellulären Immunantwort mit Gewebedestruktion und Funktionsverlust [50]. Wichtige Gegenspieler dieses Geschehens sind IL-4, IL-6, IL-10, IL-11, IL-13 und TGF- $\beta$ . Sie hemmen die Produktion der proinflammatorischen Zytokine und unterstützen Entwicklungen hin zu einer humoralen Immunantwort, durch welche eingedrungene Erreger opsonisiert und beseitigt werden [51]. Zelluläre Repräsentanten dieser zwei unterschiedlichen Wege sind aktivierte T-Helfer-Zellen, die sich je nach Zytokinmilieu differenzieren. Bei IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ -dominiertem Umfeld wird die Entwicklung hin zum T<sub>H</sub>-1-Typ unterstützt, der die Proliferation und Differenzierung von Monozyten induziert, während bei hohen IL-4-Spiegeln vor allem T<sub>H</sub>2-Zellen entstehen, die eine B-Zell-Antwort mit nachfolgender Antikörperproduktion initiieren [52].

## Einleitung

In diesem Geflecht aus Aktivierung und gegenseitiger Hemmung nehmen Makrophagen eine wichtige, richtungsweisende Funktion ein: Bei der klassischen Aktivierung (M1 Makrophagen) durch Oberflächenstrukturen auf Mikroorganismen oder durch IFN- $\gamma$ , welches von dendritischen Zellen, T-Zellen und NK-Zellen sezerniert wird, differenzieren sie sich zu einem proinflammatorischen Phänotyp, der die Ausbildung von T<sub>H</sub>1-Zellen und damit eine proentzündliche Immunantwort verstärkt. Dominieren die für Infektionen mit Protozoen und Helminthen typischen Zytokine IL-4 und IL-13, kommt es zur alternativen Aktivierung (M2 Makrophagen) mit verstärkenden Rückkopplungsschleifen für eine T<sub>H</sub>2- und B-Zell-beherrschte Immunantwort [53, 54].

### 1.1.2.2 Chemokine

Neben den Zytokinen haben auch Chemokine wichtige direktive Funktionen im Entzündungsgeschehen. Außerdem tragen sie zur Schmerzentstehung bzw. zu endogenen analgetischen Vorgängen bei.

Bei der Migration aus der Zirkulation in das verletzte Gewebe werden Entzündungszellen von verschiedenen Signalen geleitet. Freigesetzte inflammatorische Zytokine führen zur Mobilisierung von Selektinen auf der Gefäßwand [55], welche ein Rollen und eine nachfolgende Aktivierung der Zellen ermöglichen. Dies führt zur Expression verschiedener Integrine und dadurch zur Adhäsion der Zellen an das Endothel [56]. Anschließend können die Leukozyten durch zytoskelettale Veränderungen aus dem Gefäßlumen in das entzündete Gewebe migrieren [57]. Während des gesamten Vorgangs der Anlockung von Immunzellen hin zum Entzündungsgeschehen nehmen Chemokine eine wichtige Rolle als Wegweiser ein. Chemokine sind kleine, wasserlösliche Proteine, die aufgrund der Anordnung von Cystein in ihrer Proteinstruktur in vier Klassen unterteilt werden: CXC, CC, C (Lymphotactin) und CX<sub>3</sub>C [58, 59]. Jede Untergruppe entfaltet ihre Wirkung über verschiedene G-Protein gekoppelte Rezeptoren. Dabei kann ein Rezeptor durch mehrere Chemokine aktiviert werden (Redundanz), umgekehrt kann ein einzelnes Chemokin auch an verschiedenen Rezeptoren agieren und so eine Vielfalt von Effekten auslösen (Pleiotropie). Endothelzellen, die von durch inflammatorische Vorgänge ausgeschütteten Zytokinen aktiviert wurden, exprimieren Chemokine an ihrer Oberfläche [60]. Chemokinrezeptoren auf Leukozyten erkennen diese, wodurch die Adhäsion der weißen

## Einleitung

Blutzellen an die Gefäßwand [61, 62] verstärkt wird. Über diese Ligand-Rezeptor-Interaktion ist eine spezifische Wirkung auf bestimmte Leukozytenpopulationen möglich: beispielsweise immobilisiert CXCL8 (IL-8) auf Endothelzellen CXCR-2/3 positive Neutrophile [63], CCL2 (MCP-1) triggert die Adhäsion CCR-2-positiver Monozyten [64], einige Chemokine bewirken spezifisch die Einwanderung von M1 Makrophagen [65] und CXCL10 ist für die Migration CXCR-3 positiver T-Zellen in entzündetes Nervengewebe verantwortlich ist [66].

Neben dieser wichtigen chemotaktischen Funktion wurden in den letzten Jahren weitere Wirkmechanismen von Chemokinen, beispielsweise in der Karzinogenese [67], Angiogenese [68], Hämatopoese, [69], als Cofaktoren bei der Fusion von HI-Viren mit den menschlichen Zielzellen [70], sowie bei der Differenzierung und Polarisierung von Immunzellen [71] und als Mediatoren und Modulatoren von Schmerz [72] entdeckt.

Verschiedene Entitäten des Schmerzes werden von Chemokinen beeinflusst. Chemokine werden in Spinalganglien produziert und an den peripheren Enden von Nozizeptoren exprimiert [73]. Ausgeschüttet von Leukozyten während einer Entzündung, binden sie an ihre Rezeptoren oder an den Capsaicin-Rezeptor TRPV1 [74] und tragen so zur Entstehung von Hyperalgesie bei [73, 75]. Bei chronischen Schmerzen scheinen sie neuroimmunologische Reaktionen von Gliazellen zu aktivieren und an der Transmission neuropathischer Signale beteiligt zu sein [76].

Neben ihrer Rolle in der Schmerzinduktion tragen sie aber auch zur Vermittlung peripherer Antinozizeption bei. In der frühen CFA-Entzündung führen CXCL2 und -3 über CXCR1/2 Aktivierung zur Ausschüttung von  $\beta$ -Endorphin und Enkephalin aus intrazellulären Speichern von Granulozyten. Die Injektion von CXCL2 und -3 in die entzündete Pfote wirkt antinozizeptiv [32, 36].

### **1.1.2.3 Die Rolle von Adenosin für Entzündung und Schmerz**

Die verschiedenen Abwehrmechanismen als Antwort auf eine Infektion werden von unterschiedlichen extrazellulären Signalen moduliert. Zu diesen gehört Adenosin, ein Purin, das vor allem bei Zellschäden in den extrazellulären Raum gelangt oder bei Stress von verschiedenen Zellen sezerniert wird [77]. Bisher konnten vier Adenosinrezeptoren identifiziert werden: A1, A2A, A2B und A3.

## Einleitung

Alle sitzen auf der Oberfläche verschiedener Immunzellen [78, 79]. Ihre Expression ändert sich während der Reifung und Aktivierung der Zellen und ermöglicht so eine Feinabstimmung der Adenosinantwort, die immer auf die Wiedererlangung der Homöostase hin abzielt [80]. Eine entzündungsmindernde Wirkung entfaltet Adenosin nach der Bindung an seine Rezeptoren beispielsweise über die Veränderung der Zytokin- und Chemokinausschüttung aus Neutrophilen [81] und Makrophagen [82, 83], die Induktion von Angiogenese durch VEGF-Sekretion [84], die Beeinflussung der Reifung, Differenzierung und Migration von Neutrophilen und dendritischen Zellen, der Verbesserung der Phagozytoseigenschaften von Makrophagen und der supprimierten Ausschüttung gewebsschädigender Stoffe durch Neutrophile [81, 85-89]. Zu einer Aggravation der Entzündung kommt es bei chronisch inflammatorischen Erkrankungen wie Asthma und COPD, in denen Adenosinrezeptoren vor allem auf Mastzellen dauerhaft hochreguliert werden [90].

Die Adenosinwirkung auf Mastzellen ist auch verantwortlich für A3-Rezeptorvermittelte pronozizeptive Effekte, die durch die Ausschüttung von Histamin und 5-Hydroxytryptamin erklärt werden [91]. A2-Rezeptoren bewirken eine zusätzliche Schmerzförderung über eine cAMP-Erhöhung in den peripheren Enden sensibler Nerven [92]. Über A1-Rezeptoren auf Nozizeptoren wird eine entzündliche Hyperalgesie vermindert [93]. Für die Adenosin-induzierte Analgesie bei chronischen Schmerzen scheinen A1-Rezeptoren im zentralen Nervensystem verantwortlich zu sein [94]. Interessanterweise ist die Akupunkturvermittelte Antinozizeption von der Aktivierung peripherer A1-Rezeptoren abhängig [95]. Durch die Nadelinsertion wird lokal vermehrt Adenosin in den extrazellulären Raum freigesetzt [96]. Die Auswirkungen der Akupunkturvermittelten Purinerhöhung auf das Immunsystem wurden bisher allerdings nicht untersucht.

### **1.1.3 Akupunkturanalgesie und -antinozizeption**

Der analgetische Effekt von Akupunktur konnte in verschiedenen experimentellen [95, 97, 98] und klinischen Studien [99-101] nachgewiesen werden. Erklärungsmodelle für die physiologischen Vorgänge bei Akupunktur-induzierter Schmerzlinderung bleiben weiterhin unvollständig. Bisherige Ergebnisse spannen einen weiten Bogen von antiinflammatorischen Wirkungen durch Interaktio-

nen mit dem vegetativen Nervensystem [102], der Aktivierung absteigender, schmerzhemmender zentraler Bahnen [103, 104] und der gehemmten Weiterleitung von Schmerzsignalen aus der Peripherie auf segmentaler Ebene [105, 106] hin zu neuroimmunologischen Interaktionen zwischen Entzündungszellen und Nozizeptoren [107]. Periphere Mechanismen Akupunktur-induzierter-Antinozizeption werden im nächsten Kapitel ausführlicher erklärt. Auf spinaler als auch auf supraspinaler Ebene spielt das endogene Opioidsystem für die schmerzlindernde Wirkung von Akupunktur eine herausragende Rolle. So konnte die frequenzabhängige Wirkung über spinale Opioidrezeptoren für Elektroakupunktur in zahlreichen Studien belegt werden. Bei dieser Methode wurde die manuelle durch eine elektrische Stimulation ersetzt. Im experimentellen Rahmen wird sie häufig verwendet, da die Art des Reizes genauer quantifizierbar und reproduzierbar ist. Unter physiologischen Bedingungen werden durch die Behandlung mit niedrigfrequenter Elektroakupunktur (2 Hz) zentrales Endorphin und Enkephalin, bei hochfrequenter Stimulation Dynorphin ausgeschüttet [108]. In experimentellen Modellen persistierender Schmerzen wirkt sowohl niedrig als auch hochfrequente Stimulation über  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptoren [109]. Durch die erhöhte Ausschüttung anderer Botenstoffe wie beispielsweise Serotonin, Norepinephrin, Nociceptin oder Orphanin mit spinalen Zielrezeptoren hemmt Elektroakupunktur die Transmission nozizeptiver Reize. So nimmt man an, dass Norepinephrin über die Aktivierung spinaler adrenerger  $\alpha_2$ -Rezeptoren die Glutamatausschüttung hemmt [110] und sowohl Norepinephrin als auch Serotonin und endogene Opioide die Aktivierung von an der Schmerzleitung beteiligten NMDA-Rezeptoren verringern [111]. Zahlreiche supraspinale Zentren sind an den analgetischen Wirkungen von Akupunktur beteiligt. Maßgeblich scheint jedoch die Aktivierung des Nucleus arcuatus und des Nucleus raphe magnus zu sein, über die absteigende, schmerzhemmende Bahnen erregt werden [112].

### **1.1.3.1 Periphere Mechanismen von Elektroakupunktur bei Entzündungsschmerz**

Über periphere Mechanismen bei Akupunktur-induzierter Antinozizeption ist bisher wenig bekannt. Doch auch hier scheinen endogene Opioide neben Adenosinrezeptoren eine zentrale Rolle zu spielen. Bei Carageenan-induzierter Arthritis und im air-pouch Modell in Ratten sah man antiinflammatorische Effekte und reduzierte Hyperalgesie durch eine verminderte Expression von COX2

## Einleitung

und dadurch weniger PGE<sub>2</sub>-Produktion, sowie verringerte mRNA-Level proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , und IL-1 $\beta$ ) [113-116]. Kausal könnte hier eine Akupunkturinduzierte Stimulation der Kortisolserhöhung in der Nebenniere sein [111, 117]. Adenosin-1-Rezeptoren sind für die Vermittlung antinozizeptiver Wirkung von manueller Akupunktur notwendig, sowohl bei entzündlichen als auch bei neuropathischen Schmerzen in Mäusen [95]. Verschiedene schon genannte Trigger zur peripheren Opioidantinozizeption aus Immunzellen sind auch in Akupunkturmechanismen involviert. Über das autonome Nervensystem und  $\beta$ -Adrenorezeptoren verbessert Akupunktur die generalisierte Entzündung einer experimentellen Sepsis [118] und die lokale Inflammation bei Zymosan-induzierter Entzündung [119]. Auch CRF ist an der Linderung inflammatorischer Hyperalgesie durch Akupunktur beteiligt [120]. Im CFA-Modell konnte gezeigt werden, dass Elektroakupunktur über Cannabinoid-2-Rezeptoren auf Entzündungszellen und Keratinozyten die Produktion proinflammatorischer Zytokine senkt [121] und den Gehalt  $\beta$ -Endorphin-haltiger Zellen erhöht [107]. Periphere  $\mu$ -,  $\delta$ -, und  $\kappa$ -Rezeptoren sind an der neun stündigen Akupunkturantinozizeption bei Carageenan-induzierter Entzündung beteiligt [122]. Manuelle Akupunktur mindert inflammatorische Hyperalgesie bei Carageenan-induzierter Muskelentzündung durch die Ausbildung alternativ aktivierter M2-Makrophagen und erhöhter IL-10 Produktion [123].

In unseren Vorexperimenten wurde ein Modell etabliert, bei dem frei herumlaufende Ratten mit CFA-Entzündung in der rechten Hinterpfote am Tag null und 24 Stunden nach der Entzündungsinduktion mit Elektroakupunktur an einem klassischen Punkt zur Therapie der hinteren Gliedmaßen (GB30) behandelt wurden. Thermische Schmerzschwellen wurden mit Hilfe des Hargreaves-Tests bestimmt, bei dem ein Laserstrahl auf die plantare Seite der entzündeten Pfote gerichtet wurde. Die thermische Schmerzschwelle wurde als die gemessene Zeit bis zum Wegziehen der Pfote definiert [124]. Mechanische Schmerzschwellen wurden mit dem Algesiometer nach Randall-Selitto ermittelt [135]. Zunehmender Druck wurde hierbei auf die dorsale Seite der Pfote ausgeübt, bis diese weggezogen wurde. Eine Erhöhung der Schmerzschwellen wurde als Antinozizeption, eine Absenkung als Hyperalgesie interpretiert.

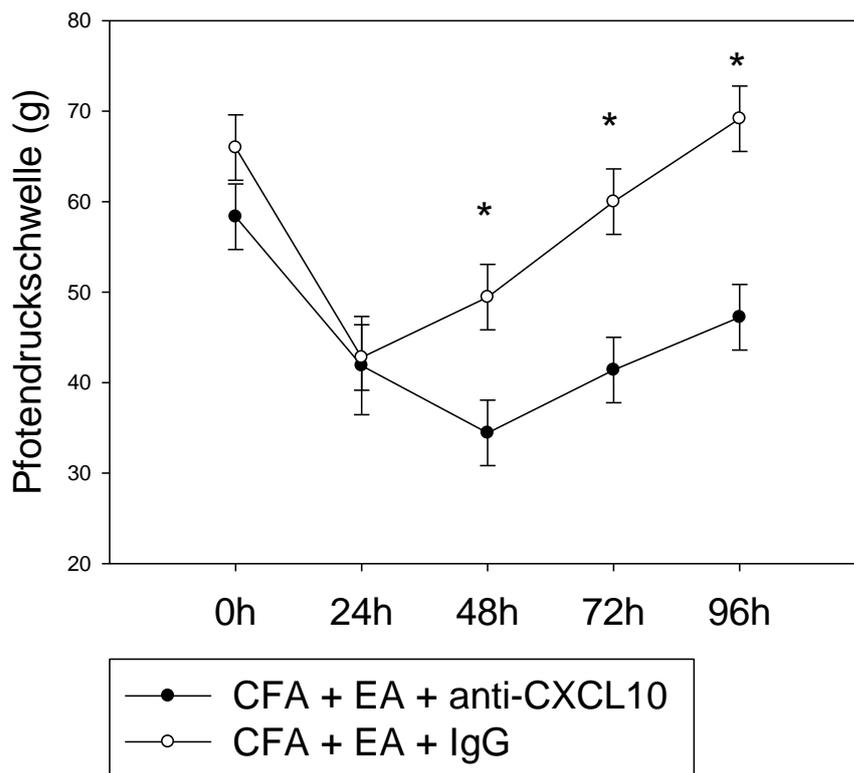
## Einleitung

Es zeigte sich ein langanhaltender antinozizeptiver und antiinflammatorischer Effekt in der mit Akupunktur behandelten Gruppe mit der größten Wirkung etwa vier Tage nach der CFA-Injektion. Periphere Opioidrezeptoren waren auch hier notwendig für die Vermittlung der Antinozizeption: bei Injektion der Opioidrezeptorantagonisten Naloxon und Naltrindol wurde der antinozizeptive Effekt der Elektroakupunktur-Behandlung aufgehoben. Außerdem waren Pfotenvolumen und -temperatur bei der Gruppe der akupunktierten Ratten signifikant niedriger als in der unbehandelten Kontrolle. Dies wurde als antientzündlicher Effekt gedeutet [125].

### 1.1.3.2 Antinozizeptive Wirkung von Elektroakupunktur durch das Chemokin CXCL10

Chemokine und Zytokine sind wichtige periphere Mediatoren des Entzündungsschmerzes. Veränderungen in der Zusammensetzung pro- und antientzündlicher Zytokine durch Elektroakupunktur wurden hier bereits beschrieben.

In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte der Beitrag des Chemokins CXCL10 zur antinozizeptiven Wirkung von Elektroakupunktur gezeigt werden. Täglich wurde ein Antikörper gegen CXCL10 injiziert und die Auswirkung der Neutralisation des Chemokins auf die Pfortendruckschwelle quantifiziert. Die tägliche Injektion von anti-CXCL10 nach CFA-Injektion und Elektroakupunktur-Behandlung verminderte die Pfortendruckschwelle signifikant am zweiten, dritten und vierten Tag nach Entzündungsinduktion (Abbildung 4).

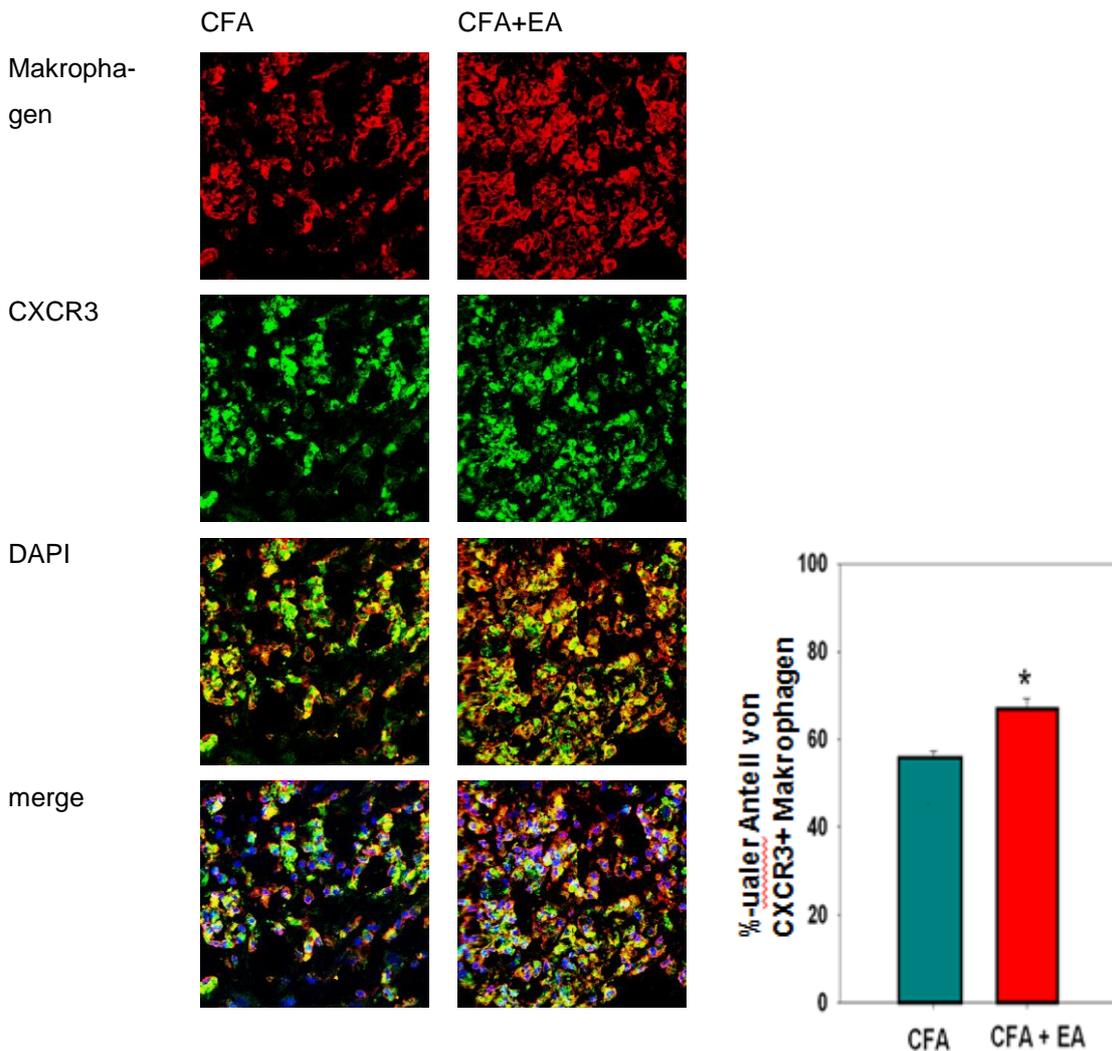


**Abbildung 4: Neutralisation von CXCL10 vermindert die antinozizeptive Wirkung von Elektroakupunktur**

Die Pfortendruckschwelle wurde täglich vor (0 h) und nach CFA-Injektion und Elektroakupunktur-Behandlung jeweils vor der täglichen Injektion von anti-CXCL10 (2 µg) oder IgG mit dem Algesiometer nach Randall-Selitto gemessen. n = 6, two way RM-ANOVA; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes dargestellt (Signifikanz \* CFA + Elektroakupunktur + IgG vs. CFA + Elektroakupunktur + anti-CXCL10 p < 0,05). [126]

## Einleitung

Mittels immunhistochemischer Färbungen wurden im Pfortengewebe der Ratten die Auswirkungen der Akupunktur-Behandlung auf die Anzahl der infiltrierenden Makrophagen 96 h nach der Entzündungsinduktion durch CFA sichtbar gemacht. Außerdem wurde die Opioidpeptidexpression, sowie der Einfluss von CXCL10 untersucht. In den Proben der akupunktierten Tiere sah man mehr CXCR3<sup>+</sup>-Makrophagen im Vergleich zu den unbehandelten entzündeten Kontrollen (Abbildung 5).

