

**Untersuchung des Einflusses von immunmodulatorischen
Zytokinen auf die thermische und mechanische Hyperalgesie
während einer Entzündung an der Pfote der Maus**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diana Kümmel

geboren am 06.09.1985 in Eisenach

Gutachter

1. Prof. Dr. Hans-Georg Schaible, Jena
2. Prof. Dr. Ralf Bräuer, Jena
3. PD Dr. Michael Böttger, Wuppertal

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.01.2013

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Afferente Mechanismen der Nozizeption.....	5
2.1.1	Nozizeptoren und Schmerzentstehung.....	5
2.1.2	Periphere Sensibilisierung.....	6
2.2	Nozizeption und Schmerz bei Störungen immunologischer Mechanismen.....	7
2.2.1	IFN γ (Interferon-gamma).....	9
2.2.2	IL-17 (Interleukin 17)	11
2.2.3	IL-23 (p19), IL-12 (p35)	13
2.2.4	TIM-3	16
2.3	Das Benzodiazepin Midazolam in seiner Rolle als GABA $_A$ -Agonist.....	17
2.4	Entzündungsmodell	18
2.5	Zielstellung	18
3	Material und Methoden	20
3.1	Versuchstiere	20
3.2	Entzündungsmodell	21
3.3	Schmerzassoziertes Verhalten unter nicht-entzündlichen Bedingungen	22
3.3.1	Nozizeption u. Schmerzentstehung bei Störungen immunologischer Mechanismen	22
3.4	Bedeutung von Interferon-gamma für Entzündungsschmerz.....	22
3.4.1	Abhängigkeit des schmerzassozierten Verhaltens von der IFN γ -Konzentration.....	22
3.4.2	Untersuchung der systemischen GABA-Wirkung in Abhängigkeit von IFN γ	24
3.5	Abhängigkeit des schmerzassozierten Verhaltens von der Zymosankonzentration	25
3.6	Applikation der zu untersuchenden Substanzen.....	25
3.6.1	Verwendete Substanzen	25
3.6.2	Applikationsformen.....	26
3.7	Pfotenschwellung	26
3.8	Testung des Schmerzassozierten Verhaltens	26
3.8.1	Messung der mechanischen Hyperalgesie	26
3.8.2	Messung der thermischen Hyperalgesie	27

3.9	Gewebeentnahme	28
3.10	Aufarbeitung der plantaren Pfotenhaut	28
3.11	Histologische Bewertung	29
3.12	Statistische Analyse.....	29
4	Ergebnisse	30
4.1	IFN γ ^{-/-} -Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen	30
4.1.1	Schwere der Entzündung.....	30
4.1.2	Schmerzassoziierte Verhaltenstests	31
4.2	Wirkung von IFN γ und anti- IFN γ unabhängig von einer Entzündung.....	34
4.2.1	Schwere der Entzündung.....	34
4.2.2	Schmerzassoziiertes Verhalten.....	35
4.3	Abhängigkeit des schmerzassoziierten Verhaltens vom Vorhandensein von IFN γ	37
4.3.1	Applikation von IFN γ	37
4.3.2	Applikation von anti-IFN γ	40
4.4	Abhängigkeit des schmerzassoziierten Verhaltens von der Zymosankonzentration	44
4.4.1	Applikation von IFN γ	44
4.4.2	Applikation von anti-IFN γ bei Wildtypmäusen.....	47
4.5	Untersuchung der systemischen Midazolam-Wirkung in Abhängigkeit von der IFN γ -Applikation	50
4.5.1	Schwere der Entzündung.....	51
4.5.2	Schmerzassoziiertes Verhalten.....	52
4.6	Effekte weiterer Zytokine und Zytokinmodulatoren auf den Entzündungsschmerz.....	54
4.6.1	p19-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen.....	54
4.6.2	p35-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen.....	56
4.6.3	p35p19-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen.....	58
4.6.4	IL-17p35-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen.....	61
4.6.5	IL-17-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen.....	63
4.6.6	TIM-3 KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen.....	66
5	Diskussion	68
5.1	Entzündungsmodell	69
5.2	Wahl einer geeigneten Zymosankonzentration	70

5.3	Einfluss von IFN γ auf das schmerzassoziierte Verhalten	71
5.4	Vergleich der Interferon-Behandlungsgruppen hinsichtlich des schmerzassoziierten Verhaltens	74
5.5	Einfluss des Benzodiazepins Midazolam (GABA $_A$ -Rezeptor-Agonist) auf das schmerzassoziierte Verhalten	76
5.6	Einfluss von p35 (IL-12) auf das schmerzassoziierte Verhalten und den Entzündungsprozess	78
5.7	Einfluss von p19 (IL-23) auf das schmerzassoziierte Verhalten und den Entzündungsprozess	79
5.8	Einfluss von IL-17 auf das schmerzassoziierte Verhalten und den Entzündungsprozess	80
5.9	Einfluss von TIM-3 auf das schmerzassoziierte Verhalten und den Entzündungsprozess	81
5.10	Veränderung des schmerzassoziierten Verhaltens der kontralateralen Pfote.....	82
5.11	Übertragbarkeit und Nutzen des Modells.....	83
5.12	Schlussfolgerung	85
6	Literaturverzeichnis.....	87
7	Anhang	I
7.1	Danksagung.....	I
7.2	Lebenslauf	III
7.3	Eigene Veröffentlichung	IV
7.4	Ehrenwörtliche Erklärung	V

Abkürzungsverzeichnis

AMPA	A-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	Analysis of Variance
CD-T-Zelle	Cluster of differentiation-T-Zelle
CGRP	Calcitonin Gene-related Peptide
DPA	Dynamic plantar aesthesiometer
EAE	Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
G-CSF	Granulocyte Colony-stimulating Factor
GluR1	Glutamat-Rezeptor 1
IASP	International Association for the Study of Pain
IFN	Interferon
IL	Interleukin
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
KO	Knock-out
MHC	Major Histocompatibility Complex
NF-κB	Nuclear Factor-kappa B
NGF	Nerve Growth Factor
NKA	Neurokinin A
NKCC1	Natrium-Kalium-Chloride-Cotransporter 1
NMDA	N-methyl-D-Aspartat
o.B.	ohne Behandlung
PBS	Phosphate Buffered Saline
SEM	Standard error of mean (Standardfehler)
SP	Substanz P
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TIM	T-cell immunoglobulin- und mucin-domain-containing-molecules
TLR	Toll-like Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor

TRPV ₁ -Rezeptor	Transient-receptor-potential Vanilloid ₁ -Rezeptor
TTX	Tetrodotoxin
VT	Vortestung
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

chemische Größen

CH ₂ O	Formaldehyd
C ₂ H ₄ O ₂	Essigsäure
C ₈ H ₁₀	Xylol
H ₂ O	Aqua dest.
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
C ₂ H ₆ O	Ethanol
C ₃ H ₆ O	Aceton

1 Zusammenfassung

Ein häufiges klinisches und volkswirtschaftliches Problem der modernen Gesellschaft ist der Entzündungsschmerz, welcher uns in unserer Leistungsfähigkeit und unserem Wohlbefinden beeinträchtigt. Obwohl es potente analgetische Substanzen gibt, sind noch immer viele Patienten nur unzureichend behandelt bzw. werden sie erheblichen Nebenwirkungen der Therapie ausgesetzt. Pro-inflammatorische Zytokine können eine Entzündung auslösen, sie aufrecht erhalten oder Nervenendigungen sensibilisieren, was zum Schmerzempfinden beiträgt oder selbst Schmerz auslöst. Dies war der Anlass für uns, anhand eines Entzündungsmodells mit Knockout-Mäusen für Zytokine und andere immunologische Faktoren Verhaltenstests durchzuführen und die mechanischen und thermischen Schmerzschwellen zu bestimmen. Dafür verwendeten wir ein stumpfes Filament mit ansteigendem Druck (von-Frey-Haar), bzw. konstante Laser-Reize, die Hitzeempfindungen auslösten. Wegzugsbewegungen wurden als Korrelate für schmerzassoziiertes Verhalten ausgewertet, wobei der Parameter Druck für die Veränderung der mechanischen Schwelle und der Parameter Latenz für die Veränderung der thermischen Schwelle analysiert wurden. Das Ausmaß der Entzündung, welche mittels Zymosaninjektion in die linke Hinterpfote induziert wurde, wurde anhand der Pfortenschwellung bestimmt. Nach Auslösen der Entzündung durch Zymosaninjektion bildeten sich die typischen Symptome der Entzündung, Rötung, Schwellung, Funktionseinschränkung und Überwärmung aus. Die rechte Hinterpfote blieb als Referenzpfote unberührt.

Die hier untersuchten Zytokine oder Zytokinbestandteile sind Teil der T_{H1} - bzw. T_{H17} -Signalwege und somit von Bedeutung für Entzündungsprozesse. Im Einzelnen wurden $IFN\gamma$, IL-17, p35 (IL-12), p19 (IL-23) und TIM-3 untersucht. Dabei wurde sowohl die Wirkung auf Wildtypmäuse getestet, als auch geprüft, ob die Ausschaltung einzelner dieser Zytokine entzündungsassoziiertes Verhalten beeinflussen kann.

Die Ausschaltung von $IFN\gamma$ reduzierte die mechanische und thermische Hyperalgesie nach einer vorherigen Entzündungsinduktion. Bei diesen Tieren konnte durch eine lokale $IFN\gamma$ -Substitution in die entzündete Pfote eine Zunahme der mechanischen und thermischen Hyperalgesie bewirkt werden.

Dagegen brachte eine intraperitoneale, systemische Substitution von IFN γ weniger ausgeprägte Effekte, wenngleich auch hier eine Zunahme der Hyperalgesie beobachtet werden konnte. Wurde IFN γ durch Antikörper neutralisiert, so beobachteten wir eine Abschwächung der Entzündung und eine geringer ausgeprägte mechanische und thermische Hyperalgesie, sofern die Entzündung stark genug war (höhere Zymosandosis).

Die Proteine p19 und p35 sind weniger an der Entzündungsausprägung als an der Entstehung von Hyperalgesie beteiligt. Nach Ausschaltung von p19 konnte eine Abschwächung der mechanischen Hyperalgesie gesehen werden, die thermische Hyperalgesie blieb unbeeinflusst. Die Ausschaltung von p35 erbrachte ähnliche Effekte, jedoch war die Abschwächung der mechanischen Hyperalgesie noch geringer. Das Ausschalten von IL-17 führte zu einer deutlichen Abschwächung der Entzündungsausprägung sowie einer schwächeren mechanischen und thermischen Hyperalgesie. Die Ausschaltung des Proteins TIM-3 verstärkte die mechanische Hyperalgesie, schwächte dagegen die thermische Hyperalgesie ab, was auf die Beeinflussung verschiedener Signalwege hindeutet.

Insgesamt zeigt die vorgelegte Studie, dass sowohl IFN γ als auch IL-17 neben ihrem Beitrag zur Entzündungsausprägung auch wesentlichen Anteil an der Entstehung mechanischer und thermischer Hyperalgesie haben.

2 Einleitung

Zahlreiche Erkrankungen gehen mit einer Stimulation des Immunsystems einher bzw. sind mit gestörten Immunfunktionen assoziiert. Gleichzeitig sind solche Erkrankungen oftmals schmerzhaft. Gerade akute Schmerzen auf Grund einer peripheren Entzündung sind häufige Gründe für die Arztkonsultation, da sie den Patienten belasten (Thomas et al., 2004).

Entzündungen zeichnen sich durch die Kardinalsymptome Rötung, Überwärmung, Schwellung, Schmerz und Funktionsverlust aus. Diese komplexen Vorgänge werden besonders durch das enge Zusammenwirken zwischen dem Immunsystem, dem Gefäßsystem und dem Nervensystem hervorgerufen. Das Immunsystem schützt den Körper vor der Einwirkung pathogener Noxen, wie z.B. Bakterien und Viren und bekämpft eingetretene Infektionen. Ihm obliegt weiterhin die Funktion, geschädigte Zellen abzuräumen, sowie zur Regeneration des geschädigten Gewebes beizutragen. Über endotheliale Prozesse kann das Gefäßsystem zur Extravasation benötigter Plasmaproteine beitragen oder durch die Expression von Adhäsionsmolekülen eine Zellinfiltration mit steuern. Zum Beispiel werden durch Chemokine Leukozyten aus der Blutbahn in das betroffene Areal gelockt; sowohl die Angiogenese wird gefördert, als auch die Immunantwort moduliert. Zum Teil entsteht zusätzlich Fieber (Verri Jr. et al., 2007, Kress, 1996).

Wie oben beschrieben, gehen entzündliche Erkrankungen häufig mit Schmerzen einher. Die International Association for the Study of Pain definiert Schmerz folgendermaßen: „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.“ (Merskey and Bogduk, 1994)

Der Schmerzempfindung liegt die Aktivierung des nozizeptiven Systems zugrunde. Es hat die Aufgabe, vor Schädigung zu warnen und die Körperintegrität zu bewahren. Bisher ist nicht gänzlich geklärt, in wieweit es auch regulierend in Entzündungen eingreifen kann.

Wird das Gewebe durch eine Entzündung oder Verletzung geschädigt, entsteht der pathophysiologische Nozizeptorschmerz. Diese Form des Schmerzes spielt für diese Arbeit eine übergeordnete Rolle, da hierbei typischerweise eine Hyperalgesie entsteht, d.h. eine erhöhte Schmerzempfindlichkeit im betroffenen, aber auch teilweise im umgebenden Gewebe. Sie wird durch die Mechanismen der peripheren und zentralen Sensibilisierung des nozizeptiven Systems erzeugt, wobei über zahlreiche molekulare Vorgänge Nervenzellen sensibilisiert werden.

Entsprechend dem aktuellen Forschungsstand unterscheidet man zwei weitere Schmerztypen nach ätiopathogenetischen Gesichtspunkten (Schaible and Richter, 2004, Sommer and Kress, 2004, Willis and Coggeshall, 2004). Wirken noxische Reize auf gesundes Gewebe ein, entsteht Schmerz, der als physiologischer Nozizeptorschmerz bezeichnet wird. Diesem akuten Schmerz kommt eine wichtige Warnfunktion zu und er ist meist auf die Region der Schädigung begrenzt (Reuter, 2004). Sobald die Gefahr droht, dass das Gewebe Schaden nimmt, wird dieser Schmerz ausgelöst und es erfolgt z.B. ein Wegziehreflex, um sich von der Quelle der Noxe zu entfernen.

Werden die Nervenfasern selbst geschädigt, spricht man von neuropathischen Schmerzen. Diese Schmerzform entsteht z.B. bei Bandscheibenvorfällen oder verschiedenen Stoffwechselerkrankungen und wird teilweise durch Entzündungsschmerz-unabhängige Mechanismen bedingt. Der ektopen Erregungsbildung kommt dabei große Bedeutung zu, da beispielsweise an der geschädigten Stelle Aktionspotenziale entstehen. Durch eine Schädigung der Nervenfasern hebt sich einerseits häufig die normale Funktion der Nozizeptoren auf und andererseits ist das vom geschädigten Nerven innervierte Gebiet schmerzhaft.

2.1 Afferente Mechanismen der Nozizeption

2.1.1 Nozizeptoren und Schmerzentstehung

Anfang des 20. Jahrhunderts wurde der Begriff Nozizeption durch Sir Charles Sherrington geprägt, welcher sich von dem lateinischen Wort „nocere“ ableitet, was so viel bedeutet wie schädigen (Sherrington, 1903). Nozizeptoren sind freie Nervenfasern mit geringem Durchmesser, die dünn myelinisiert (A δ -Fasern) oder nicht myelinisiert (C-Fasern) sind. Die nozizeptiven Afferenzen zählen zu den langsam leitenden Nervenfasern (Schaible and Grubb, 1993). Noxische Reize aktivieren diese freien sensorischen Nervenendigungen „polymodal“, das heißt, sie können mechanisch, chemisch oder thermisch erregt werden (Messlinger, 1997). Nozizeptoren sind hochschwellig und sprechen normalerweise erst auf starke mechanische und thermische Reize an (Zimmermann, 2004). Zusätzlich können sogenannte „stille Nozizeptoren“ durch Gewebeschädigung bzw. Entzündung rekrutiert werden (Grigg et al., 1986, Schaible and Grubb, 1993). Das sind C-Fasern, die in gesundem Gewebe auch nicht durch starke Hitze oder Druck erregt werden können.

Ist der noxische Reiz ausreichend stark, wird dieser in Aktionspotenzialen kodiert, diese werden über das Axon zu sensorischen nozizeptiven Hinterhornneuronen der grauen Substanz in das Rückenmark oder in den Hirnstamm weitergeleitet (Schaible and Richter, 2004, Willis and Coggeshall, 2004). Bestimmt wird die Erregungsschwelle der Rückenmarksneurone vom afferenten Eingang, von intrinsischen Eigenschaften der Zellen und von deszendierenden Bahnen (Schaible, 2007). Eine Vielzahl nozizeptiver Zellen sind sog. „Wide-dynamic-range-Neurone“. Sie antworten mit geringer Entladungsfrequenz auf nicht-noxische Reize, da sie nicht nur afferenten Eingang von Nozizeptoren erhalten, sondern auch von niederschweligen Mechanorezeptoren. Bei noxischen Reizen zeigen diese Zellen stärkere Antworten. Im Rückenmark gibt es außerdem Neurone, die spezifisch nur auf noxische Reize antworten (Willis and Coggeshall, 2004).

Eine Großzahl der Hinterhornzellen ist in vegetative und motorische Reflexbögen eingebunden, welche die Grundlage für nozizeptive Reflexe, hervorgerufen durch noxische Reize, bilden. Vom Rückenmark wird die Information über den Tractus spinothalamicus zum lateralen und medialen thalamokortikalen System aufsteigend weitergeleitet (Treede et al., 1999, Vogt, 2005). Im lateralen System, bestehend aus Relais-Kernen des lateralen Thalamus und den Areae S1 und S2 des Kortex, wird der noxische Reiz hinsichtlich Lokalisation, Intensität und Dauer analysiert. Dagegen erzeugt das mediale System bestehend aus Relais-Kernen des zentralen und medialen Thalamus, dem anterioren Gyrus cinguli, der Insula und dem präfrontalen Kortex, vorrangig die affektive Schmerzkomponente. Durch letztere entwickeln sich vorrangig die aversiven Reaktionen im Rahmen schmerzhafter Reize (Schaible and Richter, 2004, Treede et al., 1999).

Absteigende Bahnen fördern oder schwächen den nozizeptiven Prozess auf spinaler Ebene ab. Es handelt sich dabei um ein nozizeptionsförderndes- oder hemmendes System bestehend aus Bahnen, die dem Hirnstamm, insbesondere dem periaquaeduktalen Grau und dem Nucleus raphe magnus, entspringen und im dorsolateralen Funiculus des Rückenmarks absteigen (Millan, 2002). Durch diese Bahnen und durch zahlreiche inhibitorische Neurone kann eine endogene Kontrolle über die nozizeptive Verarbeitung gewährleistet werden.

2.1.2 Periphere Sensibilisierung

Wird ein unversehrter Körper einem noxischen Reiz ausgesetzt, so wird das nozizeptive System erregt und löst dadurch Schmerz aus. Endet der auf gesundes Gewebe schädigend einwirkende Reiz, endet auch die Erregung der Nozizeptoren bei akut wahrgenommenem Schmerz (Zimmermann, 2004). Ist das Gewebe allerdings entzündet oder bereits geschädigt, reagiert das nozizeptive System empfindlicher, man spricht von Sensibilisierung. Dabei wird es durch normalerweise nicht schmerzhaft Reize aktiviert (Allodynie) und zeigt verstärkte Aktivität bei überschwelliger noxischer Reizung. Daneben wird ein noxischer Reiz schmerzintensiver wahrgenommen, als in gesundem Zustand (sog. Hyperalgesie), wie es auch für das in dieser Arbeit verwendete Versuchsmodell angenommen werden soll.

Nozizeptoren können z. B. durch Entzündungsprozesse sensibilisiert werden (Bennett, 2000). Bei einer peripheren Sensibilisierung beobachtet man Spontanentladungen, die zumindest teilweise Ursache für anhaltende Schmerzen sind. Dabei wird die Erregungsschwelle herabgesetzt. Das Ergebnis ist eine Linksverschiebung der Reiz-Antwort-Kurve, welche bei kurzeinwirkenden Schmerzreizen unter Normalbedingungen nicht auftritt. Dieses Phänomen ist auf die gesteigerte Erregbarkeit peripherer Nozizeptoren zurückzuführen (Campbell and Meyer, 1983, Perl et al., 1976). Dieser Zustand wird durch eine verstärkte Kodierung noxischer Stimuli in depolarisierende Aktionspotentiale erreicht, die auf einer gesteigerten Aktivität der beteiligten Ionenkanäle wie Protonen-gesteuerte Kanäle, schmerzspezifische Natriumkanäle oder Capsaicin-Rezeptoren und anderen beruht (McCleskey and Gold, 1999). Unter Entzündungsbedingungen werden auch initial mechanoinsensitive (stumme) Nozizeptoren rekrutiert und verstärken den nozizeptiven Input in das zentrale Nervensystem (ZNS) beträchtlich (Schaible, 2006). Zusammenfassend führt die periphere Sensibilisierung zu einem veränderten afferenten Eingang in das Rückenmark; dies bewirkt eine räumliche und zeitliche Bahnung an den zentralen Synapsen, was oft als zentrale Sensibilisierung bezeichnet wird.

2.2 Nozizeption und Schmerz bei Störungen immunologischer

Mechanismen

Im Bereich des Entzündungsschmerzes ist bekannt, dass Entzündungs-Botenstoffe, die eine vielfältige Rolle im Rahmen der Immunantwort und damit in der Abwehr von Infektionen oder des Abbaus von Fremdkörpern spielen, auch potente Substanzen zur Sensibilisierung von Schmerzfasern sind (Schaible and Richter, 2004). Bei einer Entzündung werden diese Botenstoffe ausgeschüttet. Des weiteren kommt es über verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel die Hoch- oder Herunterregulation verschiedener Ionenkanäle, zu vermehrter Aktivität der Nozizeptoren und damit zu Schmerzen, die sich als Spontanschmerz oder als bewegungsinduzierter Schmerz äußern können (Boettger et al., 2008, Brenn et al., 2007, Hensellek et al., 2007).

Es ist noch nicht lange bekannt, dass neben Botenstoffen wie Bradykinin und Prostaglandinen auch Zytokine Nervenfasern entsprechend sensibilisieren können, auch ohne dass eine Nervenschädigung vorliegt (Boettger et al., 2008, Brenn et al., 2007).

Ursprünglich wurden Zytokine eher im Zusammenhang mit neuropathischen Schmerzen untersucht. Erst in den letzten Jahren wurden in der Schmerzforschung die Zytokine als eine Gruppe relevanter Entzündungsmediatoren beachtet. Zytokine sind Glykoproteine mit einer Größe von ca. 150-300 Aminosäuren (Molekulargewicht ca. 25 kDa). Sie werden von am Entzündungsgeschehen beteiligten Zellen, insbesondere von Leukozyten, aber auch von Endothel- und Nervenzellen, gebildet und können lokale (autokrine und parakrine) und systemische (endokrine) Veränderungen bewirken. Beispielsweise ist die „sickness response“, die im Rahmen einer Entzündung auftritt, unter anderem auf IL-1 zurückzuführen.

Zytokine werden von fast allen kernhaltigen Körperzellen sezerniert und besitzen zahlreiche regulatorische Funktionen. Für den Entzündungsprozess sind vor allem Zytokine von Bedeutung, die in Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen gebildet und freigesetzt werden. Man unterscheidet zwischen pro-inflammatorischen Zytokinen, die eine Entzündung fördern, wie z.B. IL-1 β , IL-6 und IFN γ und anti-inflammatorisch wirkenden, wie IL-4, IL-10 und IL-13 (Sommer and Kress, 2004). Wiederum andere können beide Effekte bewirken. Viele Zytokine sind pleiotrop, d.h. sie beeinflussen eine Vielzahl von Zellen und Geweben. Viele Zytokine werden transient gebildet und üben ihre Wirkung über eine kurze Distanz aus.

Zahlreiche Funktionen der Zytokine wurden mittels Studien, die die lokale oder systemische Entzündungsreaktion untersucht haben, gewonnen. So konnte gezeigt werden, dass Nozizeptoren Rezeptoren für einige Zytokine exprimieren. Dadurch können Zytokine Nozizeptoren direkt oder aber über sekundäre Mediatoren wie Prostanoiden sensibilisieren (Verri Jr. et al., 2007). Beispielsweise führt die Anwesenheit von IL-6 oder TNF- α nicht nur zu entzündungsfördernden Effekten, sondern auch direkt zu vermehrter neuronaler Aktivität, sodass ein neuronaler Mechanismus dafür mitverantwortlich gemacht wird (Boettger et al., 2008, Brenn et al., 2007).

Studien, bei denen Ratten Zytokine injiziert bekamen, lieferten Hinweise darauf, dass diese Mediatoren eine Hyperalgesie hervorrufen können. So wurde gezeigt, dass die mechanische Schmerzschwelle durch intraplantare Applikation von IL-1 β und TNF- α reduziert werden konnte (Cunha et al., 1992, Ferreira et al., 1988). Zudem konnte in Carrageenan-Entzündungsmodellen die Hyperalgesie durch Zytokin-Antagonisten reduziert werden, was darauf hinweist, dass die Zytokin-Aktivierung einen wichtigen Schritt bei der Etablierung des Entzündungsschmerzes darstellt (Poole et al., 1999).

2.2.1 IFN γ (Interferon-gamma)

Ein in der Schmerzforschung bislang wenig untersuchtes Zytokin ist IFN γ (Interferon-gamma), welches vorrangig von T-Helfer-Zellen (T_{H1}-Zellen) und natürlichen Killerzellen freigesetzt wird und somit im Entzündungsprozess eine wichtige Rolle spielt (Schreiber and Farrar, 1993).

IFN γ ist ein auf das Immunsystem stimulierend wirkender Botenstoff, der besonders die Aktivität der Makrophagen steigert. Das äußert sich in der Hochregulation der MHC-Moleküle Klasse I und II und der damit verbundenen besseren Präsentation antigener Peptide (Hof and Dörris, 2005, Farrar and Schreiber, 1993). IFN γ nimmt nicht nur regulierenden und aktivierenden Einfluss auf die Differenzierung und Funktion monoklonaler Phagozyten, sondern beeinflusst auch indirekt die B-Zellen durch Regulation der Bildung von CD4⁺-T-Zell-Untereinheiten. Es wirkt stark antiproliferativ auf T_{H2}-Zellen durch IL-10-Eliminierung, jedoch fördernd auf die T_{H1}-Zellproliferation (siehe Abb. 2.1) (Farrar and Schreiber, 1993). In einem Tiermodell wurde IFN γ in Mäusen neutralisiert, die anschließend mit subletalen Mengen verschiedener mikrobieller Pathogene infiziert wurden. Durch das fehlende IFN γ waren die Tiere nicht mehr in der Lage, Makrophagen zu aktivieren und verstarben (Farrar and Schreiber, 1993). IFN γ stimuliert weiterhin über Prostaglandin E₂ die IL-12-Freisetzung aus Dendritischen Zellen bei Gewebeentzündung (Bach et al., 1997).

Da IL-12 durch Makrophagen und Dendritische Zellen gebildet wird und IFN γ in Natürlichen Killerzellen und CD8⁺-T-Zellen vorkommt, dominiert in der frühen Abwehr von Viren und einigen intrazellulären Bakterien die T_{H1}-Zell-Reaktion.

Weiterhin wird $\text{IFN}\gamma$ für die Induktion von Autoimmunreaktionen verantwortlich gemacht (Irmeler et al., 2007).

Wenn man die Literatur zu den verschiedenen Zytokinsignalwegen zusammenfasst, scheint ein Hauptweg von den Dendritischen Zellen ausgehend, über die Freisetzung von IL-12 bis zur Aktivierung von Natürlichen Killerzellen und $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen zu führen. Die letzteren Zellen produzieren das $\text{IFN}\gamma$. $\text{IFN}\gamma$ hemmt sowohl $\text{T}_{\text{H}17}$ -Zellen, wie auch $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen. Gleichzeitig kann es über eine positive Rückkopplung Dendritische Zellen aktivieren. Zusätzlich können $\text{T}_{\text{H}17}$ -Zellen, die IL-17 freisetzen, über IL-23 aktiviert werden. Die $\text{T}_{\text{H}2}$ -Zellen wiederum werden von IL-4 aktiviert. Das TIM-3 kann $\text{T}_{\text{H}1}$ -Zellen hemmen.

Des Weiteren ist $\text{IFN}\gamma$ gemeinsam mit $\text{TNF-}\alpha$ erforderlich, zirkulierenden Lymphozyten zu ermöglichen, an vaskuläres Endothel zu binden und dieses zu penetrieren, um zum Ort der Entzündung migrieren zu können (Farrar and Schreiber, 1993).

Aus diesem selbstentwickelten Flussschema wird deutlich, dass sich $\text{IFN}\gamma$ und IL-17 wechselseitig hemmen können und wahrscheinlich in den verschiedenen Phasen der Entzündungen (akute / chronische Phase) unterschiedliche Funktionen wahrnehmen (Irmeler et al., 2007).

Auch im Nervensystem scheint $\text{IFN}\gamma$ eine Rolle zu spielen. So ist bekannt, dass $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptoren im Hinterhorn des Rückenmarks exprimiert werden (Vikman et al., 1998) und dass deren Aktivierung durch $\text{IFN}\gamma$ das Antwortverhalten der entsprechenden Neurone ändert. *In vitro* konnten Hinterhornneurone durch $\text{IFN}\gamma$ übererregt werden. Dies führte zu der Vermutung, dass $\text{IFN}\gamma$ Einfluss auf die zentrale Sensibilisierung nimmt (Vikman et al., 2003). Mittels prolongierter intrathekaler Applikation von $\text{IFN}\gamma$ konnte die inhibierende Wirkung von GABA aufgehoben bzw. sogar umgekehrt werden (Vikman et al., 2007).

Unter physiologischen Bedingungen stellt die GABAerge Inhibition einen wichtigen Mechanismus der endogenen Schmerzreduktion dar. Midazolam kann als GABA-Agonist dessen Wirkungen fördernd beeinflussen.

ENTZÜNDUNG

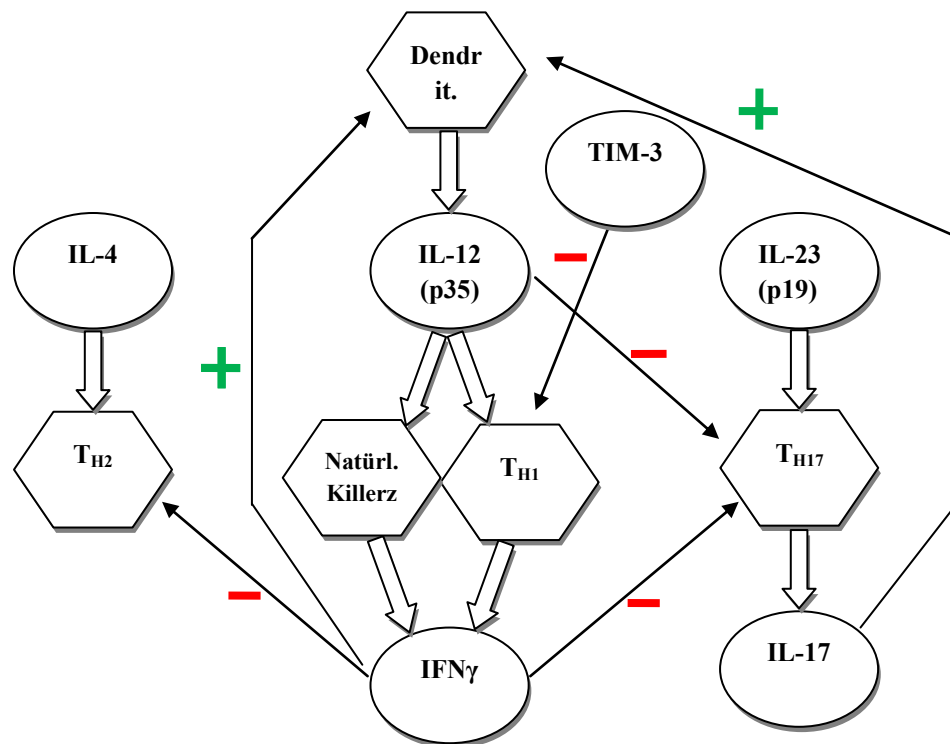


Abbildung 2.1: entsprechend der zitierten Literatur zusammengestelltes Schema zur Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine und deren Interaktionen im Rahmen einer Entzündung. Legende: - - Inhibition, + - Stimulation, T_{H1} – T-Helferzelle 1, T_{H2} – T-Helferzelle 2, T_{H17} – T-Helferzelle 17.

2.2.2 IL-17 (Interleukin 17)

1995 wurde durch die Arbeitsgruppe um Yao die Zytokin-Untergruppe IL-17 (Interleukin 17) mit ihrem entsprechenden Rezeptor erstmals benannt (Yao et al., 1995). Dies geht auf die Beobachtung zurück, dass ein T-Zell-abgeleitetes Molekül den Transkriptionsfaktor Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B), sowie die IL-6-Sekretion in Fibroblasten und die Co-Stimulation der T-Zellproliferation anregte.

