

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Einfluss des Immunsystems auf das Komplex-regionale Schmerzsyndrom (CRPS):
Untersuchung eines IL-4-Rezeptor-Knockout Stammes im Mausfrakturmodell und
Messung der Dendritischen Zellen in der Haut von CRPS-Patienten

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Jens Wacker
aus Troisdorf

Mainz, 2022

Tag der Promotion:

6. Dezember 2022

Für meinen Sohn

1 Inhaltsverzeichnis

1 Inhaltsverzeichnis	4
2 Abkürzungsverzeichnis	6
3 Einleitung	7
4 Fragestellungen	10
4.1 HAUPTFRAGESTELLUNGEN	10
4.2 NEBENFRAGESTELLUNGEN	10
5. <i>Allgemeine Grundlagen CRPS</i>	11
5.1 DEFINITION UND DIAGNOSEKRITERIEN	11
5.2 EPIDEMIOLOGIE	13
5.3 KLINISCHES ERSCHEINUNGSBILD	14
5.4 PATHOPHYSIOLOGIE	15
5.4.1 <i>Verstärkte Immunreaktion</i>	16
5.4.2 <i>Entzündung</i>	17
5.4.3 <i>Zentrale und periphere Sensibilisierung/Veränderung der Plastizität</i>	19
5.4.4 <i>Beteiligung des sympathischen Nervensystems</i>	20
5.4.5 <i>Veränderte kutane Innervation nach Trauma</i>	20
5.4.6 <i>Genetische Faktoren</i>	21
5.4.7 <i>Psychologische Faktoren</i>	22
5.5 TIERMODELLE	22
5.6 THERAPIE	23
5.6.1 <i>Medikamentöse Therapie</i>	23
6 <i>Material und Methoden</i>	25
6.1 VERSUCHSTIERE	25
6.2 TIBIA-FRAKTUR	26
6.2.1 <i>Verwendete Pharmaka</i>	27
6.3 MECHANISCHE ALLODYNIE	28
6.4 KÄLTEALLODYNIE	29
6.5 HINTERPFOTEN-GEWICHTSBELASTUNG	29
6.6 HINTERPFOTEN-VOLUMEN-MESSUNG	30
6.7 HINTERPFOTEN-TEMPERATURMESSUNG	30
6.8 CATWALK-GANGANALYSE	30
6.9 IMMUNHISTOCHEMIE	33
6.9.1 STATISTISCHE METHODEN	34
7 <i>Ergebnisse</i>	35
7.1 ERGEBNISSE ZU DEN HAUPTFRAGESTELLUNGEN	35
7.1.1 <i>Ergebnisse zur Hinterpfoten-Volumenmessung</i>	35
7.1.2 <i>Ergebnisse zur Hinterpfoten-Temperaturmessung</i>	37
7.2 ERGEBNISSE ZU DEN NEBENFRAGESTELLUNGEN	38
7.2.1 <i>Ergebnisse hinsichtlich der Kälte-Allodynie</i>	38
7.2.2 <i>Ergebnisse zur mechanischen Hyperalgesie</i>	39
7.2.3 <i>Ergebnisse hinsichtlich der Pfotenbelastung</i>	41
7.2.4 ERGEBNISSE ZUR GANGANALYSE MITTELS CATWALK XT	42
7.2.4.1 <i>Laufdauer/Lauf</i>	42
7.2.4.2 <i>Durchschnittsgeschwindigkeit</i>	43
7.2.4.3 <i>Schrittlänge</i>	44
7.2.4.4 <i>Geschwindigkeit rechte Hinterpfote während der Schwungphase</i>	46
7.2.4.5 <i>Schrittzzyklus</i>	47
7.3 ERGEBNISSE DER QUANTIFIZIERUNG VON LANGERHANS-RIESENZELLEN IN HUMANEN HAUTBIOPSATEN	48
8 <i>Wissenschaftliche Diskussion</i>	50
8.1 DISKUSSION TIBIAFRAKTURMODELL (TFM)	50
8.2 ERGEBNISDISKUSSION UND EINORDNUNG IN DEN WISSENSCHAFTLICHEN KONTEXT	51
8.3 EINFLUSS DES IL4-REZEPTOR-KNOCKOUTS AUF DIE POSTTRAUMATISCHE ENTZÜNDUNG	55
8.4 IMMUNHISTOCHEMIE	57
8.5 LIMITATIONEN DER STUDIE	58
9 <i>Zusammenfassung und Ausblick</i>	59
10 <i>Abbildungsverzeichnis</i>	62

11 Tabellenverzeichnis.....	62
12 Literaturverzeichnis.....	62
13 Anhang.....	68
13.1 DANKSAGUNG	68

2 Abkürzungsverzeichnis

ABB	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting enzyme
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
BALB	Bagg's Albino (inbred research mouse strain)
CD	Clusters of differentiation
CD1a+	CD1a positive Zellen
CGRP	Calcitonin gene-related Peptide
CPIP	Chronisches postischämisches Schmerzmodell
CRPS	complex regional pain syndrome
DOR	d-Opioidrezeptoren
DRG	Dorsal root ganglion
EXP	Exposure in vivo physiotherapy
HLA	Humanes Leukozytenantigen
IASP	International Association for the Study of Pain
IFN	Interferon
Ig	Immunglobuline
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPCI	Integrated Primary Care Information
MANOVA	Multifaktorielle Varianzanalyse
MOR	m-Opioidrezeptoren
NGF	Nervenwachstumsfaktor
PGP	Protein Gene Product
PBS	Phosphate-buffered saline
RSD	Reflexsympathische Dystrophie
SMP	Sympathisch vermittelte Schmerzen
SPSS	Statistical package for the social sciences
TH-Zellen	T-Helferzellen
TFM	Tibia-Frakturmodell
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
ZNS	Zentralnervensystem

3 Einleitung

Silas Weir Mitchell dokumentierte die Symptomatik bei CRPS 1864 erstmals detailliert (Sebastin, 2011). Mitchell bemerkte, zusammen mit Morehouse und Keen, das häufige Auftreten von Schmerzen, die durch das vorliegende Trauma nicht vollständig zu erklären waren. Mitchell prägte den Begriff „Kausalgie“ aus dem Griechischen Kausis (Feuer) + Algos (Schmerz) (Sebastin, 2011). Schmerz und Hyperalgesie sind bis heute die Leitsymptome der Erkrankung (Dimova, 2019). Charakteristisch für das komplex-regionale Schmerzsyndrom ist der Nachweis von sensorischen (Hyperästhesie/Allodynie), vasomotorischen (Asymmetrie der Hauttemperatur), sudomotorischen (Ödem), sowie trophischen Symptomen (veränderter Haarwuchs/verändertes Nagelwachstum) an einer Extremität, die durch keine andere Diagnose besser erklärt werden können. Leitsymptom ist nach wie vor ein brennender, neuropathischer, einschließender Spontanschmerz/Ruheschmerz einer Intensität, die durch das verursachende Trauma nicht zu erklären ist und der sich keinem Dermatome oder Innervationsgebiet eines peripheren Nerven zuordnen lässt (Birklein and Schlereth, 2015).

Es wird eine akute und chronische Phase beim komplex-regionalen Schmerzsyndrom unterschieden. Diese Phasen des CRPS müssen allerdings nicht immer diesem Muster folgen.

Die frühen Symptome sind oft eine überwärmte, erythematöse, geschwollene, schmerzhafteste Extremität (warme Phase). Hier werden periphere Mechanismen als Ursache angenommen, insbesondere eine neurogene Entzündung (Parkitny et al., 2013, Linnman et al., 2013, Cooper and Clark, 2013). Eine wichtige Rolle bei der Vermittlung der Entzündungsreaktion spielen hier die Keratinozytenaktivierung, sowie die Proliferation und Expression von Entzündungsmediatoren wie z.B. Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF- α), Interleukin-1-beta (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6), Nervenwachstumsfaktor (NGF) und die Mastzellaktivierung. Die Substanz-P ist ebenfalls als eines der entscheidenden Signalmoleküle anzunehmen (Wei et al., 2016). Darüber hinaus gibt es Evidenz für kutane immunologische Mechanismen (Birklein et al., 2014) und autoimmune Prozesse als Ursachen für die Entzündungsreaktion in der akuten Phase des CRPS (Li et al., 2014).

Im zeitlichen Verlauf steht weiterhin eine schmerzhafteste, allerdings eine im Vergleich zur gesunden Seite kalte Extremität im Vordergrund. Hier zeigen sich häufig Atrophien, Dystrophien und Veränderungen im Sinne einer Osteoporose, sowie autonome Störungen (Cosmi and Mazzoleni, 2014). Auch Bewegungsstörungen

einschließlich Tremor und fokalen Dystonien wurden beschrieben (Linnman et al., 2013). Diese späteren Veränderungen sind im Gegensatz zu den akuten Veränderungen zentralen Prozessen geschuldet im Rahmen der Neuroplastizität (Wei et al., 2016).

Hinsichtlich eines strukturierten Vorgehens bei der Diagnosestellung wurde 1994, unter der Schirmherrschaft der IASP (International Association for the Study of Pain), die Nomenklatur, „complex regional pain syndrome“ (CRPS), festgelegt (Galer et al., 1998). Hier wurden auch die IASP-Diagnosekriterien beschlossen. Es erfolgte eine Unterteilung des CRPS in Typ I und II.

Die klinischen Merkmale beider Typen sind identisch und das einzige Unterscheidungsmerkmal ist das Vorhandensein einer nachgewiesenen peripheren Nervenverletzung bei CRPS Typ II.

Aktuell werden die sogenannten Budapest-Kriterien zur Diagnosestellung herangezogen, die eine höhere Spezifität (0,68) im Vergleich mit den ursprünglichen IASP-Diagnosekriterien (0,36) aufweisen (Harden et al., 2010).

Untersuchungen konnten zeigen, dass es bei CRPS Patienten zu einer Dysregulation zwischen pro-inflammatorischen und anti-inflammatorischen Zytokinen kommt. Pro-inflammatorische Zytokine (Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin-2 (IL-2), IL-1beta, IL-6) werden hochreguliert, während anti-inflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10) reduziert nachzuweisen sind.

Die adaptive Immunität scheint ebenfalls an der Pathophysiologie des CRPS beteiligt zu sein. In Tierversuchen finden sich auch Veränderungen in der angeborenen Immunantwort wie z.B. die Hochregulation von Keratinozyten (Schlereth et al., 2014). Zusätzlich wird CRPS von einer verstärkten neurogenen Entzündung begleitet, die hauptsächlich durch Neuropeptide, wie z.B. Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) und Substanz P vermittelt wird (Kramer, 2012).

IL-4 ist ein wichtiges Zytokin in der Pathologie von Allergien und anderen immunologischen Erkrankungen, wo es von T-Zellen sezerniert wird, um die B-Zell-Aktivierung und den IgE-Klassenwechsel zu induzieren (Gadani et al., 2012).

Mit Tiermodellen können aufgrund verschiedener Limitationen (u.a. sehr begrenzte Lebenserwartung von Ratten/Mäusen) nie alle Aspekte eines CRPS untersucht werden. Tiermodelle sind hinsichtlich der nozizeptiven, entzündlichen, immunologischen und trophischen Veränderungen allerdings ein wichtiger und etablierter Bestandteil, um Erkenntnisse über die frühe Pathophysiologie des posttraumatischen CRPS zu gewinnen (Birklein et al., 2018).

In dieser experimentellen Arbeit wurde das Tibia-Frakturmodell (TFM) verwendet. Nach distaler Tibiafraktur und Ruhigstellung (Gips) der entsprechenden Extremität entwickeln die Tiere Ödeme, Anstieg der Hauttemperatur, periartikuläre Osteoporose, vermehrte Protein-Extravasation, spontanes Schmerzverhalten und mechanische Hyperalgesie als klassische CRPS-Symptomatik (Birklein and Schlereth, 2015, Guo et al., 2004).

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Beitrag zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie des CRPS zu leisten.

Im Maus-Tiermodell (Tibiafrakturmodell) wurden zwei Gruppen männlicher BALB/c-Mäuse (Wildtyp Tiere vs. IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere) hinsichtlich einer prolongierten Entzündungsreaktion (Ödembildung, Veränderungen der Hauttemperatur) nach distaler Tibiafraktur und konservativer Behandlung (Ruhigstellung mit Gips) untersucht.

Der Fokus dieser Arbeit war die Frage nach dem Einfluss des IL-4-Rezeptor-Knockouts (Knockout eines antiinflammatorischen Zytokins) auf die Entwicklung der CRPS-typischen Symptome bei den Mäusen und die Entwicklung der Symptomatik im zeitlichen Verlauf.

Darüber hinaus wurden Veränderungen der mechanischen Hyperalgesie unter Verwendung von von-Frey-Filamenten untersucht. Bezüglich der Kälte-Allodynie wurde die Reaktion auf lokale Aceton-Applikation getestet. Die Untersuchung der Pfotenbelastung der Tiere zu festgelegten Untersuchungszeitpunkten erfolgte zur Beurteilung des Spontanschmerzes. Alle Untersuchungen erfolgten zu unterschiedlichen Zeitpunkten, um akute und chronische Veränderungen zu erfassen.

Zur standardisierten Analyse des Gangbildes verwendeten wir das „Catwalk XT-System“ zur Beurteilung der Funktionseinschränkung und zur Beurteilung des Spontanschmerzes.

Zur Untersuchung der kutanen Immunreaktion bei CRPS-Patienten untersuchten wir immunhistochemisch vorbereitete Hautbiopsie-Proben und Quantifizierten die Langerhans-Zellen in Epidermis und Dermis im Seitenvergleich bei Patienten mit akutem bzw. chronischem CRPS.

4 Fragestellungen

4.1 Hauptfragestellungen

- Kann eine vermehrte Ödembildung als Hinweis auf eine prolongierte inflammatorische Reaktion (Ödembildung) nach distaler Tibiafraktur objektiviert werden?
- Gibt es bezüglich der Ödembildung signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Wildtyp-Tiere und der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere?
- Wie entwickelt sich die Ödembildung über die Zeit zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten bei der Gruppe der Wildtyp-Tiere und der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere?
- Kann eine vermehrte Überwärmung der frakturierten rechten Hinterpfote als Hinweis auf eine prolongierte inflammatorische Reaktion nach distaler Tibiafraktur objektiviert werden?
- Gibt es bezüglich der Überwärmung der betroffenen Pfote signifikante Unterschiede zwischen der Gruppe der Wildtyp-Tiere und der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere?
- Wie entwickelt sich die Überwärmung der betroffenen Pfote über die Zeit zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten bei der Gruppe der Wildtyp-Tiere und der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere?

4.2 Nebenfragestellungen

- Können Unterschiede (hinsichtlich Kälte-Allodynie, mechanischer Allodynie, Pfotenbelastung) zwischen der Gruppe der Wildtyp-Tiere und der Gruppe der IL-4-Rezeptor Knockout Tiere im zeitlichen Verlauf (3, 6, 9 und 12 Wochen) nach distaler Tibiafraktur und konservativer Behandlung (Ruhigstellung mit Gips) objektiviert werden?
- Wie entwickelt sich die einzelnen Parameter (Kälte-Allodynie, mechanische Allodynie, Pfotenbelastung) über die Zeit zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten bei der Gruppe der Wildtyp-Tiere und der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere?
- Sind Unterschiede bei der Analyse des Gangbildes (Durchschnittsgeschwindigkeit, Dauer eines vollständigen Laufs, Dauer für

Stand- und Schwungphase, Schrittlänge, Geschwindigkeit der Pfotenbewegung während der Schwungphase) als Maß der Funktionseinschränkung und des Spontanschmerzes zwischen der Gruppe der Wildtyp-Tiere und der Gruppe der IL-4-Rezeptor Knockout Mäuse nachweisbar?

- Sind Unterschiede hinsichtlich der Anzahl von Langerhans-Riesenzellen in humanen Hautproben (immunhistochemische Färbung mit CD1a) zwischen der gesunden Extremität und der betroffenen Extremität bei CRPS-Patienten nachweisbar als Hinweis auf eine verstärkte Immunreaktion beim komplex-regionalen Schmerzsyndrom?

5. Allgemeine Grundlagen CRPS

5.1 Definition und Diagnosekriterien

Das komplexe regionale Schmerzsyndrom (CRPS) ist durch starke, andauernde, neuropathische Ruheschmerzen in der betroffenen Extremität gekennzeichnet. Die Schmerzen werden von sensorischen, vasomotorischen, sudomotorischen, motorischen und trophischen Veränderungen, sowie von Ödemen begleitet (Goh et al., 2017). Der Schmerz ist regional begrenzt, kann allerdings nicht auf ein bestimmtes Dermatom bezogen werden.

CRPS wird in der Regel durch ein Trauma (meist distale Frakturen einer Extremität) oder eine Operation ausgelöst. Das Trauma erklärt nicht die Dauer und Intensität des Schmerzes und der weiteren Symptome. Die obere Extremität ist häufiger betroffen als die untere Extremität. CRPS ist in der Regel auf eine Extremität beschränkt, obwohl Fälle von CRPS an mehreren Extremitäten beschrieben wurden.

Das CRPS Typ I tritt ohne objektivierbare Nervenläsion auf, wohingegen bei einem CRPS Typ II eine Nervenläsion vorliegt (Goh et al., 2017). Diese Unterscheidung führt nicht zu Unterschieden in der klinischen Präsentation und der Wahl der Behandlung.

Die Diagnose CRPS erfolgt nach anamnestischen und klinischen Kriterien. Für die aktuellen Budapest-Kriterien der IASP (Harden et al., 2010) konnte auch die Überlegenheit gegenüber den ursprünglichen IASP-Kriterien nachgewiesen werden, insbesondere aufgrund der deutlich höheren Spezifität (Harden et al., 2010). Die Diagnose „CRPS“ kann anhand der Diagnosekriterien gestellt werden, wenn andere

Differentialdiagnosen ausgeschlossen wurden. Was in den gegenwärtigen IASP-Kriterien nicht berücksichtigt wird, ist, dass die Symptome die Extremitäten betreffen, distal auftreten und über das Innervationsgebiet eines Nerven hinausgehen. Die *Tabelle 1* gibt einen Überblick über die klinischen und wissenschaftlichen Budapest-Kriterien.

Tabelle 1: Diagnosekriterien „Budapest-Kriterien“ CRPS; modifiziert nach (Birklein and Schlereth, 2015)

CRPS_ Diagnosekriterien; „Budapest-Kriterien“	
1	Anhaltende Schmerzen, die im Vergleich zum initialen/auslösenden Trauma unverhältnismäßig sind
2	Anamnestisch muss <u>mindestens 1 Symptom in 3 der folgenden 4 Kategorien</u> vorliegen: Sensorisch: Hyperästhesie und/oder Allodynie Vasomotorisch: Asymmetrie der Hauttemperatur und/oder Veränderung in der Hautfarbe Sudomotorisch/Ödem: Ödem und/oder Veränderung/Asymmetrie im Schwitzen Motorisch/trophisch: Bewegungseinschränkung und/oder motorische Dysfunktion wie Schwäche, Tremor oder Dystonien und/oder trophische Veränderungen (Haare, Nägel, Haut)
3	Zum Zeitpunkt der Untersuchung muss mindestens 1 Symptom in <u>mindestens 2 (klinisch)</u> oder <u>mindestens 3 (wissenschaftlich)</u> der folgenden Kategorien vorliegen: Sensorisch: Hyperalgesie auf spitze Reize (z.B. Nadelstiche) und/oder Allodynie auf leichte Berührung und/oder tiefen, somatischen Druck und/oder Gelenkbewegungen Vasomotorisch: Asymmetrie der Hauttemperatur und/oder Veränderung/Asymmetrie in der Hautfarbe Sudomotorisch: Ödem und/oder Veränderung/Asymmetrie im Schwitzen Motorisch/trophisch: Bewegungseinschränkung und/oder motorische Dysfunktion wie Schwäche, Tremor oder Dystonien

	und/oder trophische Veränderungen (Haare, Nägel, Haut)
4	Es liegt keine andere Erkrankung vor, die die Symptomatik besser erklärt
<p>Die Diagnose „komplex regionales Schmerzsyndrom“ erfordert eine Übereinstimmung/Konformität in allen 4 o.g. Punkten.</p> <p>Es gibt 2 Versionen: Die Kriterien für die klinische Anwendung sind erfüllt, wenn unter Punkt 3 mehr als 2 Merkmale zutreffen. Das Einschlusskriterium für wissenschaftliche Studien ist erfüllt, wenn 3 oder mehr Merkmale zutreffen.</p>	

5.2 Epidemiologie

Eine Studie aus dem Jahre 1999 von Allen et al. bewertete epidemiologische Variablen bei 134 CRPS-Patienten, die in einer Klinik für chronische Schmerzen in den USA untersucht wurden. Die durchschnittliche Dauer der CRPS-Symptome vor der Auswertung im Schmerzzentrum betrug 30 Monate und 47% hatten eine ärztlich verordnete Ruhigstellung in der Anamnese (Allen et al., 1999).

Sandroni et al. führten 2003 eine bevölkerungsbezogene Studie über Inzidenz, Prävalenz, Vorgeschichte und Ansprechen auf die Behandlung des komplexen regionalen Schmerzsyndroms (CRPS) durch. Für CRPS wurden hier die IASP-Kriterien verwendet. Die Studienpopulation befand sich im Olmsted County, Minnesota (1990 Bevölkerung, 106.470). Es wurden 74 Fälle von CRPS I identifiziert, was zu einer Inzidenzrate von 5,46 pro 100.000 gefährdeten Personenjahren und einer Periodenprävalenz von 20,57 pro 100.000 Jahren führte. Das Verhältnis Frauen:Männer betrug 4:1, das Alter lag im Median zu Beginn bei 46 Jahren. Die obere Extremität war doppelt so häufig betroffen wie die untere Extremität. Alle Fälle berichteten über ein vorangegangenes Ereignis, wobei eine Fraktur der häufigste Auslöser war (46%).

Im Rahmen dieser Studie wurde postuliert, dass CRPS I eine geringe Prävalenz aufweist, deutlich häufiger Frauen als Männer betrifft und die obere Extremität häufiger als die untere Extremität betroffen ist (Sandroni et al., 2003).