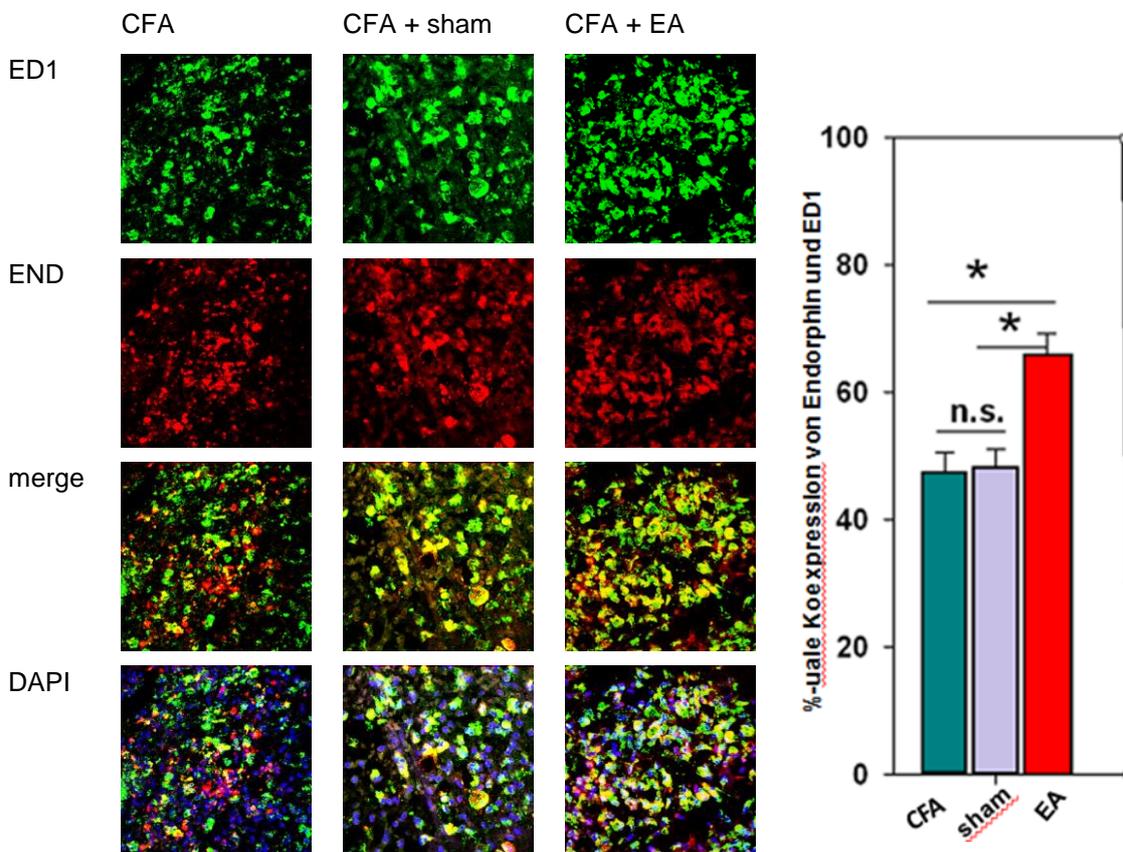


### Abbildung 5: Rekrutierung CXCR3<sup>+</sup>-Makrophagen durch Elektroakupunktur

Die Hälfte der Ratten wurde 0 h und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Das Pfortengewebe von Tieren mit und ohne Elektroakupunktur-Behandlung wurde 96 h nach CFA-Injektion entnommen. Durch immunhistochemische Färbungen wurden Makrophagen (Rattenantikörper gegen Makrophagen, rot), der CXCL10-Rezeptor CXCR3 (Mausantikörper, grün), sowie die Zellkerne (DAPI, blau) dargestellt (n = 3 pro Gruppe, gezeigt sind repräsentative Ausschnitte bei 10-facher Vergrößerung). Der Anteil von CXCR3<sup>+</sup>-Makrophagen wurde quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt (n = 3 pro Gruppe, Signifikanz \* p < 0.05, t-test). [126]

## Einleitung

Die durch Elektroakupunktur vermehrt rekrutierten Makrophagen enthielten  $\beta$ -Endorphin. Durch die Akupunkturbehandlung stieg so der Opioidpeptidgehalt im Gewebe, sham-Akupunktur hatte auf diesen keinen Einfluss (Abbildung 6).

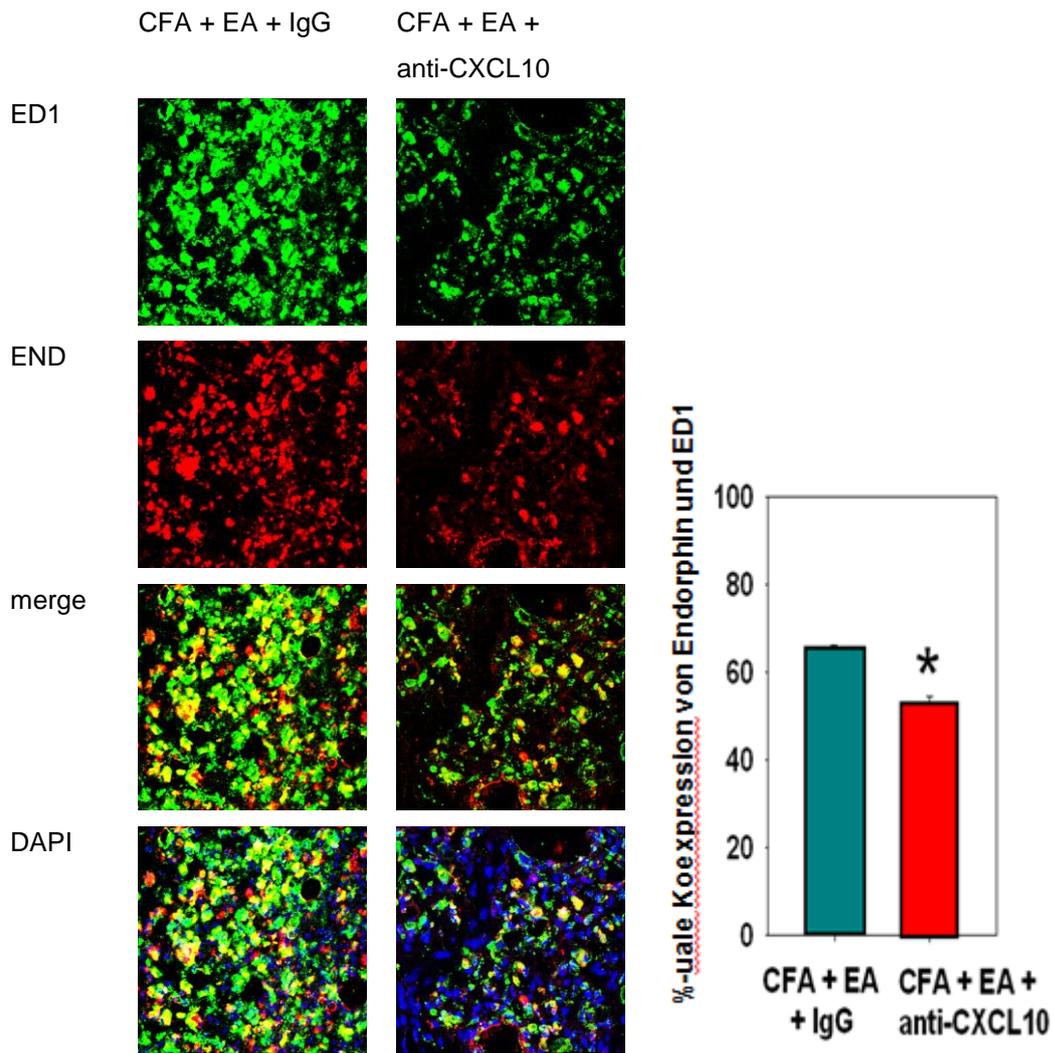


**Abbildung 6: steigender  $\beta$ -Endorphingehalt im Gewebe durch Elektroakupunkturbehandlung**

Ratten, die mit CFA und sham- oder Verumakupunktur behandelt wurden, wurde 96 h nach CFA-Injektion Pfortengewebe entnommen und immunhistochemisch gefärbt. Monozyten/Makrophagen wurden mittels Mausantikörpern gegen ED1 (grün),  $\beta$ -Endorphin mittels Hasenantikörpern (rot) und Zellkerne durch interkalierendes DAPI (blau) dargestellt (n = 3 pro Gruppe, gezeigt sind repräsentative Ausschnitte bei 10-facher Vergrößerung). Der Anteil von Zellen mit ED1- und  $\beta$ -Endorphin-Koexpression wurde quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt (n = 3 pro Gruppe, \* p < 0.05, one way ANOVA, Holm-Sidak Methode). [126]

Neutralisiert man CXCL10 in mit Elektroakupunktur behandelten Ratten, so wandern weniger  $\beta$ -Endorphin-haltige Makrophagen/Monozyten in das entzündete Pfortengewebe ein (Abbildung 7).

## Einleitung

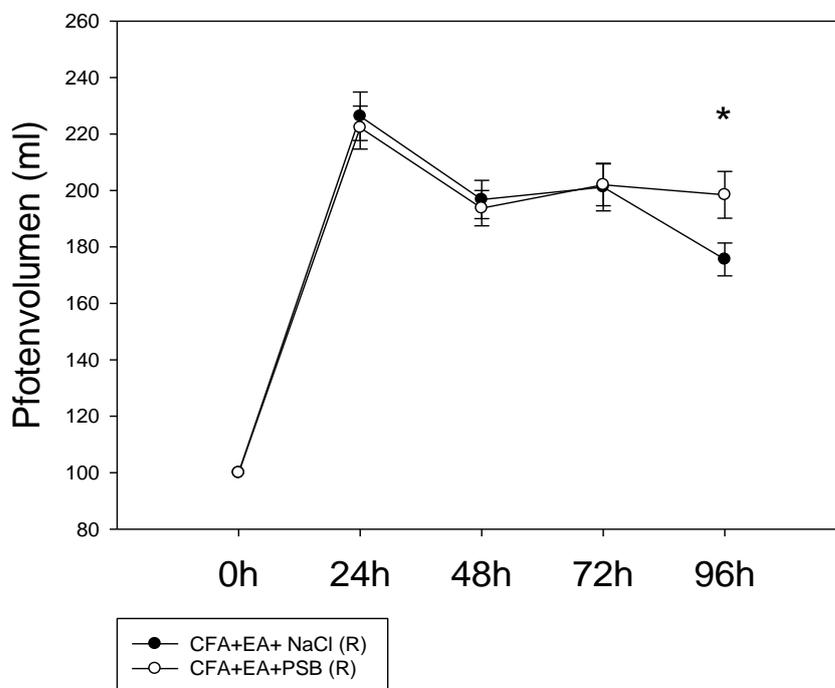


**Abbildung 7: Geringere Konzentration  $\beta$ -Endorphin-haltiger Makrophagen bei Neutralisation von CXCL10**

Mit Elektroakupunktur und täglicher IgG- oder anti-CXCL10-Injektion behandeltes Gewebe wurde 96 h nach CFA-Injektion entnommen. Bei der immunhistochemischen Färbung wurden Monocyten/Makrophagen mittels Mausantikörpern gegen ED1 (grün),  $\beta$ -Endorphin mittels Hasenantikörpern (rot) und Zellkerne durch interkalierendes DAPI (blau) dargestellt (n = 3 pro Gruppe, gezeigt sind repräsentative Ausschnitte bei 10-facher Vergrößerung). Der Anteil von Zellen mit ED1- und  $\beta$ -Endorphin-Koexpression wurde quantifiziert. Die Daten sind als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt (n = 3 pro Gruppe, \* p < 0.05, t-test). [126]

### 1.1.3.3 Adenosinrezeptoren und Akupunktur

Goldman et al. konnten zeigen, dass Akupunktur die Konzentration extrazellulären Adenosins erhöht. Periphere A1-Rezeptoren sind essentiell für die Antinozizeption manueller Akupunktur [95]. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde die Rolle der A2B-Rezeptoren für die Akupunkturwirkung untersucht. Hierfür wurde täglich der selektive A2BR-Blocker PSB1115 in die entzündete rechte Pfote injiziert und der Effekt auf Pfortenvolumen und Schmerzschwellen quantifiziert. Das Volumen der entzündeten Pfote vergrößerte sich signifikant am vierten Tag nach der Entzündungsinduktion bei A2BR-Blockade (Abbildung 8).



**Abbildung 8: A2B-Rezeptorblockade verhindert die Verminderung des Pfortenvolumens durch Elektroakupunktur**

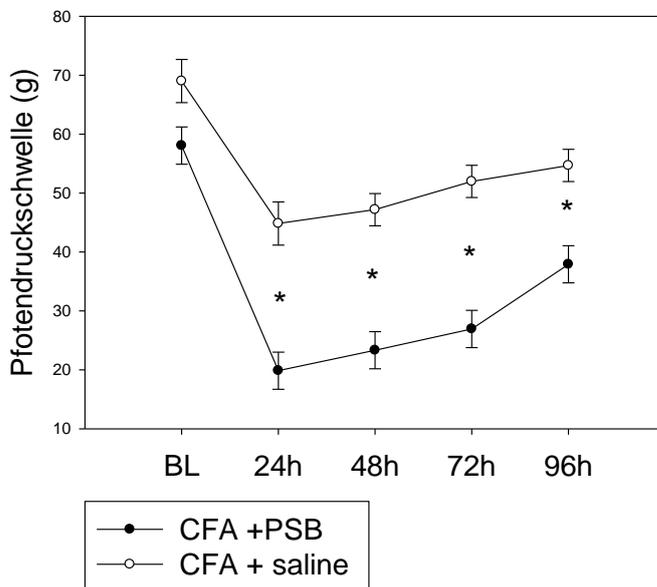
Das Pfortenvolumen wurde vor (0 h) und nach CFA-Injektion, sowie Elektroakupunktur-Behandlung (0 und 24 h nach CFA-Injektion) und vor der täglichen Injektion von PSB1115 (0,3 mg) oder 0,9 % NaCl (Trägerlösung) gemessen. two way RM-ANOVA; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes dargestellt, n = 5 für CFA + Elektroakupunktur + NaCl, n = 6 für CFA + Elektroakupunktur + PSB (Signifikanz \* p < 0,05).

Quelle: Ying Wang; unpubliziert

Die Pfortendruckschwellen wurden täglich vor (anhaltender Effekt) bzw. direkt nach (akuter Effekt) PSB1115-Injektion gemessen. Das Blockieren der A2B-Rezeptoren hatte in der CFA-Entzündung eine über vier Tage anhaltende

## Einleitung

hyperalgetische Wirkung, die sich im Absenken der Pfortendruckschwelle 24, 48, 72 und 96 h nach Entzündungsinduktion zeigte (Abbildung 9).



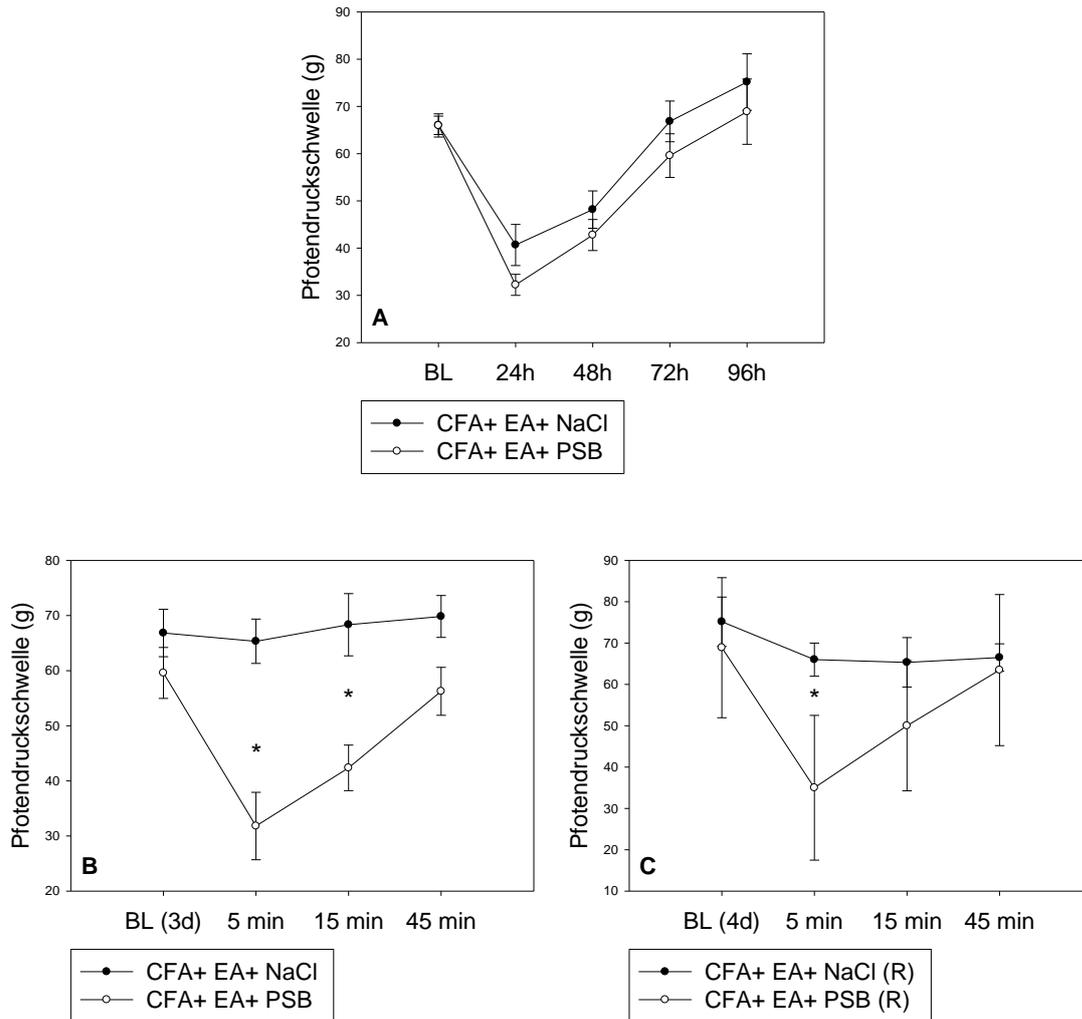
### Abbildung 9: Hyperalgesie durch A2B-Rezeptorblockade

Die Pfortendruckschwelle wurde vor (0 h) und nach CFA-Injektion und jeweils vor der täglichen Injektion von PSB1115 (0,3 mg) oder 0,9 % NaCl (Trägerlösung) mit Hilfe des Algesiometers nach Randall-Selitto gemessen. two way RM-ANOVA; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes dargestellt n = 8 für CFA + NaCl, n = 8 für CFA + PSB (Signifikanz \* CFA + NaCl vs. CFA + PSB p < 0,05).

Quelle: Ying, Wang; unpubliziert

Bei zusätzlicher Elektroakupunktur-Behandlung sah man keine anhaltenden Effekte mehr auf die mechanischen Schmerzschwellen. Es konnte jedoch ein akuter hyperalgetischer Effekt durch PSB1115 am dritten und vierten Tag nach CFA-Injektion festgestellt werden. Am dritten Tag war die Pfortendruckschwelle 5 min und 15 min, am vierten Tag 5 min nach PSB1115-Injektion signifikant erniedrigt (Abbildung 10).

## Einleitung



**Abbildung 10: A2B-Rezeptorblockade vermindert akut die antinozizeptive Wirkung von Elektroakupunktur, hat aber keine langanhaltende Wirkung auf die Pfotendruckschwelle**  
 Die Pfotendruckschwelle wurde nach Elektroakupunktur-Behandlung und PSB1115-Injektion (0,3 mg) gemessen. **(A)**: Messung der Pfotendruckschwelle täglich vor PSB1115-Injektion, BL: Pfotendruckschwelle vor CFA-Injektion, two way RM ANOVA, **(B + C)**: Messung der Pfotendruckschwelle an Tag drei und vier 5, 15 und 45 min nach PSB1115- bzw. nach NaCl-Injektion, two way RM-ANOVA; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes dargestellt, n = 5 für CFA + Elektroakupunktur + NaCl, n = 6 für CFA + Elektroakupunktur + PSB (Signifikanz \* CFA+ Elektroakupunktur + NaCl vs. CFA+ Elektroakupunktur + PSB p < 0,05).

Quelle: Ying, Wang; unpubliziert

## 1.2 Fragestellungen

Endogene Opiode scheinen über periphere Opioidrezeptoren antinozizeptive Effekte von Elektroakupunktur zu vermitteln. Freisetzungsmechanismen sind bisher unklar, das autonome Nervensystem, CRF, Cannabinoid-Rezeptoren und Zytokine sind möglicherweise beteiligt, über den Beitrag von Chemokinen ist bisher nichts bekannt. Cortisol und COX2 sowie Änderungen des Zytokinmilieus medieren antientzündliche Akupunkturreffekte.

In dem von uns etablierten Modell sah man maximale antinozizeptive Wirkungen am vierten Tag nach der CFA-Injektion. In dieser Arbeit soll untersucht werden:

- Welches Zytokinprofil bei Elektroakupunktur 96 h nach CFA-induzierter Entzündung vorliegt.
- Über welche Mechanismen ausgewählte Zytokine und Chemokine antinozizeptive und antiinflammatorische Effekte von Elektroakupunktur vermitteln.

## 2 Methoden und Material

---

Um die Auswirkungen der Akupunkturbehandlung auf unterschiedliche Zytokine und Chemokine zu untersuchen, wurden mittels ELISA deren Proteinmenge, mittels PCR die RNA im Pfotengewebe von Ratten bestimmt. Durch Schmerzschwellenmessungen konnten antinozizeptive Effekte quantifiziert werden. Immunhistochemische Färbungen und die Neutralisation verschiedener Antigene dienten der Prüfung vermuteter zugrunde liegender Mechanismen. Die durchgeführten Tierexperimente und verwendeten Methoden werden in diesem Kapitel erklärt.

### 2.1 Tierexperimente

#### 2.1.1 Versuchstiere

Die Protokolle (REG 69/10) für alle Tierexperimente wurden vom Veterinäramt der Regierung von Unterfranken, Würzburg genehmigt und sind im Einklang mit den Richtlinien der International Association for the Study of Pain [127].

Um das inflammatorische Schmerzgeschehen besser zu verstehen, wurden verschiedene experimentelle Modelle entwickelt. Die Injektion von Carrageenan wirkt als ein rein chemischer Stimulus, während durch die Applikation einzelner Bestandteile von Mikroorganismen, wie Zymosan (Bestandteil der Zellwand von Hefen) oder Lipopolysacchariden (Bakterienwand) versucht wird, die Infektion mit potentiellen Krankheitserregern zu imitieren [128]. In unserem Modell wird komplettes Freundesches Adjuvant (CFA) in die Rattenhinterpfote injiziert. Dies ist ein etabliertes und gut erforschtes Modell, bei dem eine prolongierte, lokale Entzündung durch inaktivierte Mykobakterien induziert wird, die als nozizeptiver Stimulus wirkt [129].

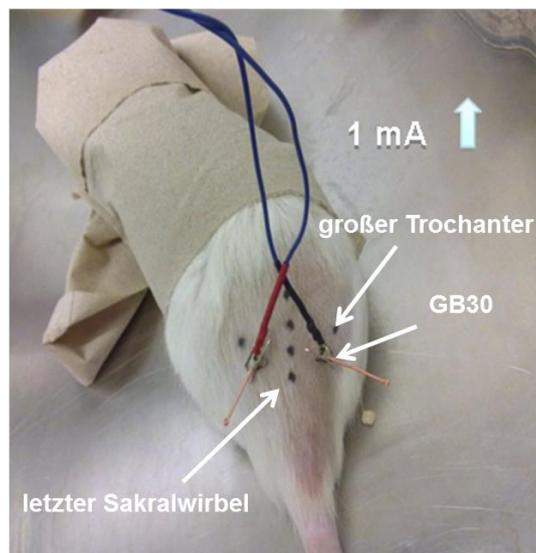
Bei allen Experimenten wurden männliche Wistar Ratten (280-350 g) untersucht. Abgesehen von der Elektroakupunktur-Behandlung wurden alle Experimente unter Isoflurananästhesie durchgeführt. Zur Induktion der lokalen Entzündung applizierte man den Ratten 150 µl CFA in die rechte Pfote wie von C. Stein beschrieben [129], die linke blieb unbehandelt und diente als interne individuelle Kontrolle. In Übereinstimmung mit dem Tierschutzgesetz und den Anforderungen des zuständigen Veterinäramtes wurden alle Experimente nach

spätestens sechs Tagen beendet, um mögliches Leiden der Tiere zu minimieren.

### 2.1.2 Elektroakupunktur-Behandlung

Die Ratten wurden innerhalb von drei Tagen vor Beginn der Experimente an Kappen aus sterilem Zellstoff gewöhnt, in denen sie während der verschiedenen Versuche gehalten wurden. Den Tieren wurde nach dem Zufallsprinzip eine der drei Gruppen zugewiesen: eine Gruppe erhielt die nachfolgend beschriebene Elektroakupunktur-Behandlung, eine andere eine Schein-Elektroakupunktur-Behandlung. Als Kontrolle wurden die Tiere mit der CFA-Entzündung ohne weitere Behandlung herangezogen.

Elektroakupunktur-Behandlung: Zuerst wurde der Rücken über dem Akupunkturpunkt GB30 rasiert und desinfiziert. Um den Akupunkturpunkt möglichst korrekt bei den unterschiedlichen Ratten lokalisieren zu können, wurden der große Trochanter und der letzte Sakralwirbel ertastet und markiert. GB30 befindet sich auf 2/3 der Strecke zwischen diesen anatomischen Landmarken. Die Akupunkturnadeln wurden mit einem elektrischen Stimulator verbunden und in GB30 inseriert (Abbildung 11). Bei Hinweisen auf die direkte Irritation von Nerven oder Blutgefäßen wurde die Einstichrichtung modifiziert.