Wie $IFN\gamma$ spielt auch IL-17 eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Entzündung und von Autoimmunreaktionen. Die IL-17-produzierenden T_{H17} -Zellen sind maßgeblich an der Entstehung chronischer Entzündungen beteiligt (Irmeler et al., 2007, Moseley et al., 2003, Kamradt, 2007).

Die Wechselwirkung von $\text{IFN}\gamma$ und IL-17 unterstreicht die Komplexität der zellulären Interaktion bei der Induktion und Regulation von Immunreaktionen und Entzündungen (siehe Abb. 2.1). Ob $\text{IFN}\gamma$ oder IL-17 bei Schmerzreaktionen eine Rolle spielen, ist derzeit noch nicht geklärt. Es steht fest, dass der Aufgabenbereich der IL-17-Zytokine in das T-Zell-Immunsystem hineinspielt und zur Entzündungsantwort beiträgt (Moseley et al., 2003).

Kürzlich konnte im Tiermodell bei Ratten gezeigt werden, dass IL-17 zu Gelenkschmerzen beitragen kann. Wahrscheinlich spielt es eine ebenso wichtige Rolle bei der Gewebshomöostase wie bei dem Verlauf einer Erkrankung (Moseley et al., 2003). Zudem fördert IL-17 die funktionelle Differenzierung von dendritischen Vorläuferzellen, welche zum Teil auf die allogene T-Zell-Proliferation Einfluss zu nehmen scheinen (Antonysamy et al., 1999).

Insgesamt sind die Effekte von IL-17 auf epitheliale Zellen vergleichbar mit denen von $\text{IFN}\gamma$, da beide auf die Bildung von IL-6 und IL-8 Einfluss nehmen und starke Stimulatoren der Keratinozyten sind (Teunissen et al., 1998, Albanesi et al., 1999). IL-17 wirkt zudem verstärkend auf die Entstehung kutaner Entzündungen und fördert möglicherweise chronische Dermatosen (Teunissen et al., 1998).

IL-17 wird, wie auch $\text{IFN}\gamma$, nur von aktivierten T-Zellen gebildet und freigesetzt. Ebenfalls wie der $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptor wird auch der IL-17_A -Rezeptor von nahezu allen Geweben exprimiert. Dabei existiert eine Vielzahl von Isoformen des Rezeptors, deren Funktionen bis dato nicht vollständig geklärt sind (Moseley et al., 2003). Wird der IL-17_A -Rezeptor durch IL-17 stimuliert, werden über NF- κ B oben genannte pro-inflammatorische Zytokine und der granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) gebildet und freigesetzt; außerdem reguliert es den Knorpelmatrix-Umsatz (Hymowitz et al., 2001). IL-17 scheint an der überschießenden Produktion pro-inflammatorischer Zytokine im entzündeten Gelenkgewebe über Interaktion mit Makrophagen in rheumatoider Synovia beteiligt zu sein (Jovanovic et al., 2000). Bei dem Versuch, IL-17 intraperitoneal zu verabreichen, wurde ein Anstieg der Neutrophilen-Migration und deren Influx in das behandelte Gebiet (Intestinum) beobachtet (Shi et al., 2000).

Weiterhin weiß man mittlerweile, dass IL-17 in hohem Maße im Rückenmark und im Hirn durch Neurone sowie Axone gebildet wird und nur zu geringem Anteil in den übrigen Körpergeweben (Moore et al., 2002).

2.2.3 IL-23 (p19), IL-12 (p35)

Das pro-inflammatorische Zytokin IL-12 wird von phagozytierenden Zellen und Dendritischen Zellen als Reaktion auf mikrobielle Stimulation gebildet (siehe Abbildung 2.2). Es ist notwendig, um die IFN γ -Produktion zu induzieren und es fördert die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_{H1}-Zellen (Trinchieri, 2003) (siehe Abbildung 2.2). Zudem bildet IL-12 die Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (Trinchieri, 2003).

IL-12 besteht aus zwei Disulfid-gekoppelten heterodimeren Proteinen, nämlich aus der IL-12p35-Komponente und der IL-12p40-Komponente. Nur wenn beide Untereinheiten in einer Zelle co-exprimiert werden, kann biologisch aktives IL-12 generiert werden (Trinchieri, 2003). Dabei kommt dem Protein p35 die Aufgabe zu, die Menge an produzierten Heterodimeren zu determinieren. Der IL-12-Rezeptor wird besonders in aktivierten T-Zellen, Natürlichen Killerzellen und in Dendritischen Zellen exprimiert (Kastelein et al., 2007). In nachstehendem Flusschema können diese Zusammenhänge nachvollzogen werden.

Das Protein p19 an sich besitzt keine biologische Aktivität; wird es jedoch mit der p40-Untereinheit von IL-12 kombiniert, entsteht ein neues Zytokin: IL-23. Dieses wird von aktivierten Dendritischen Zellen und phagozytierenden Zellen ausgeschüttet und induziert seinerseits die Proliferation von Gedächtnis-T-Zellen und naiven T-Zellen, sowie die Bildung von IFN γ (siehe Abbildung 2.2) (Oppmann, 2000). Der IL-23-Rezeptor wird sowohl auf aktiven als auch Gedächtnis-T-Zellen, T-Zell-Klonen und auf Natürlichen Killerzellen exprimiert, in geringem Maße auch auf Makrophagen und Monozyten (Kastelein et al., 2007).

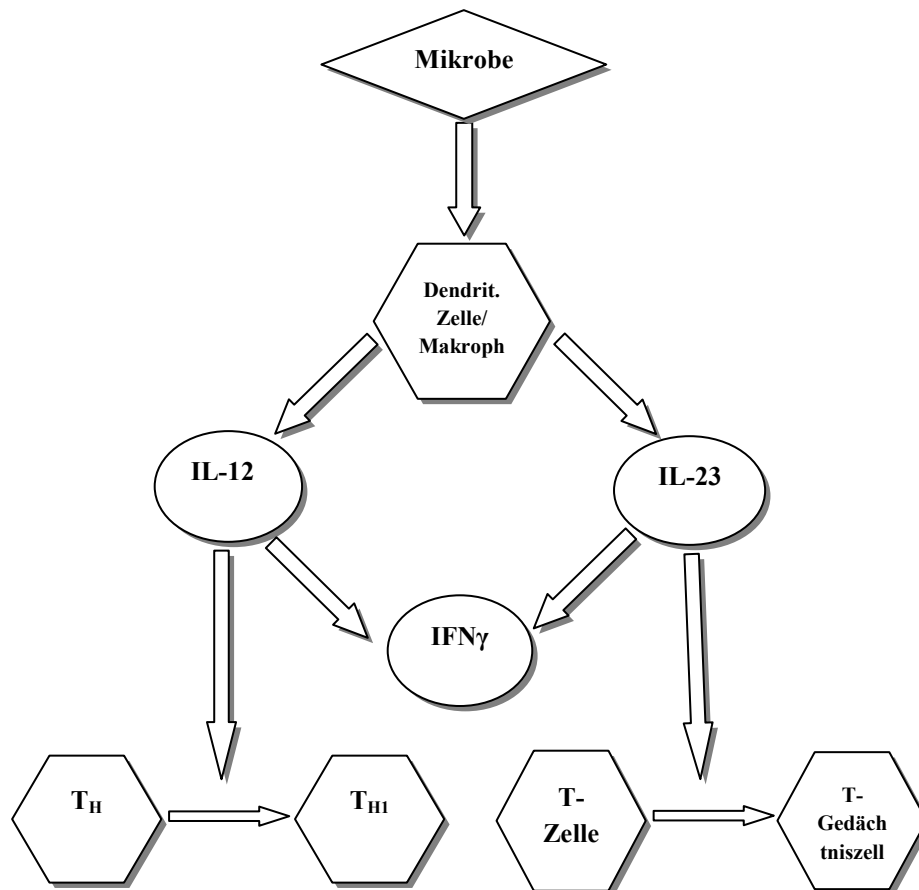


Abbildung 2.2: entsprechend der zitierten Literatur zusammengestelltes Schema zur Darstellung der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine IL12 und IL23 und deren Interaktionen im Rahmen einer Entzündung. Legende: ⇨ - Stimulation, T_{H1} - T-Helferzelle 1, T_H - T-Helferzelle.

IL-12 und IL-23 befinden sich beide am Anfang des Regulationsmechanismus, der die adaptive Immunantwort bildet (Kastelein et al., 2007). Da beide die p40-Untereinheit benötigen, um aktiv zu werden, werden sie der Familie heterodimerer IL-12-Zytokine zugeordnet (McKenzie et al., 2006). Sie werden beide in haut- und mukosaständigen Dendritischen Zellen sowie Makrophagen gebildet, sobald die entsprechende Stimulation durch Pathogene (z.B. gram-negative Bakterien) und Toll-like-Rezeptor-Agonisten erfolgt (Smits et al., 2004). Unter entzündlichen Bedingungen kann die Zytokinfreisetzung durch T-Zell-Interaktionen noch weiter gesteigert werden (Kastelein et al., 2007). 1986 beschrieben Mosmann und Kollegen, dass es zwei Typen von $CD4^+$ - T-Zellklonen mit unterschiedlicher Zytokinproduktion gibt (siehe Abbildung 2.3) (Mosmann et al., 1986). Mittlerweile zählt man die T_{H17} -Zellen als weitere Untergruppe dazu.

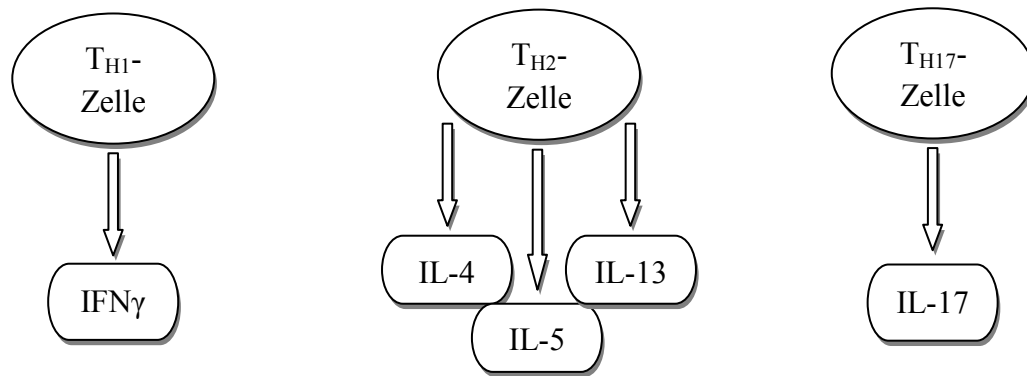


Abbildung 2.3: entsprechend der zitierten Literatur zusammengestelltes Schema zur Darstellung der T_H -Zell-Subpopulationen mit ihren entsprechenden Leitzytokinen.

Werden aktive oder Gedächtnis-T-Zellen in Gegenwart von IL-23 stimuliert, führt dies zu erhöhter Produktion von IL-17, jedoch nicht zur Bildung von IFN γ oder IL-4. Daraus schloss die Arbeitsgruppe um Mosmann, dass es eine weitere Untergruppe von T-Zellen geben muss (siehe Abbildung 2.3). Man erkannte, dass IL-12 und IL-23 unterschiedliche Signalwege bedienen: Einerseits induziert der IL-12/IFN γ -Signalweg vor allem die Ausschüttung zytotoxischer Faktoren, die wichtig für die direkte Abtötung von Mikroben oder infizierten Zellen sind.

Andererseits gibt es den IL-23/IL-17-Signalweg, welcher mit lokaler Gewebsentzündung mit Schwellung, Erwärmung und Schmerz in Verbindung steht und das Gewebe auf eine verstärkte Immunantwort vorbereitet (Neutrophileneinwanderung etc.). Beide Wege arbeiten letztendlich gemeinsam bei der Kontrolle der körperlichen Immunität, wobei IL-23 mehr für den Ablauf des lokalen Entzündungsprozesses zuständig ist und IL-12 eher die systemische Antwort generiert (Kastelein et al., 2007). Bezüglich IL-23 weiß man, dass defiziente Mäuse resistent gegenüber Knochen- und Gelenkpathologien sind und ein Mangel an IL-17- und IFN γ -produzierenden T-Zellen trotz adäquater Entzündungsinduktion besteht. Bei IL-12-defizienten Mäusen beobachtete man dagegen vermehrte T_{H17} -Zellproduktion, sowie erhöhte Expression pro-inflammatorischer Zytokine und eine überschießende Kollagen-induzierte Arthritis.

Somit wirkt IL-23 als essentieller Promoter für autoimmune Knieentzündungen, wogegen IL-12 einen Schutz vor Selbigen bildet (Murphy et al., 2003, McKenzie et al., 2006).

2.2.4 TIM-3

T-cell immunoglobulin- und mucin-domain-containing-molecules (TIMs) bilden eine Molekülfamilie, deren Mitglieder auf murinen und humanen T-Zellen exprimiert werden (McIntire et al., 2001). In *ex-vivo*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass TIM-3 zu hohem Anteil auf T_{H1} - und auf T_{H17} -Zellen exprimiert wird, dagegen werden TIM-1 und TIM-2 verstärkt auf T_{H2} -Zellen exprimiert (Khademi et al., 2004, Meyers et al., 2005, Monney et al., 2002, Hastings et al., 2009). In den Versuchen von Khademis Arbeitsgruppe erkannte man eine Korrelation zwischen hoher TIM-3-Expression und geringer $IFN\gamma$ - bzw. $TNF-\alpha$ -Freisetzung, sowie eine bessere Rückbildung klinischer Symptome. Weiterhin ist eine vermehrte TIM-3-Bildung vor Ausbruch einer chronischen Krankheit, wie z.B. Multipler Sklerose, *in vitro* gegenüber einem deutlichen Rückgang der TIM-3-Konzentration während des Krankheitsfortschrittes beobachtet worden (Monney et al., 2002). Daher wird vermutet, dass TIM-3 negativen Einfluss auf die Aktivität der T_{H1} -Zellen nimmt und deren Signalkaskade blockieren kann (Sabatos et al., 2003, Meyers et al., 2005).

Eine Blockade von TIM-3 führt umgekehrt zu einer vermehrten Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-17, $IFN\gamma$, IL-2 und IL-6 (siehe Abbildung 2.1) (Hastings et al., 2009). Letztendlich ist der TIM-3-TIM-3-Ligand-Signalweg notwendig für eine produktive T_{H1} -Immunantwort, da eine unkontrollierte proinflammatorische Immunantwort schwere pathologische Konsequenzen für den Wirt nach sich zieht (Meyers et al., 2005); ebenso wichtig scheint es bei der Regulation der T_{H17} -Immunantwort zu sein. Bei einem Mangel von TIM-3 wird zwar nicht der Zelltod gefördert oder die T-Zell-Proliferation gesteigert, jedoch erhöht sich die Expressionsrate für die verschiedenen Zytokine; ebenfalls wird die Bildung und Aktivität von Makrophagen gefördert (Monney et al., 2002, Hastings et al., 2009). In der Mikroglia der weißen Substanz im ZNS wird TIM-3 gebildet, was im Zusammenhang mit Multipler Sklerose zu stehen scheint (Monney et al., 2002).

Zusammenfassend ist bekannt, dass TIM-3 auto- und alloimmune Antworten auf T-Zell-Ebene hemmend beeinflusst und auf immunologische Toleranz fördernd wirkt (Sánchez-Fueyo et al., 2003).

2.3 Das Benzodiazepin Midazolam in seiner Rolle als GABA_A-Agonist

GABA ist der wichtigste inhibierende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Anseloni and Gold, 2008), der die neuronale Erregbarkeit primärer Afferenzen sowie Neurone des dorsalen und ventralen Horns reguliert (De Groat, 1972, Curtis and Felix, 1971). GABAerge Neurone hemmen Neurone des Rückenmarks, die wichtig für das Weiterleiten von Aktionspotentialen zum Hirn sind (Enna and McCarson, 2006). Weiterhin kommen in supraspinalen Gebieten GABAerge Neurone und ihre Rezeptoren vor, die für die Koordination der Wahrnehmung und Reaktion auf schmerzhafte Stimuli zuständig sind und die Kontrolle sensorischer Informationsverarbeitung im Rückenmark regulieren (Enna and McCarson, 2006). Über auf- und absteigende GABAerge Kreisläufe ist das System dadurch stark in die Nozizeptionsmodulation in spinalen Hinterhörnern involviert (Price et al., 2005). Im gesunden Gewebe wirken GABA_A-Rezeptor-Agonisten, wie Midazolam (Agonist für zentrale GABA_A-Rezeptoren und periphere Benzodiazepin-Rezeptoren) analgetisch (Dirig and Yaksh, 1995).

GABA_A-Rezeptor-Antagonisten führen jedoch zu thermischer und mechanischer Hypersensibilität (Sivilotti and Woolf, 1994, Yaksh, 1989). Kommt es nun zu einer Entzündung, ändert sich der GABA-Effekt. Es kommt durch Änderung des Chlorid-Gleichgewichts-Potenzials zu einer exzitatorischen Steigerung in den Hinterhorn-Neuronen (= zentrale Sensibilisierung) (Lin et al., 1996), was bereits durch periphere Nervenverletzungen in spinalen Hinterhornneuronen gezeigt werden konnte (Coull et al., 2005). Dadurch vermindert sich die GABA-vermittelte Inhibition der ins Hinterhorn projizierenden Neurone und ein erhöhter Input von A δ - und C-Fasern, die peripher noxischen Reizen ausgesetzt waren, in die spinalen Hinterhörner ist die Folge. Es entstehen erhöhte Aktivitäten der Hinterhornreflexe (Lin et al., 1999, Willis, 1999). Diese spielen allem Anschein nach eine wichtige Rolle als neurogene Komponente der Entzündungsentstehung. Die Entzündung wird durch Mechanismen verstärkt, welche die Konzentration von spinalem GABA erhöhen (Lin et al., 1999, Willis, 1999).

Solche Mechanismen liefern zum Beispiel GABA-Agonisten wie Midazolam, für die in verschiedenen Tiermodellen für Schmerz bereits antinozizeptive Merkmale nachgewiesen werden konnten (Enna and McCarson, 2006).

2.4 Entzündungsmodell

Um die Zytokine IFN γ , IL-17, IL-23, IL-12 und Tim-3 hinsichtlich ihres Beitrags zur thermischen und mechanischen Hyperalgesie in der akuten Phase einer Entzündung zu studieren, benötigt man ein entsprechendes Tiermodell. Meller und Gebhart beschreiben das Entzündungsmodell der intraplantaren Zymosaninjektion in die Hinterpfoten bei Ratten (Meller and Gebhart, 1997). Dabei bewirkte das aus Hefeextrakt (aus *Saccharomyces cerevisiae*) gewonnene Zymosan A eine dosis- und zeitabhängige thermische und mechanische Hyperalgesie, ein beständiges Ödem sowie bei sehr hohen Dosen (> 12,5 mg/ml) Anzeichen für Spontanschmerz. Das Maximum der mechanischen Hyperalgesie beobachtete man 4 Stunden *post injectionem*. Dagegen trat die thermische Hyperalgesie biphasisch auf, mit einem Maximum nach 30 min und dann wiederum 4 bis mindestens 24 Stunden nach der Zymosaninjektion.

Die behandelten Ratten entwickelten bei einer mittleren Dosis von 12,5 mg/ml keinen Spontanschmerz, jedoch eine Schonhaltung und zögerliches Absetzen der entzündeten Pfote auf den Boden, sowie leckendes Verhalten nach längeren Testphasen. Diese Beobachtungen deckten sich mit denen einer humanen Gewebeschädigung bei einer Entzündung (Meller and Gebhart, 1997). Daher verwendeten wir Zymosan für unser Entzündungsmodell.

2.5 Zielstellung

Das Ziel der Arbeit war, zu untersuchen, inwiefern bestimmte T-Zell-Zytokine Einfluss auf das entzündungsassoziierte Schmerzverhalten nehmen. Am Modell der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung sollte die lokale und systemische Wirkung von IFN γ , IL-17, IL-12 (p35), IL-23 (p19) und TIM-3 untersucht werden. Die Beobachtung des Verhaltens wurde durch histologische Auswertungen komplettiert.

Es wurden partiell immundefiziente Mäuse und entsprechende Wildtypmäuse zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach Entzündungsinduktion hinsichtlich ihrer Schmerzschwellen untersucht. Dabei handelte es sich um IFN γ -, IL-17-, IL-17p35-, p35-, p19-, p35p19-, sowie TIM-3-KO-Mäuse.

Zum Vergleich wurden mehrere Gruppen $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ - Mäuse und C57Bl6-Wildtypmäuse mit Interferon-gamma bzw. einem Interferon-gamma-Antikörper behandelt. In Kontrollgruppen gleichartiger und gleich behandelter Tiere sollte die Schmerzschwelle ohne Zymosan-induzierte Pfotenentzündung gemessen werden.

In weiteren Versuchsgruppen ($\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse und C57Bl6-Wildtypmäuse) wurden verschiedene Zymosankonzentrationen appliziert und die konzentrationsabhängige Veränderung der Schmerzschwellen untersucht. Eine weitere Messreihe sollte die Wirkung eines GABA-Rezeptor-Agonisten auf die Schmerzschwellen untersuchen.

In den dargestellten Versuchen waren folgende Fragen zu prüfen:

1. Wird das schmerzassoziierte Verhalten bei einer zymosaninduzierten Entzündung der Hinterpfote vermindert, wenn einzelne Entzündungsmediatoren oder –modulatoren, wie $\text{IFN}\gamma$, IL-17, TIM-3, p19 und p35, durch ein Knock-out ausgeschaltet werden?
2. Welchen Effekt auf das schmerzassoziierte Verhalten hat ein kombinierter Knock-out dieser Mediatoren (p35/p19; IL-17/p35) in einem Tier?

Die Untersuchung der oben formulierten Fragestellung soll als Grundlage für weiterführende Untersuchungen des nozizeptiven Systems dazu beitragen, genauere Erkenntnisse über die Wirkung von T-Zell-Zytokinen auf die Schmerzentstehung bei peripheren Entzündungen zu erhalten.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vorwiegend männliche, teils weibliche Mäuse unterschiedlicher Stämme im Alter von ca. 8-12 Wochen verwendet. Tierstamm, Anzahl, Geschlecht und Herkunft der verwendeten Tiere sind der Tabelle 3.1 zu entnehmen. Alle Mäuselinien wurden in Forschungsprojekten von Prof. Bräuer (Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Jena) untersucht und wurden von ihm für die Messungen zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3.1: Typ, Stamm, Anzahl, Geschlecht und Herkunft der Tiere zur tierexperimentellen Untersuchung

Typ	Stamm	Anzahl	Geschl.	Herkunft
Wildtyp	C57Bl/6	76	♂	Charles River, Sulzfeld
Wildtyp	Balb c	10	♀	Siehe TIM-3 ^{-/-}
IFN γ ^{-/-}	C57Bl/6	68	♂	Jackson Lab., Bar Harbor, USA. Prof. Dr. Edgar Schmitt (Johannes Gutenberg Uni Mainz)
IL-17 ^{-/-}	C57Bl/6	10	♂	Prof. Dr. Gottfried Alber (Universität Leipzig) & Prof. Dr. Y. Iwakura (Inst. Med. Science, Tokyo University, Japan)
p19 ^{-/-}	C57Bl/6	10	♂	Prof. Dr. Gottfried Alber (Universität Leipzig)
p35 ^{-/-}	C57Bl/6	10	♂	
p35p19 ^{-/-}	C57Bl/6	7	♂	
IL-17p35 ^{-/-}	C57Bl/6	10	♂	
TIM-3 ^{-/-}	Balb c	10	♀	Dr. A.J. Coyle, Millenium Pharmaceuticals, Cambridge/MA, Zucht/Haltung: Institut für Versuchstierkunde der FSU Jena (Tierhaus 5/Beutenberg)

Die Mäuse wurden in Gruppen von maximal 6 Tieren unter standardisierten Bedingungen bei einem konstanten 12-Stunden-Hell-/Dunkelrhythmus gehalten. Die Experimente fanden während des Hell-Zyklus statt. Als Nahrung diente standardisiertes Haltungsfutter (Altromin-Pellets # 1326) und Wasser *ad libitum*. Die tierexperimentellen Untersuchungen waren vom Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz, Abteilung Gesundheitlicher Verbraucherschutz, Veterinärwesen, Pharmazie genehmigt (Reg.-Nr. 02-009/08 vom 15.04.2009).

Die Tierversuche erfolgten gemäß EU-Richtlinien (86/609/EEC) sowie entsprechend der Empfehlungen der IASP (International Association for the Study of Pain; Zimmermann et al., 1983).

3.2 Entzündungsmodell

Die Entzündung wurde unter einer Kurznarkose mit Isofluran (3%) (Isofluran Delta Select, Delta Select GmbH, Dreieich, Vertrieb Zweigniederlassung Pfullingen, Deutschland) induziert. Dabei wurde mit Hilfe einer Hamilton Spritze 20 µl Zymosan-Emulsion (12,5 mg/ml in 0,1 M PBS pH 7,4) (Meller and Gebhart, 1997) subkutan in die linke Hinterpfote plantar appliziert (Abbildung 3.1). Das Zymosan wurde dabei in sterilem PBS gelöst (Ansatz: NaCl (Fluka) 140 mM/l; KCl (Fluka) 2,7 mM/l; KH₂PO₄ (Merck) 1,5 mM/l; NaH₂PO₄ (Merck) 8,1 mM/l).

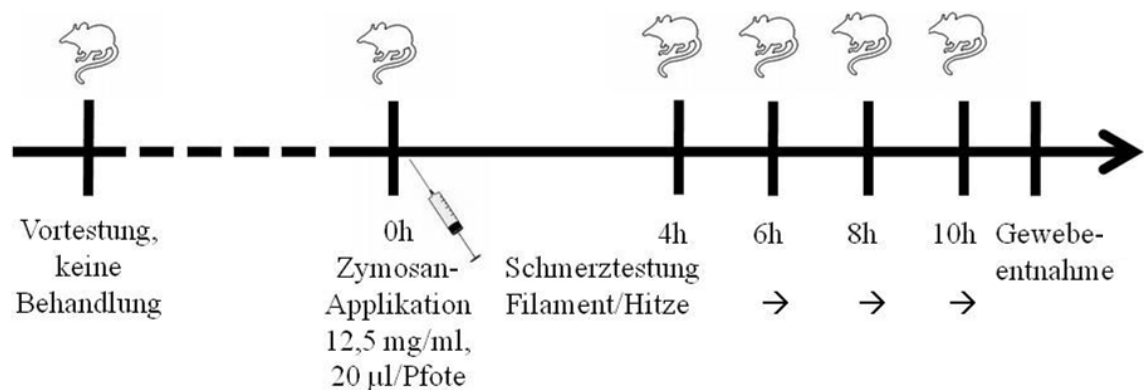


Abbildung 3.1: schematische Darstellung des Versuchsaufbaus: einige Zeit nach der Vortestung wurde die Entzündung ausgelöst und anschließend wurden die Mäuse auf das Schmerzverhalten gegenüber Hitze- und Druckreiz getestet, später Gewebeentnahme.

3.3 Schmerzassoziiertes Verhalten unter nicht-entzündlichen Bedingungen

3.3.1 Nozizeption u. Schmerzentstehung bei Störungen immunologischer

Mechanismen

Um das Schmerzverhalten von Wildtypmäusen und KO-Mäusen vergleichen zu können, wurden jeweils ca. 10 KO-Mäuse gegen ca. 10 Wildtypmäuse desselben genetischen Hintergrundes getestet. Dabei wurde darauf geachtet, dass die zu vergleichenden Gruppen die gleiche Geschlechtszusammensetzung hatten. Zunächst wurde das Schmerzverhalten unter Normalbedingungen zur Erfassung von Ausgangswerten getestet. Zu einem späteren Zeitpunkt (ca. 4-7 Tage später) wurde die Schmerzantwort auf den durch Zymosan induzierten entzündlichen Reiz untersucht. Dabei wurde zur Stunde 0, wie oben beschrieben, Zymosan (siehe 3.6.1) in die linke Hinterpfote appliziert und zur 4., 6., 8. und 10. Stunde nach Entzündungsinduktion das schmerzassoziierte Verhalten auf Druck- bzw. Hitzereize getestet.

3.4 Bedeutung von Interferon-gamma für Entzündungsschmerz

3.4.1 Abhängigkeit des schmerzassoziierten Verhaltens von der IFN γ -

Konzentration

In zwei Gruppen wurden IFN γ ^{-/-}- Mäuse verwendet, denen IFN γ entweder direkt in das Entzündungsgebiet intraplantar oder systemisch intraperitoneal injiziert wurde. Bei der Dosierung orientierten wir uns an vorbeschriebene Daten (Irmeler et al., 2007).

Die erste Gruppe, bestehend aus 9 IFN γ ^{-/-}- Mäusen, erhielt mit der intraplantaren Injektion der Zymosanemulsion 100 ng IFN γ . Die zweite Gruppe (8 IFN γ ^{-/-}- Mäuse) erhielt kurz vor der plantaren Zymosan-Injektion eine Gesamtmenge von 500 ng IFN γ (siehe 3.6.1) intraperitoneal. Damit sollte eine systemische Supplementierung von IFN γ erzielt werden.

Analog zu diesen beiden Gruppen wurde in zwei weiteren Gruppen, bestehend aus Wildtypmäusen, IFN γ sowohl durch intraplantare als auch intraperitoneale Injektion mit Hilfe monoklonaler Antikörper neutralisiert. Die hier verwendeten anti-IFN γ -Konzentrationen wurden von publizierten Daten abgeleitet (Irmeler et al., 2007).

Die aus 8 Wildtypmäusen bestehende dritte Gruppe bekam gleichzeitig zur Zymosan-Injektion 20 µg anti-IFN γ intraplantar appliziert. Dementsprechend wurde der vierten Gruppe (8 Wildtypmäuse) 100 µg anti-IFN γ kurz vor der intraplantaren Zymosaninjektion intraperitoneal appliziert (siehe Abbildung 3.2).

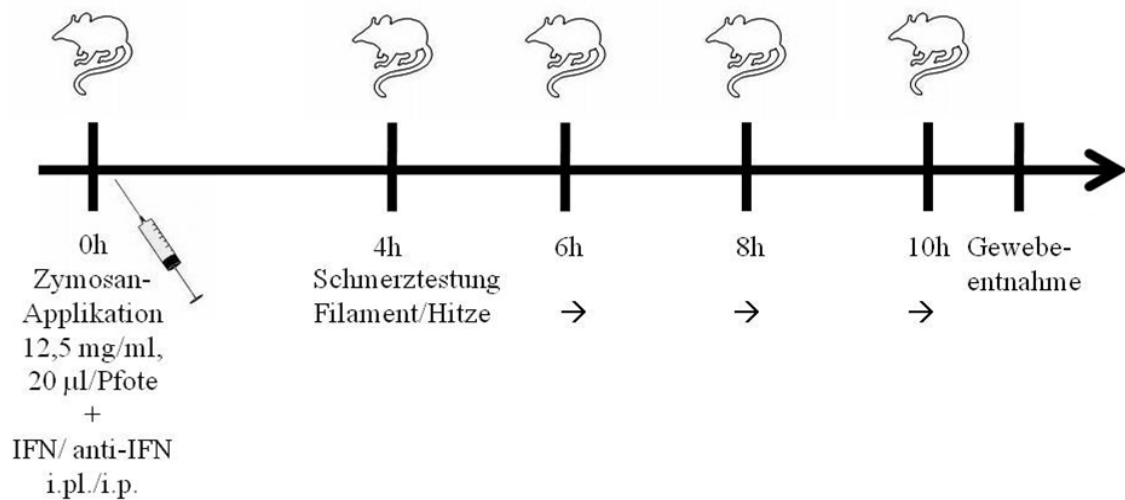


Abbildung 3.2: unmittelbar nach Auslösen der Entzündung wurde IFN γ bzw. anti-IFN γ intraplantar oder intraperitoneal appliziert. Nach Auslösen der Entzündung wurde das Schmerzverhalten gegenüber Hitze- und Druckreiz getestet, anschließend erfolgte die Gewebeentnahme. Legende: t – Zeit in Std., i.pl. – intraplantar, i.p. – intraperitoneal.

Um zu prüfen, ob sich eine adäquate Entzündungsreaktion unabhängig von der Interferonapplikation ausbildet (vgl. Abb. 3.1), wurden zusätzlich im gleichen Versuchsdesign jeweils 4 Wildtypmäuse beziehungsweise IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse nur mit intraplantarem Zymosan behandelt und es wurde auf die Gabe von Interferonanaloga verzichtet. Außerdem wurden 6 Wildtypmäuse mit anti-IFN γ bzw. 6 IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse mit IFN γ intraplantar behandelt, ohne jedoch eine Entzündung durch Zymosan auszulösen (siehe Abb. 3.3). Dadurch sollte ausgeschlossen werden, dass die injizierten Substanzen selbst zu einer Entzündung führen.