Eine niederländische Studie von de Mos et al. verfolgte das Ziel, die Inzidenz von CRPS in der Allgemeinbevölkerung zu schätzen. Eine retrospektive Kohortenstudie wurde in den Jahren 1996-2005 im Rahmen des Projekts Integrated Primary Care Information (IPCI) durchgeführt. Dabei handelte es sich um eine Forschungsdatenbank für die Allgemeinmedizin mit elektronischen Patientendaten

von 600.000 Patienten in den gesamten Niederlanden. Die geschätzte Gesamtinzidenzrate von CRPS betrug 26,2 pro 100.000 Personenjahre (95% Konfidenzintervall: 23,0-29,7). Frauen waren mindestens dreimal häufiger betroffen als Männer. Die höchste Inzidenz wurde für Frauen im Alter von 61-70 Jahren dokumentiert. Die obere Extremität war häufiger betroffen als die untere Extremität, und eine Fraktur war das häufigste auslösende Ereignis (44%). Postmenopausale Frauen schienen das höchste Risiko für die Entwicklung von CRPS zu haben (de Mos et al., 2007, Goh et al., 2017).

Zu den bisher beschriebenen Risikofaktoren für diese Erkrankung gehören laut aktueller Studienlage die Menopause, Personen mit einer Vorgeschichte hinsichtlich Migräne, Osteoporose, Asthma und einer Therapie mit ACE-Hemmern (Hemmer des Angiotensin-Converting-Enzyme), sowie Personen mit einem erhöhten Druck unterhalb des Hartverbandes nach Gips-Anlage bei konservativer Therapie nach Extremitäten-Fraktur (de Mos et al., 2008, de Mos et al., 2009). Darüber hinaus ist die Prognose von CRPS bei Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern schlechter (An et al., 1988).

5.3 Klinisches Erscheinungsbild

Das komplex regionale Schmerzsyndrom ist eine Ausschlussdiagnose und die Diagnosestellung sollte anhand der Budapest-Kriterien erfolgen, wenn andere Differentialdiagnosen verworfen wurden (Harden et al., 2010).

Das Hauptsymptom des komplex regionalen Schmerzsyndroms ist ein neuropathischer, häufig einschließender Ruheschmerz/Spontanschmerz, der nicht durch das verursachende Trauma erklärt werden kann.

Die Schmerzen werden von sensorischen (Hyperästhesie und/oder Allodynie), vasomotorischen (Asymmetrie der Hauttemperatur/Veränderung der Hautfarbe) sudomotorischen (Ödem, verändertes Schwitzen), motorischen (Bewegungseinschränkung) und trophischen Veränderungen (verändertes Nagelwachstum), sowie von Ödemen begleitet.

Darüber hinaus kommt es neben den Schmerzen zu Atrophien des Unterhautfettgewebes und der Muskulatur, sowie zu diffusen/fleckigen osteoporotischen Veränderungen (Galve Villa et al., 2016).

Autonome Symptome wie eine Hyper- oder Hypohidrose und Veränderungen der Hautfarbe, meist mit rötlicher Verfärbung der betroffenen Extremität (Galve Villa et al., 2016) sind häufig.

Motorische Störungen treten in den meisten Fällen auf. In der Anfangsphase ist die Bewegung aufgrund der ausgeprägten Ödembildung und der Angst, mit der Bewegung Schmerzen zu induzieren, eingeschränkt (Bussa et al., 2017).

Es werden grundsätzlich zwei Phasen des CRPS beschrieben. Die warme Phase und kalte Phase. Der Zeitpunkt des Auftretens des „warmen CRPS“ bzw. „kalten CRPS“ kann sehr unterschiedlich sein, zudem gibt es auch Patienten mit langjährigen Verläufen und durchgehen „warmem CRPS“.

Häufig tritt allerdings initial die warme Phase auf, die durch das Auftreten der klassischen Entzündungszeichen „calor, rubor, dolor, tumor, functio laesa“ an der betroffenen Extremität gekennzeichnet ist (Bussa et al., 2017). Die Symptome treten meist distal der Fraktur/Verletzung auf. Die Patienten beschreiben einen konstanten, starken, brennenden Ruheschmerz/Spontanschmerz, mit Zunahme der Symptomatik bei Bewegung oder Temperaturveränderungen. Die Schmerzintensität ist inadäquat hoch hinsichtlich des auslösenden Traumas (Misidou and Papagoras, 2019).

Die chronische oder „kalte“ Phase, beginnt typischerweise etwa 6 Monate später nach Abklingen der prolongierten Entzündungsreaktion. Dennoch sind auch primär kalte Verläufe beschrieben (Misidou and Papagoras, 2019). Einige Patienten berichteten auch über Muskelkrämpfe, Tremor und fokale Dystonien (Veldman et al., 1993).

Im chronischen Stadium führt die Fibrose zu einer Bewegungseinschränkung. Obwohl das Hauptunterscheidungsmerkmal zwischen CRPS vom Typ 1 und Typ 2 das Vorhandensein einer Nervenverletzung bei letzterer ist, übersteigen die Symptome bei Typ 2 das Innervationsgebiet des verletzten Nervs und sind weitaus komplexer als bei klassischen neuropathischen Schmerzen (Wasner et al., 2003, Misidou and Papagoras, 2019).

5.4 Pathophysiologie

Die bisherigen Anstrengungen, die Pathophysiologie des CRPS zu verstehen, haben zunehmend zu der Erkenntnis geführt, dass mehrere Mechanismen beteiligt sind. Ein einzelner Mechanismus erklärt die komplexe und vielschichtige Symptomatik nicht

ausreichend. Im Folgenden werden die aktuellen Erkenntnisse über die CRPS-Mechanismen zusammengefasst, die in der Literatur aktuell akzeptiert und dokumentiert sind.

5.4.1 Verstärkte Immunreaktion

Einer der entscheidenden Pathomechanismen ist die verstärkte Immunreaktion. Birklein et al. führten eine Studie mit 55 CRPS-Patienten durch (Birklein et al., 2014). Es wurden Hautbiopsien der betroffenen und der kontralateralen Extremität gewonnen. Die Biopsate wurden immunhistochemisch hinsichtlich Keratinozyten, Zellproliferation, Mastzellmarker, TNF- α und IL-6 untersucht. Bei CRPS-Patienten im frühen Krankheitsstadium wurden Keratinozyten in der betroffenen Haut aktiviert, was zu deren Proliferation, epidermaler Verdickung und hochregulierter TNF- α - und IL-6-Expression führte. Bei chronischem CRPS kam es zu einer verminderten Keratinozytenproliferation mit Abnahme der Epidermisdicke in der betroffenen Haut. Diese Daten unterstützen die Hypothese, dass es in der akuten Phase des CRPS zu einer Aktivierung des kutanen angeborenen Immunsystems kommt mit einer Aktivierung und Proliferation von Keratinozyten und Mastzellen. Dieser Pathomechanismus führt zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren und zu Schmerzen (Birklein et al., 2014).

Osborne et al. beschäftigten sich darüber hinaus mit der kutanen Immunreaktion bei chronischen CRPS-Patienten. 10 CRPS-Patienten mit einer Krankheitsdauer > 1 Jahr, die nach den Budapester Kriterien diagnostiziert wurden (Harden et al., 2010), wurden untersucht.

In der Haut von Patienten mit langanhaltendem CRPS war die epidermale Langerhans-Zelldichte in CRPS-betroffenem Gewebe im Vergleich zu nicht-betroffenem Gewebe signifikant ($p < 0,01$) niedriger (Osborne et al., 2015). In früheren Untersuchungen von Calder et al. wurde allerdings das Vorhandensein zahlreicher Langerhans-Zellen in der Epidermis in Hautbiopsien von Patienten mit der damals gestellten Diagnose „reflexsympathische Dystrophie“ nachgewiesen. Alle Patienten dieser Untersuchung hatten zum Zeitpunkt der Biopsie erhebliche Schmerzen, und alle hatten therapierefraktäre Symptome (Calder et al., 1998). Neben der verstärkten kutanen Immunreaktion spielte auch die Mikroglia eine entscheidende Rolle. Die Infiltration von Immunzellen in das zentrale Nervensystem wurde bei der Untersuchung verschiedener neuroinflammatorischer Erkrankungen

nachgewiesen (Almolda et al., 2015). Es wird angenommen, dass residente Gliazellen mit infiltrierten Immunzellen, einschließlich T-Zellen, interagieren können und deren Rekrutierung, Aktivierung und Funktion innerhalb des ZNS regulieren (Almolda et al., 2015). Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Mikroglia während einer ZNS-Entzündung in dendritische Zellen des Gehirns differenzieren oder einen dendritischen Zellphänotyp erwerben können. Es gibt Hinweise darauf, dass reife entzündliche dendritische Zellen auch nach Beendigung des Entzündungsprozesses im ZNS verbleiben (Fischer and Reichmann, 2001). Somit ist anzunehmen, dass dendritische Zellen einen der primären Entzündungsmediatoren im ZNS bei CRPS darstellen (Russo et al., 2018).

5.4.2 Entzündung

Klassische Entzündungsmechanismen tragen, u.a. vermittelt durch Immunzellen (beispielsweise Lymphozyten und Mastzellen), höchstwahrscheinlich zur Pathophysiologie des CRPS bei. Nach einem Trauma werden durch diese Immunzellen proinflammatorische Zytokine, z.B. Interleukin-1, -2, -6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α freigesetzt. Dies führt zur Plasmaextravasation in das Gewebe und somit zur Ödembildung (Cheng and Ji, 2008).

Darüber hinaus ist die neurogene Entzündung ein wichtiger Mechanismus. Hier werden Zytokine direkt aus den nozizeptiven Fasern als Reaktion auf ein initiales Trauma, einschließlich Nervenläsionen, freigesetzt (Birklein, 2005).

Zu den Neuropeptid-Mediatoren, die an der neurogenen Entzündung beteiligt sind, gehören die Substanz P, das Calcitonin-Gen-Related Peptide (CGRP) und Bradykinin (das auch an der Auslösung der Zytokin-Freisetzung beteiligt ist) (Ferreira et al., 1993).

Diese Neuropeptide erhöhen sowohl die Plasmaextravasation, als auch die Vasodilatation und können so die klassischen Entzündungszeichen „calor, dolor, rubor, tumor, functio laesa“ an der betroffenen Extremität hervorrufen (Li et al., 2018).

Substanz P und TNF- α aktivieren darüber hinaus Osteoklasten, die zu der diffusen/fleckigen Osteoporose beitragen können, die bei CRPS-Patienten häufig röntgenologisch festgestellt wird. CGRP sorgt zudem für gesteigerten Haarwuchs und vermehrtes Schwitzen (Li et al., 2018, Schlereth et al., 2006).

Interleukin-4 (IL-4) ist ein entzündungshemmendes und analgetisches Zytokin, das die Transkription von Opioidrezeptoren induziert und das maßgeblich an der Regulation der Immunität beteiligt ist (Kariyawasam et al., 2020, Uceyler et al., 2011).

IL-4 und IL-13 teilen sich denselben Rezeptor und wirken über den Signal Transducer and Activator of Transcription 6 (STAT6)-Signalweg. IL-4 ist von besonderem Interesse, da es das Immunsystem mit dem Opioidsystem verbindet, indem es die Transkription von m- und d-Opioidrezeptoren (MOR, DOR) induziert (Uceyler et al., 2011). IL-4 ist essentiell für die B-Zell-Sekretion von IgE und steigert die Produktion von IgG1 in vivo. Neben der Regulierung des B-Zell-Wachstums und der Immunglobulinsekretion beeinflusst IL-4 auch die T-Zellen. IL-4 induziert die Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen in TH2-Zellen, die sich durch ihre Fähigkeit auszeichnen, bei Aktivierung die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 zu sezernieren, während es gleichzeitig die Bildung von TH1-Zellen hemmt, die IL-2 und Interferon γ (IFN γ) sezernieren (Stephen T. Smiley, 1998). IL-4 führt zum Klassenwechsel von IgG bzw. IgM zu IgE. IL-4 induziert spezifische biologische Funktionen auf einer Vielzahl von Zellen, einschließlich dendritischer Zellen und T-Zellen, die wesentliche Bestandteile der adaptiven Immunantwort sind (Kariyawasam et al., 2020). IL-4 und IL-13 sind strukturell und funktionell verwandte Zytokine (Kariyawasam et al., 2020). IL-13 reguliert die IgE-Produktion ähnlich wie IL-4, hat aber keinen Einfluss auf die Th2-Zelldifferenzierung (Cernescu et al., 2021). Die Wirkung von IL-4 kann entweder über den Typ-1- oder den Typ-2-Rezeptor vermittelt werden. Der Typ-1-Rezeptor setzt sich aus den IL4-R α - und γ C-Rezeptoruntereinheiten zusammen. Der Typ 2-Rezeptor setzt sich aus IL4- R α und IL-13R α 1 zusammen. IL-4 hat eine sehr hohe Affinität zu IL4-R α mit geringerer Affinität zu γ C und IL-13R α 1. Die Wirkung von IL-13 wird ausschließlich über den Typ-2-Rezeptor vermittelt.

Studien konnten eine deutliche Dysbalance der pro- und antiinflammatorischen Zytokine nachweisen. Bei CRPS-Patienten konnte ein signifikanter Anstieg der proinflammatorischen Zytokine (TNF-, Interleukin-1, -2 und -6) und reduzierte systemische Konzentrationen von antiinflammatorischen Zytokinen (Interleukin-10) festgestellt werden (Uceyler et al., 2007).

TNF- α ist ein Schlüsselzytokin, weil es nicht nur eine direkte pro-nozizeptive Wirkung hat, sondern auch die Produktion anderer an der Entzündung beteiligter Zytokine, darunter Interleukin-1 β und IL-6, induziert.

Birklein et al. berichteten über eine erhöhte systemische CGRP-Konzentration bei CRPS-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Birklein et al., 2001). Darüber hinaus konnte in einer Studie eine signifikante Erhöhung des Plasma-Bradykinins objektiviert werden bei CRPS-Patienten (Blair et al., 1998). Andere Arbeiten weisen darauf hin, dass die Plasmaspiegel der Substanz P bei CRPS-Patienten signifikant höher sind als bei gesunden Kontrollen (Schinkel et al., 2006).

5.4.3 Zentrale und periphere Sensibilisierung/Veränderung der Plastizität

Die zentrale Sensibilisierung beschreibt eine erhöhte Erregbarkeit von nozizeptiven Nervenzellen im Rückenmark oder zentralen Nervensystem. Das nozizeptive Signal, das durch das initiale Trauma erzeugt und durch afferente, periphere Nervenfasern ins Rückenmark geleitet wird, führt dort zur Ausschüttung von Neuropeptiden (Substanz P, Bradykinin und CGRP) und dem exzitatorischen Neurotransmitter. Diese Peptide und Transmitter binden an ihre spezifischen Rezeptoren der nozizeptiven Neurone im Rückenmarkhinterhorn und erhöhen deren Erregbarkeit. Die Rückenmarksneurone erhöhen daraufhin ihre Spontanaktivität und senken ihre Erregungsschwelle auf periphere Reize. Dies führt wiederum zu Allodynie und Hyperalgesie (Bruehl, 2010).

Das initiale Gewebetrauma selbst löst darüber hinaus auch eine lokale periphere Sensibilisierung aus. Primär afferente Fasern im verletzten Bereich setzen mehrere pronozizeptive Neuropeptide frei (z.B. Substanz P, Bradykinin), was ebenfalls zu Hyperalgesie und Allodynie führt (Goh et al., 2017, Marinus et al., 2011, Bruehl, 2010).

Bildgebungsstudien an Patienten mit CRPS haben eine Verkleinerung des Areals beschrieben, das die betroffene Extremität bei CRPS im somatosensorischen Kortex repräsentiert im Vergleich zur nicht betroffenen Extremität (Maihofner et al., 2003). Das Ausmaß der Reorganisation korrelierte signifikant mit der Schmerzintensität und dem Grad der Hyperalgesie, die der Patient berichtete (Maihofner et al., 2003, Maihofner et al., 2004, Goh et al., 2017). Diese Veränderungen normalisieren sich nach erfolgreicher CRPS-Behandlung. Somit gibt es ausreichende Evidenz dafür, dass es bei CRPS-Patienten zu signifikanten Veränderungen hinsichtlich der neuronalen Plastizität kommt.

5.4.4 Beteiligung des sympathischen Nervensystems

Eine Interaktion des sympathischen Nervensystems und der Entzündungsreaktion trägt maßgeblich zur Pathophysiologie des CRPS bei. Das sympathische Nervensystem führt zu kühler Haut, vermehrtem Schwitzen und durch das sympathische Nervensystem aufrechterhaltenen Schmerzen. Der Norepinephrinspiegel ist in der von CRPS betroffenen Extremität niedriger als in der kontralateralen Extremität. Allerdings kommt es durch das Aussprossen sympathischer Fasern und die Hochregulation von Alpha-Adrenozeptoren zu einer adrenergen Überempfindlichkeit. Noradrenalin beeinflusst das Immunsystem und die Produktion von Zytokinen, die wiederum maßgeblich zur Aufrechterhaltung von Hyperalgesie und Allodynie beitragen (Schlereth et al., 2014, Goh et al., 2017, Bruehl, 2010).

5.4.5 Veränderte kutane Innervation nach Trauma

Oaklander et al. untersuchten 18 Patienten, die nach den IASP-Kriterien die Diagnose CRPS-I erhielten. An drei Stellen an der vom CRPS betroffenen und der passenden kontralateralen Extremität der Probanden, sowie an Kontrollstellen wurden Hautbiopsien gewonnen. Anschließend erfolgte die immunhistochemische Untersuchung der intraepidermalen Nervendichte mit Hilfe des neuronalen PGP 9,5 Protein-Antikörpers.

Die axonale Dichte war jedoch an den CRPS-betroffenen Stellen bei 17 von 18 Probanden um durchschnittlich 29% vermindert ($P < 0,001$) (Oaklander et al., 2006). Albrecht et al. berichteten über eine verringerte C-Faser- und $A\delta$ -Faserdichte in den betroffenen Gliedmaßen von CRPS-I-Patienten im Vergleich zu nicht schmerzhaften Kontrollstellen an der gleichen Extremität und im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Es wurde auch eine abnorme Innervation um Haarfollikel und Schweißdrüsen beobachtet (Albrecht et al., 2006).

Morellini et al. untersuchten die Dichte der dermalen Nervenfasern, die Dichte an Mastzellen, sowie die Nähe von Mastzellen zu Nervenfasern in Hautbiopsien, die von den betroffenen und nicht betroffenen Extremitäten von 57 Patienten mit CRPS und 28 gesunden Kontrollen entnommen wurden.

Die immunhistochemische Untersuchung mit dem neuronalen Marker PGP 9,5 zeigte eine Verringerung der intradermalen Nervenfaserdichte. Die Anzahl der intradermalen Mastzellen war bei Patienten und Kontrollen ähnlich, aber der

Prozentsatz der Mastzellen, die weniger als 5 µm von Nervenfasern entfernt waren, war in den betroffenen und nicht betroffenen Gliedmaßen der Patienten signifikant niedriger im Vergleich mit den Kontroll-Probanden. Der Verlust der intradermalen Nervenfasern bei CRPS könnte laut Morellini et al. somit zum Verlust chemotaktischer Signale führen, wodurch die Wanderung der Mastzellen in Richtung der überlebenden Nervenfasern zum Stillstand kommt. Das Versagen der normalen Nervenfasern-Mastzell-Interaktionen könnte zur verzögerten Gewebereparatur und somit zur chronischen Entzündung bei CRPS beitragen (Morellini et al., 2018).

Allerdings gibt es auch Evidenz hinsichtlich erhöhter Mastzellakkumulation in der betroffenen Haut bei Patienten mit akutem CRPS.

Birklein et al. konnten zeigen, dass es beim frühen, akuten CRPS zu einer Aktivierung des kutanen, angeborenen Immunsystems kommt, u.a. mit Mastzellaktivierung und Mastzellproliferation, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Schmerzen (Birklein et al., 2014).

Klein et al. stellten im Rahmen des 18G-Nadelstich-Nervenverletzungs-Modells an der Ratte fest, dass eine deutlich höhere Mastzell-Dichte bei den Tieren mit Nervenverletzung zu verzeichnen war (Klein et al., 2012).

5.4.6 Genetische Faktoren

De Rooij et al. stellten in ihrer Familienstudie fest, dass in dem untersuchten Patientenkollektiv Geschwister von CRPS-Patienten unter 50 Jahren ein dreimal höheres Risiko, an der Erkrankung zu erkranken, aufwiesen. Allerdings ergaben sich keine Hinweise auf ein generell erhöhtes Risiko für die Entwicklung von CRPS bei Geschwistern von CRPS-Patienten (de Rooij et al., 2009a).

Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes, der für die Moleküle des humanen Leukozytenantigens (HLA), HLA-B62- und HLA-DQ8-Allele, kodiert, stark mit der Entwicklung von CRPS korrelieren (de Rooij et al., 2009b). Klare Daten, hinsichtlich einzelner genetischen Veränderungen, die definitiv zur Entwicklung eines CRPS führen, liegen bislang nicht vor.

5.4.7 Psychologische Faktoren

Obwohl beispielsweise Depressionen häufig bei CRPS-Patienten vorkommen (Rommel et al., 2005) ist die Datenlage aktuell nicht ausreichend hinsichtlich eines kausalen Zusammenhangs psychologischer Faktoren und dem Auftreten von CRPS. Auch in umfangreichen Studien (Halicka et al., 2020) konnten einerseits neuropsychologische Veränderungen (z.B. bezüglich der Körperwahrnehmung und höherer kortikaler Funktionen) beobachtet werden. Andererseits wurden auch hier weitere Studien zur genaueren Klärung des Zusammenhangs zwischen psychologischen Veränderungen und CRPS empfohlen.