**Abbildung 11: Elektroakupunkturmodell**

Die letzten Sakralwirbel und der große Trochanter wurden als anatomische Landmarken markiert, um den Akupunkturpunkt GB30 sicher und reproduzierbar zu identifizieren.

Quelle: Ying Wang; unpubliziert

## Methoden und Material

In der ersten Minute wurde Strom mit einer Stromstärke von 1 mA appliziert, diese wurde anschließend für die insgesamt 20-minütige Behandlung auf 2-3 mA erhöht und innerhalb dieser Spanne individuell angepasst. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die Tiere während der gesamten Behandlung frei herumlaufen konnten. Muskelkontraktionen der hinteren Gliedmaßen einschließlich der Pfoten wurden als Hinweis auf die korrekte Positionierung der Nadel in der Nähe des N. ischiadicus gewertet. Während der gesamten Behandlung wurde den Tieren Futter angeboten, um sie von der Elektroakupunktur abzulenken.

Sham-Akupunktur: Zur Durchführung der Sham Akupunktur wurden die Nadeln auch am Akupunkturpunkt GB30 inseriert, es wurde jedoch nicht mit Strom stimuliert.

### **2.1.3 Lokale Blockade der Adenosin-2B-Rezeptoren**

Eine Untergruppe wurde mit dem Adenosin-2B-Rezeptor Blocker, PSB1115, behandelt, wobei jeweils in die entzündete Pfote 0,3 mg des Antagonisten an Tag null, eins, zwei und drei injiziert wurde. Der Kontrollgruppe wurde nach dem gleichen Prinzip 0.9 % NaCl injiziert.

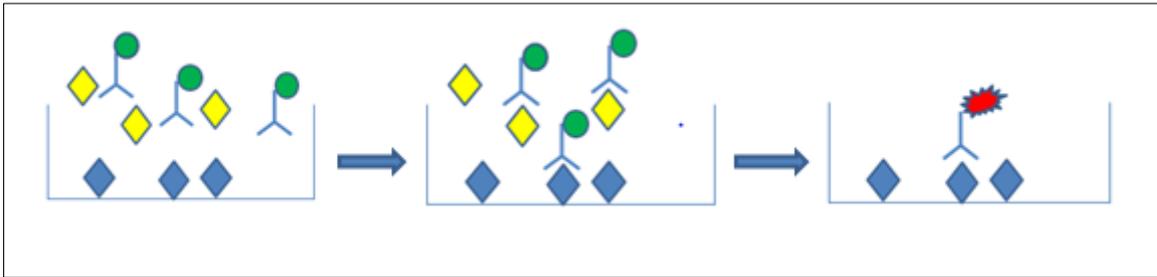
Alle Tierexperimente wurden von Frau Ying Wang, M.S. durchgeführt.

### **2.1.4 ELISA**

#### **2.1.4.1 Prinzip**

Der ELISA ist ein zur Bestimmung von Biomolekülen verwendeter Immunoassay, beruhend auf dem Antigen-Antikörper-Prinzip. Man unterscheidet zwei Konzepte: den kompetitiven und den Sandwich-ELISA.

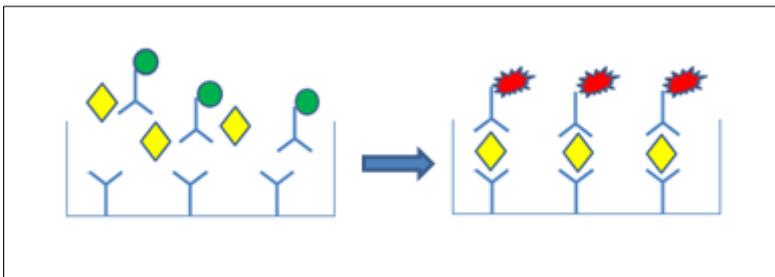
Beim kompetitiven Assay konkurrieren markierte Antigene bekannter Konzentration mit nachzuweisenden, unmarkierten Antigenen unbekannter Konzentration um die Bindungsstellen eines passenden Antikörpers. Der Nachweis gebundener, markierter Antigene lässt bei definierten Bedingungen auf die Konzentration des unmarkierten Antigens schließen (Abbildung 12).



**Abbildung 12: Prinzip des kompetitiven ELISA**

◆ Antigen bekannter Konzentration, ◆ Antigen unbekannter Konzentration (Probe), ∩ Antikörper, ● Enzym, ★ farbiges Produkt

Beim Sandwich Assay wird das gesuchte Antigen von zwei, durch den Versuchsleiter hinzugefügten, Antikörpern gebunden, von denen einer mittels Enzym oder Farbstoff markiert ist. Das Antigen muss in diesem Fall zwei Epitope (Oberflächenstrukturen) besitzen, an denen die Antikörper binden können. Durch die von den gebundenen Detektionsantikörpern hervorgerufene Farbreaktion kann auf die Antigenkonzentration geschlossen werden (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Prinzip des Sandwich-ELISA**

◆ Antigen unbekannter Konzentration (Probe), ∩ Detektionsantikörper, ∩ Fängerantikörper, ● Enzym, ★ farbiges Produkt

### 2.1.4.2 Durchführung

#### Probengewinnung

Das Pfortengewebe wurde 96 h nach CFA-Injektion entnommen und in eiskaltem Lysepuffer mit Protease-Inhibitor-Cocktail zerkleinert. Dieses Homogenisat wurde bei -80 °C tiefgefroren. Vor den Immunoassays wurden die Proben über Nacht bei 4 °C aufgetaut, für 15 min bei 14.000 g zentrifugiert, der Überstand abpipetiert und auf die für die entsprechenden ELISAs benötigten Mengen aufgeteilt. Diese Teilproben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

### Lyse-Puffer:

20 mM	Imidazole Hydrochloride, pH 6,8
100 mM	Kaliumchlorid
1 mM	Magnesiumchlorid
10 mM	Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)
1,0 %	Triton X-100
10 mM	Natriumfluorid
1 mM	Natriummolybdat
1 mM	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

### Konzentrationsbestimmung von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-13, IL-4

Für die Konzentrationsbestimmung der Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-13 und IL-4 wurden kommerziell erhältliche ELISA-Kits erworben, die alle auf dem Prinzip des Sandwich-ELISA basieren.

Die bereitgestellten Mikrotiterplatten im 96-Well-Format waren bereits mit einem spezifischen Antikörper beschichtet. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Standardreihe hergestellt, die in verschiedenen Verdünnungen bekannte Konzentrationen des gesuchten Antigens enthielt. Die Verdünnungsfaktoren für die Proben wurden in Vorexperimenten so ermittelt, dass die Antigenkonzentrationen nicht zu nah an den maximal bzw. minimal detektierbaren Konzentrationen lagen. Die verdünnten Proben und die unverdünnten Kontrollen wurden in die Vertiefungen gemäß des zuvor erstellten Plattenlayouts pipettiert und anschließend inkubiert. Nach dem Waschen wurde enzym- oder biotinkoppelter Detektionsantikörper zugegeben. Nach erneutem Waschen wurde im Falle von enzymgekoppelten Antikörpern ein Substrat, bei biotinkoppelten Antikörpern erst ein Enzym, welches an Biotin bindet, und nach Inkubation ein Substrat hinzugefügt. Die Farbreaktion wurde mit einem entsprechenden Mikrotiterplattenleser gemessen. Um Fehler durch Verunreinigungen zu minimieren wurden Referenzwellenlängenmessungen durchgeführt und detektierte Signale aus reiner Verdünnungslösung wurden von den erhaltenen Rohdaten subtrahiert.

### **IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$**

Die bereitgestellten Detektionsenzyme waren an Meerrettichperoxidase gekoppelt. Als Substrat wurde ein fertig zur Verfügung gestelltes Gemisch aus Hydrogenperoxid und Tetramethylbenzidin (TMB) verwendet. Die Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge: 560nm).

### **IL-4, IL-13**

Die bereitgestellten Detektionsenzyme waren biotinkoppelt. Als Enzym wurde Meerrettichperoxidase, als Substrat TMB verwendet. Die Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen (Referenzwellenlänge: 560 nm).

### **TNF- $\alpha$**

Die bereitgestellten Detektionsantikörper waren an alkalischer Phosphatase gekoppelt. Als Reaktionsmittel wurde chemilumineszentes Substrat für alkalische Phosphatase (CSPD) verwendet. Die Farbreaktion wurde luminometrisch bei 1000 ms Integrationszeit gemessen.

### **CXCL10**

Zur Konzentrationsbestimmung des Chemokins CXCL10 wurde ein Mini-ELISA-Kit verwendet, das CXCL10 bekannter Konzentration als Standard, Antikörper und Enzym enthielt. Eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurde mit Fängerantikörpern, verdünnt in PBS, beschichtet und über Nacht inkubiert. Um die Hintergrundaktivität zu minimieren wurden freie Proteinbindstellen mit Blockreagenz aus 1 % BSA in PBS abgeblockt. Die durch Verdünnung hergestellte Standardreihe (1 ng/ $\mu$ l bis 15,25 pg/ $\mu$ l) und verdünnte Proben wurden zugegeben. Um gebundene Antigene nachzuweisen, wurden biotinkgebundene Detektionsantikörper zugefügt. Als Enzym wurde Avidin-Meerrettichperoxidase, als Substrat ABTS verwendet. Die Farbreaktion wurde bei einer Wellenlänge von 405 nm in fünf-minütigen-Intervallen für insgesamt 55 min überwacht, Verunreinigungen schloss man bei einer Referenzwellenlänge von 650 nm aus.

Zur Herstellung des Waschpuffers wurde Tween-20 in PBS (Verhältnis 0,05:100) gegeben. Die Verdünnungslösung für Proben und Standard bestand aus 0,05 % Tween-20 und 0,1 % BSA in PBS.

### **2.1.5 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese**

Um mit Hilfe der PCR eine Aussage über vorhandene RNA-Mengen treffen zu können, muss die RNA zunächst isoliert und in cDNA umgeschrieben werden.

#### **Probengewinnung**

Das Pfortengewebe wurde 48, 72 und 96 h nach CFA-Injektion gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C aufbewahrt.

#### **RNA-Isolierung**

Das bei -80 °C zwischengelagerte Gewebe wurde in je 1 ml Trizol gegeben, auf Eis aufgetaut und im Qiagen Tissuelyser homogenisiert. Durch das im Trizol enthaltene Guanidinisothiocyanat werden Proteine denaturiert und RNasen inaktiviert, durch das enthaltene Phenol werden Proteine und DNA entfernt. Nach Zugabe von Chloroform wurde zentrifugiert, anschließend die obere RNA-haltige Phase abgenommen und in Isopropanol überführt. RNA fiel über Nacht bei -20 °C aus. Um das RNA-Pellet zu erhalten wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die RNA mit 75 %igen Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Abgießen des Überstandes wurde die RNA bei 37 °C getrocknet, anschließend in 100 µl Nuklease-freiem-Wasser resuspendiert und bei 57 °C im Thermomixer geschüttelt.

Die Konzentration der RNA wurde mit dem Nano Drop 2000 Spectrophotometer bestimmt.

#### **cDNA-Synthese**

Bei der cDNA-Synthese (complementary DNA) wird aus RNA mit Hilfe einer RNA abhängigen Reversen Transkriptase cDNA hergestellt. Es können Oligo-dT Primer oder random Primer verwendet werden, die sich an die RNA Matrize anlagern und den Ausgangspunkt für die Synthese bilden.

Random Primer hybridisieren zufällig an die RNA, dadurch werden alle mRNA Bereiche (messenger RNA) aber auch alle anderen RNA-Arten in cDNA umgeschrieben.

## High-Capacity cDNA Transcription

Für die cDNA-Synthese wurde ein High-Capacity cDNA Transcription Kit verwendet. Dieses enthält eine MuLV Reverse Transkriptase, eine Moloney murine leukemia virus RT, deren RNase-H-Aktivität entfernt wurde, was das Umschreiben längerer Transkripte ermöglicht.

Ein Mastermix wurde entsprechend der benötigten Mengen aus RT Puffer, dNTP Mix, RT random Primern, Multiscribe Reverser Transkriptase, RNase Inhibitor und RNase-freiem-Wasser hergestellt. 10 µl verdünnte RNA, die jeweils 1 µg RNA enthielt, wurden zu je 10 µl Mastermix gegeben. Die Synthese fand im 2720 Thermocycler bei 37 °C statt, bei anschließenden 85 °C wurde die RT inaktiviert. Als Kontrollen wurden sowohl RNA-freie als auch Reverse Transkriptase-freie Proben angefertigt.

Reaktionsansatz für die cDNA Synthese:

2 µl	10x RT Buffer
0,8 µl	25x dNTP Mix
2 µl	10x RT Random Primers
1 µl	Multiscribe Rev. Transcriptase
1 µl	RNase Inhibitor
3,2 µl	Nuclease freies Wasser
10 µl	1:10 verdünnte cDNA

## 2.1.6 PCR

### 2.1.6.1 Prinzip

Zur Genquantifizierung kann man DNA mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigen. Während der Echtzeit-PCR wird diese Vervielfältigung durch das Messen von freigesetzten Fluoreszenzfarbstoffen erfasst, um anschließend auf die ursprünglich vorhandene DNA Menge zurückzuschließen.

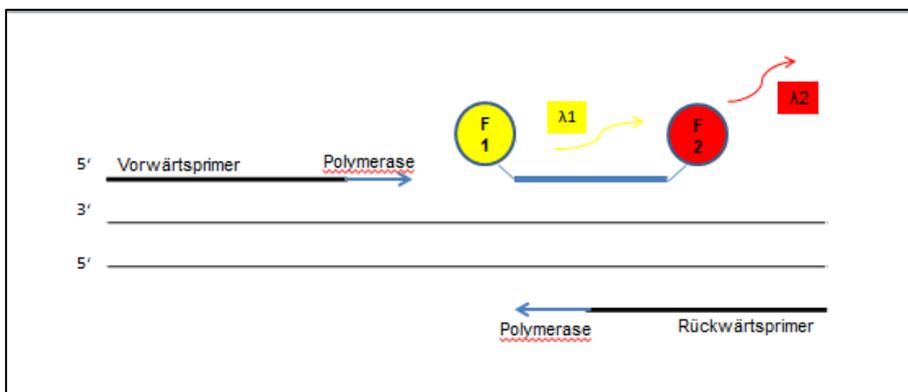
### Die Polymerasekettenreaktion

Um die DNA zu vervielfältigen wird sie bei 95 °C denaturiert. Bei einer Primer-spezifischen Annealingtemperatur lagern sich die für das zu amplifizierende

Gen spezifischen Primer an die DNA Matrize an. In der anschließenden Elongationsphase synthetisiert die DNA Polymerase einen komplementären Strang. In einem Zyklus wird so die Ausgangs-DNA-Menge verdoppelt.

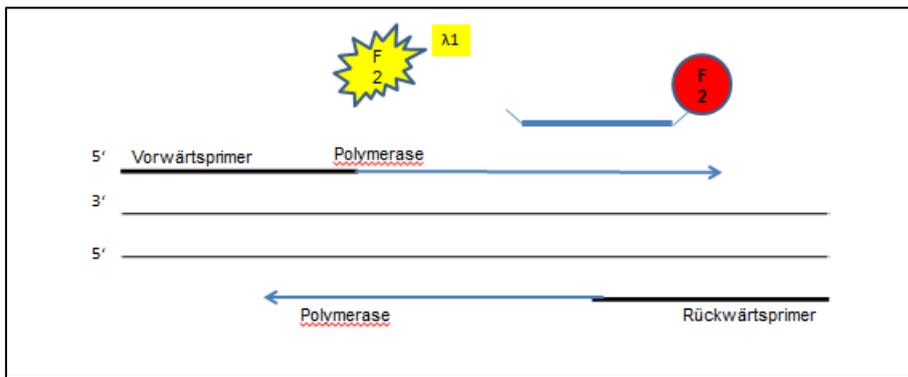
### Die Echtzeit-PCR und taq Polymerase

Die modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren ist die Echtzeit-PCR, bei der die Menge der synthetisierten DNA durch freigesetzte Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden kann. Um die Spezifität für die nachzuweisende DNA-Sequenz zu erhöhen wurde die sogenannte Taqman-Methode entwickelt, welche auf dem Prinzip des sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers beruht. Es wird ein drittes am 5'- und am 3'-Ende radioaktiv-markiertes Oligonukleotid genutzt, das zwischen den beiden Primern hybridisiert. Wird dieses Nukleotid durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut, werden die Fluoreszenzfarbstoffe voneinander getrennt. Zuvor wurde das vom Farbstoff 1 (F1, sog. Reporter Farbstoff) emittierte Licht an Farbstoff 2 (F2, sog. Quencher Farbstoff) weitergegeben, und es wurde Licht mit einer für F2 spezifischen Wellenlänge emittiert (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Polymerisierung**

Durch die räumliche Trennung von F1 und F2 kann nun Licht mit einer für F1 spezifischen Wellenlänge detektiert werden, das davor an F2 weitergegeben wurde (Abbildung 15). Je öfter die DNA Sequenz amplifiziert wird, desto mehr Fluoreszenz wird gemessen.



**Abbildung 15: Freisetzung des Reporterfarbstoffes F2**

Da die Effizienz der cDNA-Synthese sehr unterschiedlich ist, wird als endogene Kontrolle neben den Zielgenen auch ein Housekeeping-Gen (HKG) amplifiziert. Diese Gene sind wichtig für basale Funktionen der Zellen und man geht davon aus, dass sie im Testgewebe konstant exprimiert werden. Um eine Aussage über die Expression der Zielgene treffen zu können, wird die Menge an Zielgenen auf die Menge der Housekeeping-Gene bezogen (relative Quantifizierung). In Vorexperimenten wurden drei HKGs getestet: GAPDH, 18s und  $\beta$ -Aktin. Die stabilste Expression zeigte GAPDH, welches daraufhin in den nachfolgenden Experimenten als endogene Kontrolle verwendet wurde.

Als weitere Kontrollen untersuchte man Proben ohne cDNA und andere, bei denen in der cDNA Synthese keine RNA zugegeben wurden war. In beiden Fällen konnte keine DNA im PCR-Lauf detektiert werden.

Bei den enzymfreien Kontrollen wurde während der cDNA Synthese keine Reverse Transkriptase zugegeben um Verunreinigungen der RNA mit genomischer DNA oder anderer Art zu detektieren. Für das Zielgen CXCL10 konnte kein Signal gemessen werden. Sehr hohe  $C_T$  Werte (threshold cycle, siehe Auswertung) wurden in den Reverse-Transkriptase-freien Proben für CXCR3 und GAPDH festgestellt und als vernachlässigbar kleine, unspezifische Bindungen der Sonden eingeschätzt.

### 2.1.6.2 Durchführung und Auswertung

Reaktionsansatz für die quantitative PCR

12.5 µl	Absolute qPCR ROX mix
1.25 µl	Taqman Sonde
6.25 µl	cDNA
5 µl	cDNA (1:10 verdünnt)

Von jeder Probe wurden drei Replikate gemessen, deren Mittelwert für die weiteren Analysen verwendet wurde. Im Cycler wurde die DNA-Polymerase bei 95 °C in 15 min aktiviert, anschließend fand in 50 Zyklen die Denaturierung und Amplifizierung der cDNA sowie die Fluoreszenzmessung statt (Abbildung 16).

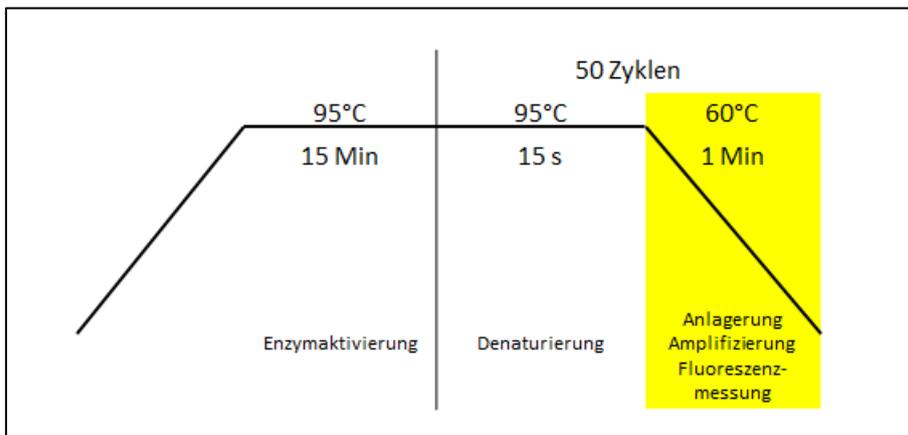


Abbildung 16: Cyclereinstellung für qPCR

Targetspezifische Fluoreszenzfarbstoffe:

Target	Fluoreszenz
Human Euk 18s rRNA	FAM
rat GAPD	VIC
rat β-Actin	FAM
rat Cxcl-	FAM
rat Cxcr-3	FAM

### $\Delta R_n$

Um technische Fehlerquellen zu minimieren wird dem PCR-Ansatz ein Referenzfarbstoff zugefügt (ROX Passive Reference). Dessen Emission wird genutzt um die gemessenen Emissionen der Reporterfarbstoffe zu normalisieren. Diese normalisierte Emission wird als  $R_n$  bezeichnet. Um die tatsächliche Veränderung der Fluoreszenz ( $\Delta R_n$ ) während eines PCR-Laufs in einem Reaktionsgefäß zu berechnen, wird die während des Laufes gemessene, normalisierte Emission ( $R_n^+$ ) von der zu Beginn des Laufes ( $R_n^-$ ) gemessenen „Grundfluoreszenz“ subtrahiert.

$$\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$$

### Schwellenwert und Schwellenwert-Zyklus

Um auf die ursprünglich vorhandene Menge an cDNA rückschließen zu können wird bei der quantitativen Real-Time-PCR der Schwellenwert-Zyklus (engl. threshold cycle  $C_T$ ) bestimmt. Hierfür muss ein Schwellenwert festgelegt werden. Dieser ist definiert als der Mittelwert der Standardabweichung von  $R_n$  zwischen dem dritten und fünfzehnten Zyklus, multipliziert mit zehn. Der Schnittpunkt des Schwellenwertes mit den Fluoreszenzkurven wird auf die x-Achse projiziert. Dies ist der sogenannte Schwellenwert-Zyklus, an dem in jedem Reaktionsgefäß die gleiche Menge an neu amplifizierter DNA vorliegen sollte und das erste Mal ein signifikanter Unterschied beim Anstieg von  $\Delta R_n$  zu messen ist. Der Mittelwert der für jedes Target in drei Ansätzen gemessenen  $C_T$  Werte wurde für die weiteren Analysen mit der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode verwendet.

### $\Delta\Delta C_T$ -Methode

Bei der relativen Quantifizierung werden endogene Kontrollen zur Normalisierung genutzt. Von den  $C_T$  Werten der Zielgene werden die der endogenen Kontrollen subtrahiert ( $\Delta C_T$ ). Um die Genexpression relativ zu quantifizieren wird eine Kalibrierungsprobe herangezogen. Als Kalibrator wurde der Mittelwert der unbehandelten Pfoten errechnet (Messungen aus den linken Pfoten). Nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wurde der relative Quotient (RQ) bestimmt, dieser Wert wurde zur statistischen Auswertung herangezogen.

$$\Delta C_T = C_{T \text{ Zielgen}} - C_{T \text{ endogene Kontrolle}}$$

$$Potenz = 2^{\Delta ct}$$

$$RQ = \frac{Potenz_{unbehandelte\ Probe}}{Potenz_{behandelte\ Probe}}$$

## 2.2 Statistik und Programme

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte über die Programme SigmaPlot 11.0 (SPSS Inc.) und Excel 2010 (Microsoft). Alle Daten wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM), die Schmerzschwellenmessungen als Rohwerte angegeben. Mehrere Messungen zu einem Zeitpunkt wurden beim Vergleich von zwei Gruppen mit Hilfe des t-Tests analysiert, beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen wurde die one way analysis of variance genutzt (ANOVA). Verschiedene Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten in zwei oder mehr Gruppen wurden durch den two way repeated measurement (RM) ANOVA verglichen. Bei nicht normal verteilten Datensätzen wurde mit der Holm-Sidak-Methode für den one way ANOVA und mit der Student-Newman-Keuls Methode für den RM ANOVA ausgewertet. Ein p-Wert < 0,05 wurde als signifikant definiert.