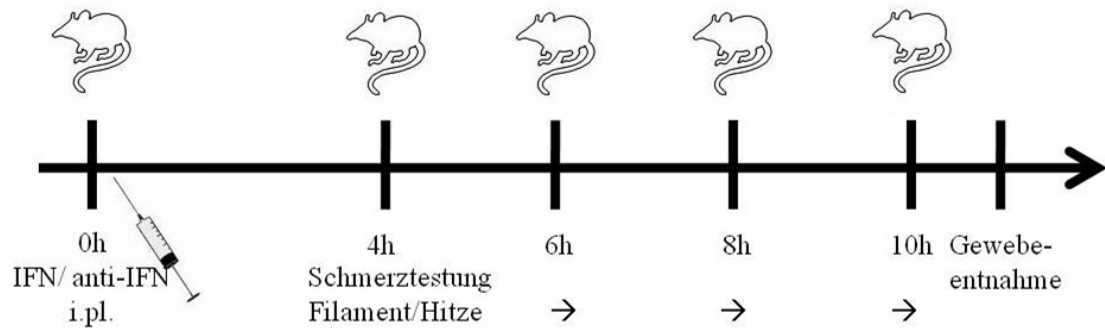


Abbildung 3.3: Vor Versuchsbeginn wurde IFN γ bzw. anti-IFN γ den IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen bzw. Wildtypmäusen intraplantar injiziert. Dann wurde auf Druck – und Hitzeschmerzverhalten getestet, anschließend erfolgte die Gewebeentnahme. Legende: t – Zeit in Std., i.pl. – intraplantar.

3.4.2 Untersuchung der systemischen GABA-Wirkung in Abhängigkeit von IFN γ

Die Wirkung des inhibitorischen Neurotransmitters GABA kann durch Benzodiazepine verstärkt werden. Wie in Abbildung 3.4 zu sehen ist, wurden 10 Wildtyp- und 10 IFN $\gamma^{-/-}$ -Tieren 200 μ g/200 μ l des Benzodiazepin-Rezeptor-Agonisten Midazolam (siehe 3.6.1) intraperitoneal appliziert. Die Substanzgabe erfolgte 7 Stunden nach Zymosaninjektion, also eine Stunde vor der dritten Testung (8. Stunde). Die genannten Konzentrationen haben sich in anderen Studien bereits als wirksam erwiesen (Anseloni and Gold, 2008).

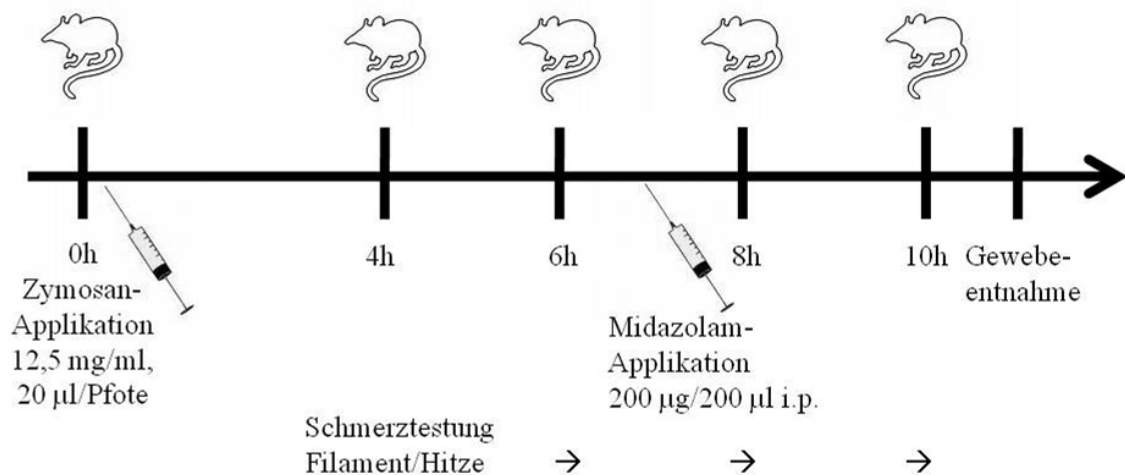


Abbildung 3.4: sieben Stunden nach Zymosanapplikation wurde Midazolam intraperitoneal appliziert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde auf Druck – und Hitzeschmerzverhalten getestet, anschließend erfolgte die Gewebeentnahme. Legende: t – Zeit in Std., i.p. – intraperitoneal.

3.5 Abhängigkeit des schmerzassoziierten Verhaltens von der Zymosankonzentration

Alle bisher beschriebenen Untersuchungen wurden an plantaren Entzündungen vorgenommen, welche durch eine Zymosankonzentration von 12,5 mg/ml hervorgerufen wurden. Um beurteilen zu können, inwiefern die Zymosankonzentration und damit die Schwere der Entzündungsreaktion im Zusammenhang mit dem schmerzassoziierten Verhalten steht, wurden die Versuche entsprechend zu den unter 3.4.1 beschriebenen Gruppen mit den entsprechenden Kontrollgruppen analog Abbildung 3.4 wiederholt, allerdings mit halbiertes Zymosanmenge (6 mg/ml).

3.6 Applikation der zu untersuchenden Substanzen

3.6.1 Verwendete Substanzen

Substanz	Hersteller	Applikationsort	Verwendete Konzentration	Verwendete Menge/Tier
Monoklonaler anti-m-IFNγ-Antikörper	R&D-Systems	intraperitoneal	100 μ g/100 μ l	100 μ l
		intraplantar	20 μ g/20 μ l	20 μ l
Rekombinantes Maus-IFNγ	R&D-Systems	intraperitoneal	500 ng/100 μ l	100 μ l
		intraplantar	100 ng/200 μ l	20 μ l
Zymosan A	Sigma-Aldrich	intraplantar	12 mg/ml bzw. 6 mg/ml	20 μ l
Midazolam	Ratiopharm GmbH	intraperitoneal	200 μ g/200 μ l	200 μ l

Bis auf Midazolam wurden alle Substanzen mit 0,1 M sterilem PBS auf die entsprechende Konzentration verdünnt.

3.6.2 Applikationsformen

Die verschiedenen Substanzen wurden, wie bereits die Zymosan-Emulsion (siehe 3.2), mit einer Hamilton Spritze (Gesamtvolumen 100 µl) entweder in die linke Hinterpfote oder intraperitoneal appliziert. Dabei wurde bei der intraplantaren Applikation darauf geachtet, nicht zu tief und auch nicht zu oberflächlich zu applizieren, um Gewebeschäden und Blasenbildung zu vermeiden. Ebenfalls wurde bei der intraperitonealen Substanzgabe die freie Beweglichkeit der Nadel in der Bauchhöhle durch leichtes Hin- und Herschwenken geprüft, um eine versehentliche Applikation in die Organe weitestgehend ausschließen zu können.

3.7 Pfortenschwellung

Die Entzündungsinduktion in der linken Hinterpfote führte zu einer deutlichen Schwellung der gesamten Pfote. Der dorso-plantare Pfortendurchmesser beider Pforten wurde mit einem Oditest-Schnelltester (Mitutoyo, Neuss, Deutschland) ermittelt. Die Differenz zwischen linker und rechter Hinterpfote diente als Maß für die klinische Schwere der Entzündung und generell als Zeichen einer erfolgreich induzierten Inflammation (Ferreira et al., 2001). Dieser Parameter wurde einmal pro Testzeitpunkt bestimmt.

3.8 Testung des Schmerzassoziierten Verhaltens

3.8.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Um die Entstehung von primärer und sekundärer mechanischer Hyperalgesie zu bewerten, wurde die Sensibilität auf taktile Stimulation unter Verwendung eines dynamischen plantaren Ästhesiometers (DPA, Ugo Basile, Comerio, Italien) (Szabó et al., 2005) beurteilt. Dabei handelt es sich um eine automatisierte Version der von Frey Haar-Untersuchung, wodurch eine bessere Standardisierbarkeit erreicht wird. Von Frey Haare werden generell dazu genutzt, um Veränderungen in der mechanischen Schmerzschwelle (als Reaktion auf mechanische Stimulation) zu erkennen.

Anstelle verschiedener Filamente ansteigender Dicke, die unterschiedliche Gewichtskräfte auf die Pfoten ausüben, wird beim DPA ein starres, jedoch stumpfes Filament direkt unter die Plantarfläche der zu testenden Hinterpfote platziert. Anschließend wird das Filament über 10 Sekunden mit zunehmender Kraft gegen die Pfote gedrückt, bis die Maus diese wegzieht oder ein maximales Gewicht von 10 Gramm erreicht wird. Um Gewebeschädigung zu vermeiden, wurde dieser Cut-off-Wert von 10 s bzw. 10 g eingestellt, bei dem die Reizung abgebrochen wird. Das DPA erfasst dabei automatisch das Gewicht, bei dem die Pfote weggezogen wurde, sowie die Latenz bis zum Wegziehen. Jede Pfote wurde 3 Mal pro Versuchszeitpunkt getestet mit einem Zeitabstand von mindestens 2 Minuten zwischen den Tests.

Die Tiere befanden sich während dieser Testphase in einem Plexiglasbehälter mit Drahtgitterboden, in dem sie sich frei bewegen bzw. ohne Restriktion sitzen konnten. Vor Beginn jeder Testung wurden die Tiere über mindestens 10 Minuten an diese Umgebung akklimatisiert.

3.8.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Die thermische Hyperalgesie der Hinterpfoten wurde mit einem Algesimeter (Ugo Basile, Comerio, Italien) gemessen. Dieses Verfahren wurde 1988 von Hargreaves und Kollegen (Hargreaves et al., 1988) erstmals beschrieben. Dabei wurden die Mäuse in einen Plexiglasbehälter mit Plexiglasboden gesetzt, an den sie vor Beginn der Testung für mindestens 10 Minuten gewöhnt wurden. Danach wurde die Hitzequelle so positioniert, dass ein Laserstrahl konstanter Intensität direkt auf die plantare Fläche der zu untersuchenden Hinterpfote einwirken konnte. Durch das Wegziehen der Pfote wurde durch Aktivierung eines Lichtschrankenmechanismus die Hitzezufuhr unterbrochen und der Zeitzähler automatisch gestoppt. Diese Latenz gilt somit als Messpunkt für die Schmerzschwelle auf noxische Hitzereize. Zur Verhinderung von Gewebsverletzungen wurde eine maximale Reizdauer von 12 s definiert. Die Tiere wurden abwechselnd an der rechten, beziehungsweise linken Hinterpfote jeweils 3 Mal pro Versuchszeitpunkt getestet, wobei zwischen den Testungen mindestens 2 Minuten Zeit lagen.

3.9 Gewebeentnahme

Nach Beendigung der Testserie nach Stunde 10 wurden die Tiere durch eine Überdosis Isofluran und anschließender Dekonnectierung der Wirbelsäule am Schädelansatz getötet. Daraufhin wurden jeweils beide Plantarflächen *in toto* mittels eines Skalpell abpräpariert und in gepufferter Formaldehydlösung (4%) (Ansatz siehe Tabelle 3.2) fixiert.

Tabelle 3.2: Ansatz der gepufferten Formaldehydlösung (4%)

Substanz	Hersteller	Konzentration
Formaldehyd (40%)	Sigma	100 ml/l
Dinatriumphosphat, wasserfrei	Sigma	6,5 g/l
Natrium-Monophosphat (Monohydrat)	Sigma	4 g/l
Aqua dest.	Braun	

3.10 Aufarbeitung der plantaren Pfortenhaut

Die in gepufferter Formaldehydlösung (4%) fixierten Pfortengewebe wurden mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (50, 70, 85, 90, 100 %) (Rotisol, Roth) entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet (Histosec, Merck). Es wurden jeweils 6 querverlaufende Schnitte der Proben von 6 µm Dicke mittels eines Mikrotoms (Leica RM 2045, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) angefertigt. Für die mikroskopische Beurteilung wurden die Schnitte 10 Minuten in Xylol getaucht und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 85, 70, 50 %) (Rotisol, Roth) entparaffiniert. Um die Leukozyten sichtbar zu machen, wurde die panoptische Färbung nach Pappenheim verwendet. Dazu wurden die entparaffinierten Schnitte 20 Minuten in May-Grünwald-Lösung (1 Teil May-Grünwald zu 8 Teilen Aqua dest.) bei 35 °C getaucht und anschließend 40 Minuten in Giemsa-Lösung (1 Teil Giemsa zu 75 Teilen Aqua dest.), ebenfalls bei 35 °C (Färbelösung: May-Grünwald-Lösung: Merck, Giemsa-Lösung: Fluka). Danach wurde kurz in 0,15 %iger Essigsäure differenziert, in Aqua dest. gespült, auf Filterpapier abgepresst und daraufhin nochmal 10 Minuten in Aceton/Äthanol (1:1) getaucht sowie 10 Minuten in Xylol, um die Schnitte letztendlich in Entellan® (Merck) einzubetten.

3.11 Histologische Bewertung

Um die Schwere der lokalen Entzündung mit dem schmerzassoziierten Verhalten der Tiere ins Verhältnis setzen zu können, wurde anhand der histologischen Präparate die Leukozytenzahl pro Quadratmillimeter bestimmt. Dazu wurden je Präparat sechs 230 μm x 170 μm große Bildausschnitte bei 40-facher Vergrößerung ausgezählt. Dabei wurde darauf geachtet, ähnliche Pfotenausschnitte zu verwenden, um die Fehlerquote so gering wie möglich zu halten.

3.12 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, www.spss.com) für Windows, Version 17.

Zunächst wurden die Daten mittels Kolmogorov-Smirnov Tests auf Normalverteilung überprüft. Anschließend wurden Messwiederholungs-ANOVAs durchgeführt, um Haupteffekte nachzuweisen. Dabei wurde als Innersubjektfaktor der Faktor „Zeit“ (Testzeitpunkte Vortestung, 4, 6, 8 und 10 Stunden nach Entzündungsauslösung) und als Zwischensubjektfaktor der Parameter „Gruppe“ definiert (Wildtyp gegen KO bzw. i.p. gegen i.pl. und ohne Behandlung). Für die Beschreibung der Unterschiede zwischen den Gruppen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten wurden zweiseitige, ungepaarte t-Tests verwendet. Darüber hinaus wurden Mittelwerte, Standardabweichung (standard deviation, S.D.) und Standardfehler (standard error of mean, S.E.M.) mittels deskriptiver Statistik berechnet. Ebenso wurde bei der Überprüfung der Midazolamwirkung zwischen $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen und Wildtypmäusen vorgegangen, sowie bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen und Wildtypmäusen, die kein Zymosan, wohl aber $\text{IFN}\gamma$ bzw. anti- $\text{IFN}\gamma$ injiziert bekommen hatten.

Um die histologischen Unterschiede beschreiben zu können, wurden die Mittelwerte mittels einer einfaktoriellen ANOVA verglichen und Mittelwerte sowie Standardabweichung (standard deviation, S.D.) berechnet.

Generell wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

Ziel der Studie war es, Mäuse mit unterschiedlich ausgeschalteten Genabschnitten für Modulatoren des Immunsystems im Vergleich mit ihren entsprechenden Wildtypmäusen in Bezug auf schmerzassoziiertes Verhalten und Ausprägung der akuten lokalen Entzündung zu untersuchen. Zudem sollte bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen untersucht werden, ob durch die Gabe von Interferon oder die Beeinflussung von GABA_A -Rezeptoren eine Hinterpfotenschwellung als Folge einer Entzündung sowie mechanische und thermische Schwellen nach Auslösen einer Entzündung beeinflusst werden.

4.1 $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen

4.1.1 Schwere der Entzündung

4.1.1.1 Schwellung

Die Schwellungen der linken Hinterpfoten bildeten sich innerhalb des Beobachtungszeitraumes bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen von Stunde 4 bis Stunde 6 zu ihren größten Werten aus und bei den Wildtypmäusen bis Beobachtungstunde 10. Bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen konnte in Stunde 8 und 10 ein deutlicher Rückgang der Schwellung im Vergleich zu den Wildtypmäusen beobachtet werden, der statistisch signifikant war (Abb. 4.1 A) [$F(4,16) = 7,504$; $p = 0,001$].

4.1.1.2 Histologie der plantaren Pfotenhaut

Wie man in Abbildung 4.1 B erkennen kann, war die Anzahl der eingewanderten Leukozyten bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen etwas geringer als bei den Wildtypmäusen. Ein signifikanter Gruppenunterschied war jedoch nicht nachweisbar. Auch die histologische Aufarbeitung der rechten Hinterpfoten als Referenz (Abbildung 4.1 C und D) und der linken Hinterpfoten (Abbildung 4.1 E und F) zeigte keine auffälligen Unterschiede zwischen beiden Tiergruppen.

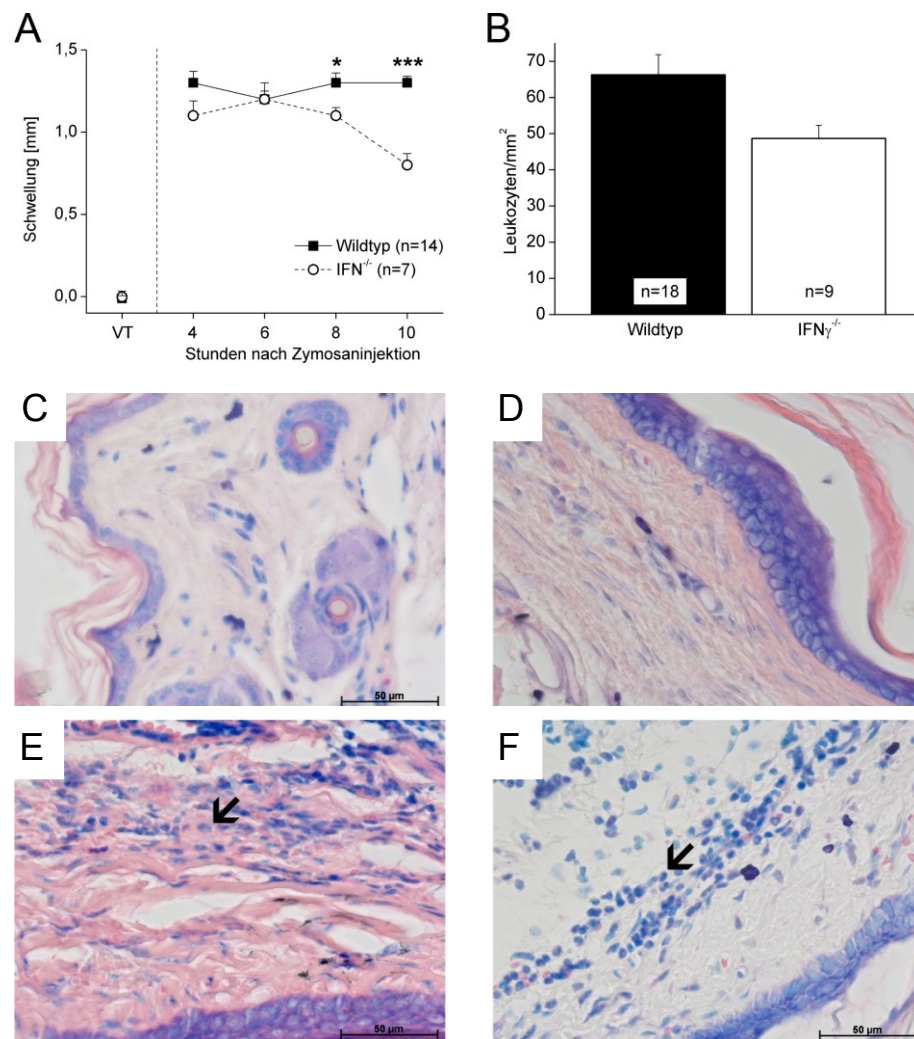


Abbildung 4.1: Differenz der Hinterpfotendurchmesser (links – rechts) der IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung (A), sowie Leukozyten pro mm² im Vergleich (B) Legende: VT – Vortestung (ohne Entzündung, ohne Therapie). * - Signifikanzniveau $p < 0,05$. *** - Signifikanzniveau $p < 0,001$. Mittelwerte + SEM, C/D: Hautschnittpräparate aus der rechten Hinterpfote einer IFN $\gamma^{-/-}$ -Maus (Abb. C) und einer Wildtypmaus (Abb. D), E/F: Hautschnittpräparate aus der linken Hinterpfote einer IFN $\gamma^{-/-}$ -Maus (Abb. E) und einer Wildtypmaus (Abb. F), die Pfeile zeigen vereinzelte Leukozyten.

4.1.2 Schmerzassoziierte Verhaltenstests

4.1.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

In der Vortestung unterschieden sich die mechanischen Schwellen der linken und rechten Hinterpfoten zwischen den Wildtyp- und IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen nicht. Nach Entzündungsinduktion sank bis Stunde 4 die Schwelle für den Druckschmerz der linken Hinterpfote bei beiden Gruppen.

Die Abnahme war bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen etwas geringer, jedoch nicht signifikant im Vergleich zu den Wildtypmäusen [$F(4,34) = 1,381$; $p = 0,261$] (Abb. 4.2 A). Während des weiteren Beobachtungszeitraums wurde kein deutlicher Unterschied auf der entzündeten Seiten zwischen den Schwellen bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen und Wildtypmäusen beobachtet.

Wie in Abbildung 4.2 B zu sehen ist, stieg die mechanische Schwelle der rechten nicht entzündeten Hinterpfoten der Wildtypmäuse während des Beobachtungszeitraumes gegenüber der Vortestung noch an, wohingegen die Drucksensibilität der $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse auf etwa gleichem Niveau blieb. Die Differenzen der mechanischen Schwellen waren in den Stunden 4 und 8 zwischen Wildtypmäusen und $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen signifikant [$F(4,34) = 3,866$; $p = 0,011$].

Vergleicht man die Schwellenveränderung der linken und der rechten Hinterpfote und berechnet man deren Differenz links-rechts, so ist die mechanische Hyperalgesie bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen deutlich vermindert.

4.1.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung zeigten die Hitzelatenzen zwischen $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen und Wildtypmäusen zwischen rechten und linken Hinterpfoten keine Unterschiede. Sowohl die $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse als auch die Wildtypmäuse wurden nach Auslösung der Entzündung stark für den Hitzeschmerz sensibilisiert, erkennbar an der Verkürzung der Latenzzeiten nach der Vortestung. Allerdings waren $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse über den gesamten Untersuchungszeitraum (Stunden 4, 6, 8 und 10) signifikant weniger sensibel an der entzündeten linken Hinterpfote reagierten als die Wildtypmäuse [$F(4,34) = 2,671$; $p = 0,049$]. Keine der beiden Gruppen konnte sich innerhalb des Beobachtungszeitraums dem Ausgangswert völlig annähern, wie man in Abbildung 4.2 C erkennt.

Die nicht entzündete rechte Hinterpfote zeigte bei den Wildtypmäusen eine deutlich erniedrigte thermische Schmerzschwelle verglichen mit den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen, wie Abbildung 4.2 D zeigt. Zu Stunde 6 nahm die Empfindlichkeit für den Hitzereiz bei den Wildtypmäusen gegenüber den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen signifikant zu, was bis zur Stunde 10 beobachtet werden konnte [$F(4,34) = 2,958$; $p = 0,034$].

Insgesamt kann festgehalten werden, dass $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen eine weniger ausgeprägte Pfotenschwellung aufwiesen. Ihre mechanische Druckschmerzschwelle war geringfügig niedriger zu Beginn der Entzündung, ihre thermische Schmerzschwelle dagegen signifikant niedriger. Die nicht entzündeten Hinterpfoten wiesen bei den Wildtypmäusen signifikant höhere Druckschmerzschwellen auf, die thermischen Schmerzlatenzen nahmen dagegen ab. Damit ist festzustellen, dass das Ausschalten von $\text{IFN}\gamma$ die mechanische und thermische Hyperalgesie im entzündeten Gewebe reduziert.

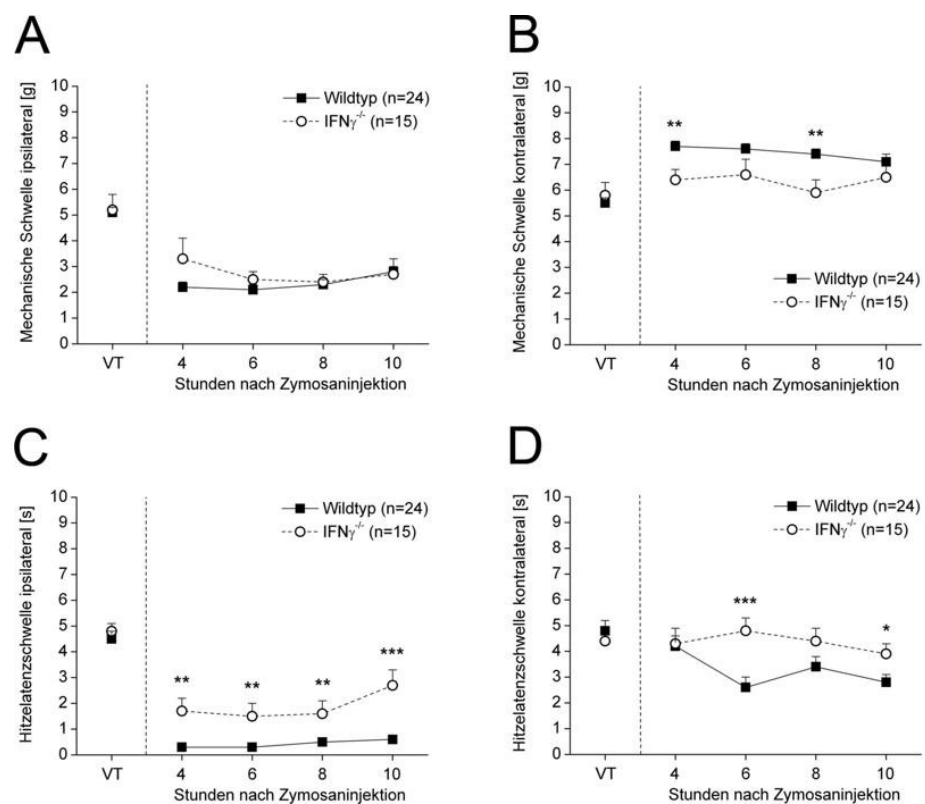


Abbildung 4.2: Mechanische Schwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Pfoten der $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.1 * = $< 0,05$; ** = $< 0,01$; *** = $< 0,001$.

4.2 Wirkung von IFN γ und anti- IFN γ unabhängig von einer Entzündung

Um herauszufinden, ob der monoklonale Antikörper gegen IFN γ selbst zu einer Entzündung in unbeschädigtem Gewebe führt, wurde den Wildtypmäusen anti-IFN γ bzw. den IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen IFN γ intraplantar injiziert. Es wurde keine Entzündung durch Zymosaninjektion in die linke Hinterpfote ausgelöst.

4.2.1 Schwere der Entzündung

4.2.1.1 Schwellung

Nachdem die IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse IFN γ intraplantar in die linke Hinterpfote injiziert bekommen hatten, nahm der Pfortendurchmesser im Vergleich zu den mit anti-IFN γ behandelten Wildtypmäusen geringfügig zu, die Differenz wurde jedoch nicht signifikant [$F(4,7) = 1,900$; $p = 0,215$] (Abb. 4.3 A). Allerdings nahm die Schwellung bei den IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen bis zur Stunde 8 fast bis auf das Niveau der Wildtypmäuse ab. Eine geringfügige Zunahme in beiden Gruppen trat bis Stunde 10 noch einmal auf.

4.2.1.2 Histologie der plantaren Pfothenhaut

Analog zu den geringfügigen Unterschieden der Pfortendurchmesser konnte in der histopathologischen Auswertung kein Unterschied bezüglich der Leukozyteneinwanderung festgestellt werden [$F = 0,074$; $p = 0,791$] (Abb. 4.3 B). In der histologischen Aufarbeitung fiel bei den Wildtypmäusen eine größere Anzahl an Stromazellen auf, die durch längliche blaue Zellkerne charakterisiert waren. Diese Zellen waren keine eingewanderten Leukozyten.

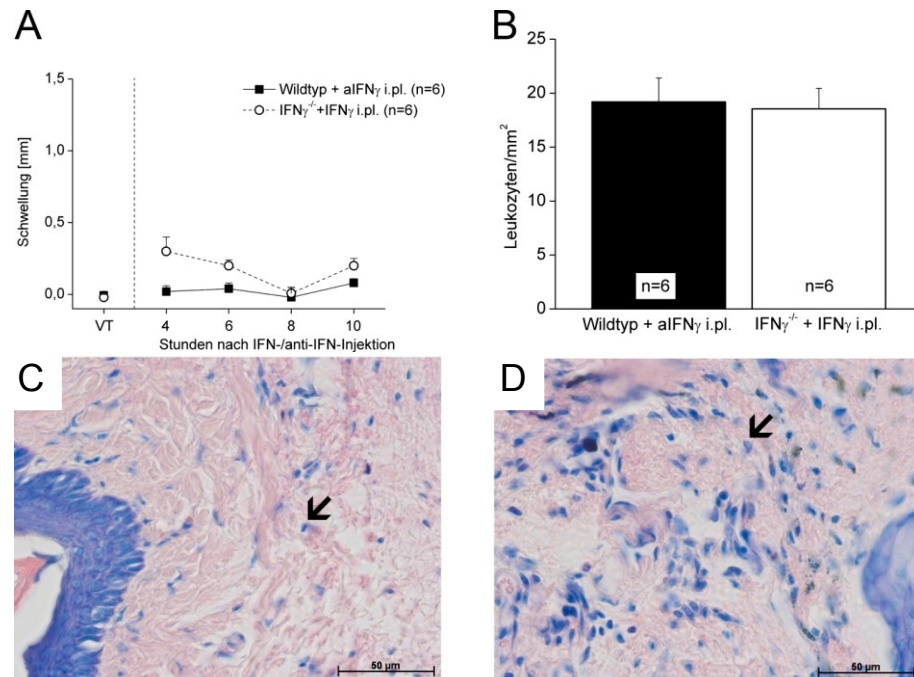


Abbildung 4.3: Differenz der Pfotendurchmesser (links–rechts) der mit IFN γ behandelten IFN γ ^{-/-}-Mäuse bzw. der mit anti-IFN γ behandelten Wildtypmäusen in Abwesenheit der akuten Entzündung (A), sowie die Leukozyten pro mm² beider Gruppen im Vergleich (B). Legende: siehe Abbildung 4.1, C/D: Hinterpfotenschnittpräparate in Pappenheimfärbung einer IFN γ ^{-/-}-Maus (Abb. C) und einer Wildtypmaus (Abb. D), die Pfeile zeigen auf einzelne Leukozyten.

4.2.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

4.2.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung zeigten sich zwischen den Wildtypmäusen und IFN γ ^{-/-}-Mäusen und zwischen rechten und linken Hinterpfoten keine signifikanten Unterschiede. Die mechanische Schwelle der linken behandelten Hinterpfote blieb nach der Substanzinjektion bei beiden Gruppen über den Beobachtungszeitraum nahezu gleich (Abb. 4.4 A). Wie in Abbildung 4.4 B zu sehen ist, konnte bei beiden Versuchsgruppen auch keine signifikante Veränderung der Wegzugsschwelle in den rechten Hinterpfoten beobachtet werden.

4.2.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Im Gegensatz zur mechanischen Schwelle zeigte sich bei den Hitzelatenzzeiten, dass die alleinige Injektion von entweder anti-IFN γ in die Wildtypmäuse oder IFN γ in die IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen schon zu einer Reduktion der Schmerzschwellen in den linken Hinterpfoten führte. Dieser Effekt bildete sich gruppengleich zwischen Stunde 4 und Stunde 6 aus. Dabei nahm die Sensibilität bei den Wildtypmäusen geringer zu als bei den IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen, glich sich diesen jedoch in Stunde 8 und 10 an. Wie man in Abbildung 4.4 C sieht, entwickelten sich dabei keine signifikanten Schwellenunterschiede [$F(4,7) = 1,411$; $p = 0,323$].

Auch bei der Untersuchung der rechten Hinterpfoten kam es bei beiden Gruppen zu einem Anstieg der Sensibilität für Hitze, der seinen Maximalwert in Stunde 10 des Beobachtungszeitraumes erreichte. Die IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse wiesen etwas geringere Latenzzeiten auf als die Wildtypmäuse (Abb. 4.4 D). Es gab keine signifikanten Differenzen [$F(4,7) = 0,766$; $p = 0,580$].