5.5 Tiermodelle

Es ist nach wie vor entscheidend, Hypothesen in Tiermodellen zu beweisen. Viele Untersuchungen, beispielsweise der neuronalen Plastizität, erfordern höhere Hirnfunktionen und können somit durch Versuche mit Nagetieren nicht ausreichend abgebildet werden. Hinsichtlich der Untersuchung komplexer Verhaltensänderungen wurden bislang nur wenige Versuche mit Hilfe des Frakturmodells unternommen (Birklein et al., 2018). Ein etabliertes Tiermodell ist das chronische postischämische Schmerzmodell (CPIP). Dabei wird ein enganliegender Kunststoff-O-Ring 3 Stunden lang distal über die Hinterpfote geschoben (Coderre et al., 2004, Birklein et al., 2018). Nach der Reperfusion entwickelten die Tiere nur wenige Stunden lang eine Hyperämie und ein Ödem, allerdings zeigten die Tiere mindestens 4 Wochen lang ein Verhalten, das klar hinweisend auf persistierende Schmerzen war. Darüber hinaus kam es in diesem Zeitraum zu Hyperalgesie bei mechanischen Reizen und Kältereizen. Zudem wurde beobachtet, dass die Symptomatik sich sogar auf die unverletzte kontralaterale Hinterpfote ausbreitete (Birklein and Schlereth, 2015). Trotz ausgeprägter, CRPS-ähnlicher Symptomatik gilt es zu berücksichtigen, dass das typische Verhalten bei chronischen Schmerzen beidseitig und nicht einseitig, wie bei CRPS, auftritt. Darüber hinaus halten die Veränderungen nur kurz an, somit lassen sich langfristige Veränderungen nicht ausreichend gut darstellen (Birklein et al., 2018).

Das aktuell realistischste Tiermodell ist das Tibia-Frakturmodell (TFM). Dieses wurde sowohl an Ratten als auch an Mäusen durchgeführt. Nach distaler Tibiafraktur und Ruhigstellung (Gips) der entsprechenden Extremität entwickeln die Tiere Ödeme, Anstieg der Hauttemperatur, periartikuläre Osteoporose, vermehrte Protein-

Extravasation, spontanes Schmerzverhalten und mechanische Hyperalgesie. Diese Symptome treten vor allem an der verletzten Extremität auf, aber auch an der kontralateralen Extremität werden einige Veränderungen beobachtet (Birklein and Schlereth, 2015, Guo et al., 2004). Der offensichtlichste Vorteil dieses Modells ist die Nachahmung der häufigsten Ätiologie des CRPS, der distalen Extremitätenfraktur. Wie auch bei der natürlichen Frakturheilung beim Menschen kommt es auch in diesem Modell in der Regel innerhalb weniger Wochen zu einer Regredienz der Beschwerden (Birklein et al., 2018).

Ein weiteres Modell ist das Modell der Nadelstichverletzung. Der Ischiasnerv wird chirurgisch freigelegt und mit einer Nadel punktiert. Die Tiere entwickeln eine mechanische Hyperalgesie auf der behandelten und in geringerem Ausmaß auch auf der unbehandelten Seite. Sichtbare Zeichen wie bei CRPS können selten beobachtet werden (Siegel et al., 2007).

Über die o.g. Tierversuchsmodelle gibt es noch weitere Ansätze, allerdings jeweils nur mit geringen Entzündungszeichen und somit mit wenig Vergleichbarkeit/Aussagekraft hinsichtlich CRPS. Darüber hinaus wurde nicht berichtet, ob die Symptomatik im jeweiligen Modell über das Innervationsgebiet eines Nerven hinausging. Trotz der Limitationen der einzelnen Modelle haben sie wesentliche Erkenntnisse bezüglich der Pathophysiologie des CRPS erbracht und sind weiterhin ein wichtiger Bestandteil der Forschung (Birklein and Schlereth, 2015).

5.6 Therapie

5.6.1 Medikamentöse Therapie

Hinsichtlich der laut der Leitlinie der deutschen Gesellschaft für Neurologie empfohlenen medikamentösen Therapien gibt die *Tabelle 2* einen Überblick über die verschiedenen Substanzklassen.

Tabelle 2: Übersicht medikamentöse Therapien bei CRPS, modifiziert nach (Birklein, 2018)

Bisphosphonate oral oder i.v.	Empfohlen bei CRPS der oberen und unteren Extremität	Hemmung der Osteoklastenaktivität; Längerfristige Entzündungshemmung; Modulation der spinalen Mikroglia	(Adami et al., 1997) (Manicourt et al., 2004) (Varena et al., 2013)
Steroide oral	Im frühen CRPS-Stadium (Rötung, Ödem, Überwärmung) Kurzzeitiger Einsatz	Antiinflammatorisch Antiödematös	(Christensen et al., 1982)
Gabapentin oral	Therapie der Schmerzen und Sensibilitätsstörungen	Wirkung auf die $\alpha 2/\delta$ - Untereinheit neuronaler Kalziumkanäle	(van de Vusse et al., 2004)
Dimethylsulfoxid (DMSO) topisch	Standardbehandlung in den Niederlanden	Antioxidative Wirkung	Keine ausreichende Evidenz der Wirksamkeit (Perez et al., 2003)

Hinsichtlich der Entzündungsreaktion beim komplex regionalen Schmerzsyndrom sind hier insbesondere die Glukokortikoide zu erwähnen. Sie entfalten ihre antiinflammatorische und antiödematöse Wirkung über die Bindung an Rezeptoren am Zellkern und die Wirkung auf Zellmembranen (Birklein, 2018). Die Wirksamkeit der Steroide konnte in diversen Studien belegt werden (Christensen et al., 1982, Kalita et al., 2006).

Bezüglich der Dosierung und Effektivität gibt es sehr unterschiedliche Angaben und verschiedene Erfahrungen der Behandler, sodass im Einzelfall eine individuelle Entscheidung getroffen werden sollte. In der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für

Neurologie wird laut Studienlage ein Prednisolonäquivalent von > 30-40 mg/Tag über 4 Wochen bei akutem CRPS mit einer Dauer von bis zu 6 Monaten empfohlen (Birklein, 2018).

Diese Steroid-Therapie hat einen Effekt auf die immunologischen Mediatoren, u.a. auch auf die Interleukine, somit ist anzunehmen, dass die Wirkung des Cortisons auch über die Beeinflussung dieser Mediatoren geschieht (de Jong et al., 1999).

6 Material und Methoden

6.1 Versuchstiere

Die Experimente wurden mit 60 männlichen Albino-BALB/c-Mäusen durchgeführt. Davon handelte es sich bei 30 Tieren um IL-4-Rezeptor-Knockout-Mäuse. Die restlichen 30 Tiere waren Wildtyp Albino-BALB/c-Mäuse.

C57BL/6-Mäuse, die ebenfalls häufig für ähnliche Experimente herangezogen werden und die hier verwendeten BALB/c-Mäuse unterscheiden sich in ihrer angeborenen Immunantwort, hauptsächlich zwischen Typ 1 und Typ 2 Helfer-T-Zellen (Th1 und Th2). Bei C57BL/6-Mäusen spielen die Th1-Immunantwort und die IFN γ -Produktion die Hauptrolle. Im Gegensatz dazu ist es bei BALB/c-Mäusen einfacher, eine Th2-Immunantwort zu induzieren. BALB/c-Mäuse neigen dazu, eine stärkere humorale Antwort zu produzieren als C57BL/6-Mäuse (Watanabe et al., 2004). Die Tiere wurden unter spezifischen pathogenfreien Barrierebedingungen in handelsüblichen Kunststoffkäfigen mit den Maßen 20 cm x 25 cm gehalten und es wurden 2-3 Tiere/Käfig untergebracht. Bei der Einstreu handelte es sich um gewöhnliche Holzpellets. Die durchschnittliche Temperatur betrug 24 °C und die Luftfeuchtigkeit circa 40 %. Futter und Wasser wurden ad libitum bereitgestellt und es wurde ein 12-stündiger Tag-/Nacht-Zyklus eingehalten. Die Unterbringung erfolgte in den institutionellen Tieranlagen der „Mouse Behavior Unit“ in Mainz unter Aufsicht der dort zuständigen Tierärzte und Tierpfleger. Vor Beginn der Experimente wurde eine Akklimatisierung der Versuchstiere in der jeweiligen Gruppe für 2-3 Wochen gewährleistet. Alle Verfahren folgten den Richtlinien für Tierversuche des deutschen Tierschutzgesetzes 2006 und hielten sich an die Richtlinien des Komitees für Forschung und ethische Fragen der International Association for the Study of Pain (IASP) von 1983. Sie wurden von der zuständigen Ethikkommission zugelassen, vom Landesuntersuchungsamt genehmigt und vom Anstaltstierarzt beaufsichtigt. Es

wurde darauf geachtet, den Tieren kein unnötiges Leid zuzufügen. 9 der Tiere starben vor dem Ende der Versuche; die übrigen 51 Tiere wurden in die Analyse einbezogen. Wir hielten uns, hinsichtlich Geschlechtes und Alter, an frühere Arbeiten am Tibia-Frakturmodell, um unsere Studie mit der Literatur vergleichbar zu machen (Birklein et al., 2018). In der aktuellen Literatur gibt es Evidenz, dass IL-4-Rezeptor Knockout BALB/c-Mäuse überempfindlich auf taktile Reize (von-Frey-Test) nach einem Trauma reagieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (Uceyler et al., 2011).

6.2 Tibia-Fraktur

Hinsichtlich des Tibia-Frakturmodells (TFM) haben wir uns an vorangegangenen Versuchen anderer Arbeitsgruppen zum Thema CRPS orientiert (Wei et al., 2016, Guo et al., 2012). Initial erfolgte eine Inhalationsnarkose mit Isofluran über einen Verdampfer (Vapor 19,3, Dräger). Das Gas wurde mit reinem Sauerstoff gemischt und eine Konzentration von ca. 1,5% - 2% angestrebt. Nach circa 2 Minuten wurde die Narkosetiefe mit dem Zwischenzehenreflex geprüft. Wenn der Reflex nicht mehr ausgelöst werden konnte, war die gewünschte Narkosetiefe erreicht. Die Maus wurde bei Narkoseeinleitung auf dem Bauch gelagert. Zunächst wurde ein etwa 30 cm langer Leukoplaststreifen zusammengefaltet, sodass er nicht am Fell der Maus festklebte. Dieses wurde zwei- bis dreimal um den Bauch oberhalb der Hinterläufe geschlungen. Anschließend wurde das Band noch einmal um die Tibia geschlungen und dann am Bauch fixiert. Diese Vorbereitung erfolgte zur besseren Befestigung des Gipses und als Schutz vor Hautläsionen durch den Gips. Nach Umlagerung des Versuchstieres auf den Rücken erfolgte die Polsterung der rechten Tibia mit einem Stück Watte. Nach erneuter Prüfung der Narkosetiefe wurde die mit Watte gepolsterte rechte Tibia mit einer Klemme gefasst. Bei gleichzeitiger Fixierung von Sprunggelenk und Hüfte wurde die Klemme um ca. 45° zur Seite gekippt, bis es zu einer spürbaren Fraktur der rechten Tibia kam. Ein etwa 30 cm langes Stück „Cast Tape“ (Gips) wurde in der Mitte halbiert. Anschließend wurde ein weiteres, 1 cm langes, schmales Stück des Cast Tapes abgeschnitten. Eine Hälfte des 30 cm langen Tapes wurde der Maus um den Bauch geschlungen und an dem zuvor befestigten Leukoplast fixiert. Das 1 cm lange Stück wurde verwendet, um den Vorderfuß in leichter Flexionsstellung mit dem Gips zu fixieren. Zuletzt wurde das zweite Stück des Tapes um die Tibia gewickelt und oberhalb der Hüfte fixiert. Zur

Vermeidung eines Kompartiment-Syndroms erfolgte im Bereich der rechten Tibia eine möglichst lockere Stabilisierung mit dem Gips. Der Vorderfuß wurde frei gelassen. Kurz vor dem Ende der Inhalationsnarkose erhielt das Versuchstier eine gewichtsadaptierte Analgesie (Buprenorphin 0,05 µg/kg KG), isotonische Kochsalzlösung zur ausreichenden Flüssigkeitsversorgung postoperativ, sowie Enrofloxacin als Antibiotika-Prophylaxe. Im Anschluss wurde die Inhalationsnarkose beendet und die Maus während der Aufwachphase im Käfig beobachtet hinsichtlich möglicher Komplikationen. Alle Hindernisse wurden aus dem Käfig entfernt, damit ausreichende Bewegungsfreiheit für das Versuchstier gewährleistet war. 12 Stunden und 24 Stunden post-OP wurde der Zustand der Maus erneut kontrolliert und das Analgetikum und die Kochsalzlösung wurden nochmals in der gleichen Dosierung appliziert. Der Gips wurde zur konservativen Frakturheilung für insgesamt 3 Wochen belassen. Anschließend erfolgte eine erneute Inhalationsnarkose und die Entfernung des Gipses. Alle Versuchstiere wurden engmaschig in den 3 Wochen nach Fraktur beobachtet auf Sitz des Gips und hinsichtlich des Gesundheitszustands. Zur Entfernung des Gipses wurde mit einer Schere vorsichtig zunächst der abdominelle Teil des Gipses aufgeschnitten und abgenommen. In der Regel konnte der Gips am Bein der Maus leicht abgezogen werden. Falls dies nicht gelang, wurde der Gips vorsichtig an der Seite aufgeschnitten, um die Maus nicht zu verletzen. Anschließend wurde das Versuchstier in den Käfig gesetzt. Die Temperatur und das Ödem wurden nach dem Entfernen des Gipses gemessen. Alle anderen Tests wurden mit etwas Abstand zur Narkose nach 1-2 Tagen durchgeführt.

6.2.1 Verwendete Pharmaka

Antibiotikum:

Wir haben den Wirkstoff Enrofloxacin verwendet mit dem Handelsnamen Baytril. Das Medikament wurde in verdünnter Lösung subkutan appliziert. Die Konzentration sollte 5 µg pro kg Maus betragen, sodass die Applikation gewichtsadaptiert erfolgte. Die Entnahme erfolgte mit handelsüblichen Pipetten des Herstellers Accumax.

Analgetikum:

Wir verwendeten zur Analgesie den Wirkstoff Buprenorphin mit dem Handelsnamen Temgesic. Das Präparat wurde verdünnt subcutan appliziert. 1ml Temgesic enthalten

0,3 mg des Wirkstoffes. Die Konzentration sollte 0,05 µg pro Kilogramm Maus betragen, sodass eine gewichtsadaptierte Verabreichung erfolgte.

Inhalationsanästhetikum:

Einige der durchgeführten Experimente erfolgten unter Inhalationsnarkose. Verwendet wurde hier der Wirkstoff Isofluran. Hersteller des Präparates mit dem Handelsnamen Forena ist die Firma Abbvie Deutschland. Die Konzentration der Lösung betrug 100 %. Zur Verabreichung wurde ein speziell für Isofluran geeigneter Verdampfer (Vapor 19.3) der Marke Dräger genutzt. Die Konzentration des Isoflurans im Isofluran-Sauerstoffgemisch wurde auf 2 Vol.% eingestellt.

6.3 Mechanische Allodynie

Wir untersuchten die mechanische Allodynie unter Verwendung von Nylon-von-Frey-Filamenten (Aesthesio; Ugo Basile, Monvalle, Italien) nach dem von Chaplan et al. beschriebenen "up-down"-Algorithmus.(Chaplan et al., 1994). Darüber hinaus verwendeten Clark et al. diese Methode zum Nachweis von Allodynie bei Mäusen (Clark et al., 2006). Die Tests wurden in durchsichtigen zylindrischen Plastikbehältern (10 cm Durchmesser und 40 cm Höhe) durchgeführt. Die Mäuse wurden in diese Kästen auf Drahtgitterboden platziert und erhielten vor dem Testverfahren mindestens 30 Minuten Akklimatisierungszeit. Fasern mit sukzessiv zunehmendem Druck (in mN wurden vorsichtig gegen die Hinterpfoten, etwa in der Mitte der Sohle, gedrückt. Die Faser wurde nach oben gedrückt, bis sie leicht gebogen war und 5 Sekunden an Ort und Stelle belassen. Das Zurückziehen oder Lecken der Hinterpfote nach der Faserapplikation wurde als Reaktion gewertet (Guo et al., 2012). Falls keine Reaktion erfolgte, wurde die nächst stärkere Faser in der Testbatterie an der gleichen Pfote verwendet. Wenn eine Reaktion beobachtet wurde, wurde eine weniger starke Faser appliziert. Das Testverfahren wurde bis zu 3 positiven Reaktionen fortgesetzt. Für die Analyse wurde der Mittelwert in mN der 3 positiven Antworten verwendet.

6.4 Kälteallodynie

Bei der Durchführung des Tests wurden die Tiere auf ein Gitter gesetzt (Base Platform 37000-003, UGO Basile). Dabei saßen die Tiere einzeln in einer der 12 transparenten Kunststoffboxen mit den Maßen 10 cm x 10 cm. Den Tieren wurden 30 Minuten Habituationszeit gegeben, bevor mit der Testung begonnen wurde. Als Kontrolle wurde initial ein Tropfen Wasser (temperiert entsprechend der Körpertemperatur) dreimal abwechselnd auf jede plantare Oberfläche der Hinterpfote gegeben und die Reaktion der Maus dokumentiert. Dann wurde dasselbe Verfahren mit einem Tropfen Aceton (0,5 - 1 ml) für jede Pfote abwechselnd ebenfalls dreimal pro Pfote wiederholt. Die Reaktion jeder Maus wurde 20 Sekunden lang aufgezeichnet und dokumentiert.

Die Reaktionen auf Aceton wurden auf einer 4-Punkte-Skala eingestuft:

- 0, keine Reaktion
- 1, schnelles Zurückziehen, Schütteln oder Aufstampfen der Pfote
- 2, längeres Zurückziehen oder wiederholtes Wegziehen der Pfote
- 3, wiederholtes Wegziehen der Pfote mit Lecken der ventralen Pfote

Die Reaktion jedes Tieres wurde entsprechend dokumentiert. Für die Auswertung wurde der Mittelwert aus allen Testungen der rechten Hinterpfote zum jeweiligen Zeitpunkt verwendet.

6.5 Hinterpfoten-Gewichtsbelastung

Für die Messung der bilateralen Hinterpfoten-Gewichtsbelastung als Maß für den Spontanschmerz wurde ein „Incapacitance Device“ (IITC Life Science, Woodland Hills, CA) verwendet. Die Mäuse wurden manuell in vertikaler Position über das Gerät gehalten, wobei die Hinterpfoten auf separaten Metallwaagenplatten ruhten und das gesamte Gewicht der Maus auf den Hinterpfoten lag. Die Dauer jeder Messung betrug 6 s, und es wurden 6 aufeinanderfolgende Messungen im Abstand von 10 s durchgeführt. Alle 6 Messwerte wurden gemittelt, um die bilaterale Gewichtsbelastung der Hinterpfoten zu berechnen. Die Methode mit dem entsprechenden Gerät wurde durch die Gruppe von W. Kingery, Palo Alto im Tibia-Fraktur-Modell validiert (Guo et al., 2012, Li et al., 2014). Nach jeder Maus wurde der Versuchsapparat gründlich mit einer Ethanollösung (70%) gesäubert.

6.6 Hinterpfoten-Volumen-Messung

Zur Bestimmung der dorsal-ventralen Dicke beider Hinterpfoten wurde ein Lasersensorgerät (4381 Precicura, Limab, Goteborg, Schweden) mit einem Messbereich von 200 mm und einer Auflösung von 0,01 mm verwendet. Jede Maus wurde kurz mit Isofluran betäubt und dann vertikal gehalten, so dass jede Hinterpfote auf einer Tischplatte unter dem Laser ruhte. Die Pfote wurde sanft flach auf dem Tisch gehalten, wobei ein kleiner Metallstab an der Oberseite des Sprunggelenks angebracht wurde. Durch optische Triangulation mit einem Abstandsmesssensor wurde der Abstand zur Tischplatte und zur Oberseite der Hinterpfote bestimmt. Die Differenz wurde zur Berechnung der dorsal-ventralen Pfootendicke verwendet. Insgesamt wurden 2 Messungen pro Pfote durchgeführt.

6.7 Hinterpfoten-Temperaturmessung

Die Temperatur der Hinterpfote wurde mit einem feinen Draht-Thermoelement (OM-CP; Omega, Norwalk, CT) gemessen, das auf die Pfotenhaut aufgebracht wurde. Der Untersucher hielt die Temperatursonde mit einem isolierenden Styroporblock. Drei Stellen wurden über dem Dorsum der Hinterpfote getestet: Zwischen dem ersten und zweiten Mittelfußknochen (medial), dem zweiten und dritten Mittelfußknochen (zentral) und dem vierten und fünften Mittelfußknochen (lateral). Nachdem eine Stelle bei einer Hinterpfote getestet wurde, wurde dieselbe Stelle sofort bei der kontralateralen Hinterpfote getestet. Das Testprotokoll lautete: medial dorsal rechts dann links, zentral dorsal rechts dann links, lateral dorsal rechts dann links, medial dorsal links dann rechts, zentral dorsal links dann rechts und lateral dorsal links dann rechts. Die sechs Messungen für jede Hinterpfote wurden für die Bestimmung der mittleren Temperatur gemittelt. Nach der Messung wurde die Maus alleine in einen Käfig gesetzt, um dort in Ruhe aufzuwachen. Nach der Aufwachphase folgte eine etwa 15-minütige Beobachtungsphase, um sicher zu stellen, dass es keine weiteren Komplikationen gab.