## 2.3 Geräte und Software

Gerät	Hersteller
Microplate Reader Tecan sunrise	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Qiagen Tissuelyser	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5418 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Eppendorf Thermomixer comfort	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Applied biosystems 7300 real time PCR System	Applied Biosystems, Warrington, UK
Nano Drop 2000 Spectrophotometer	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
2720 Thermocycler	Applied Biosystems, Warrington, UK
Combi Spin	Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS, Tokyo, Japan
Eppendorf Research Pipetten (10, 100, 1000µl, Multipipette)	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Tecan GENios Pro	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Akupunkturnadeln Ø 0,2mm, Länge: 25mm	Schwa-medico, Ehrlinghausen, Deutschland

Software	Hersteller
7300 System SDS Software	Applied Biosystems, Warrington, UK
NanoDrop 2000/2000c Thermoscientific	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Magellan V4.00	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutschland
Elektrischer Stimulator AS Super 4 digital	Schwa-medico, Ehrlinghausen, Deutschland
NIH Image J Software	Bethesda, Maryland, USA

## 2.4 Chemikalien, Kits und Antikörper

<b>Kits</b>	<b>Hersteller</b>
rat TNF- $\alpha$ Chemiluminescence ELISA Kit	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
rat IL-1 $\beta$ ELISA Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA
IL 13 rat ELISA Kit	Abcam, Cambridge, UK
rat IL-1 $\alpha$ Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA
rat IL-4 ELISA	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
rat IP-10 Mini ELISA Development Kit	PeproTech Germany, Hamburg, Deutschland
rat IFN- $\gamma$ Immunoassay	R&D Systems, Minneapolis, USA
high capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
polyclonal rabbit anti-END	Peninsula Laboratories, Merseyside, UK
monoclonal mouse anti-CD68	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
Texas red conjugated goat anti-rabbit antibodies	Vector Laboratories, Burlingame, USA
FITC conjugated donkey anti-mouse antibodies	Vector Laboratories, Burlingame, USA

## Methoden und Material

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
PBS	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Albumin-BSA	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Aqua	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Tween-20	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trizol	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Otto Fischar GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
RNase freies H <sub>2</sub> O	Lifetechnologies, Darmstadt, Deutschland
stainless steel beads	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Rnase away	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Thermoscientific Absolute ROX Mix	Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Human Euk 18s rRNA pre developed TaqMan®	Applied Biosystems, Warrington, UK
rat GAPD pre developed TaqMan®	Applied Biosystems, Warrington, UK
rat $\beta$ -Actin TaqMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Warrington, UK
rat CXCL10 TaqMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Warrington, UK
rat CXCR3 TaqMan Gene Expression Assay	Applied Biosystems, Warrington, UK
Complete Freund's Adjuvant (CFA)	Calbiochem, San Diego, USA
Imidazol-Hydrochlorid, pH 6,8	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Triton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumfluorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriummolybdat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

## Methoden und Material

4',6 Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, USA
4 % Paraformaldehyd (PFA)	OCT, Miles Inc., Elkhart, USA
10 % Saccharose	OCT, Miles Inc., Elkhart, USA
Tissue-Tek compound	OCT, Miles Inc., Elkhart, USA

### **3 Ergebnisse**

Das Ziel dieser Arbeit ist es, periphere Mechanismen von Elektroakupunktur in Ratten mit einer durch CFA-Injektion induzierten Entzündung der rechten Hinterpfote zu untersuchen, die zur Antinozizeption und Entzündungshemmung beitragen. In dem bereits etablierten Tiermodell sah man 96 h nach der CFA-Injektion die stärksten antinozizeptiven Effekte, diese waren abhängig von peripheren Opioiden [125]. Der nächste Schritt bestand nun darin, die zu diesem Zeitpunkt durch Elektroakupunktur hervorgerufenen Veränderungen im Zytokin- und Chemokinmuster zu bestimmen.

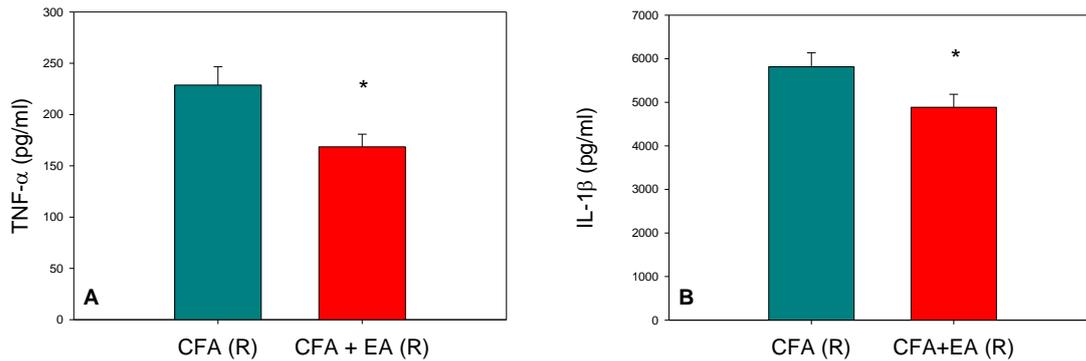
#### **3.1 Veränderungen im Zytokin- und Chemokinmuster durch Elektroakupunktur**

Es wurden die klassischen, inflammatorischen Zytokine und das Chemokin CXCL10, ausgewählt, um deren Konzentration in der rechten Hinterpfote vier Tage nach der Entzündungsinduktion durch CFA mittels ELISA zu bestimmen. CXCL10 war in einem nicht gezeigten Zytokinarray interessanterweise durch Akupunktur-Behandlung erhöht, weswegen es uns neben den klassischen Zytokinen besonders interessierte.

##### **3.1.1 Verminderung proinflammatorischer Zytokine durch Elektroakupunktur**

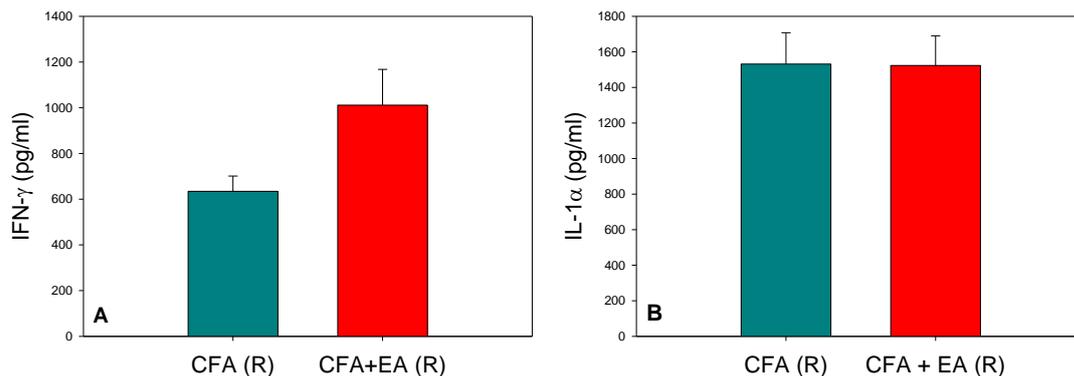
Im Pfortengewebe der akupunktieren Ratten waren die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  erniedrigt. (Abbildung 17), während sich für IL-1 $\alpha$  kein statistisch signifikanter Unterschied zeigte (Abbildung 18B). Interessanterweise war IFN- $\gamma$  das einzige proinflammatorische Zytokin, das erhöht war (Abbildung 18A).

## Ergebnisse



**Abbildung 17: Verminderung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  durch Elektroakupunktur.**

Die Hälfte der Ratten wurde 0 h und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Mittels ELISA wurden die proinflammatorischen Zytokine im Pfortengewebe 96 h nach CFA-Injektion (■) und nach CFA-Injektion plus Elektroakupunktur-Behandlung (■) verglichen. (Abbildung 17A): TNF- $\alpha$ , n = 11, t-Test, (B): IL-1 $\beta$ , n = 10, t-Test; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Signifikanz \* bei p < 0,05). [126]



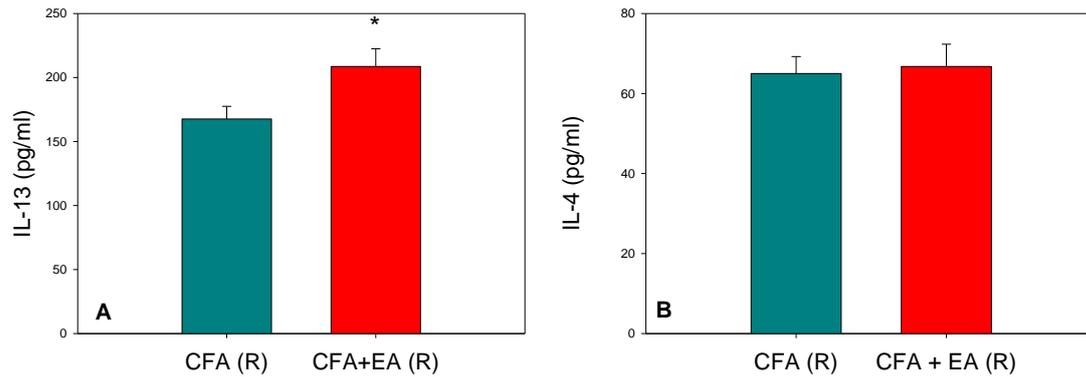
**Abbildung 18: Erhöhung des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  und keine Änderung des Zytokins IL-1 $\alpha$  durch Elektroakupunktur**

Die Hälfte der Ratten wurde 0 h und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Mittels ELISA wurden die proinflammatorischen Zytokine im Pfortengewebe 96 h nach CFA-Injektion (■) und nach CFA-Injektion plus Elektroakupunktur-Behandlung (■) verglichen. (Abbildung 18A): IFN- $\gamma$ , n = 8, t-Test, (B): IL-1 $\alpha$ , n = 6, t-Test; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Signifikanz \* bei p < 0,05). [126]

### 3.1.2 Antiinflammatorische Zytokine

Erhielten die Ratten eine Akupunkturbehandlung, so stieg die Konzentration des antiinflammatorischen Zytokins IL-13 signifikant an; beim antiinflammatorischen Zytokin IL-4 zeigte sich keine statistisch signifikante Änderung (Abbildung 19).

## Ergebnisse

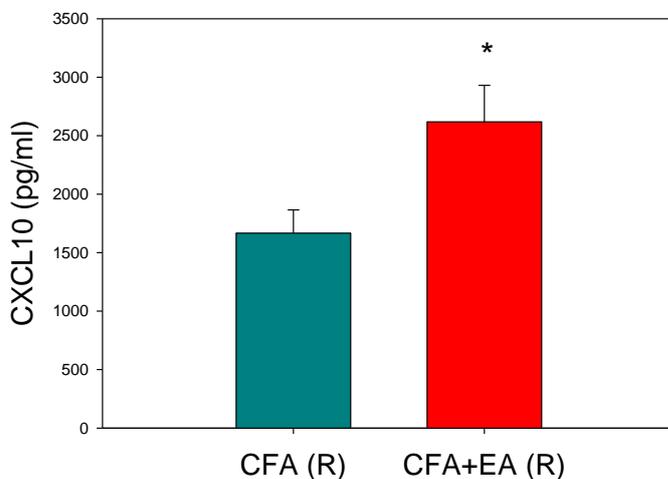


### Abbildung 19: Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-13 und keine Änderung des Zytokins IL-4 bei Behandlung mit Elektroakupunktur

Die Hälfte der Ratten wurde 0 h und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Mittels ELISA wurden antiinflammatorische Zytokine im Pfortengewebe 96 h nach CFA-Injektion (■) und nach CFA-Injektion plus Elektroakupunktur-Behandlung (■) verglichen. **(A)**: IL-13, n = 11, t-Test, **(B)**: IL-4, n = 6, t-Test; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Signifikanz \* bei  $p < 0,05$ ). [126]

### 3.1.3 Erhöhung des Chemokins CXCL10

Im entzündeten Pfortengewebe konnte man nach der Akupunkturbehandlung größere Proteinmengen des Chemokins CXCL10 detektieren (Abbildung 20).



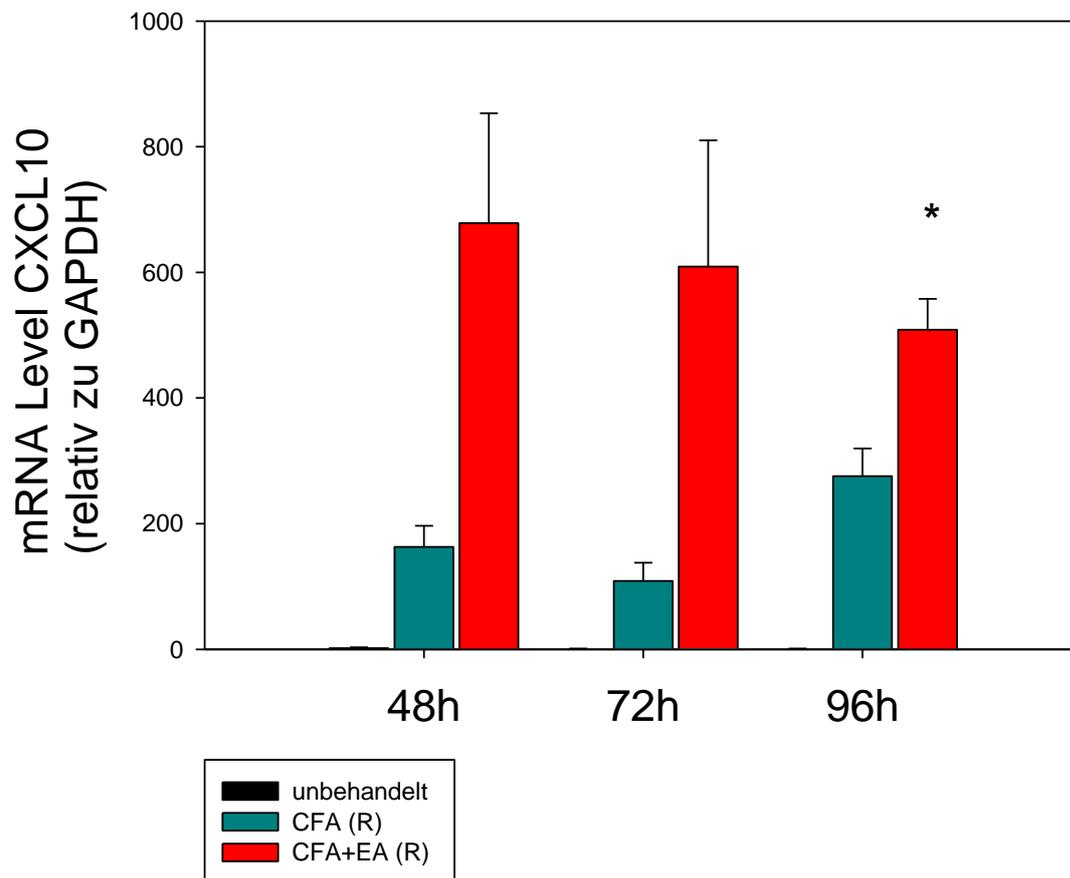
### Abbildung 20: Zunahme des Chemokins CXCL10 durch Elektroakupunktur

Die Hälfte der Ratten wurde 0 h und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Mittels ELISA wurde das Chemokin CXCL10 im Pfortengewebe 96 h nach CFA-Injektion (■) und nach CFA-Injektion plus Elektroakupunktur-Behandlung (■) gemessen. n = 6, t-Test; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Signifikanz \* bei  $p < 0,05$ ). [126]

Zusätzlich sah man in Untersuchungen durch die quantitative real time PCR eine Hochregulierung von CXCL10-mRNA 96 h nach CFA-Injektion, in der Ten-

## Ergebnisse

denz beginnend bereits zwei Tage nach der Entzündungsinduktion. In der un-  
behandelten linken Pfote (keine CFA-Injektion, keine Elektroakupunktur) waren  
nur sehr geringe Mengen von CXCL10-mRNA zu finden (Abbildung 21).

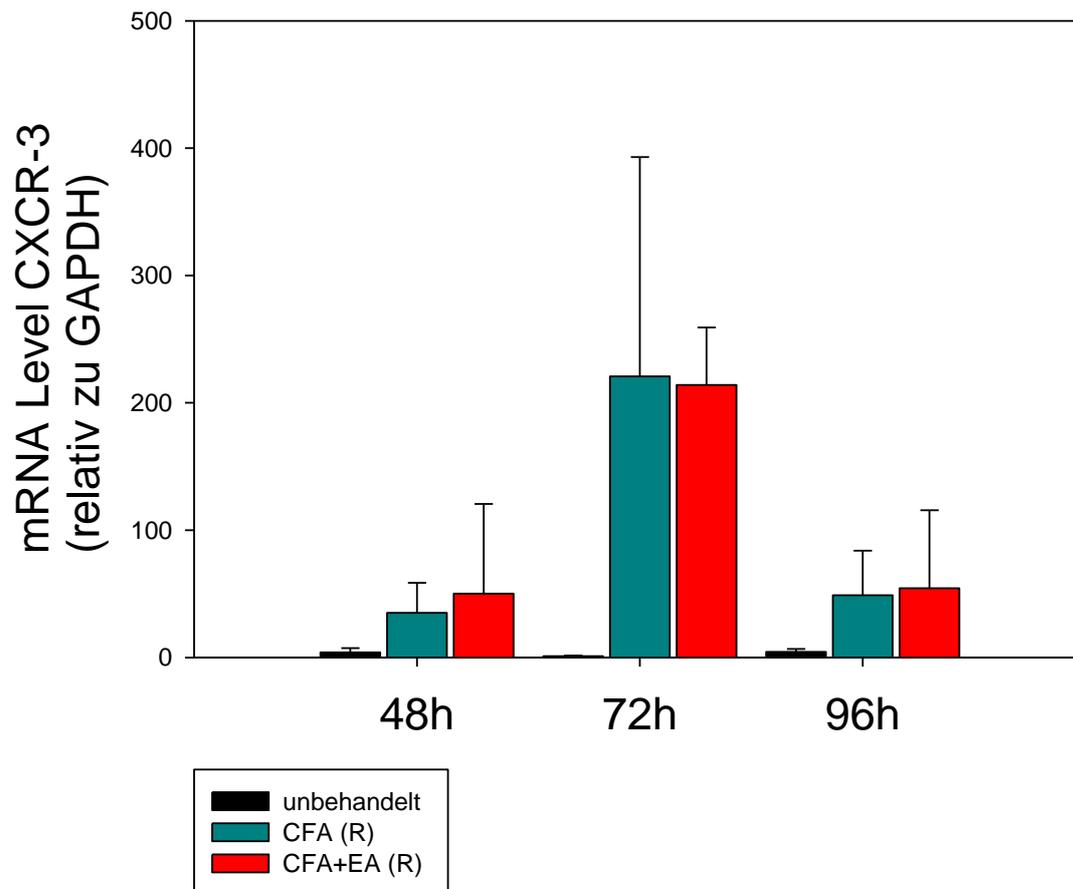


**Abbildung 21: Erhöhung der mRNA-Level des Chemokins CXCL10 im Zeitverlauf durch Elektroakupunktur**

Die Hälfte der Ratten wurde 0 h und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Im entnommenen Pfortengewebe wurde mittels PCR die CXCL10-mRNA im Verhältnis zu GAPDH-mRNA über einen Zeitraum von drei Tagen untersucht (48 h, 72 h und 96 h nach CFA-Injektion). Verglichen wurden die Proben der akupunkturierten mit denen der nicht akupunkturierten Tiere. Die Daten wurden mit der CXCL10- und GAPDH-mRNA der unbehandelten linken Pfote genormt; CFA und CFA + Elektroakupunktur n = 6, unbehandelt n = 2; Holm-Sidak-Methode (Signifikanz \* bei  $p < 0,05$ ). [126]

### 3.1.4 Keine Änderung der CXCR3-Expression durch Elektroakupunktur

CXCL10 bindet an den Chemokinrezeptor CXCR3. CXCR3-mRNA wurde mittels PCR quantifiziert. Die Rezeptorexpression ist im Vergleich zum nicht-entzündeten Gewebe deutlich hochreguliert. Die Behandlung mit Elektroakupunktur verändert die Expression im entzündeten Pfortengewebe allerdings nicht (Abbildung 22).



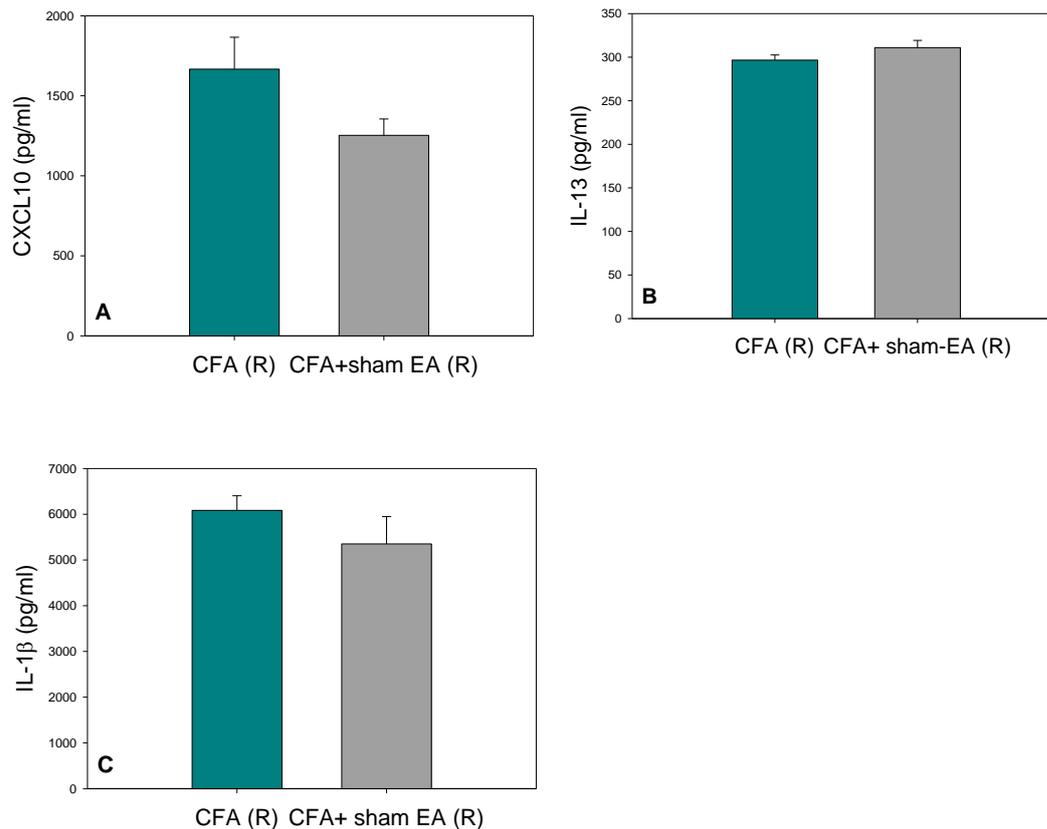
**Abbildung 22: Keine Änderung der CXCR3-Expression durch Elektroakupunktur**

Die Hälfte der Ratten wurde 0 h und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Mittels PCR wurde die mRNA vom Rezeptor CXCR3 im Verhältnis zu GAPDH-mRNA im Pfoten-gewebe quantifiziert. Die Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführt: 48 h, 72 h und 96 h nach CFA-Injektion und Gewebe von akupunktierten mit Gewebe von nicht-akupunktierten Tieren verglichen. Die Daten wurden mit den gemessenen mRNA-Leveln der unbehandelten linken Pfote genormt. CFA und CFA + Elektroakupunktur n = 6, unbehandelt n = 2; Holm-Sidak-Methode (Signifikanz \* bei p < 0,05).

### 3.1.5 Keine Veränderung der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-13 und des Chemokins CXCL10 nach Sham-Akupunktur

Bei ausgewählten Zytokinen (IL-1 $\beta$ , IL-13) und dem Chemokin CXCL10 wurde der Effekt von Sham-Akupunktur (Nadelinsertion ohne Stimulation mit Strom) auf die Proteinexpression bestimmt. Sowohl bei IL-1 $\beta$ , IL-13 als auch bei CXCL10 zeigten sich keine statistisch signifikanten Änderungen durch die Scheinbehandlung (Abbildung 23).