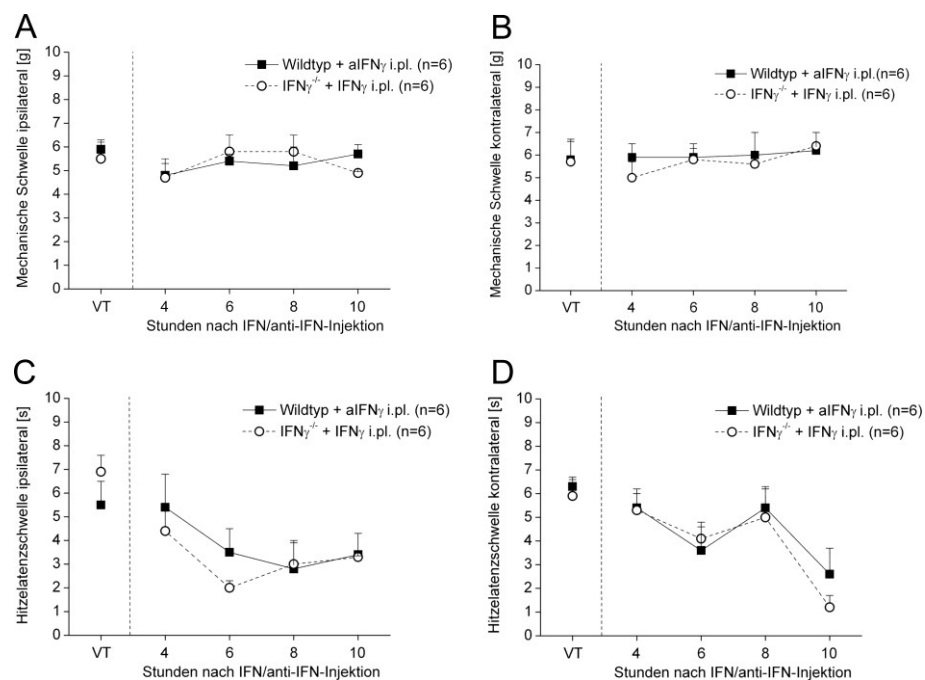


Abbildung 4.4: Mechanische Schmerzschwelle der linken entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Hinterpfoten (B) der behandelten Wildtypmäusen im Vergleich zu den IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen in Abwesenheit der akuten Entzündung. Sowie Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.1., aIFN γ – anti-IFN γ .

Sowohl bei der Betrachtung der Pfotenschwellung und der Leukozyteneinwanderung, als auch bei der Betrachtung der Schwellenveränderungen bei noxischer Stimulation konnten keine signifikanten Gruppenunterschiede bestimmt werden. Vergleicht man dagegen die mit $\text{IFN}\gamma$ behandelten $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse mit den Tieren, die Zymosan in die linke Hinterpfote appliziert bekamen (siehe 4.1), so wird deutlich, dass Interferon alleine keine charakteristischen Änderungen der Schwellen verursacht (siehe Abbildung 4.1-4.2). Bei den Wildtypmäusen ist zu beobachten, dass ein Blockieren der Interferon-Wirkung durch anti-Interferon in Abwesenheit von Zymosan zu keiner Schwellenveränderung führt, im Gegensatz zu den mit Zymosan behandelten Tieren, welche eine deutliche Abnahme der Schwellen der linken Hinterpfoten aufwiesen (siehe Abbildung 4.1-4.2). Somit ergibt sich eine Zunahme der thermischen und mechanischen Hyperalgesie, wenn $\text{IFN}\gamma$ den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen substituiert wird.

4.3 Abhängigkeit des schmerzassoziierten Verhaltens vom Vorhandensein von $\text{IFN}\gamma$

4.3.1 Applikation von $\text{IFN}\gamma$

Um zu überprüfen, ob der Effekt des fehlenden $\text{IFN}\gamma$ durch Substitution umkehrbar ist, wurde im Folgenden untersucht, welchen Einfluss die intraplantare (lokale) bzw. intraperitoneale (systemische) Substitution von $\text{IFN}\gamma$ bei $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen auf den Verlauf der akuten Entzündung und auf die Empfindlichkeit gegenüber schmerzhaften Reizen hat.

4.3.1.1 Schwere der Entzündung

4.3.1.1.1 Schwellung

In der Vortestung gab es bei keiner der Gruppen eine Pfotenschwellung. Zwischen intraplantarer, intraperitonealer oder fehlender Substitution zeigte sich eine signifikante Zeit-Behandlungs-Interaktion [$F(8,36) = 2,236$; $p = 0,047$]: Im Vergleich zu den unbehandelten $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen zeigten die intraplantar behandelten Tiere in Stunde 10 eine signifikant größere Schwellung der entzündeten Hinterpfoten.

Weiterhin fiel auf, dass die intraperitoneal behandelten Tiere gegenüber den intraplantar behandelten Tieren eine weniger ausgeprägte Schwellung während des Untersuchungszeitraumes hatten. Zwischen der unbehandelten und der intraperitoneal behandelten Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede. Es ist festzuhalten, dass die unbehandelten Tiere am Ende des Untersuchungszeitraumes eine geringere Pfortenschwellung aufwiesen als die übrigen Gruppen (Abb. 4.5 A).

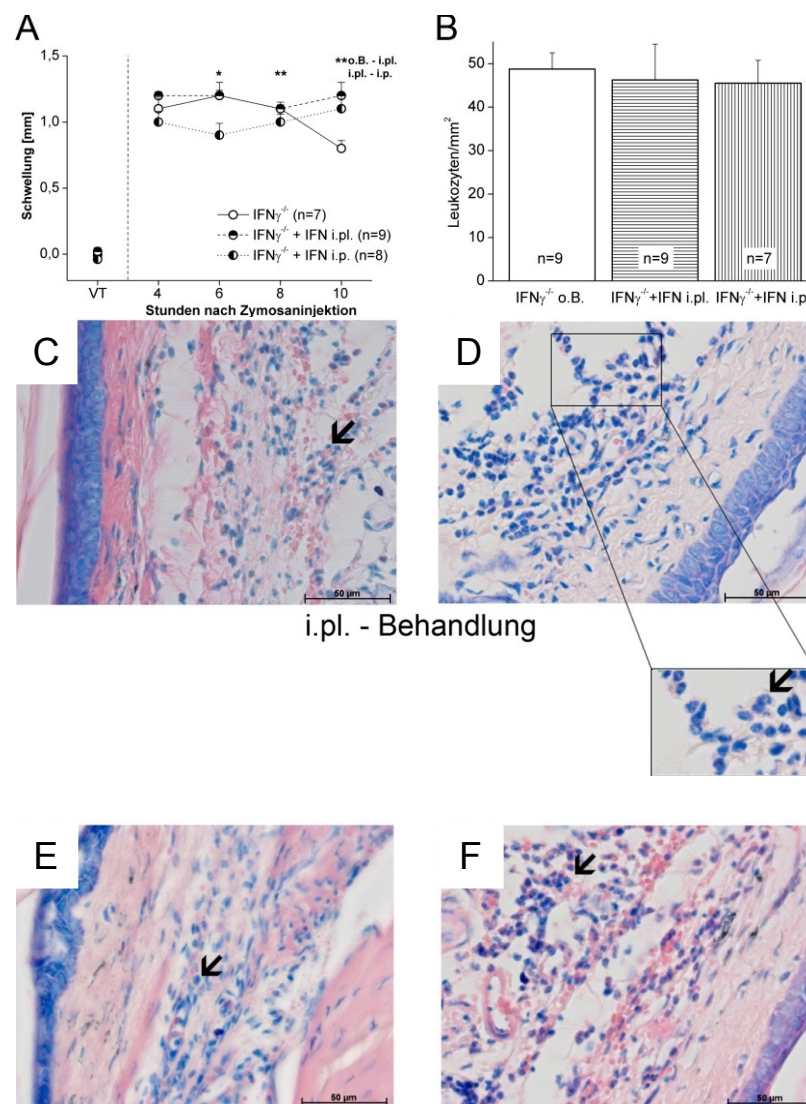


Abbildung 4.5: Differenz der Pfortendurchmesser (links – rechts) der unbehandelten und der i.pl. bzw. i.p. mit IFN γ behandelten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse während der akuten Entzündung (A), sowie die Leukozyten pro mm² aller 3 Gruppen im Vergleich (B). Legende: o.B. – unbehandelte IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse, i.pl. – intraplantare IFN γ -Applikation, i.p. – intraperitoneale IFN γ -Applikation. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. VT – Vortestung (ohne Entzündung, ohne Therapie). Mittelwerte \pm SEM, C-F: Ausschnitte aus Schnittpräparaten der linken Hinterpfoten in Pappenheimfärbung, C – IFN $\gamma^{-/-}$ -Maus mit i.pl. Applikation von IFN γ , D – Wildtypmaus mit i.pl. Applikation von aIFN γ , E – IFN $\gamma^{-/-}$ -Maus mit i.p. Applikation von IFN γ , F – Wildtypmaus mit i.p. Applikation von aIFN γ ; die Pfeile zeigen auf eingewanderte Leukozyten.

4.3.1.1.2 Histologie der plantaren Pfotenhaut

Bei der histologischen Beurteilung der Leukozyteninvasion konnte zwischen keiner der drei beobachteten Gruppen ein Unterschied festgestellt werden [$F = 1,130$; $p = 0,337$] (Abbildung 4.5 B). Für einen besseren Vergleich sind hier die histologischen Bilder von mit anti-IFN γ behandelten Wildtypmäusen (Abbildung 4.5 D und F) eingefügt. Dabei fällt auf, dass auch bei den Wildtypmäusen keine andere Leukozyteneinwanderung zu verzeichnen war.

4.3.1.2 Schmerzassoziertes Verhalten

4.3.1.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Die Vortestungen erfolgten an gesunden unbehandelten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen. Nach Auslösung der Entzündung kam es zu einer Abnahme der Sensibilitätsschwellen der entzündeten linken Hinterpfoten, welche sich über den Untersuchungszeitraum nicht wieder normalisierten (Abbildung 4.6 A). Die Gruppen reagierten überwiegend gleich [$F(8,52) = 1,791$; $p = 0,100$]. Es fiel auf, dass bei den beiden mit IFN γ substituierten Gruppen initial eine etwas größere Schwellenabnahme zu verzeichnen war, als bei der nicht substituierten Gruppe.

An den rechten Hinterpfoten konnte man sehen, dass die mit IFN γ behandelten Tiere über den gesamten Untersuchungszeitraum höhere Schwellen aufwiesen, als die unbehandelten Tiere (Abbildung 4.6 B). Die Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen und zur unbehandelten Gruppe sind nicht signifikant [$F(8,52) = 0,595$; $p = 0,777$].

4.3.1.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Die Latenzen gegenüber den noxischen Hitzereizen nahmen bei den IFN γ -substituierten Tieren stärker ab, als bei den nicht substituierten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen (Abbildung 4.6 C). Zwischen den beiden behandelten Gruppen und der unbehandelten Gruppe gab es bei den linken Hinterpfoten [$F(8,52) = 1,965$; $p = 0,070$] und auch bei den rechten Kontroll-Hinterpfoten [$F(8,52) = 1,411$; $p = 0,214$] zu keinem Zeitpunkt der Untersuchung statistisch signifikante Unterschiede (Abbildung 4.6 D).

Insgesamt ist festzuhalten, dass intraplantar und intraperitoneal appliziertes IFN γ in IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen bei einer Entzündung mit einer Zymosankonzentration von 12 mg eine etwas stärkere Schwellung der behandelten Hinterpfoten, sowie eine geringfügig stärkere thermische und mechanische Hyperalgesie induzieren kann.

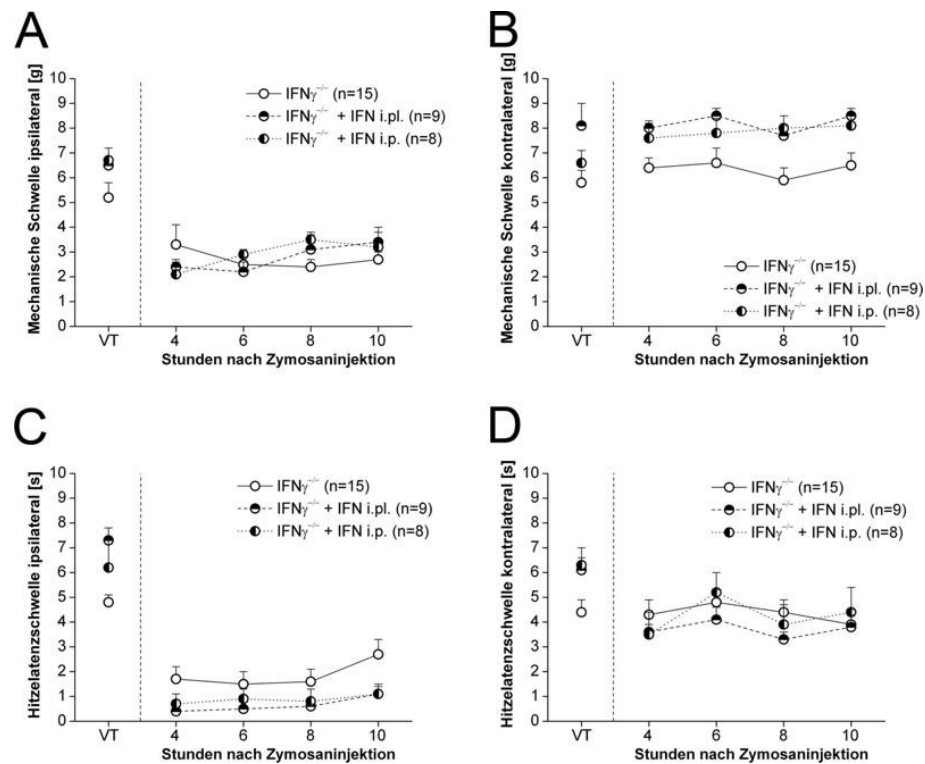


Abbildung 4.6: Mechanische Schwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Pfoten (B) der unbehandelten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den i.pl. bzw. i.p. behandelten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abb. 4.5.

4.3.2 Applikation von anti-IFN γ

Weiterhin war zu überprüfen, ob bei Wildtypmäusen durch Applikation von anti-IFN γ eine Wegnahme des IFN γ erzielt werden kann und damit ein Effekt ähnlich dem bei unbehandelten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen ausgelöst wird. Hierbei wurde eine Gruppe als Kontrolle mit NaCl behandelt, der zweiten Gruppe wurde anti-IFN γ intraplantar und einer weiteren Gruppe anti-IFN γ intraperitoneal injiziert, um eventuelle systemische Effekte zu erfassen.

4.3.2.1 Schwere der Entzündung

4.3.2.1.1 Schwellung

Die Vortestung erfolgte an gesunden unbehandelten Wildtypmäusen und zeigte keine Schwellungen. Bei allen drei Versuchsgruppen konnte eine deutliche Schwellung nach Entzündungsinduktion festgestellt werden. Bei keiner der Gruppen wurde eine merkliche Rückbildung der Schwellung beobachtet. Allerdings unterschied sich die Ausbildung der Pfotenschwellung der intraplantar mit anti-IFN γ behandelten Tiere deutlich gegenüber den unbehandelten, insofern sie zur 4., 8. und 10. Stunde eine signifikant geringere Zunahme der Durchmesser der Pfoten aufwiesen [F(8,48) = 2,988; p = 0,008]. Abbildung 4.7 A zeigt weiterhin, dass die intraperitoneale Behandlung keine so starken Effekte erzielte, was zur Stunde 8 besonders deutlich wurde, da hier bei der intraplantaren Behandlung wiederum eine signifikant geringere Ausprägung der Schwellung gemessen wurde.

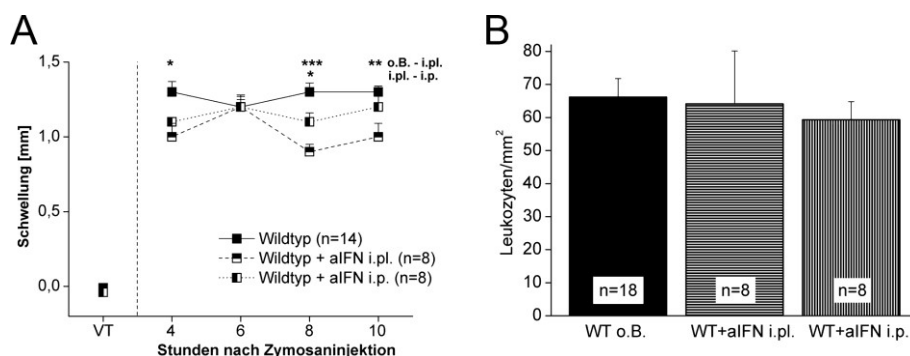


Abbildung 4.7: Differenz der Pfotendurchmesser (links – rechts) der unbehandelten und der i.pl. bzw. i.p. mit anti-IFN γ behandelten Wildtypmäuse während der akuten Entzündung (A), sowie die Anzahl der eingewanderten Leukozyten aller 3 Gruppen im Vergleich (B). Legende: * = p < 0,05; ** = p < 0,01; *** = p < 0,001. VT – Vortestung (ohne Entzündung, ohne Therapie). Mittelwerte \pm SEM. o.B. – unbehandelte Wildtypmäuse, i.pl. – intraplantare aIFN γ -Applikation, i.p. – intraperitoneale aIFN γ -Applikation.

4.3.2.1.2 Histologie der plantaren Pfotenhaut

Durch die Auswertung der histologischen Präparate konnten keine eindeutigen Unterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen beschrieben werden. Sowohl die intraplantare, als auch die intraperitoneale Behandlung bewirkten eine ähnlich ausgeprägte Leukozyteninvasion als histopathologisches Zeichen einer akuten Entzündung, wie sie auch bei unbehandelten Wildtypmäusen gesehen wurde (Abb. 4.7 B). Die Anzahl der Leukozyten pro Quadratmillimeter lag im Mittel bei ca. 65 Zellen.

Diese Infiltration war etwa um den Faktor 3 größer als bei Wildtypmäusen ohne Zyosanentzündung (siehe Abbildung 4.3).

4.3.2.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

4.3.2.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung der gesunden Wildtypmäuse zeigten sich bereits zwischen den drei Versuchsgruppen Unterschiede. Wie in Abbildung 4.8 A dargestellt, waren die mechanischen Schmerzschwellen der linken entzündeten Hinterpfoten während fast des gesamten Untersuchungszeitraumes bei den intraplantar mit anti-IFN γ behandelten Tieren nicht so stark herabgesetzt wie bei den unbehandelten Wildtypmäusen.

Der Effekt der intraperitonealen Behandlung unterschied sich dagegen kaum von der Nichtbehandlung. So war zu Stunde 10 die mechanische Schmerzschwelle in beiden Gruppen signifikant niedriger als bei der intraplantar behandelten Versuchsgruppe [$F(8,68) = 2,296$; $p = 0,031$].

Bei der Betrachtung der mechanischen Schwellen an den rechten Hinterpfoten in Abbildung 4.8 B kann man bei den drei Gruppen keine Verminderung, sondern sogar eine Zunahme der Schwellen im Vergleich zur Vortestung und der entzündeten linken Seite erkennen.

Die mechanischen Schwellen der unbehandelten Wildtypmäuse stiegen während des Untersuchungszeitraumes geringfügig an. Zwischen Stunde 4 und 8 kam es zu einer weiteren Zunahme der mechanischen Schwellen bei den intraplantar und intraperitoneal behandelten Tieren. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren jedoch insignifikant [$F(8,68) = 1,875$; $p = 0,078$].

4.3.2.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Wie in Abbildung 4.8 C zu sehen ist, kam es nach der Entzündung bei allen Versuchsgruppen über den gesamten Zeitverlauf zu einer Abnahme der Hitzelatenzzeiten.

Die intraperitoneale Substanzapplikation bewirkte über die Zeit keinen Unterschied der Hitzelatenzen im Vergleich zu den unbehandelten Wildtypmäusen. Dagegen konnte zwischen Stunde 6 und 8 eine signifikant längere Latenzzeit bei den intraplantar behandelten Tieren im Vergleich zu unbehandelten Tieren nachgewiesen werden [$F(8,68) = 4,675$; $p < 0,001$].

Die Messungen der Hitzelatenzen der rechten Hinterpfoten ergaben über den gesamten Untersuchungszeitraum sehr inhomogenen Ergebnisse. Bei allen Gruppen kam es zu einer Abnahme der Hitzelatenzzeiten auf der rechten Seite nach Entzündungsinduktion in der linken Hinterpfote. Die intraplantar behandelten Tiere zeigten eine relative Normalisierung der thermischen Latenzzeiten in Stunde 8 bis 10 des Beobachtungszeitraumes. Bei den unbehandelten Wildtypmäusen und bei der intraperitoneal behandelten Gruppe kam es im gleichen Zeitraum zu einer weiteren Abnahme der thermischen Schmerzschwelle [$F(8,68) = 2,580$; $p = 0,016$] (Abb. 4.8 D).

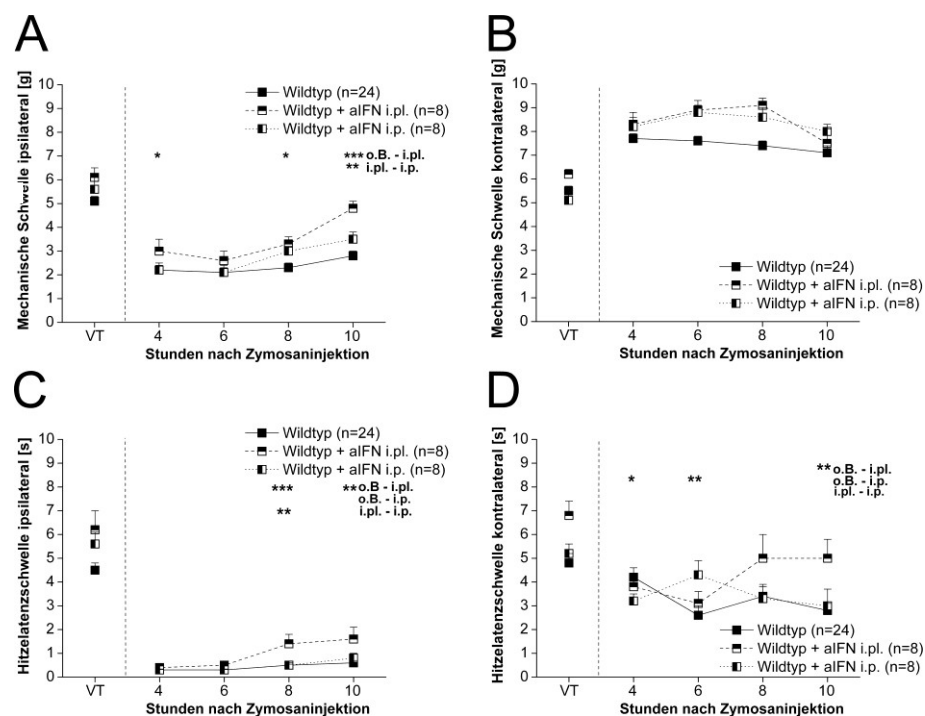


Abbildung 4.8: Mechanische Schmerzschwellen der linken entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Hinterpfoten (B) der behandelten Wildtypmäuse in Bezug auf die unbehandelten Kontrollen im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.7; o.B. – unbehandelte Wildtypmäuse, i.pl. – intraplantare aIFN γ -Applikation, i.p. – intraperitoneale aIFN γ -Applikation.

Insgesamt bewirkte die intraplantare Behandlung der Wildtypmäuse mit anti-IFN γ , gemessen an der Hinterpfotenschwellung, eine Verringerung der akuten Entzündung und eine verminderte Druck- und Hitzesensibilität gegenüber ihren Vergleichsgruppen.

Die intraperitoneal behandelten Wildtypmäuse zeigten bei der Pfortenschwellung nahezu den gleichen Verlauf wie die unbehandelten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse und auch bei der ipsilateralen Hitzelatenzzeit zeichnete sich ein ähnlicher Verlauf ab. Dagegen war die Abnahme der mechanischen Schmerzschwelle bei den intraplantar behandelten Wildtypmäusen geringer als bei allen IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen.

4.4 Abhängigkeit des schmerzassoziierten Verhaltens von der Zymosankonzentration

In den bisher dargestellten Untersuchungen wurde zur Auslösung der Entzündung immer eine Konzentration von 12 mg/ml Zymosan mit einem Injektionsvolumen von 20 μ l verwendet. Diese Konzentration wurde für die weiteren Versuche auf 6 mg/ml Zymosan bei gleichbleibendem Injektionsvolumen reduziert, um zu überprüfen, ob die oben beschriebenen Beobachtungen hinsichtlich der Wirkung von IFN γ von der Stärke der Entzündungsreaktion abhängig sind.

4.4.1 Applikation von IFN γ

4.4.1.1 Schwere der Entzündung

Um zu beschreiben, wie stark die akute Entzündung ausgeprägt ist, wurde wieder die Differenz der Durchmesser zwischen linker und rechter Hinterpfote bestimmt. Insgesamt gab es einen signifikanten Zeit-Gruppen-Effekt [F(8,36) = 2,236; p = 0,047]. Wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist, kam es in allen drei Versuchsgruppen (keine Behandlung, i.pl. und i.p. Substitution mit IFN γ bei IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäusen) nach Auslösen der Entzündung zu einer deutlichen Volumenzunahme der linken Hinterpfote. Bis zur Stunde 8 der Versuchszeit entwickelte sich jedoch kein eindeutiger Unterschied zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Die Stärke der Schwellung nahm kaum weiter zu.

Erst zu Stunde 10 konnte beobachtet werden, dass die Pfortenschwellung der unbehandelten Tiere signifikant stärker abnahm als bei den intraplantar behandelten Tieren. Auch die Schwellung der intraperitoneal behandelten Gruppe nahm gegenüber den intraplantar behandelten Tieren stärker ab, welche sogar noch eine geringfügige Zunahme der Pfortenschwellung erkennen ließen.

Der Verlauf der Pfortenschwellung dieser mit 6 mg/20 μ l Zymosan behandelten $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse unterscheidet sich insgesamt nicht von den Messdaten der mit 12 mg/20 μ l Zymosan behandelten $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse (vgl. Abb. 4.5 mit Abb. 4.9).

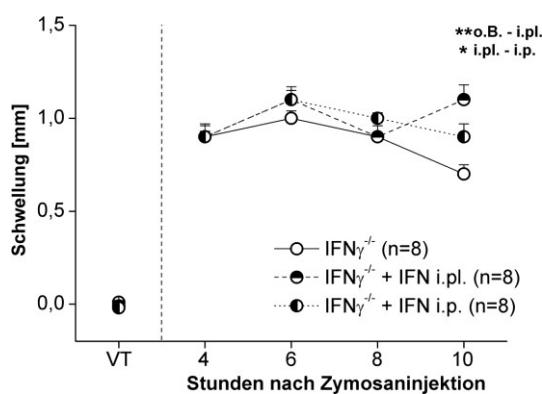


Abbildung 4.9: Differenz der Pfortendurchmesser (links – rechts) der unbehandelten, i.pl. bzw. i.p. mit $\text{IFN}\gamma$ behandelten $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse während der akuten Entzündung. Legende: siehe Abbildung 4.5.

4.4.1.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

4.4.1.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung gab es zwischen den Untersuchungsgruppen keine Unterschiede. Die mechanischen Schwellen nahmen in den entzündeten linken Hinterpfoten in allen drei Versuchsgruppen zu Beginn der Testung auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes (Vortestung) ab. In Abbildung 4.10 A ist zu sehen, dass sich die drei Gruppen nicht unterschieden [$F(8,36) = 1,235$; $p = 0,307$].

Die mechanischen Schwellen der gesunden rechten Hinterpfoten nahmen während der gesamten Versuchszeit gegenüber der Vortestung zu und verblieben auf dem Niveau von Stunde 4 [$F(8,36) = 0,515$; $p = 0,837$] (Abbildung 4.10 B).

4.4.1.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Die Messung der Hitzelatenzzeiten zeigte zu Testbeginn (wie bei der mechanischen Schwelle) eine Verminderung auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes, der in allen Gruppen gleich ausgeprägt war. Während der weiteren Beobachtungszeit konnte auch hier kein signifikanter Gruppenunterschied ermittelt werden [$F(8,36) = 0,832$; $p = 0,580$].

Zu Stunde 6 und 8 wurden die drei Versuchsgruppen noch sensibler gegenüber den Hitzereizen als in Stunde 4. Die Latenzen bei den intraplantar behandelten Tieren stiegen in Stunde 10 etwas an (Abb. 4.10 C).

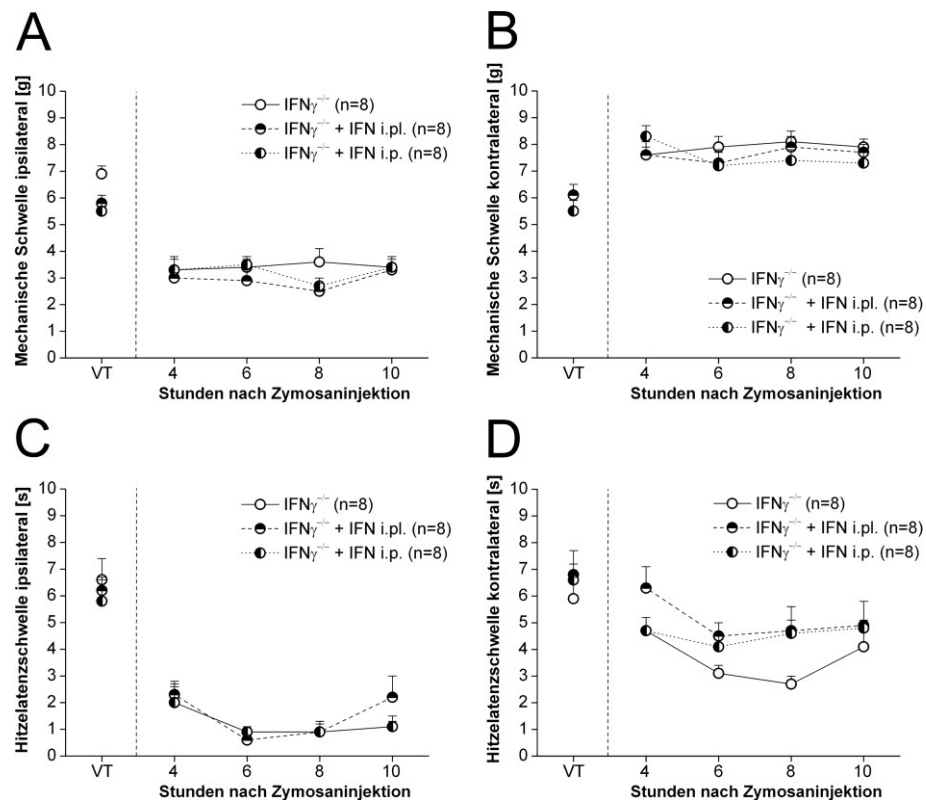


Abbildung 4.10: Mechanische Schwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Pfoten der unbehandelten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den i.pl. bzw. i.p. mit IFN γ substituierten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.5.

Kontralateral sanken die Latenzzeiten ebenfalls ab, wenn auch nicht so ausgeprägt wie an der entzündeten linken Hinterpfote. Doch hier zeigte sich im Vergleich zu den behandelten Gruppen, dass die unbehandelten IFN $\gamma^{-/-}$ -Mäuse wesentlich sensibler gegenüber dem Hitzereiz reagierten.

Besonders in Stunde 8 war der Unterschied am deutlichsten, wie in Abbildung 4.10 D zu sehen ist. Die Differenz bildete sich aber bis zu Stunde 10 fast vollständig zurück, sodass insgesamt keine signifikante Zeit-Gruppen-Interaktion vorlag [$F(8,36) = 0,640$; $p = 0,739$].

Die Hitzelatenzzeiten der mit 6 mg/20 μ l Zymosan entzündeten $IFN\gamma^{-/-}$ -Mäuse sanken im Vergleich zu den mit 12 mg/20 μ l Zymosan entzündeten $IFN\gamma^{-/-}$ -Mäusen zur Stunde 4 weniger ab, doch im weiteren Verlauf verhielten sich die mit Interferon intraplantar bzw. intraperitoneal behandelten Gruppen nahezu deckungsgleich (vgl. Abb. 4.6 C mit Abb. 4.10 C).

Insgesamt kommt es auch bei einer Applikation von 6 mg/20 μ l Zymosan zu einer Entzündungsreaktion der linken Hinterpfote mit eindeutig zuordenbaren Schwellenveränderungen. Der Entzündungsverlauf scheint sich nicht von dem bei 12 mg / 20 μ l Zymosan zu unterscheiden. Die Effekte der $IFN\gamma$ -Substitution waren gering ausgeprägt. Signifikante $IFN\gamma$ -Effekte sind offensichtlich nur bei stärkeren Entzündungen (12 mg / 20 μ l Zymosan) von Bedeutung.

4.4.2 Applikation von anti- $IFN\gamma$ bei Wildtypmäusen

Es sollte überprüft werden, ob die Effekte von $IFN\gamma$ auf die akute Entzündung bei Wildtypmäusen durch die Wegnahme von $IFN\gamma$ umkehrbar sind. Es wurden im Folgenden wieder drei Gruppen gebildet, eine blieb als Kontrollgruppe unbehandelt, die beiden anderen erhielten entweder eine intraplantare bzw. intraperitoneale Applikation von anti- $IFN\gamma$.

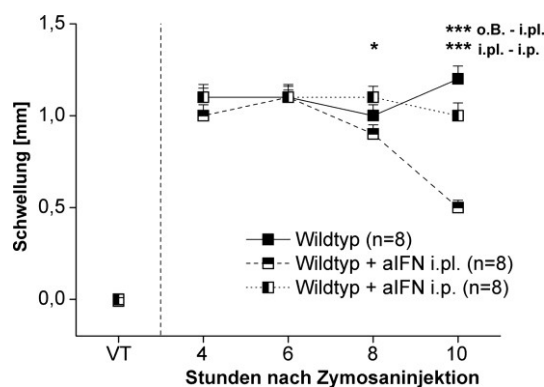


Abbildung 4.11: Differenz der Pfortendurchmesser (links – rechts) der unbehandelten, i.pl. bzw. i.p. mit anti- $IFN\gamma$ behandelten Wildtypmäuse während der akuten Entzündung. Legende: siehe Abbildung 4.7.