6.8 Catwalk-Ganganalyse

Wir haben für diese Studie CatWalk XT Version 10.6 (Noldus) verwendet. Licht aus einer Leuchtstoffröhre wurde durch eine Glasplatte emittiert und die Lichtstrahlen wurden im Inneren vollständig reflektiert. Wenn die Pfote einer Maus mit der

Glasoberfläche in Kontakt kam, wurde das Licht nach unten reflektiert und ergab ein scharfes Bild eines hellen Pfotenabdrucks. Eine Kamera wurde unter der Glasplatte befestigt und der gesamte Lauf wurde aufgezeichnet, so dass es möglich war, das komplette Gangbild/Laufmuster zu aufzuzeichnen. Der gläserne Laufsteg wurde so eingestellt, dass er etwas >8 cm breit war und die Kamera 75 cm darunter positioniert wurde, sodass die Größe des virtuellen Laufstegs auf 70 cm Länge und 8 cm Breite eingestellt werden konnte. Vor Beginn des Experiments wurden die Einstellungen für die Kameraerkennung mit der Auto-Detect-Funktion des Programms angepasst. Das System wurde bei jeder Einstellung der Kameraposition mit Hilfe eines rechteckigen Kalibrierblatts von 10 × 5 cm kalibriert. Jedes Tier erhielt 2 Tage Gewöhnungszeit an das Experiment mit entsprechenden Testläufen. Um die Tiere zum Laufen zu bewegen, wurde ein sanfter Luftzug eingesetzt. Alle Trainings- und Testsitzungen wurden vom gleichen Forscher in einem dunklen Raum zu einer einheitlichen Tageszeit (beginnend um 17 Uhr) durchgeführt. Vor jeder Sitzung wurden die Tiere 30 Minuten lang an den Versuchsraum gewöhnt. Am ersten der 5 Trainingstage wurden die Mäuse in die Versuchsumgebung und den CatWalk-Apparat eingeführt. Zuerst wurden sie in ihren Heimkäfigen in den Versuchsraum gebracht und 30 Minuten lang ungestört gelassen. Dann wurden sie einzeln auf den CatWalk gesetzt und durften die Umgebung 10 Minuten lang frei erforschen. Es wurde darauf geachtet, dass der Laufsteg vor und nach jedem Versuchstier gründlich gereinigt wurde. Am Ende der Sitzung wurden die Mäuse in ihre Heimkäfige zurückgebracht. An jedem der folgenden 4 Tage wurden die Mäuse darauf trainiert, den Laufsteg zu überqueren. Nach einer 30-minütigen Akklimatisierung an den Raum wurden sie an einem Ende des Laufstegs platziert und ggf. durch einen sanften Luftzug ermutigt, zum anderen Ende hinüberzulaufen. Die Trainingseinheit wurde beendet, sobald das Tier erfolgreich drei vollständige Läufe über den Laufsteg absolviert, oder eine maximale Zeit von 10 Minuten auf dem Laufsteg erreicht hatte. Die Daten des Baseline-Tests wurden am Tag unmittelbar nach der Trainingsperiode (3 Tage vor Tibiafraktur) und dann am Tag 1 nach Gips-Entfernung (nach 3 Wochen Heilungsphase mittels Gipses) erhoben. Während jeder Versuchssitzung mussten die Versuchstiere drei konforme Läufe absolvieren, die für diese Studie durch eine kontinuierliche, ununterbrochene Fortbewegung definiert waren, die den gesamten Laufsteg in beide Richtungen durchquerte. Die Mäuse wurden darauf trainiert, 3 Tage vor der Tibia-Fraktur den Gehweg zu überqueren. Dieses Trainingsverfahren führte dazu, ohne Zögern mit konstanter Geschwindigkeit zu gehen. Wir

konzentrierten uns auf die Beurteilung der Symptome und des Gangbildes nach der Fraktur.

Kriterien für einen gültigen Lauf:

Minimale Dauer eines Laufs: 0,5 Sekunden

Maximale Dauer eines Laufs: 5,0 Sekunden

Weitere Kriterien:

Minimale Anzahl gültiger Läufe für Akquise: 3

Maximale Geschwindigkeitsänderung: < 90

Einstellungen:

Schwellenwert (threshold): 0.25 (wenig Hintergrundrauschen)

Gain: 37.5 (ausreichende Beleuchtung)

Max. range: 150-250

Min. intensity: 20

Definition der ausgewerteten Parameter bezüglich der Ganganalyse

Alle folgenden Variablen wurden für die rechte Hinterpfote ausgewertet zum Zeitpunkt t=0 (Baseline) und t=3 (3 Wochen nach Fraktur).

Average speed: Durchschnittsgeschwindigkeit in mm/s.

Run duration: Dauer für 1 Lauf in s.

Stride length: Die Schrittlänge ist der Abstand zwischen den aufeinanderfolgenden Platzierungen der gleichen Pfote, also die Strecke, die eine Pfote während eines Schrittes zurücklegt in mm.

Swing speed: Geschwindigkeit der Bewegung einer Pfote während der Schwungphase in mm/s.

Step Cycle: Zeit, um sowohl die Stand- als auch die Schwungphase zu durchlaufen in s.

BOS (base of support): Abstand zwischen den beiden Hinterpfoten in mm.

6.9 Immunhistochemie

Es wurden Daten von 16 Patienten gesammelt, die von 2009 bis 2014 in der Hautklinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz entweder mit der Diagnose „akutes CRPS“, „chronisches CRPS“ gelistet wurden.

Unter ihnen waren 9 Patienten weiblich und 7 männlich. Das Alter der Patienten lag zwischen 28 und 73 Jahren. Im Mittel lag das Alter bei 50 Jahren. Diese Studie wurde von der zuständigen Ethikkommission genehmigt, und alle Patienten gaben ihre Zustimmung.

Die konventionelle IHC-Färbung für das Antigen CD1a [Klon: o10; DAKO], das von Langerhans-Zellen der Haut exprimiert wird, wurde nach einem Standardverfahren durchgeführt. Nach dem Schneiden von 2,5µm dicken Schnitten mit einem Präzisionsmikrotom wurden die Proben eine Stunde lang bei 60°C inkubiert und in einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert. Die Vorbehandlung für die IHC erfolgte mit Antigen-Demaskierungspuffern (für CD1a: Citrat), die für das ausgewählte Antigen spezifisch sind. Anschließend wurde die endogene Peroxidase mit 3%iger H₂O₂-Lösung blockiert. Die Inkubation der Antikörper erfolgte eine Stunde lang bei 30°C. Der Nachweis der primären Antikörper erfolgte mit geeigneten sekundären Antikörpern (Peroxidase-markiertes Polymer oder IG-Detektionssystem für Kaninchen/Maus). Die Markierung erfolgte entweder mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) (falls IHC BRAUN) oder PermaRed/AP-Auto (falls IHC ROT) (Substrat/Chromogensystem). Abschließend wurden alle Proben mit Hämatoxylin bei einer Inkubationszeit von 2 min gegengefärbt. Nach dem Spülen mit Leitungswasser wurden die Proben mit einer aufsteigenden Alkoholreihe behandelt und mit einem Deckglas unter Verwendung von Eukitt-Montagemedium (Xylol) abgedeckt. Parallel dazu wurden für alle Gewebeproben Hämatoxylin- und Eosinfärbungen durchgeführt. Unter einem Lichtmikroskop (Olympus BX51) wurden Zellen mit braunen Dendriten in der Zellmembran und/oder im Zytoplasma als positive Zellen betrachtet. Mit 200-facher Vergrößerung wurden aus jedem Abschnitt 5 zufällige Felder ausgewählt, die hauptsächlich Epidermis und Dermis enthielten.

Die Anzahl der positiven Zellen in der Epidermis und Dermis in jedem Gesichtsfeld wurden gezählt. Dabei wurde die Epidermis und Dermis jeweils separat beurteilt. Die Anzahl der CD1a positiven Zellen pro Gesichtsfeld wurde im Anschluss gemittelt. Als Software kam das Programm „cellSens“ von Olympus zum Einsatz.

6.9.1 Statistische Methoden

Die während der Versuchsdurchführung erhobenen Daten wurden zunächst in Excel Tabellen eingepflegt (Microsoft Office Excel Version 16.46 für Mac). Es wurden Berechnungen, wie beispielsweise die Ermittlung von Differenzen, durchgeführt. Im Anschluss wurden diese Datensätze in das Statistikprogramm SPSS (IBM SPSS Statistics Version 23) übertragen und weiter ausgewertet.

Für die weiteren durchgeführten Tests in SPSS wurde ein Signifikanzniveau von 5 % ($p < 0,05$) festgelegt. Neben der deskriptiven Datenbeschreibung durch Mittelwerte, Minima und Maxima, wurden alle stetigen Variablen auf Normalverteilung geprüft. Anschließend wurde mithilfe des Levene-Tests die Varianzhomogenität getestet. Bei $p > 0,05$ wurde die Nullhypothese beibehalten, die Varianzhomogenität wurde angenommen.

Im Falle einer Normalverteilung (geprüft mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests) wurde anschließend untersucht, ob zwischen zwei Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten ein statistisch signifikanter Unterschied besteht.

Hierzu wurde der t-Test zum Vergleich der Mittelwerte bei nicht-verbundenen Stichproben durchgeführt.

Der p-Wert zur Definition der statistischen Signifikanz betrug hier 0,05 (5 %-Signifikanzniveau).

Um den Gesamt-Gruppeneffekt der IL-4-Rezeptor-Knockout Tiere gegenüber den Wildtyp-Tieren zu ermitteln und um die Gruppenunterschiede zu den verschiedenen Messzeitpunkten zu ermitteln, wurde eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) mit anschließendem post-hoc Test durchgeführt.

Für die nicht-normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrischer Test für den Vergleich zweier Gruppen verwendet.

Darüber hinaus führten wir den asymptotischen Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben durch, um zu überprüfen, ob die zentralen Tendenzen zweier abhängiger Stichproben verschieden sind.

Das zweiseitige Signifikanzniveau lag bei $p < 0,05$. Der z-Wert wurde auf Signifikanz geprüft. Lag der Betrag der z-Wertes über 1,96 wurde er als signifikant angenommen.

Zur graphischen Veranschaulichung der Ergebnisse und der Gruppenunterschiede wurde das Programm Graph Pad Prism Version 9.2.0 verwendet. Überwiegend wurden Punktediagramme mit Verbindungslinien und Fehlerbalken (Standardfehler) verwendet zur Darstellung der Ergebnisse beider Gruppen (Wildtyp vs. IL-4-

Rezeptor-Knockout) im Vergleich zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten über die Zeit.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse der Quantifizierung CD1a-positiver Zellen in der Haut von CRPS-Patienten wurde ebenfalls Graph Pad Prism Version 9.2.0 verwendet und Streudiagramme erstellt.

Die fehlenden Werte wurden mit dem Mittelwert der Zahlenreihe ersetzt.

Bei der Auswertung verzichteten wir auf das Ersetzen der Werte bei den Ergebnissen der Untersuchung der Pfoten-Temperatur um falsche Schlussfolgerungen zu vermeiden.

7 Ergebnisse

7.1 Ergebnisse zu den Hauptfragestellungen

7.1.1 Ergebnisse zur Hinterpfoten-Volumenmessung

Die Gruppe der BALB/c-Wildtyp-Mäuse bestand aus $n = 30$ Tieren. Vor der Untersuchung 3 Wochen nach Fraktur verstarben 3 Tiere, sodass $n = 27$ der Wildtyp-Mäuse in die weiteren Untersuchungen einbezogen wurden.

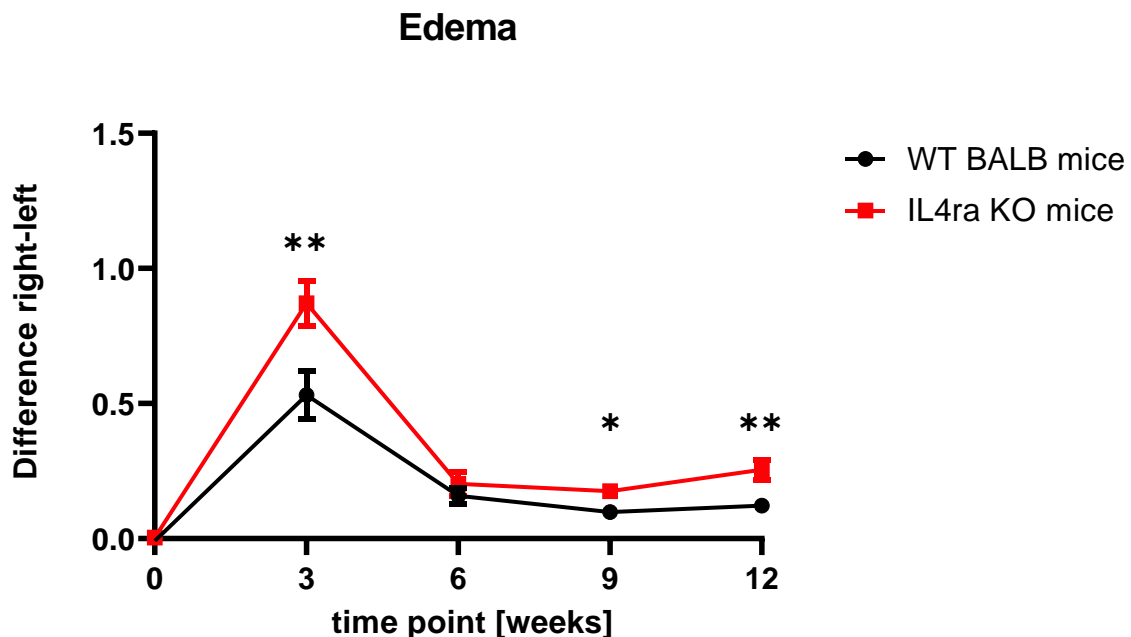
Die Gruppe der BALB/c IL-4R-KO-Tiere bestand aus $n = 30$ Tieren.

Somit gingen insgesamt $n = 57$ Tiere in die Auswertung ein. Dies gilt für alle folgenden Punkte bis einschließlich *Punkt 7.2.3*.

Aufgrund eines Geräte-Defektes wurden die Messungen des Hinterpfoten-Volumens zur Baseline-Untersuchung bei den Wildtyp-Tieren mittels Schieblehre durchgeführt, alle anderen Messungen erfolgten mittels Lasermessung (anterior-posterior-Durchmesser).

Die *Abbildung 1* veranschaulicht die Ergebnisse der Hinterpfoten-Volumenmessungen zu den einzelnen Zeitpunkten über die Zeit, jeweils vergleichend zwischen der Gruppe der Wildtyp-Tiere und der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere.

ABBILDUNG 1: HINTERPFOTEN-VOLUMENMESSUNG/ÖDEMBILDUNG; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO



Nach Tibia-Fraktur der rechten Hinterpfote zeigte sich in beiden Gruppen eine deutliche Ödembildung mit einem Maximum 3 Wochen nach Fraktur. Diese Ödembildung war bis 9 Wochen nach Fraktur durchgehend regredient. Das Ausgangsniveau wurde in beiden Gruppen nicht erreicht. 12 Wochen nach Fraktur zeigte sich eine erneute diskrete Zunahme des Ödems, hier etwas deutlicher bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren im Vergleich mit den Wildtyp-Mäusen.

Eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) zeigte einen statistisch signifikanten Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts ($p = 0,004$).

Die Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zeigten eine signifikant stärkere Ödembildung 3 Wochen nach Fraktur ($p = 0,007$), 9 Wochen nach Fraktur ($p = 0,034$), sowie 12 Wochen nach Fraktur ($p = 0,004$) bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren.

Zur Baseline-Untersuchung ($p = 0,344$) und 6 Wochen nach Fraktur ($p = 0,42$) konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Somit werteten wir die Ergebnisse in beiden Gruppen als prolongierte Entzündungsreaktion mit vermehrter Ödembildung der rechten Hinterpfote nach Tibia-Fraktur rechts mit maximaler Ausprägung des Ödems 3 Wochen nach Fraktur

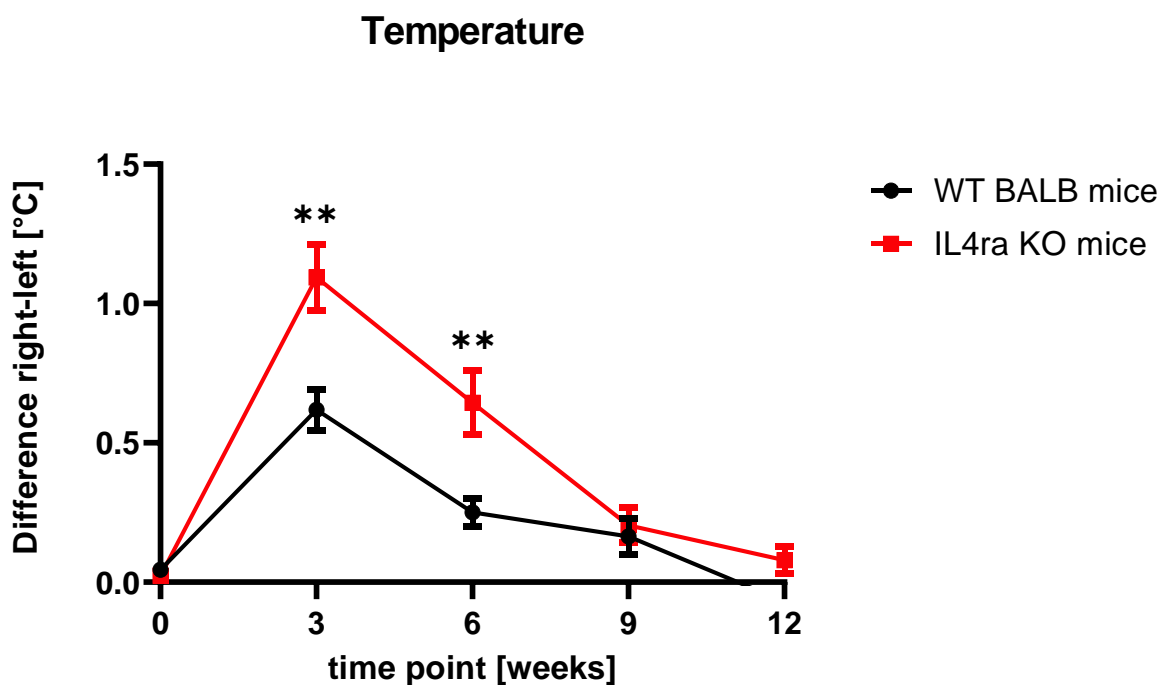
und signifikantem Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts 3 Wochen nach Fraktur, 9 Wochen nach Fraktur und 12 Wochen nach Fraktur.

7.1.2 Ergebnisse zur Hinterpfoten-Temperaturmessung

Beurteilt wurde der Mittelwert des Temperaturunterschiedes rechte Hinterpfote – linke Hinterpfote in Grad Celsius zum jeweiligen Zeitpunkt.

Die *Abbildung 2* gibt einen Überblick über die Ergebnisse der Pfoten-Temperaturmessungen zu den einzelnen Zeitpunkten über die Zeit, jeweils im direkten Vergleich der Wildtyp-Tiere und der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere.

ABBILDUNG 2: HINTERPFOTEN-TEMPERATURMESSUNG; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO



Aufgrund zahlreicher fehlender Werte, insbesondere zu den Zeitpunkten 3 Wochen nach Fraktur, 6 Wochen nach Fraktur und 12 Wochen nach Fraktur konnte keine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) berechnet werden und die Voraussetzungen für einen t-Test waren nicht erfüllt.

Mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests konnten wir allerdings signifikante Unterschiede der zentralen Tendenzen zwischen den zwei Gruppen mit deutlich stärkerer Überwärmung der rechten Hinterpfote bei den IL-4-Rezeptor-Knockout Tieren

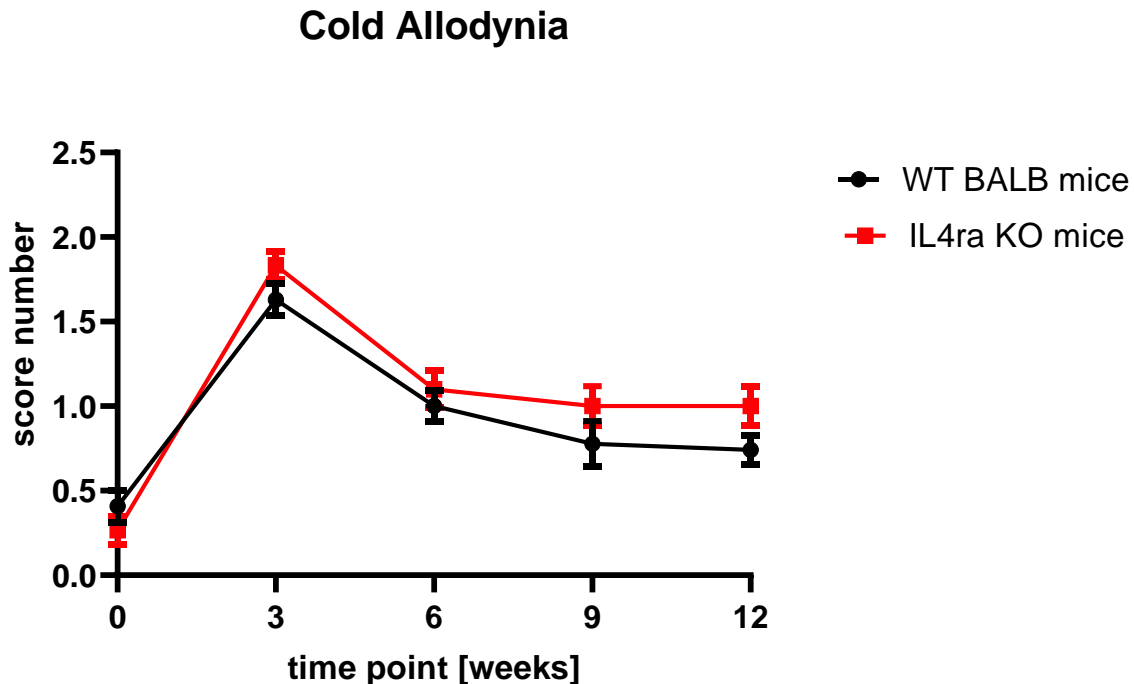
zeigen. Eine signifikant wärmere Hinterpfote bei den Knockout Tieren ließ sich 3 Wochen nach Fraktur ($p = 0,005$) und 6 Wochen nach Fraktur ($p = 0,002$) objektivieren. 9 Wochen nach Fraktur ($p = 0,46$) und 12 Wochen nach Fraktur ($p = 0,18$) gab es keinen relevanten Gruppenunterschied.

Zusammenfassend war hier eine deutliche Überwärmung der rechten Hinterpfote mit einem Maximum 3 Wochen nach Fraktur in beiden Gruppen festzustellen, ausgeprägter in der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout Tiere bis einschließlich 6 Wochen nach Fraktur. Ein statistisch signifikanter Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts konnte nicht gezeigt werden, jedoch eine signifikant stärkere Überwärmung der rechten Hinterpfote bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren 3 Wochen nach Fraktur und 6 Wochen nach Fraktur.