## Ergebnisse



### Abbildung 23: Unveränderte Proteinmengen von CXCL10, IL-13 und IL-1 $\beta$ nach Sham-Akupunktur-Behandlung

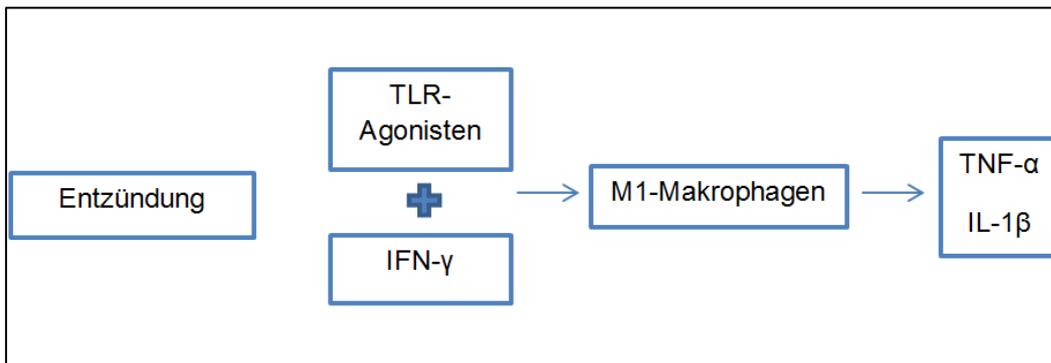
Die Hälfte der Ratten wurde 0 h und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Es wurden ausgewählte Zytokine und das Chemokin CXCL10 im Pfortengewebe 96 h nach CFA-Injektion (■) und nach CFA-Injektion plus Sham-Akupunktur-Behandlung (■) mittels ELISA verglichen. **(A)**: CXCL10, n = 6, t-Test, **(B)**: IL-13, n = 6, t-Test, **(C)**: IL-1 $\beta$ , n = 6, t-Test; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes angegeben (Signifikanz \* bei p < 0,05). [126]

## 3.2 Antiinflammatorische Wirkung von Elektroakupunktur durch Adenosin-2B-Rezeptoren

Die mittels ELISA charakterisierten Zytokinveränderungen, die durch Elektroakupunktur hervorgerufen wurden, zeigten überraschenderweise ein erhöhtes IFN- $\gamma$  bei sonst erniedrigten proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . Die Theorie der IFN- $\gamma$ -induzierten Deaktivierung von Makrophagen via Adenosin-2B-Rezeptoren (A2BR) [130] (Abbildung 24 und Abbildung 25) veranlasste uns, diese Adenosinrezeptoren genauer zu untersuchen.

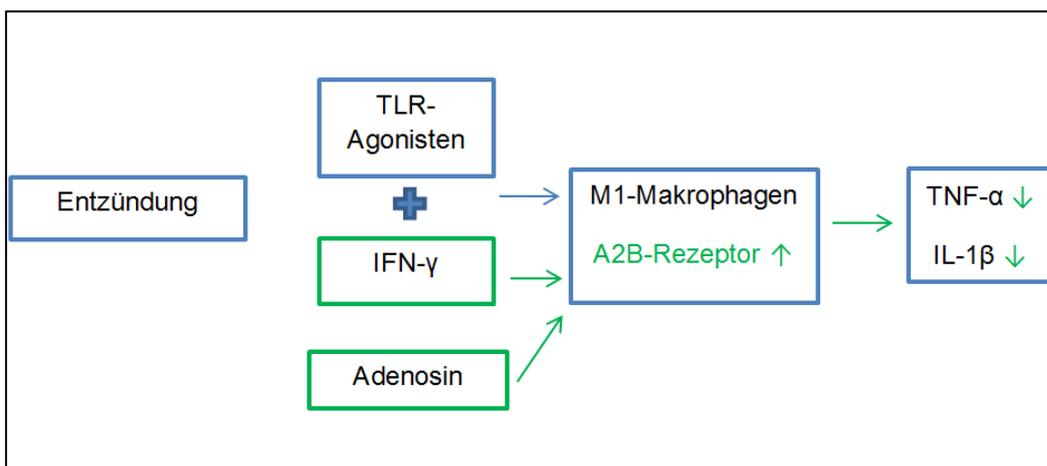
Hierfür wurde täglich der selektive A2BR-Blocker PSB1115 in die entzündete rechte Pfote injiziert und die Auswirkungen auf Zytokine und Rezeptorexpression ermittelt.

## Ergebnisse



**Abbildung 24: Klassische Aktivierung von Makrophagen**

IFN- $\gamma$  und Toll-like-Rezeptor-Agonisten induzieren die Differenzierung von Monozyten zu M1-Makrophagen, welche proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  produzieren.



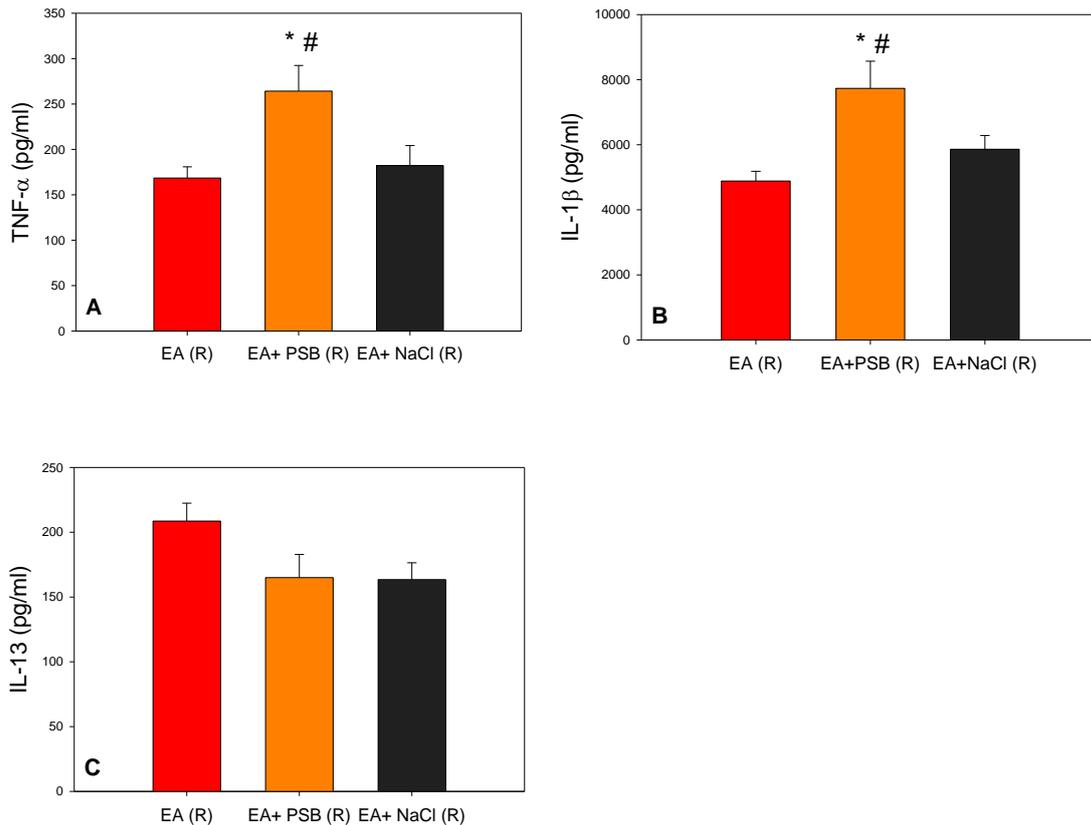
**Abbildung 25: Deaktivierung von M1-Makrophagen**

IFN- $\gamma$  führt zur verstärkten Expression von A2B-Rezeptoren auf klassisch aktivierten M1-Makrophagen. Adenosin kann dadurch seine antiinflammatorische Wirkung entfalten und führt z.B. zu weniger TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  Produktion [130].

### 3.2.1 A2BR-Blockade verhindert die Verminderung proinflammatorischer Zytokine und des Potenvolumens durch Elektroakupunktur

TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , welche sonst durch die Elektroakupunktur-Behandlung vermindert wurden, waren bei gleichzeitiger Blockade der A2BR durch PSB1115 signifikant erhöht (Kontrolle: Elektroakupunktur + NaCl, Abbildung 26). Die Injektion von PSB1115 hatte keine Effekte auf IL-13.

## Ergebnisse

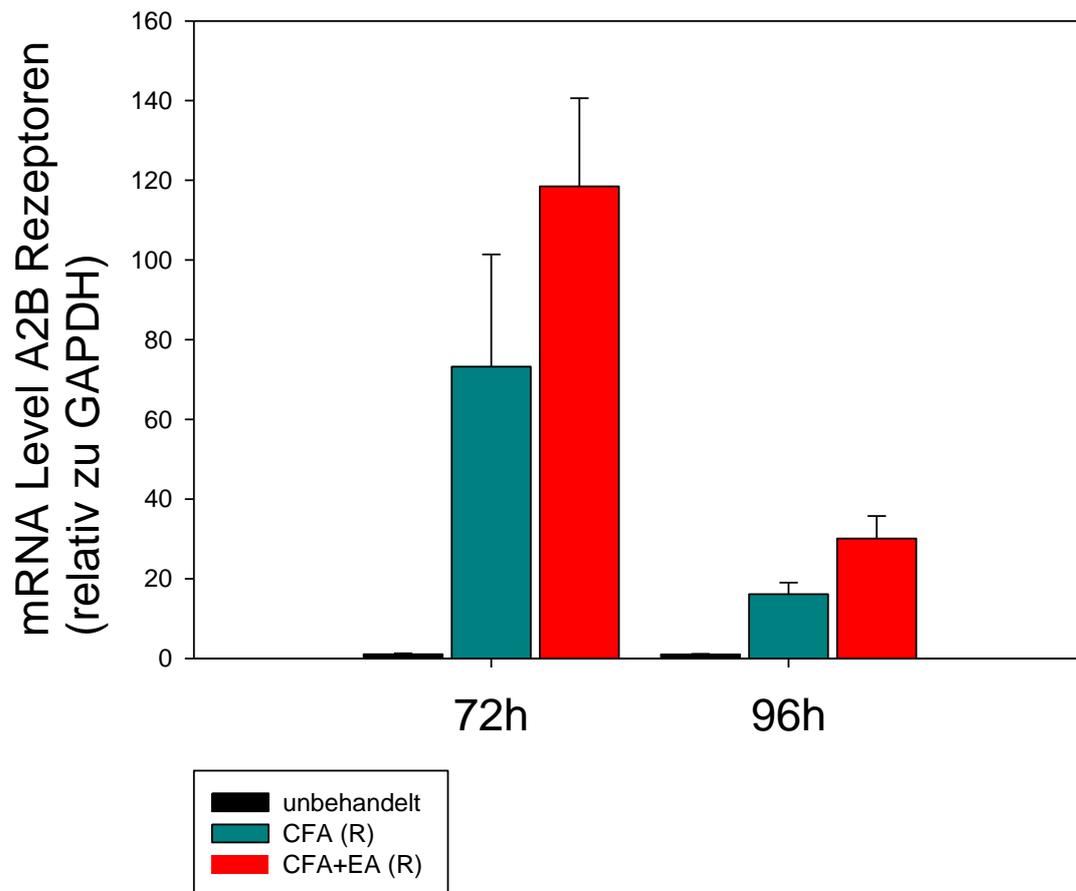


### Abbildung 26: Aufhebung der antiinflammatorischen Wirkung von Elektroakupunktur auf Zytokine durch A2B-Rezeptor-Blockade außer bei IL-13

Die Hälfte der Ratten wurden 0 h und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-13 wurden in der rechten Pfote 96 h nach CFA-Injektion und Elektroakupunktur-Behandlung, der täglichen Injektion von PSB1115 (0,3 mg) oder 0,9 % NaCl (Trägerlösung) bis zum dritten Tag (72 h), gemessen. **(A)**: TNF- $\alpha$ , EA n = 11, Elektroakupunktur + PSB n = 6, Elektroakupunktur + NaCl n = 6, one-way ANOVA (Holm-Sidak Methode), **(B)**: IL-1 $\beta$ , EA n = 10, Elektroakupunktur + PSB/ NaCl, one way ANOVA (Holm-Sidak Methode); **(C)**: IL-13, EA n = 11, Elektroakupunktur + PSB/NaCl n = 6, one-way ANOVA; Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes dargestellt (Signifikanz \* Elektroakupunktur vs. Elektroakupunktur + PSB, # Elektroakupunktur + NaCl vs. Elektroakupunktur + PSB p < 0,05).

### 3.2.2 Veränderung der A2BR-Expression durch Elektroakupunktur

Um unsere Hypothese zu bestätigen, dass die vermehrte Ausschüttung von IFN- $\gamma$  bei Elektroakupunktur zu einer gesteigerten Expression von A2B-Rezeptoren führt, wurde A2B-mRNA im Pfortengewebe mittels PCR 72 und 96 h nach CFA-Injektion bestimmt. Die Unterschiede zwischen den akupunktierten und den nicht-akupunktierten Gruppen wurden nicht signifikant (p = 0,053), es ist aber eine Tendenz hin zu einer vermehrten A2BR-mRNA-Expression bei Elektroakupunktur-Behandlung zu erkennen (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Vergleich der A2BR-Expression mit und ohne Elektroakupunktur-Behandlung 72 und 96 h nach CFA-Injektion**

Die Hälfte der Ratten wurde 0 und 24 h nach CFA-Injektion mit Elektroakupunktur behandelt. Die A2BR-mRNA wurde im Verhältnis zu GAPDH-mRNA-Leveln im Pfortengewebe quantifiziert. Verglichen wurden Messungen aus Proben von Tag drei (72 h) und vier (96 h) nach CFA-Injektion von unbehandelten und mit Elektroakupunktur behandelten Ratten. Die Daten wurden mit der gemessenen mRNA der unbehandelten linken Pfote genormt, 72 h: CFA und CFA + Elektroakupunktur n = 5, unbehandelt n = 2; Holm-Sidak-Methode, p = 0,242; 96 h: CFA und CFA + Elektroakupunktur n = 6, unbehandelt n = 2, Holm-Sidak-Methode, p = 0,053.

## 4 Diskussion

---

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Durch Elektroakupunktur wurden am vierten Tag nach CFA-induzierter Entzündung die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  vermindert und das antiinflammatorische Zytokin IL-13 erhöht. Interessanterweise war IFN- $\gamma$  das einzige proinflammatorische Zytokin, das durch Elektroakupunktur vergrößert war. Sowohl die Protein- als auch die mRNA-Level des Chemokins CXCL10 wurden durch Elektroakupunktur gesteigert (48, 72 und 96 h nach CFA-Injektion). Die Behandlung mit Sham-Akupunktur zeigte keine signifikanten Effekte.

Bei Elektroakupunktur trägt CXCL10 zum antinozizeptiven Effekt bei und ist notwendig für die Rekrutierung  $\beta$ -Endorphin-haltiger Monozyten. CXCR3<sup>+</sup> Makrophagen sind im Vergleich zur unbehandelten CFA-Entzündung vermehrt im akupunktierten Gewebe zu finden.

Bei Blockade der Adenosin-2B-Rezeptoren durch PSB1115 war Elektroakupunktur nicht mehr in der Lage, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  sowie das Pfotenvolumen der entzündeten Pfote zu senken. Die A2BR-Blockade führte in der CFA-Entzündung dauerhaft zur Hyperalgesie, konnte den antinozizeptiven Effekt von Elektroakupunktur aber nur akut mindern. Die Expression der A2B-Rezeptoren wird durch die Behandlung mit Elektroakupunktur nicht beeinflusst.

### 4.2 Diskussion der Methoden

#### 4.2.1 Proteinmessung mittels ELISA

Zytokine und Chemokine besitzen eine kurze Halbwertszeit und können noch nach der Probengewinnung von Zellen sezerniert werden. Möchte man ihre Konzentration im Gewebe messen, ist deshalb eine standardisierte Behandlung und Aufbewahrung der Proben essentiell. Diese wurden wie empfohlen [131] nach ihrer Gewinnung nie der Raumtemperatur ausgesetzt und nach sorgfältiger Aufteilung auf Eis bei -80 °C gelagert. Dadurch konnte ein wiederholtes Auftauen vermieden werden. Unter diesen Bedingungen sollten die Zytokinkonzentrationen bis zu zwei Jahren stabil sein [132].

## Diskussion

Die Methode des ELISA zeichnet sich durch ihre hohe Sensitivität und Spezifität, sowie ihre gute Reproduzierbarkeit aus [133]. Limitationen entstehen durch die Tatsache, dass eine gleichzeitige Messung verschiedener Proteine nicht möglich ist. Außerdem kann nicht zwischen bioaktiven und -inaktiven Proteinen unterschieden werden. Man kann keine Erkenntnis über die funktionelle Regulation der gemessenen Zytokine und Chemokine gewinnen. Verwendet man den ELISA für Zytokinmessungen im Gewebe kann schon die Verwendung unterschiedlicher Lysebuffer zu divergierenden Messungen führen [133]. Neben den Zielproteinen vorhandene Substanzen können einen unverfälschten Prozess der Detektion stören und die Ergebnisse zusätzlich verändern. Um mögliche Interaktionen unbekannter Gewebestandteile mit verwendeten Verdünnungslösungen oder Antikörpern zu entdecken wurde ein nicht gezeigtes Spikeexperiment durchgeführt, in welchem keine Unterschiede zwischen verdünnten Gewebeproben und bereitgestellten Antigenen bekannter Konzentration zu erkennen waren. Wir schlossen deshalb relevante Matrix-Kit-Interaktionen aus.

### **4.2.2 mRNA-Quantifizierung**

Die zur Isolierung der RNA genutzte Methode mit TRIzol beruht auf der single-step Methode von Chomczynski und Sacchi. Diese ist bekannt für ihre stabilen und qualitativ hochwertigen Ergebnisse, da sie die gefürchteten RNasen sofort nach der Lyse der Zellen inaktiviert [134]. Um eine folgende Kontamination der Proben mit RNasen und damit eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden wurden spezielle Pipetten, Tubes sowie RNase freie Reagenzien benutzt.

Da ein direkter Nachweis der mRNA nicht möglich ist, muss diese nach ihrer Isolierung in cDNA umgeschrieben werden. Dies ist der kritischste Schritt bei der mRNA Quantifizierung, da die Effizienz der cDNA Synthese nicht ermittelt werden kann. Aus diesem Grund werden House-keeping Gene (HKG) als endogene Kontrolle genutzt. Leider muss man davon ausgehen, dass auch diese nicht gänzlich stabil exprimiert werden. Um ein möglichst unverfälschtes Ergebnis zu erzielen wurden deshalb drei verschiedene HKG gemessen und GAPDH als das stabilste für weitere Messungen ausgewählt.

Die quantitative Echtzeit PCR gilt als die sensitivste und genaueste Methode zur Quantifizierung von Zytokin-mRNA [135]. Zwei verschiedene Detektionssys-

teme finden in diesem Fall Verwendung: SYBR Green® Farbstoff und Taq Man Sonden® [136]. Letztere wurde sehr häufig für Zytokinquantifizierungen genutzt [137]. Sie zeichnet sich durch hohe Spezifität und Sensitivität aus, während die Spezifität bei der Verwendung von SYBR Green unter der Bildung von nicht-spezifischen PCR-Produkten und Primerdimeren leidet [138]. Auch für die Auswertung gibt es zwei häufig verwendete und etablierte Methoden. Man kann Standardkurven benutzen, wobei die Herstellung des Standards sehr aufwändig und dessen Stabilität begrenzt ist. Bei der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode fällt dieser Aufwand weg, allerdings muss sichergestellt sein, dass die Effizienz der Amplifikation von HKG und Zielsequenz gleich ist. Um die Koamplifikation genomischer DNA auszuschließen wurden cDNA-Kontrollen ohne Reverse Transkriptase hergestellt. Bei CXCL10 und den Adenosin-2B-Rezeptoren konnte in diesen Kontrollen kein Signal detektiert werden, bei CXCR3 waren die  $C_T$ -Werte vernachlässigbar hoch.

Nukleinsäuren sind sehr anfällig und degradieren schnell. Trotz der Lagerung bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  und der ausschließlichen Verarbeitung auf Eis sollte deshalb eine möglichst rasche Untersuchung gewährleistet sein. Große Schwankungen in den Messungen der Adenosin-2B-Rezeptor-mRNA-Level könnten auf die, im Vergleich zu den schneller durchgeführten PCR-Läufen für die anderen Targets, längere Aufbewahrung zurückzuführen sein.

### **4.2.3 Immunhistochemie**

Die doppelte Immunfärbung ist eine etablierte Methode zur Darstellung der Kollokalisation verschiedener Proteine in einer Zelle, wie beispielsweise intrazelluläre Opiode und zellwandständige Rezeptoren [35]. Durch das gleichzeitige Verwenden von Antikörpern gegen Oberflächenmarker bestimmter Zellpopulationen und Antikörpern gegen gesuchte Proteine kann deren Vorkommen in den markierten Zellen gezeigt werden.

### **4.2.4 Entzündliche Hyperalgesie durch CFA und Schmerzschwellenmessungen**

*„As a subjective experience, pain is one of the many exceptional properties of human existence“* („Schmerz als subjektive Erfahrung ist ein ausschließlich menschliches Merkmal“) [16]. Auf der Grundlage des biopsychosozialen Schmerzmodells, das Schmerz als ein Ergebnis aus Kognition, Sensation und

## Diskussion

affektiven Prozess beschreibt [139], wird oft argumentiert, dass Tiere, die die Fähigkeit der Reflektion und Interpretation nicht besitzen, nicht in der Lage sind, eine Schmerzwahrnehmung, die vergleichbar mit der eines Menschen wäre, zu entwickeln. In diesem Zusammenhang wird gerne die Differenzierung zwischen Nozizeption, als durch einen nozizeptiven Stimulus induzierte Erregung von Nozizeptoren, und Schmerz, als psychologischen Status, betont [140]. Unabhängig von diesen psychologischen Unterschieden hat die Schmerzforschung an verschiedenen Tiermodellen in den letzten Jahrzehnten zu einem großen Erkenntniszuwachs in Bezug auf die Pathophysiologie und Therapie des Schmerzes geführt und damit ihre Notwendigkeit für das Verstehen von nozizeptiven Mechanismen bestätigt.

Es gibt zahlreiche nozizeptive Stimuli, die im Tiermodell genutzt werden. Die Injektion von inaktiviertem Mykobakterium butyricum (CFA) ist eine lange etablierte Methode, um einen persistierenden Schmerzreiz zu induzieren. Innerhalb von zwei Stunden entwickeln sich eine kutane Entzündung, Hyperalgesie und Ödem, die für etwa zehn Tage andauern. Diese Effekte sind begrenzt auf die injizierte Pfote, ohne Zeichen einer systemischen Reaktion [129]. Es gibt keine Auswirkungen auf das motorische Verhalten, was insbesondere für Messungen von motorischen Reaktionen auf mechanische und thermische Stimuli von Bedeutung ist [141]. Problematisch aus tierethischer Perspektive ist die Tatsache, dass die Ratten nicht selbst dem Entzündungsschmerz entfliehen können, bei der Messung der Schmerzschwellen können sie hingegen jederzeit die Pfote dem Druck ausübenden Kolben oder dem Hitze produzierenden Laserstrahl entziehen.

Zur Detektion von Hyperalgesie bzw. Antinozizeption werden verschiedene quantifizierbare, reproduzierbare und nicht invasive Stimuli wie Hitze, Druck, Strom oder chemische Reizstoffe genutzt [142]. In unserem Modell wurden sowohl thermische als auch mechanische Schmerzschwellen gemessen. In beiden Fällen findet eine selektivere Erregung von afferenten Fasern statt, als beispielsweise bei elektrischen Reizen. Dennoch werden neben Nozizeptoren sowohl Mechano- als auch Thermosensoren erregt. Es ist deswegen nicht möglich zu unterscheiden, ob die provozierte Reaktion des Wegziehens der Pfote ein Reflex mit nozizeptiver oder sensibler Afferenz ist [143]. Beim von Randall

und Selitto entwickelten Test zur Messung mechanischer Schmerzschwellen folgt auf den motorischen Reflex eine Bewegung, die versucht, die Pfote weg vom nozizeptiven Reiz zu befreien. Dies wiederum involviert supraspinale Zentren und kann als spezifischere Reaktion interpretiert werden, die nicht als rein motorischer Reflex auf spinaler Ebene stattfindet [144]. Der hohe Druck, der notwendig ist um eine Wegziehreaktion zu induzieren, ist Grund für die geringe Sensitivität der Methode. Deswegen wurde ein Schwellenvergleich zwischen entzündeter und nicht entzündeter Pfote vorgeschlagen [144]. Interindividuelle Unterschiede bei der Reaktion auf thermische Reize entstehen durch die variierende Beschaffenheit der Haut (z.B. Pigmentierung, Behaarung, etc.) durch welche es zu divergierender Reflexion, Absorption und Transmission der Hitze kommt [145]. Durch die Verwendung von Laserstrahlen können die durch den Kontakt mit einer Lampe entstehenden, verfälschenden Einflüsse vermieden werden. Da der Schwanz ein wichtiges thermoregulierendes Organ in Ratten ist, wurde der zur Erhebung thermischer Schmerzschwellen genutzte tail flick test von Hargreaves verändert. Er richtete die Hitze auf die Hinterpfote in sich frei bewegenden Ratten [124].