4.4.2.1 Schwere der Entzündung

In der Vortestung gab es in keiner Gruppe eine Pfortenschwellung. Bei allen drei Versuchsgruppen konnte nach Auslösen der Entzündung eine deutliche Zunahme des linken Hinterpfotendurchmessers bestimmt werden. Allerdings zeigten die intraplantar IFN γ -neutralisierten Tiere von Stunde 8 bis Stunde 10 eine signifikant stärkere Abnahme der Pfortenschwellungen, sowohl gegenüber den unbehandelten Wildtypmäusen, als auch gegenüber den intraperitoneal behandelten Tieren [$F(8,36) = 5,324$; $p < 0.001$] (Abb. 4.11).

Vergleicht man die Schwellungen dieser Wildtypmäuse mit den Wildtyp-Gruppen, welche 12 mg/20 μ l Zymosan injiziert bekamen, fällt auf, dass die intraplantar behandelten Wildtypmäuse in Abbildung 4.11 die deutlichste Abnahme der Schwellung aufweisen; dagegen verhalten sich die anderen Behandlungsgruppen sowohl in Abbildung 4.7 als auch in Abbildung 4.11 nahezu gleich.

4.4.2.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

4.4.2.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung unterschieden sich die mechanischen Schwellen der drei Versuchsgruppen nicht. Nach Auslösung der Entzündung mit 6 mg/20 μ l Zymosan konnte man beobachten, dass sich auch hier die Wegzugsschwellen aller drei Versuchsgruppen auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes aus der Vortestung verminderten. Dabei war in Stunde 4 die Verminderung der mechanischen Schwellen bei den unbehandelten Wildtypmäusen geringer verglichen mit den beiden anderen Gruppen. Bis zum Ende der Beobachtungszeit nahmen die mechanischen Schwellen aller drei Gruppen wieder leicht zu, blieben aber insignifikant unter dem Vortestungswert [$F(8,36) = 1,209$; $p = 0,321$] (Abb. 4.12 A).

In Abbildung 4.12 B kann man sehen, dass sich bei allen drei Gruppen die mechanische Schmerzschwelle der Hinterpfoten auf der gesunden Seite veränderten und leicht anstiegen. Ab Stunde 8 ließ sich wiederum eine Abnahme der Schwelle in Richtung des Vortestniveaus verzeichnen. Signifikante Gruppenunterschiede gab es nicht [$F(8,36) = 1,301$; $p = 0,274$].

Verglichen mit den mit 12 mg/20 μ l Zymosan substituierten Wildtypmäusen zeigten die mit 6 mg/20 μ l entzündeten Wildtypmäuse (Abb. 4.12 A) gegenüber der Vortestung eine geringere Zunahme der mechanischen Hyperalgesie. Die mechanischen Schwellen der intraperitoneal bzw. nicht behandelten Gruppen der mit 6 mg/20 μ l Zymosan entzündeten Wildtypmäuse normalisierten sich besser als in der Behandlungsgruppe mit höherer Zymosan-Konzentration (vgl. Abb. 4.8 A mit Abb. 4.12 A).

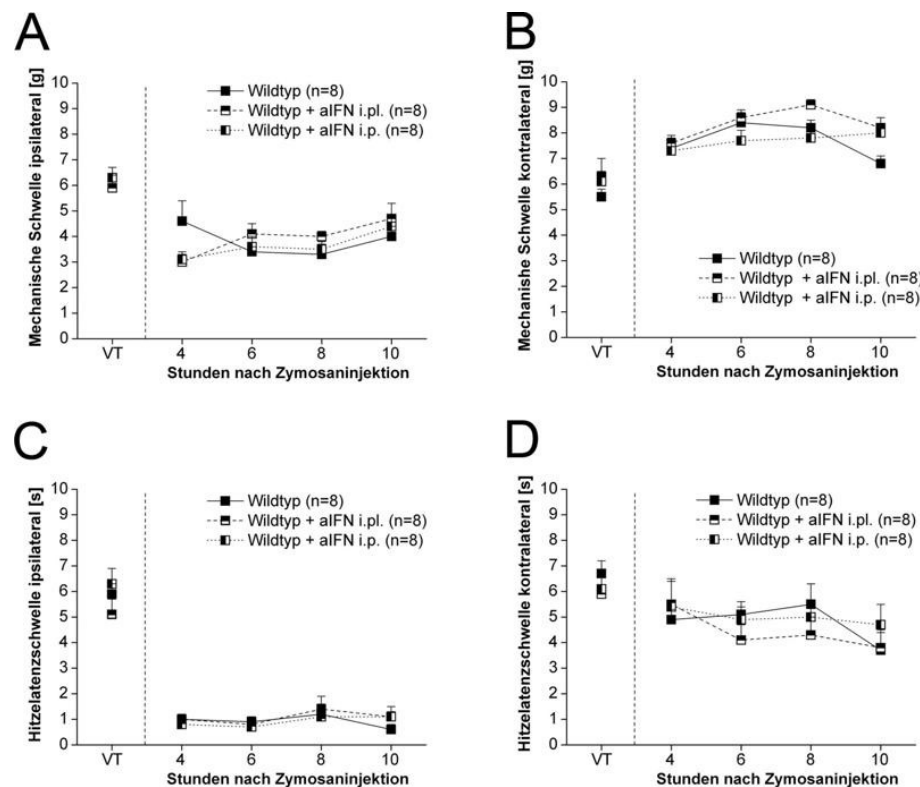


Abbildung 4.12: Mechanische Schmerzschwellen der linken entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Hinterpfoten (B) der behandelten Wildtypmäuse in Bezug auf die unbehandelten Kontrollen im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.7.

4.4.2.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung unterschieden sich die Schwellenwerte zwischen den Gruppen und den rechten und linken Hinterpfoten nicht. Alle Tiere zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum kürzere Wegzugslatenzen der entzündeten linken Hinterpfote gegenüber der Vortestung. Es gab zwischen den Gruppen bei den Hitzelatenzzeiten der linken Hinterpfoten keinen Unterschied [$F(8,36) = 0,456$; $p = 0,878$] (Abb. 4.12 C).

Die Wegzugszeiten der nicht entzündeten rechten Hinterpfoten verminderten sich nur gering im Vergleich zur Vortestung und zur linken Hinterpfote. Es gab auch hier keine signifikanten Gruppenunterschiede [$F(8,36) = 0,348$; $p = 0,940$] (Abb. 4.12 D).

Gegenüber den mit 12 mg/20 μ l Zymosan entzündeten Wildtypmäusen war bei den weniger stark entzündeten Tieren (6 mg/12 μ l Zymosan) die Abnahme der Hitzelatenzzeiten nicht so stark ausgeprägt. Sie normalisierten sich jedoch nicht deutlich besser. Letztendlich kam es zu nahezu gleichen Endwerten wie in den Behandlungsgruppen aus Kapitel 4.5.1 (vgl. Abb. 4.8 C mit Abb. 4.15 C).

Zusammenfassend ließen sich zwischen den drei mit 6 mg/20 μ l Zymosan entzündeten Wildtyp-Gruppen unabhängig von einer Behandlung mit anti-IFN γ keine signifikanten Unterschiede in den Schwellen für schmerzhafte Reize finden. Dagegen unterschied sich die Pfortenschwellung der intraplantar mit anti-IFN γ behandelten Tiere deutlich von den Werten der anderen Gruppen.

4.5 Untersuchung der systemischen Midazolam-Wirkung in Abhängigkeit von der IFN γ -Applikation

Ein weiterer Teil der Untersuchungen war, zu überprüfen, inwiefern das GABAerge System eine Rolle bei der Ausbildung einer akuten Entzündung spielt und welchen Einfluss es auf die mechanische und Hitzesensibilität nimmt. Aus diesem Grund wurde im folgenden Teilversuch das Benzodiazepin Midazolam, welches an GABA_A-Rezeptoren als Agonist wirkt, vor Stunde 8 intraperitoneal appliziert. Die Entzündungsinduktion erfolgte mit 12 mg/ 20 μ g Zymosan.

4.5.1 Schwere der Entzündung

4.5.1.1 Schwellung

Nachdem nach Induktion der Entzündung bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen und den Wildtypmäusen die linken Hinterpfoten sichtbar angeschwollen waren, konnte im weiteren Verlauf beobachtet werden, dass zur Stunde 6 die Pfoten der Wildtypmäuse noch weiter anschwellen, wohingegen die Schwellungen bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen bis zum Versuchsende nahezu konstant blieben [F(4,7) = 4,863; p = 0,034].

Wie in Abbildung 4.13 A dargestellt ist, konnte nach Applikation von Midazolam vor Stunde 8 (7 Stunden nach Auslösen der Entzündung) eine Angleichung der Pfortenschwellung bei den Wildtypmäusen auf das Niveau der $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse beobachtet werden.

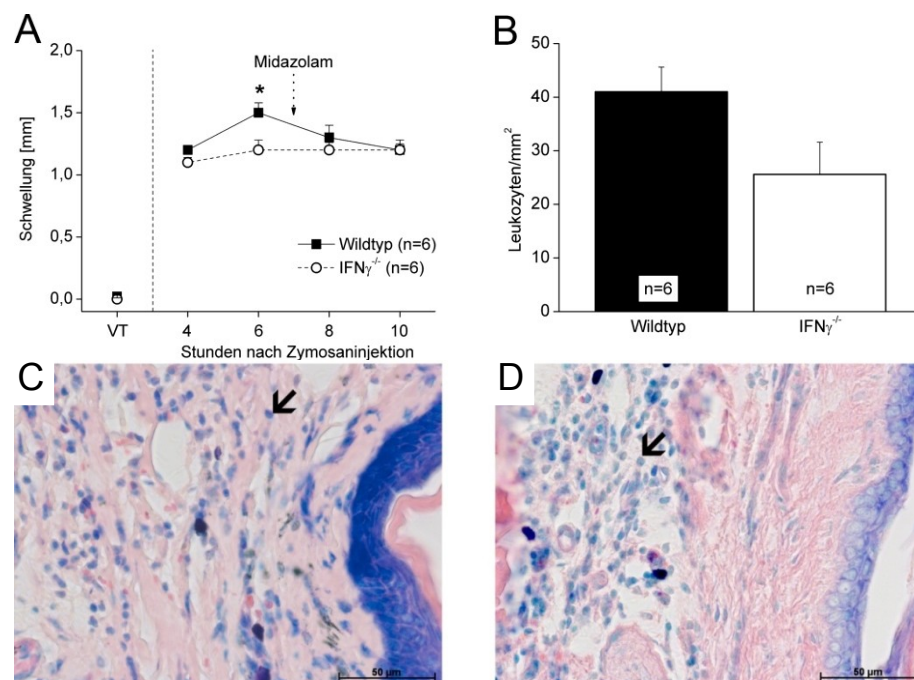


Abbildung 4.13: Midazolam-Applikation vor Stunde 8 nach Entzündungsinduktion. Differenz der Hinterpfotendurchmesser (links – rechts) der $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung (A), sowie Leukozyten pro mm^2 im Vergleich (B) Legende: siehe Abbildung 4.1; C/D: representative Schnittpräparate der linken Hinterpfoten nach i.p. Applikation von Midazolam bei $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen (Abbildung C) und bei Wildtypmäusen (Abbildung D); die Pfeile zeigen auf eingewanderte Leukozyten.

4.5.1.2 Histologie der plantaren Pfotenhaut

Die Auswertung der histologischen Schnitte ergab, dass sich die $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse nur unerheblich von den Wildtypmäusen unterschieden, wie Abbildung 4.13 B deutlich macht. Die durchschnittliche Anzahl der eingewanderten Leukozyten unterschied sich nicht signifikant zwischen den beiden Untersuchungsgruppen. Dies wird auch in Abbildung 4.13 C ($\text{IFN}\gamma^{-/-}$ - Mäuse) und D (Wildtypmäuse) illustriert.

4.5.2 Schmerzassoziertes Verhalten

4.5.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Infolge der Entzündung zeigten die $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse und die Wildtypmäuse eine reduzierte mechanische Schwelle. Dabei war zur Stunde 4 die Sensibilitätszunahme bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen deutlich geringer ausgeprägt, jedoch glichen sich beide Gruppen im weiteren Verlauf der Untersuchung nahezu aneinander an. Abbildung 4.14 A zeigt, dass zu Beginn der 8. Stunde nach Entzündungsinduktion bis zum Ende der Messung bei beiden Gruppen die mechanische Schwelle bis auf den Ausgangswert der $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse zu Stunde 4 anstieg [$F(4,7) = 1,519$; $p = 0,295$]. Bei der Betrachtung der mechanischen Schwelle für die rechten Hinterpfoten ließ sich kein signifikanter Gruppenunterschied nachweisen, wie in Abbildung 4.14 B zu erkennen ist [$F(4,7) = 0,686$; $p = 0,624$]. Sowohl die $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse als auch die Wildtypmäuse wiesen über den gesamten Zeitverlauf eine leichte Zunahme der Schwellen für die rechten Hinterpfoten auf, ohne dabei signifikante Abweichungen voneinander auszubilden.

4.5.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Während die Hitzelatenz bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen zur Vortestung deutlich höher lag als bei den Wildtypmäusen, verschwand diese Differenz nach Auslösen der Entzündung und beide Gruppen wiesen über den gesamten Zeitverlauf eine Abnahme der Latenzen auf, wie in Abbildung 4.14 C zu erkennen ist [$F(4,7) = 2,357$; $p = 0,152$].

Die Tendenz einer Normalisierung der thermischen Latenzzeiten wurde durch die Midazolamgabe kaum beeinflusst.

Dagegen waren die thermischen Latenzzeiten bei den rechten nicht entzündeten Hinterpfoten zunächst deutlich verkürzt, stiegen zur Stunde 6 in beiden Gruppen leicht an und nahmen nach Gabe von Midazolam wieder in beiden Gruppen auf das Niveau des 4-Stundenwertes ab [F(4,7) = 0,422; p = 0,789] (Abb. 4.14 D).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Behandlung mit Midazolam im Wesentlichen dazu führte, dass die mechanischen und thermischen Schwellen der entzündeten Hinterpfoten sich wieder tendenziell normalisierten. Die Schwellung der Pfoten verstärkte sich nicht weiter. Ein Unterschied zwischen den Genotypen war nicht nachzuweisen

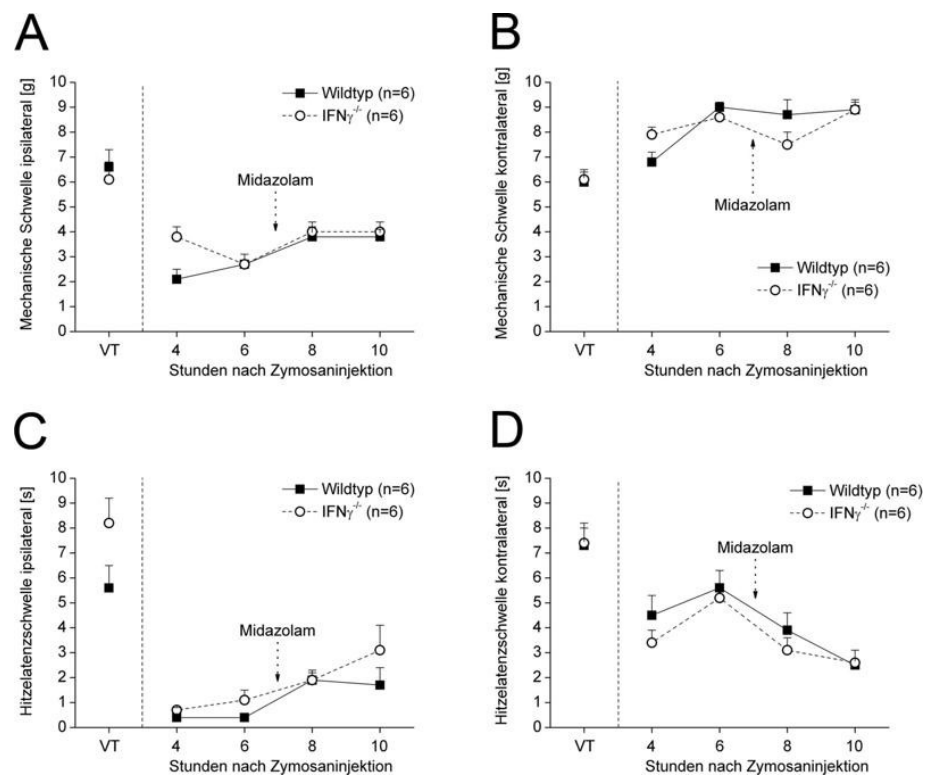


Abbildung 4.14: Mechanische Schmerzschwellen der linken entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Hinterpfoten (B) der IFN γ ^{-/-}-Mäuse in Bezug auf die Wildtypmäuse im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.3.

4.6 Effekte weiterer Zytokine und Zytokinmodulatoren auf den Entzündungsschmerz

In den nachfolgenden Experimenten wurde die Entzündung mittels einer Zymosankonzentration von 12 mg/ 20 μ l induziert. Das Protein p19 und das Protein p35 sind wichtige Bestandteile der Interleukine IL-12 und IL-23. In den nachfolgenden Untersuchungen sollte geprüft werden, ob ein Ausschalten dieser Bestandteile ein anderes schmerzassoziiertes Verhalten bzw. andere Entzündungsverläufe nach Zymosaninjektion nach sich zieht.

4.6.1 p19-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen

4.6.1.1 Schwere der Entzündung

Vor Auslösung einer Entzündung gab es in beiden Gruppen keine Pfotenschwellungen. Die Schwellungen der entzündeten linken Hinterpfoten nahmen bei den p19^{-/-}-Mäusen zwischen der 4. und 6. Teststunde zu, gingen jedoch bis Stunde 10 wieder etwas zurück und blieben auf dem Niveau von Stunde 4. Im Gegensatz dazu blieben die Schwellungen bei den Wildtypmäusen über die gesamte Zeit auf gleichem Niveau. In Abbildung 4.16 ist zu sehen, dass der Unterschied zwischen beiden Tiergruppen zur Stunde 6 signifikant wird [$F(4,19) = 3,808$; $p = 0,019$].

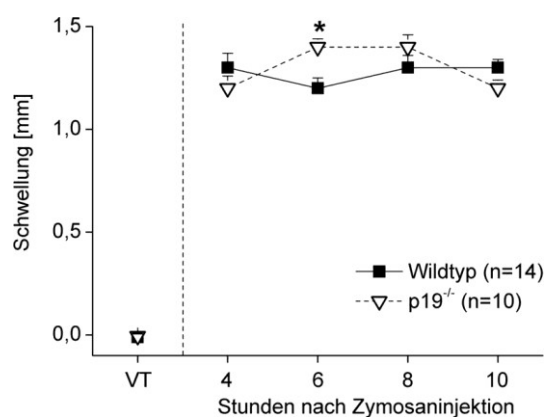


Abbildung 4.16: Differenz der Hinterpfotendurchmesser (links – rechts) der p19^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Legende: siehe Abbildung 4.1.

4.6.1.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

4.6.1.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

In der Vortestung konnten keine Gruppenunterschiede bei den mechanischen und thermischen Schwellen in den linken und rechten Hinterpfoten gemessen werden. Abbildung 4.17 A zeigt die mechanischen Schwellen der entzündeten linken Hinterpfoten, die nach der Entzündungsinduktion für beide Gruppen etwa 5 Gramm unter denen der nicht entzündeten rechten Hinterpfoten waren. Zwischen den Tiergruppen gab es dabei nur geringe, nicht signifikante Unterschiede. Abbildung 4.17 B zeigt, dass die mechanischen Schwellen der rechten Hinterpfoten nach Auslösung der Entzündung links leicht anstiegen, aber in beiden Gruppen auf einem gleich bleibenden Niveau blieben.

4.6.1.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Bei der Messung der Hitzelatenzzeiten wiesen beide Versuchsgruppen bei den entzündeten linken Hinterpfoten eine starke Abnahme der Zeiten auf, die sich bis zum Ende der Testung nicht mehr normalisierten (Abb. 4.17 C). Auch bei den nicht-entzündeten rechten Pfoten wurde bei beiden Gruppen über die Zeit von 10 Stunden eine geringfügige Abnahme der Wegzugszeiten beobachtet (Abb. 4.17 D). Zwischen beiden Tiergruppen konnten sowohl für die entzündeten [$F(4,29) = 1,822$; $p = 0,151$], als auch für die nicht-entzündeten Hinterpfoten [$F(4,29) = 1,476$; $p = 0,235$] keine signifikanten Unterschiede gemessen werden.

Aus diesen Ergebnissen ist zu schließen, dass eine Ausschaltung von p19 die Entzündungsreaktion nicht beeinflusst. Die mechanische Hyperalgesie bei den p19^{-/-}-Mäusen wird geringfügig abgeschwächt, die thermische Hyperalgesie im entzündeten Gewebe dagegen nicht.

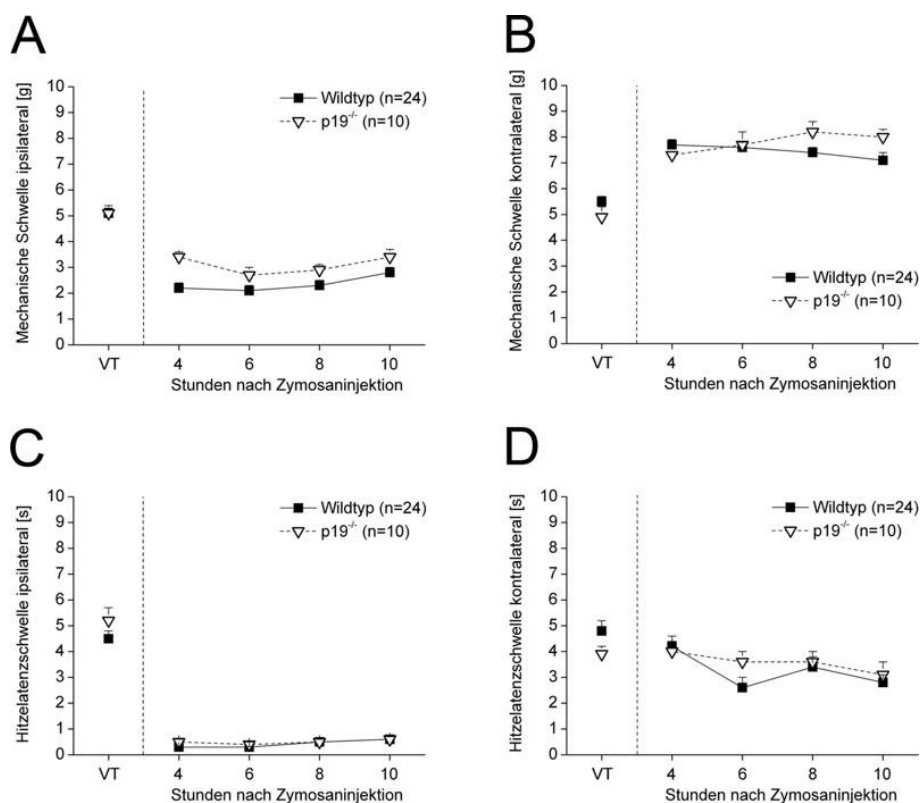


Abbildung 4.17: Mechanische Schwelle der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Pfoten der p19^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Sowie Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.1.

4.6.2 p35-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen

4.6.2.1 Schwere der Entzündung

Vor Auslösung der Entzündung gab es keine Schwellungen in den Hinterpfoten beider Tierversuchsgruppen. Vier Stunden nach Entzündungsauslösung waren die Schwellungen der linken Hinterpfoten im Vergleich zu den rechten bei den p35^{-/-}-Mäusen etwas geringer als bei den Wildtypmäusen. Die Differenz der Hinterpfotendurchmesser nahm bis zum Ende der Testung nur geringfügig ab [F(4,19) = 3,156; p = 0,038] (siehe Abb. 4.18).

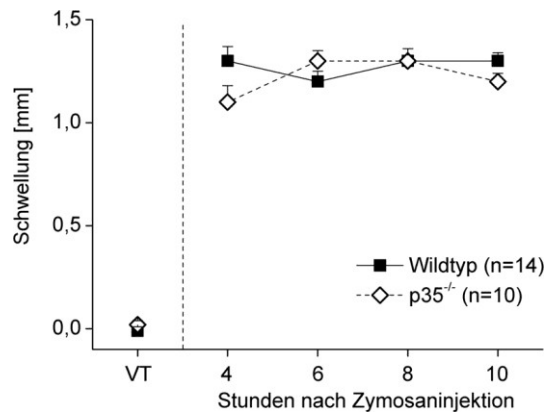


Abbildung 4.18: Differenz der Hinterpfotendurchmesser (links – rechts) der p35^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Legende: siehe Abbildung 4.1.

4.6.2.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

4.6.2.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung fanden wir keine Unterschiede in den mechanischen oder thermischen Schwellen der linken und rechten Hinterpfoten beider Tiergruppen. Vier Stunden nach Entzündungsinduktion waren die mechanischen Schwellen etwa 3,5 g niedriger als zur Vortestung. Dabei war kein Unterschied der Wegzugslatenzen der linken Hinterpfoten zwischen den p35^{-/-}-Mäusen und den Wildtypmäusen zu erkennen. (Abb. 4.19 A). In den nicht entzündeten rechten Hinterpfoten stiegen die mechanischen Schwellen in beiden Gruppen um etwa 2 g an und änderte sich bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes nicht (Abb. 4.19 B).

4.6.2.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Die thermische Hyperalgesie beider Gruppen von Versuchstieren zeigte über den Untersuchungszeitraum einen ähnlichen Verlauf wie bei den p19^{-/-}-Mäusen (siehe 4.6.1.2.2.). Auch hier fanden wir eine starke Verkürzung der thermischen Latenzzeiten für die entzündeten linken Hinterpfoten (Abb. 4.19 C). In beiden Gruppen kam es über den Beobachtungszeitraum zu einer langsamen Abnahme der thermischen Latenzen in den rechten nicht entzündeten Hinterpfoten (Abb. 4.19 D).

Die Ausschaltung von p35 nimmt offenkundig keinen Einfluss auf die Ausprägung einer Entzündung. Mechanische und thermische Hyperalgesie nach einer Entzündungsinduktion unterscheiden sich nicht von den Wildtyp-Tieren.

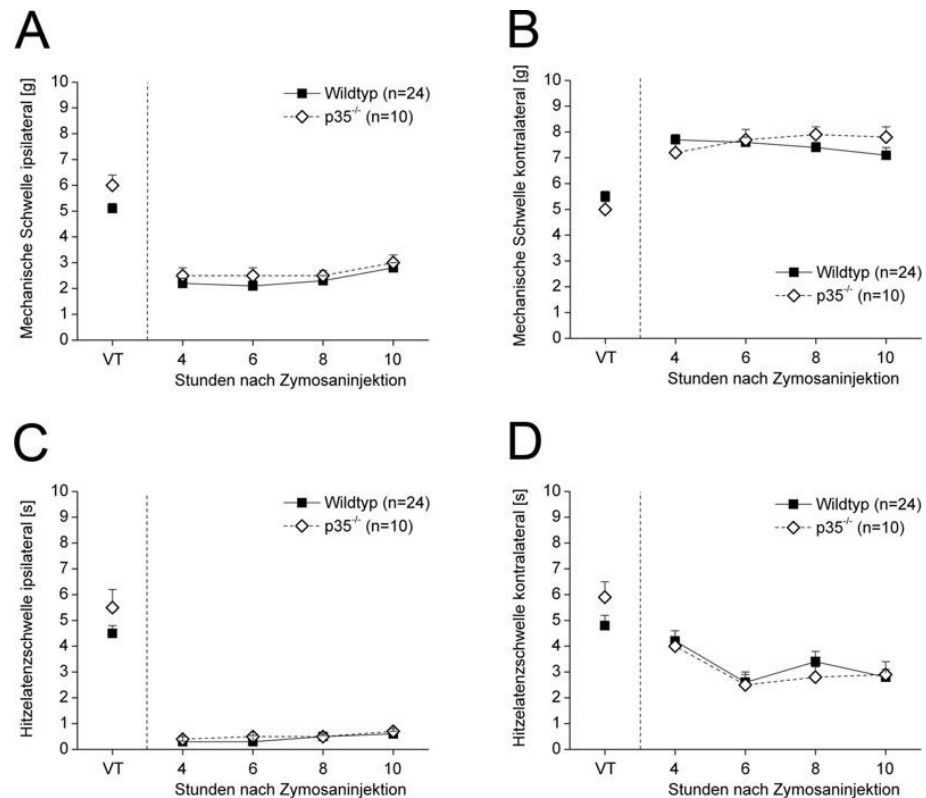


Abbildung 4.19: Mechanische Schwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten (B) Pfoten der p35^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.1.

4.6.3 p35p19-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen

4.6.3.1 Schwere der Entzündung

Es galt zu prüfen, ob ein Ausschalten beider Proteine (p35 und p19) in einem Tier einen anderen Effekt als das Ausschalten nur eines der beiden Proteine bewirken könnte. Auch die p35p19^{-/-}-Mäuse unterschieden sich in der Vortestung nicht von den Wildtyptieren und hatten keine Pfortenschwellungen.

Nachdem bei beiden Gruppen durch Zymosaninjektion (12 mg/ 20 μ l) die Entzündung der linken Hinterpfote ausgelöst wurde, konnte man zur Stunde 4 ein signifikant geringeres Anschwellen der Pfoten bei den p35p19^{-/-}-Mäusen beobachten [F(4,16) = 3,184; p = 0,042] (Abb. 4.20). Dieser Unterschied war in den darauffolgenden Versuchszeiten nicht mehr zu beobachten und die durchschnittliche Schwellung glich sich der der Wildtypmäuse an, welche über die gesamte Zeit auf gleichem Niveau verblieben war.

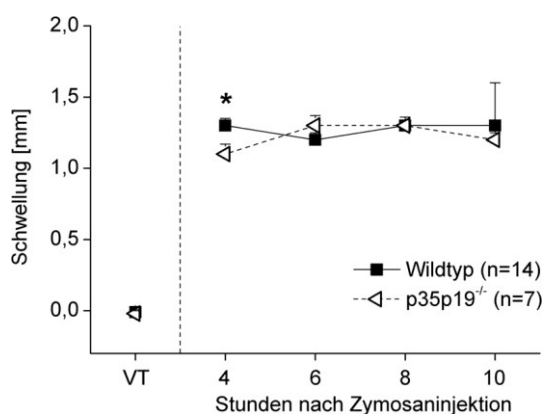


Abbildung 4.20: Differenz der Hinterpfotendurchmesser (links – rechts) der p35p19^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Legende: siehe Abbildung 4.1.

4.6.3.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

4.6.3.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung zeigten die beiden Versuchsgruppen weder in den mechanischen noch in den thermischen Schwellen signifikante Unterschiede. Bei der Messung der mechanischen Schwellen fand man bei den p35p19^{-/-}-Mäusen geringfügig weniger verminderte Wegzugsschwellen der entzündeten linken Hinterpfoten als bei den Wildtypmäusen. Dieser insignifikante Unterschied blieb bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes erhalten [F(4,26) = 1,361; p = 0,275] (Abb. 4.21 A).

Bei der Betrachtung der rechten nicht entzündeten Hinterpfoten zeigte sich in beiden Gruppen ein Anstieg der Wegzugsschwellen, der bis zur Stunde 10 erhalten blieb. Zur Stunde 4 war die Zunahme der Wegzugslatenzen für die Wildtypmäuse signifikant größer als bei den p35p19^{-/-}-Mäusen [F(4,26) = 2,781; p = 0,048] (Abb. 4.21 B).

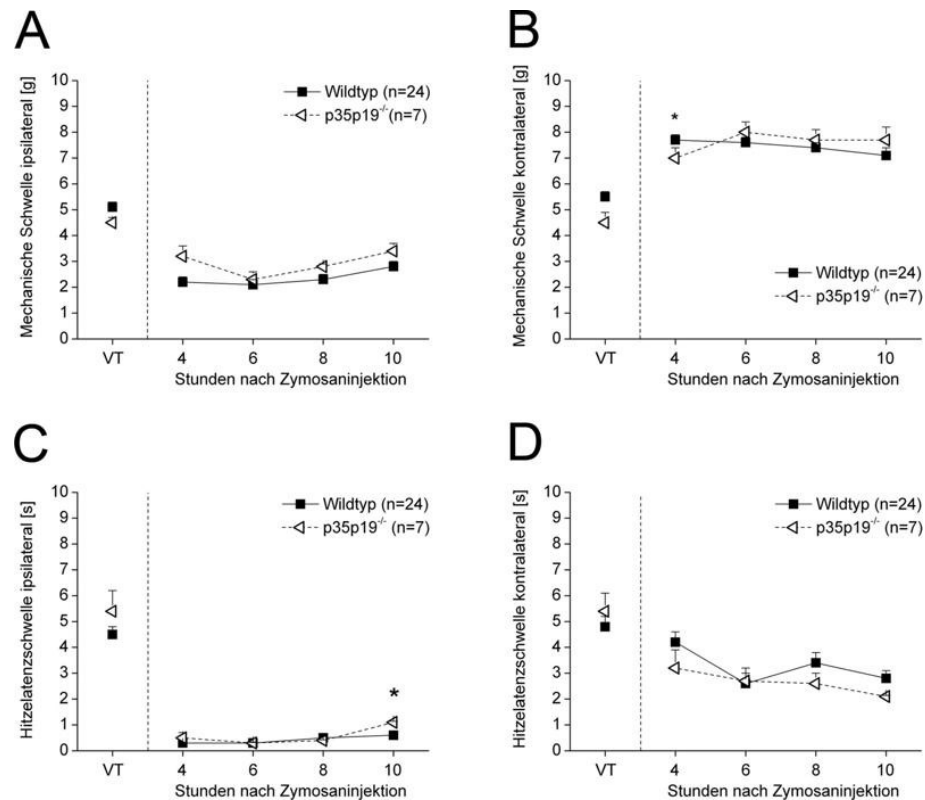


Abbildung 4.21: Mechanische Schwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten Pfoten (B) der $p35p19^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.1.