7.2 Ergebnisse zu den Nebenfragestellungen

7.2.1 Ergebnisse hinsichtlich der Kälte-Allodynie

Die *Abbildung 3* veranschaulicht die Ergebnisse bezüglich der Untersuchungen zur Kälte-Allodynie zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten über die Zeit, jeweils im Vergleich der Gruppe der Wildtyp-Tiere mit der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere.



In beiden Gruppen war eine deutliche Kälte-Allodynie nach Tibia-Fraktur der rechten Hinterpfote mit einem Maximum 3 Wochen nach Fraktur zu objektivieren.

Eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) zeigte keinen statistisch signifikanten Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts ($p = 0,182$).

Die Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zeigten zu keinem Zeitpunkt eine signifikant stärkere Kälte-Allodynie bei den IL-4-Rezeptor Knockout-Tieren (Baseline: $p = 0,27$; 3 Wochen nach Fraktur: $p = 0,11$; 6 Wochen nach Fraktur: $p = 0,497$; 9 Wochen nach Fraktur: $p = 0,22$; 12 Wochen nach Fraktur: $p = 0,09$).

In Zusammenschau der Daten konnte eine deutliche Kälte-Allodynie in beiden Gruppen mit einem Maximum 3 Wochen nach Fraktur objektiviert werden, sowie eine prolongierte Kälte-Allodynie in beiden Gruppen über den gesamten Untersuchungszeitraum.

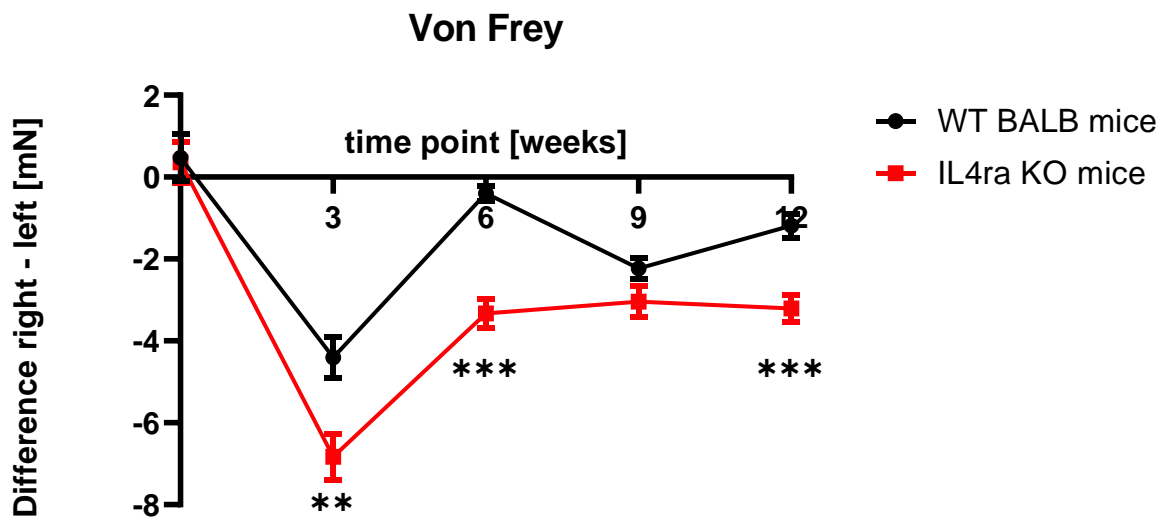
Ein statistisch signifikanter Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts konnte nicht gezeigt werden, wobei graphisch eine geringfügig stärkere Kälte-Allodynie bei den Knockout-Tieren auffiel (*Abb. 3*).

7.2.2 Ergebnisse zur mechanischen Hyperalgesie

Die *Abbildung 4* zeigt die Untersuchungsergebnisse hinsichtlich der mechanischen Hyperalgesie zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten bei mechanischem Reiz

mit Von-Frey-Filamenten. Verglichen werden hier die Ergebnisse der Gruppe der Wildtyp-Tiere mit der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout Tiere.

ABBILDUNG 4: MECHANISCHE HYPERALGESIE; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO



Bereits graphisch fiel hier eine sehr ausgeprägte mechanische Hyperalgesie mit einem Maximum 3 Wochen nach Fraktur auf.

Das Ausgangsniveau wurde in beiden Gruppen bis einschließlich 12 Wochen nach Tibia-Fraktur rechts nicht erreicht, sodass wir eine prolongierte mechanische Hyperalgesie annehmen.

Eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) zeigte einen statistisch signifikanten Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts ($p < 0,001$).

Die Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zeigten eine signifikant stärkere mechanische Hyperalgesie 3 Wochen nach Fraktur ($p = 0,003$), 6 Wochen nach Fraktur ($p < 0,001$) und 12 Wochen nach Fraktur ($p < 0,001$). Zur Baseline-Untersuchung ($p = 0,88$) und 9 Wochen nach Fraktur ($p = 0,095$) konnte kein signifikanter Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts gezeigt werden.

Zusammenfassend konnten wir deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen hinsichtlich der mechanischen Hyperalgesie feststellen. Während die Wildtyp-Versuchstiere 6 Wochen nach Fraktur und auch zum letzten Untersuchungszeitpunkt 12 Wochen nach Fraktur nahezu das Ausgangsniveau erreichten, hielt die mechanische Hyperalgesie bei den IL-4-Rezeptor-Knockout Tieren deutlich länger an

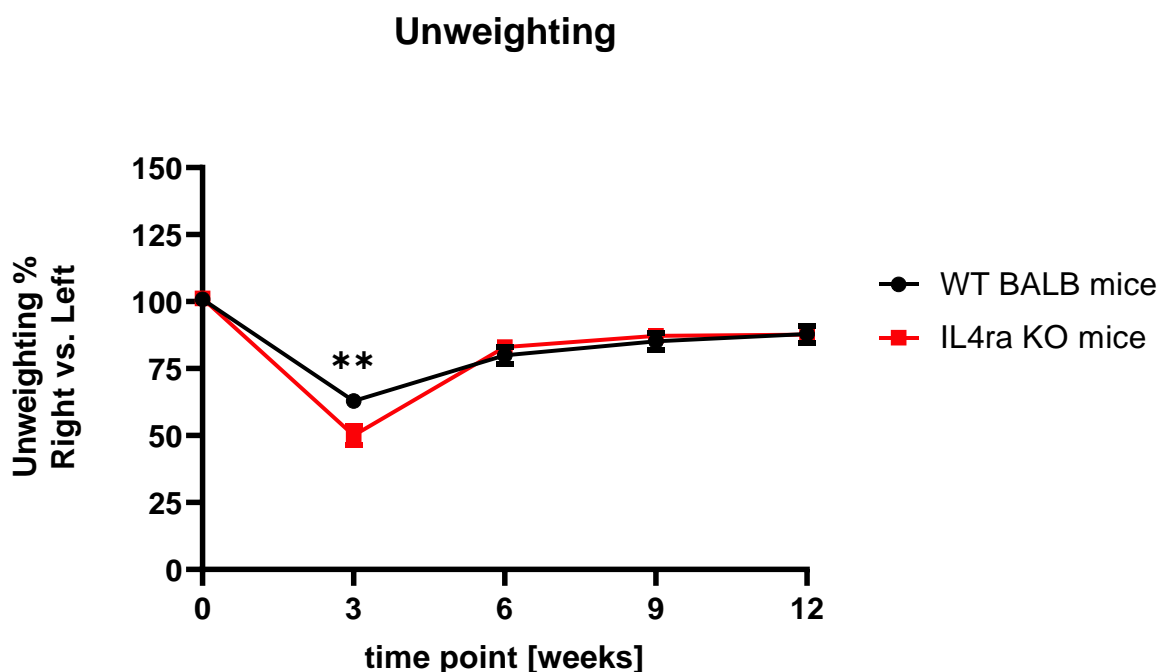
und war ausgeprägter. Somit konnten wir einen deutlichen Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts zeigen.

7.2.3 Ergebnisse hinsichtlich der Pfotenbelastung

Die *Abbildung 5* veranschaulicht die Pfotenbelastung der Tiere zu den Messzeitpunkten über die Zeit, jeweils im Vergleich der Wildtyp-Tiere mit den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren.

In der graphischen Darstellung (*Abb. 5*) konnte eine deutliche Abnahme der Pfotenbelastung 3 Wochen nach Fraktur in beiden Gruppen, etwas deutlicher in der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere, gezeigt werden. Darüber hinaus wurde das Ausgangsniveau in beiden Gruppen während des Untersuchungszeitraumes nicht mehr erreicht.

ABBILDUNG 5: PFOTENBELASTUNG; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO



Eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) zeigte keinen statistisch signifikanten Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts ($p = 0,06$).

Die Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zeigten 3 Wochen nach Fraktur eine signifikant stärkere Abnahme der Pfotenbelastung der rechten Hinterpfote bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren ($p = 0,01$).

Zur Baseline-Untersuchung ($p = 0,37$), 6 Wochen nach Fraktur ($p = 0,43$), 9 Wochen nach Fraktur ($p = 0,57$) und 12 Wochen nach Fraktur ($p = 0,95$) konnte kein signifikanter Gruppenunterschied gezeigt werden.

Zusammenfassend konnte nur zum Zeitpunkt 3 Wochen nach Fraktur ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen objektiviert werden, sodass die IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere die rechte Hinterpfote 3 Wochen nach Fraktur deutlich weniger belasteten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren.

7.2.4 Ergebnisse zur Ganganalyse mittels Catwalk XT

Die Ganganalyse mittels CatWalk XT wurde für alle Parameter zum Zeitpunkt $t = 0$ (Baseline-Untersuchung vor Tibia-Fraktur) und $t = 3$ Wochen (3 Wochen nach konservativer Behandlung mit Gips nach Tibia-Fraktur der rechten Hinterpfote) durchgeführt.

Insgesamt wurden $n = 49$ Tiere untersucht, davon $n = 22$ Wildtyp-BALB/c-Mäuse und $n = 27$ IL-4-Rezeptor-Knockout-BALB/c-Mäuse.

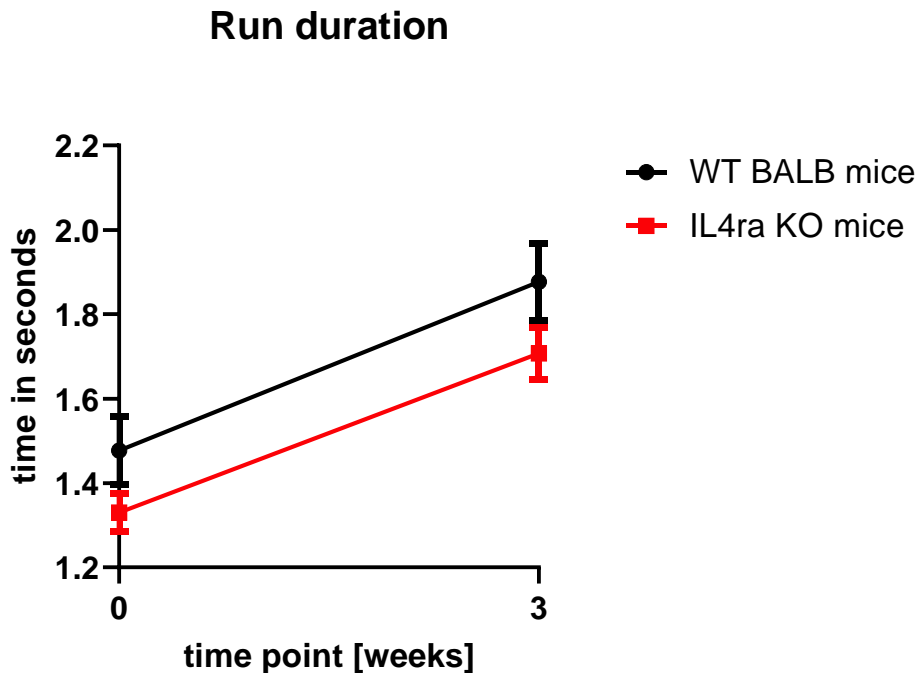
Neben den anderen durchgeführten Untersuchungen wurde diese Gruppe von Versuchstieren zur CatWalk-Ganganalyse herangezogen.

Dieses Procedere gilt für alle untersuchten Parameter hinsichtlich der Ganganalyse mittels CatWalk XT.

7.2.4.1 Laufdauer/Lauf

Die *Abbildung 6* veranschaulicht die Veränderungen der Dauer eines vollständigen Laufs im zeitlichen Verlauf für die Gruppe der Wildtyp-Tiere vs. der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere über die Zeit vor Tibia Fraktur (time point = 0) und nach Fraktur (time point = 3).

ABBILDUNG 6: CATWALK; LAUFDAUER JE LAUF; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO



Die Dauer, die für einen Lauf benötigt wird, nahm nach stattgehabter Tibia-Fraktur in beiden Gruppen deutlich zu.

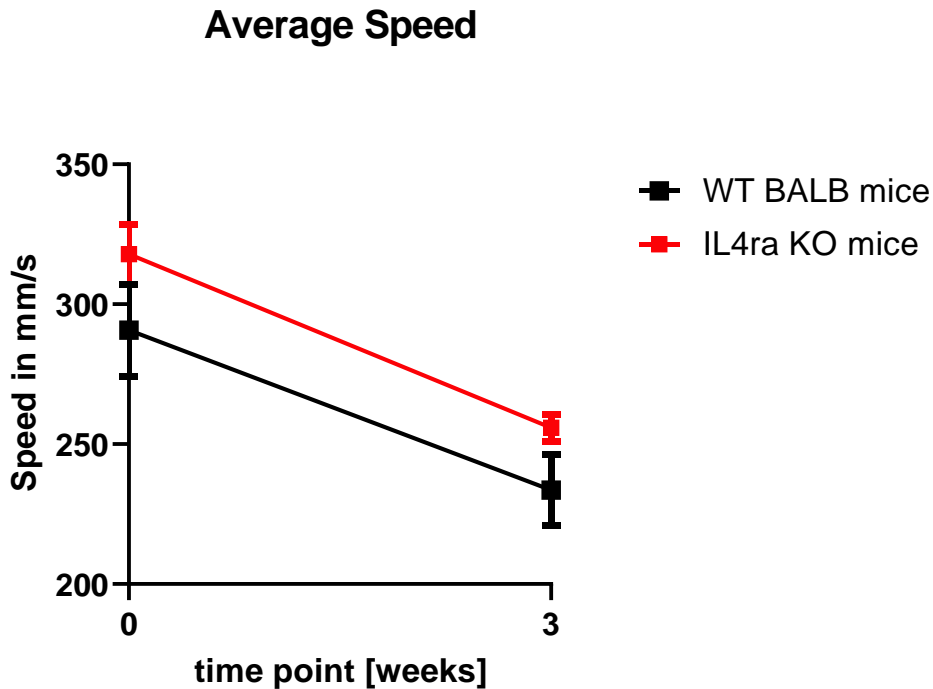
Eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) zeigte keinen statistisch signifikanten Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts ($p = 0,168$).

Die Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Laufdauer zwischen der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere und der Wildtyp-Tiere zur Baseline-Untersuchung ($p = 0,09$) und 3 Wochen nach Fraktur ($p = 0,15$).

In Zusammenschau der Untersuchungsergebnisse konnten wir 3 Wochen nach Tibia-Fraktur der rechten Hinterpfote eine deutliche, persistierende Funktionseinschränkung mit Zunahme der Dauer, die für einen vollständigen Lauf benötigt wurde, in beiden Gruppen nachweisen. Ein statistisch signifikanter Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts konnte nicht gezeigt werden.

7.2.4.2 Durchschnittsgeschwindigkeit

Die *Abbildung 7* zeigt die Durchschnittsgeschwindigkeit beim Absolvieren eines Laufs in der CatWalk-Untersuchung der Wildtyp-Tiere und der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere.



Es fiel auf, dass die Durchschnittsgeschwindigkeit in beiden Gruppen nach stattgehabter Tibiafraktur rechts und konservativer Versorgung deutlich abnahm.

Eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) zeigte keinen statistisch signifikanten Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts ($p = 0,15$).

Die Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zeigten keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Durchschnittsgeschwindigkeit pro Lauf zwischen der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere und der Wildtyp-Tiere zur Baseline-Untersuchung ($p = 0,15$) und 3 Wochen nach Fraktur ($p = 0,08$).

Zusammenfassend war kein statistisch signifikanter Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts 3 Wochen nach Fraktur nachweisbar.

Die deutliche Abnahme der Laufgeschwindigkeit 3 Wochen nach Fraktur im Vergleich zur Baseline-Untersuchung werteten wir als Hinweis auf eine persistierende Funktionseinschränkung und Spontanschmerzen.

7.2.4.3 Schrittlänge

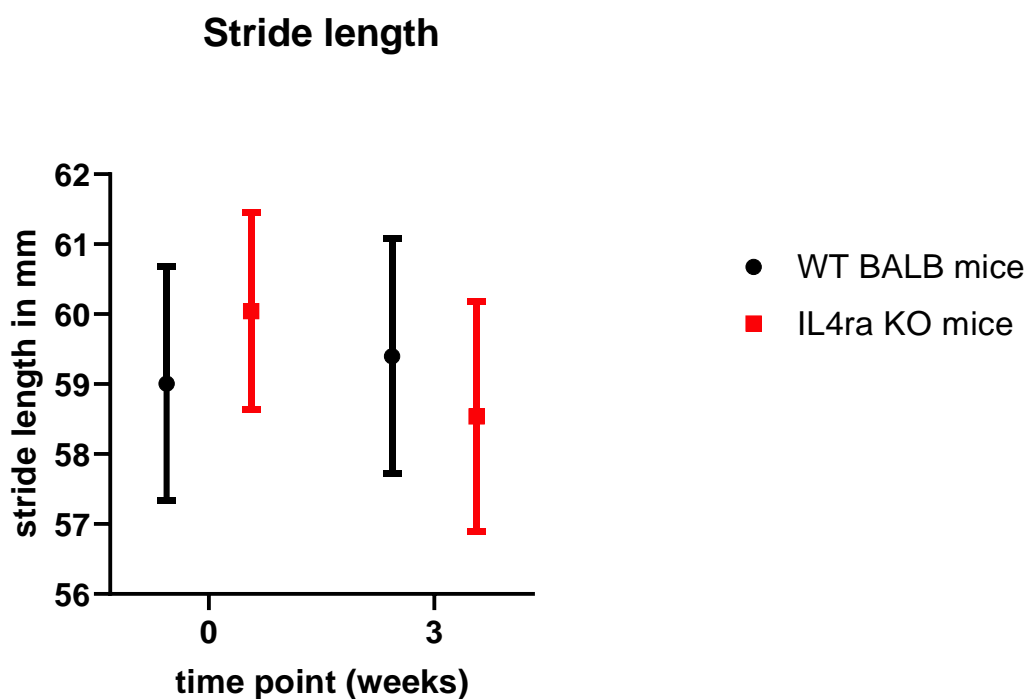
Die *Abbildung 8* zeigt die Schrittlänge beim Überqueren der definierten Laufstrecke des CatWalk XT-Systems für die Gruppe der Wildtyp-Mäuse und die Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Mäuse.

Graphisch fiel auf, dass die Schrittlänge 3 Wochen nach Fraktur in der Gruppe der Wildtyp-Tiere diskret zunahm, wohingegen sie in der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere abnahm.

Eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) zeigte keinen statistisch signifikanten Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts ($p = 0,84$).

Die Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere und der Wildtyp-Tiere hinsichtlich der Schrittlänge zur Baseline-Untersuchung ($p = 0,64$) und 3 Wochen nach Fraktur ($p = 0,72$).

ABBILDUNG 8; CATWALK; SCHRITTLÄNGE; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO



Die reduzierte Schrittlänge 3 Wochen nach Fraktur in der Gruppe der Knockout-Versuchstiere werteten wir im Rahmen eines veränderten Gangbildes nach Trauma und vorsichtigerer Schrittfolge.

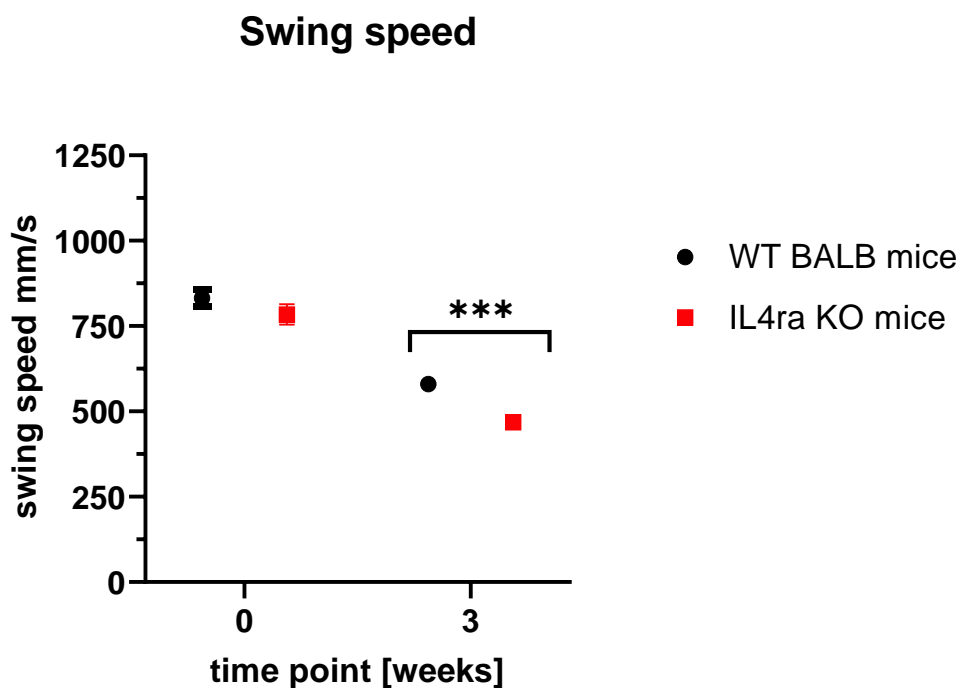
Zusammenfassend konnte allerdings keine signifikante Veränderung zur Baseline-Untersuchung und kein Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts gezeigt werden.

7.2.4.4 Geschwindigkeit rechte Hinterpfote während der Schwungphase

Die *Abbildung 9* veranschaulicht die Geschwindigkeit der rechten Hinterpfote während der Schwungphase für die Gruppe der Wildtyp-Tiere und der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere.

Bereits graphisch fiel auf, dass sich die Pfotengeschwindigkeit 3 Wochen nach Tibia-Fraktur in beiden Gruppen deutlich reduziert war, ausgeprägter in der Gruppe der Knockout-Mäuse.

ABBILDUNG 9: CATWALK; GESCHWINDIGKEIT RECHTE HINTERPFOTE WÄHREND SCHWUNGPHASE; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO



Eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) zeigte einen statistisch signifikanten Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts ($p = 0,001$).

Die Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zeigten eine signifikant stärkere Abnahme der Geschwindigkeit der rechten Hinterpfote während der Schwungphase 3 Wochen nach Fraktur bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren ($p < 0,001$), nicht aber zur Baseline-Untersuchung ($p = 0,24$).

Zusammenfassend konnte ein signifikanter Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts nachgewiesen werden. Wir konnten 3 Wochen nach Tibia-Fraktur einen signifikanten Unterschied der Mittelwerte zeigen mit stärkerer Reduktion der

Geschwindigkeit der rechten Hinterpfote während der Schwungphase bei den Knockout-Tieren. Diese Entwicklung werteten wir als Zeichen der persistierenden Schmerzen mit Funktionseinschränkung und somit Veränderung des Gangbildes.

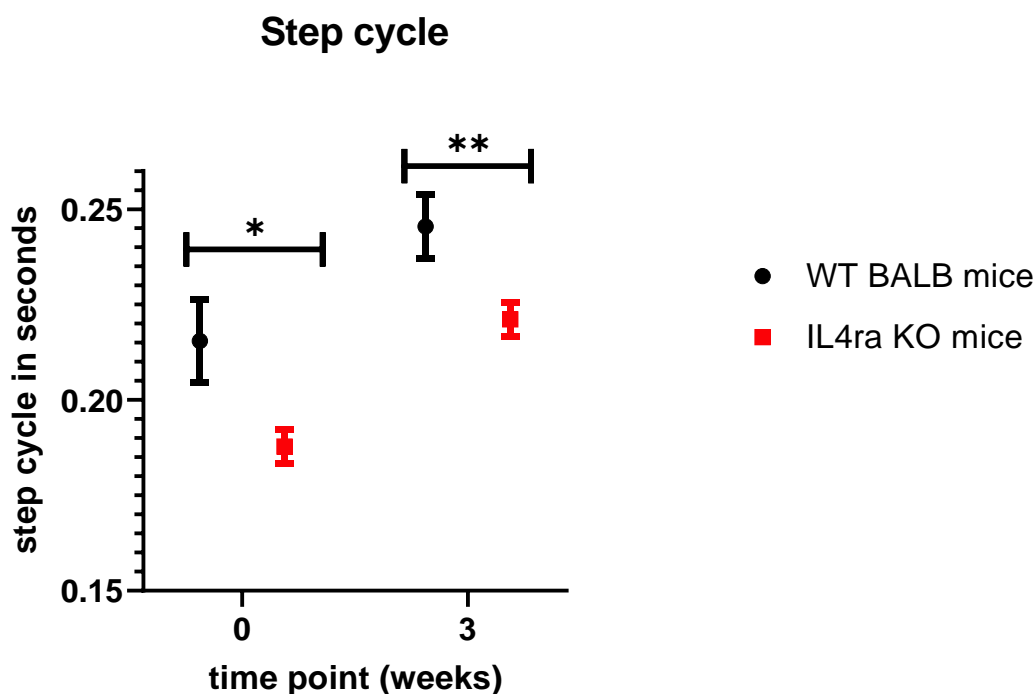
7.2.4.5 Schrittzzyklus

Die *Abbildung 10* zeigt die Veränderung des Schrittzzyklus (Dauer des Schrittzzyklus = Standphase + Schwungphase) für die Gruppe der Wildtyp-Tiere und die Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere.

In der graphischen Darstellung fiel eine deutliche Zunahme der Zeit, die zum Durchlaufen der Stand- und Schwungphase benötigt wird, auf.

In beiden Gruppen war diese Veränderung 3 Wochen nach Fraktur festzustellen.

ABBILDUNG 10; CATWALK; SCHRITZZYKLUS; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO



Eine Multivariate Varianzanalyse (MANOVA) zeigte einen statistisch signifikanten Gruppenunterschied zu Gunsten der Wildtyp-Tiere ($p = 0,001$).

Die Bonferroni-korrigierten post-hoc Tests zeigten einen signifikanten

Gruppenunterschied sowohl bei der Baseline-Untersuchung ($p = 0,02$), als auch 3 Wochen nach Fraktur ($p = 0,01$).

Zusammenfassend konnte ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied nachgewiesen werden hinsichtlich der Dauer, die für die Stand- und Schwungphase benötigt wurde.

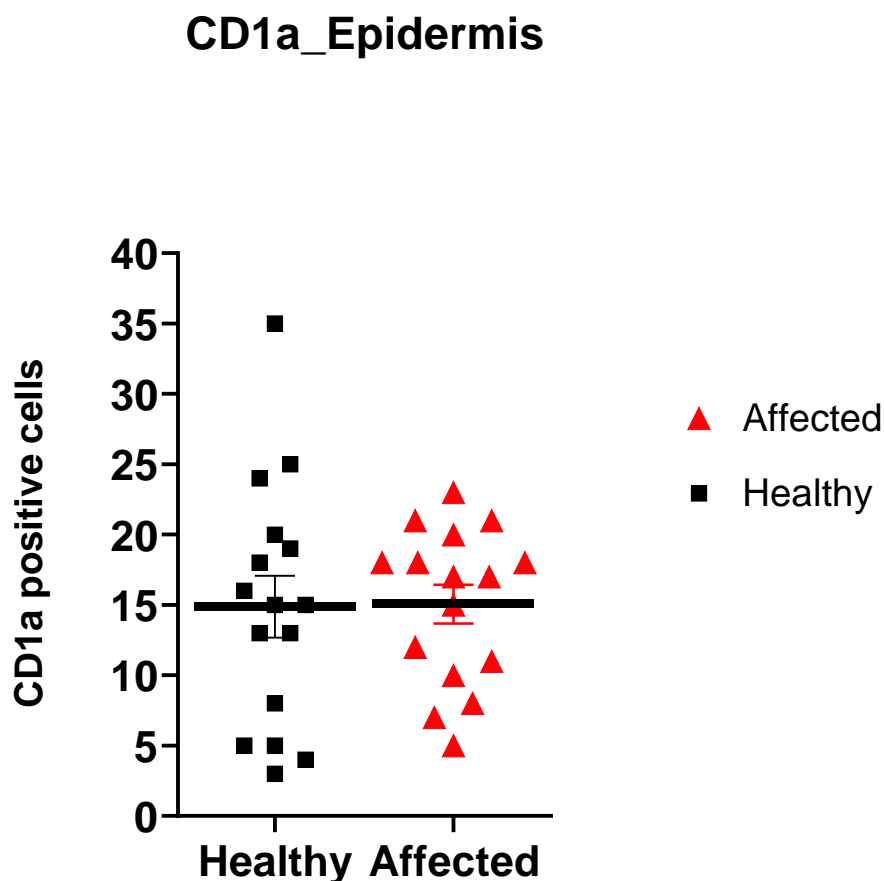
In beiden Gruppen war eine deutliche Zunahme der Dauer eines Schrittzklus im Vergleich zur Baseline-Untersuchung objektivierbar.

Das diesbezügliche Ergebnis werteten wir im Rahmen persistierender Schmerzen und Funktionseinschränkung in beiden Gruppen, mit signifikant stärkerer Ausprägung bei den Wildtyp-Tieren.

7.3 Ergebnisse der Quantifizierung von Langerhans-Riesenzellen in humanen Hautbiopsaten

Die *Abbildung 11* zeigt den Mittelwert der Anzahl der CD1a-positiven Zellen (Langerhans-Riesenzellen) pro Gesichtsfeld in der Epidermis der nicht betroffenen Extremität im Vergleich mit der betroffenen Extremität bei CRPS-PatientInnen.

ABBILDUNG 11; HUMANE HAUTBIOPSIEPROBEN; QUANTIFIZIERUNG CD1A POSITIVER ZELLEN; EPIDERMIS



In der Dermis (*Abbildung 12*) fiel der Unterschied etwas deutlicher aus mit vermehrtem Vorkommen der Langerhans-Riesenzellen in der betroffenen Extremität.

Zusammenfassend ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen der betroffenen und nicht betroffenen Extremität von CRPS-Patienten hinsichtlich der Anzahl der Langerhans-Riesenzellen in der Dermis feststellen ($p = 0,34$).

8 Wissenschaftliche Diskussion

Der Fokus dieser Arbeit lag auf der Untersuchung des Effekts eines IL-4-Rezeptor-Knockouts bei männlichen BALB/c-Mäusen im Vergleich zu männlichen Wildtyp-BALB/c-Mäusen auf die posttraumatische Entzündung im Tibia-Fraktur-Modell des komplex-regionalen Schmerzsyndroms (CRPS).

Darüber hinaus war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit die Untersuchung der verstärkten kutanen Immunreaktion in Hautbiopsieproben von CRPS-Patienten.

8.1 Diskussion Tibiafrakturmodell (TFM)

Das Nagetier-CRPS-Tibiafrakturmodell imitiert die häufigste Ätiologie des CRPS, die distale Extremitäten-Fraktur. Es handelt sich hierbei um ein etabliertes Modell an Ratten oder Mäusen zur Untersuchung der Mechanismen hinsichtlich des Überganges von akuten zu chronischen Schmerzen (Birklein et al., 2018, Wei et al., 2016). Die meisten bisherigen Untersuchungen wurden an C57Bl/6 Mäusen (meist männlich) und Ratten durchgeführt (Li et al., 2018, Shi et al., 2011, Guo et al., 2014, Guo et al., 2018). In anderen Studien wurden auch männliche und weibliche C57BL/6J-Mäuse hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede untersucht (Tajerian et al., 2015).

Wir hingegen verwendeten männliche BALB/c-Mäuse.

BALB/c- und C57BL/6-Mäuse sind zwei gängige Inzuchtstämme, die häufig in der Forschung verwendet werden.

Mehrere Studien heben die Unterschiede in der immunologischen Reaktion dieser beiden Stämme hervor, was dazu führte, dass BALB/c-Mäuse als Th2-Typ (z. B. IL-4, IL-6, IL-10 und IL-13) Responder und C57BL/6-Mäuse als Th1-Typ (TNF- β und IFN- γ) Responder bezeichnet wurden, basierend auf ihren jeweiligen Zytokinprofilen

und Reaktionen auf Infektionen (Busch et al., 2016, Reiner and Locksley, 1995, Karupiah, 1998, Autenrieth et al., 1995).

BALB/c-Mäuse neigen dazu, eine stärkere humorale Antwort zu produzieren als C57BL/6-Mäuse (Busch et al., 2016).

Aufgrund dieser immunologischen Unterschiede verwendeten wir für unsere Fragestellungen BALB/c-Mäuse, um den Effekt von IL-4-Rezeptor-Knockout-Mäusen auf die Entwicklung und Persistenz CRPS-typischer Symptome zu untersuchen.

8.2 Ergebnisdiskussion und Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext

Unsere vergleichenden Untersuchungen der BALB/c-Wildtyp-Mäuse und der BALB/c IL-4-Rezeptor-Knockout-Mäuse hinsichtlich der Ödembildung im Bereich der rechten Hinterpfote nach distaler Tibia-Fraktur ergab eine deutliche Ödembildung der betroffenen Pfote mit einem Maximum 3 Wochen nach Fraktur. Zu diesem Zeitpunkt konnte auch eine signifikant stärker ausgeprägte Ödembildung bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren gezeigt werden. Mittels MANOVA konnten wir einen signifikanten Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts zeigen und mit Hilfe der post-hoc Tests eine signifikant stärkere Ödembildung bei den IL-4-Rezeptor-Knockout Tieren 3 Wochen nach Fraktur, 9 Wochen nach Fraktur und 12 Wochen nach Fraktur. In der Literatur wurden bereits zahlreiche Untersuchungen der Ödembildung im Bereich der ipsilateralen Hinterpfote im Tibia-Frakturmodell durchgeführt und eine maximale Ödembildung 3 bzw. 4 Wochen nach Fraktur beschrieben (Birklein et al., 2018, Wei et al., 2016, Guo et al., 2012).

Diese Entwicklung der Ödembildung in den ersten 3-4 Wochen in der akuten Phase entsprach unseren Ergebnissen, allerdings konnten wir bei unseren Versuchstieren in beiden Gruppen objektivieren, dass das Ausgangsniveau des Hinterpfoten-Volumens nach 12 Wochen nicht erreicht wurde und weiterhin eine Ödembildung imponierte, zu diesem Zeitpunkt signifikant mehr bei den Knockout-Tieren.

Einschränkend muss hier die geringe Gruppengröße (n=57) erwähnt werden und ein Geräte-Defekt, sodass die Baseline-Messungen bei den Wildtyp-Tieren mittels Schieblehre erfolgten und für alle anderen Tiere und Zeitpunkte mit Hilfe der obig beschriebenen Lasermessung. Dieser technische Unterschied erklärt die geringere Streuung der Werte bei der Baseline-Messung bei den Wildtyp-Tieren, da mittels Lasermessung, im Gegensatz zu den Messungen mit Schieblehre, kleinere Unterschiede detektiert werden konnten.

Trotz der geringen Gruppengröße legen unsere Daten nahe, dass in beiden Gruppen eine prolongierte Ödembildung im Bereich der rechten Hinterpfote mit maximaler Ausprägung 3 Wochen nach Fraktur als Symptom einer prolongierten Entzündungsreaktion vorlag und dass die Ödembildung bei den IL-4-Rezeptor-Knockout Tieren signifikant stärker ausfiel. Unsere Annahme einer stärkeren und länger bestehenden Ödembildung durch den IL-4-Rezeptor-Knockout wurde durch die erhobenen Daten gestützt, die diskrete Zunahme des Ödems 12 Wochen nach Fraktur bei den Knockout-Tieren ist allerdings am ehesten im Rahmen möglicher Messfehler zu werten. Bezüglich der Untersuchung der Pfortemperatur muss einschränkend ein Gerätedefekt des verwendeten Thermometers berücksichtigt werden, der mehrere Untersuchungszeitpunkte betraf. 3 Wochen nach Fraktur ergaben sich so 25% fehlende Werte, 6 Wochen nach Fraktur 41,7% fehlende Werte und 12 Wochen nach Fraktur 48,3% fehlende Werte. Aufgrund der hohen Anzahl fehlender Werte wurden diese für die Analyse nicht ersetzt, um falsche Schlussfolgerungen zu vermeiden.

Somit konnte keine MANOVA berechnet werden mit der Frage nach dem Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts. Allerdings konnten wir trotz der o.g. Einschränkungen eine deutliche Überwärmung der rechten Hinterpfote mit einem Maximum 3 Wochen nach Fraktur nachweisen, die bis einschließlich 6 Wochen nach Fraktur anhielt, mit deutlich stärkerer Überwärmung bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren. Statistisch konnten wir dies mittels Mann-Whitney-U-Test für die Zeitpunkte 3 Wochen nach Fraktur und 6 Wochen nach Fraktur belegen.

In der Literatur konnte gezeigt werden, dass die maximale Erhöhung der ipsilateralen Pfortemperatur 3 Wochen nach Fraktur, bzw. 4 Wochen nach Fraktur auftritt und sich langsam dem Ausgangsniveau nähert (Birklein et al., 2018, Sabsovich et al., 2008). Dies entsprach auch der Temperaturentwicklung bei unseren Untersuchungen. Eine Studie untersuchte Ratten mit Tibia-Fraktur 4 Wochen nach Fraktur und 16 Wochen nach Fraktur. Hier wurde bei 90 % der Ratten mit Fraktur Allodynie, Gewichtsverlust, Wärmegefühl, Ödeme und/oder Epidermisverdickung beobachtet, während nach 16 Wochen (chronische Phase) nur noch die nozizeptiven Veränderungen bestanden (Wei et al., 2016). Wir untersuchten die Versuchstiere engmaschiger und konnten somit eine persistierende Überwärmung der Hinterpfote bis einschließlich 6 Wochen nach Fraktur nachweisen. Analog zu Ergebnissen der Literatur wurde das Ausgangsniveau der Temperatur 9 Wochen nach Fraktur nahezu erreicht.

Als weiteren wichtigen Aspekt der CRPS-Symptomatik konnten wir bei der Untersuchung der mechanischen Hyperalgesie mittels Von-Frey-Filamenten zeigen, dass die Versuchstiere beider Gruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten nach Tibia-Fraktur deutlich sensibler auf die Von-Frey-Filamente reagierten.

Wir konnten einen signifikanten Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts mittels MANOVA nachweisen mit deutlich stärkerer mechanischer Hyperalgesie der Knockout-Tiere im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren. Darüber hinaus fand sich eine signifikant stärkere mechanische Hyperalgesie bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren 3 Wochen nach Fraktur, 6 Wochen nach Fraktur, sowie 12 Wochen nach Fraktur. In der Literatur konnte auch in anderen Arbeiten, die jeweils den Zeitpunkt 4 Wochen nach Fraktur untersuchten, eine signifikant niedrigere Reizschwelle als Zeichen der mechanischen Hyperalgesie objektiviert werden (Li et al., 2018, Li et al., 2009), wo wir hingegen auch einen anhaltenden Effekt bis 12 Wochen nach Fraktur zeigen konnten. In einer anderen Untersuchung bei Ratten, 4 Wochen und 16 Wochen nach Tibia-Fraktur, konnten Wei et al. übereinstimmend mit unseren Ergebnissen zeigen, dass 4 Wochen nach Fraktur eine deutliche mechanische Hyperalgesie bestand, die sich 16 Wochen nach Fraktur nicht mehr objektivieren ließ (Wei et al., 2016).

Das Auftreten einer Kälte-Allodynie an der betroffenen Pfote konnte in unseren Untersuchungen sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren objektiviert werden. Ein signifikanter Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts konnte nicht nachgewiesen werden, allerdings eine prolongierte Kälte-Allodynie bis 12 Wochen nach Fraktur in beiden Gruppen.

Ein signifikanter Unterschied der Mittelwerte konnte zu keinem Zeitpunkt objektiviert werden. In einer vorangegangenen Arbeit von De Pra et al. wird eine verstärkte Kälte-Allodynie 1 Tag und 17 Tage nach Durchführung eines CPIP-Mausmodells beschrieben (De Pra et al., 2019).

Hinsichtlich der Pfotenbelastung bei unseren Versuchstieren fand sich kein signifikanter Gesamteffekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts. Allerdings konnten wir zeigen, dass die IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere die rechte Hinterpfote 3 Wochen nach Fraktur signifikant weniger belasteten im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Somit bestätigten unsere erhobenen Daten die Hypothese einer reduzierten Pfotenbelastung nach Tibia-Fraktur und die Annahme einer stärkeren Ausprägung in der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere. Wir nahmen persistierende Schmerzen und eine Funktionseinschränkung als Grund der Veränderungen an.

Die reduzierte Belastung der ipsilateralen Hinterpfote im Maus-Tibiafrakturmodell wurde bereits in diversen Arbeiten beschrieben (Guo et al., 2012, Li et al., 2021). Gallagher et al. zeigten beispielsweise, dass die deutliche Minderbelastung der Pfote nach Fraktur bis 7 Wochen nach Fraktur angehalten hat (Gallagher et al., 2013).

Im Rahmen der posttraumatischen Entzündung bei CRPS gingen wir von persistierenden Schmerzen und Funktionseinschränkungen mit Veränderungen des Gangbildes aus. Darüber hinaus erwarteten wir ausgeprägtere Veränderungen durch den Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts.

Unsere Ganganalysen mittels Catwalk-Untersuchungen zeigten eine Zunahme der benötigten Laufdauer und eine Abnahme der Durchschnittsgeschwindigkeit in beiden Gruppen ohne signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Knockout-Tieren 3 Wochen nach Tibia-Fraktur der rechten Hinterpfote.

Es kam zu einer Zunahme der Laufdauer/Lauf und Reduktion der Durchschnittsgeschwindigkeit im Vergleich zu den Baseline-Untersuchungen. Hinsichtlich der Untersuchung der Schrittlänge konnten wir eine Abnahme der Schrittlänge in der Gruppe der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere zeigen und eine leichte Zunahme der Schrittlänge bei den Wildtyp-Tieren 3 Wochen nach Fraktur. Eine MANOVA und anschließende Bonferroni-korrigierte post-hoc Tests ergaben allerdings keinen signifikanten Effekt des Knockouts und keinen signifikanten Unterschied zu den Baseline-Untersuchungen. Die Abnahme der Schrittlänge nach Fraktur impliziert laut Literatur eine geringere Rumpfstabilität und eine geringere Grobmuskelkraft (Garcia-Ovejero et al., 2014, Iwasaki et al., 2014).

Caballero-Garrido et al. untersuchten C57BL/6-Mäuse nach künstlich erzeugtem Schlaganfall und stellten fest, dass sich diverse Parameter 7 Tage nach Schlaganfall signifikant änderten. Beispielsweise war die Durchschnittsgeschwindigkeit und die Geschwindigkeit der betroffenen Pfoten in der Schwungphase verringert und die Schrittlänge nahm ab (Caballero-Garrido et al., 2017).

Aceves et al. zeigten bereits auf, dass viele CatWalk-Ergebnisse miteinander korreliert sind, vor allem durch eine gegenseitige Abhängigkeit von der Laufdauer oder der Laufgeschwindigkeit, obwohl dies kein Problem ist, wenn eine dieser Variablen alleine verwendet wird und nicht als Teileiner Testbatterie (Aceves et al., 2020).

Aceves et al. empfahlen beispielsweise, die Schrittlänge oder die Schwungdauer und den Hinterpfotenabstand als geeignete Messgrößen für den Einsatz der

Hintergliedmaßen nach einer Verletzung des thorakalen Rückenmarks zu verwenden (Aceves et al., 2020).

Die Geschwindigkeit der rechten Hinterpfote während der Schwungphase nahm 3 Wochen nach Tibia-Fraktur in beiden Gruppen deutlich ab, mit signifikantem Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts 3 Wochen nach Fraktur in der MANOVA.

Es zeigte sich eine deutlich stärkere Reduktion der Pfortengeschwindigkeit bei den Knockout-Tieren als Hinweis auf persistierende Schmerzen und Funktionseinschränkung. Der Bonferroni-korrigierte post-hoc-Test ergab einen signifikanten Unterschied 3 Wochen nach Fraktur im Vergleich zur Baseline-Untersuchung.

Ein weiterer wichtiger Parameter im Rahmen der CatWalk-Ganganalyse ist die Untersuchung der Dauer des Schrittzklus (Dauer der Standphase und Schwungphase). Wir konnten hier einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der Wildtyp-Tiere und der IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren 3 Wochen nach Fraktur mit einer deutlicheren Zunahme der Dauer eines Schrittzklus in der Gruppe der Wildtyp-Tiere als Ausdruck von andauernden Schmerzen zeigen.

In Zusammenschau der Ergebnisse der Ganganalyse mittels Catwalk-Untersuchung fanden sich signifikante Unterschiede nur hinsichtlich der Geschwindigkeit der rechten Hinterpfote während der Schwungphase mit stärkerer Abnahme der Geschwindigkeit bei den Knockout-Tieren und einer stärkeren Zunahme der Dauer eines Schrittzklus bei den Wildtyp-Tieren.

Abgesehen von diesen gegenläufigen Ergebnissen ergaben die Untersuchungen aller anderen Parameter der Ganganalyse keine belastbaren Ergebnisse hinsichtlich eines möglichen Effekts des IL-4-Rezeptor-Knockouts.

Zusammenfassend war insgesamt somit kein Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts anzunehmen.

8.3 Einfluss des IL4-Rezeptor-Knockouts auf die posttraumatische Entzündung

In unserer Arbeit haben wir den Effekt eines IL-4-Rezeptor-Knockouts auf die posttraumatische Entzündung im Maus-Tibiafrakturmodell untersucht.

Wir konnten zeigen, dass die Versuchstiere in beiden Gruppen nach Tibia-Fraktur der rechten Hinterpfote und konservativer Behandlung mittels Gips typische Symptome eines CRPS entwickelten.

Die Untersuchungen hinsichtlich der Hauptsymptome der posttraumatischen Entzündung (Ödembildung und Überwärmung) zeigten, dass es bezüglich dieser Parameter einen statistisch signifikanten Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts gab. Die Ödembildung war 3 Wochen nach Fraktur, 9 Wochen nach Fraktur und 12 Wochen nach Fraktur signifikant stärker bei den Knockout-Tieren.

Somit konnten wir einen Effekt sowohl auf die Symptomausprägung als auch auf die Symptombdauer nachweisen.

Kein signifikanter Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts konnte bei der Untersuchung der Kälte-Allodynie objektiviert werden.

Die Ergebnisse hinsichtlich der Untersuchung der mechanischen Hyperalgesie ergaben einen deutlichen Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts mit signifikant stärkerer Hyperalgesie der Knockout-Tiere 3 Wochen nach Fraktur, 6 Wochen nach Fraktur und 12 Wochen nach Fraktur.

Hinsichtlich der Untersuchungen zur Beurteilung der Schmerzen und der Funktionseinschränkung konnten wir ebenfalls eine deutliche Reduktion der Pfotenbelastung der rechten Hinterpfote in beiden Gruppen objektivieren. Ein signifikanter Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts konnte mittels MANOVA nachgewiesen werden, sowie eine signifikant stärkere Reduktion der Pfotenbelastung der Knockout-Tiere 3 Wochen nach Fraktur.

Zur genaueren Analyse des Effekts des IL-4-Rezeptor-Knockouts führten wir detaillierte Ganganalysen zum besseren Verständnis der Veränderungen des Gangbildes bei CRPS durch.

Hier konnten wir, neben der Reduktion der Durchschnittsgeschwindigkeit und Zunahme der Laufdauer in beiden Gruppen zeigen, dass das Absolvieren eines Schrittzklus (Schwung- und Standphase) deutlich länger dauerte, hier mit signifikant mehr Effekt bei den Wildtyp-Tieren 3 Wochen nach Fraktur.

Zudem konnte ein signifikanter Effekt des Knockouts bezüglich der Reduktion der Geschwindigkeit der rechten Hinterpfote während der Schwungphase 3 Wochen nach Fraktur gezeigt werden.

Bei Betrachtung der Schrittlänge zeigten die Wildtyp-Tiere eine leichte Zunahme der Schrittlänge, wohingegen bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren eine Abnahme der

Schrittlänge beobachtet werden konnte. Ein signifikanter Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts konnte hier nicht objektiviert werden.

Bezüglich der Catwalk-Ganganalyse konnte in Zusammenschau der verschiedenen Parameter kein statistisch belastbarer Effekt des Knockouts nachgewiesen werden.

8.4 Immunhistochemie

Wir untersuchten bilaterale Hautbiopsieproben von CRPS-PatientInnen mit unterschiedlicher Krankheitsdauer hinsichtlich der Anzahl CD1a-positiven Langerhans-Zellen jeweils in der Epidermis und in der Dermis.

Bei der Quantifizierung der CD1a-positiven Zellen in den einzelnen Proben fiel ein geringfügiger Unterschied zwischen der nicht betroffenen und betroffenen Extremität mit einer leicht erhöhten Anzahl der Langerhans-Riesenzellen in der Epidermis der betroffenen Extremität auf.

In der Dermis fiel der Unterschied etwas deutlicher aus, mit vermehrtem Vorkommen der Langerhans-Riesenzellen in der betroffenen Extremität.

Ein signifikanter Unterschied zwischen der betroffenen und nicht betroffenen Extremität konnte nicht nachgewiesen werden.

Li et al. konnten im Tibia-Frakturmodell zeigen, dass die Anzahl der epidermalen Langerhans-Zellen im Bereich der ipsilateralen Pfote 3 Wochen nach Tibiafraktur deutlich erhöht war, im Vergleich zu den Kontrollen ohne Tibiafraktur.

Darüber hinaus war die Morphologie der epidermalen Langerhans-Zellen verändert, wobei die Zellen größer wurden und eine verstärkte dendritische Verzweigung aufwiesen (Li et al., 2018). Li et al. untersuchten auch bilaterale Hautbiopsieproben von frühen CRPS-Patienten. Hier stellten sie eine Zunahme der epidermalen Langerhans-Zellen im Bereich der betroffenen Seite im Vergleich zur kontralateralen Seite fest und eine vermehrte Verzweigung als Hinweis auf eine zelluläre Aktivierung und Differenzierung (Li et al., 2018). Osborne et al. untersuchten Hautbiopsieproben von CRPS Patienten mit langer Krankheitsdauer und chronischem CRPS. Hier war die CD1a+ Langerhans-Zelldichte in der epidermalen Schicht in betroffenen im Vergleich zu nicht betroffenen CRPS-Gliedmaßen signifikant verringert, als Hinweis auf weiterhin bestehende Immunzellanomalien im chronischen Stadium der Erkrankung (Osborne et al., 2015).

Unserer Ergebnisse zeigten ebenfalls eine geringfügige Zunahme der Langerhans-Riesenzellen in den Hautbiopsieproben der betroffenen Extremität.

Allerdings waren die Unterschiede nur bei einem Teil der Patienten objektivierbar, sehr gering ausgeprägt und statistisch nicht signifikant.

Ein möglicher Grund für die sehr eingeschränkte Aussagekraft unserer Ergebnisse war die geringe Anzahl der Probanden mit $n = 16$, sowie die geringe Anzahl an Präparaten pro Seite.

8.5 Limitationen der Studie

Im Rahmen unserer Studie sind diverse Limitationen und Kritikpunkte zu nennen.

Es verstarben insgesamt 3 IL-4-Rezeptor-Knockout-Tiere und 6 Wildtyp-Versuchstiere (insgesamt $n = 9$ Tiere), was zu einer Dezimierung der ohnehin geringen Fallzahl führte und somit die Aussagekraft reduzierte. Die meisten Versuchstiere ($n = 4$ Tiere) verstarben im Rahmen der Inhalationsnarkose bei der Frakturdurchführung aufgrund eines Atemstillstandes. Darüber hinaus wurden einige Mäuse ($n = 3$ Tiere) am Tag nach der Frakturdurchführung tot im Käfig aufgefunden, wobei die Ursache hier nicht sicher festgestellt werden konnte. 2 Tiere wiesen bei Entfernung des Gipses keine Frakturheilung auf und mussten getötet werden.

Weitere Probleme ergaben sich aus einem Gerätedefekt des Thermometers zur Prüfung der Pfotentemperatur der Hinterpfoten im Seitenvergleich. Dadurch konnten die diesbezüglichen Daten zu den korrekten Untersuchungszeitpunkten nicht erhoben werden, sodass nicht alle Daten wie geplant vorlagen.

Bei der Baseline-Messung des Pfootenvolumens musste, aufgrund eines Defektes der Lasermessung, eine Messung mittels Schieblehre erfolgen, was zu einer schlechteren Vergleichbarkeit der Ergebnisse führte.

Darüber hinaus erfolgten die Untersuchungen ausschließlich an männlichen BALB/c-Mäusen. Somit war weder ein Vergleich mit weiblichen Versuchstieren möglich, noch können die Ergebnisse auf andere Stämme (z.B. C57Bl/6 Mäuse) übertragen werden.

Hinsichtlich der immunhistochemischen Untersuchungen ist ebenfalls einschränkend die geringe Anzahl von 16 Patienten zu nennen, sowie die geringe Anzahl an Präparaten pro Seite (4-5 Stück), sodass hier nur eine kleine Fallzahl vorlag.

9 Zusammenfassung und Ausblick

Wir verwendeten für unser Projekt das etablierte Tibiafrakturmodell der Maus zur Untersuchung der posttraumatischen Entzündung. Mit Hilfe dieses Modells konnten bereits wesentliche Erkenntnisse hinsichtlich der Erforschung der Pathophysiologie des CRPS bei Ratten und Mäusen gewonnen werden.

Die Forschungsfrage dieser Arbeit zielte darauf ab, den Effekt eines IL-4-Rezeptor-Knockouts bei männlichen BALB/c-Mäusen im Vergleich zu männlichen Wildtyp-BALB/c-Mäusen auf die Ausprägung der posttraumatischen Entzündung nach Tibiafraktur zu untersuchen und die damit assoziierten Veränderungen des Gangbildes.

Diese Studie liefert Hinweise auf einen signifikanten Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts.

Hinsichtlich der Hauptfragestellungen konnten wir mit Hilfe unserer Untersuchungen sowohl eine signifikant stärkere Ödembildung bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren 3 Wochen nach Fraktur, 9 Wochen nach Fraktur und 12 Wochen nach Fraktur zeigen als auch eine deutlich stärkere Überwärmung der rechten Hinterpfote der Knockout-Tiere nach Tibia-Fraktur 3 Wochen nach Fraktur und 6 Wochen nach Fraktur.

Bei den Nebenfragestellungen fiel insbesondere ein deutlicher Effekt des IL-4-Rezeptor-Knockouts bei der Untersuchung der mechanischen Hyperalgesie auf mit deutlich verringerter Reizschwelle der Knockout-Tieren im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren. Darüber hinaus hielt die ausgeprägte mechanische Hyperalgesie bei den Knockout-Tieren über den Untersuchungszeitraum von 12 Wochen an.

Die rechte Hinterpfote bei den IL-4-Rezeptor-Knockout-Tieren wurde 3 Wochen nach Fraktur deutlich weniger belastet im Vergleich mit den Wildtyp-Tieren, sodass wir hier starke persistierende Schmerzen und Funktionseinschränkungen annahmen.

Die Ganganalyse zeigte Unterschiede bezüglich der Schrittlänge als Hinweis auf eine geringere Rumpfstabilität und Grobmuskelkraft der Knockout-Tiere. Insgesamt ergab die Ganganalyse allerdings keinen Nachweis eines statistisch signifikanten Effekts des IL-4-Rezeptor-Knockouts.

In Zusammenschau unserer Ergebnisse konnten wir eine deutliche Zunahme der Symptome der posttraumatischen Entzündung (Ödembildung, Überwärmung, mechanische Hyperalgesie, reduzierte Pfotenbelastung) durch den Knockout des Rezeptors für das antiinflammatorisch und analgetisch wirksame Zytokin IL-4 nachweisen.

Neben der Regulierung des B-Zell-Wachstums und der Immunglobulinsekretion beeinflusst IL-4 auch die T-Zellen. IL-4 induziert die Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen in TH2-Zellen (Stephen T. Smiley, 1998) und führt zum Klassenwechsel von IgG bzw. IgM zu IgE.

IL-4 induziert spezifische biologische Funktionen auf einer Vielzahl von Zellen, einschließlich dendritischer Zellen und T-Zellen, die entscheidend an der adaptiven Immunantwort beteiligt sind (Kariyawasam et al., 2020). So reguliert IL-4 auch die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten und T-Zellen in entzündetes Gewebe durch die Induktion der Expression von VCAM-1 auf vaskulären Endothelzellen (Thornhill et al., 1991) und durch die verminderte Expression von E-Selektin (Bennett et al., 1997).

Im Kontext des CRPS und der damit einhergehenden prolongierten, ausgeprägten Entzündung, ist eine wichtige Rolle von IL-4 als antiinflammatorisches Zytokin anzunehmen. Insbesondere auch hinsichtlich eines Einsatzes für künftige Therapien. In der Literatur werden verschiedene Arten von Fehlfunktionen des Immunsystems für ihren Beitrag zur Entwicklung eines CRPS beschrieben, zum Beispiel Autoinflammation und Autoimmunität.

Bei der Autoinflammation ist das angeborene Immunsystem direkt für die Entzündung des Gewebes verantwortlich; bei der Autoimmunität aktiviert das angeborene Immunsystem das adaptive Immunsystem gegen sich selbst. Beide Prozessgruppen wirken sich potenziell auf die Physiologie mehrerer Systeme aus, einschließlich des neurologischen, muskuloskelettalen, vaskulären und integumentären Systems, wobei alle Systeme am CRPS beteiligt sind (David Clark et al., 2018, Li et al., 2014).

Clark et al. beschrieben bereits den möglichen Einsatz von therapeutischen Interventionen, die auf Autoinflammation bzw. Autoimmunität abzielen, wie beispielsweise biologische Antizytokinwirkstoffe (TNF α , IL-1 β , IL-6 usw.) oder Medikamente, die auf Komponenten des adaptiven Immunsystems abzielen, wie Rituximab (Anti-CD20) oder Calcineurin-Inhibitoren (David Clark et al., 2018).

Allerdings sollten hier auch die potenziellen Vorteile dieser immunologischen Wirkstoffe gegen die Anfälligkeit für Infektionen und bestimmte Krebsarten abgewogen werden (David Clark et al., 2018).

Bezüglich der Rolle von IL-4 untersuchten Volpin et al. in einer prospektiven Studie gesunde Kontrollpersonen, sowie traumatisierte orthopädische Patienten und

bestimmten die Serumspiegel pro-inflammatorischer, regulatorischer und anti-inflammatorischer Zytokine. Hier konnte ein signifikanter Anstieg der Spiegel der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TGF β und IL-8, mit den höchsten Spiegeln in der schwer verletzten Gruppe gezeigt werden in Kombination mit signifikant niedrigen Spiegeln von IL-4 bei allen verletzten Patienten (Volpin et al., 2014).

Die gezielte Entwicklung von Medikamenten, die zu einer Hochregulation von IL-4 und somit zu einem starken anti-inflammatorischen Effekt führen könnten wird durch verschiedene Problemstellungen verkompliziert. Durch alternatives Splicing von IL-4, unterschiedliche Rezeptorbindung durch IL-4 und unterschiedliche Regulierung der Makrophagenaktivierung durch IL-4 ist anzunehmen, dass es Schwierigkeiten beim Erzielen eines gezielten gewünschten Effekts der Therapie geben kann (Luzina et al., 2012).

Weitere Studien zu den spezifischen Aspekten der IL-4-gesteuerten Regulierung von Entzündungen sind notwendig, um die Grundlage für die Entwicklung besserer Therapien zu schaffen.

Bei der Behandlung der Psoriasis als Autoimmunerkrankung wurde beispielsweise bereits im Rahmen einer Studie die systemische Therapie mit rekombinantem humanem (rhu) IL-4 bei 20 Patienten durchgeführt mit deutlichem Rückgang der Hautläsionen bei Psoriasis vulgaris (Homey, 2003).

Bezüglich der immunhistochemischen Untersuchungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen betroffener und kontralateraler Seite nachgewiesen werden. Allerdings fiel auf, dass die Anzahl der CD1a+ Langerhans-Zellen in der Epidermis und Dermis bei mehreren Patienten auf der betroffenen Seite erhöht war.

Für zukünftige Studien ist es empfehlenswert, alle Untersuchungen mit einer deutlich größeren Fallzahl und deutlich mehr Präparaten pro Seite zu wiederholen, um die Aussagekraft zu erhöhen.

Bei der Untersuchung der histologischen Präparate sollte auch die dermoepidermale Junktionszone separat ausgewertet werden.

Trotz der beschriebenen Einschränkungen leistet diese Arbeit einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie des CRPS.

10 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: HINTERPFOTEN-VOLUMENMESSUNG/ÖDEMBILDUNG; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO.....	36
ABBILDUNG 2: HINTERPFOTEN-TEMPERATURMESSUNG; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO	37
ABBILDUNG 3: KÄLTE-ALLODYNIE; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO	39
ABBILDUNG 4: MECHANISCHE HYPERALGESIE; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO	40
ABBILDUNG 5: PFOTENBELASTUNG; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO.....	41
ABBILDUNG 6: CATWALK; LAUFDAUER JE LAUF; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO.....	43
ABBILDUNG 7: CATWALK; DURCHSCHNITTSGESCHWINDIGKEIT; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO	44
ABBILDUNG 8; CATWALK; SCHRITTLÄNGE; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO	45
ABBILDUNG 9: CATWALK; GESCHWINDIGKEIT RECHTE HINTERPFOTE WÄHREND SCHWUNGPHASE; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO	46
ABBILDUNG 10; CATWALK; SCHRITTZYKLUS; WILDTYP VS. IL-4-REZEPTOR-KO.....	47
ABBILDUNG 11; HUMANE HAUTBIOPSIEN; QUANTIFIZIERUNG CD1A POSITIVER ZELLEN; EPIDERMIS	48
ABBILDUNG 12: HUMANE HAUTBIOPSIEN; QUANTIFIZIERUNG CD1A POSITIVER ZELLEN; DERMIS	49

11 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: DIAGNOSEKRITERIEN „BUDAPEST-KRITERIEN“ CRPS; MODIFIZIERT NACH (BIRKLEIN AND SCHLERETH, 2015)	12
TABELLE 2: ÜBERSICHT MEDIKAMENTÖSE THERAPIEN BEI CRPS, MODIFIZIERT NACH (BIRKLEIN, 2018).....	24

12 Literaturverzeichnis

- ACEVES, M., DIETZ, V. A., DULIN, J. N., JEFFERY, U. & JEFFERY, N. D. 2020. An Analysis of Variability in "CatWalk" Locomotor Measurements to Aid Experimental Design and Interpretation. *eNeuro*, 7.
- ADAMI, S., FOSSALUZZA, V., GATTI, D., FRACASSI, E. & BRAGA, V. 1997. Bisphosphonate therapy of reflex sympathetic dystrophy syndrome. *Ann Rheum Dis*, 56, 201-4.
- ALBRECHT, P. J., HINES, S., EISENBERG, E., PUD, D., FINLAY, D. R., CONNOLLY, M. K., PARE, M., DAVAR, G. & RICE, F. L. 2006. Pathologic alterations of cutaneous innervation and vasculature in affected limbs from patients with complex regional pain syndrome. *Pain*, 120, 244-66.
- ALLEN, G., GALER, B. S. & SCHWARTZ, L. 1999. Epidemiology of complex regional pain syndrome: a retrospective chart review of 134 patients. *Pain*, 80, 539-44.
- ALMOLDA, B., GONZALEZ, B. & CASTELLANO, B. 2015. Are Microglial Cells the Regulators of Lymphocyte Responses in the CNS? *Front Cell Neurosci*, 9, 440.
- AN, H. S., HAWTHORNE, K. B. & JACKSON, W. T. 1988. Reflex sympathetic dystrophy and cigarette smoking. *J Hand Surg Am*, 13, 458-60.
- AUTENRIETH, I. B., BOHN, E., BEER, M., PREGER, S., HEINZE, G. & HESEMANN, J. 1995. Role of T-helper-cell subtypes and cytokines in immunity to *Yersinia enterocolitica* in susceptible and resistant strains of mice. *Contrib Microbiol Immunol*, 13, 203-6.
- BENNETT, B. L., CRUZ, R., LACSON, R. G. & MANNING, A. M. 1997. Interleukin-4 suppression of tumor necrosis factor alpha-stimulated E-selectin gene transcription is mediated by STAT6 antagonism of NF-kappaB. *J Biol Chem*, 272, 10212-9.
- BIRKLEIN, F. 2005. Complex regional pain syndrome. *J Neurol*, 252, 131-8.
- BIRKLEIN, F. 2018. *Diagnostik und Therapie komplexer regionaler Schmerzsyndrome (CRPS), S1-Leitlinie* [Online]. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.). Available: www.dgn.org/leitlinien [Accessed 08.11.2020].
- BIRKLEIN, F., DRUMMOND, P. D., LI, W., SCHLERETH, T., ALBRECHT, N., FINCH, P. M., DAWSON, L. F., CLARK, J. D. & KINGERY, W. S. 2014. Activation of cutaneous immune responses in complex regional pain syndrome. *J Pain*, 15, 485-95.

- BIRKLEIN, F., IBRAHIM, A., SCHLERETH, T. & KINGERY, W. S. 2018. The Rodent Tibia Fracture Model: A Critical Review and Comparison With the Complex Regional Pain Syndrome Literature. *J Pain*, 19, 1102 e1-1102 e19.
- BIRKLEIN, F. & SCHLERETH, T. 2015. Complex regional pain syndrome-significant progress in understanding. *Pain*, 156 Suppl 1, S94-103.
- BIRKLEIN, F., SCHMELZ, M., SCHIFTER, S. & WEBER, M. 2001. The important role of neuropeptides in complex regional pain syndrome. *Neurology*, 57, 2179-84.
- BLAIR, S. J., CHINTHAGADA, M., HOPPENSTEHDT, D., KIJOWSKI, R. & FAREED, J. 1998. Role of neuropeptides in pathogenesis of reflex sympathetic dystrophy. *Acta Orthop Belg*, 64, 448-51.
- BRUEHL, S. 2010. An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology*, 113, 713-25.
- BUSCH, R. A., JONKER, M. A., PIERRE, J. F., HENEGHAN, A. F. & KUDSK, K. A. 2016. Innate Mucosal Immune System Response of BALB/c vs C57BL/6 Mice to Injury in the Setting of Enteral and Parenteral Feeding. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 40, 256-63.
- BUSSA, M., MASCARO, A., CUFFARO, L. & RINALDI, S. 2017. Adult Complex Regional Pain Syndrome Type I: A Narrative Review. *PM R*, 9, 707-719.
- CABALLERO-GARRIDO, E., PENA-PHILIPPIDES, J. C., GALOCHKINA, Z., ERHARDT, E. & ROITBAK, T. 2017. Characterization of long-term gait deficits in mouse dMCAO, using the CatWalk system. *Behav Brain Res*, 331, 282-296.
- CALDER, J. S., HOLTEN, I. & MCALLISTER, R. M. 1998. Evidence for immune system involvement in reflex sympathetic dystrophy. *J Hand Surg Br*, 23, 147-50.
- CERNESCU, L. D., HAIDAR, L. & PANAITESCU, C. 2021. Dendritic cell-CD4(+) T cell interaction: The differential role of IL-4/IL-13 in serum IgE levels in house dust mite allergic patients. *Exp Ther Med*, 21, 95.
- CHAPLAN, S. R., BACH, F. W., POGREL, J. W., CHUNG, J. M. & YAKSH, T. L. 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 53, 55-63.
- CHENG, J. K. & JI, R. R. 2008. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res*, 33, 1970-8.
- CHRISTENSEN, K., JENSEN, E. M. & NOER, I. 1982. The reflex dystrophy syndrome response to treatment with systemic corticosteroids. *Acta Chir Scand*, 148, 653-5.
- CLARK, J. D., QIAO, Y., LI, X., SHI, X., ANGST, M. S. & YEOMANS, D. C. 2006. Blockade of the complement C5a receptor reduces incisional allodynia, edema, and cytokine expression. *Anesthesiology*, 104, 1274-82.
- CODERRE, T. J., XANTHOS, D. N., FRANCIS, L. & BENNETT, G. J. 2004. Chronic post-ischemia pain (CPIP): a novel animal model of complex regional pain syndrome-type I (CRPS-I; reflex sympathetic dystrophy) produced by prolonged hindpaw ischemia and reperfusion in the rat. *Pain*, 112, 94-105.
- COOPER, M. S. & CLARK, V. P. 2013. Neuroinflammation, neuroautoimmunity, and the co-morbidities of complex regional pain syndrome. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8, 452-69.
- COSMI, F. & MAZZOLENI, G. 2014. Evaluation of the structural quality of bone in a case of progressive osteoporosis complicating a Complex Regional Pain Syndrome (CRPS) of the upper limb. *J Mech Behav Biomed Mater*, 29, 517-28.
- DAVID CLARK, J., TAWFIK, V. L., TAJERIAN, M. & KINGERY, W. S. 2018. Autoinflammatory and autoimmune contributions to complex regional pain syndrome. *Mol Pain*, 14, 1744806918799127.
- DE JONG, E. C., VIEIRA, P. L., KALINSKI, P. & KAPSENBERG, M. L. 1999. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J Leukoc Biol*, 66, 201-4.
- DE MOS, M., DE BRUIJN, A. G., HUYGEN, F. J., DIELEMAN, J. P., STRICKER, B. H. & STURKENBOOM, M. C. 2007. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. *Pain*, 129, 12-20.

- DE MOS, M., HUYGEN, F. J., DIELEMAN, J. P., KOOPMAN, J. S., STRICKER, B. H. & STURKENBOOM, M. C. 2008. Medical history and the onset of complex regional pain syndrome (CRPS). *Pain*, 139, 458-66.
- DE MOS, M., HUYGEN, F. J., STRICKER, B. H., DIELEMAN, J. P. & STURKENBOOM, M. C. 2009. The association between ACE inhibitors and the complex regional pain syndrome: Suggestions for a neuro-inflammatory pathogenesis of CRPS. *Pain*, 142, 218-24.
- DE PRA, S. D. T., ANTONIAZZI, C. T. D., FERRO, P. R., KUDSI, S. Q., CAMPONOGARA, C., FIALHO, M. F. P., RIGO, F. K., GOMEZ, M. V., BOCHI, G. V., MORESCO, R. N., OLIVEIRA, S. M. & TREVISAN, G. 2019. Nociceptive mechanisms involved in the acute and chronic phases of a complex regional pain syndrome type 1 model in mice. *Eur J Pharmacol*, 859, 172555.
- DE ROOIJ, A. M., DE MOS, M., VAN HILTEN, J. J., STURKENBOOM, M. C., GOSSO, M. F., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M. & MARINUS, J. 2009a. Increased risk of complex regional pain syndrome in siblings of patients? *J Pain*, 10, 1250-5.
- DE ROOIJ, A. M., FLORENCIA GOSSO, M., HAASNOOT, G. W., MARINUS, J., VERDUIJN, W., CLAAS, F. H., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M. & VAN HILTEN, J. J. 2009b. HLA-B62 and HLA-DQ8 are associated with Complex Regional Pain Syndrome with fixed dystonia. *Pain*, 145, 82-5.
- DIMOVA, V., BIRKLEIN, F. 2019. Das komplexe regionale Schmerzsyndrom (CRPS). *Anaesthetist*, 68, 115-128.
- FERREIRA, S. H., LORENZETTI, B. B. & POOLE, S. 1993. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br J Pharmacol*, 110, 1227-31.
- FISCHER, H. G. & REICHMANN, G. 2001. Brain dendritic cells and macrophages/microglia in central nervous system inflammation. *J Immunol*, 166, 2717-26.
- GADANI, S. P., CRONK, J. C., NORRIS, G. T. & KIPNIS, J. 2012. IL-4 in the brain: a cytokine to remember. *J Immunol*, 189, 4213-9.
- GALER, B. S., BRUEHL, S. & HARDEN, R. N. 1998. IASP diagnostic criteria for complex regional pain syndrome: a preliminary empirical validation study. International Association for the Study of Pain. *Clin J Pain*, 14, 48-54.
- GALLAGHER, J. J., TAJERIAN, M., GUO, T., SHI, X., LI, W., ZHENG, M., PELTZ, G., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2013. Acute and chronic phases of complex regional pain syndrome in mice are accompanied by distinct transcriptional changes in the spinal cord. *Mol Pain*, 9, 40.
- GALVE VILLA, M., RITTIG-RASMUSSEN, B., MOELLER SCHEAR MIKKELSEN, L. & GROENDAHL POULSEN, A. 2016. Complex regional pain syndrome. *Man Ther*, 26, 223-230.
- GARCIA-OVEJERO, D., GONZALEZ, S., PANIAGUA-TORIIA, B., LIMA, A., MOLINA-HOLGADO, E., DE NICOLA, A. F. & LABOMBARDA, F. 2014. Progesterone reduces secondary damage, preserves white matter, and improves locomotor outcome after spinal cord contusion. *J Neurotrauma*, 31, 857-71.
- GOH, E. L., CHIDAMBARAM, S. & MA, D. 2017. Complex regional pain syndrome: a recent update. *Burns Trauma*, 5, 2.
- GUO, T. Z., OFFLEY, S. C., BOYD, E. A., JACOBS, C. R. & KINGERY, W. S. 2004. Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*, 108, 95-107.
- GUO, T. Z., WEI, T., HUANG, T. T., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2018. Oxidative Stress Contributes to Fracture/Cast-Induced Inflammation and Pain in a Rat Model of Complex Regional Pain Syndrome. *J Pain*, 19, 1147-1156.
- GUO, T. Z., WEI, T., LI, W. W., LI, X. Q., CLARK, J. D. & KINGERY, W. S. 2014. Immobilization contributes to exaggerated neuropeptide signaling, inflammatory changes, and nociceptive sensitization after fracture in rats. *J Pain*, 15, 1033-45.
- GUO, T. Z., WEI, T., SHI, X., LI, W. W., HOU, S., WANG, L., TSUJIKAWA, K., RICE, K. C., CHENG, K., CLARK, J. D. & KINGERY, W. S. 2012. Neuropeptide deficient mice have attenuated nociceptive, vascular, and inflammatory changes in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome. *Mol Pain*, 8, 85.
- HALICKA, M., VITTERSO, A. D., PROULX, M. J. & BULTITUDE, J. H. 2020. Neuropsychological Changes in Complex Regional Pain Syndrome (CRPS). *Behav Neurol*, 2020, 4561831.

- HARDEN, R. N., BRUEHL, S., PEREZ, R. S., BIRKLEIN, F., MARINUS, J., MAIHOFNER, C., LUBENOW, T., BUVANENDRAN, A., MACKEY, S., GRACIOSA, J., MOGILEVSKI, M., RAMSDEN, C., CHONT, M. & VATINE, J. J. 2010. Validation of proposed diagnostic criteria (the "Budapest Criteria") for Complex Regional Pain Syndrome. *Pain*, 150, 268-74.
- HOMEY, B. 2003. [Interleukin-4: a new option in the therapy of systemic psoriasis?]. *Hautarzt*, 54, 1019-20.
- IWASAKI, M., WILCOX, J. T., NISHIMURA, Y., ZWECKBERGER, K., SUZUKI, H., WANG, J., LIU, Y., KARADIMAS, S. K. & FEHLINGS, M. G. 2014. Synergistic effects of self-assembling peptide and neural stem/progenitor cells to promote tissue repair and forelimb functional recovery in cervical spinal cord injury. *Biomaterials*, 35, 2617-29.
- KALITA, J., VAJPAYEE, A. & MISRA, U. K. 2006. Comparison of prednisolone with piroxicam in complex regional pain syndrome following stroke: a randomized controlled trial. *QJM*, 99, 89-95.
- KARIYAWASAM, H. H., JAMES, L. K. & GANE, S. B. 2020. Dupilumab: Clinical Efficacy of Blocking IL-4/IL-13 Signalling in Chronic Rhinosinusitis with Nasal Polyps. *Drug Des Devel Ther*, 14, 1757-1769.
- KARUPIAH, G. 1998. Type 1 and type 2 cytokines in antiviral defense. *Vet Immunol Immunopathol*, 63, 105-9.
- KLEIN, M. M., LEE, J. W., SIEGEL, S. M., DOWNS, H. M. & OAKLANDER, A. L. 2012. Endoneurial pathology of the needlestick-nerve-injury model of Complex Regional Pain Syndrome, including rats with and without pain behaviors. *Eur J Pain*, 16, 28-37.
- KRAMER, H. H. 2012. Immunological aspects of the complex regional pain syndrome (CRPS). *Curr Pharm Des*, 18, 4546-9.
- LI, W. W., GUO, T. Z., SHI, X., BIRKLEIN, F., SCHLERETH, T., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2018. Neuropeptide regulation of adaptive immunity in the tibia fracture model of complex regional pain syndrome. *J Neuroinflammation*, 15, 105.
- LI, W. W., GUO, T. Z., SHI, X., CZIRR, E., STAN, T., SAHBAIE, P., WYSS-CORAY, T., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2014. Autoimmunity contributes to nociceptive sensitization in a mouse model of complex regional pain syndrome. *Pain*, 155, 2377-89.
- LI, W. W., SABSOVICH, I., GUO, T. Z., ZHAO, R., KINGERY, W. S. & CLARK, D. J. 2009. The role of enhanced cutaneous IL-1beta signaling in a rat tibia fracture model of complex regional pain syndrome. *Pain*, 144, 303-313.
- LI, W. W., YANG, Y., GUO, T. Z., SAHBAIE, P., SHI, X. Y., GUANG, Q., KINGERY, W. S., HERZENBERG, L. A. & CLARK, J. D. 2021. IL-6 signaling mediates the germinal center response, IgM production and nociceptive sensitization in male mice after tibia fracture. *Brain Behav Immun*.
- LINNMAN, C., BECERRA, L. & BORSOOK, D. 2013. Inflaming the brain: CRPS a model disease to understand neuroimmune interactions in chronic pain. *J Neuroimmune Pharmacol*, 8, 547-63.
- LUZINA, I. G., KEEGAN, A. D., HELLER, N. M., ROOK, G. A., SHEA-DONOHUE, T. & ATAMAS, S. P. 2012. Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of "alternatives". *J Leukoc Biol*, 92, 753-64.
- MAIHOFNER, C., HANDWERKER, H. O., NEUNDORFER, B. & BIRKLEIN, F. 2003. Patterns of cortical reorganization in complex regional pain syndrome. *Neurology*, 61, 1707-15.
- MAIHOFNER, C., HANDWERKER, H. O., NEUNDORFER, B. & BIRKLEIN, F. 2004. Cortical reorganization during recovery from complex regional pain syndrome. *Neurology*, 63, 693-701.
- MANICOURT, D. H., BRASSEUR, J. P., BOUTSEN, Y., DEPRESEUX, G. & DEVOGELAER, J. P. 2004. Role of alendronate in therapy for posttraumatic complex regional pain syndrome type I of the lower extremity. *Arthritis Rheum*, 50, 3690-7.
- MARINUS, J., MOSELEY, G. L., BIRKLEIN, F., BARON, R., MAIHOFNER, C., KINGERY, W. S. & VAN HILTEN, J. J. 2011. Clinical features and pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Lancet Neurol*, 10, 637-48.
- MISIDOU, C. & PAPAGORAS, C. 2019. Complex Regional Pain Syndrome: An update. *Mediterr J Rheumatol*, 30, 16-25.

- MORELLINI, N., FINCH, P. M., GOEBEL, A. & DRUMMOND, P. D. 2018. Dermal nerve fibre and mast cell density, and proximity of mast cells to nerve fibres in the skin of patients with complex regional pain syndrome. *Pain*, 159, 2021-2029.
- OAKLANDER, A. L., RISSMILLER, J. G., GELMAN, L. B., ZHENG, L., CHANG, Y. & GOTT, R. 2006. Evidence of focal small-fiber axonal degeneration in complex regional pain syndrome-I (reflex sympathetic dystrophy). *Pain*, 120, 235-43.
- OSBORNE, S., FARRELL, J., DEARMAN, R. J., MACIVER, K., NAISBITT, D. J., MOOTS, R. J., EDWARDS, S. W. & GOEBEL, A. 2015. Cutaneous immunopathology of long-standing complex regional pain syndrome. *Eur J Pain*, 19, 1516-26.
- PARKITNY, L., MCAULEY, J. H., DI PIETRO, F., STANTON, T. R., O'CONNELL, N. E., MARINUS, J., VAN HILTEN, J. J. & MOSELEY, G. L. 2013. Inflammation in complex regional pain syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 80, 106-17.
- PEREZ, R. S., ZUURMOND, W. W., BEZEMER, P. D., KUIK, D. J., VAN LOENEN, A. C., DE LANGE, J. J. & ZUIDHOF, A. J. 2003. The treatment of complex regional pain syndrome type I with free radical scavengers: a randomized controlled study. *Pain*, 102, 297-307.
- REINER, S. L. & LOCKSLEY, R. M. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*, 13, 151-77.
- ROMMEL, O., WILLWEBER-STRUMPF, A., WAGNER, P., SURALL, D., MALIN, J. P. & ZENZ, M. 2005. [Psychological abnormalities in patients with complex regional pain syndrome (CRPS)]. *Schmerz*, 19, 272-84.
- RUSSO, M., GEORGIUS, P. & SANTARELLI, D. M. 2018. A new hypothesis for the pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Med Hypotheses*, 119, 41-53.
- SABSOVICH, I., GUO, T. Z., WEI, T., ZHAO, R., LI, X., CLARK, D. J., GEIS, C., SOMMER, C. & KINGERY, W. S. 2008. TNF signaling contributes to the development of nociceptive sensitization in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*, 137, 507-519.
- SANDRONI, P., BENRUD-LARSON, L. M., MCCLELLAND, R. L. & LOW, P. A. 2003. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. *Pain*, 103, 199-207.
- SCHINKEL, C., GAERTNER, A., ZASPEL, J., ZEDLER, S., FAIST, E. & SCHUERMANN, M. 2006. Inflammatory mediators are altered in the acute phase of posttraumatic complex regional pain syndrome. *Clin J Pain*, 22, 235-9.
- SCHLERETH, T., DITTMAR, J. O., SEEWALD, B. & BIRKLEIN, F. 2006. Peripheral amplification of sweating--a role for calcitonin gene-related peptide. *J Physiol*, 576, 823-32.
- SCHLERETH, T., DRUMMOND, P. D. & BIRKLEIN, F. 2014. Inflammation in CRPS: role of the sympathetic supply. *Auton Neurosci*, 182, 102-7.
- SEBASTIN, S. J. 2011. Complex regional pain syndrome. *Indian J Plast Surg*, 44, 298-307.
- SHI, X., WANG, L., LI, X., SAHBAIE, P., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2011. Neuropeptides contribute to peripheral nociceptive sensitization by regulating interleukin-1beta production in keratinocytes. *Anesth Analg*, 113, 175-83.
- SIEGEL, S. M., LEE, J. W. & OAKLANDER, A. L. 2007. Needlestick distal nerve injury in rats models symptoms of complex regional pain syndrome. *Anesth Analg*, 105, 1820-9, table of contents.
- STEPHEN T. SMILEY, M. J. G. 1998. *Encyclopedia of Immunology*.
- TAJERIAN, M., SAHBAIE, P., SUN, Y., LEU, D., YANG, H. Y., LI, W., HUANG, T. T., KINGERY, W. & DAVID CLARK, J. 2015. Sex differences in a Murine Model of Complex Regional Pain Syndrome. *Neurobiol Learn Mem*, 123, 100-9.
- THORNHILL, M. H., WELLICOME, S. M., MAHIOUZ, D. L., LANCHBURY, J. S., KYAN-AUNG, U. & HASKARD, D. O. 1991. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol*, 146, 592-8.
- UCEYLER, N., EBERLE, T., ROLKE, R., BIRKLEIN, F. & SOMMER, C. 2007. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. *Pain*, 132, 195-205.
- UCEYLER, N., TOPUZOGU, T., SCHIESSER, P., HAHNENKAMP, S. & SOMMER, C. 2011. IL-4 deficiency is associated with mechanical hypersensitivity in mice. *PLoS One*, 6, e28205.

- VAN DE VUSSE, A. C., STOMP-VAN DEN BERG, S. G., KESSELS, A. H. & WEBER, W. E. 2004. Randomised controlled trial of gabapentin in Complex Regional Pain Syndrome type 1 [ISRCTN84121379]. *BMC Neurol*, 4, 13.
- VARENNA, M., ADAMI, S., ROSSINI, M., GATTI, D., IDOLAZZI, L., ZUCCHI, F., MALAVOLTA, N. & SINIGAGLIA, L. 2013. Treatment of complex regional pain syndrome type I with neridronate: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Rheumatology (Oxford)*, 52, 534-42.
- VELDMAN, P. H., REYNEN, H. M., ARNTZ, I. E. & GORIS, R. J. 1993. Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients. *Lancet*, 342, 1012-6.
- VOLPIN, G., COHEN, M., ASSAF, M., MEIR, T., KATZ, R. & POLLACK, S. 2014. Cytokine levels (IL-4, IL-6, IL-8 and TGFbeta) as potential biomarkers of systemic inflammatory response in trauma patients. *Int Orthop*, 38, 1303-9.
- WASNER, G., SCHATTSCHEIDER, J., BINDER, A. & BARON, R. 2003. Complex regional pain syndrome-
-diagnostic, mechanisms, CNS involvement and therapy. *Spinal Cord*, 41, 61-75.
- WATANABE, H., NUMATA, K., ITO, T., TAKAGI, K. & MATSUKAWA, A. 2004. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. *Shock*, 22, 460-6.
- WEI, T., GUO, T. Z., LI, W. W., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2016. Acute versus chronic phase mechanisms in a rat model of CRPS. *J Neuroinflammation*, 13, 14.

13 Anhang

13.1 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich bei meiner Dissertation unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank den folgenden Personen, ohne deren Hilfe die Anfertigung dieser Doktorarbeit niemals zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst meiner Doktormutter, für die Betreuung dieser Arbeit. Insbesondere für die exzellente Beratung in allen Belangen, die Geduld und Ihr Verständnis.

Mein Dank gilt auch den Kolleg*Innen vom Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik für die freundliche und kompetente statistische Beratung.

Darüber hinaus bedanke ich mich ausdrücklich bei allen Beteiligten der Abteilung für Dermatologie der Uniklinik Mainz für die kollegiale und freundliche Zusammenarbeit, für die Beratung und für die Herstellung und Färbung der histologischen Präparate.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Mouse Behaviour Unit Mainz für die fachgerechte Pflege und Versorgung der Versuchstiere, sowie für die Schaffung der notwendigen Rahmenbedingungen für die Experimente und die Beratung.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich besonders herzlich danken für die aufmerksame, liebevolle und vielseitige Unterstützung während dem Verfassen dieser Arbeit und während meines gesamten Studiums, sodass es mir möglich war mich ganz auf dieses Projekt und parallel auf meine klinische Ausbildung zu konzentrieren.

Meiner Ehefrau danke ich von ganzem Herzen für ihr grenzenloses Verständnis in jeder Phase der Arbeit, für viele aufmunternde Worte, ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihre Liebe und Motivation.