Aufgrund der Beschränkungen dieser klassischen Verhaltensexperimente auf die Nozizeption wurden Verfahren entwickelt, bei denen das outcome komplexerer zentraler Vorgänge beobachtet wird. Genutzt werden erlernte Verhaltensweisen, durch welche die Tiere den nozizeptiven Reizen entfliehen können [146]. Schwierig ist hier die Diskriminierung zwischen Vermeidung und Flucht. Das Verhalten ist nicht nur Reaktion auf einen sensorischen Reiz, sondern durch Motivation und Aufmerksamkeit beeinflusst. Um emotionale Reaktionen zu berücksichtigen, werden in letzter Zeit Verfahren postuliert, in denen beispielsweise der Gesichtsausdruck der Tiere bewertet wird [147]. Letztendlich bleibt die Tatsache, dass man Schmerz nicht direkt messen kann, bestehen und die Grenzen verdeutlichen, wie vielschichtig das Phänomen Schmerz ist.

### **4.2.5 Akupunkturmodell**

Das in intensiver Vorarbeit etablierte Rattenmodell zur Elektroakupunkturbehandlung von Entzündungsschmerz zeichnet sich besonders durch seine gute Reproduzierbarkeit und das Arbeiten mit frei laufenden Tieren aus, die nicht durch Anästhetika oder andere Medikamente beeinträchtigt sind. Wichtige Ein-

## Diskussion

flussgrößen auf die Akupunkturwirkung wie Nadellokalisierung und -Insertion sowie Art und Größe der Stimulation wurden mit Hilfe eines Computermodells standardisiert [125]. Für das Design der Kontrollgruppe, behandelt mit Sham-Akupunktur, gibt es verschiedene Möglichkeiten: man kann die Stimulation kontrollieren, die Unterschiede zwischen Akupunktur- und Nichtakupunkturpunkten oder die Spezifität verschiedener Akupunkturpunkte untersuchen [148]. Da es schwierig ist im Tiermodell einen sicheren Nichtakupunkturpunkt zu definieren [149], gingen wir dem Effekt der elektrischen Stimulation nach. In Übereinstimmung mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen [97, 103] erzielte die reine Insertion der Nadel ohne manuelle oder elektrische Stimulation nur geringe antinozizeptive Effekte 96 h nach CFA-Injektion [125]. Diese könnten leichte Stimulationen durch Bewegungen der Nadel in den frei beweglichen Ratten widerspiegeln.

In klinischen Studien aus den letzten Jahren wurde das Design von Sham-Modellen kontrovers diskutiert. Parallel dazu wurde die Frage aufgeworfen, ob die Wirkung von Akupunktur allein auf Placeboeffekte zurückzuführen ist. Große Metaanalysen zeigen tendenziell zwar eine Überlegenheit von Verumakupunktur über die Scheintherapie mit Shamakupunktur bei Osteoarthritisbedingten Knieschmerzen, Spannungskopfschmerz und chronischen Schmerzen der unteren Wirbelsäule [101, 150, 151], die Interpretation ist jedoch oft durch die Vielfalt der Sham-Modelle limitiert. So erzielte beispielsweise Akupunktur mit Streitbergernadeln, bei denen die Haut nicht penetriert wird, gleiche Effekte bei Osteoarthritis wie die Verumakupunktur. Großen Einfluss auf die Wirkung hatten hier die Erwartung des Patienten und die Person des Therapeuten [152]. Zwei frühere Studien lassen vermuten, dass die Akupunkturwirkung weder von der Spezifität eines Akupunkturpunktes für die zugrundeliegende Krankheit, noch von der Punktion eines Akupunktur- oder Nichtakupunkturpunktes abhängt [153, 154]. Bei Untersuchungen im fMRT sieht man Überlappungen zwischen Akupunktur- und Placeboaktivierten Arealen, allerdings scheint eine regelmäßige Akupunkturbehandlung langfristig Veränderungen in kortikalen Prozessen zu bewirken [155]. Diese sogenannten unspezifischen Effekte von Akupunktur, die denen von Placebos ähneln, sind Kontextwirkungen, wie z.B. die Erwartung und Meinung von Patient und Therapeut oder die Art der Konsultation [148]. Diese Einflussgrößen, die oft schwierig zu kontrollieren sind, spie-

## Diskussion

len im Tiermodell keine oder eine deutlich geringere Rolle. So wurde auf dem internationalen Symposium der Society for Acupuncture Research zum 10. Jahrestag der „NIH Consensus Development Conference on Acupuncture“ in der veröffentlichten Diskussionsschrift [156] zur konstruktiven Vernetzung der klinischen und experimentellen Forschung aufgerufen. Besonders betont wurde darin, wie wichtig das Verstehen der physiologischen Vorgänge für die maximal effektive klinische Praxis ist.

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Elektroakupunktur (EA) sowohl in der Praxis als auch in der Forschung etabliert. Die elektrische Stimulation ersetzt die manuelle Stimulation (MA) der Nadel. Sie ist besser quantifizierbar und reproduzierbar. Außerdem ist der mechanische Reiz im Gegensatz zur manuellen Stimulation verstärkt [149]. Leitet man elektrische Impulse über die Nadel, so werden andere Gehirnareale erregt [157, 158] als durch das Drehen oder An-schnipsen der Nadeln mit der Hand. Ob eine Methode bezüglich der analgetischen Wirkung überlegen ist, ist noch nicht abschließend geklärt (EA > MA: [159-161]; EA = MA: [162]).

In Übereinstimmung mit den traditionellen Prinzipien der chinesischen Medizin nach dem Huang Di Nei Jing, Su Wên (Buch des gelben Kaisers zur Inneren Medizin) wurde sowohl auf der Seite der Entzündung als auch auf der gesunden Seite akupunktiert [163].

### **4.3 Diskussion der Ergebnisse**

#### **4.3.1 Auswirkung von Elektroakupunktur auf die Zytokinproduktion**

Am vierten Tag nach Entzündungsinduktion in der Rattenpfote durch CFA wurde das entnommene Pfortengewebe auf den Proteingehalt der klassischen Zytokine untersucht. Elektroakupunktur verminderte die Konzentration von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , erhöhte IFN- $\gamma$  und IL-13. Für IL-1 $\alpha$  und IL-4 sah man keine signifikanten Veränderungen. Der suppressive Effekt von Elektroakupunktur auf proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  wurde schon in verschiedenen experimentellen Modellen gezeigt. Beim entzündlichen Schmerz scheinen Cannabinoid-2-Rezeptoren auf Immunzellen diesen teilweise zu vermitteln [121]. Nach Infektion mit Streptokokkus pyogenes und Elektroakupunkturbehandlung

## Diskussion

sezernieren isolierte Peritonealmakrophagen bei LPS Stimulation weniger TNF- $\alpha$  als die unbehandelte Gruppe. Dieses antientzündliche Verhalten ist teilweise reversibel bei systemischer Blockade von Opioidrezeptoren [164]. Eine Auswirkung der Akupunkturbehandlung auf das Zytokin IL-1 $\alpha$  konnte bisher nicht gefunden werden. Möglicherweise hat Akupunktur nur einen Effekt auf die Zytokinsekretion aktivierter Entzündungszellen, während IL-1 $\alpha$  eher bei Zellnekrose freigesetzt wird [165]. Veränderungen von IL-13 und IL-4 durch Elektroakupunktur wurden bisher nicht bei entzündlichem Schmerz untersucht. In Asthmodellen sieht man eine Verminderung beider Zytokine [166, 167]. Hier wird gezielt eine T<sub>H</sub>-2-Antwort stimuliert und durch die Senkung der T<sub>H</sub>-2-Zytokine stellt Akupunktur ein Gleichgewicht in dem einseitig dominierten System wieder her. In der späten CFA-Entzündung finden sich allerdings kaum T-Helferzellen sondern hauptsächlich Makrophagen und Monozyten [27], die durch ein IFN- $\gamma$  dominiertes Umfeld und den Kontakt mit Bestandteilen von CFA hin zu einer M1-Differenzierung mit Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  geleitet werden [53]. Diese Unterschiede im Vorkommen und Differenzieren der Immunzellen könnte die teilweise konträre Regulation der Zytokine in beiden Modellen erklären. Kongruent sind unsere Ergebnisse mit Erkenntnissen, die bei der experimentellen Nachahmung eines ischämischen zerebralen Insultes und Induktion eines entzündlichen Schadens gewonnen wurden. Hier zeigte sich die antiinflammatorische Wirkung von Akupunktur durch vermindertes IL-1 $\beta$  und erhöhtes IL-13 [168]. IFN- $\gamma$  ist ein systemisch wirkendes Zytokin, das von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen und natürlichen Killerzellen produziert wird [169]. Aber auch Monozyten und Makrophagen sezernieren IFN- $\gamma$  zur Autostimulation [170]. Eine IFN- $\gamma$  Erhöhung sieht man bei Menschen im Serum nach Akupunkturbehandlung [171], bei Ratten im Milzgewebe [172]. Erklärt wird dies durch die verstärkte Aktivierung von NK-Zellen durch Akupunktur [173, 174], die teilweise durch den lateralen Hypothalamus und sympathische Bahnen vermittelt wird [174]. Die Quelle der erhöhten IFN- $\gamma$  Spiegel in unserem Modell bleibt ungeklärt, da sie nur im entzündeten Pfortengewebe bestimmt wurden und so keine Aussage über systemische Veränderungen gemacht werden kann. Die Summierung von stimulierten Makrophagen lokal und aktivierten NK-Zellen systemisch sezerniertem IFN- $\gamma$  wäre eine Möglichkeit.

Neben ihrer Funktion als Dirigenten der Immunzellen in der Entzündung haben Zytokine auch direkte und indirekte Wirkung auf die Schmerzwahrnehmung. Die Herunterregulation der proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  könnte zu den antinozizeptiven Effekten von Elektroakupunktur beitragen. Beide Zytokine sind an der Entstehung von entzündlicher Hyperalgesie beteiligt, wobei TNF- $\alpha$  eine Schlüsselrolle innehat [175]. Über Rezeptoren auf sensiblen Neuronen können sie diese direkt erregen. TNF- $\alpha$  über eine TNFR1 und TNFR2 vermittelte Ca<sup>2+</sup>-Mobilisierung [176], IL-1 $\beta$  über einen PKC/NF $\kappa$ B abhängigen Weg, der die Expression von  $\alpha$ -CGRP induziert [177]. Zusätzlich führen sie zur Freisetzung endogener Substanzen wie NGF [106], Eicosanoiden und Sympathomimetika [178], die ihrerseits Nozizeptoren sensibilisieren. IL-1 $\alpha$  und - $\beta$  defiziente Mäuse zeigen eine reduzierte Sensitivität auf CFA-induzierte Hyperalgesie [179]. In letzter Zeit gibt es Hinweise, dass auch antiinflammatorische Zytokine Entzündungsschmerz modulieren. Durch ihren hemmenden Effekt auf die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Prostaglandinen reduziert IL-13 Carageenan-, LPS-, Bradykinin-, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ -induzierte Hyperalgesie [180]. Die Injektion von IL-13 erhöht thermische Schmerzschwellen bei *Leishmania major* induziertem Entzündungsschmerz [181] und reduziert schmerzassoziiertes Verhalten bei Zymosan-induzierter Gelenkentzündung [182]. Zum Beitrag von IFN- $\gamma$  bei der direkten Erregung von Nozizeptoren ist bisher nichts bekannt, dies scheint nur auf indirektem Weg über die Regulation proinflammatorischer Mediatoren zu geschehen.

Zusammenfassend scheinen die durch Elektroakupunktur hervorgerufenen Zytokinveränderungen einen Beitrag zur Antinozizeption zu leisten: die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die direkt oder über Freisetzung nozizeptiver Substanzen Nozizeptoren sensibilisieren, werden herunter-, IL-13, das pronozizeptive Proteine senkt, wird heraufreguliert.

### **4.3.2 Antinozizeptive Wirkung von Elektroakupunktur durch CXCL10-getriggerte Freisetzung peripherer Opiode**

Neben den Verschiebungen im Zytokinmilieu war in den mit Elektroakupunktur behandelten Proben das Chemokin CXCL10 hochreguliert. Die verstärkte Expression fand auf Transkriptions- und auf Translationsebene statt. CXCL10 ist

## Diskussion

notwendig für die antinozizeptive Wirkung von Elektroakupunktur. Vergleicht man das Pfortengewebe von akupunkturierten und nicht akupunkturierten Ratten so sieht man ein erhöhtes Vorkommen CXCR<sup>3+</sup> Makrophagen in den behandelten Proben. Die Neutralisation von CXCL10 vermindert den Gehalt von  $\beta$ -Endorphin-haltigen Makrophagen in diesem Gewebe.

Chemokinvermittelte Wirkungen von Akupunktur wurden gezeigt für Neuroprotektion, Wundheilung und bei Myokardschäden. Neuropathischen Schmerz mindert Akupunktur durch eine herunterregulierte Expression von CCL2, CCL4 und CCL20 in Astrozyten über einen JNK abhängigen Signalweg [183]. Akupunktur hat bei zerebraler Ischämie präventive Effekte durch die vermehrte Produktion von protektivem CXCL20 [184], in einem Modell für autoimmune Enzephalitis reduziert sie die Expression der Chemokine MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  [185]. Bei beschleunigter Wundheilung nach Verbrennungen findet man in der akupunkturierten Gruppe weniger CCL2 und mehr CXCL3 im geschädigten Gewebe [186]. Außerdem entfaltet Elektroakupunktur positive Wirkung auf den Verlauf nach myokardialer Ischämie über erhöhte CXCL8 Plasmaspiegel [187].

CXCL10 ist bekannt für seine chemotaktische Wirkung auf aktivierte T-Helferzellen, Granulozyten, NK-Zellen und Makrophagen [188, 189] über die Aktivierung seines Rezeptors CXCR<sup>3+</sup> [190]. Es ist involviert in die Entstehung verschiedener T<sub>H</sub>1-dominierter Pathologien wie Autoimmunerkrankungen [191, 192], chronische Infektionen [193], Infektionskrankheiten wie Tuberkulose und Malaria [66, 194, 195] und demyelinisierende Neuropathien [196]. Zugrundeliegende Signalwege bleiben bisher weitgehend ungeklärt.

In unserem Modell ist wiederum die Wirkung von CXCL10 auf Makrophagen interessant, da diese die Hauptleukozytenpopulation in der späten CFA-Entzündung darstellen [27]. Die gesteigerten IFN- $\gamma$  Spiegel könnten ursächlich für die Hochregulierung von CXCL10 durch Elektroakupunktur sein [197]. Dies führt zur Anlockung CXCR<sup>3+</sup> positiver Makrophagen, welche  $\beta$ -Endorphin enthalten, demonstriert durch unsere immunhistochemischen Färbungen. Die Ausschüttung dieses endogenen Opioids könnte verantwortlich für den Beitrag von CXCL10 zum antinozizeptiven Effekt von Elektroakupunktur sein. Wie eingangs bereits erwähnt, führt die Bindung von Chemokinen an ihre Rezeptoren auf Leukozyten zur Freisetzung intrazellulärer Opioiden. Liganden von CXCR1/2 füh-

## Diskussion

ren zur p38 MAPK abhängigen Translokation primärer Vesikel in Neutrophilen und damit zur Freisetzung der enthaltenen Opioide [36]. In verschiedenen anderen Untersuchungen konnten außerdem Zytokine, CRF und formylierte Peptide als Trigger für die Freisetzung endogener Opioide aus Immunzellen identifiziert werden [31, 33]. Diese sensibilisieren Nozizeptoren direkt über die Bindung an periphere Opioidrezeptoren [38]. Formylierte Peptide sind Bestandteil des auch in unserem Modell verwendeten CFA. In vitro stimulieren diese Neutrophile aber nicht Monozyten und führen so zur Freisetzung der intrazellulär enthaltenen Opioide [33]. Dieser Mechanismus scheint in der frühen Entzündung (bis 24 h nach Entzündungsinduktion) wichtig zu sein, zu dem von uns untersuchten Zeitpunkt 96 h nach CFA-Injektion aber keine Rolle mehr zu spielen. Die chemokinvermittelte, Opioid-abhängige periphere Antinozizeption ist ein bisher unbekannter Mechanismus über den Akupunktur ihre Wirkung entfaltet. Für eine gute analgetische Wirkung bei entzündlichem Schmerz wäre ein intaktes Immunsystem folglich eine wichtige Voraussetzung. Eine Anti-Chemokin-Therapie, wie sie bei manchen entzündlichen Erkrankungen angedacht ist, scheint hinsichtlich schmerzlindernder Aspekte kontraproduktiv zu sein. Interessant wäre, ob extern applizierte, periphere Opioide, sowie eine medikamentöse selektive Rekrutierung opioidhaltiger Immunzellen und eine verstärkte endogene Opioidproduktion synergistisch mit Akupunktur wirken könnten.

Weitere Untersuchungen sollten darauf hinzielen, die ungeklärten Verbindungen zwischen der Nadelinsertion in der Nähe des Steißbeins der Tiere und den ausgelösten Veränderungen in deren Pfote zu klären. Möglicherweise spielt hier die Aktivierung zentraler Strukturen eine Rolle. Wie etwa die schon erwähnte Verbindung zwischen Akupunktur-Stimulation des Sympathikus über den lateralen Hypothalamus und erhöhter IFN- $\gamma$  Produktion durch NK-Zellen in der Milz [173, 174]. Die Hypothese, dass Akupunktur über das vegetative Nervensystem ihre Effekte entfaltet wurde bisher nur durch lückenhafte Hinweise gestützt [102]. Weitere gezielte Untersuchungen zu neuroimmunologischen Mechanismen von Akupunktur sind notwendig um diese zu bestätigen.

### **4.3.3 Antiinflammatorische Wirkung von Elektroakupunktur durch A2BR**

Um der Rolle der Adenosin-2B-Rezeptoren für die antiinflammatorischen Wirkungen der Elektroakupunktur auf Zytokinebene nachzugehen, wurden diese durch die tägliche Injektion von PSB1115 inhibiert. Unter Rezeptorblockade war Akupunktur nicht mehr in der Lage, die Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zu senken. Das Pfotenvolumen war signifikant höher 96 h nach Entzündungsinduktion in den akupunktierten und mit PSB1115 behandelten Tieren im Vergleich zu den Pfoten ohne Injektion von Rezeptorantagonisten. Die Rezeptorblockade führte zu anhaltender Hyperalgesie bei CFA-Entzündung, hob den antinozizeptiven Effekt von Akupunktur aber nur akut auf. Die mRNA-Level der Adenosin-2B-Rezeptoren wurden durch Akupunkturbehandlung nicht signifikant verändert.

Adenosin-2B-Rezeptoren haben unter physiologischen Bedingungen die niedrigste Affinität zu Adenosin im Vergleich zu A1-, A2A- und A3-Rezeptoren [198], sie werden funktionell also erst durch hochregulierte Expression in pathophysiologischen Vorgängen wichtig. Bekannt sind sie für ihren Beitrag zur Aggravation von Asthma und COPD über die Stimulation von Mastzellen zur Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren [199]. Sie beeinflussen dendritische Zellen während ihrer Reifung und Differenzierung so, dass eine T<sub>H</sub>2 dominierte Immunantwort unterstützt wird [86]. Ihre Aktivierung auf Endothelzellen bewirkt wahrscheinlich eine verminderte Adhäsion von Leukozyten durch eine herunterregulierte Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen [200]. Hypoxie verstärkt diese Wirkung, da über HIF-1 $\alpha$  mehr Adenosin-2B-Rezeptoren exprimiert werden [201]. Die Wirkung in Makrophagen ist umstritten. Es wurde angenommen, dass diese nur in Abwesenheit von Adenosin-2A-Rezeptoren vorhanden ist, da diese durch ihre hohe Affinität sonst die Effekte von Adenosin dominieren [202]. Allerdings ist Adenosin in hypoxischen Bedingungen selbst in der Lage in Monozyten eine HIF-1 $\alpha$  Sekretion zu stimulieren. Unter diesen Umständen nehmen Adenosin-2B/3 Rezeptoren eine Schlüsselrolle in der Modulation von Makrophagenfunktionen ein [203]. Sie unterstützen einen Wechsel vom proinflammatorischen M1-Typ hin zum antiinflammatorischen M2-Typ, hemmen also eine überschießende klassische Aktivierung [80, 130] und unterstützen eine alternative Aktivierung der Makrophagen [204]. Zusätzlich tragen sie zur

## Diskussion

Aufrechterhaltung des Zellmetabolismus bei, indem sie bei Hypoxie die Bildung von ATP erleichtern [205].

Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass mittels Elektroakupunktur die durch CFA klassisch aktivierten Makrophagen, vermittelt durch Adenosin-2B-Rezeptoren, in ihrer proinflammatorischen Aktivität gehemmt werden. Die erhöhten IFN- $\gamma$  Spiegel tragen zur Induktion von Adenosin-2B-Rezeptoren in Makrophagen bei. Anschließend kann Adenosin besser seine antientzündliche Aktivität über diese Rezeptoren vermitteln, was die verminderten TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Level bei Akupunktur trotz des erhöhten IFN- $\gamma$  erklären würde. Dieser Mechanismus der „Makrophagendeaktivierung“ wurde von Xaus et al. [130] etabliert und durch weitere Untersuchungen bestätigt [202, 206-208]. Es zeigte sich nur eine nichtsignifikante Tendenz für eine Erhöhung der Adenosin-2B-Rezeptor-mRNA durch Akupunktur. Dies könnte methodische Gründe haben (siehe Diskussion der mRNA-Quantifizierung). Die IFN- $\gamma$  stimulierte, erhöhte Rezeptorexpression auf Makrophagen ist bisher durch durchflusszytometrische Messungen [130], PCR und Western Blot gezeigt wurden [209].

Die Datenlage zur Auswirkung von Adenosin-2B-Rezeptoren auf die Nozizeption ist bisher widersprüchlich. Die systemische Applikation von PSB1115 (A2B Rezeptor Antagonist) erhöht die Schmerzschwellen bei Formalin und Carageenan induzierter Entzündung [210]. Die intraperitoneale Injektion verstärkt die antinozizeptive Wirkung von Koffein [211] aber verhindert die schmerzlindernde Wirkung von Diphenyldiselenid [212] bei Hitze induziertem Schmerz. In unserem Modell des CFA-induzierten Entzündungsschmerzes hatte die Adenosin-2B-Rezeptorblockade einen über mehrere Tage andauernden hyperalgetischen Effekt, der bei Akupunkturbehandlung nur akut auftrat. Dies spiegelt wahrscheinlich die differenzierte Verteilung der Rezeptoren mit jeweils unterschiedlichen, teils gegensätzlichen Funktionen wieder. Da die selektiven Rezeptorantagonisten erst kürzlich entwickelt wurden [211] fehlt es noch an Untersuchungen, die die verschiedenen Wirkweisen erklären. Die Akupunkturwirkung auf die inflammatorische Hyperalgesie ist jedoch nicht von Adenosin-2B-Rezeptoren abhängig.

An der Stelle der Nadelinsertion findet man Adenosin lokal erhöht [95]. Der Mechanismus über den Akupunktur zu einer vermehrten extrazellulären Adenosin-

## Diskussion

ansammlung führt ist unklar. Ob die Konzentration des Purins auch in weiterem Abstand zum Akupunkturpunkt an dem für den Schmerz ursächlichen Ort (in unserem Modell die Pfote) steigt, wurde bisher noch nicht untersucht.

Der beschriebene Mechanismus der Makrophagendeaktivierung über IFN- $\gamma$  zeigt, wie Akupunktur körpereigene, physiologische Mechanismen nutzt, um eine überschießende entzündliche Reaktion zu verhindern. Erneut wird deutlich, dass ein gesund agierendes Immunsystem für die Akupunkturwirkung notwendig ist. In Zusammenschau mit den Ergebnissen von Goldman et al., die die herausragende Rolle der A1-Rezeptoren für die Akupunktur-induzierte Antinozizeption demonstriert haben [95] wäre eine Untersuchung des möglichen Synergismus von Adenosinrezeptoragonisten und Akupunktur interessant. Vom Kaffeingenuss vor einer Akupunkturbehandlung sollte man abraten, da Koffein ein bekannter Antagonist aller Adenosinrezeptoren ist.