4.6.3.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Die Änderungen der thermischen Latenzzeiten waren fast deckungsgleich zu den Beobachtungen bei $p35^{-/-}$ - oder $p19^{-/-}$ -Mäusen. Vier Stunden nach Induktion der Entzündung waren in beiden Gruppen sehr geringe Schwellen für thermische Reize zu verzeichnen, die in der $p35p19^{-/-}$ -Gruppe bis zu Stunde 10 wieder leicht anstiegen und damit signifikant höher waren als die der Wildtypmäuse [$F(4,26) = 3,341$; $p = 0,025$] (Abb. 4.21 C). Über den Beobachtungszeitraum sanken die thermischen Latenzzeiten der nicht entzündeten rechten Hinterpfoten beider Tiergruppen leicht ab, die Unterschiede zwischen den Gruppen waren insignifikant [$F(4,26) = 0,896$; $p = 0,481$] (Abb. 4.21 D).

Die Ausschaltung beider Proteine p19 und p35 in einem Tier brachte keine anderen Ergebnisse, als die Ausschaltung jedes der beiden Proteine einzeln. Ein synergistisches Wirken auf die Entzündungsausprägung und/oder die Veränderung des schmerzassoziierten Verhaltens kann daher nicht angenommen werden.

Mit dieser Versuchsreihe wurde im Wesentlichen der Effekt der alleinigen Ausschaltung von p19 reproduziert.

4.6.4 IL-17p35-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen

Die Ausschaltung des Zytokins IL-17 nimmt den Hauptfaktor der T_{H17} -Zellen bei der Induktion einer Entzündung weg. Die zusätzliche Ausschaltung von p35 als Untereinheit des Zytokins IL-12 unterbindet weitere Signalübertragungswege bei der Entzündungsauslösung (siehe Einführung Abb. 2.2). Wenn beide Zytokine in einem Tier ausgeschaltet werden, könnte ein anderer Entzündungsverlauf entstehen. Dieses sollte mit einer Entzündung mit 12 mg / 20 μ l Zymosan getestet werden.

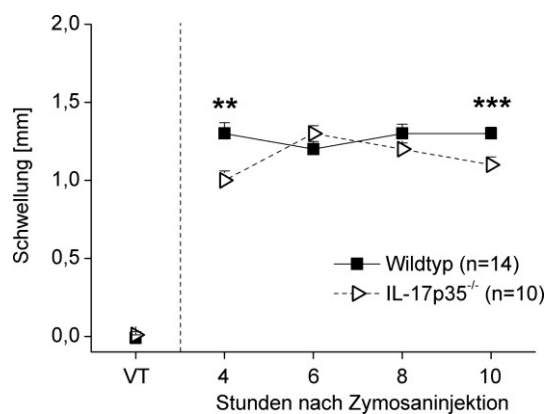


Abbildung 4.22: Differenz der Hinterpfotendurchmesser (links – rechts) der IL-17p35^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Legende: siehe Abbildung 4.1.

4.6.4.1 Schwere der Entzündung

Vor Auslösung einer zymosaninduzierten Entzündung gab es in beiden Tiergruppen keine Pfortenschwellung. In Abbildung 4.22 ist zu sehen, dass die Durchmesser der linken entzündeten Hinterpfoten bei den IL-17p35^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtypmäusen weniger zunahm. Besonders zur 4. und 10. Teststunde wurde der Unterschied signifikant [$F(4,19) = 5,972$; $p = 0,003$]. Die Schwellungen gingen jedoch nicht bis auf das Niveau der gesunden rechten Hinterpfoten zurück.

4.6.4.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

4.6.4.2.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Bei den Vortestungen konnten keine Unterschiede für mechanische oder thermische Schwellen in den rechten und linken Hinterpfoten beider Tiergruppen gefunden werden. Die Untersuchung der mechanischen Schwellen zeigt, dass die Wegzugslatenzen der linken entzündeten Hinterpfoten bei den IL-17p35^{-/-}-Mäusen in Stunde 4 nach Entzündungsinduktion signifikant weniger abnahmen als die der Wildtypmäuse [$F(4,29) = 2,952$; $p = 0,037$]. Im weiteren Beobachtungsverlauf unterschieden sich die mechanischen Schwellen der linken Hinterpfoten dann nicht mehr, von Stunde 8 bis Stunde 10 des Beobachtungszeitraumes war für beide Gruppen eine geringfügige Tendenz der Normalisierung zu verzeichnen (Abb. 4.23 A).

Abbildung 4.23 B zeigt, dass nach Induktion der Entzündung in beiden Tiergruppen die mechanischen Schwellen um ca. 2 g anstiegen. Die Wegzugsschwellen lagen für die IL-17p35^{-/-}-Mäuse zur Stunde 6 und 8 etwas höher gegenüber ihrer Vergleichsgruppe, unterschieden sich jedoch nicht signifikant [$F(4,29) = 2,354$; $p = 0,077$].

4.6.4.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Die Messungen der thermischen Latenzzeiten ergaben eine in Ausmaß und Zeitgang sehr ähnlichen Verlauf wie bei den vorher untersuchten p35^{-/-}- bzw. p19^{-/-}-Tieren. Die Hitzelatenzzeiten der entzündeten linken Hinterpfoten der IL-17p35^{-/-}-Mäuse waren zur Stunde 4 extrem niedrig und unterschieden sich nur insignifikant von denen der Wildtypmäuse [$F(4,29) = 2,634$; $p = 0,054$]. Über den Beobachtungszeitraum blieben die thermischen Hitzelatenzzeiten in beiden Gruppen unverändert niedrig (Abb. 4.23 C).

Die Latenzzeiten der rechten nicht entzündeten Hinterpfoten nahmen über den Untersuchungszeitraum leicht und kontinuierlich ab, zwischen den Versuchsgruppen gab es keine Unterschiede [$F(4,29) = 0,305$; $p = 0,873$] (Abb. 4.23 D).

Die Ausschaltung des Zytokins IL-17 und des Proteins p35 in einem Tier führte zu einer etwas geringeren Ausprägung der Entzündung und in der Anfangsphase nach Entzündungsauslösung zu einer geringeren Ausprägung der mechanischen Hyperalgesie. Für die thermische Hyperalgesie konnte kein Einfluss festgestellt werden.

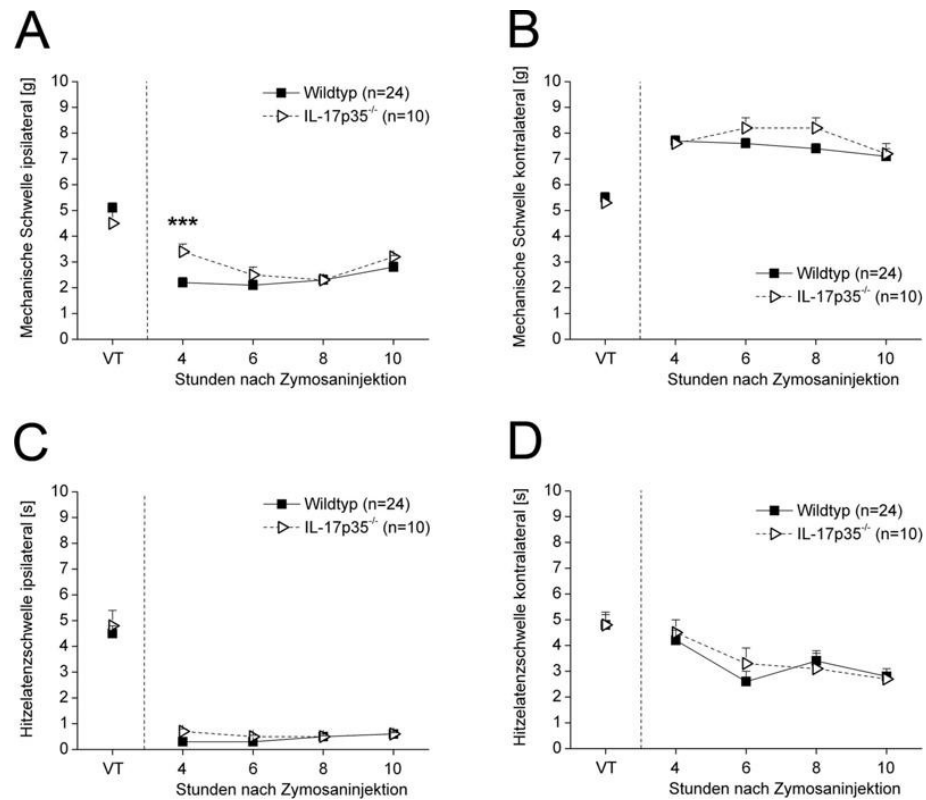


Abbildung 4.23: Mechanische Schwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten (B) Pfoten der IL-17p35^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.1.

4.6.5 IL-17-KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen

4.6.5.1 Schwere der Entzündung

Vor Auslösen der Entzündung mit 12 mg / 20 µl Zymosan gab es in beiden Tiergruppen keine Pftenschwellungen. Nach dem Auslösen der Entzündung in der linken Hinterpfote konnte eine deutliche Zunahme der Durchmessers sowohl bei den IL-17^{-/-}-Mäusen als auch bei den Wildtypmäusen beobachtet werden. Über den Beobachtungszeitraum von 10 Stunden gingen die Schwellungen bei den IL-17^{-/-}-Mäusen leicht zurück und waren ab Stunde 8 bis zum Beobachtungsende signifikant geringer als bei den Wildtypmäusen [$F(4,19) = 4,774$; $p = 0,008$] (Abb. 4.24).

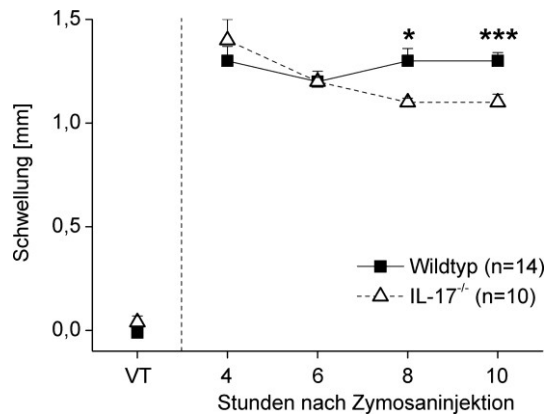


Abbildung 4.24: Differenz der Hinterpfotendurchmesser (links – rechts) der IL-17^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Legende: siehe Abbildung 4.1.

4.6.5.2 Schmerzassoziiertes Verhalten

4.6.5.2.1 Messung der primären mechanischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung zeigten die beiden Versuchsgruppen weder in den mechanischen noch in den thermischen Schwellen signifikante Unterschiede. Die mechanischen Schwellen nahmen nach Entzündungsinduktion in beiden Tiergruppen in den entzündeten linken Hinterpfoten ab. Die Schwellen der IL-17^{-/-}-Mäuse waren geringfügig größer, als die der Wildtypmäuse. Über den Beobachtungszeitraum von 10 Stunden stiegen die mechanischen Schwellen der IL-17^{-/-}-Mäuse zwischen Stunde 8 und 10 deutlich an, unterschieden sich aber nur insignifikant von denen der Wildtypmäuse [$F(4,29) = 0,762$; $p = 0,559$] (Abb. 4.25 A).

Dagegen stiegen die Schwellen der rechten nicht entzündeten Hinterpfoten in den IL-17^{-/-}-Mäusen etwas weniger an als in den Wildtypmäusen [$F(4,29) = 2,166$; $p = 0,098$]. Ab Stunde 6 bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes glichen sich die Schwellen beider Gruppen nahezu an und veränderten sich kaum weiter (Abb. 4.25 B).

4.6.5.2.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Zu Beginn der Untersuchung sanken die Wegzuglatenzen der entzündeten linken Hinterpfoten in beiden Gruppen sehr stark ab. Die niedrigen Latenzzeiten blieben bei den Wildtypmäusen über den Beobachtungszeitraum unverändert.

Dagegen stiegen die Schwellen bei den IL-17^{-/-}-Mäusen ab Stunde 8 nach Entzündungsinduktion wieder leicht an und waren in Stunde 10 signifikant höher als bei den Wildtypmäusen [F(4,29) = 3,334; p = 0,023] (Abb. 4.25 C). Die Analyse der Hitzelatenzzeiten der rechten nicht entzündeten Hinterpfoten ergab eine langsame und kontinuierliche Verkürzung in beiden Versuchsgruppen, die bei den Wildtypmäusen etwas stärker ausgeprägt war und über den Beobachtungszeitraum insignifikant niedrigere Hitzelatenzzeiten erreichte [F(4,29) = 2,159; p = 0,099] (Abb. 4.25 D).

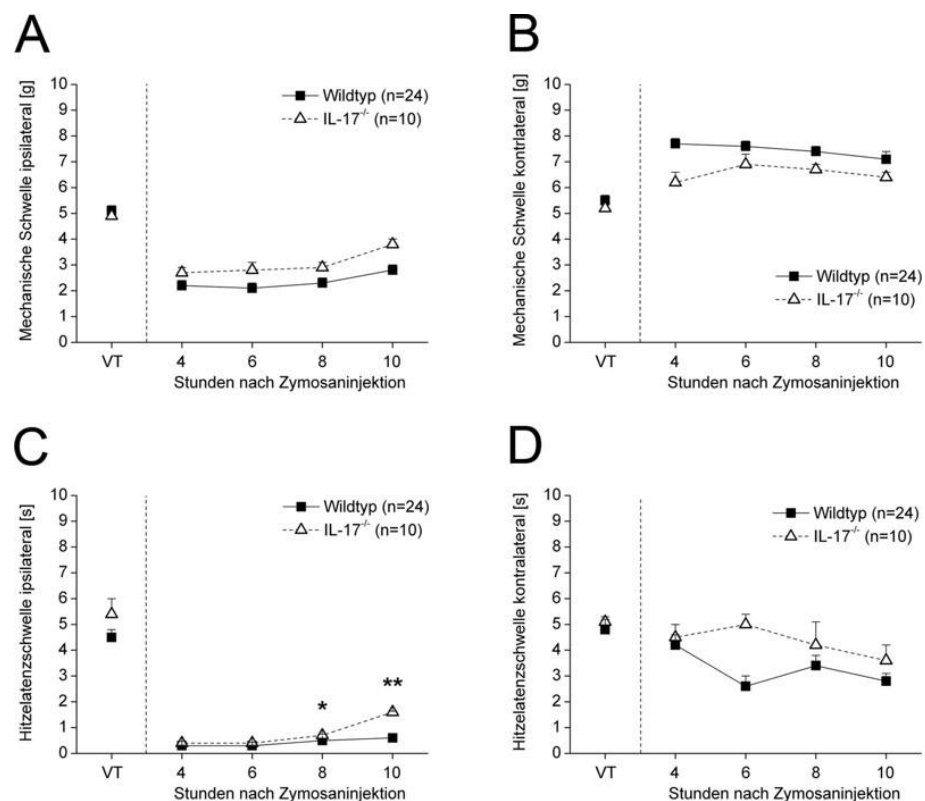


Abbildung 4.25: Mechanische Schwel len der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten (B) Pfoten der IL-17^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.1

Mit der Ausschaltung des Zytokins IL-17 konnte eine verringerte Ausprägung der Entzündung beobachtet werden. Die Entwicklung der mechanischen Hyperalgesie auf der entzündeten Seite war in den IL-17^{-/-}-Mäusen weniger ausgeprägt, auch auf der nicht entzündeten rechten Seite änderten sich die mechanischen Schwel len dieser Tiere kaum. Die thermische Hyperalgesie schien bei den IL-17^{-/-}-Mäusen zum Ende der Beobachtungszeit etwas abgeschwächt.

Diese Ergebnisse belegen die Bedeutung von IL-17 für die Ausbildung thermischer und mechanischer Hyperalgesie und die Ausprägung von Entzündungszeichen.

4.6.6 TIM-3 KO-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen

Das Protein TIM-3 reguliert die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine. Seine Ausschaltung könnte den Entzündungsverlauf bzw. das schmerzassoziierte Verhalten beeinflussen, was in Tieren mit Zymosanentzündung (12 mg/ 20 μ l) geprüft werden sollte. Da aus Voruntersuchungen bekannt war, dass TIM-3-defiziente Tiere hinsichtlich ihrer Pfotenschwellungen bei Entzündung keine Unterschiede zu Wildtyptieren aufweisen, wurde auf eine Analyse dieses Parameters bei den nachfolgenden Tiergruppen verzichtet.

4.6.6.1 Messung der mechanischen Hyperalgesie

Bei der Vortestung zeigten die beiden Versuchsgruppen weder in den mechanischen noch in den thermischen Schwellen signifikante Unterschiede. In Abbildung 4.26 A wird dargestellt, dass die Wegzugsschwellen der entzündeten linken Hinterpfoten der TIM-3^{-/-}-Mäuse nach Entzündungsinduktion über den Versuchszeitraum niedrigere Werte annahmen als die der Wildtypmäuse. Die mechanischen Schwellen der Hinterpfoten der Wildtypmäuse waren in Stunde 8 und 10 signifikant höher [$F(4,15) = 3,133$; $p = 0,046$]. Dagegen veränderten sich die mechanischen Schwellen der nicht entzündeten rechten Hinterpfoten in beiden Tiergruppen kaum und wiesen keine signifikanten Unterschiede auf [$F(4,15) = 0,213$; $p = 0,927$] (Abb. 4.26 B).

4.6.6.2 Messung der thermischen Hyperalgesie

Nach Auslösung der Entzündung nahmen die thermischen Latenzzeiten in beiden Versuchsgruppen auf der entzündeten Seite deutlich ab. Über den Beobachtungszeitraum konnte zwischen Stunde 8 und 10 eine tendenzielle Normalisierung beobachtet werden, dabei erreichten die TIM-3^{-/-}-Mäuse geringfügig höhere Werte als die Wildtypmäuse [$F(4,7) = 1,411$; $p = 0,323$] (Abb. 4.26 C).

Auf der nicht entzündeten rechten Seite veränderten sich die thermischen Latenzzeiten nur geringfügig. Zwischen den Versuchsgruppen gab es keine signifikanten Unterschiede im Beobachtungszeitraum [F(4,7) = 0,766; p = 0,215] (Abb. 4.26 D).

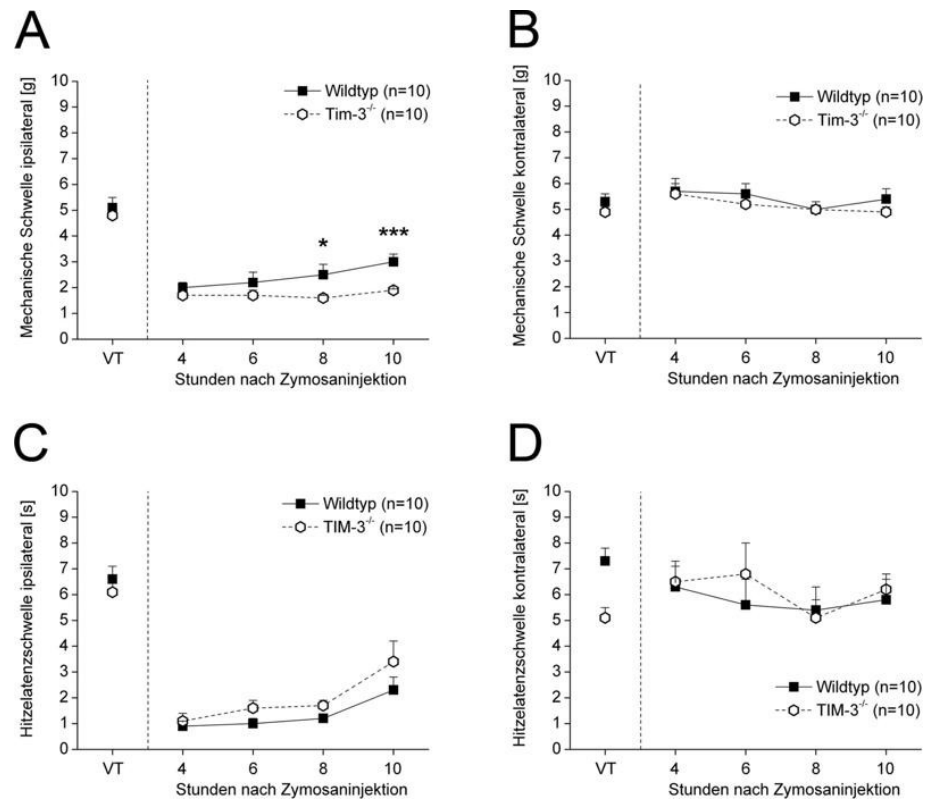


Abbildung 4.26: Mechanische Schwellen der linken, entzündeten (A) bzw. der rechten, nicht-entzündeten (B) Pfoten der TIM-3^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen im Verlauf der akuten Entzündung. Hitzelatenzen an den linken Hinterpfoten (C) bzw. den rechten Hinterpfoten (D) der gleichen Versuchsgruppen. Legende: siehe Abbildung 4.1

Das Ausschalten von TIM-3 führte zu einer Verstärkung der mechanischen Hyperalgesie und Abschwächung der thermischen Hyperalgesie auf der entzündeten linken Seite. Damit ist zu folgern, dass TIM-3 Einfluss auf das schmerzassoziierte Verhalten nimmt, wobei offensichtlich verschiedene Zytokine in die Ausprägung mechanischer bzw. thermischer Hyperalgesie einbezogen werden.

5 Diskussion

In dieser Arbeit zeigen wir, dass das entzündungsbedingte Schmerzverhalten über verschiedene Immunmodulatoren beeinflusst werden kann. Insbesondere der Mangel an $\text{IFN}\gamma$, dem Leitzytokin der $\text{T}_{\text{H}1}$ -Antwort, führt zu einer verminderten thermischen und mechanische Hyperalgesie, wenn eine Entzündung in der Pfote besteht. Die Zufuhr von $\text{IFN}\gamma$ intraplantar oder intraperitoneal kann das Defizit an $\text{IFN}\gamma$ bei Knockout-Tieren ausgleichen und eine stärkere Schwellung, sowie eine stärkere thermische und mechanische Hyperalgesie bewirken. Dieses trifft allerdings nur zu, wenn eine Entzündung mit 12 mg Zymosan vorher ausgelöst wurde. Der Effekt von intraperitoneal systemisch appliziertem $\text{IFN}\gamma$ war dabei geringer als bei einer intraplantaren Substitution in die entzündete Pfote. Wenn $\text{IFN}\gamma$ in Wildtypmäusen durch anti- $\text{IFN}\gamma$ in der entzündeten Hinterpfote neutralisiert wurde, schwächten sich Schwellung, thermische und mechanische Hyperalgesie nach Entzündung ab. Dagegen hatte die systemische Gabe von anti- $\text{IFN}\gamma$ nur einen Effekt auf die Ausprägung der Entzündung, nicht aber auf die Hyperalgesie. Die Aktivierung des GABAergen Systems beeinflusste die Ausprägung der Entzündung kaum. Die Veränderung der mechanischen Hyperalgesie wurde durch GABA-Aktivierung kaum beeinflusst, die thermische Hyperalgesie schien bei entzündeten Hinterpfoten leicht gemindert, in den gesunden Hinterpfoten dagegen etwas verstärkt zu sein.

Weitere Zytokine und Immunmodulatoren, welche die $\text{T}_{\text{H}1}$ -Antwort beeinflussen, z.B. TIM-3, IL-17, p19 (IL-23) und p35 (IL-12) bewirkten einen gering ausgeprägten antinozizeptiven und anti-inflammatorischen Phänotyp bzw. keine Abweichung von den entsprechenden Wildtyp-Tieren im Vergleich zu den Knockout-Tieren.

Dringt ein Fremdstoff in den Körper ein, oder wird, wie in unserem Experiment, eine Entzündung mittels Zymosan induziert, erkennen T_{H} -Zellen Peptid-MHC-II-Komplexe und setzen daraufhin inflammatorische Zytokine frei. Je nach Beteiligung verschiedener Entzündungszellen ($\text{T}_{\text{H}1}$, $\text{T}_{\text{H}2}$, $\text{T}_{\text{H}17}$, Makrophagen) sind dies vorrangig $\text{IFN}\gamma$, IL-17 oder TNF- α . In der sich anschließenden Sensibilisierungsphase werden in lokalen Lymphknoten Gedächtniszellen gebildet, die in die Dermis einwandern, um durch weitere Antigenpräsentation aktiviert zu werden (Verri Jr. et al., 2007).

Im Zuge dessen werden noch mehr Zytokine, wie $\text{IFN}\gamma$ und IL-17 im betroffenen Gewebe freigesetzt, welche zur Pathogenese der entzündlichen Symptome (Schwellung, Rötung, Überwärmung) beitragen. Diese bedingen wiederum eine Freisetzung anderer Zytokine, wie IL-1 und IL-6 aus den Keratinozyten, wodurch letztendlich die inflammatorische Antwort weiter verstärkt wird (Janeway, 2001).

Es ist bekannt, dass $\text{IFN}\gamma$ ebenso wie der $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptor α bei der Abwehr mikrobieller Pathogene unabdingbar ist (Huang et al., 1993, Kamijo et al., 1993). Bei einem Mangel an $\text{IFN}\gamma$ konnten Mäuse, die mit subletalen Dosen von Erregern behandelt wurden, keine ausreichende Immunantwort mehr aufbauen und verstarben (Buchmeier and Schreiber, 1985). Zudem ist $\text{IFN}\gamma$ notwendig, um die TNF- α und TNF- α -Rezeptor-Expression zu fördern (Farrar and Schreiber, 1993).

5.1 Entzündungsmodell

Die Zymosan-induzierte subkutane Pfotenentzündung ist ein etabliertes Modell zur Erfassung einer akuten Entzündung, einhergehend mit Schmerz und Schwellung, die am Tier gut messbar sind. Zymosan war deshalb für uns eine geeignete Substanz, um die Entzündung auszulösen, da es in Versuchen mit Ratten bereits 2,5 bis 4 h nach Applikation verstärkte pronozizeptive und proinflammatorische Wirkungen zeigte, die bis 24 h *post injectionem* andauerten. Darüber hinaus zeigten die Tiere kein ungewöhnliches Verhalten, wie z.B. Pfotenschütteln, -kratzen, -beißen (Gühring et al., 2001). Meller et al. postulierten ebenfalls, dass die intraplantare Zymosan-Injektion bei Ratten ein bewährtes und quantifizierbares Modell sei, um thermische und mechanische Schmerzschwellen bestimmen zu können (Meller and Gebhart, 1997).

Andere Entzündungsmodelle, wie z.B. das Carrageenan-Modell oder komplettes Freund's Adjuvans (CFA), sind ebenfalls in der Literatur beschrieben. Allerdings bieten diese Modelle für unser Versuchsmodell eine Reihe von Nachteilen hinsichtlich der zeitlichen Entwicklung der Entzündungsreaktion. Im Carrageenan-Modell wird eine maximale Ausprägung der Hyperalgesie erst etwa 7 Stunden nach Injektion erwartet. Die Erstbeschreibung dieses Modells geht auf Winter (1962) zurück.

Stein beobachtete 12 Stunden nach der Applikation von CFA, welche unilateral intraplantar in die Hinterpfoten von Ratten erfolgte, eine Entzündungsentstehung, welche ihr Maximum in der 2. bis 3. Woche ausprägte. Die Folgen waren verminderte lokomotorische Aktivität, verstärkt kratzendes Verhalten an der behandelten Stelle, sowie verminderte Futter- und Wasseraufnahme und andere unerwünschte Nebenwirkungen (Stein et al., 1988).

Letztendlich haben all diese Modelle Vor- aber auch Nachteile. Wir entschieden uns für Zymosan, da der Zeitverlauf der Entzündung für den Beobachtungszeitraum adäquat war, die Handhabbarkeit relativ einfach war, bereits Vergleichsdaten vorlagen, die Entzündungsauslösung gut reproduzierbar war und im Gegensatz zum CFA-Modell z.B. keine neuropathischen Schäden ausgelöst werden.

5.2 Wahl einer geeigneten Zymosankonzentration

In der Literatur gibt es verschiedene Angaben, welche Zymosankonzentration verwendet werden sollte. So verwendeten Schmidtke und Kollegen in ihren Experimenten meist eine Konzentration von 5 mg/ml zur Induktion einer mechanischen Hyperalgesie (Schmidtke et al., 2005). Gühring et al. verwendeten bei der Untersuchung von Ratten auf thermische Hyperalgesie eine Konzentration von 12,5 mg/ml (Gühring et al., 2001). In der Studie von Meller und Gebhardt zur am besten geeigneten Zymosankonzentration stellte sich heraus, dass die dort behandelten Ratten bis zu einer Dosis von max. 12,5 mg/ml Zymosan keinen Spontanschmerz zeigten. Dosen unter 6 mg/ml bzw. über 12,5 mg/ml zeigten entweder keine/geringe Wirkungen oder Spontanschmerz. Weiterhin zeigte sich bei der thermischen Hyperalgesie eine zeit- und konzentrationsabhängige Entwicklung, wobei sowohl bei einer Zymosankonzentration von 6 mg/ml als auch von 12 mg/ml die hitzesensible Phase nach 4 Stunden begann und bis 72 Stunden nach Injektion anhielt. Allerdings zeigten die mit 6 mg/ml behandelten Tiere eine ca. 40% höhere Latenz als die andere Gruppe. Bei der mechanischen Hyperalgesie konnte die Studie ebenfalls für eine Konzentration von 12,5 mg/ml eine erhöhte Schmerzschwelle für mindestens 24 h nachweisen, dagegen zeigte die 6 mg/ml Dosis keine bleibende Veränderung der mechanischen Schmerzsensibilität.

Ähnlich verhielt es sich bei der Ausbildung der Pfortenschwellung, auch hier war der Pfortendurchmesser bei geringerer Konzentration kleiner als bei 12,5 mg/ml Zymosan (Meller and Gebhart, 1997). Deshalb entschieden wir uns in unserer Arbeit dazu, diese beiden Konzentration (12,5 mg/ml bzw. 6 mg/ml) für die Untersuchung des schmerzassoziierten Verhaltens von IFN γ -defizienten Tieren zu verwenden.

Generell wiesen die unbehandelten und intraplantar behandelten Gruppen der IFN γ -defiziente Mäuse und Wildtypmäuse in unserer Studie bei halbiertes Zymosankonzentration eine geringere Pfortenschwellung auf, dagegen waren bei allen drei Beeinflussungen des Interferons die Latenzen gegenüber Hitze- und mechanischem Schmerzreizen höher. Unsere Ergebnisse decken sich mit denen der hier aufgezeigten Literatur, da auch dort verminderte Pfortenschwellungen und erhöhte Latenzen gegenüber den thermischen und mechanischen Stimuli bei halbiertes Zymosankonzentration beobachtet wurden.

Wir können festhalten, dass Zymosan dosisabhängig die Entzündungsreaktion erhöhte und dass die von uns eingesetzte halbiertes Zymosankonzentration zu einer weniger ausgeprägten Entzündungsreaktion führte, die noch für die Beobachtung der Effekte der mechanischen und thermischen Hyperalgesie ausreichend war, jedoch nicht mehr für den Nachweis der Wirkung der Supplementierung von IFN γ .

5.3 Einfluss von IFN γ auf das schmerzassoziierte Verhalten

Die grundlegende Hypothese dieser Arbeit war, dass das Fehlen spezieller T-Helfer-Zell-Zytokine zu einer Verminderung des schmerzassoziierten Verhaltens beiträgt. Demzufolge erwarteten wir bei entsprechenden KO-Mäusen eine geringere Schmerzempfindlichkeit gegenüber Hitze- und mechanischen Reizen. Um einen eventuellen Einfluss der Zytokine auf die periphere Entzündungsstärke evaluieren zu können, wurden die Durchmesser der Hinterpfoten miteinander in Bezug gebracht und auf diese Weise die Schwellung bestimmt. In unseren Untersuchungen unterschieden sich die Schmerzschwellen während der Vortestung nicht. Dagegen waren die Schmerzschwellen der IFN γ ^{-/-}-Mäuse nach Entzündung mit Zymosan signifikant höher als die der Wildtypmäuse.

Dabei fiel besonders auf, dass die $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine deutlich geringere Hitzesensibilität, sowie eine verminderte Pfotenschwellung der entzündeten linken Hinterpfoten aufwiesen.