## 5 Zusammenfassung

---

Die Grundlage für diese Arbeit bildete ein Modell mit CFA-induziertem Entzündungsschmerz in Ratten, bei denen eine zweimalige Behandlung mit Elektroakupunktur zu einer langanhaltenden Antinozizeption führte, welche abhängig von peripheren Opioiden war. In einem nächsten Schritt sollten nun die durch Akupunktur vermittelten Zytokin- und Chemokinveränderungen untersucht und deren Beitrag zu den antinozizeptiven und antiinflammatorischen Mechanismen geklärt werden. Mittels ELISA und PCR wurden die Protein- und mRNA-Level der klassischen Zytokine und des Chemokins CXCL10 bestimmt. CXCL10, welches durch Elektroakupunktur sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene hochreguliert wurde, ist notwendig für die Rekrutierung  $\beta$ -Endorphin haltiger Makrophagen in das entzündete Gewebe und für die antinozizeptive Wirkung der Akupunkturbehandlung. Ein antiinflammatorischer Effekt der Akupunkturbehandlung äußerte sich durch die Reduktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  und ein erhöhtes IL-13. Das einzige hochregulierte proinflammatorische Zytokin war IFN- $\gamma$ . Ein Teil der entzündungshemmenden Wirkung, die Reduktion der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , wird durch Adenosin-2B-Rezeptoren vermittelt, welche bekannt sind für ihre Rolle in der „Deaktivierung“ IFN- $\gamma$ -stimulierter Makrophagen. Diese Ergebnisse verweisen auf die bisher unbekannt Verbindung zwischen chemokinvermittelter peripherer, opioidabhängiger Antinozizeption durch Elektroakupunktur. Sie erweitern das Verständnis für das Zusammenspiel von Immunzellen, Adenosin und Akupunktur. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um neuroimmunologische Verbindungen zu klären und die Wirkungen durch die Nadelinsertion mit Effekten in der entfernten Rattenpfote besser zu verstehen.

Diese Arbeit vereint westliche Wissenschaft und eine Jahrtausende alte Methode. Diese Gratwanderung wird treffend durch ein Bild von Georg König beschrieben, welches die Herangehensweisen von westlicher und asiatischer Medizinphilosophie mit den beiden Großhirnhemisphären vergleicht. In beiden sind bestimmte Fähigkeiten angesiedelt. Welche dominieren, wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Nicht eine Seite ist wichtiger als die andere. Für die bestmögliche Funktion müssen beide zusammenarbeiten [213].

## 6 Abkürzungsverzeichnis

---

ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure)
ANOVA	analysis of variance (Varianzanalyse)
mA	mili Ampere
BSA	bovines Serumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CFA	Complete Freund's Adjuvant
CGRP	Calcitonin gene related Peptid
CRF	Corticotropin releasing factor
CT	threshold cycle
°C	grad Celsius
DAPI	4',6 Diamidino-2-phenylindol
EA	Elektroakupunktur
END	Endorphin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
h	Stunde(n)
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia inducible Factor
IL	Interleukin
IFN	Interferon
JNK	Jun-N-terminal Kinase
LPS	Lipopolysaccharid
M1	M1-Makrophagen, proinflammatorischer Phänotyp
M2	M2-Makrophagen, antiinflammatorischer Phänotyp
MCP-1	Monocyte Chemotactic Protein-1
Min	Minute(n)
MIP-1 $\alpha$	Macrophage Inflammatory Protein-1 $\alpha$
L	links
NaCl	Natriumchlorid

## Abkürzungsverzeichnis

NFκB	nuclear factor 'κ-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGF	Nerve growth factor
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PKC	Proteinkinase C
R	rechts
RM	repeated measurement (wiederholte Messung)
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
T <sub>H</sub> -1	T1-Helferzellen
T <sub>H</sub> -2	T2-Helferzellen
TMB	Tetramethylbenzidin
TNFR 1/2	Tumor Nekrosefaktor α Rezeptor 1/2
TRPV1	Transient Receptor Potential Vanilloid 1

## 7 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Veröffentlichungen zum Thema Akupunktur seit 1900 ..... 3  
Reprinted from *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, Vol. 35, Han, J.S. and Y.S. Ho, Global trends and performances of acupuncture research., Page No. 682, Copyright (2011), with permission from Elsevier
- Abbildung 2: nozizeptiver, inflammatorischer und neuropathischer Schmerz ..... 6  
Reprinted by permission from Macmillan Publishers Ltd: *Nature Neuroscience*, Vol. 5, . Joachim Scholz and Clifford J. Woolf, Can we conquer pain? copyright (2002)
- Abbildung 3: periphere Antinozizeption durch endogene Opiode aus Leukozyten ..... 8  
Reprinted from *Current Opinion in Pharmacology*, Vol. 9, Christoph Stein, Leonie Julia Lang, Peripheral mechanisms of opioid analgesia, Page No. 4, Copyright (2009) with permission from Elsevier
- Abbildung 4: Neutralisation von CXCL10 vermindert die antinozizeptive Wirkung von Elektroakupunktur ..... 16  
Ausschnitt aus *Figure 6. Neutralization of CXCL10 fully reversed electroacupuncture (EA)-induced antinociception and increase of opioid-containing monocytes/macrophages.*  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g006> von Ying Wang, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.
- Abbildung 5: Rekrutierung CXCR3<sup>+</sup>-Makrophagen durch Elektroakupunktur ..... 17  
Ausschnitt aus *Figure 3. Upregulation of CXCL10 and an increase of CXCR3+macrophages in inflamed paw tissue by electroacupuncture (EA).*  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g003> von Ying Wang, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.
- Abbildung 6: steigender  $\beta$ -Endorphingehalt im Gewebe durch Elektroakupunkturbehandlung ..... 18  
Ausschnitt aus *Figure 5. EA enhanced the recruitment of opioid-containing macrophages.*  
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g005> von Ying Wang, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 7: Geringere Konzentration $\beta$ -Endorphin-haltiger Makrophagen bei Neutralisation von CXCL10.....	19
Ausschnitt aus <i>Figure 6. Neutralization of CXCL10 fully reversed electroacupuncture (EA)-induced antinociception and increase of opioid-containing monocytes/macrophages.</i>	
<a href="http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g006">http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g006</a> von Ying Wang, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.	
Abbildung 8: A2B-Rezeptorblockade verhindert die Verminderung des Pfortenvolumens durch Elektroakupunktur .....	20
Quelle: Ying Wang; unpubliziert	
Abbildung 9: Hyperalgesie durch A2B-Rezeptorblockade.....	21
Quelle: Ying Wang; unpubliziert	
Abbildung 10: A2B-Rezeptorblockade vermindert akut die antinocizeptive Wirkung von Elektroakupunktur, hat aber keine langanhaltende Wirkung auf die Pfortendruckschwelle.....	22
Quelle: Ying Wang; unpubliziert	
Abbildung 11: Elektroakupunkturmodell .....	25
Quelle: Ying Wang; unpubliziert	
Abbildung 12: Prinzip des kompetitiven ELISA .....	27
Abbildung 13: Prinzip des Sandwich-ELISA.....	27
Abbildung 14: Polymerisierung.....	32
Abbildung 15: Freisetzung des Reporterfarbstoffes F2.....	33
Abbildung 16: Cyclereinstellung für qPCR .....	34
Abbildung 17: Verminderung der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ und IL-1 $\beta$ durch Elektroakupunktur. ....	42
Ausschnitt aus <i>Figure 2. Differential alterations in pro- and anti-inflammatory cytokines in inflamed paw tissue by electroacupuncture (EA).</i>	
<a href="http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g002">http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g002</a> von Ying Wang und Rebekka Gehringer, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.	
Abbildung 18: Erhöhung des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$ und keine Änderung des Zytokins IL-1 $\alpha$ durch Elektroakupunktur.....	42
Ausschnitt aus <i>Figure 2. Differential alterations in pro- and anti-inflammatory cytokines in inflamed paw tissue by electroacupuncture (EA).</i>	
<a href="http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g002">http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g002</a> von Ying Wang und Rebekka Gehringer, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 19: Anstieg des antiinflammatorischen Zytokins IL-13 und keine Änderung des Zytokins IL-4 bei Behandlung mit Elektroakupunktur .....	43
Ausschnitt aus <i>Figure 2. Differential alterations in pro- and anti-inflammatory cytokines in inflamed paw tissue by electroacupuncture (EA)</i> .	
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g002 von Ying Wang und Rebekka Gehringer, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.	
Abbildung 20: Zunahme des Chemokins CXCL10 durch Elektroakupunktur .....	43
Ausschnitt aus <i>Figure 3. Upregulation of CXCL10 and an increase of CXCR3+macrophages in inflamed paw tissue by electroacupuncture (EA)</i> .	
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g003 von Ying Wang und Rebekka Gehringer, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.	
Abbildung 21: Erhöhung der mRNA-Level des Chemokins CXCL10 im Zeitverlauf durch Elektroakupunktur .....	44
Ausschnitt aus <i>Figure 3. Upregulation of CXCL10 and an increase of CXCR3+macrophages in inflamed paw tissue by electroacupuncture (EA)</i> .	
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g003 von Ying Wang und Rebekka Gehringer, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.	
Abbildung 22: Keine Änderung der CXCR3-Expression durch Elektroakupunktur .....	45
Abbildung 23: Unveränderte Proteinmengen von CXCL10, IL-13 und IL-1 $\beta$ nach Sham-Akupunktur-Behandlung .....	46
23A ist ein Ausschnitt aus <i>Figure 3. Upregulation of CXCL10 and an increase of CXCR3+macrophages in inflamed paw tissue by electroacupuncture (EA)</i> .	
http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0094696.g003 von Ying Wang und Rebekka Gehringer, lizenziert unter Creative Commons Attribution 4.0 International License. Eine Kopie der Lizenz ist unter: <a href="http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a> zu finden, oder senden Sie einen Brief an Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.	
Abbildung 24: Klassische Aktivierung von Makrophagen .....	47
Abbildung 25: Deaktivierung von M1-Makrophagen .....	47
Abbildung 26: Aufhebung der antiinflammatorischen Wirkung von Elektroakupunktur auf Zytokine durch A2B-Rezeptor-Blockade außer bei IL-13 .....	48
Abbildung 27: Vergleich der A2BR-Expression mit und ohne Elektroakupunktur-Behandlung 72 und 96 h nach CFA-Injektion .....	49

## 8 Literaturverzeichnis

---

1. Lu, G.-D.N., Joseph, *Historical growth of the system, in A History and Rationale of Acupuncture and Moxa*. 1980, Cambridge University Press: Cambridge. p. 69-88.
2. Lu, G.-D.N., Joseph, *Influences, in A History and Rationale of Acupuncture and Moxa*. 1980, Cambridge University Press Cambridge. p. 270.
3. Barnes, L.L., *Needles, herbs, gods, and ghosts: China, healing, and the West to 1848*. 2005, Harvard University Press. p. 58.
4. Lu, G.-D.N., Joseph, *Influences, in A History and Rationale of Acupuncture and Moxa*. 1980, Cambridge University Press Cambridge. p. 293.
5. Pettigrew, T.J., ed. *Superstitions connected with the history and practice of medicine and surgery*. NRRSL. 1844. 251-254.
6. Dujardin, F., *Histoire de la chirurgie, depuis son origine jusqu'à nos jours*. Vol. 1. 1774, Paris: De l'imprimerie royale.
7. Zhou, J., *Chinesische Medizin - Kompendium*. 2004, OZV: Bad Pyrmont - Beijing. p. I.
8. Barnes, L.L., *Needles, herbs, gods, and ghosts: China, healing, and the West to 1848*. 2005, Harvard University Press. p. 4.
9. Koch, H.P.K., Sonja, *Traditionelle chinesische Medizin: eine Einführung*. 1996, Stuttgart; New York: Schattauer.
10. Kaptchuk, T.J., *Acupuncture: theory, efficacy, and practice*. *Ann Intern Med*, 2002. **136**(5): p. 374-83.
11. Han, J.S. and Y.S. Ho, *Global trends and performances of acupuncture research*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2011. **35**(3): p. 680-7.
12. IASP, T.f.o.t., *Classification of chronic pain in Part III Pain Terms, a current list with definitions and notes on usage* B.N. Merskey H, Editor. 2007. p. 3-4.
13. Eisenberger, N.I., M.D. Lieberman, and K.D. Williams, *Does rejection hurt? An fMRI study of social exclusion*. *Science*, 2003. **302**(5643): p. 290-2.
14. Kross, E., et al., *Social rejection shares somatosensory representations with physical pain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(15): p. 6270-5.
15. Bungert, M., et al., *Pain Processing after Social Exclusion and Its Relation to Rejection Sensitivity in Borderline Personality Disorder*. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0133693.
16. Derbyshire, S.W.G., *Assessing Pain in Animals*. *Science of Pain*, ed. A. Basbaum. 2009.
17. Cox, J.J., et al., *An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain*. *Nature*, 2006. **444**(7121): p. 894-8.
18. Minett, M.S., et al., *Endogenous opioids contribute to insensitivity to pain in humans and mice lacking sodium channel Nav1.7*. *Nat Commun*, 2015. **6**: p. 8967.
19. Scholz, J. and C.J. Woolf, *Can we conquer pain?* *Nat Neurosci*, 2002. **5 Suppl**: p. 1062-7.
20. Stein, C., et al., *Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(15): p. 5935-9.
21. Stein, C., et al., *Local analgesic effect of endogenous opioid peptides*. *Lancet*, 1993. **342**(8867): p. 321-4.

## Literaturverzeichnis

22. Machelska, H., et al., *Opioid control of inflammatory pain regulated by intercellular adhesion molecule-1*. J Neurosci, 2002. **22**(13): p. 5588-96.
23. Machelska, H., et al., *Selectins and integrins but not platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 regulate opioid inhibition of inflammatory pain*. Br J Pharmacol, 2004. **142**(4): p. 772-80.
24. Brack, A., et al., *Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells*. Pain, 2004. **112**(3): p. 229-38.
25. Rittner, H.L., et al., *Neurokinin-1 receptor antagonists inhibit the recruitment of opioid-containing leukocytes and impair peripheral antinociception*. Anesthesiology, 2007. **107**(6): p. 1009-17.
26. Lopes, A.H., et al., *DF2755A, a novel non-competitive allosteric inhibitor of CXCR1/2, reduces inflammatory and post-operative pain*. Pharmacol Res, 2015. **103**: p. 69-79.
27. Rittner, H.L., et al., *Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain*. Anesthesiology, 2001. **95**(2): p. 500-8.
28. Mousa, S.A., et al., *Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain*. Endocrinology, 2004. **145**(3): p. 1331-41.
29. Czlonkowski, A., C. Stein, and A. Herz, *Peripheral mechanisms of opioid antinociception in inflammation: involvement of cytokines*. Eur J Pharmacol, 1993. **242**(3): p. 229-35.
30. Cabot, P.J., et al., *Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats*. J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 142-8.
31. Schafer, M., L. Carter, and C. Stein, *Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(10): p. 4219-23.
32. Rittner, H.L., et al., *Pain control by CXCR2 ligands through Ca<sup>2+</sup>-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells*. FASEB J, 2006. **20**(14): p. 2627-9.
33. Rittner, H.L., et al., *Mycobacteria attenuate nociceptive responses by formyl peptide receptor triggered opioid peptide release from neutrophils*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000362.
34. Binder, W., et al., *Sympathetic activation triggers endogenous opioid release and analgesia within peripheral inflamed tissue*. Eur J Neurosci, 2004. **20**(1): p. 92-100.
35. Schafer, M., et al., *Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 6096-100.
36. Rittner, H.L., et al., *CXCR1/2 ligands induce p38 MAPK-dependent translocation and release of opioid peptides from primary granules in vitro and in vivo*. Brain Behav Immun, 2007. **21**(8): p. 1021-32.
37. Stein, C. and L.J. Lang, *Peripheral mechanisms of opioid analgesia*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(1): p. 3-8.
38. Coggeshall, R.E., S. Zhou, and S.M. Carlton, *Opioid receptors on peripheral sensory axons*. Brain Res, 1997. **764**(1-2): p. 126-32.
39. Rau, K.K., et al., *Diverse immunocytochemical expression of opioid receptors in electrophysiologically defined cells of rat dorsal root ganglia*. J Chem Neuroanat, 2005. **29**(4): p. 255-64.

40. Mousa, S.A., et al., *Beta-endorphin, Met-enkephalin and corresponding opioid receptors within synovium of patients with joint trauma, osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2007. **66**(7): p. 871-9.
41. Andreev, N., L. Urban, and A. Dray, *Opioids suppress spontaneous activity of polymodal nociceptors in rat paw skin induced by ultraviolet irradiation*. Neuroscience, 1994. **58**(4): p. 793-8.
42. Yaksh, T.L., *Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids*. Brain Res, 1988. **458**(2): p. 319-24.
43. Endres-Becker, J., et al., *Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain*. Mol Pharmacol, 2007. **71**(1): p. 12-8.
44. Machelska, H., et al., *Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation*. J Neuroimmunol, 2003. **141**(1-2): p. 30-9.
45. Mousa, S.A., et al., *Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain*. Brain, 2007. **130**(Pt 2): p. 502-13.
46. Antonijevic, I., et al., *Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation*. J Neurosci, 1995. **15**(1 Pt 1): p. 165-72.
47. Vetter, I., et al., *The effects of pH on beta-endorphin and morphine inhibition of calcium transients in dorsal root ganglion neurons*. J Pain, 2006. **7**(7): p. 488-99.
48. Zollner, C., et al., *Chronic morphine use does not induce peripheral tolerance in a rat model of inflammatory pain*. J Clin Invest, 2008. **118**(3): p. 1065-73.
49. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. 2011: Spektrum Akademischer Verlag.
50. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118**(2): p. 503-8.
51. Opal, S.M. and V.A. DePalo, *Anti-inflammatory cytokines*. Chest, 2000. **117**(4): p. 1162-72.
52. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 145-73.
53. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
54. Martinez, F.O., L. Helming, and S. Gordon, *Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective*. Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 451-83.
55. Lasky, L.A., *Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation*. Science, 1992. **258**(5084): p. 964-9.
56. Springer, T.A., *Adhesion receptors of the immune system*. Nature, 1990. **346**(6283): p. 425-34.
57. Granger, D.N. and P. Kubes, *The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion*. J Leukoc Biol, 1994. **55**(5): p. 662-75.
58. Clore, G.M. and A.M. Gronenborn, *Three-dimensional structures of alpha and beta chemokines*. FASEB J, 1995. **9**(1): p. 57-62.
59. Bazan, J.F., et al., *A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif*. Nature, 1997. **385**(6617): p. 640-4.
60. Rollins, B.J., et al., *Cytokine-activated human endothelial cells synthesize and secrete a monocyte chemoattractant, MCP-1/JE*. Am J Pathol, 1990. **136**(6): p. 1229-33.
61. Weber, K.S., L.B. Klickstein, and C. Weber, *Specific activation of leukocyte beta2 integrins lymphocyte function-associated antigen-1 and Mac-1 by*

- chemokines mediated by distinct pathways via the alpha subunit cytoplasmic domains.* Mol Biol Cell, 1999. **10**(4): p. 861-73.
62. Constantin, G., et al., *Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow.* Immunity, 2000. **13**(6): p. 759-69.
  63. Smart, S.J. and T.B. Casale, *TNF-alpha-induced transendothelial neutrophil migration is IL-8 dependent.* Am J Physiol, 1994. **266**(3 Pt 1): p. L238-45.
  64. Gerszten, R.E., et al., *MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions.* Nature, 1999. **398**(6729): p. 718-23.
  65. Xuan, W., et al., *The chemotaxis of M1 and M2 macrophages is regulated by different chemokines.* J Leukoc Biol, 2015. **97**(1): p. 61-9.
  66. Van den Steen, P.E., et al., *CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN-gamma-induced chemokines.* Eur J Immunol, 2008. **38**(4): p. 1082-95.
  67. Dewan, M.Z., et al., *Stromal cell-derived factor-1 and CXCR4 receptor interaction in tumor growth and metastasis of breast cancer.* Biomed Pharmacother, 2006. **60**(6): p. 273-6.
  68. Belperio, J.A., et al., *CXC chemokines in angiogenesis.* J Leukoc Biol, 2000. **68**(1): p. 1-8.
  69. Lataillade, J.J., J. Domenech, and M.C. Le Bousse-Kerdiles, *Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)\CXCR4 couple plays multiple roles on haematopoietic progenitors at the border between the old cytokine and new chemokine worlds: survival, cell cycling and trafficking.* Eur Cytokine Netw, 2004. **15**(3): p. 177-88.
  70. Doranz, B.J., et al., *Chemokine receptors as fusion cofactors for human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1).* Immunol Res, 1997. **16**(1): p. 15-28.
  71. Mantovani, A., et al., *The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization.* Trends Immunol, 2004. **25**(12): p. 677-86.
  72. Abbadie, C., *Chemokines, chemokine receptors and pain.* Trends Immunol, 2005. **26**(10): p. 529-34.
  73. Oh, S.B., et al., *Chemokines and glycoprotein120 produce pain hypersensitivity by directly exciting primary nociceptive neurons.* J Neurosci, 2001. **21**(14): p. 5027-35.
  74. Zhang, N., et al., *A proinflammatory chemokine, CCL3, sensitizes the heat- and capsaicin-gated ion channel TRPV1.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(12): p. 4536-41.
  75. Vellani, V., et al., *Sensitization of transient receptor potential vanilloid 1 by the prokineticin receptor agonist Bv8.* J Neurosci, 2006. **26**(19): p. 5109-16.
  76. Abbadie, C., et al., *Chemokines and pain mechanisms.* Brain Res Rev, 2009. **60**(1): p. 125-34.
  77. Hasko, G. and B.N. Cronstein, *Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity.* Trends Immunol, 2004. **25**(1): p. 33-9.
  78. Marone, G., R. Petracca, and S. Vigorita, *Adenosine receptors on human inflammatory cells.* Int Arch Allergy Appl Immunol, 1985. **77**(1-2): p. 259-63.
  79. Ribeiro, J.A. and A.M. Sebastiao, *Adenosine receptors and calcium: basis for proposing a third (A3) adenosine receptor.* Prog Neurobiol, 1986. **26**(3): p. 179-209.
  80. Hasko, G. and P. Pacher, *Regulation of macrophage function by adenosine.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(4): p. 865-9.

81. Cronstein, B.N., et al., *Adenosine; a physiologic modulator of superoxide anion generation by human neutrophils. Adenosine acts via an A2 receptor on human neutrophils.* J Immunol, 1985. **135**(2): p. 1366-71.
82. Hasko, G., et al., *Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice.* J Immunol, 1996. **157**(10): p. 4634-40.
83. Szabo, C., et al., *Suppression of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha production and collagen-induced arthritis by adenosine receptor agonists.* Br J Pharmacol, 1998. **125**(2): p. 379-87.
84. Adair, T.H., *Growth regulation of the vascular system: an emerging role for adenosine.* Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(2): p. R283-R296.
85. Fischer, D., et al., *A role for adenosine deaminase in human monocyte maturation.* J Clin Invest, 1976. **58**(2): p. 399-407.
86. Novitskiy, S.V., et al., *Adenosine receptors in regulation of dendritic cell differentiation and function.* Blood, 2008. **112**(5): p. 1822-31.
87. Inoue, Y., et al., *A3 and P2Y2 receptors control the recruitment of neutrophils to the lungs in a mouse model of sepsis.* Shock, 2008. **30**(2): p. 173-7.
88. Panther, E., et al., *Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells.* Blood, 2003. **101**(10): p. 3985-90.
89. Flamand, N., et al., *Adenosine, a potent natural suppressor of arachidonic acid release and leukotriene biosynthesis in human neutrophils.* Am J Respir Crit Care Med, 2000. **161**(2 Pt 2): p. S88-94.
90. Rorke, S. and S.T. Holgate, *Targeting adenosine receptors: novel therapeutic targets in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Med, 2002. **1**(2): p. 99-105.
91. Sawynok, J., A. Reid, and A. Poon, *Peripheral antinociceptive effect of an adenosine kinase inhibitor, with augmentation by an adenosine deaminase inhibitor, in the rat formalin test.* Pain, 1998. **74**(1): p. 75-81.
92. Taiwo, Y.O. and J.D. Levine, *Direct cutaneous hyperalgesia induced by adenosine.* Neuroscience, 1990. **38**(3): p. 757-62.
93. Lima, F.O., et al., *Direct blockade of inflammatory hypernociception by peripheral A1 adenosine receptors: involvement of the NO/cGMP/PKG/KATP signaling pathway.* Pain, 2010. **151**(2): p. 506-15.
94. Hayashida, M., K. Fukuda, and A. Fukunaga, *Clinical application of adenosine and ATP for pain control.* J Anesth, 2005. **19**(3): p. 225-35.
95. Goldman, N., et al., *Adenosine A1 receptors mediate local anti-nociceptive effects of acupuncture.* Nat Neurosci, 2010. **13**(7): p. 883-8.
96. Takano, T., et al., *Traditional acupuncture triggers a local increase in adenosine in human subjects.* J Pain, 2012. **13**(12): p. 1215-23.
97. Chen, L., et al., *Endogenous anandamide and cannabinoid receptor-2 contribute to electroacupuncture analgesia in rats.* J Pain, 2009. **10**(7): p. 732-9.
98. Tobaldini, G., et al., *Ascending nociceptive control contributes to the anti-nociceptive effect of acupuncture in a rat model of acute pain.* J Pain, 2014.
99. Wang, S.M., Z.N. Kain, and P.F. White, *Acupuncture analgesia: II. Clinical considerations.* Anesth Analg, 2008. **106**(2): p. 611-21, table of contents.
100. Deare, J.C., et al., *Acupuncture for treating fibromyalgia.* Cochrane Database Syst Rev, 2013. **5**: p. CD007070.

## Literaturverzeichnis

101. Linde, K., et al., *Acupuncture for tension-type headache*. Cochrane Database Syst Rev, 2009(1): p. CD007587.
102. Kavoussi, B. and B.E. Ross, *The neuroimmune basis of anti-inflammatory acupuncture*. Integr Cancer Ther, 2007. **6**(3): p. 251-7.
103. Li, A., et al., *Electroacupuncture suppresses hyperalgesia and spinal Fos expression by activating the descending inhibitory system*. Brain Res, 2007. **1186**: p. 171-9.
104. Du, H.J. and Y.F. Chao, *Localization of central structures involved in descending inhibitory effect of acupuncture on viscerosomatic reflex discharges*. Sci Sin, 1976. **19**(1): p. 137-48.
105. Lao, L., et al., *A parametric study of electroacupuncture on persistent hyperalgesia and Fos protein expression in rats*. Brain Res, 2004. **1020**(1-2): p. 18-29.
106. Zhang, Y.Q., et al., *Excitatory amino acid receptor antagonists and electroacupuncture synergistically inhibit carrageenan-induced behavioral hyperalgesia and spinal fos expression in rats*. Pain, 2002. **99**(3): p. 525-35.
107. Su, T.F., et al., *Cannabinoid CB2 receptors contribute to upregulation of beta-endorphin in inflamed skin tissues by electroacupuncture*. Mol Pain, 2011. **7**: p. 98.
108. Han, J.S., *Acupuncture: neuropeptide release produced by electrical stimulation of different frequencies*. Trends Neurosci, 2003. **26**(1): p. 17-22.
109. Zhang, R.X., et al., *Involvement of opioid receptors in electroacupuncture-produced anti-hyperalgesia in rats with peripheral inflammation*. Brain Res, 2004. **1020**(1-2): p. 12-7.
110. Li, X. and J.C. Eisenach, *alpha2A-adrenoceptor stimulation reduces capsaicin-induced glutamate release from spinal cord synaptosomes*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(3): p. 939-44.
111. Zhang, R., et al., *Mechanisms of acupuncture-electroacupuncture on persistent pain*. Anesthesiology, 2014. **120**(2): p. 482-503.
112. Zhao, Z.Q., *Neural mechanism underlying acupuncture analgesia*. Prog Neurobiol, 2008. **85**(4): p. 355-75.
113. Fang, J.Q., et al., *[Effect of electroacupuncture on carrageenan-induced inflammation, IL-1beta and TNF-alpha concentrations and their mRNA expressions in toe tissue in rats]*. Zhen Ci Yan Jiu, 2007. **32**(4): p. 224-8.
114. Lee, J.H., Y.H. Choi, and B.T. Choi, *The anti-inflammatory effects of 2 Hz electroacupuncture with different intensities on acute carrageenan-induced inflammation in the rat paw*. Int J Mol Med, 2005. **16**(1): p. 99-102.
115. Liu, F., J.Q. Fang, and X.M. Shao, *[Influence of electroacupuncture on the expression of cyclooxygenase mRNA and protein in rats with air-pouch plus recombinant human IL-1beta induced inflammation at the back]*. Zhen Ci Yan Jiu, 2009. **34**(3): p. 159-62.
116. Liu, F., J.Q. Fang, and X.M. Shao, *[Influence of electroacupuncture on human recombination tumor necrosis factor-alpha induced cyclooxygenase expression in air sac model rats]*. Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi, 2010. **30**(8): p. 867-70.
117. Li, A., et al., *Corticosterone mediates electroacupuncture-produced anti-edema in a rat model of inflammation*. BMC Complement Altern Med, 2007. **7**: p. 27.
118. Song, J.G., et al., *Electroacupuncture improves survival in rats with lethal endotoxemia via the autonomic nervous system*. Anesthesiology, 2012. **116**(2): p. 406-14.

## Literaturverzeichnis

119. Kim, H.W., et al., *Low-frequency electroacupuncture suppresses zymosan-induced peripheral inflammation via activation of sympathetic post-ganglionic neurons*. Brain Res, 2007. **1148**: p. 69-75.
120. Sekido, R., K. Ishimaru, and M. Sakita, *Corticotropin-releasing factor and interleukin-1beta are involved in the electroacupuncture-induced analgesic effect on inflammatory pain elicited by carrageenan*. Am J Chin Med, 2004. **32**(2): p. 269-79.
121. Su, T.F., et al., *Electroacupuncture reduces the expression of proinflammatory cytokines in inflamed skin tissues through activation of cannabinoid CB2 receptors*. Eur J Pain, 2012. **16**(5): p. 624-35.
122. Taguchi, R., T. Taguchi, and H. Kitakoji, *Involvement of peripheral opioid receptors in electroacupuncture analgesia for carrageenan-induced hyperalgesia*. Brain Res, 2010. **1355**: p. 97-103.
123. da Silva, M.D., et al., *IL-10 cytokine released from M2 macrophages is crucial for analgesic and anti-inflammatory effects of acupuncture in a model of inflammatory muscle pain*. Mol Neurobiol, 2015. **51**(1): p. 19-31.
124. Hargreaves, K., et al., *A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia*. Pain, 1988. **32**(1): p. 77-88.
125. Wang, Y., et al., *Long-term antinociception by electroacupuncture is mediated via peripheral opioid receptors in free-moving rats with inflammatory hyperalgesia*. Eur J Pain, 2013.
126. Wang, Y., et al., *CXCL10 Controls Inflammatory Pain via Opioid Peptide-Containing Macrophages in Electroacupuncture*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. e94696.
127. Zimmermann, M., *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*. Pain, 1983. **16**(2): p. 109-10.
128. Marchand, F., M. Perretti, and S.B. McMahon, *Role of the immune system in chronic pain*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(7): p. 521-32.
129. Stein, C., M.J. Millan, and A. Herz, *Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds*. Pharmacol Biochem Behav, 1988. **31**(2): p. 445-51.
130. Xaus, J., et al., *IFN-gamma up-regulates the A2B adenosine receptor expression in macrophages: a mechanism of macrophage deactivation*. J Immunol, 1999. **162**(6): p. 3607-14.
131. Panicker, G., et al., *Effect of storage temperatures on the stability of cytokines in cervical mucous*. Cytokine, 2007. **37**(2): p. 176-9.
132. de Jager, W., et al., *Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays*. BMC Immunol, 2009. **10**: p. 52.
133. Keustermans, G.C.E., et al., *Cytokine assays: An assessment of the preparation and treatment of blood and tissue samples*. Methods, 2013. **61**(1): p. 10-17.
134. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
135. Wang, T. and M.J. Brown, *mRNA quantification by real time TaqMan polymerase chain reaction: validation and comparison with RNase protection*. Anal Biochem, 1999. **269**(1): p. 198-201.
136. Giulietti, A., et al., *An Overview of Real-Time Quantitative PCR: Applications to Quantify Cytokine Gene Expression*. Methods, 2001. **25**(4): p. 386-401.
137. Overbergh, L., et al., *Quantification of murine cytokine mRNAs using real time quantitative reverse transcriptase PCR*. Cytokine, 1999. **11**(4): p. 305-12.

## Literaturverzeichnis

138. Simpson, D.A., et al., *Retinal VEGF mRNA measured by SYBR green I fluorescence: A versatile approach to quantitative PCR*. Mol Vis, 2000. **6**: p. 178-83.
139. Waddell, G., *1987 Volvo award in clinical sciences. A new clinical model for the treatment of low-back pain*. Spine (Phila Pa 1976), 1987. **12**(7): p. 632-44.
140. Wall, P.D., *Neurophysiological mechanisms*. 2nd ed. Encyclopedia of Neurosciences, ed. G.S. Adelman, B. 1999, Amsterdam.
141. Dubner, R.R., Ke, *Assessing transient and persistent pain in animals*. Textbook of pain, ed. P. Wall. 1999.
142. Beecher, H.K., *The measurement of pain; prototype for the quantitative study of subjective responses*. Pharmacol Rev, 1957. **9**(1): p. 59-209.
143. Lundberg, A., *Integrative significance of patterns of connections made by muscle afferents in the spinal cord*, in *International Congress of Physiological Sciences (IUPS)*. 1959: Buenos Aires. p. 100-105.
144. Randall, L.O. and J.J. Selitto, *A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue*. Arch Int Pharmacodyn Ther, 1957. **111**(4): p. 409-19.
145. Bigelow, N., et al., *Studies on Pain: Quantitative Measurements of Two Pain Sensations of the Skin, with Reference to the Nature of the "Hyperalgesia of Peripheral Neuritis"*. J Clin Invest, 1945. **24**(4): p. 503-12.
146. Weiss, B. and V.G. Laties, *Characteristics of Aversive Thresholds Measured by a Titration Schedule*. J Exp Anal Behav, 1963. **6**: p. 563-72.
147. Dolgin, E., *Animalgesic effects*. Nat Med, 2010. **16**(11): p. 1237-40.
148. White, A.R., et al., *Clinical trials of acupuncture: consensus recommendations for optimal treatment, sham controls and blinding*. Complement Ther Med, 2001. **9**(4): p. 237-45.
149. Han, J.S., *Acupuncture analgesia: areas of consensus and controversy*. Pain, 2011. **152**(3 Suppl): p. S41-8.
150. Ezzo, J., et al., *Acupuncture for osteoarthritis of the knee: a systematic review*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(4): p. 819-25.
151. Furlan, A.D., et al., *Acupuncture and dry-needling for low back pain*. Cochrane Database Syst Rev, 2005(1): p. CD001351.
152. White, P., et al., *Practice, practitioner, or placebo? A multifactorial, mixed-methods randomized controlled trial of acupuncture*. Pain, 2012. **153**(2): p. 455-62.
153. Gaw, A.C., L.W. Chang, and L.C. Shaw, *Efficacy of acupuncture on osteoarthritic pain. A controlled, double-blind study*. N Engl J Med, 1975. **293**(8): p. 375-8.
154. Godfrey, C.M. and P. Morgan, *A controlled trial of the theory of acupuncture in musculoskeletal pain*. J Rheumatol, 1978. **5**(2): p. 121-4.
155. Dhond, R.P., N. Kettner, and V. Napadow, *Do the neural correlates of acupuncture and placebo effects differ?* Pain, 2007. **128**(1-2): p. 8-12.
156. Langevin, H.M., et al., *Paradoxes in acupuncture research: strategies for moving forward*. Evid Based Complement Alternat Med, 2011. **2011**: p. 180805.
157. Jiang, Y., et al., *Manipulation of and sustained effects on the human brain induced by different modalities of acupuncture: an fMRI study*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66815.
158. Wu, M.T., et al., *Neuronal specificity of acupuncture response: a fMRI study with electroacupuncture*. Neuroimage, 2002. **16**(4): p. 1028-37.

## Literaturverzeichnis

159. Schliessbach, J., et al., *The effect of brief electrical and manual acupuncture stimulation on mechanical experimental pain*. Pain Med, 2011. **12**(2): p. 268-75.
160. Zheng, Z., et al., *Acupuncture analgesia for temporal summation of experimental pain: a randomised controlled study*. Eur J Pain, 2010. **14**(7): p. 725-31.
161. Baeumler, P.I., et al., *Acupuncture-induced changes of pressure pain threshold are mediated by segmental inhibition-a randomized controlled trial*. Pain, 2015. **156**(11): p. 2245-55.
162. Kong, J., et al., *Psychophysical outcomes from a randomized pilot study of manual, electro, and sham acupuncture treatment on experimentally induced thermal pain*. J Pain, 2005. **6**(1): p. 55-64.
163. Unschuld, P.U., H. Tessenow, and J. Zheng, *Huang Di Nei Jing Su Wen: An Annotated Translation of Huang Di's Inner Classic - Basic Questions*. 2011: University of California Press.
164. Aoki, E., et al., *Electroacupuncture and moxibustion influence the lipopolysaccharide-induced TNF-alpha production by macrophages*. In Vivo, 2005. **19**(3): p. 495-500.
165. Cohen, I., et al., *Differential release of chromatin-bound IL-1alpha discriminates between necrotic and apoptotic cell death by the ability to induce sterile inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(6): p. 2574-9.
166. Park, M.B., et al., *Suppression of IgE production and modulation of Th1/Th2 cell response by electroacupuncture in DNP-KLH immunized mice*. J Neuroimmunol, 2004. **151**(1-2): p. 40-4.
167. Carneiro, E.R., et al., *Electroacupuncture promotes a decrease in inflammatory response associated with Th1/Th2 cytokines, nitric oxide and leukotriene B4 modulation in experimental asthma*. Cytokine, 2010. **50**(3): p. 335-40.
168. Qin, W.Y., Y. Luo, and C. Yu, *[Influence of electroacupuncture intervention on hippocampal IL-1beta content and I kappa B kinase beta expression in focal cerebral ischemia/reperfusion rats]*. Zhen Ci Yan Jiu, 2013. **38**(4): p. 271-6.
169. Bach, E.A., M. Aguet, and R.D. Schreiber, *The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 563-91.
170. Frucht, D.M., et al., *IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge*. Trends Immunol, 2001. **22**(10): p. 556-60.
171. Yamaguchi, N., et al., *Acupuncture regulates leukocyte subpopulations in human peripheral blood*. Evid Based Complement Alternat Med, 2007. **4**(4): p. 447-53.
172. Yu, Y., et al., *Role of endogenous interferon-gamma on the enhancement of splenic NK cell activity by electroacupuncture stimulation in mice*. J Neuroimmunol, 1998. **90**(2): p. 176-86.
173. Kim, C.K., et al., *Electroacupuncture up-regulates natural killer cell activity Identification of genes altering their expressions in electroacupuncture induced up-regulation of natural killer cell activity*. J Neuroimmunol, 2005. **168**(1-2): p. 144-53.
174. Choi, G.S., et al., *Modulation of natural killer cell activity affected by electroacupuncture through lateral hypothalamic area in rats*. Neurosci Lett, 2002. **329**(1): p. 1-4.

175. Cunha, F.Q., et al., *The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia*. Br J Pharmacol, 1992. **107**(3): p. 660-4.
176. Pollock, J., et al., *TNF-alpha receptors simultaneously activate Ca<sup>2+</sup> mobilisation and stress kinases in cultured sensory neurones*. Neuropharmacology, 2002. **42**(1): p. 93-106.
177. Hou, L., W. Li, and X. Wang, *Mechanism of interleukin-1 beta-induced calcitonin gene-related peptide production from dorsal root ganglion neurons of neonatal rats*. J Neurosci Res, 2003. **73**(2): p. 188-97.
178. Sachs, D., et al., *Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity*. Pain, 2002. **96**(1-2): p. 89-97.
179. Honore, P., et al., *Interleukin-1alphabeta gene-deficient mice show reduced nociceptive sensitivity in models of inflammatory and neuropathic pain but not post-operative pain*. Behav Brain Res, 2006. **167**(2): p. 355-64.
180. Lorenzetti, B.B., et al., *Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-13*. Eur Cytokine Netw, 2001. **12**(2): p. 260-7.
181. Karam, M.C., et al., *Interleukin-13 reduces hyperalgesia and the level of interleukin-1beta in BALB/c mice infected with Leishmania major with an up-regulation of interleukin-6*. J Neuroimmunol, 2011. **234**(1-2): p. 49-54.
182. Vale, M.L., et al., *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, 2003. **304**(1): p. 102-8.
183. Lee, J.Y., et al., *Analgesic effect of acupuncture is mediated via inhibition of JNK activation in astrocytes after spinal cord injury*. PLoS One, 2013. **8**(9): p. e73948.
184. Kim, J.H., et al., *Electroacupuncture preconditioning reduces cerebral ischemic injury via BDNF and SDF-1alpha in mice*. BMC Complement Altern Med, 2013. **13**: p. 22.
185. Lee, M.J., et al., *Bee Venom Acupuncture Alleviates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Upregulating Regulatory T Cells and Suppressing Th1 and Th17 Responses*. Mol Neurobiol, 2015.
186. Lee, J.A., et al., *Acupuncture accelerates wound healing in burn-injured mice*. Burns, 2011. **37**(1): p. 117-25.
187. Wang, X.R., H. Lin, and Z.H. Wang, *Protective effects of electroacupuncture and Salviae Miltiorrhizae on myocardial ischemia/reperfusion in rabbits*. Acupunct Electrother Res, 2003. **28**(3-4): p. 175-82.
188. Taub, D.D., et al., *Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 1995. **155**(8): p. 3877-88.
189. Taub, D.D., et al., *Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells*. J Exp Med, 1993. **177**(6): p. 1809-14.
190. Loetscher, M., et al., *Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes*. The Journal of Experimental Medicine, 1996. **184**(3): p. 963-969.
191. Rotondi, M., et al., *Role for interferon-gamma inducible chemokines in endocrine autoimmunity: an expanding field*. J Endocrinol Invest, 2003. **26**(2): p. 177-80.
192. Lasch, S., et al., *Anti-CD3/Anti-CXCL10 Antibody Combination Therapy Induces a Persistent Remission of Type 1 Diabetes in Two Mouse Models*. Diabetes, 2015. **64**(12): p. 4198-211.

193. Moura, A.S., et al., *Soluble inflammatory markers as predictors of hepatocellular damage and therapeutic response in chronic hepatitis C*. Braz J Infect Dis, 2009. **13**(5): p. 375-82.
194. Ruhwald, M., M.G. Aabye, and P. Ravn, *IP-10 release assays in the diagnosis of tuberculosis infection: current status and future directions*. Expert Rev Mol Diagn, 2012. **12**(2): p. 175-87.
195. Bakmiwewa, S.M., et al., *Synergistic induction of CXCL10 by interferon-gamma and lymphotoxin-alpha in astrocytes: Possible role in cerebral malaria*. Cytokine, 2016. **78**: p. 79-86.
196. Kieseier, B.C., et al., *Chemokines and chemokine receptors in inflammatory demyelinating neuropathies: a central role for IP-10*. Brain, 2002. **125**(Pt 4): p. 823-34.
197. Luster, A.D., J.C. Unkeless, and J.V. Ravetch, *Gamma-interferon transcriptionally regulates an early-response gene containing homology to platelet proteins*. Nature, 1985. **315**(6021): p. 672-6.
198. Fredholm, B.B., et al., *International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors*. Pharmacol Rev, 2001. **53**(4): p. 527-52.
199. Ryzhov, S., et al., *Effect of A2B adenosine receptor gene ablation on proinflammatory adenosine signaling in mast cells*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7212-20.
200. Yang, D., et al., *The A2B adenosine receptor protects against inflammation and excessive vascular adhesion*. J Clin Invest, 2006. **116**(7): p. 1913-23.
201. Kong, T., et al., *HIF-dependent induction of adenosine A2B receptor in hypoxia*. FASEB J, 2006. **20**(13): p. 2242-50.
202. Kreckler, L.M., et al., *Adenosine inhibits tumor necrosis factor-alpha release from mouse peritoneal macrophages via A2A and A2B but not the A3 adenosine receptor*. J Pharmacol Exp Ther, 2006. **317**(1): p. 172-80.
203. Gessi, S., et al., *Adenosine modulates HIF-1{alpha}, VEGF, IL-8, and foam cell formation in a human model of hypoxic foam cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(1): p. 90-7.
204. Csoka, B., et al., *Adenosine promotes alternative macrophage activation via A2A and A2B receptors*. FASEB J, 2012. **26**(1): p. 376-86.
205. Ruiz-Garcia, A., et al., *Cooperation of adenosine with macrophage Toll-4 receptor agonists leads to increased glycolytic flux through the enhanced expression of PFKFB3 gene*. J Biol Chem, 2011. **286**(22): p. 19247-58.
206. Sun, Y., et al., *A novel mechanism of control of NFkappaB activation and inflammation involving A2B adenosine receptors*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 19): p. 4507-17.
207. Chen, H., et al., *Activation of the macrophage A2b adenosine receptor regulates tumor necrosis factor-alpha levels following vascular injury*. Exp Hematol, 2009. **37**(5): p. 533-8.
208. Belikoff, B.G., et al., *A2B adenosine receptor blockade enhances macrophage-mediated bacterial phagocytosis and improves polymicrobial sepsis survival in mice*. J Immunol, 2011. **186**(4): p. 2444-53.
209. Rogachev, B., et al., *Adenosine is upregulated during peritonitis and is involved in downregulation of inflammation*. Kidney Int, 2006. **70**(4): p. 675-81.
210. Bilkei-Gorzo, A., et al., *Adenosine receptor subtype-selective antagonists in inflammation and hyperalgesia*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2008. **377**(1): p. 65-76.

## Literaturverzeichnis

211. Abo-Salem, O.M., et al., *Antinociceptive effects of novel A2B adenosine receptor antagonists*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(1): p. 358-66.
212. Savegnago, L., C.R. Jesse, and C.W. Nogueira, *Caffeine and a selective adenosine A(2B) receptor antagonist but not imidazoline receptor antagonists modulate antinociception induced by diphenyl diselenide in mice*. Neurosci Lett, 2008. **436**(2): p. 120-3.
213. König, G., *Ist Akupunktur Naturwissenschaft?*, ed. W. Auerswald. 1982, Wien, München, Bern Maudrich.

## 9 Danksagung

---

Zum Gelingen dieser Promotion haben viele Menschen beigetragen, denen ich gerne meinen Dank aussprechen möchte.

Ich danke meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Heike Rittner für die Überlassung des Promotionsthemas und die Eröffnung der Möglichkeit an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie der Universität Würzburg meine Dissertation durchführen zu dürfen. Darüber hinaus danke ich ihr für ihre außergewöhnliche und zuverlässige Betreuung und Förderung.

Ein sehr großer Dank geht an Ying Wang, ohne deren aufwendige Vorarbeiten, methodische Einführung und praktische Unterstützung durch Rat und Tat diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Danken möchte ich auch meiner Arbeitsgruppe für die kritischen, konstruktiven Rückfragen und hilfreichen Vorschläge. Danke Kirsten Langenbrink und Anja Neuhoff für die Unterstützung bei technischen und methodischen Fragen.

Ich danke meinen Eltern, die mir durch ihre bedingungslose ideelle und finanzielle Unterstützung das Medizinstudium und das Arbeiten an dieser Promotion ermöglicht haben. Ebenso danke ich dem Cusanuswerk für die wertvolle Begleitung durch mein Studium und die Ermunterung zu wissenschaftlicher Tätigkeit. Ich danke meinem Mann für sein Dasein, sein Vertrauen und seine motivierenden Worte.

## 10 Lebenslauf

---

### Rebekka Gehringer

#### Ausbildung

---

- Seit 02/2016 **Ärztin in Weiterbildung**  
Strukturierte Weiterbildung Allgemeinmedizin am Universitätsklinikum Jena
- Dezember 2015 **Approbation als Ärztin**
- 2008 - 2015 **Medizinstudium, Universität Würzburg**
- Seit 2013 Dissertation: "Periphere Mechanismen von Elektroakupunktur bei Entzündungsschmerz in Ratten", Prof. Dr. med. H.L. Rittner  
Vorstellung der Ergebnisse auf dem Deutschen Schmerzkongress 2013  
Veröffentlichung: Wang Y, Gehringer R et al. PLoS One 2014
- Dezember 2015 Ärztliche Prüfung
- August 2010 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- 1999-2007 **Christophorusgymnasium CJD, Droyßig**  
Schule in freier Trägerschaft, „Club of Rome“ Schule,  
Abitur

#### Stipendien

---

- 2011-2015 Stipendiatin des Cusanuswerks, Bischöfliche Studienförderung

Jena, April 2016