In zahlreichen Studien zur Bedeutung von $\text{IFN}\gamma$ bei Entzündung wurden unterschiedliche Wirkungen von $\text{IFN}\gamma$ beobachtet, die sowohl pro-inflammatorisch, als auch anti-inflammatorisch waren, wie z.B. bei der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (Irmeler et al., 2007, Willenborg et al., 1996). Dabei handelte es sich um Mehrtages- oder Langzeit-Modelle mit Beobachtungszeiten von bis zu zwei Wochen. Kim et al. beobachteten in ihren Autoimmun-Entzündungsmodellen einen krankheits-protaktiven Effekt von $\text{IFN}\gamma$ (Kim et al., 2008). $\text{IFN}\gamma$ ist als ein pro-inflammatorisches Zytokin dafür verantwortlich, die Expression anderer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-12 und $\text{TNF-}\alpha$ anzutreiben, was zumindest theoretisch für eine verstärkte Entzündungsreaktion sprechen würde. Robertson et al. veröffentlichten, dass $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen in einem Tiermodell für neuropathischen Schmerz ein deutlich geringeres Schmerzverhalten aufwiesen (Robertson et al., 1997).

Kwon et al. beschrieben bei der intrathekalen Applikation von $\text{IFN}\gamma$ in gesunden Mäuse ein ausgeprägtes stärker schmerzassoziiertes Verhalten (Kwon et al., 2005). Irmeler et al. beschreiben dagegen, dass im Langzeitmodell der AIA gerade in der akuten Entzündungsphase (d1 - d3 nach Entzündungsinduktion) $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse eine signifikant verstärkte Entzündungsreaktion im Vergleich zu den Kontrolltieren aufwiesen, erkennbar an einer erhöhten Knieschwellung, sowie einer massiven Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das behandelte Kniegelenk. Erst ab Tag 9 erreichten beide Gruppen ein niedrigeres Niveau der Entzündungsreaktion (Irmeler et al., 2007). Weiterhin stellten Irmeler und Kollegen fest, dass die Gabe von rekombinantem $\text{IFN}\gamma$ in das Knie der $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse bereits an Tag 1 zu einer Verminderung der Schwellung führte. Die gleiche Behandlung führte bei den Wildtypmäusen zum gleichen Effekt. Jedoch hielten diese Effekte nicht über die akute Gabe hinaus an und waren an Tag drei bereits verschwunden. Es ist daher anzunehmen, daß mit unterschiedlichen Modellen und bei der Betrachtung verschiedener Zeiträume auch unterschiedliche Effekte zu finden sind.

Die Mechanismen, mit denen IFN γ Entzündungsparameter beeinflussen kann, sind derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt. In einer Arbeit von Mizuno et al. ist beschrieben, dass IFN γ zentral mit der AMPA-Untereinheit GluR1 einen Komplex bilden kann, infolge dessen mehr NO gebildet wird, was letztendlich zur Förderung entzündlicher und degenerativer ZNS-Erkrankungen beitragen kann (Mizuno et al., 2008). Zudem schildern Meller et al. in ihren Arbeiten, dass IFN γ im ZNS über AMPA-Rezeptoren, metabotrope Glutamat-Rezeptoren und eine dadurch bedingte vermehrte CO-Bildung zur Ausbildung mechanischer Hyperalgesie führt, sowie dass NMDA-Rezeptoren über NO-Bildung zu vermehrter thermischer Hyperalgesie beitragen (Meller et al., 1993, Meller et al., 1994). Es ist also möglich, dass auch zentrale Angriffspunkte bei der Entzündungsausprägung eine Rolle spielen. Bisher ist nicht völlig geklärt, inwieweit diese Rezeptoren auch Einfluss auf periphere Nerven nehmen. Meller und Mitarbeiter nehmen an, dass IFN γ peripher über den NMDA-Rezeptor oder andere Glutamat-Rezeptoren fähig ist, Einfluss auf die thermische Hyperalgesie zu nehmen und es daher bei einem Mangel von IFN γ zu einer Verminderung der selbigen führt (Meller et al., 1993, Meller et al., 1994).

Wir nutzten ein Kurzzeitmodell zur Schmerzschwellenbestimmung. Damit beobachteten wir nur einen Zeitraum von 10 Stunden und befinden uns noch unterhalb des von Irmeler et al. gezeigten Bereiches der akuten Entzündungsphase und setzten die Behandlung bzw. Supplementierung vor der 4. Untersuchungsstunde bzw. 6. Untersuchungsstunde (Midazolam) ein. Wir bestimmten die Schmerzschwellen für mechanische und thermische Reize, sowie die Hinterpfotenschwellung und die Leukozyteneinwanderung nach Auslösen der Entzündung. Es wurden alle Leukozyten ausgezählt und nicht, wie bei Irmeler et al., in die Subklassen (wie Neutrophile Granulozyten) unterteilt. Dagegen wurde bei den Langzeitmodellen die Entzündung immer erst am Tag nach Induktion behandelt und untersucht, wogegen wir in unseren Versuchen bereits 4 Stunden nach Auslösen der Entzündung erste Verhaltenstests unternahmen. Daher könnte die Differenz unserer Ergebnisse zu den Arbeiten von Irmeler et al. in der Abhängigkeit vom Zeitfenster begründet werden. Auch die Bestimmung der Leukozyteninvasion erfolgte bei den Arbeitsgruppen erst einige Tage nach Entzündungsinduktion und Behandlung, wogegen unsere Histologie die Zelleinwanderung bis 10 Stunden nach Entzündungsauslösung widerspiegelte.

Zusammenfassend kann postuliert werden, dass $\text{IFN}\gamma$ einerseits zur Induktion und Aufrechterhaltung von Entzündungen von Bedeutung ist (Trinchieri, 2003), was sich mit unseren Beobachtungen deckt. Wir beobachteten, dass der Mangel an $\text{IFN}\gamma$ als Kurzeffekt weniger Schwellung und höhere Schmerzschwellen bewirkte. Andererseits kann $\text{IFN}\gamma$ ab einer bestimmten Entzündungsdauer (Langzeiteffekt) offensichtlich regulatorische Mechanismen triggern, welche die weitere Exazerbation der Entzündung unterbinden (Kim et al., 2008). Aus unseren Versuchen lässt sich zumindest feststellen, dass $\text{IFN}\gamma$ -defiziente Tiere eine verminderte Entzündungsreaktion und eine verminderte thermische Hyperalgesie und eine leicht verminderte mechanische Hyperalgesie aufweisen.

5.4 Vergleich der Interferon-Behandlungsgruppen hinsichtlich des schmerzassoziierten Verhaltens

Hier sollen nur die Hauptergebnisse der mit 12 mg/ml Zymosan entzündeten $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse und Wildtypmäuse diskutiert werden, da die Ergebnisse der mit 6 mg/ml Zymosan entzündeten Tiere weniger ausgeprägt waren.

Ziel der Supplementierung von $\text{IFN}\gamma$ in $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen bzw. des Ausschaltens von $\text{IFN}\gamma$ durch Gabe von anti- $\text{IFN}\gamma$ in Wildtypmäusen war es, zu überprüfen, ob einerseits $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse eine Verminderung der Schwellen erfahren oder ob durch Blockieren von $\text{IFN}\gamma$ in Wildtypmäusen die Schmerzschwelle auf ein Niveau der unbehandelten $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse gehoben werden kann.

Die Pfotenschwellung konnte durch das Blockieren von $\text{IFN}\gamma$ in Wildtyp-Tieren durch die intraplantare Zugabe von anti- $\text{IFN}\gamma$ deutlich gesenkt werden. Die Zugabe von $\text{IFN}\gamma$, sowohl intraplantar als auch intraperitoneal, zu den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen ergab einen Schwellungszuwachs der linken Hinterpfote bis auf das Niveau der unbehandelten Wildtypmäuse. Zudem war die Schwellung der unbehandelten $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäuse signifikant geringer im Vergleich zu den mit $\text{IFN}\gamma$ supplementierten Tieren. Die Beobachtung, dass die Zugabe von $\text{IFN}\gamma$ eine Schwellung fördert, bzw. dass ein Blockieren dieses Zytokins zu einer Verminderung der Pfotenschwellung führt, unterstreicht die entzündungsfördernde Komponente des $\text{IFN}\gamma$ (Schreiber and Farrar, 1993).

Dabei scheint es von Bedeutung zu sein, $\text{IFN}\gamma$ direkt am Ort der Entzündung zu beeinflussen, da die systemische (intraperitoneale) Applikation weniger ausgeprägte Effekte zeigte, obwohl sie höher dosiert war. Einschränkend muss hier jedoch angemerkt werden, dass keine lokalen $\text{IFN}\gamma$ -Konzentrationen gemessen wurden.

Bei der Bestimmung der thermischen und mechanischen Schmerzschwellen zeigte sich, dass die intraplantar vorgenommenen Applikationen von $\text{IFN}\gamma$ zu einer deutlichen Verminderung der Schmerzschwellen führten. Dabei war die intraplantare Applikation geringfügig stärker wirksam als die intraperitoneale. Aufgrund der besseren Wirkung der Applikation geringerer Substanzdosen intraplantar gegenüber einer kaum messbaren Wirkung der intraperitoneal applizierten höheren Dosen lässt sich vermuten, dass sich eine intraplantare Applikation der $\text{IFN}\gamma$ -Konzentration stärker auf die Hyperalgesie am Ort der Entzündung auswirkt als eine systemische Substitution.

Gründe dafür könnten sein, dass $\text{IFN}\gamma$ lokal appliziert direkt am Ort der Entzündung wirken kann und somit schon geringere Dosen zur Beeinflussung der Hyperalgesieentstehung und Entzündungsbildung ausreichen. Die systemische Gabe dagegen scheint trotz höherer Dosen nicht wirken zu können, was eventuell daran liegen könnte, dass jede kernhaltige Zelle $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptoren exprimiert und somit die zugegebene Dosis zu schnell systemisch von den Körperzellen gebunden wird, bevor der Wirkstoff zum Ort der Entzündung gelangen kann (Farrar and Schreiber, 1993). Weiterhin könnte auch das größere Verteilungsvolumen bei der systemischen Applikation eine Rolle spielen.

Insgesamt lässt sich postulieren, dass $\text{IFN}\gamma$ nicht nur entzündungsfördernd wirkt, sondern auch zumindest direkt oder indirekt im entzündeten Gewebe sensibilisierend auf die dort befindlichen Nozizeptoren einwirkt. Gestützt werden kann diese Aussage durch das bereits bekannte Wissen darüber, dass Nozizeptoren durch eine Vielzahl körpereigener Substanzen aktiviert und in ihrer Erregbarkeit beeinflusst werden können (Verri Jr., 2007; Vikman, 2003). Weiterhin sind $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptoren auf sensorischen Neuronen im Hinterwurzelganglion beschrieben worden, was auf die Möglichkeit einer Expression dieser Rezeptoren an den afferenten Nervenfasern oder nozizeptiven Endigung hindeutet (Neumann, 1997, Edström, 2004).

5.5 Einfluss des Benzodiazepins Midazolam (GABA_A-Rezeptor-Agonist) auf das schmerzassoziierte Verhalten

Bei der Behandlung von Wildtypmäusen und IFN γ ^{-/-}-Mäusen mit dem GABA_A-Rezeptor-Agonisten Midazolam beobachteten wir einen Anstieg der mechanischen und thermischen Schmerzschwelle. Im Vergleich zu den Gruppen unbehandelter Wildtypmäuse und IFN γ ^{-/-}-Mäuse stiegen die Schwellen sogar noch deutlicher, aber nicht signifikant. Die Pfotenschwellung der IFN γ ^{-/-}-Mäuse veränderte sich nicht und die Pfotenschwellung der Wildtypmäuse nahm nach einer geringen Zunahme bis auf das Niveau der IFN γ ^{-/-}-Mäuse ab.

GABA ist der wichtigste inhibierende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (Anseloni and Gold, 2008). Es beeinflusst über Primärafferenzen das Hinterhorn und das Vorderhorn des Rückenmarkes und reguliert dort die neuronale Erregbarkeit (De Groat, 1972, Curtis and Felix, 1971). So finden sich zum Beispiel in Laminae I und IV des spinalen Hinterhorns im Rückenmark GABAerge inhibitorische Interneurone (Enna and McCarson, 2006). Weiterhin kommen in supraspinalen Gebieten GABAerge Neurone und ihre Rezeptoren vor, die für die Koordination der Wahrnehmung und Reaktion auf schmerzhafte Stimuli zuständig sind und die Kontrolle sensorischer Informationsverarbeitung im Rückenmark regulieren (Enna and McCarson, 2006). Über auf- und absteigende GABAerge Kreisläufe ist das System dadurch stark in die Modulation der Nozizeption auf der Ebene des spinalen Hinterhorns involviert (Price et al., 2005). In gesundem Gewebe wirken GABA_A-Rezeptor-Agonisten, wie Midazolam (Agonist für zentrale GABA_A-Rezeptoren und periphere Benzodiazepin-Rezeptoren) analgetisch (Dirig and Yaksh, 1995). GABA_A-Rezeptor-Antagonisten führen dennoch zu thermischer und mechanischer Hypersensibilität (Sivilotti and Woolf, 1994, Yaksh, 1989).

Für GABA_A-Agonisten wie Midazolam wurden in verschiedenen Tiermodellen für (Entzündungs-)Schmerz bereits antinozizeptive Wirkungen nachgewiesen (Enna and McCarson, 2006). Midazolam flutet nach intravenöser Injektion (systemisch, intraperitoneal) schnell im ZNS an. Werden die Benzodiazepinrezeptoren von Midazolam besetzt, verbessert sich die Kopplung zwischen dem GABA_A-Rezeptor und dem Chlorid-Ionenkanal.

Unter normalen Umständen nimmt dadurch die Permeabilität des Chloridkanals zu und der Einstrom von Chloridionen in die Nervenzelle wird erleichtert. Dadurch wird die Erregbarkeit der Neuronenmembran gehemmt (Jantzen, 2009).

Es ist bekannt, dass $\text{IFN}\gamma$ -Rezeptoren im Hinterhorn des Rückenmarks exprimiert werden (Vikman et al., 1998) und dass deren Aktivierung durch $\text{IFN}\gamma$ das Antwortverhalten entsprechender Neurone über das Anionenpotenzial beeinflusst. Es konnte insbesondere gezeigt werden, dass nach längerer intrathekaler Applikation von $\text{IFN}\gamma$ die inhibierende Wirkung von GABA aufgehoben bzw. sogar umgekehrt werden kann (Vikman et al., 2007). Dabei spielt das Anionenpotenzial eine wichtige Rolle bei der Hyperalgesie- und Allodynieentstehung bei peripheren Entzündungen (Price et al., 2009). Dieses Anionenpotenzial wird unter gesunden Bedingungen bei einem neuronalen Ruhemembranpotenzial von ca. -70 mV durch den Kationen-Chlorid-Transporter NKCC1 aufrechterhalten (Price et al., 2009, Sung et al., 2000). Normalerweise führt die GABA_A -Kanalöffnung über diesen Transporter zu einem Chlorideinstrom in die Zelle und somit zu einer Hyperpolarisation postsynaptischer Membranen, was gleichbedeutend mit einer Antinozizeption ist (Price et al., 2009, Pitcher et al., 2007, Sung et al., 2000). Unter entzündlichen Bedingungen und unter chronischer Einwirkung von $\text{IFN}\gamma$ können A β -Fasern antidrom über GABA_A erge Mechanismen Nozizeptoren direkt erregen, wodurch die Nozizeptoren orthodrom an Aktivität zunehmen und so die entzündungsinduzierte Allodynie hervorrufen können (Pitcher et al., 2007, Garcia-Nicas et al., 2006). Dabei kann der Chloridtransporter NKCC1 herunter reguliert werden. Daraufhin könnte es zu einer Akkumulation von Chlorid im Intrazellularraum kommen. Dies könnte nachfolgend bei einer Öffnung der Chloridkanäle statt zu einer Hyper- zu einer Depolarisation führen. Da die Chloridionen nun von intra- nach extrazellulär fließen würden, würde somit die hemmende Wirkung von GABA vermindert, bzw. erhöhte Nozizeption bedingt werden (Eccles, 1964, Price et al., 2009).

In unseren Versuchen gaben wir nur einmalig Midazolam innerhalb der Versuchszeit von 10 Stunden – entsprechend dem von uns verwendeten Akutmodell für Entzündungsschmerz. Entzündungsmediatoren wie $\text{IFN}\gamma$ wirkten daher nur für eine kurze Zeit auf das Rückenmark ein.

Bei der systemischen Applikation von Midazolam zeigte sich, dass die Toleranz gegenüber thermischen und mechanischen Schmerzreizen sowohl bei den Wildtypmäusen als auch bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen geringfügig stieg. Diese Beobachtung deutet auf eine antinozizeptive Wirkung von Midazolam hin (Enna and McCarson, 2006). Insgesamt scheint in unseren Experimenten Midazolam und damit die Aktivierung von GABA_A -Rezeptoren antinozizeptiv zu wirken.

5.6 Einfluss von p35 (IL-12) auf das schmerzassoziierte Verhalten und den Entzündungsprozess

Das Protein p35 ist als Untereinheit des IL-12 notwendig, um als Reaktion auf Entzündungsreize die $\text{IFN}\gamma$ -Produktion anzutreiben (Trinchieri et al., 2003). Der Prozess wird durch Pathogenbindung am Toll-Like-Rezeptor 2 (TLR-2) stimuliert; dieser Komplex wird Makrophagen präsentiert, welche NO freisetzen und dadurch die IL-12-Freisetzung bedingen. In Folge dessen werden die T-Zellen zur $\text{IFN}\gamma$ -Freisetzung bewegt, welches wiederum mehr Makrophagen zum Ort der Entzündung lockt, um den Fremdstoff zu beseitigen (Janeway, 2001, Kastelein et al., 2007). Somit stimuliert IL-12 die systemische Immunantwort und ist über den sog. IL-12/ $\text{IFN}\gamma$ -Signalweg zur Induktion vor allem zytotoxischer Faktoren notwendig, um Mikroben oder infizierte Zellen direkt abzutöten (Kastelein et al., 2007). $\text{IL-23p35}^{-/-}$ -Mäuse sind nur zu einer geringen Bildung von $\text{IFN}\gamma$ fähig, wogegen die IL-17-Produktion erhöht ist, sodass es so scheint, als könnte $\text{IFN}\gamma$ die IL-17-Expression supprimieren (Iwakura and Ishigame, 2006). Dieser Befund wurde auch in anderen Arbeiten bestätigt, in denen IL-12p35- und $\text{IFN}\gamma$ -defiziente Mäuse eine erhöhte Autoimmunität aufwiesen, was für eine erhöhte $\text{T}_{\text{H}17}$ -Antwort spricht (Cua et al., 2003, Murphy et al., 2003, Ferber et al., 1996).

Vergleicht man unsere Ergebnisse mit den Angaben aus der Literatur, fand sich ein Rückgang der Schwellung der entzündeten Hinterpfoten bei den $\text{p35}^{-/-}$ -Mäusen ab Stunde 8 gegenüber den Wildtypmäusen. Diese Verminderung der Schwellung war etwas geringer als bei den $\text{IFN}\gamma^{-/-}$ -Mäusen, weshalb vermutet werden kann, dass auch noch andere Mechanismen und Pathways zuständig sind. So beschreiben zumindest Oppmann et al., dass auch IL-23 zur Induktion der $\text{IFN}\gamma$ -Expression fähig ist (Oppmann, 2000).

Andererseits könnte zu Beginn der akuten Entzündung auch erst der IL-23/IL-17-Signalweg dominieren und später dann der IL-12/IFN γ -Signalweg greifen. Da es in der Literatur keine genauen Zeitangaben gibt, wann der Übergang von dem einen zum anderen Signalweg stattfindet, könnte man postulieren, dass dieser Übergang eventuell ab Stunde 8 nach Entzündungsbeginn stattfindet (McKenzie et al., 2006).

Da bei der Bestimmung der Schmerzschwellen keine Unterschiede im Vergleich zu den Wildtypmäusen gemessen werden konnten, ist anzunehmen, dass IL-12 mit seinen Funktionen eher das Entzündungsgeschehen beeinflusst und weniger Einfluss auf die Schmerzschwelle nimmt.

5.7 Einfluss von p19 (IL-23) auf das schmerzassoziierte Verhalten und den Entzündungsprozess

IL-12 und IL-23 sind grundlegende Interleukine für die Regulationsmechanismen der adaptiven Immunantwort (siehe Abb. 2.2). Beide werden in haut- und mukosa-ständigen Dendritischen Zellen, sowie in Makrophagen gebildet.

Das Protein p19 ist eine der zwei Zytokin-Untereinheiten von IL-23 und ist notwendig, um die IL-17-Expression zu stimulieren, bzw. mit IL-17 den IL-23/IL-17-Signalweg zu ermöglichen (Kastelein et al., 2007).

Bisher weiß man, dass IL-23 die initiale Entzündungsantwort im geschädigten peripheren Gewebe dominiert und erst später vom IL-12/IFN γ -Signalweg ersetzt wird (Kastelein et al., 2007). Bereits wenige Stunden nach Fremdkörper-Exposition greift dieser Mechanismus in immunpotenten Organismen, woraufhin IL-17 freigesetzt wird und die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in das betroffene Gewebe ermöglicht wird. Dadurch kommt es bei der lokalen Gewebeschädigung zu Schwellung, Erwärmung und Schmerz und bildet somit ein Umfeld verstärkter Immunantwort (Kastelein et al., 2007). Zudem induziert IL-23 in Mäusen eine massive Gedächtnis-T-Zell-Proliferation (Oppmann, 2000). In IL-23p19^{-/-}-Mäusen ist die IL-17-Produktion vollständig aufgehoben, wobei die IFN γ -Expression unangetastet bleibt (Iwakura and Ishigame, 2006).

Jedoch kann IL-17 von T_{H17}-unabhängigen Zellen gebildet werden und könnte somit in andere Regulationsmechanismen der Entzündung eingebunden sein, wobei die Unterscheidung diese Mechanismen noch nicht geklärt werden konnte (Iwakura and Ishigame, 2006). Da nun in den p19-defizienten Mäusen nur bedingt IL-17 gebildet werden kann, würde man vermuten, dass auch die Entzündungsreaktion geringer ausfallen würde als in den Kontrolltieren. Wir konnten solche Unterschiede jedoch nicht beobachten.

Es scheinen also noch andere Signalwege Einfluss zu nehmen, wie zum Beispiel der oben beschriebenen IL-12/IFN γ -Signalweg, oder auch der IL-4/IL-5/IL-13-Signalweg, welcher ebenfalls Einfluss auf die Entzündungsreaktion nehmen kann (Iwakura and Ishigame, 2006). Diese Annahme wird zusätzlich durch das nahezu gleiche schmerzassoziierte Verhalten der p19-defizienten Mäuse und Wildtypmäuse unterstrichen. Dagegen scheint eine Fehlregulation der IL-23/IL-17-Antwort eine wesentlich bedeutendere Position bei der Entstehung organischer Autoimmunerkrankungen einzunehmen (McKenzie et al., 2006).

Bei den IL-17/p35-KO-Mäusen, sowie den p35/p19-KO-Mäusen wurde ein Rückgang der Pfotenschwellung sowie eine verminderte Schmerzlatenz kurz nach Entzündungsinduktion beobachtet. Daher nehmen wir wie die Arbeitsgruppen von McKenzi und Iwakura an, dass beide hier näher besprochenen Signalwege einen gewissen Anteil an der Entzündungsausprägung haben (McKenzie et al., 2006, Iwakura and Ishigame, 2006).

5.8 Einfluss von IL-17 auf das schmerzassoziierte Verhalten und den Entzündungsprozess

Bei den Untersuchungen IL-17-defizienter Mäuse machten wir eine ähnliche Beobachtung wie bei den IFN γ -defizienten Mäusen, nämlich verminderte Pfotenschwellung und eine höhere Hitzeschmerzschwelle im Vergleich zu den Wildtypmäusen. Im Gegensatz zu den IFN γ -defizienten Mäusen bildete sich die höhere Hitzeschmerzlatenz erst zu Stunde 8 nach Auslösen der Entzündung aus.

Wie bereits in der Einleitung beschrieben wurde, nehmen beide Zytokine eine wesentliche Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Entzündungen und Autoimmunreaktionen ein. So unterstützt IL-17 die Entstehung einer kutanen Entzündung (Teunissen et al., 1998), wie sie bei der Zymosan-Injektion entsteht. Da die Mechanismen zur IL-6-, IL-1- und IL-8-Freisetzung durch IL-17 gesteuert werden, wird bei den IL-17-defizienten Mäusen die Entzündung nicht in diesem Umfang stattfinden können.

Möglicherweise ist durch den Mangel an mit IL-17 assoziierten proinflammatorischen Zytokinen die geringere Pfotenschwellung erklärbar, weil es zu einer geringeren Einwanderung von neutrophilen Granulozyten kommt. Ebenso konnte in Studien zur Arthritis in Ratten und Mäusen ein hoher Anteil von IL-17 im entzündeten Gelenk nachgewiesen werden, was wiederum den Einfluss auf Entzündungsprozesse unterstreicht (Moseley et al., 2003). Hinsichtlich der Beobachtung von Schwellenveränderungen bei Hitzereizen gibt es derzeit keine vergleichbaren Daten in der Literatur. Es wird beschrieben, dass bei Ableitungen von Nozizeptoren des Gelenkes IL-17 im gesunden Knie der Ratte bei mechanischer Stimulation sensibilisierend wirken kann (Richter et al., 2010). Ob eine solche Sensibilisierung auch für thermische Reize existiert, wurde bisher nicht untersucht und ist derzeit noch unbekannt. Da die Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und IL-17^{-/-}-Mäusen erst spät auftraten, könnten sekundäre Prozesse eine Rolle spielen.

5.9 Einfluss von TIM-3 auf das schmerzassoziierte Verhalten und den Entzündungsprozess

TIM-3 ist für die Regulation der T_{H1}-Antwort zuständig (Meyers et al., 2005, Sabatos et al., 2003). Die TIM-3-defizienten Mäuse zeigten während unserer Experimente bei der Testung auf die mechanische Schmerzschwelle signifikant geringere Schwellen als ihre entsprechenden Wildtypmäuse. Sie waren somit empfindlicher auf Druckschmerz.

TIM-3 reguliert die vermehrte Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie IFN γ und IL-17, was durch die Blockade von TIM-3 gezeigt wurde (Hastings et al., 2009). Somit ist TIM-3 zumindest teilweise an der Zytokinproduktion beteiligt und beeinflusst unter normalen Umständen die IFN γ - und IL-17-Produktion negativ.

Es kontrolliert auf diesem Weg das Ausmaß eines pro-inflammatorischen Prozesses durch Verzögerung der über $\text{IFN}\gamma$ und IL-17 ablaufenden Signalwege. Ohne TIM-3 würde die pro-inflammatorische Immunantwort unkontrollierter ablaufen und so dem Organismus mehr schaden als nutzen (Meyers et al., 2005). Entgegen unseren Erwartungen beobachteten wir vermindertes schmerzassoziertes Verhalten. Da auch dieser Effekt erst mehrere Stunden nach Zymosan auftrat, beruht auch dieser Effekt möglicherweise auf Sekundärprozessen.

5.10 Veränderung des schmerzassozierten Verhaltens der kontralateralen

Pfote

Während der Untersuchungen auf das schmerzassozierte Verhalten prüften wir nicht nur die entzündete linke Hinterpfote, sondern auch die nicht entzündete rechte Hinterpfote. Dabei fiel auf, dass in allen Versuchsgruppen während der Testphase die thermische Schmerzschwelle der kontralateralen nicht entzündeten Hinterpfoten sank, dagegen stieg die Latenz für mechanische Hyperalgesie häufig an. Ein einfacher Erklärungsversuch für das veränderte Schmerzverhalten der nicht-entzündeten Hinterpfoten bei mechanischer Stimulation und für die erhöhte mechanische Schwelle der nicht-entzündeten Pfote wäre, dass bei einer entzündeten Pfote diese mit weniger Körpergewicht belastet wird. Dementsprechend wird dieses Gewicht auf die drei übrigen Pfoten umverteilt. Somit trägt die kontralaterale Pfote mehr Gewicht, wodurch sich auch die Werte zur Bestimmung der mechanischen Schmerzschwelle erhöhen. Diese Theorie wird durch Studien zur Gewichtsverlagerung beim sog. Incapacitance-Test bei Ratten mit einseitiger Arthritis untermauert (Boettger et al., 2008) sowie durch neuere Daten von Böttger et al. mittels Videoradiographie (Boettger et al., 2011).

Allerdings hätte man ein solches Reaktionsmuster auch bei thermischer noxischer Reizung erwartet. Die Gründe für das Absenken der Latenz auf der kontralateralen Seite sind nicht bekannt. Die Absenkung der Schwelle in einem gesunden Areal könnte als sekundäre Hyperalgesie angesehen werden.

Es wird angenommen, dass zentrale Mechanismen bei der Weiterleitung erhöhter Reflexantworten aus entfernten Geweben eine Rolle spielen (Millan, 1999). Ebenso führten in Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen Gewebeschäden zu einer Hypersensibilität der geschädigten Extremität gegenüber nicht noxischen mechanischen Reizen (Allodynie) in Regionen, die vom geschädigten Gewebe weiter entfernt sind und führten somit zu einer Vergrößerung der rezeptiven Felder der dazugehörigen Hinterhornneurone (Cook et al., 1987, McMahon and Wall, 1984, Neugebauer and Schaible, 1990). Analog dazu konnte gezeigt werden, dass durch eine lokalisierte noxische Stimulation der ipsilateralen Pfote in der Ratte eine Hyperalgesieentstehung in der kontralateralen Pfote erzeugt werden konnte, welche mittels Anästhesie der stimulierten Pfote zwar vermindert, aber nicht aufgehoben werden konnte (Coderre and Melzack, 1991, Coderre et al., 1993, Wiertelak et al., 1994). Das läßt aber die Frage offen, weshalb bei mechanischer Reizung keine Schwellensenkung auf der kontralateralen Seite zu beobachten war. Entweder ist die zentrale Sensibilisierung für thermische Reize besonders ausgeprägt oder es handelt sich um eine Besonderheit der Maus, denn bei Ratten wurde dieses Muster bisher nicht beobachtet. Die Erklärung muß offen bleiben.

5.11 Übertragbarkeit und Nutzen des Modells

In der Schmerz- und Entzündungsforschung werden Tiermodelle vielfach verwendet, da sie zur Aufklärung von Mechanismen und Therapiestrategien unabdingbar sind. Um Versuche zur Erforschung des Immunsystems vornehmen zu können, eignen sich besonders KO-Mäuse. Sie können leicht unter Laborbedingungen gehalten werden. Eine standardisierte Anwendung des Modells an der Maus gewährleistet dabei eine gute Vergleichbarkeit mit verschiedenen anderen Studien. Somit stellt das Mausmodell eine gute Strategie zur Erforschung der Mechanismen des schmerzassoziierten Verhaltens dar. Des Weiteren bietet das Tiermodell die Möglichkeit, z.B. auch weiterführende elektrophysiologische Untersuchungen durchzuführen, die beim Menschen nicht möglich wären.

Das Schmerzempfinden ist ein Zusammenspiel verschiedenster Komponenten, welche nur an einem lebenden Organismus ausreichend gut beobachtet werden kann. *In vitro*-Versuche reichen dabei nicht aus, da einzelne Zellen oder Zellkulturpräparate nicht die Wirkmechanismen eines ganzen Organismus widerspiegeln können.

Die Verwendung von KO-Mäusen, welche von Geburt an das Gen für das entsprechende Zytokin nicht mehr haben (sog. konstitutive KO) (in unserer Studie verwendet), birgt spezifische Probleme. Würde man anstelle konstitutiver KO-Mäuse konditionale KO-Mäuse verwenden, also Tiere, die erst im Laufe ihres Lebens oder kurz vor der Testung das Gen z.B. für IFN γ ausgeschaltet bekämen, könnten die Effekte von IFN γ noch stärker hervortreten. In konstitutiven KO-Mäusen kommt es beispielsweise vor, dass andere Proteine die Funktion des ausgeknockten Gens übernehmen bzw. zumindest teilweise kompensieren können (Boettger et al., 2007). Für zukünftige Studien bestünde die Möglichkeit, gewebsspezifische KO-Mäuse zu verwenden (Brüning et al., 1999), die zum Beispiel eine Depletion von IFN γ nur in Entzündungszellen oder nur im Nervensystem aufweisen, um so bessere Aussagen darüber treffen zu können, wo die einzelnen Zytokine gebildet werden und ihre größte Wirksamkeit zeigen.

Die Beurteilung von Schmerz stellt sowohl beim Menschen als auch beim Tier ein generelles Problem dar, da jeder Organismus Schmerz anders wahrnimmt und ausdrückt. So ist es beim Menschen möglich, über Schmerzskaleten oder benötigte Schmerzmittelmengen den Schmerz in seiner Intensität zu beschreiben (Wieck and Lehl, 1980, Redegeld et al., 1995). Dahingegen ist bei der Maus, wie auch bei jedem anderen Tier, die Bewertung des Schmerzempfindens schwierig. So kann die Einschätzung, ob ein Tier Schmerzen hat oder nicht, nur durch das Erfassen von Surrogaten wie Wegziehen der Pfote, Lecken oder Ausschütteln der Pfote oder Vokalisieren abgeschätzt werden. Hierfür haben wir Verhaltenstests verwendet, welche die primäre Hyperalgesie erfassen (Neugebauer et al., 2007). Dabei wird die Validität der getroffenen Aussage durch Verwendung mehrerer Methoden erhöht. Langford et al. zeigten in ihrer Studie, dass Mäuse, wie es auch Menschen tun, über ihre Mimik ebenfalls Schmerzempfinden zum Ausdruck bringen können (Langford et al., 2010). Dieses Verfahren wäre eine zusätzliche Möglichkeit, Schmerzwahrnehmungen evaluieren zu können, wobei es dabei einer sehr aufmerksamen Beobachtung bedarf.

Allgemein wird die Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen zuweilen kritisch hinterfragt, da es sich trotz des fast gleichen Genoms immer noch um zwei weitestgehend verschiedene Organismen handelt und nicht vollkommen ausgeschlossen werden kann, dass diese auch zumindest teilweise verschieden funktionieren. Jedoch stellt das Tiermodell im Rahmen der biomedizinischen Forschung eine anerkannte Methode zur Untersuchung von Mechanismen und Wirksamkeiten von Wirkstoffen dar, auch wenn letzteres durch Unterschiede in der Pharmakokinetik bzw. -dynamik nicht vollständig übertragbar ist (Whiteside et al., 2008).

Es ist klar, dass auch zukünftig die Schmerzforschung am Tiermodell ein notwendiger Bestandteil sein wird, um genaue Kenntnisse über die Pathophysiologie des Schmerzes zu erlangen und objektive Aussagen bezüglich qualitativer und quantitativer Wirkungsweisen der wesentlichen Zytokine des Immunsystems treffen zu können.

5.12 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das für die T_{H1} -Antwort charakteristische Zytokin $IFN\gamma$ und in einem geringeren Ausmaß auch das für die T_{H17} -Antwort maßgebliche Zytokin IL-17 an der Ausprägung schmerzassozierten Verhaltens beteiligt sind. Für $IFN\gamma$ konnte dies anhand $IFN\gamma$ -defizienter Tiere gezeigt werden, die ein signifikant vermindertes schmerzassoziertes Verhalten zeigten. Für diesen Effekt scheint in erster Linie lokal am Entzündungsort wirkendes $IFN\gamma$ von Bedeutung zu sein, da einerseits eine lokale Substitution bei den KO-Tieren, aber auch eine lokale Blockade bei den Wildtypmäusen, nicht jedoch entsprechende systemische Behandlungsformen, zu entsprechenden Verhaltensänderungen führten.

Andere im Rahmen dieser Studie untersuchte Zytokine bzw. Zytokinbestandteile wie p35, p19 oder der Immunmodulator TIM-3 zeigten in unseren Versuchen eine geringere Bedeutung als $IFN\gamma$ und IL-17 für den Entzündungsschmerz, obwohl sie teilweise in ähnliche Signalkaskaden eingreifen.

Die Blockade bzw. Neutralisation von $\text{IFN}\gamma$ könnte in Zukunft, analog zur Behandlung mit anti-TNF- α -Medikamenten (Boettger et al., 2008), neben einer Verminderung der Entzündung auch als antinozizeptives Prinzip therapeutisch Verwendung finden, wenn entsprechende Substanzen wie z.B. neutralisierende Antikörper für den Menschen verfügbar wären. In ersten klinischen Studien wurde der Einsatz des G-CSF als Hemmstoff für die Freisetzung von $\text{IFN}\gamma$ erfolgreich getestet (Boneberg, 2000). Ein kommerzielles Medikament zur Hemmung von $\text{IFN}\gamma$ ist nach unseren Erkenntnissen bislang nicht auf dem Markt.

6 Literaturverzeichnis

- ALBANESI, C., CAVANI, A. & GIROLOMONI, G. 1999. IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol*, 162, 494-502.
- ANSELONI, V. & GOLD, M. 2008. Inflammation-induced shift in the valence of spinal GABA-A receptor-mediated modulation of nociception in the adult rat. *J Pain*, 9, 732-8.
- ANTONYSAMY, M., FANSLOW, W., FU, F., LI, W., QIAN, S., TROUTT, A. & THOMSON, A. 1999. Evidence for a role of IL-17 in organ allograft rejection: IL-17 promotes the functional differentiation of dendritic cell progenitors. *J Immunol*, 162, 577-84.
- BACH, E., AGUET, M. & SCHREIBER, R. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol*, 15, 563-91.
- BENNETT, G. 2000. Update on the neurophysiology of pain transmission and modulation: focus on the NMDA-receptor. *J Pain Symptom Manage*, 19, S2-6.
- BOETTGER, M., HENSELLEK, S., RICHTER, F., GAJDA, M., STÖCKIGT, R., VON BANCHET, G., BRÄUER, R. & SCHAIBLE, H.-G. 2008. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum*, 58, 2368-78.
- BOETTGER, M., UCEYLER, N., ZELENKA, M., SCHMITT, A., REIF, A., CHEN, Y. & SOMMER, C. 2007. Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice. *Eur J Pain*, 11, 810-8.
- BRENN, D., RICHTER, F. & SCHAIBLE, H.-G. 2007. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: an inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum*, 56, 351-9.
- BRÜNING, J., KAHN, C., KRONE, W. & MÜLLER-WIELAND, D. 1999. [Conditional mutagenesis--second generation knockout mice as models for internal diseases]. *Med Klin (Munich)*, 94, 564-9.
- BUCHMEIER, N. & SCHREIBER, R. 1985. Requirement of endogenous interferon-gamma production for resolution of *Listeria monocytogenes* infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 7404-8.
- CAMPBELL, J. & MEYER, R. 1983. Sensitization of unmyelinated nociceptive afferents in monkey varies with skin type. *J Neurophysiol*, 49, 98-110.
- CODERRE, T., KATZ, J., VACCARINO, A. & MELZACK, R. 1993. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain*, 52, 259-85.
- CODERRE, T. & MELZACK, R. 1991. Central neural mediators of secondary hyperalgesia following heat injury in rats: neuropeptides and excitatory amino acids. *Neurosci Lett*, 131, 71-4.
- COOK, A., WOOLF, C. & WALL, P. 1986. Prolonged C-fibre mediated facilitation of the flexion reflex in the rat is not due to changes in afferent terminal or motoneurone excitability. *Neurosci Lett*, 70, 91-6.

- COOK, A., WOOLF, C., WALL, P. & MCMAHON, S. 1987. Dynamic receptive field plasticity in rat spinal cord dorsal horn following C-primary afferent input. *Nature*, 325, 151-3.
- COULL, J., BEGGS, S., BOUDREAU, D., BOIVIN, D., TSUDA, M., INOUE, K., GRAVEL, C., SALTER, M. & DE KONINCK, Y. 2005. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438, 1017-21.
- CUA, D., SHERLOCK, J., CHEN, Y., MURPHY, C., JOYCE, B., SEYMOUR, B., LUCIAN, L., TO, W., KWAN, S., CHURAKOVA, T., ZURAWSKI, S., WIEKOWSKI, M., LIRA, S., GORMAN, D., KASTELEIN, R. & SEDGWICK, J. 2003. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421, 744-8.
- CUNHA, F., POOLE, S., LORENZETTI, B. & FERREIRA, S. 1992. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 107, 660-4.
- CURTIS, D. & FELIX, D. 1971. GABA and prolonged spinal inhibition. *Nat New Biol*, 231, 187-8.
- DE GROAT, W. 1972. GABA-depolarization of a sensory ganglion: antagonism by picrotoxin and bicuculline. *Brain Res*, 38, 429-32.
- DIRIG, D. & YAKSH, T. 1995. Intrathecal baclofen and muscimol, but not midazolam, are antinociceptive using the rat-formalin model. *J Pharmacol Exp Ther*, 275, 219-27.
- ECCLES, J. 1964. IONIC MECHANISM OF POSTSYNAPTIC INHIBITION. *Science*, 145, 1140-7.
- ENNA, S. & MCCARSON, K. 2006. The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv Pharmacol*, 54, 1-27.
- FARRAR, M. & SCHREIBER, R. 1993. The molecular cell biology of interferon-gamma and its receptor. *Annu Rev Immunol*, 11, 571-611.
- FERBER, I., BROCKE, S., TAYLOR-EDWARDS, C., RIDGWAY, W., DINISCO, C., STEINMAN, L., DALTON, D. & FATHMAN, C. 1996. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol*, 156, 5-7.
- FERREIRA, J., CAMPOS, M., PESQUERO, J., ARAÚJO, R., BADER, M. & CALIXTO, J. 2001. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology*, 41, 1006-12.
- FERREIRA, S., LORENZETTI, B., BRISTOW, A. & POOLE, S. 1988. Interleukin-1 beta as a potent hyperalgesic agent antagonized by a tripeptide analogue. *Nature*, 334, 698-700.
- GARCIA-NICAS, E., LAIRD, J. & CERVERO, F. 2006. GABAA-Receptor blockade reverses the injury-induced sensitization of nociceptor-specific (NS) neurons in the spinal dorsal horn of the rat. *J Neurophysiol*, 96, 661-70.
- GRIGG, P., SCHAIBLE, H.-G. & SCHMIDT, R. 1986. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. *J Neurophysiol*, 55, 635-43.

- GÜHRING, H., TEGEDER, I., LÖTSCH, J., PAHL, A., WERNER, U., REEH, P., REHSE, K., BRUNE, K. & GEISSLINGER, G. 2001. Role of nitric oxide in zymosan induced paw inflammation and thermal hyperalgesia. *Inflamm Res*, 50, 83-8.
- HARGREAVES, K., DUBNER, R., BROWN, F., FLORES, C. & JORIS, J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32, 77-88.
- HASTINGS, W., ANDERSON, D., KASSAM, N., KOGUCHI, K., GREENFIELD, E., KENT, S., ZHENG, X., STROM, T., HAFLER, D. & KUCHROO, V. 2009. TIM-3 is expressed on activated human CD4+ T cells and regulates Th1 and Th17 cytokines. *Eur J Immunol*, 39, 2492-501.
- HENSELLEK, S., BRELL, P., SCHAIBLE, H.-G., BRÄUER, R. & SEGOND VON BANCHET, G. 2007. The cytokine TNFalpha increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci*, 36, 381-91.
- HOF, H. & DÖRRIS, R. 2005. *Induzierbare Effektorsysteme. Medizinische Mikrobiologie*. Stuttgart: Thieme.
- HUANG, S., HENDRIKS, W., ALTHAGE, A., HEMMI, S., BLUETHMANN, H., KAMIJO, R., VILCEK, J., ZINKERNAGEL, R. & AGUET, M. 1993. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. *Science*, 259, 1742-5.
- HYMOWITZ, S., FILVAROFF, E., YIN, J., LEE, J., CAI, L., RISSER, P., MARUOKA, M., MAO, W., FOSTER, J., KELLEY, R., PAN, G., GURNEY, A., DE VOS, A. & STAROVASNIK, M. 2001. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J*, 20, 5332-41.
- IRMLER, I. M., GAJDA, M. & BRAUER, R. 2007. Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response. *J Immunol*, 179, 6228-36.
- IWAKURA, Y. & ISHIGAME, H. 2006. The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*, 116, 1218-22.
- JANEWAY, C. A. 2001. *Immunobiology the immune system in health and disease*, Edinburgh; New York, Churchill Livingstone ; Garland Pub.
- JANTZEN, T. 2009. *Klinische Pharmakologie und Anwendung von Morphin, Ketamin und Midazolam. Clinical Pharmacology and Use of Morphin, Ketamin and Midazolam*, 25, 11-16.
- JOVANOVIĆ, D., MARTEL-PELLETIER, J., DI BATTISTA, J., MINEAU, F., JOLICOEUR, F., BENDERDOUR, M. & PELLETIER, J. 2000. Stimulation of 92-kd gelatinase (matrix metalloproteinase 9) production by interleukin-17 in human monocyte/macrophages: a possible role in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 43, 1134-44.
- KAMIJO, R., LE, J., SHAPIRO, D., HAVELL, E., HUANG, S., AGUET, M., BOSLAND, M. & VILCEK, J. 1993. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered responses to infection with *Bacillus Calmette-Guérin* and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 178, 1435-40.
- KAMRADT, T. 2007. [Th17 cells]. *Z Rheumatol*, 66, 54-5.

- KASTELEIN, R. A., HUNTER, C. A. & CUA, D. J. 2007. Discovery and Biology of IL-23 and IL-27: Related but Functionally Distinct Regulators of Inflammation. *Annual Review of Immunology*, 25, 221-242.
- KHADEMI, M., ILLÉS, Z., GIELEN, A., MARTA, M., TAKAZAWA, N., BAECHER-ALLAN, C., BRUNDIN, L., HANNERZ, J., MARTIN, C., HARRIS, R., HAFLER, D., KUCHROO, V., OLSSON, T., PIEHL, F. & WALLSTRÖM, E. 2004. T Cell Ig- and mucin-domain-containing molecule-3 (TIM-3) and TIM-1 molecules are differentially expressed on human Th1 and Th2 cells and in cerebrospinal fluid-derived mononuclear cells in multiple sclerosis. *J Immunol*, 172, 7169-76.
- KIM, E., CHI, H., BOUZIANE, M., GAUR, A. & MOUDGIL, K. 2008. Regulation of autoimmune arthritis by the pro-inflammatory cytokine interferon-gamma. *Clin Immunol*, 127, 98-106.
- KRESS, M. & REEH, P. 1996. Chemical excitation and sensitization of nociceptors. Belmonte C, Cervero E (eds). Oxford Univ. Press. Oxford, 11, 258-297.
- KWON, M.-S., SHIM, E.-J., SEO, Y.-J., CHOI, S.-S., LEE, J.-Y., LEE, H.-K. & SUH, H.-W. 2005. Differential Modulatory Effects of Cholera Toxin and Pertussis Toxin on Pain Behavior Induced by TNF- α , Interleukin-1 β and Interferon-Injected Intrathecally. *Archives of Pharmacal Research*, 28, 582-586.
- LANGFORD, D., BAILEY, A., CHANDA, M., CLARKE, S., DRUMMOND, T., ECHOLS, S., GLICK, S., INGRAO, J., KLASSEN-ROSS, T., LACROIX-FRALISH, M., MATSUMIYA, L., SORGE, R., SOTOCINAL, S., TABAKA, J., WONG, D., VAN DEN MAAGDENBERG, A., FERRARI, M., CRAIG, K. & MOGIL, J. 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods*, 7, 447-9.
- LIN, Q., PENG, Y. & WILLIS, W. 1996. Inhibition of primate spinothalamic tract neurons by spinal glycine and GABA is reduced during central sensitization. *J Neurophysiol*, 76, 1005-14.
- LIN, Q., WU, J. & WILLIS, W. 1999. Dorsal root reflexes and cutaneous neurogenic inflammation after intradermal injection of capsaicin in rats. *J Neurophysiol*, 82, 2602-11.
- MCCLESKEY, E. & GOLD, M. 1999. Ion channels of nociception. *Annu Rev Physiol*, 61, 835-56.
- MCINTIRE, J., UMETSU, S., AKBARI, O., POTTER, M., KUCHROO, V., BARSH, G., FREEMAN, G., UMETSU, D. & DEKRUYFF, R. 2001. Identification of Tapr (an airway hyperreactivity regulatory locus) and the linked Tim gene family. *Nat Immunol*, 2, 1109-16.
- MCKENZIE, B., KASTELEIN, R. & CUA, D. 2006. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*, 27, 17-23.
- MCMAHON, S. & WALL, P. 1984. Receptive fields of rat lamina 1 projection cells move to incorporate a nearby region of injury. *Pain*, 19, 235-47.
- MELLER, S. & GEBHART, G. 1997. Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *Eur J Pain*, 1, 43-52.
- MELLER, S. T., DYKSTRA, C. L. & GEBHART, G. F. 1993. Acute mechanical hyperalgesia is produced by coactivation of AMPA and metabotropic glutamate receptors. *NeuroReport*, 4, 879-882.

- MELLER, S. T., DYKSTRA, C. L. & GEBHART, G. F. 1994. Investigations of the possible role for carbon monoxide (CO) in thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *NeuroReport*, 5, 2337-2341.
- MERSKEY, H. & BOGDUK, N. 1994. Classification of chronic pain, Seattle.
- MESSESLINGER, K. 1997. [What is nociceptor]. *Schmerz*, 11, 353-66.
- MEYERS, J., SABATOS, C., CHAKRAVARTI, S. & KUCHROO, V. 2005. The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med*, 11, 362-9.
- MILLAN, M. 1999. The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*, 57, 1-164.
- MILLAN, M. 2002. Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66, 355-474.
- MIZUNO, T., ZHANG, G., TAKEUCHI, H., KAWANOKUCHI, J., WANG, J., SONOBE, Y., JIN, S., TAKADA, N., KOMATSU, Y. & SUZUMURA, A. 2008. Interferon-gamma directly induces neurotoxicity through a neuron specific, calcium-permeable complex of IFN-gamma receptor and AMPA GluR1 receptor. *FASEB J*, 22, 1797-806.
- MONNEY, L., SABATOS, C., GAGLIA, J., RYU, A., WALDNER, H., CHERNOVA, T., MANNING, S., GREENFIELD, E., COYLE, A., SOBEL, R., FREEMAN, G. & KUCHROO, V. 2002. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*, 415, 536-41.
- MOORE, E., PRESNELL, S., GARRIGUES, U., GUILBOT, A., LEGUERN, E., SMITH, D., YAO, L., WHITMORE, T., GILBERT, T., PALMER, T., HORNER, P. & KUESTNER, R. 2002. Expression of IL-17B in neurons and evaluation of its possible role in the chromosome 5q-linked form of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul Disord*, 12, 141-50.
- MOSELEY, T., HAUDENSCHILD, D., ROSE, L. & REDDI, A. 2003. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*, 14, 155-74.
- MOSMANN, T., CHERWINSKI, H., BOND, M., GIEDLIN, M. & COFFMAN, R. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136, 2348-57.
- MURPHY, C., LANGRISH, C., CHEN, Y., BLUMENSCHNEIN, W., MCCLANAHAN, T., KASTELEIN, R., SEDGWICK, J. & CUA, D. 2003. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 198, 1951-7.
- NEUGEBAUER, V., HAN, J., ADWANIKAR, H., FU, Y. & JI, G. 2007. Techniques for assessing knee joint pain in arthritis. *Mol Pain*, 3, 8.
- NEUGEBAUER, V. & SCHAIBLE, H. 1990. Evidence for a central component in the sensitization of spinal neurons with joint input during development of acute arthritis in cat's knee. *J Neurophysiol*, 64, 299-311.
- OPPMANN, B. 2000. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 13, 715-725.
- PERL, E., KUMAZAWA, T., LYNN, B. & KENINS, P. 1976. Sensitization of high threshold receptors with unmyelinated (C) afferent fibers. *Prog Brain Res*, 43, 263-77.

- PITCHER, M., PRICE, T., ENTRENA, J. & CERVERO, F. 2007. Spinal NKCC1 blockade inhibits TRPV1-dependent referred allodynia. *Mol Pain*, 3, 17.
- POOLE, S., CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. 1999. Hyperalgesia from subcutaneous cytokines. Birkenhauser Basel.
- PRICE, T., CERVERO, F. & DE KONINCK, Y. 2005. Role of cation-chloride-cotransporters (CCC) in pain and hyperalgesia. *Curr Top Med Chem*, 5, 547-55.
- PRICE, T., CERVERO, F., GOLD, M., HAMMOND, D. & PRESCOTT, S. 2009. Chloride regulation in the pain pathway. *Brain Res Rev*, 60, 149-70.
- REDEGELD, M., WEIß, L., DENECKE, H., GLIER, B., KLINGER, R., KRÖNER-HERWIG, B. & NILGES, P. 1995. Qualitätssicherung in der Therapie chronischen Schmerzes Ergebnisse einer Arbeitsgruppe der Deutschen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (DGSS) zur psychologischen Diagnostik. *Der Schmerz*, 9, 151-158.
- REUTER, P. 2004. Schmerz. Springer Lexikon Medizin.
- RICHTER, F., VOIGT, E. & SCHAIBLE, H.-G. 2010. IL-17 sensitizes nociceptive afferent nerve fibers in normal rat knee without activating IL-6 or TNF- α pathways [Online]. San Diego: Society for Neuroscience. 2010].
- ROBERTSON, B., XU, X., HAO, J., WIESENFELD-HALLIN, Z., MHLANGA, J., GRANT, G. & KRISTENSSON, K. 1997. Interferon-gamma receptors in nociceptive pathways: role in neuropathic pain-related behaviour. *Neuroreport*, 8, 1311-6.
- SABATOS, C., CHAKRAVARTI, S., CHA, E., SCHUBART, A., SÁNCHEZ-FUEYO, A., ZHENG, X., COYLE, A., STROM, T., FREEMAN, G. & KUCHROO, V. 2003. Interaction of Tim-3 and Tim-3 ligand regulates T helper type 1 responses and induction of peripheral tolerance. *Nat Immunol*, 4, 1102-10.
- SCHAIBLE, H.-G. 2006. Basic mechanisms of deep somatic pain. In: McMahon S.B., Koltzenburg M., editors. Wall and Melzack's textbook of pain. 5th ed. London: Churchill Livingstone; 2006. 621-34
- SCHAIBLE, H.-G. 2007. [Pathophysiology of pain]. *Orthopade*, 36, 8, 10-2, 14-6.
- SCHAIBLE, H.-G. & GRUBB, B. 1993. Afferent and spinal mechanisms of joint pain. *Pain*, 55, 5-54.
- SCHAIBLE, H.-G. & RICHTER, F. 2004. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg*, 389, 237-43.
- SCHMIDTKO, A., DEL TURCO, D., COSTE, O., EHNERT, C., NIEDERBERGER, E., RUTH, P., DELLER, T., GEISSLINGER, G. & TEGEDER, I. 2005. Essential role of the synaptic vesicle protein synapsin II in formalin-induced hyperalgesia and glutamate release in the spinal cord. *Pain*, 115, 171-81.
- SCHREIBER, R. & FARRAR, M. 1993. The biology and biochemistry of interferon-gamma and its receptor. *Gastroenterol Jpn*, 28 Suppl 4, 88-94; discussion 95-6.
- SEGOND VON BANCHET, G., BOETTGER, M., FISCHER, N., GAJDA, M., BRÄUER, R. & SCHAIBLE, H.-G. 2009. Experimental arthritis causes tumor necrosis factor-alpha-dependent infiltration of macrophages into rat dorsal root ganglia which correlates with pain-related behavior. *Pain*, 145, 151-9.
- SHERRINGTON, C. 1903. Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. *J Physiol*, 30, 39-46.
- SHI, Y., ULLRICH, S., ZHANG, J., CONNOLLY, K., GRZEGORZEWSKI, K., BARBER, M., WANG, W., WATHEN, K., HODGE, V., FISHER, C., OLSEN, H., RUBEN, S., KNYAZEVA, I., CHO, Y., KAO, V., WILKINSON, K.,

- CARRELL, J. & EBNER, R. 2000. A novel cytokine receptor-ligand pair. Identification, molecular characterization, and in vivo immunomodulatory activity. *J Biol Chem*, 275, 19167-76.
- SIVILOTTI, L. & WOOLF, C. 1994. The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol*, 72, 169-79.
- SMITS, H., VAN BEELEN, A., HESSLE, C., WESTLAND, R., DE JONG, E., SOETEMAN, E., WOLD, A., WIERENGA, E. & KAPSENBERG, M. 2004. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *Eur J Immunol*, 34, 1371-80.
- SOMMER, C. & KRESS, M. 2004. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*, 361, 184-7.
- STEIN, C., MILLAN, M. & HERZ, A. 1988. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav*, 31, 455-51.
- SUNG, K., KIRBY, M., MCDONALD, M., LOVINGER, D. & DELPIRE, E. 2000. Abnormal GABAA receptor-mediated currents in dorsal root ganglion neurons isolated from Na-K-2Cl cotransporter null mice. *J Neurosci*, 20, 7531-8.
- SZABÓ, A., HELYES, Z., SÁNDOR, K., BITE, A., PINTÉR, E., NÉMETH, J., BÁNVÖLGYI, A., BÖLCSKEI, K., ELEKES, K. & SZOLCSÁNYI, J. 2005. Role of transient receptor potential vanilloid 1 receptors in adjuvant-induced chronic arthritis: in vivo study using gene-deficient mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 314, 111-9.
- SÁNCHEZ-FUEYO, A., TIAN, J., PICARELLA, D., DOMENIG, C., ZHENG, X., SABATOS, C., MANLONGAT, N., BENDER, O., KAMRADT, T., KUCHROO, V., GUTIÉRREZ-RAMOS, J., COYLE, A. & STROM, T. 2003. Tim-3 inhibits T helper type 1-mediated auto- and alloimmune responses and promotes immunological tolerance. *Nat Immunol*, 4, 1093-101.
- TEUNISSEN, M., KOOMEN, C., DE WAAL MALEFYT, R., WIERENGA, E. & BOS, J. 1998. Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 111, 645-9.
- THOMAS, E., PEAT, G., HARRIS, L., WILKIE, R. & CROFT, P. 2004. The prevalence of pain and pain interference in a general population of older adults: cross-sectional findings from the North Staffordshire Osteoarthritis Project (NorStOP). *Pain*, 110, 361-8.
- TREUDE, R., KENSHALO, D., GRACELY, R. & JONES, A. 1999. The cortical representation of pain. *Pain*, 79, 105-11.
- TRINCHIERI, G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*, 3, 133-46.
- TRINCHIERI, G., PFLANZ, S. & KASTELEIN, R. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*, 19, 641-4.
- VERRI JR., W. A., CUNHA, T. M., POOLE, S., FERREIRA, S. H. & CUNHA, F. Q. 2007. Cytokine inhibitors and pain control. *Revista Brasileira de Reumatologia*, 47, 341-353.

- VIKMAN, K., DUGGAN, A. & SIDDALL, P. 2007. Interferon-gamma induced disruption of GABAergic inhibition in the spinal dorsal horn in vivo. *Pain*, 133, 18-28.
- VIKMAN, K., HILL, R., BACKSTRÖM, E., ROBERTSON, B. & KRISTENSSON, K. 2003. Interferon-gamma induces characteristics of central sensitization in spinal dorsal horn neurons in vitro. *Pain*, 106, 241-51.
- VIKMAN, K., ROBERTSON, B., GRANT, G., LILJEBORG, A. & KRISTENSSON, K. 1998. Interferon-gamma receptors are expressed at synapses in the rat superficial dorsal horn and lateral spinal nucleus. *J Neurocytol*, 27, 749-59.
- VOGT, B. 2005. Pain and emotion interactions in subregions of the cingulate gyrus. *Nat Rev Neurosci*, 6, 533-44.
- WALL, P. & WOOLF, C. 1984. Muscle but not cutaneous C-afferent input produces prolonged increases in the excitability of the flexion reflex in the rat. *J Physiol*, 356, 443-58.
- WHITESIDE, G., ADEDOYIN, A. & LEVENTHAL, L. 2008. Predictive validity of animal pain models? A comparison of the pharmacokinetic-pharmacodynamic relationship for pain drugs in rats and humans. *Neuropharmacology*, 54, 767-75.
- WIECK, H. & LEHRL, S. 1980. [Pain syndromes: the situation in general practice]. *Med Welt*, 31, 1259-62.
- WIERTELAK, E., FURNESS, L., HORAN, R., MARTINEZ, J., MAIER, S. & WATKINS, L. 1994. Subcutaneous formalin produces centrifugal hyperalgesia at a non-injected site via the NMDA-nitric oxide cascade. *Brain Res*, 649, 19-26.
- WILLENBORG, D. O., FORDHAM, S., BERNARD, C. C., COWDEN, W. B. & RAMSHAW, I. A. 1996. IFN-[gamma] plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 157, 3223-3227.
- WILLIS, W. D. & COGGESHALL, R. E. 2004. Sensory mechanisms of the spinal cord, New York, Kluwer Academic/ Plenum Publisher.
- WILLIS, W. J. 1999. Dorsal root potentials and dorsal root reflexes: a double-edged sword. *Exp Brain Res*, 124, 395-421.
- WOOLF, C. & MCMAHON, S. 1985. Injury-induced plasticity of the flexor reflex in chronic decerebrate rats. *Neuroscience*, 16, 395-404.
- WOOLF, C. & WALL, P. 1986. Relative effectiveness of C primary afferent fibers of different origins in evoking a prolonged facilitation of the flexor reflex in the rat. *J Neurosci*, 6, 1433-42.
- YAKSH, T. 1989. Behavioral and autonomic correlates of the tactile evoked allodynia produced by spinal glycine inhibition: effects of modulatory receptor systems and excitatory amino acid antagonists. *Pain*, 37, 111-23.
- YAO, Z., FANSLAW, W., SELDIN, M., ROUSSEAU, A., PAINTER, S., COMEAU, M., COHEN, J. & SPRIGGS, M. 1995. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity*, 3, 811-21.
- ZIMMERMANN, M. 2004. Neuronale Mechanismen der Schmerzchronifizierung. *Der Orthopäde* 33, 508-514

7 Anhang

7.1 Danksagung

Nun ist es Zeit, mich bei den Menschen zu bedanken, die mir während meiner Promotion jederzeit zur Seite standen.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. H.-G. Schaible, welcher mir die Arbeit an seinem Institut ermöglichte, indem er mir das Promotionsthema überließ und meine Arbeit im Endstadium unzählige Male geduldig Korrektur las.

Ebenso bin ich Dr. M.-K. Böttger sehr dankbar für seine freundliche Unterstützung und seiner Geduld, mit der er mich stets auf dem Weg zur Promotion begleitete. Es ist nicht selbstverständlich, trotz Arbeitsplatz- und Wohnortwechsel einen Promovenden bis zur Verteidigung zu begleiten.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Richter, ohne dessen Hilfe diese Promotion nie beendet worden wäre. Vielen Dank für die vielen gemeinsamen Stunden am Rechner bei der Überarbeitung und Fertigstellung dieser Dissertation. Ich habe selten einen so hilfsbereiten Menschen kennen gelernt und werde Sie als persönliches Vorbild in Erinnerung behalten.

Weiterhin gilt es, auch den übrigen Mitarbeitern des Institutes für Physiologie I Dank auszusprechen, welche stets ein offenes Ohr für meine Bedürfnisse hatten und mich auch in scheinbar schweren Zeiten aufmunterten – Danke! In eurem Kollegienkreis herrschte immer eine freundliche Atmosphäre, sodass es stets eine Freude war mit euch zu arbeiten.

Renate Stöckigt bin ich sehr dankbar für die vielen Stunden, die sie investierte, um mir bei der Datenerhebung und der Tierpflege behilflich zu sein.

Dem IZKF danke ich für die finanzielle Unterstützung in Form eines 12-monatigen Promotionsstipendiums.

Meiner Familie möchte ich dafür danken, dass sie mir das Studium der Medizin ermöglichten und immer für mich da sind, wenn es gilt voran zu kommen und meinen Weg zu finden; sie haben mir keine Möglichkeit verwehrt, mich weiterzuentwickeln und stehen jederzeit hinter mir – das werde ich nicht vergessen.

Vielen Dank an all die, welche ich nicht namentlich erwähnt habe, Freunde, Studienkollegen, Arbeitskollegen – ich weiß, was ich an euch habe.

7.2 Lebenslauf

Name: Diana Kümmel

Geburtsdatum: 06. September 1985

Geburtsort: Eisenach

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Anschrift: Niederberger Höhe 07, 56077 Koblenz

Schulbildung

08/1992 – 07/1996 1. Staatliche Grundschule Eisenach

08/1996 – 06/2004 Elisabeth – Gymnasium Eisenach

25.06.2004 Abitur mit „sehr gut“ (1,2)

Studium

10/2004 Studium der Humanmedizin an der FSU Jena

08/2006 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung

08/2010 – 07/2011 Praktisches Jahr

10/2011 – 12/2011 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung

Labortätigkeit

05/2008 – 08/2010 Institut für Physiologie I der Friedrich-Schiller-Universität Jena
im Rahmen der Dissertation

Stipendien

10/2009 – 09/2010 IZKF-Promotionsstipendium der F.-Schiller-Universität Jena

Beruflicher Werdegang:

seit 02/2012 Ärztin in Weiterbildung für Unfallchirurgie/ Orthopädie im
Stiftungsklinikum Mittelrhein

Ort, Datum

Unterschrift

7.3 Eigene Veröffentlichung

Long-term antinociceptive properties of different hyaluronic acid preparations in an animal model of repetitive joint pain

Michael K Boettger, MD; Diana Kümmel; Andrew Harrison; Hans-Georg Schaible, M.D.

Differential effects of locally and systemically administered soluble glycoprotein 130 on pain and inflammation in experimental arthritis.

Boettger MK, Leuchtweis J, Kümmel D, Gajda M, Bräuer R, Schaible HG.
Arthritis Res Ther. 2010;12(4):R140. Epub 2010 Jul 13

7.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. med. M. Böttger,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers