

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

Der Einfluss von Interleukin-10  
auf das murine Tibiafrakturmodell der posttraumatischen Entzündung

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

Vorgelegt von

Tobias Stegmann  
aus Lich

Mainz, 2023

Tag der Promotion: 02. August 2023

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Grundlagen</b> .....	<b>2</b>
2.1. posttraumatische Entzündungsreaktion am Beispiel der Knochenfraktur .....	3
2.2. Immunsystem.....	7
2.3. Das Zytokinsystem und Interleukin-10 .....	10
2.3.1 Interleukin-10 .....	14
2.4. CRPS und Schmerz.....	17
2.5. Klassifikation .....	17
2.6. Epidemiologie .....	18
2.7. Ätiologie .....	19
2.8. Klinik .....	21
2.9. Pathophysiologie.....	23
2.9.1 Überschießende posttraumatische Entzündungsreaktion .....	23
2.9.2 Beteiligung des zentralen Nervensystems .....	26
2.9.3. Zentrale Reorganisation.....	27
2.10. Diagnostik.....	28
2.11. Differentialdiagnostik .....	31
2.12. Therapie .....	33
2.13. CRPS am Tiermodell.....	36
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>38</b>
3.1. Technische Hilfsmittel.....	39
3.2. Pharmaka .....	41
3.3. Frakturablauf.....	41
3.4. Verhaltenstestung .....	42
3.5. Elektrophysiologie .....	47
3.6. Statistische Methoden.....	49
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>50</b>
4.1. Sensibilitätstestung im Vergleich WT-Mäuse vs. IL-10 KO-Mäuse.....	50
4.2. Elektrophysiologie .....	56
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>61</b>
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>70</b>
<b>Referenzen</b> .....	<b>72</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>82</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE.....	Angiotensin converting enzyme
ANOVA .....	Analysis of Variance
CGRP .....	Calcitonin-gene Related Peptide
CRP .....	C-reaktives Protein
CRPS .....	Complex Regional Pain Syndrom
CSS.....	CRPS Severity Score
CT.....	Computer Tomography
fMRT.....	funktionelle Magnetresonanztomografie
GMI.....	Graded Motor Imagery
HLA.....	Humanes Leukozytenantigen
HZV.....	Herpes Zoster Virus
IASP .....	International Association of Pain
IL.....	Interleukin
ISS.....	Impairment Level SumScore
NSAID.....	Non steroid antiinflammatory drugs
PEPT.....	Pain Exposure Therapy
ROM.....	Range of Motion, Range of Motion
SLE.....	stressful lilfe events
SMP.....	sympathetically maintained pain
SNL .....	Spinal Nerve Ligation
SPECT.....	Single Photon Emssion CT
TARC .....	Translational Animal Research Center
TFM.....	Tibia Fraktur Modelll
TNF- $\alpha$ .....	Tumornekrosefaktor alpha
VAS.....	Visual Analog Scale
VZV.....	Varizella Zoster Virus
WDR.....	Wide Dynamic Range
WHO .....	World Health Organisation
WT.....	Wildtyp

## **Abbildungsverzeichnis**

- Abb. 1: Zusammenfassung der Stadien der Knochenheilung**
- Abb. 2: Übersicht der an angeborenen, bzw. adaptiven Immunität beteiligten Zellen**
- Abb. 3: Unterschiedliche Wege der Signalübertragung zwischen Zellen**
- Abb. 4: IL-10R ausgelöste antiinflammatorische Kaskade**
- Abb. 5: Entstehungsmechanismen CRPS und aufrechterhaltende Faktoren**
- Abb. 6: An Chronifizierung partizipierende psychologische Mechanismen**
- Abb. 7: Therapiealgorithmus CRPS**
- Abb. 8: Bilder Ödem der Pfoten der Versuchstiere**
- Abb. 9: Ergebnisse Von Frey Test für mechanische Sensibilität**
- Abb. 10: Ergebnisse der Unweighting Testung**
- Abb. 11: Ergebnisse Hot Plate Test für Wärmetoleranz**
- Abb. 12: Pfortendicke, Ödembildung**
- Abb. 13: Hauttemperatur**
- Abb. 14: Darstellung Aktionspotential Frequenzen**
- Abb. 15: Frequenzen der Aktionspotentiale bei mechanischer Stimulation**
- Abb. 16: Schematische Darstellung der Größe der gemessenen rezeptiven Felder**
- Abb. 17: Größe rezeptiver Felder der frakturierten Pfote**
- Abb. 18: Größe rezeptive Felder der kontralateralen Pfote**

## **Tabellenverzeichnis**

- Tab. 1: Wichtige Zytokine, Chemokine, Kolonie-stimulierenden Faktoren, Wachstumsfaktoren und deren Einfluss auf immunologische Antworten**
- Tab. 2: Auslösende Faktoren des CRPS und Häufigkeitsverteilung**
- Tab. 2: CRPS Severity Score (CSS)**
- Tab. 3: Differentialdiagnostik CRPS**
- Tab. 4: Material und Hersteller**
- Tab. 5: Auswertungstabelle Aesthesio von Frey-Testung**
- Tab. 6: Protokoll Hot Plate Test**
- Tab. 7: Protokoll Kälteallodynie Testung**

## **1. Einleitung**

Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung einer immunmodulatorischen Komponente, genauer Interleukin-10, auf die Ausprägung des komplexen regionalen Schmerzsyndroms (CRPS) ähnlichen Phänotyps am Mausmodell. Das CRPS stellt eine zumeist chronische, posttraumatische Schmerzstörung dar, welche in der Ausprägung der Symptomatik in keiner Korrelation mit dem auslösenden Ereignis steht. Sensorische, motorische und autonome Symptome dehnen sich dabei häufig über den ursprünglichen Ort des Traumas aus und können in maximaler Ausprägung auch die kontralaterale Seite betreffen. Die genauen Entstehungsmechanismen sind dabei weiterhin nicht eindeutig aufgeklärt. Das Tibiafrakturmodell (TFM) hat sich als zuverlässiges Modell der neuropathischen Schmerzen etabliert und wird daher auch als ein mögliches Modell zur experimentellen Erforschung des CRPS an Ratten und Mäusen verwendet. Interleukin-10 besitzt als antiinflammatorisches Zytokin der Immunregulation eine herausragende Rolle in der Eindämmung von Entzündungsprozessen. Da bei der Entstehung des CRPS nachweislich auch eine initiale Entzündungsphase zu beobachten ist, stellt sich die Frage, ob eine Veränderung der Immunantwort auch eine Veränderung in der Ausprägung der Symptomatik bedingen kann. Dies soll in dieser Arbeit mittels standardisierter Sensibilitätstestungen vor und nach Durchführung der Tibiafrakturen ermittelt werden. Die Reorganisation von rezeptiven Feldern des Rückenmarks stellt eine charakteristische Veränderung der neuronalen Plastizität nach Verletzungen peripherer Nerven dar. Auf dieser Grundlage wurde eine Vergrößerung der rezeptiven Felder auf einen leichten mechanischen Stimulus als eine mögliche Ursache für das Auftreten von Allodynie beschrieben (Suzuki et al., 2000). Daher wurden die Versuchstiere in dieser Arbeit ebenfalls elektrophysiologisch untersucht, um festzustellen, ob es durch die beschriebenen Eingriffe zu einer Reorganisation bzw. Vergrößerung der rezeptiven Felder und einer Erhöhung der Entladungsfrequenzen der entsprechenden Neurone auf Reizung kommt.

## **2. Grundlagen**

In den vergangenen Jahrzehnten hat sich das Verständnis von Schmerz und dessen Entstehung stark verändert. Neuropathische Schmerzen können für die daran leidenden Patientinnen und Patienten, aber auch für das die Schmerzen behandelnde ärztliche und pflegerische Personal ein außerordentliches Problem darstellen, da die Schmerzen häufig als besonders schwerwiegend wahrgenommen werden und darüber hinaus oft resistent gegen bekannte Behandlungsansätze sind. Daraus erklärt sich das besondere Interesse von klinisch tätigen Personen, Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftlern sowohl in den vergangenen Jahrzehnten als auch heute. Historisch als besonders relevant hervorzuheben ist die wissenschaftliche Arbeit von Silas Weir Mitchell, der während des Amerikanischen Bürgerkrieges von 1861 bis 1865 vor allem für die Versorgung und Behandlung von Soldaten mit Nervenverletzungen verantwortlich war und dabei den Begriff der Kausalgie prägte (Mitchell et al., 1864). Dr. Paul Sudeck, ein Chirurg am Allgemeinen Krankenhaus Hamburg-Eppendorf, beschrieb bereits 1900 in einer Publikation ein später nach ihm benanntes Krankheitsbild, welches er von der bekannten „einfachen Inaktivitätsatrophie“ als initiale „akut entzündliche Atrophie“ ohne vollständige Restitutio abgrenzte. Sudeck schlussfolgerte, dass neben einer akuten Entzündungsreaktion zu Beginn, auch eine „trophische Störung, die auf reflektorischem Wege vom Rückenmark aus zu Stande kommt“ ursächlich für die nach Abklingen der Entzündungsreaktion weiterhin vorhandenen Versteifungen und Schmerzen sein könnte (Sudeck, 1900).

Zwischenzeitlich beschrieb auch der französische Chirurg René Leriche bleibende Nervenschmerzen als Folge einer sympathischen Übererregbarkeit (Leriche, 1916).

In den folgenden Jahrzehnten wurde die Nomenklatur sowie die Einteilung von Symptomatik immer komplexer (Gibbons and Wilson, 1992, Blumberg et al., 1991, Egle and Hoffmann, 1992, Ascherl and Blumel, 1981).

Daher hat die International Association for the Study of Pain (IASP) die Taxonomie und damit einhergehende diagnostische Kriterien festgelegt. Die bis heute gebräuchlichen Termini "Komplexes Regionales Schmerzsyndrom Typ I" (CRPS Typ I) und "Komplexes Regionales Schmerzsyndrom Typ II" (CRPS II) wurden schließlich 1995 durch die IASP in einer Konsensuskonferenz eingeführt. Die Ergebnisse wurden von Stanton und Hicks in der PAIN veröffentlicht. Dabei wurden vor allem klinische Kriterien in der Beschreibung und Klassifikation der Erkrankung berücksichtigt. (Stanton-Hicks et al., 1995).



Da im Rahmen von überschießenden Entzündungsreaktionen auch körpereigenes, gesundes Gewebe geschädigt werden kann, kommt der Regulation von Entzündungsmechanismen besondere Bedeutung zu. Immunreaktionen müssen unter Umständen schnell eingegrenzt werden, um eine adäquate Immunhomöostase herzustellen. Die Manipulation von zytokininduzierte Zellabläufen stellt eine effektive Strategie dar, um verschiedene Erkrankungen zu behandeln (Ouyang and O'Garra, 2019). Entzündungsreaktionen laufen dabei nach einem festen Schema ab.

### **2.1. posttraumatische Entzündungsreaktion am Beispiel der Knochenfraktur**

Die Knochenheilung nach erfolgter Fraktur gliedert sich in drei ineinander übergreifende Phasen: die Entzündungsphase, die Granulations- und Kallushärtungsphase (Reparationsphase) und die Remodelingphase. Dabei ist das Ergebnis dieses Heilungsprozesses stark abhängig von der initialen Entzündungsphase, welche wiederum von lokaler, als auch systemischer Antwort auf den verletzenden Reiz, in diesem Fall die Fraktur, beeinflusst wird (Loi et al., 2016).

Die Inflammation ist dabei die proaktive Antwort des Gewebes auf den schädigenden Reiz. Diese Antwort führt zum einen zu einer Entfernung des schädigenden Reizes, zum anderen zu einer gleichzeitigen Initiation des Heilungsprozesses. Die einsetzende Entzündungsreaktion ist geprägt durch Dilatation der beteiligten Kapillare und Leukozytenmigration ins betroffene Gewebe mit dem Ergebnis einer Rötung, Überwärmung und nicht zuletzt auch Schmerzen (Maruyama et al., 2020).

Die akute Inflammation wird dabei initiiert durch einen exogenen oder endogenen Stimulus. Nach der eigentlichen Verletzung kommt es zu einer Kaskade an verschiedenen nachgeschalteten Vorgängen. Dabei erkennen gewebständige Zellen wie Makrophagen, Fibroblasten, Mastzellen und dendritische Zellen Nebenprodukte der vorangegangenen Gewebsschädigung oder exogene Pathogene und setzen daraufhin proinflammatorische Mediatoren frei (Loi et al., 2016). Dabei handelt es sich um Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren, durch deren Ausschüttung es schließlich zu einer Migration von neutrophilen Granulozyten, sowie Monozyten/Makrophagen und schließlich auch deren Infiltration in das betroffene Gewebe kommt. Diese nun infiltrierenden Zellen übernehmen dabei unterschiedlichste Aufgaben im Prozess der akuten Entzündungsreaktion. Neutrophile phagozytieren und eliminieren Pathogene. Makrophagen werden in den proinflammatorischen M1 Subtypen polarisiert, übernehmen protektive Aufgaben,

verstärken die Entzündungsreaktion und rekrutieren weitere Immunzellen durch die Ausschüttung proinflammatorischer und chemotaktischer Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und weiterer (Martinez and Gordon, 2014).

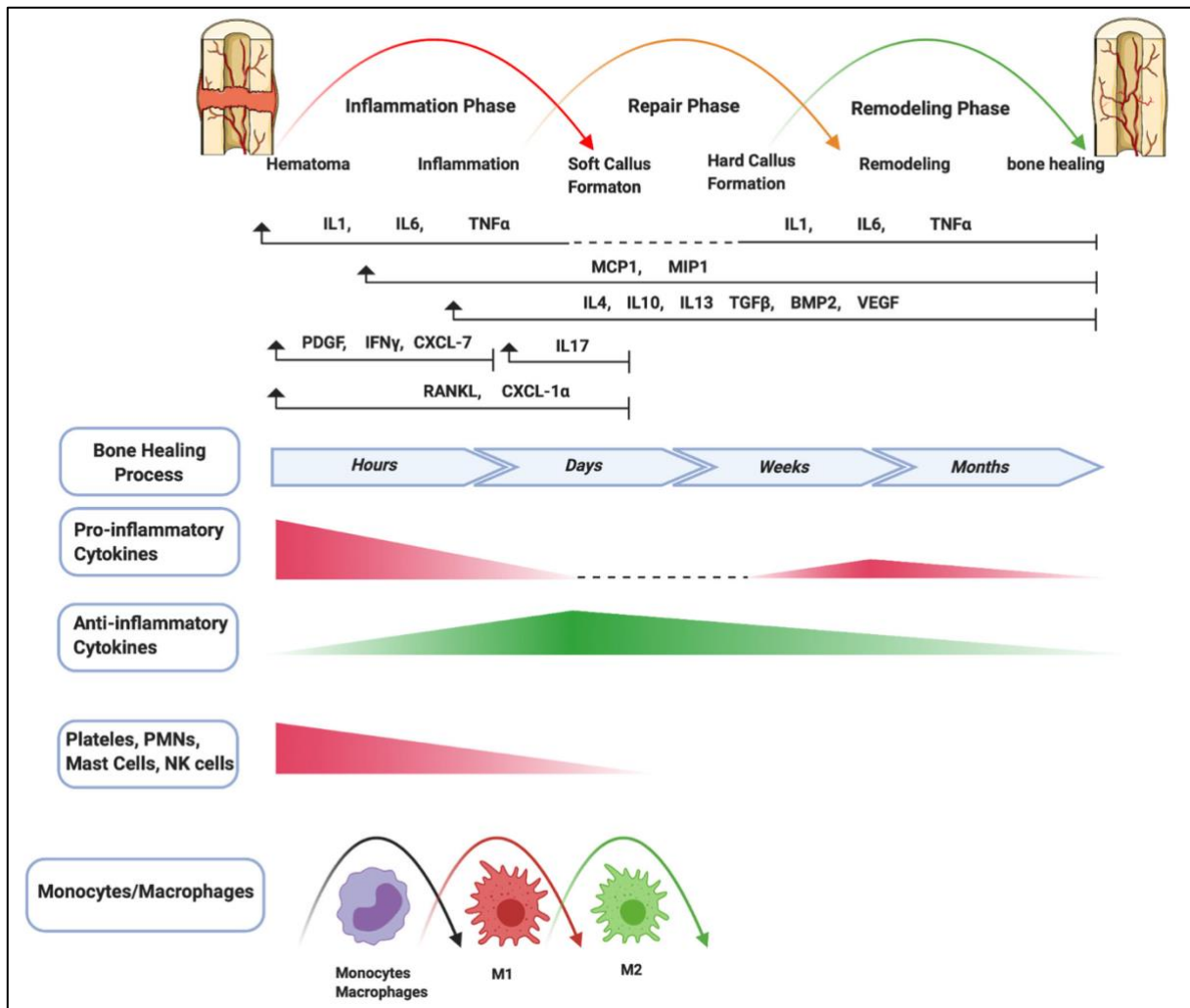
Die Resolution der Entzündungsreaktion kann ebenfalls als aktiver Vorgang begriffen werden und nicht nur durch Abnahme der proinflammatorischen Mediatoren als Art des passiven Vorgangs (Buckley et al., 2013). Der Resolutionsprozess beginnt dabei ebenfalls bereits wenige Stunden nach der initialen Gewebsschädigung. Zunächst werden inflammatorische Stimuli eliminiert, danach proinflammatorische Mediatoren entfernt und antiinflammatorische Mediatoren wie IL-4, IL-13 und vor allem auch IL-10 gefördert (Buckley et al., 2013). Zuvor eingewanderte neutrophile Granulozyten gehen in Apoptose und werden durch Makrophagen phagozytiert. Durch den Einfluss antiinflammatorischer Zytokine polarisieren Makrophagen nun zum protektiven M2 Subtypen, welche ihrerseits wiederum antiinflammatorische und gewebereparierende Eigenschaften aufweisen, was zu einer Einleitung des Heilungsprozesses des geschädigten Gewebes führt (Martinez and Gordon, 2014). Nach der Resolution der akuten Inflammation kommt es nach aktuellen Erkenntnissen jedoch nicht zu einer Terminierung der lokalen Immunantwort, sondern vielmehr zu einer Art „post-Resolutions-Phase“ um eine angepasste immunologische Homöostase aufrecht zu erhalten (Newson et al., 2014). Diese beeinflusst das angeborene Immunsystem innerhalb des geschädigten Gewebes durch Veränderung der chemischen und funktionalen Aspekte der betroffenen Zellen.

In Abgrenzung zur akuten Inflammation kommt es bei einer chronischen Entzündungsreaktion nicht zur Herstellung einer Homöostase, sondern zu einer dauerhaften Produktion von proinflammatorischen Mediatoren bei insgesamt gestörter Resolutionsphase. Die chronische Inflammation ist dabei geprägt von gleichzeitigem Vorliegen akuter Inflammation, Fibrose und Reparationsvorgängen. (Maruyama et al., 2020).

Die Knochenheilung ist ein komplizierter, regenerativer Prozess, welcher in primärer oder sekundärer Form ablaufen kann. Dabei stellt die sekundäre Knochenheilung die weitaus häufigste Form der Heilung dar (Marsell and Einhorn, 2011) und läuft in drei sich teilweise überschneidenden Phasen ab. Dazu zählen die inflammatorische, die Reparations- und die Remodeling-Phase. Ein gutes Ergebnis der Knochenheilung wird dabei maßgeblich von der inflammatorischen ersten Phase bestimmt (Maruyama et al., 2020). Diese beginnt kurz nach

dem eigentlichen Trauma, welches zu Gefäßrupturen und damit zu einem den Frakturspalt umgebenden Hämatom führt. In diesem Hämatom besteht zunächst lokale Hypoxie, Azidität und geringere Temperatur als im umliegenden Gewebe. Das Hämatom wirkt dabei wie eine Art Gerüst für die folgende Rekrutierung von proinflammatorischen Zellen und Mediatoren, um die inflammatorische Kaskade zu starten. Zusätzlich werden spezielle knochenständige Makrophagen, die Osteomacs aktiviert (Batoon et al., 2017). Diese initiieren nicht nur die inflammatorische Kaskade, sondern stellen ebenfalls die Moleküle bereit, die zu Beginn der weiteren Knochenheilung stehen. Der Prozess mündet in der Formung eines Granulationsgewebes, welches als Vorlage für die folgende Kallusbildung während der Reparationsphase dient. Die akute inflammatorische Antwort findet ca. 24-48h nach Trauma ihren Höhepunkt und verschwindet nach ca. 7 Tagen (Maruyama et al., 2020, Loi et al., 2016).

In der Reparationsphase kommt es zu einer weiteren Ausbildung eines zunächst weichen, später harten Kallus. Durch enchondrale Ossifikation mittels Osteoblasten, welche im Verlauf aktiviert werden und Knorpelmaterial nach und nach in Knochenmatrix umwandeln, schreitet der Heilungsprozess voran (Kenkre and Bassett, 2018). Beim Remodeling wird schließlich ein Gleichgewicht zwischen Osteoklasten und Osteoblasten erreicht und der Knochen in Struktur und Form wiederhergestellt. Dass zuvor die Resolution des initialen Entzündungsprozesses stattgefunden hat, ist dabei von besonderer Bedeutung, da proinflammatorische Mediatoren wie TNF- $\alpha$  Osteoblastenaktivität inhibiert. Gleichsam ist die Ausprägung der initialen Entzündungsreaktion ebenfalls wegweisend für eine gute Knochenheilung. Inhibition der Inflammation durch NSAIDs, Steroide oder Chemotherapeutika ist als Faktor der gestörten Knochenheilung ebenfalls bekannt (Copuroglu et al., 2013).



**Abbildung 1:** Schematische Zusammenfassung der Stadien der Knochenheilung und das damit einhergehende Muster an Immunzellen und Mediatoren. Knochenheilung findet in drei Stadien statt (Entzündung, Reparatur, Remodeling). Nach Fraktur kommt es zu einer Einwanderung und Aktivierung von Zellen wie neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und einer damit verbundenen Ausschüttung von Zytokinen und anderen Mediatoren, welche ihrerseits Makrophagen aktivieren. Diese spielen als M1 bzw. M2 Subtyp eine wichtige Rolle während der Entzündungsreaktion und der Resolution der Inflammation. Die proinflammatorischen Zytokine sind notwendige Signale während der frühen Stadien der Knochenfraktur. TNF $\alpha$  wird erneut in der späten Reparaturphase ausgeschüttet. Der Wandel von proinflammatorischem zu antiinflammatorischem Mediatorenprofil wie IL4, IL10, IL13 als Einleitung der Resolutionsphase der Entzündung ist als wichtiger Schritt der Knochenheilung anzusehen (aus (Maruyama et al., 2020)).

## 2.2. Immunsystem

Das Abwehrsystem des Menschen kann vereinfacht gesehen werden als Zusammenstellung von anatomischen und physiologischen Barrieren sowie dem Immunsystem. Dieses wird dabei traditionell in zwei Arten aufgeteilt: das angeborene, unspezifische Immunsystem, sowie das erworbene, adaptive Immunsystem (Janeway and Medzhitov, 2002).

Das adaptive Immunsystem besteht dabei aus T- und B-Zellen, wobei jeder Lymphozyt einen spezifischen und strukturell einzigartigen Rezeptor präsentieren kann. Dieser Prozess generiert eine Vielzahl an Antigenrezeptoren, welche die Wahrscheinlichkeit erhöhen ein passendes Antigen aufzuspüren und zu eliminieren. Die klonale Vermehrung nach initialer Bindung eines Antigens an einem passenden Rezeptor ist hocheffektiv, jedoch auch zeitaufwändig und benötigt 3-5 Tage in seiner Umsetzung. Dieses Zeitfenster würde einem Pathogen zunächst die Möglichkeit geben im betreffenden Gewebe Schaden anrichten zu können. Das angeborene Immunsystem überbrückt diese Zeit und stellt dabei die erste Linie der körpereigenen Abwehr dar. Die Bestandteile der angeborenen Immunantwort, bestehend aus Phagozyten, Makrophagen, antimikrobiellen Peptiden, als auch dem Komplementsystem, zielen auf bestimmte mikrobielle Komponente, welche in möglichen Pathogenen vorkommen und generieren innerhalb weniger Minuten nach Exposition auf diese Gefahrenstoffe eine entzündliche Antwort. Diese Gefahrensignale kommen in einer breiten Variabilität. Dabei kann unterschieden werden in pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) oder in endogene, Schaden assoziierte molekulare Muster (DAMPs) (Masters and De Nardo, 2014, Zindel and Kubes, 2020).

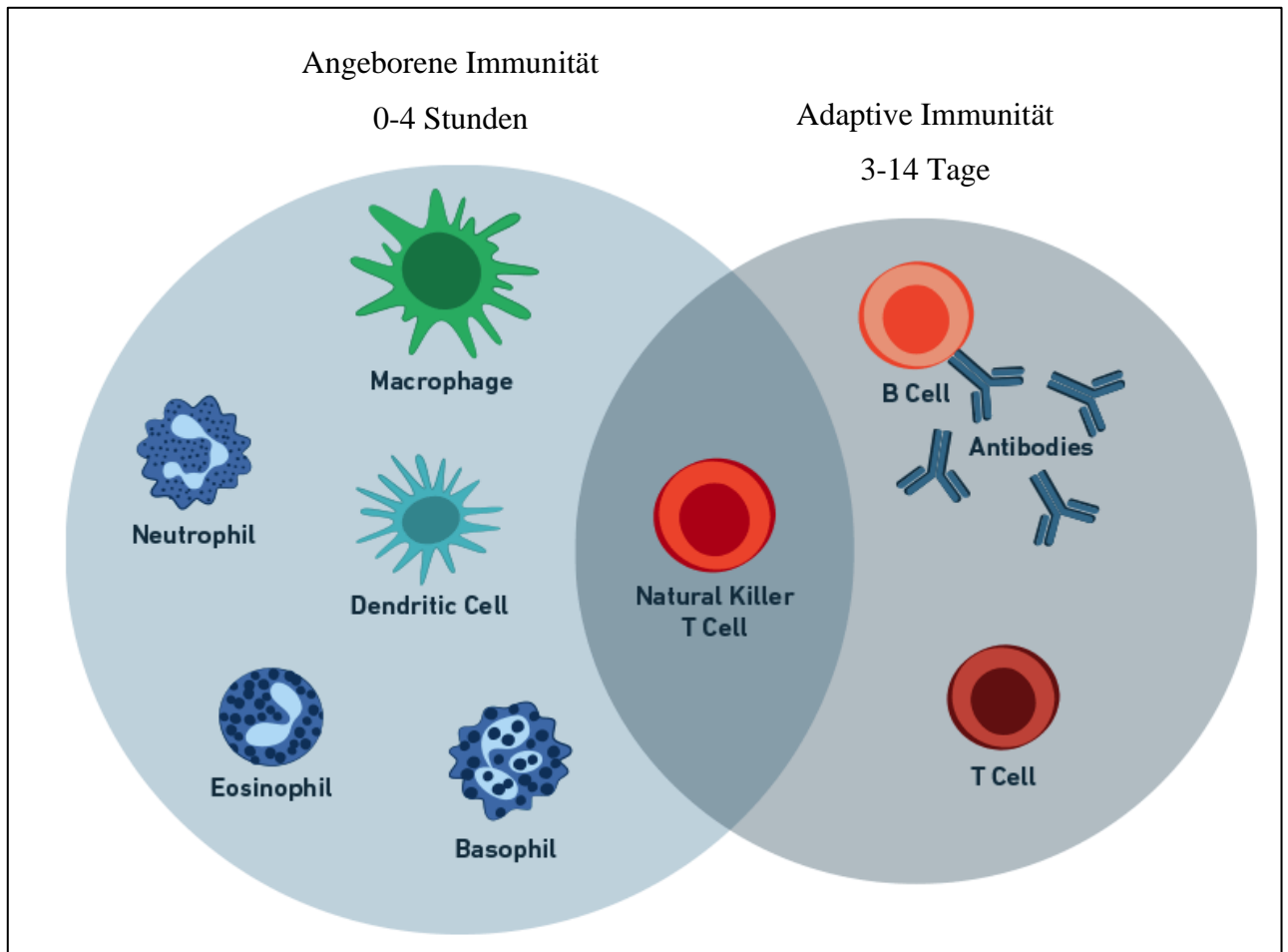
Das angeborene Immunsystem hat dabei die Fähigkeit diese Gefahrensignale mittels Pattern Recognition Rezeptoren (PRRs) schnell zu erkennen. Die Gene, welche diese PRRs kodieren, werden dabei von den Eltern auf ihre Kinder übertragen (Travis, 2009). Phylogenetische Untersuchungen legen außerdem nahe, dass die Gene für PRRs und andere Komponente des angeborenen Immunsystems über die Zeit von Generation zu Generation durch natürliche Selektion angepasst wurde. Eine Vielzahl an spezialisierten Rezeptoren wie Toll-Like- Rezeptoren (TLRs) oder Nod-Like-Rezeptoren (NLRs) und einige weitere stellen dabei eine Form der Abwehr dar. Nach der Aktivierung formen einige dieser Rezeptoren große Proteinkomplexe, die sogenannten Inflammosome, welche als effektiver Teil der angeborenen Immunantwort zu einer Aktivierung weiterer Entzündungskaskaden überleiten (Guo et al., 2015). Die Lokalisation der PRRs spiegelt die bestimmten Liganden wider, welche durch die Rezeptoren aufgespürt werden sollen. TLRs finden sich daher vermehrt an der Zelloberfläche, wo sie vor allem Komponente von Bakterien binden

(Brubaker et al., 2015). Zytosolische PRRs erkennen in Kontrast dazu vor allem körpereigene Gefahrensignale, welche direkt im Zytosol vorliegen oder solche die dem lysosomalen Abbau entfliehen können. Zusammengenommen ermöglicht dieses System eine breit aufgestellte Abwehr gegen eine Vielzahl von möglichen Gefahren.

Generell führt die Aktivierung dieser unterschiedlichen Rezeptoren über spezielle Signalübertragungen und proteolytischen Verläufen zum gleichen Endpunkt: der Produktion von proinflammatorischen Mediatoren, welche ihrerseits weitere Immunzellen rekrutieren.

Dabei sind die aktivierten Signalwege nicht nur entscheidend für die Beseitigung der einfallenden Pathogenen oder Mikroorganismen, sondern auch für die Aktivierung des adaptiven Immunsystems mit folgender Antigenaktivierung und Bildung eines immunologischen Gedächtnisses (Masters and De Nardo, 2014).

Denn im Kontrast zum angeborenen Immunsystem erwirbt jeder T- und B-Lymphozyt während seiner Entwicklung einen strukturell einzigartigen Rezeptor. Dies bringt ein enormes Repertoire an Zellen mit jeweils individuellen Rezeptoren hervor. Wenn nun Lymphozyten aus diesem Repertoire ihrem fremden Antigen ausgesetzt werden, führt dies zur klonalen Vermehrung eben jener Zellen, welche nun alle gegen dieses bestimmte Antigen gerichtet sind. Mit der Vervielfältigung der Kopien nimmt die Affinität der Bindung für das spezielle Antigen zu und führt so zu einer Selektion der hilfreichsten Rezeptoren, was eine stetige Verbesserung der Fähigkeiten des Systems bedingt. Anders als beim angeborenen Immunsystem kann diese erlernte Immunantwort nicht an Nachkommen weitergegeben werden (McComb et al., 2019).



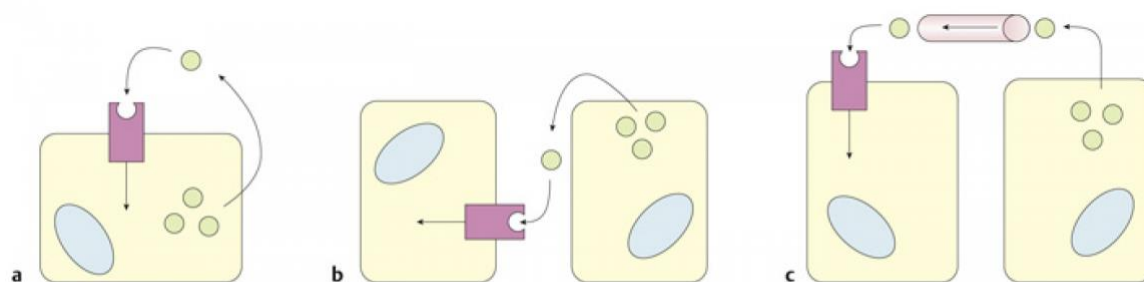
**Abbildung 2:** Übersicht über an der angeborenen, bzw. adaptiven Immunität beteiligten Zellen (modifiziert nach (April Lowell, 2022)).

### 2.3. Das Zytokinsystem und Interleukin-10

Die Freisetzung von Zytokinen bewirkt als Antwort auf eine Verletzung eine Kaskade von verschiedenen Ereignissen. Zytokine sind kleine, intrazelluläre Polypeptide mit einer Größe von 5-140 kD (Clark et al., 2013), welche von Zellen sezerniert werden um das eigene Verhalten, oder das anderer Zellen zu beeinflussen (Parkin and Cohen, 2001).

Zytokine senden intrazelluläre Signale, indem sie an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche binden. Auch wenn es sich bei den meisten Zytokinen um lösliche Moleküle handelt, kommen manch andere auch in membrangebundener Form vor. Dies erschwert teilweise die Differenzierung von Zytokin und Rezeptoren (Fajgenbaum and June, 2020).

Zytokine werden dabei von nahezu allen Zellen produziert und haben eine große Bandbreite an potenziellen Funktionen (siehe Tabelle 1). Der biologische Effekt hängt dabei vom Zytokin und dessen Effektorzelle ab, umfasst jedoch typischerweise Zellaktivierung, Teilung, Apoptose oder Migration bzw. Zellbewegung. Dabei wirken sie als autokrine, parakrine oder endokrine Botenstoffe.



 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart · New York · 2011  
G. Spinas, S. Fischli: Endokrinologie und Stoffwechsel kompakt · 2. Auflage

**Abbildung 3:** Unterschiedliche Wege der Signalübertragung. a) autokrine Signalübertragung: die sezernierende Zelle wirkt mit den Produkten auf sich selbst ein. b) parakrine Signalübertragung: die Produkte wirken auf benachbarte Zellen ein. c) endokrine Signalübertragung: Sekretionsmodus, bei dem Produkte zunächst an die Blutbahn abgegeben werden und daher auch auf entfernte Zellen wirken können.

Zytokine, welche von Leukozyten produziert werden und v.a. auf andere weiße Zellen wirken werden Interleukine genannt. Zytokine die chemotaktische Wirkungen haben werden als Chemokine bezeichnet. Die, welche Differenzierung und Proliferation von Stammzellen beeinflussen, heißen Kolonie-stimulierende-Faktoren (colony-stimulating-factors, CSFs)



(Parkin and Cohen, 2001). Zytokine, welche die virale Replikation beeinträchtigen werden als Interferone bezeichnet.

Eine der genannten Subgruppen stellen die Interleukine dar. Diese werden anhand ihrer biologischen Funktion und Wirkungsweisen auf andere Zellen in proinflammatorisch und antiinflammatorisch eingeteilt. Diese Einteilung trifft jedoch nur teilweise zu, da je nach wirkendem Rezeptor, Zielzelle oder Konzentration auch Doppelwirkungen möglich sein können (Üçeyler and Sommer, 2008). Interleukine wirken dabei sowohl autokrin als auch parakrin, das heißt auf die produzierende Zelle selbst und auch auf die benachbarten Zellen, welche durch die ausgeschüttete Substanz, über meist membrangebundene Rezeptoren, stimuliert oder gehemmt werden können. Proinflammatorische Zytokine induzieren dabei meist über eine positive Rückkopplungsschleife ihre eigene Produktion sowie weiterer proinflammatorischer Substanzen. Dazu werden über direkte Aktivierung und Sensibilisierung von Nozizeptoren und weiteren indirekten Effekten, wie der Bildung und Ausschüttung von Neuropeptiden sowie Prostaglandinen maßgeblich entzündliche Reaktionen getriggert. Um eine überschießende Reaktion und somit die Schädigung von intaktem Gewebe zu vermeiden, kommt es gleichzeitig zu einer Sezernierung von antiinflammatorischen Interleukinen, um die ausgelösten inflammatorischen Prozesse zu beschränken und eine Resolution der Entzündungsreaktion einzuleiten. Dieses Gleichgewicht aus proinflammatorischen und antiinflammatorischen Prozessen macht eine zielgerichtete Antwort auf Reize, Schädigungen und Infektionen erst möglich und stellt daher eine wichtige Grundvoraussetzung der körpereigenen Abwehr dar.

<b>Immunmodulatorische Mediatoren</b>	<b>Produzierende Zellen/Herkunft</b>	<b>Wirkung</b>
<b>Zytokine</b>		
<b>IL-1</b>	Monozyten / Makrophagen u.a.	Fieber, Aktivierung T-Zellen, Makrophagenaktivierung
<b>IL-2</b>	T-Zellen	Wachstum von T-Zellen
<b>IL-4</b>	T-Zellen, Mastzellen	Aktivierung von B-Zellen, Wachstum von T-Zellen
<b>IL-5</b>	T-Zellen, Mastzellen	Wachstum und Differenzierung der eosinophilen Zellen
<b>IL-6</b>	Monozyten / Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, Produktion von Eiweißen der akuten Phase, Fieber
<b>IL-10</b>	Monozyten / Makrophagen, T-Zellen	Entzündungshemmend, Anregung von B-Zellen
<b>IL-12</b>	Monozyten / Makrophagen, B-Zellen	Aktivierung von NK-Zellen, Differenzierung von CD4-T- Zellen zu T <sub>H</sub> 1-Zellen
<b>IL-13</b>	T-Zellen	Wachstum von B-Zellen, Hemmung der T <sub>H</sub> 1-Zellen und der Produktion entzündungsfördernder Zytokine durch Makrophagen
<b>IL-15</b>	T-Zellen, Monozyten/Makrophagen	TNF-alpha Freisetzung aus synovialen Makrophagen, induziert Mitogenese, and inhibiert Apoptose

<b>IL-17</b>	T-Zellen, innate lymphoide Zellen	Aktiviert Neutrophile und eine Vielzahl von Stromazellen zur Regulierung von Abwehrfunktionen
<b>IL-23</b>	Dendritische Zellen, Monozyten/Makrophagen	Fördert T-Zell Differenzierung
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Monozyten / Makrophagen, T-Zellen, NK-Zellen	Lokale Entzündung, Endothelaktivierung
<b>IFN (Interferon)-<math>\gamma</math></b>	T-Zellen, NK-Zellen	Aktivierung von Makrophagen, Zunahme von MHC-Molekülen, Abtötung von TH 2-Zellen
<b>Kolonie-stimulierende Faktoren</b>		
<b>GM-CSF (Granulozyten / Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)</b>	Monozyten / Makrophagen, T-Zellen	Erhöhte Bildung von Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen
<b>G-CSF (Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor)</b>	Monozyten/Makrophagen	Granulozyten Differenzierung und Aktivierung
<b>M-CSF (Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor)</b>	Monozyten / Makrophagen	Stärkeres Wachstum und Differenzierung der myeloiden Vorläuferzellen
<b>Wachstumsfaktoren</b>		
<b>TGF-<math>\beta</math> (Transformierender Wachstumsfaktor-<math>\beta</math>)</b>	Monozyten, T-Zellen	Gehemmtes Zellwachstum von B-Zellen, entzündungshemmend
<b>FGF, VEGF</b>	Viele Zellen	Fibroblastenproliferation und Angiogenese
<b>PDGF (platelet-derived growth factor)</b>	Viele Zellen	Fibroblastenproliferation
<b>Chemokine</b>		

<b>C-X-C Familie</b>	Viele Zellen	Aktiviert Neutrophile, wirkt chemotaktisch auf Neutrophile und T-Zellen
<b>C-C Familie</b>	Viele Zellen	Chemotaktisch auf Monozyten und T-Zellen

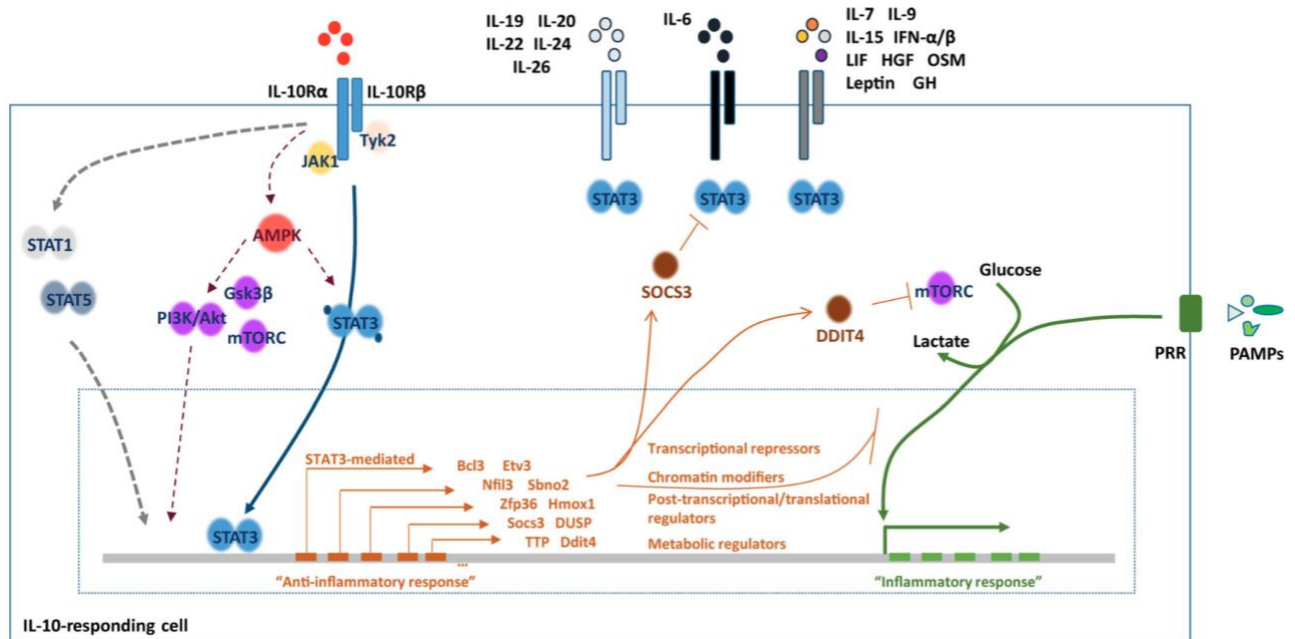
**Tabelle 1:** Beitrag von wichtigen Zytokinen, Chemokinen, Kolonie-stimulierenden Faktoren und Wachstumsfaktoren auf immunologische Antworten (modifiziert nach (uptodate.com, 2023))

### 2.3.1 Interleukin-10

Die IL-10 Familie inkludiert einige weitere Zytokine. IL-10, 19, 20, 22, 24, und 26 sind dabei alle als Klasse von  $2\alpha$ -Helices Zytokinen anzusehen. Der IL-10 Familie zugehörige Zytokine binden dabei an heterodimere Rezeptoren, welche viele unterschiedliche Kombinationen durch den Aufbau ihrer gemeinsamen Untereinheiten ermöglichen: IL20R $\alpha$  (IL-19, 20, 24, 26 bindend), IL20R $\beta$  (IL-20 und 24 bindend), IL10R $\beta$  (IL-10, 22, 26, 28, 29 bindend), IL22R $\alpha$  (genutzt durch IL-22 und 24) sowie IL10R $\alpha$ , welcher alleinig durch IL-10 genutzt wird (Ouyang and O'Garra, 2019). Durch die geteilte Nutzung verschiedener Rezeptoreinheiten durch unterschiedliche Zytokine der IL-10 Familie, sind die genauen Funktionen durch Rezeptor Knockout Mäuse nicht eindeutig differenzierbar (Wei et al., 2019). IL-10 und IL-22 werden maßgeblich von T- und B-Zellen, natürlichen Killerzellen (NKs), Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen produziert (Ouyang and O'Garra, 2019). Die Verteilung der Liganden und Rezeptoren der Interleukin-10 Familie unterscheidet sich je nach untersuchtem Gewebe. IL10R $\alpha$  findet sich vor allem auf Immunzellen, wohingegen IL20R $\alpha$  und IL22R $\alpha$  eher auf epithelialen Zellen anzutreffen sind. Dies zeigt die große Rolle der IL-20 Unterfamilie an der Regulation von Entzündungsreaktionen und Regeneration des Gewebes (Wei et al., 2019).

IL-10 spielt eine kritische Rolle bei der Rückbildung von peripheren Entzündungsreaktionen. Dazu wird es von einer Vielzahl leukozytischer Zellen gebildet, u.a. von Monozyten und Granulozyten sowie weiteren Nicht-Immunzellen, wie z.B. epithelialen Zellen und Keratinozyten (Mosser and Zhang, 2008). Dabei liegt die Kernaufgabe von IL-10 in der Limitierung von Entzündungsprozessen. Die lokalen Effekte werden dabei über

zwei unterschiedliche Rezeptoren ausgeführt. IL-10R1 findet sich dabei v.a. auf hämatopoetischen Zellen, IL-10R2 wird hingegen auf allen Zellen exprimiert. Beide Domänen wirken über einen JAK/STAT Pathway. IL-10 wirkt sich ebenfalls auf das Wachstum und Differenzierung von B-Zellen, NK-Zellen, T-Helferzellen, regulatorischen T-Zellen, Mastzellen, Granulozyten, dendritischen Zellen, Keratinozyten und epithelialen Zellen aus. Die Fähigkeit von IL-10 regulatorisch auf proinflammatorische TH1-Antworten einzugreifen, ist dabei in der weiterführenden Literatur gut beschrieben (Mosser and Zhang, 2008). IL-10 beeinflusst immunsuppressive Wirkungen über eine Erniedrigung von proinflammatorischen Mediatoren und induziert außerdem die Expression von bestimmten miRNAs, welche ihrerseits zu einer Abnahme von über Toll-like-Rezeptor Signalen gesteuerten inflammatorischen Antworten führt. Außerdem wird über IL-10 Aktivität die Stabilität von mRNA codierend für proinflammatorisch wirkende Substanzen negativ beeinflusst und so deren Expression gehemmt (Curtale et al., 2013, Wilbers et al., 2017). Somit hat IL-10 über eine Vernetzung von unterschiedlichen, an der Immunreaktion beteiligten Prozessen, eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Homöostase. Es kann als das wichtigste antiinflammatorische Zytokin und somit als Schlüssel zur Prävention von entzündlichen Gewebsschäden angesehen werden. Bei akuten Infektionen steigt die IL-10 Serumkonzentration zu Beginn an und bleibt über mehrere Wochen erhöht. Es kommt über die Zeit gesehen, unabhängig von der Krankheitsaktivität, zu einem Gleichgewicht der antiinflammatorisch wirkenden Substanzen mit proinflammatorischen Mediatoren (Mingomataj and Bakiri, 2016). IL-10 oder IL-10R defiziente Mäusen entwickeln schwere Magen-Darm-Infektionen (Kühn et al., 1993), weshalb IL-10 als essenzielles, immunregulierendes Zytokin des Magen-Darm-Traktes gesehen werden kann.



**Abbildung 4:** Die nach Aktivierung des IL-10R nachgeschaltete, antiinflammatorische Kaskade. Die Bindung von IL-10 an seinen Rezeptor aktiviert JAK1-TYK2-STAT3 Signalkaskaden, welche in der STAT3 vermittelten, antiinflammatorischen Antwort mündet. Die durch STAT3 ausgelöste transkriptionale Modifikation führt zur Produktion einiger Moleküle, welche zusammengenommen die, auf z.B. durch PAMPs und somit PRR-Aktivierung ausgelöste, inflammatorische Antwort begrenzt. IL-10 moduliert die Transkription von einigen metabolischen Regulatoren wie DDIT4. Da DDIT4 wiederum mTORC reguliert, das Einfluss auf die Signalkaskade von TLR4 nimmt, wird auf diesem Weg die inflammatorische Antwort von Makrophagen moduliert (aus (Saraiwa et al., 2020)).

## 2.4. CRPS und Schmerz

Laut aktueller Leitlinien ist das komplexe regionale Schmerzsyndrom ein posttraumatisches Schmerzsyndrom einer Extremität, deren Schmerzen im Vergleich zur Läsion unangemessen stark sind und darüber hinaus mit Störungen in Sensorik, Motorik, dem vegetativen Nervensystem sowie in der Gewebetrophik einhergeht (Birklein, 2018). Die Namensgebung orientiert sich dabei klar an den klinischen Befunden. Es handelt sich um eine „komplexe“ Erkrankung, bei der neben den Schmerzen, sowohl sensorische und motorische Einschränkungen als auch sudomotorische und andere vegetative Störungen im Vordergrund stehen. Dabei tritt diese komplexe Schmerzsymptomatik „regional“ auf, sprich an einer Extremität nach direktem Trauma, jedoch *per definitionem* außerhalb der Traumastelle. Schmerz generell wird von der International Association of Pain (IASP) als „eine sensorisch und emotional unangenehme Erfahrung“ beschrieben, welche „mit tatsächlichem oder potenziellem Gewebeschaden einhergeht.“ (IASP). Weiter heißt es, dass „ungewöhnliche, unangenehme Wahrnehmungen, (z.B. Dysästhesie) ebenfalls als Schmerz bezeichnet werden können“, auch wenn diese nicht dieselben, eingangs erwähnten, sensorischen Qualitäten bieten.

## 2.5. Klassifikation

In der Einteilung des CRPS hat sich die Unterscheidung in zwei Subtypen bewährt. Dabei handelt es sich um das komplexe regionale Schmerzsyndrom Typ I (CRPS I), welches ursprünglich als Reflexalgodystrophie (Evans, 1947) bezeichnet wurde, vorliegend bei typischer Symptomatik ohne definierbare Nervenläsion. Besteht die Symptomatik bei nachgewiesener Nervenverletzung, früher als Kausalgie bezeichnet, liegt ein CRPS II vor (Stanton-Hicks et al., 1995). Diese überarbeiteten Kategorien wurden in der Klassifikation von chronischen Schmerzsyndromen der IASP inkludiert.

Über die offizielle Klassifikation hinaus, bietet sich eine weitere mögliche Unterscheidung an. Zuerst statistisch erwiesen durch Bruhl et al. 2016, zeigten sich unter den CRPS-Patientinnen und Patienten ein warmer, sowie ein kalter CRPS Subtyp. Dabei wird der warme Subtyp durch eine warme, entzündlich imponierende Haut mit Ödem charakterisiert. Dieser Typ zeigte sich in knapp 70% der untersuchten Patientinnen und Patienten. Die restlichen knapp 30% entfallen auf den sogenannten kalten Typ. Hier steht eine kalte, livide veränderte Haut, ohne die inflammatorischen Zeichen des warmen Typs und mit geringerer Ödemneigung im Vordergrund. Die Einteilung in warmen und kalten Subtyp zeigt sich auch

bei der medianen Schmerzdauer als relevant. Patientinnen und Patienten mit warmem Subtyp sind in der Regel kürzer erkrankt als Patientinnen und Patienten mit kaltem Subtyp.

## **2.6. Epidemiologie**

Die erste populationsbasierte Studie wurde 2004 in Olmstead County, Minnesota durchgeführt (Sandroni et al., 2003). Hier fand sich eine Inzidenz von knapp 5,5 Fällen von CRPS I auf 100.000 Menschen. Dabei zeigte sich folgende Geschlechterverteilung: Frauen waren viermal häufiger betroffen als Männer, mit einem medianen Erkrankungsalter von 46 Jahren bei Auftreten. Es zeigte sich außerdem, dass die obere Extremität doppelt so häufig betroffen war als die untere Extremität.

In einer 2009 in den Niederlanden durchgeführten Studie, war die Inzidenz von 26,2 Fällen pro 100.000 Personen (de Mos et al., 2007). Hier zeigte sich ein Altersgipfel von 61-70 Jahren, mit einem mittleren Erkrankungsalter von 52,7 Jahren. Frakturen zeigten sich hier in 44% der Fälle als auslösender Faktor. Es kann angenommen werden, dass die gesteigerte Inzidenz im höheren Alter unter anderem auch auf das gesteigerte Auftreten von Knochenbrüchen zurückzuführen ist.

Eine aktuellere koreanische Studie aus dem Jahr 2019 fand ähnliche Ergebnisse. Jo et al. finden ebenfalls ein gesteigertes Risiko für Frauen, mit einer erhöhten Inzidenz von 5:1. Ebenfalls beschreiben die Autoren gewisse Altersgruppen, in welchen es zu einer erhöhten Inzidenz von Fällen von CRPS I kommt. Besonders interessant ist dabei die Tatsache, dass es sich dabei nicht um eine lineare Steigerung mit zunehmendem Alter handelt, jedoch vielmehr um einen Peak in der Altersgruppe zwischen 50 und 60 Jahren (Jo et al., 2019). Aufgrund der epidemiologischen Verteilung der Inzidenzen, vermuten Jo et al. hier einen Zusammenhang mit der hormonellen Veränderung während der Menopause. Ein zugrundeliegender Mechanismus ist dabei jedoch weiterhin nicht bekannt.

In der zahlreich vorhandenen Literatur werden weitere Risikofaktoren für das Auftreten eines CRPS I diskutiert. Hier finden sich unter anderem Zusammenhänge zwischen dem Vorliegen einer seropositiven rheumatoiden Arthritis (Jo et al., 2019, Goebel, 2011). Darüber hinaus scheinen das gleichzeitige Vorhandensein einer Migräne, Osteoporose, sowie die Einnahme von ACE-Hemmer Risikofaktoren darzustellen (de Mos et al., 2008, de



Mos et al., 2007, de Mos et al., 2009). Als häufigster Auslöser findet sich jedoch ein initiales Trauma der später betroffenen Extremität.

URSACHE	HÄUFIGKEIT (QUELLE)
TRAUMATA (MEIST FRAKTUREN)	<b>65% (Veldman et al., 1993)</b>
FRAKTUREN	<b>44,1% (de Mos et al., 2007)</b> <b>46% (Sandroni et al., 2003)</b> <b>43% (Rothkirch et al., 1989)</b>
DISTORSIONEN	<b>17,6% (de Mos et al., 2007)</b> <b>12% (Sandroni et al., 2003)</b> <b>16,3% (Rothkirch et al., 1989)</b>
OPERATIONEN	<b>12,2% (de Mos et al., 2007)</b> <b>19% (Veldman et al., 1993)</b> <b>28% (Rothkirch et al., 1989)</b>

**Tabelle 1:** Ursachen des CRPS und ihre Häufigkeitsverteilung in unterschiedlichen Studien

Eine prospektive Kohortenstudie, durchgeführt von Moseley et al., hat verstärkten Schmerz nach einer konservativ behandelten Radiusfraktur als „red flag“ identifiziert. Wird der ständige Schmerz auf der VAS als über 5/10 angegeben, ist die Entwicklung eines CRPS wahrscheinlicher (Moseley et al., 2014). Diese Ergebnisse konnten bei Patientinnen und Patienten mit distaler Radiusfraktur einige Jahre später durch Roh et al. bestätigt werden. Darüber hinaus deuteten stärkere Schmerzen zu Beginn auch auf einen prolongierten Krankheitsverlauf hin (Roh et al., 2019).

## 2.7. Ätiologie

Als einer der auslösenden Faktoren ist besonders die distale Radiusfraktur hervorzuheben. Dieser Sachverhalt wird in verschiedenen Publikationen immer wieder als der am häufigsten CRPS auslösende Faktor benannt (de Mos et al., 2007). Einen Überblick über die auslösenden Faktoren und deren Häufigkeitsverteilung in ausgewählter Literatur bietet die oben dargestellte Tabelle 1.

Weniger klare Auslöser des CRPS sind unter anderem Verletzungen von Sehnen (de Mos et al., 2007), Kontusionen (Sandroni et al., 2003), Entzündungen und Zustände nach Paravasation von Infusionen (Veldman, 1995). Vereinzelt stehen auch virale Infektionen mit HZV, VZV, Lyme-Borreliose sowie chemische Verbrennungen unter Verdacht ein CRPS auslösen zu können (Muneshige et al., 2003, Kumbhat et al., 2004, Sibanc and Lesnicar, 2002, Berry et al., 2004). Da sich hier jedoch nur wenige, mitunter Einzelfallberichte finden, fokussiert sich die wissenschaftliche Forschung auf die in der Tabelle 1 genannten, häufigsten auslösenden Faktoren.

In den ätiologischen Betrachtungen werden gewisse psychische Prädispositionen immer wieder angenommen und kritisch diskutiert. In einer Fall-Kontroll Studie wurde ein Zusammenhang zwischen einschneidenden sozialen Vorkommnissen, mit daraus resultierender psychischer Belastung und der Entstehung eines CRPS gefunden (Dijkstra et al., 2003, Geertzen et al., 1998). In einer weiteren Studie zeigten unter 145 Patientinnen und Patienten 42,1% ein unmittelbar mit dem Beginn des CRPS zusammenfallendes, Stress auslösendes Lebensereignis (Birklein et al., 2000).

Auch die positive Familienanamnese und damit verbundene genetische Disposition für die Entwicklung eines CRPS wurde von verschiedenen Autoren beschrieben. Die Inzidenz für ein familiäres Auftreten von CRPS liegt bei de Rooij bei 16%, in der Studie von Shirani bei 6% (Shirani et al., 2010, de Rooij et al., 2009).

Bezüglich der genetischen Disposition zeigte eine klein angelegte Studie von 1994 erste Hinweise auf das Vorhandensein einer Assoziation mit einer bestimmten HLA-Antigentypisierung (Mailis and Wade, 1994). Weitere, etwas größer angelegte Studien kamen zu dem Ergebnis, dass es bezüglich der HLA-Antigentypisierung unter CRPS-Patientinnen und Patienten tatsächlich signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe gibt. (Kemler et al., 1999). Auch aktuelle Arbeiten zeigen eine anzunehmende, genetische Disposition und Verknüpfung von CRPS mit dem humanen Leukozytenantigen-System. Durch die Einbeziehung des HLA-Systems liegt die Annahme nahe, dass bei der Krankheitsentstehung des CRPS auch eine gestörte Regulation von Entzündungsgeschehen ursächlich sein kann (van Rooijen et al., 2012).

## 2.8. Klinik

Das klinische Bild des CRPS wird von einer Symptomtrias aus motorischen, sensiblen und autonomen Störungen geprägt. Sensorische Symptome und Schmerzen finden sich bei allen CRPS-Patientinnen und Patienten. Anhaltende Schmerzen, gar ein Dauerschmerz, werden in einer groß angelegten Studie von 145 Patienten in 77% der Fälle beschrieben (Birklein et al., 2000). Der typische Schmerz wurde dabei als tief in der distalen Extremität und von reißendem Charakter beschrieben. Unter bestimmten Umständen kam es zu einer Verstärkung der Schmerzen. Hier wurden vor allem Orthostase (Hängenlassen der Extremität) sowie Bewegung von Gelenken oder Druck als schmerzverstärkende Aspekte beschrieben. Eine Hyperalgesie wurde dabei von fast allen Patienten beklagt (94%). Ein weiterer wichtiger Punkt bei diesen von den Patienten beschriebenen Schmerzen ist die Tatsache, dass auch Bereiche der Extremität betroffen sind, welche nicht durch ein initiales Trauma verletzt wurden. Der Schmerz ist dabei nicht auf Dermatome beschränkt und steht in keinerlei Verhältnismäßigkeit zur auslösenden Ursache.

Die Budapest Kriterien, welche im Kapitel Diagnostik weiter beschrieben werden, zählen u.a. Störungen der Sensibilität wie Allodynie oder Hyperästhesie als Diagnosekriterien auf. Diese Sensibilitätsstörungen finden sich ebenfalls bei nahezu allen an CRPS-Erkrankten (94%) (Rommel et al., 2005). Bei der Allodynie handelt es sich um das Phänomen, dass Berührungen, welche normalerweise keine Schmerzen auslösen, nun plötzlich als schmerzhaft wahrgenommen werden. Dabei kann mittels funktioneller Bildgebung die Aktivierung eines komplexen kortikalen Netzwerks, nicht nur unter Einschluss des motorischen Systems, sondern ebenfalls des limbischen, kognitiven Systems beobachtet werden (Maihofner et al., 2006). Birklein et al. finden eine Berührungsalldynie nach Bestreichen mit einem Wattestäbchen in 30% der untersuchten Fälle, andere Untersuchungen zeigen diese Symptomatik in 50-80% aller Patienten (Baron et al., 2003, Birklein et al., 2000, Rommel et al., 2005). Die teils hohen Schwankungen dieser Zahlen scheinen durch die unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkte zustande zu kommen. Bei unbehandelten Patientinnen und Patienten in frühen Phasen der Erkrankung finden sich bei 20% eine Allodynie, wohingegen in späteren Krankheitsphasen dieses Symptom häufiger beschrieben wird. Auch die Schmerzintensität scheint mit der Dauer der Erkrankung zuzunehmen (Schwartzman et al., 2009b)

Motorische Einschränkungen finden sich je nach Studie und Betrachtungsweise in unterschiedlicher Ausprägung. Veldman beschreibt eine allgemeine muskuläre Schwäche in 95% der Patientinnen und Patienten. Rommel hingegen beschreibt eine Bewegungseinschränkung in knapp der Hälfte der Untersuchten (45%). Ebenfalls zeigte sich das Vorhandensein eines Tremors bei 50% der Patientinnen und Patienten (Rommel et al., 2005, Veldman, 1995, Veldman et al., 1993). Auch wenn die Häufigkeit teilweise unterschiedlich ausfällt, herrscht Einigkeit über die allgemeinen motorischen Symptome des CRPS. Bei CRPS-Patientinnen und Patienten treten die bereits beschriebene muskuläre Schwäche, Tremor, Dystonien, Bradykinese oder auch Myoklonien auf. Patientinnen und Patienten mit CRPS und gleichzeitigem Auftreten von Dystonien sind bei Erkrankungsbeginn im Durchschnitt jünger als diese ohne Dystonien. Daher lag die Annahme nahe, dass eine genetische Komponente hier eine Rolle spielen könnten, wofür van Rooijen et al. in einer klinischen Studie mit 131 Patienten Anhaltspunkte finden konnte (van Rooijen et al., 2012).

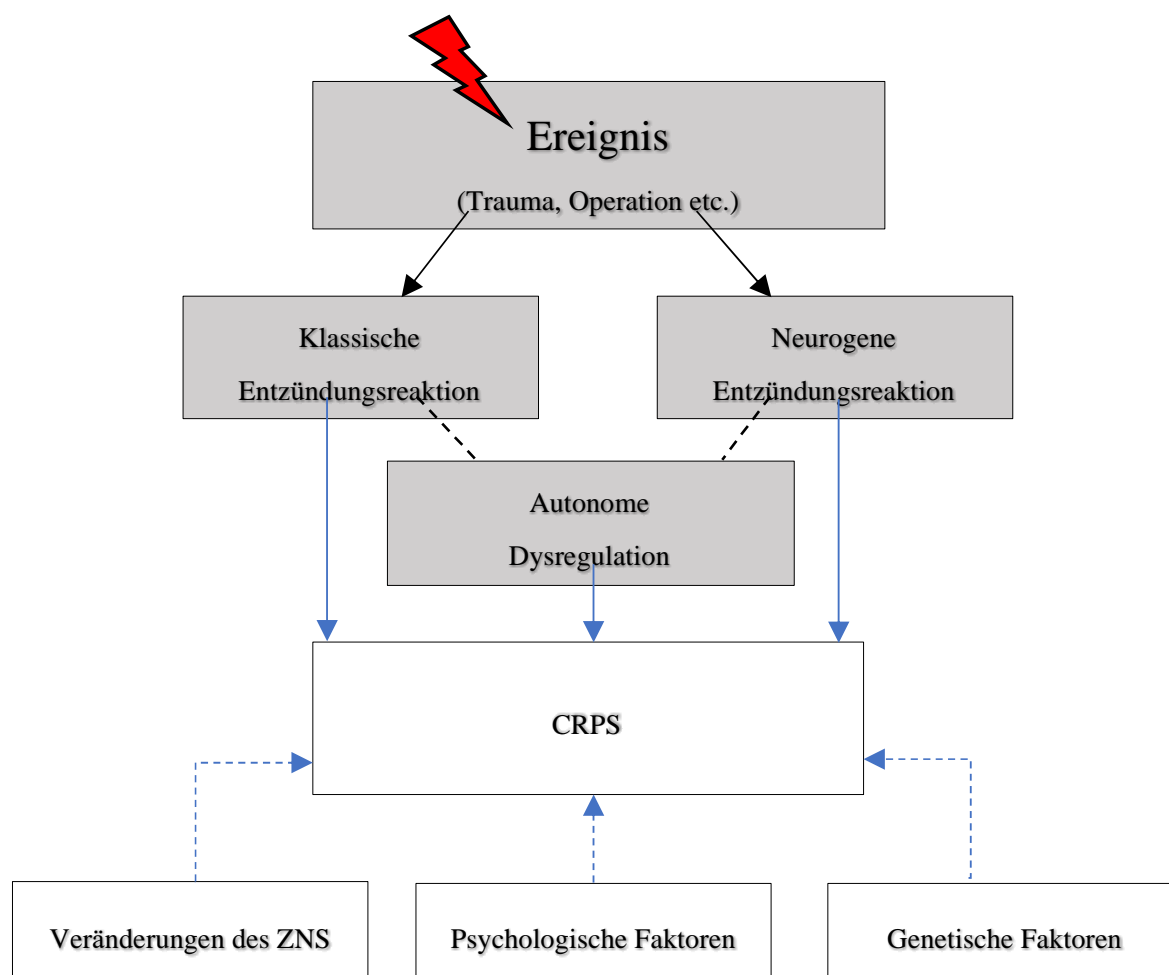
Bei Personen mit motorischen Beeinträchtigungen oder mit Allodynie zeigte sich die psychische Belastung durch die Erkrankung stärker als bei anderen Patientinnen und Patienten ohne diese Symptome (Rommel et al., 2005).

Ein meist distal gelegenes Ödem findet sich in ca. 80% aller Fälle. Diese Ausprägung kann sehr eindruckliche Formen annehmen und stark beeinträchtigend wirken. Zu starke krankentherapeutische Maßnahmen, Bewegungen oder Orthostasebelastungen können das Ödem und die damit verbunden Schmerzen verstärken. (Veldman et al., 1993, Birklein et al., 2000). Mit der Dauer der Erkrankung kann sich das Ödem zurückbilden, ohne dass sich die Schmerzsymptomatik signifikant verändert. Häufig bestehen jedoch auch Jahre nach der Erstdiagnose noch Probleme mit umschriebenen ödematösen Schwellungen. Über eine erhöhte Schweißsekretion und damit eine gestörte Sudomotorik beklagen sich knapp 30% der Patientinnen und Patienten (Schwartzman et al., 2009b).

Häufig auftretende Störungen der Trophik sind ebenfalls ein eindruckliches klinisches Symptom des CRPS. Hierunter fallen Veränderungen an Nägeln, Haut und Haaren der betroffenen Extremität in ca. 30-40% der Fälle. Es kann zu Hypertrichose, Hyperkeratinose und später auch Atrophien der Haut kommen, welche durch eine schmerzassoziierte Schonhaltung mit Muskulaturverkümmung erklärt werden kann (Maihofner and Birklein, 2007).

## 2.9. Pathophysiologie

Aktuell werden verschiedene pathophysiologische Prozesse diskutiert, welche nach heutigem Wissensstand ineinander übergreifen und die Entstehung sowie die Unterhaltung des Krankheitsbildes CRPS multifaktoriell bedingen.



**Abbildung 1:** Mögliche pathophysiologische Entstehungsmechanismen des CRPS sowie unterhaltende Faktoren (modifiziert nach Misidou (Misidou and Papagoras, 2019))

### 2.9.1 Überschießende posttraumatische Entzündungsreaktion

Das CRPS ist charakterisiert durch das Auftreten von Schmerzen, in Kombination mit autonomen, sensorischen, trophischen und motorischen Störungen (Janig and Baron, 2003). Die klassische Entzündungsreaktion kann dabei als initiale, akute Phase des CRPS und überschießende Reaktion auf die vorliegende Gewebsschädigung gesehen werden. Die klinischen Zeichen dieser Akutphase decken sich dabei mit den Kardinalsymptomen einer allgemeinen Entzündungsreaktion. Es kommt zur Ausbildung einer ödematösen Schwellung, erhöhter Temperatur des betroffenen Hautareals, Erythem, Schmerzen sowie

Funktionseinschränkungen. Die Gewebsschädigung verursacht eine anhaltende Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 und bewirkt damit die zuvor genannten lokalen Veränderungen (Goh et al., 2017, Misidou and Papagoras, 2019, Birklein and Schmelz, 2008, Cheng and Ji, 2008, Uceyler et al., 2007).

In zahlreichen Untersuchungen zur Pathophysiologie des CRPS ergeben sich, sowohl in human-, als auch tierexperimentellen Studien, Hinweise auf die Beteiligung unterschiedlicher pro- und antiinflammatorischer Zytokine als Auslöser und Mediatoren der beim CRPS gefunden Symptome und Schmerzen (Schinkel et al., 2009, Baronio et al., 2020, Alexander et al., 2012). Proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-2, Interleukin-1beta, Interleukin-6) zeigen eine erhöhte Konzentration beim Vorliegen eines CRPS (Schlereth et al., 2014, Alexander et al., 2012, Alexander et al., 2005), wohingegen sich die Konzentration von antiinflammatorischen Zytokinen reduziert (Uceyler et al., 2007). Auch in den betroffenen Hautarealen bzw. Blasenflüssigkeit der betroffenen Regionen zeigen sich erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen (Birklein et al., 2014, Parkitny et al., 2013). Die lokalen Veränderungen scheinen sich jedoch nach einigen Monaten denen der gesunden Kontrollgruppen anzupassen. Dabei sinken zunächst erhöht gemessene Konzentration von proinflammatorischen Zytokinen nach ca. sechs Monaten wieder auf normale Spiegel ab (Lenz et al., 2013). Diese Ergebnisse legen ebenfalls das Vorliegen einer akuten sowie einer persistierenden, chronischen Phase der Erkrankung nahe. In Gruppen, in welchen ein erhöhter Serumspiegel von TNF- $\alpha$  nachgewiesen wurde, zeigten sich ebenfalls erhöhtes Auftreten mechanischer Hyperalgesie (Maihofner et al., 2005) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es ist anzunehmen, dass eine normale Entzündungsreaktion sowie die initiale Phase des CRPS ähnliche molekulare Mechanismen aufweisen und dass die posttraumatische Reaktion, folgend auf die durchgeführte Fraktur und die Immobilisierung die initiale Veränderung darstellt, welche in der vollständigen Ausprägung des CRPS münden kann. Zusammengenommen lässt sich aus der Aufzählung der an der Ausprägung des CRPS beteiligten Mediatoren ableiten, dass es durch die initiale Entzündungsreaktion zu einer dauerhaften Veränderung und Sensibilisierung von primär afferenten Neuronen mit nachfolgender zentraler Sensibilisierung in schmerzleitenden Bahnen kommen kann.

Die überschießende Immunreaktion und die damit einhergehenden entzündlichen Veränderungen führen bei der TFM-Maus zur hinlänglich beschriebenen Symptomatik wie

u.a. Hyperalgesie (Guo et al., 2012). Vermittelt wird diese Reaktion dabei vermutlich durch eine Sensibilisierung von primär afferenten Nozizeptoren, wie in anderen Schmerzmodellen beschrieben (Leung and Cahill, 2010) oder nachgeschalteten afferenten Neuronen auf Rückenmarksebene (Shi et al., 2015). Die neuronalen Mechanismen, welche der Hyperalgesie bei frakturierten Mäusen zugrunde liegen, sind damit noch nicht hinreichend erforscht und bieten somit einen Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen.

Die zuvor genannten pro-inflammatorischen Mediatoren führen nicht nur zu einer lokalen Entzündungsreaktion, sondern steigern auch die Erregbarkeit und Sensitivität von Nozizeptoren durch erhöhte Aktivität von Ionenkanälen, die zuständig für die Entstehung von pronozizeptiven Potentialen sind (Cheng and Ji, 2008). Daher ist es auch nicht verwunderlich, dass neurogene Entzündungsreaktionen ebenfalls eine große Rolle bei der akuten Ausprägung des CRPS spielen. Durch die Aktivierung von nozizeptiven C-Fasern kommt es zu einer Ausschüttung von weiteren neurogenen Mediatoren wie Substanz P, Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP) sowie Neurokinin-A und anderen (Littlejohn, 2015). Dies führt, durch das Vorhandensein der jeweiligen Rezeptoren im umliegenden Immunzellen, Mikroglia und Astrozyten, zu einer Vielzahl von molekularen Prozessen. Hierunter auch zu einer gesteigerten Produktion von Prostaglandinen, Leukotrienen oder Stickoxiden, welche ihrerseits dann durch verstärkte Vasodilatation und erhöhte vaskuläre Permeabilität zu den typischen klinischen Zeichen der Entzündungsreaktion führen. Darüber hinaus führt Substanz P ebenfalls zu einer Aktivierung von Mastzellen, welche ihrerseits weitere pro-inflammatorische Stoffe wie TNF- $\alpha$ , Histamin oder Serotonin ausschütten und so den initialen Entzündungsprozess aufrechterhalten, sowie die Reizschwelle von A $\delta$ -Schmerzfasern absenken (Li et al., 2012, Littlejohn, 2015, Bussa et al., 2017).

Auch finden sich bei CRPS-Patientinnen und Patienten sudomotorische Störungen. Da das thermoregulatorische Schwitzen des Menschen durch cholinerge sympathische Nervenfasern gesteuert wird, können Hyper- bzw. Hypohidrose unter anderem durch eine erhöhte, bzw. erniedrigte Aktivität von Sudomotorneuronen und damit des sympathischen Systems entstehen (Janig and Baron, 2003, Guhl et al., 2019). Bei posttraumatischer Entzündungsreaktion vermehrt ausgeschüttetes Substanz P reduziert cholinerges Schwitzen (Kumazawa et al., 1994). So lässt sich die bei Mäusen gefundene Hypohidrose direkt nach Frakturdurchführung physiologisch erklären. Gesteigerte Schweißproduktion könnte im Verlauf in Maus und Mensch ein Indikator für das Auftreten eines CRPS sein, bei welcher

auch erhöhte Level des stark vasodilatativ wirkenden CGRP ursächlich zu sein scheinen (Schlereth et al., 2006).

### **2.9.2 Beteiligung des zentralen Nervensystems**

Verschiedene Faktoren legen eine Beteiligung des sympathischen Nervensystems bei der Entstehung und Unterhaltung eines CRPS nahe. Darunter befinden sich Veränderungen der Temperatur der betroffenen Extremität, Hyperhidrose bzw. Hypohidrose sowie Veränderung der Hautfarbe. Diese vasomotorischen und sudomotorischen Veränderungen können nicht durch Mechanismen der Denervierung erklärt werden, da es bei CRPS I keine sichtbare Nervenläsion gibt. Bei gesunden Menschen führen thermoregulatorische Reflexe zu seitengleicher Abnahme bzw. Zunahme der akralen Temperatur. Bei CRPS-Patientinnen und -Patienten sind diese Thermoregulationsprozesse gestört, was zu einer veränderten Temperatur der betroffenen Extremität führt (Wasner et al., 2001). Da diese thermoregulatorischen Prozesse, wie Anpassung der Hauttemperatur, durch vasokonstriktive Fasern gesteuert wird, liegt die Annahme einer Sympathikusbeteiligung bei der Ausprägung des Krankheitsbildes nahe.

Darüber hinaus wurden bei CRPS-Patientinnen und -Patienten generalisierte Veränderungen sympathischer Funktionen beobachtet, welche ein Ungleichgewicht des gesamten sympathischen Systems nahelegen. Als Ausdruck von Stress finden sich erhöhte Herzfrequenzen sowie eine geringere Herzratenvariabilität, welche ihrerseits Prädiktoren für eine erhöhte Mortalität und plötzlichen Herztod darstellen (Terkelsen et al., 2012).

Torebjörk et al zeigten bereits 1995, dass sympathische Strukturen an der Erhaltung von Schmerzen beteiligt sein können. Durch Stellatumblockade gebesserter Spontanschmerz bei CRPS Patientinnen und Patienten konnte durch Injektion von Noradrenalin in die betroffene Extremität erneut hervorgerufen werden (Torebjork et al., 1995). Bei Noradrenalinjektion in die Extremität der nicht betroffenen Seite konnte dagegen kein Schmerz ausgelöst werden. Aktuelle Studien machen klar, dass die beschriebene autonome Dysregulation zurückgeht auf eine gesteigerte Expression von  $\alpha$ -1 adrenergen Rezeptoren auf Nozizeptoren und Keratinozyten (Knudsen et al., 2019). In der akuten Phase zeigt sich die Konzentration von Noradrenalin erniedrigt, woraufhin die beschriebene gesteigerte Expression von peripheren  $\alpha$ -1 adrenergen Rezeptoren stattfindet und es durch Vasodilatation der CRPS betroffenen Extremität zu Überwärmung und Rötung kommt. Durch die prolongierte



Entzündungsreaktion unter Ausschüttung inflammatorischer Mediatoren kommt es, ähnlich der chronischen Phase des CRPS, zu einer massiv gesteigerten Ausschüttung von Noradrenalin, was zu einer verminderten Expression von  $\alpha$ -1 adrenergen Rezeptoren und schließlich zu einer kalten, blauen Extremität führt.

### 2.9.3. Zentrale Reorganisation

Einige Studien implizieren eine veränderte zentralnervöse Signalverarbeitung. Motorische Störungen wurden dabei durch Birklein et al. zusammengefasst. Es fanden sich neben den bereits erwähnten Symptomen wie Hyperalgesie und Ruheschmerz auch motorische Befunde, wie übersteigerte Reflexantworten, Dystonie, Tremor und Myoklonien (Birklein et al., 2000). Naheliegender scheinen daher Veränderungen des primären Motorcortex, der supplementär-motorischen Rinde sowie des posterioren Parietalcortex. Maihofner et al. zeigten 2007 eine signifikante Reorganisation von motorischen Bahnen bei CRPS-Patientinnen und -Patienten, indem sie diese gegen eine gesunde Kontrollgruppe im fMRT bestimmte Bewegungen ausführen ließen (Maihofner et al., 2007). Trotz dieser eindrücklichen Befunde resümiert eine Metaanalyse aus dem Jahr 2013, dass es zu keinerlei signifikanten Veränderungen der Abbildung von betroffenen Extremitäten im motorischen Kortex kommt (Di Pietro et al., 2013).

Schmerzspezifische Ängste und schmerzvermeidendes Verhalten können bei Vorliegen eines CRPS dessen Chronifizierung fördern können. Ein schmerzassoziertes Vermeidungsverhalten kann, durch die Minimierung der Bewegung der betroffenen Extremität, zu einer Beschleunigung des Funktionsverlustes führen (Bean et al., 2015).



Abbildung 2: An möglicher Chronifizierung eines CRPS partizipierende, psychologische Mechanismen. Modifiziert nach Dimova, 2019 (Dimova and Birklein, 2019).

## 2.10. Diagnostik

Die Diagnosestellung des CRPS erfolgt klinisch. Für die Diagnose CRPS müssen dabei nach den durch Harden (Harden et al., 2007) festgelegten «Budapest-Kriterien», welche durch die International Association of Pain (IASP) anerkannt sind, folgende Charakteristika erfüllt werden:

1. Anhaltender Schmerz, der durch das Anfangstrauma nicht mehr erklärt wird.
2. Der Patient muss mindestens über ein Symptom aus drei der folgenden vier Kategorien **berichten**:
  - Sensibilität: Berichtet von Hyperästhesie und/oder Allodynie
  - Vasomotorik: Berichtet von Temperaturseitendifferenz und/oder Veränderungen bzw. Seitendifferenz der Hautfarbe
  - Ödem/Sudomotorik: Berichtet über Ödem und/oder Veränderung bzw. Seitendifferenz der Schweißsekretion
  - Motorik/Trophik: Berichtet von Bewegungseinschränkungen und/oder motorische Störungen (Schwäche, Dystonie, Tremor) und/oder trophische Störungen der Haut bzw. Hautanhangsgebilde (Haare, Nägel)
3. **Zum Zeitpunkt der Untersuchung** muss mindestens ein klinisches Zeichen in zwei oder mehr Kategorien **vorliegen**:
  - Sensibilität: Hyperalgesie (auf Nadelstich) und/oder Allodynie (auf leichte Berührung und/oder Temperatur, Druck, Bewegungen des Gelenks)
  - Vasomotorik: Vorliegen von Temperaturseitendifferenz ( $<1^{\circ}\text{C}$ ) und/oder Veränderung bzw. Seitendifferenz der Hautfarbe
  - Ödem/Sudomotorik: Vorliegen eines Ödems und/oder Veränderung bzw. Seitendifferenz der Schweißsekretion
  - Motorik/Trophik: Vorliegen einer Bewegungseinschränkung und/oder motorischer Störung (Schwäche, Dystonie, Tremor) und/oder trophische Störungen (Haut, Nägel, Haare)
4. Es gibt keine andere Diagnose, welche den Schmerz und die vorliegende Symptomatik erklären kann.

Ein durch die Budapest-Kriterien nicht berücksichtigter Aspekt ist die Tatsache, dass das CRPS normalerweise nur die distalen Extremitäten betrifft.

Auch wenn aus den Diagnosekriterien nicht unbedingt hervorgehend sollte die Hauttemperatur mittels geeigneter Messinstrumente erfasst werden. Da die Hauttemperatur

häufig starke Schwankungen aufweist, kann es hilfreich sein, diese zu verschiedenen Zeitpunkten oder in einer Langzeitmessung zu testen.

Punkt 4 hat in der Diagnosefindung ganz besondere Bedeutung, da viele weitere Erkrankungen, die eine andere Therapie benötigen, ebenfalls eine sehr ähnliche Symptomatik hervorrufen können. Besonders hervorzuheben sind hierbei rheumatische Erkrankungen, unterschiedliche Entzündungen (wie unter anderem Polyradikulitiden, Polyneuritiden, postoperative Infektionen), Thrombosen, Embolien sowie Kompartmentsyndrome oder Nervenkompressionssyndrome.

Zur Beurteilung der Schwere eines CRPS eignet sich der Impairment Level SumScore (ISS), welcher in fünf Kategorien jeweils 1 bis 10 Punkte vergibt. Der Score wurde 1998 durch Oerlemans et al. entwickelt und beinhaltet die Visual Analog Scale (VAS), den McGill Pain Index, Temperatur Unterschiede von betroffener und nicht-betroffener Extremität, Ödemmessung mittels Volumeter sowie Beeinträchtigung der aktiven Bewegungsgrade (active range of motion = AROM) (Oerlemans et al., 1998). Auch wenn der ISS gute Ergebnisse bei der Messung der Evaluation der Maßnahmen erreicht, werden Symptome, die durch die 2007 festgelegt Budapest-Kriterien bei der Diagnosefindung erfüllt sein müssen, nicht berücksichtigt. Daher lag eine Überarbeitung des ISS, mit dem Ziel, diesen durch die in den Budapest Kriterien festgelegten Symptome zu erweitern und so einen kontinuierlichen Score zu erhalten, nahe. Basierend auf einer multizentrischen, internationalen Studie konnte so 2010 der CRPS Severity Score (CSS) entwickelt werden (Harden et al., 2010). Eine Skala, die sowohl eine hohe Übereinstimmung mit den Symptomen der Patientinnen und Patienten zeigt als auch die Budapest Kriterien einschließt. Der CSS dient als Überwachung der Krankheitsprognose sowie als Maß für die Therapieergebnisse bzw. als Verlaufsdokumentation (Stanton-Hicks, 2019).

Symptome (durch Patienten beschrieben)	Zeichen (bei Untersuchung erhoben)
Kontinuierlicher, disproportionaler Schmerz	Hyperalgesie (auf Pinprick)
Allodynie/Hyperalgesie	Allodynie
Asymmetrie der Hauttemperatur	Asymmetrie der Hauttemperatur
Unterschiede in Hautkolorit	Unterschiede in Hautkolorit
Schweißasymmetrie	Schweißasymmetrie
Einseitiges Ödem	Einseitiges Ödem
Veränderung der Trophik	Veränderung der Trophik
Beeinträchtigung der Motorik (ROM)	Beeinträchtigung der Motorik (ROM)

**Tabelle 2: CRPS Severity Score (CSS)**

Je länger ein CRPS besteht, desto schwieriger kann eine Unterscheidung zwischen krankheitsbedingten Symptomen und Veränderungen durch chronischen Nicht- oder Mindergebrauch erfolgen. Daher empfiehlt sich eine regelmäßige Bilddokumentation zur besseren Abgrenzbarkeit der Veränderungen in allen Stadien der Erkrankung.

Es gibt weitere Untersuchungsmöglichkeiten, welche die Diagnose CRPS wahrscheinlicher machen können:

- Durch einen Neglect-Fragebogen, der Aufmerksamkeitsphänomene mittels sechs von den Patienten zu beantwortenden Fragen untersucht, kann die Diagnose CRPS bestätigt werden. Bei einem Score von fünf oder mehr, beträgt die Spezifität für die Diagnose 90,6%, bei niedriger Sensitivität von knapp 20%. Bei einfacher und schneller Durchführbarkeit empfiehlt sich die Erhebung des Scores. Bei einer Punktzahl von fünf oder höher sieht der Untersucher die Diagnose CRPS bestätigt, wohingegen eine geringere Punktzahl nicht zur Diagnosefindung dienen sollte (Frettlow et al., 2006).

Darüber hinaus besteht die Möglichkeit apparativer Diagnostik, welche jedoch übergeordnet zur weiteren Bestätigung der klinisch gestellten Diagnose benutzt werden sollte.

- Die Auswertung eines 3-Phasen-Knochenszintigramms mit Technetium-99m-Diphosphonat hat eine geringe Sensitivität (30-50%), jedoch eine hohe Spezifität von 83-100% (Wuppenhorst et al., 2010, Nitzsche, 2011) und kann daher nur zur Bestätigung in Betracht gezogen werden.

- Eine Langzeitmessung der Hauttemperaturunterschiede im Seitenvergleich zwischen betroffener und nicht-betroffener Extremität kann ebenfalls die Diagnose CRPS unterstützen. Da die Hauttemperatur bei Untersuchung häufig nur einfach erhoben wird, können Unterschiede, die sich erst über einen längeren Zeitraum durch Oszillationen zeigen, durch kontinuierliche Langzeitmessung besser erfasst werden (Krumova et al., 2008).
- Seitenvergleichende Röntgenuntersuchungen der Handgelenke können acht Wochen nach der auslösenden Ursache mit einer Sensitivität von 33% und einer Spezifität von 91% durch ein „CRPS typisches Muster, welches diffus fleckige Entkalkungen mit bleistiftartiger Zeichnung der gelenknahen Knorpel“ darstellt, bestätigt werden (Gradl et al., 2003). Als Diagnosestellung oder gar Frühdiagnostik ist die Bildgebung der klinischen Diagnosestellung unterlegen.

### 2.11. Differentialdiagnostik

Gerade zu Beginn der Erkrankung kann das CRPS nur schwer von anderen entzündlichen, posttraumatischen Schmerzzuständen zu unterscheiden sein. Folgende Tabelle soll dabei einen Eindruck vermitteln, welche vielfältigen, differentialdiagnostischen Überlegungen bei der klinischen Erfassung der Symptome berücksichtigt werden sollten. Dabei besteht kein Anspruch auf Vollständigkeit.

<b>Differentialdiagnostik des CRPS</b>	
<b>Postoperativ, posttraumatische Zustände</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• (Protrahierte) postoperative, posttraumatische Verläufe</li> </ul>
<b>Neuropathische Schmerzzustände</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• postherpetische Neuropathie</li> <li>• periphere Polyneuropathien</li> <li>• Nervenkompressionssyndrome</li> <li>• Radikulopathien</li> <li>• Plexuspathologien</li> </ul>
<b>Ossäre Ursachen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ossäre Stressreaktion</li> <li>• Osteoporose</li> <li>• Osteonekrosen</li> <li>• Osteosarkome</li> <li>• Frakturen</li> <li>• Ermüdungsfrakturen</li> <li>• Osteomyelitis</li> </ul>
<b>Vaskuläre Ursachen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• chronisch venöse Insuffizienz</li> </ul>

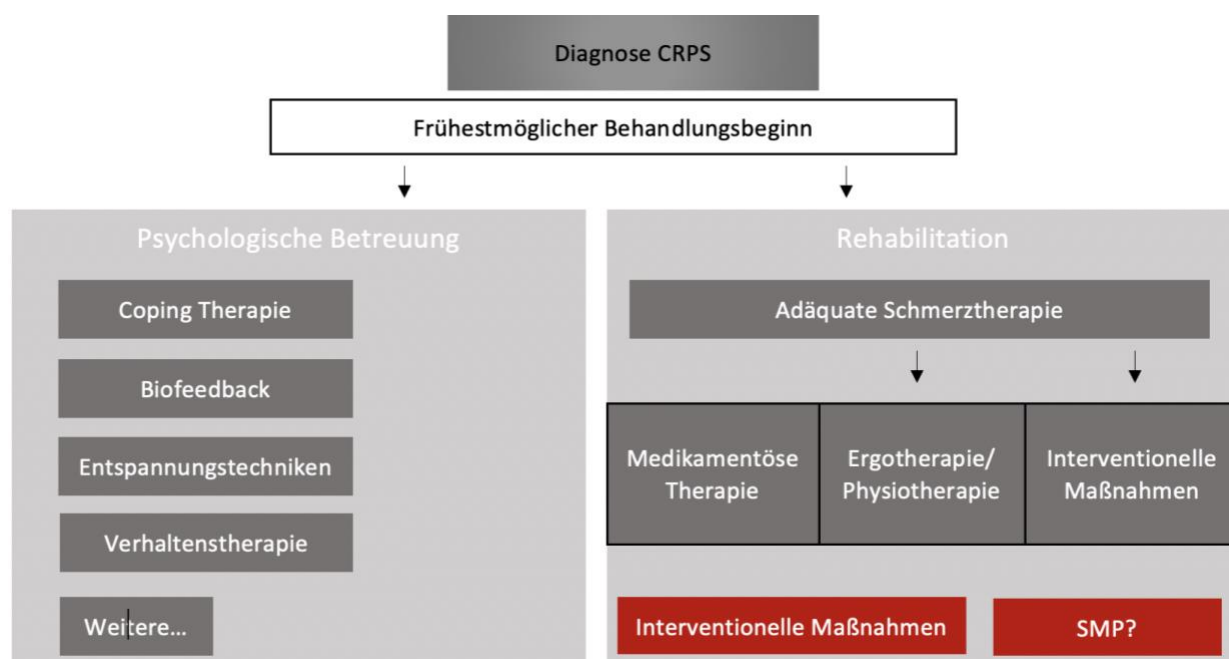
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Thrombophlebitis</li> <li>• Atherosklerose</li> <li>• Lymphödem</li> <li>• Akrozyanose</li> <li>• Raynaud-Syndrom</li> </ul>
<b>Infektionen, entzündliche Erkrankungen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bursitis</li> <li>• Tendinitis</li> <li>• Septische Arthritis</li> <li>• Erysipel</li> <li>• entzündlich rheumatische Erkrankungen (Gichtanfälle)</li> </ul>
<b>Dermatologische Ursachen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Erythema migrans</li> <li>• Borreliose</li> <li>• Acrodermatitis chronica atrophicans</li> <li>• irritative/allergische Kontaktdermatitis</li> <li>• Sklerodermie</li> <li>• Eosinophile Fasziitis (Shulman-Syndrom)</li> </ul>
<b>Rheumatische Ursachen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Überbelastung, Fehlbelastung</li> <li>• Fibromyalgie</li> <li>• Tendinosen</li> <li>• Myofasiales Syndrom</li> <li>• Bursopathie</li> </ul>
<b>Psychiatrische Ursachen</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• somatoforme Störungen</li> <li>• artifizielle Störungen</li> </ul>

**Tabelle 3:** Differentialdiagnostische Überlegungen bei der Diagnosestellung eines CRPS, modifiziert nach (Brunner, 2017). Ergänzt durch (Büchner, 2010, Birklein, 2018).

## 2.12. Therapie

Bei der Therapie des CRPS gilt es unterschiedlichste, interdisziplinäre Therapieansätze miteinander zu kombinieren. Die multimodale Therapie umfasst dabei pharmakologische, psychologische und physikalische Ansätze sowie interventionelle Maßnahmen. Eine 2018 erschienene S1-Leitlinie stellt die unterschiedlichen Behandlungsmöglichkeiten vor (Birklein, 2018), auf welche im Folgenden näher eingegangen werden soll.

Aufgrund der vielschichtigen Pathophysiologie der Erkrankung ist eine „One fits all“ Behandlung nicht möglich bzw. nicht zielführend (Birklein and Schlereth, 2013). Grundsätzlich sollte der Therapiebeginn so schnell wie möglich nach Diagnosefindung eingeleitet werden, um eine Chronifizierung zu verhindern.



**Abbildung 3:** Möglicher Algorithmus zur Therapie des CRPS (modifiziert nach (Baron et al., 2003)).

### Pharmakotherapie

Eine bedarfsgerecht dosierte Analgesie ist wichtig, um Schmerzreduktion zu erreichen und darf als Voraussetzung gesehen werden eine adäquate Mitarbeit der Patientinnen und Patienten bei den anderen Komponenten der Therapie sicherzustellen. Eine alleinige Schmerztherapie ohne gleichzeitige funktionserhaltende, rehabilitative Maßnahmen ist nicht zielführend (Harden et al., 2006). Die Einstellung mit rein analgetischen Medikamenten

sollte dabei nach WHO-Standard durchgeführt und leitliniengerecht durch Koanalgetika erweitert werden. Bezüglich der Therapie von Allodynie und Hyperalgesie, sprich neuropathischen Schmerzen, hat sich der Einsatz von Amytriptillin, Gabapentin oder Pregabalin bewährt (Baron et al., 2003, van de Vusse et al., 2004, Brown et al., 2016). Bezüglich der Schmerzreduktion bei CRPS gibt es nur für Gabapentin eine randomisierte, kontrollierte Therapiestudie (RCT), die einen gering positiven Effekt nachweisen konnte. Die Wirkung von Gabapentin wird vermittelt durch Hemmung von regulatorischen  $\alpha_2\text{-}\delta$ -Untereinheiten spannungsabhängiger Kalziumkanäle präsynaptischer Neurone. Für Ketamin und andere NMDA-Rezeptor-Antagonisten kann trotz in den Leitlinien erwähntem Vorbehalt, eine Anwendung aufgrund zweier positiver RCTs (Sigtermans et al., 2009, Schwartzman et al., 2009a) empfohlen werden.

Ein weiterer Teil der pharmakologischen Therapie ist der Einsatz von Bisphosphonaten. Diese hemmen die Osteoklastenaktivität und wirken so einer Destruktion von Knochen entgegen. Darüber hinaus wirken Bisphosphonate langfristig entzündungshemmend und modulieren spinale Mikroglia (Manicourt et al., 2004).

Kortikoide zeigen als entzündungshemmende Substanzen eine gute Wirksamkeit gegen Entzündungssymptome wie Ödemen und damit verbundenen Funktionsbeeinträchtigungen bei CRPS (Kingery, 1997, Christensen et al., 1982). Initial 100 mg oral, alle vier Tage um 25 mg reduziert (Birklein, 2018).

Weiter können bestimmte Radikalfänger wie N-Acetylcystein (NAC) systemisch gegeben oder auf topische medikamentöse Therapie mit Dimethylsulfoxid (DMSO) zurückgegriffen werden (Birklein, 2018).

### **Rehabilitative Therapie**

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Behandlung stellen die rehabilitativen Therapien dar, welche in unterschiedlichen Studien Wirksamkeit zeigen (Singh et al., 2004, Duong et al., 2018). Dazu gehören die Physiotherapie, Ergotherapie sowie weitere experimentelle, an diese Therapieformen angelehnte Ansätze, wie Spiegeltherapie, Pain Exposure Therapy (PEPT) oder Graded Exposure Training (GEXP).



Die Physiotherapie stellt dabei den klassisch passiven Aspekt der rehabilitativen Therapie dar. Sie ist bei der Therapie des CRPS ein wichtiger Pfeiler (Rho et al., 2002). Eingeschränkte Bewegungen sollen durch die Physiotherapie wieder erlernt und Muskulatur gefordert werden. Wenn eine Verletzung zu Schmerzen führt, geht häufig eine Schonhaltung zur Vermeidung dieser mit einher. Durch gelernten Nichtgebrauch kann es zu einer längerfristigen Bewegungseinschränkung kommen und damit die Funktionsbeeinträchtigung paradoxerweise weiter verstärkt werden (Taub et al., 2006, Barnhoorn et al., 2015).

Die Ergotherapie ist, wie die Physiotherapie, ein unerlässliches Mittel in der Therapie des CRPS. Hier sollen, durch aktive Mitarbeit, ebenfalls schmerzvermeidende Schonhaltungen übergangen werden, um die Patientinnen und Patienten schrittweise wieder an einen normalen Bewegungsablauf zu gewöhnen, Sensibilitätseinschränkungen aufzuheben und ggf. vorhandenen Ödeme zu reduzieren (Oerlemans et al., 2000).

### **Psychotherapie**

Die psychologische Betreuung der Patientinnen und Patienten ist ein wichtiger Aspekt in der Therapie des CRPS, insbesondere, wenn psychische Komorbiditäten erkennbar sind oder sich Symptome, während der zuvor genannten Bausteine der Therapie, nicht bessern. Die Erfassung und Behandlung von psychologischen Komorbiditäten ist unerlässlich, da durch begleitende Krankheiten, wie Depressionen mit Antriebsminderung oder Angstzustände sowie fehlende Motivation, die Durchführung von Ergo- oder Physiotherapie behindern kann.

### **Interventionelle Therapie**

Es werden Sympathikusblockaden, rückenmarksnahe Elektrostimulation, elektrische Stimulation von Spinalganglien, repetitive transkranielle Magnetstimulation (rTMS) des Motorcortex oder auch Plasmaphoresen, sowie intrathekale Applikation von Wirkstoffen diskutiert. Die klinischen Studien und die daraus resultierende Datenlage bezüglich dieser Thematik weisen insgesamt schlechte Qualität auf, weshalb für diese Methoden zumeist keine eindeutige Empfehlung ausgesprochen werden kann.

### 2.13. CRPS am Tiermodell

In den vergangenen Jahren wurden verschiedene Modelle genutzt, welche dem Phänotyp der Erkrankung gerecht werden sollten. Eines dieser Modelle stellt das Chronic Post-ischemia Pain (CPIP) Modell dar. Dabei wird eine Art starrer Gummiring über den distalen Knöchel geschoben, wodurch es zu einer Perfusionseinschränkung der Extremität kommt. Auf diese Ischämie entstehen in der Reperfusionsphase CRPS-ähnliche Auffälligkeiten. Es kommt dabei zu der Entwicklung eines Ödems sowie zu einer Überwärmung der Extremität für einige Stunden. Allodynie und Hyperalgesie sind noch bis zu 4 Wochen später nachweisbar (Coderre et al., 2004). Ebenfalls lassen sich, zumindest zu Beginn der Reperfusionsphase, eine Erhöhung der Zytokinlevel feststellen, welche jedoch nach Tagen oder wenigen Wochen wieder abnimmt. Es wird diskutiert, ob dieses CRPS-Modell am ehesten auf den Subtyp des kalten CRPS angewendet werden kann, da es dessen Pathophysiologie mit mikrovaskulärer Vasokonstriktion ähnelt (Birklein et al., 2018).

Andere Modelle werden nur selten genutzt, da sie weitere Unterschiede in der Ausprägung im Vergleich zu unter CRPS-Patientinnen und Patienten zeigen. Darunter bekannt sind das Needle-stick Nerve Injury (NNI) Modell, bei welchem der N. ischiadicus oder N. tibialis operativ offengelegt und mit einer Nadel punktiert werden (Klein et al., 2012). Dabei kommt es zu der Entstehung einer Hyperalgesie, was nach der direkten Verletzung des Nervens nicht verwundert. Darüber hinaus halten sich die Ähnlichkeiten zur Symptomatik des CRPS jedoch in Grenzen – eine Entzündungsreaktion ist, wenn überhaupt, nur minimal ausgeprägt.

Das für diese Arbeit genutzte Tibia Fraktur Modell (TFM) stellt das Modell dar, welches der Entstehung des CRPS beim Menschen am meisten ähnelt. Das TFM wurde durch die Arbeitsgruppe Kingery und Clark beschrieben und weiterentwickelt. In den ersten Versuchen wurde der N. ischiadicus durchtrennt, was Schwellung und Hyperalgesie auslöste und eher dem CRPS-Typ II näherkommt. Da beim „klassischen“ CRPS-Typ I keine Nervenschädigung vorliegt, wurde das Modell dementsprechend angepasst. Von einer Durchtrennung des Nervs wurde abgesehen und stattdessen eine Fraktur der Tibia durchgeführt. Gleichsam wie in unserem Versuchsaufbau wurde nach der geschlossenen Fraktur der rechten Tibia in Inhalationsanästhesie, die Extremität durch das Anlegen eines Gipses für 4 Wochen immobilisiert (Guo et al., 2004).

Wie vorangegangen beschrieben, wurde das TFM zunächst an Ratten getestet, ist jedoch mittlerweile, wie in unserem Aufbau geschehen, auch seit 2012 bei der Anwendung auf

Mäuse etabliert (Guo et al., 2012). Hier wurden die Mäuse über einen längeren Zeitraum an verschiedenen Zeitpunkten (3,5,7 Wochen) auf Belastungsunterschiede, Allodynie, Temperaturunterschiede und Ausprägung eines Ödems untersucht. Vasomotorische Zeichen bildeten sich dabei schneller zurück als Allodynie und Belastungsunterschiede der Hinterpfoten (Gallagher et al., 2013).

Generell bleibt die Methodik bei Übertragung auf die Maus gleich, bis auf das Belassen des Gipses für lediglich drei Wochen. Auch wenn das Modell in der Durchführung komplexer ist, da die Fraktursetzung und Gipsanlage einiges an Übung bedarf, spricht allein die Nachbildung der am häufigsten CRPS auslösenden Ätiologie für diese Herangehensweise. Zusammenfassend sei gesagt, dass dieses Modell, sei es nun an der Ratte oder der Maus, die posttraumatischen Entzündungsreaktionen sehr gut abbildet. Durch die Kombination von Tibiafraktur und anschließender Immobilisation für drei, respektive vier Wochen, entstehen bei den Versuchstieren eine Überwärmung der Extremität, Ödeme, Allodynie sowie verminderte Belastbarkeit. Würden diese bei der Ratte bzw. bei der Maus auftretenden Symptome anhand der CRPS-Diagnostik an Menschen geläufigen Budapest-Kriterien eingeteilt, zeigt sich eine gute Überschneidung zu der humanen Symptomatik. (Wei et al., 2016, Li et al., 2012). Trotz dieser Erläuterungen muss beachtet werden, dass es sich lediglich um ein Modell handelt, welches auch Schwächen mitbringt. So wird unter anderem die chronische Phase des CRPS nur unzureichend abgebildet (Birklein et al., 2018).

### **3. Material und Methoden**

Alle hier durchgeführten Experimente folgen den ethischen Leitlinien für experimentelle Schmerzstudien der IASP und dem deutschen Tierschutzgesetz 2006. Sie wurden von der zuständigen Ethikkommission des Landesuntersuchungsamtes Rheinland-Pfalz geprüft und bewilligt. Die Haltung der Tiere sowie deren Untersuchungen wurden dabei durch die Veterinärin der zentralen Versuchstiereinheit Mainz (TARC), in welcher sie stattfanden, überwacht.

Für die Versuchsdurchführungen wurden ausschließlich männliche C57BL/6 Mäuse verwendet. Eine Gruppe dabei im Alter von 6-12 Wochen, die andere im Alter von 6-9 Monaten frakturiert. Diese Entscheidung basiert auf einer besseren Vergleichbarkeit zu bereits bestehenden Arbeiten des Formenkreises der CPRS-Forschung. Dabei wurde jedoch nicht berücksichtigt, dass es bezüglich des Mechanismus der Entstehung des Krankheitsbildes Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren geben könnte (Cahill, 2006, Tajerian et al.). Die verwendeten C57BL/6 Mäuse stellen die am häufigsten verwendete Züchtung von Labormäusen dar. Neben unveränderten, naiven C57BL/6 Mäusen wurden außerdem Mäuse verwendet, welchen durch genetische Modifikation die Fähigkeit genommen wurde, Interleukin-10 zu produzieren (IL-10(-/-)), sogenannte Knockout Mäuse (B6.129P2-*Il10<sup>tm1Cgn</sup>/J*, Jackson Laboratory), im Folgenden nur noch als IL-10(-/-) oder IL-10 KO bezeichnet. Die Verhaltenstestungen wurden 3-6 Wochen nach Fraktur durchgeführt, die Elektrophysiologie nach 8-12 Wochen.

Die Tiere lebten in Gruppenhaltung von zwei bis vier Mäusen pro handelsüblichen Käfig aus Plastik, mit den Maßen 20 x 25 cm. Sie hatten Zugang zu Futter in pelletierter Form, ebenso zu Wasser *ad libitum*. Dabei waren sie einem 12-stündigen Hell-/Dunkelrhythmus mit einer Hellperiode von 6<sup>oo</sup>-18<sup>oo</sup> ausgesetzt. Beim Käfigestreue handelte es sich um gewöhnliche Holzhobelspäne. Die durchschnittliche Temperatur betrug 24°C bei einer Luftfeuchtigkeit von circa 40%.

Die elektrophysiologischen Bestimmungen erfolgten dabei an denselben Tieren, welche zuvor verhaltenstechnisch untersucht wurden. Diese Versuchsanordnung wurde bewusst gewählt, um die Anzahl der benötigten Tiere so klein wie möglich zu halten. Dabei stand das Wohl der Tiere und die Reduktion der Schmerzen auf ein Minimum stets im Vordergrund. Um einer unbewussten Beeinflussung der Ergebnisse vorzubeugen, wurde

eine Verblindung bei der Durchführung der Experimente der unterschiedlichen Gruppen eingesetzt. Zum Zeitpunkt der Untersuchungen war nicht klar, welche Tiere untersucht wurden und ob es sich dabei um die Versuchs- oder Kontrollgruppe handelte. Die Verblindung wurde erst nach der abschließenden elektrophysiologischen Evaluation und der Tötung der Tiere aufgehoben.

### 3.1. Technische Hilfsmittel

Von Frey Testung	<p>Von Frey Haare</p> <p>Hersteller: NorthCoast (Touch Test Sensory Evaluators) Evaluator Size 1,65-6,65 - North Coast Medical, Inc 8100 Camino Arroyo Gilroy, CA 95020</p> <p>3700-003 Base Plattform</p> <p>Hersteller: Ugo Basile mit Gitter Ugo Basile - Via Giuseppe di Vittorio 2, 21036 Gemonio, Italy</p>
Plantar Test	<p>37370-001 Plantar Test (Hargreaves Apparatus) Volt:100-240</p> <p>Hz: 50/60</p> <p>Watt: 50</p> <p>Hersteller: Ugo Basile</p> <p>3700-003 Base Plattform des Herstellers Ugo Basile mit Glasboden</p>
Unweighting	<p>Incapacitance Meter Tester for Mice, Rats and Birds</p> <p>IITC Life Science Inc.</p> <p>23924 Victory Blvd Woodland Hills, CA 91376</p>

Thermometer	<p>Greisinger GTH 175/PT-K Temperatur-Messgerät</p> <p>GHM Messtechnik GmbH Standort GREISINGER Hans-Sachs-Straße 26 93128 Regenstauf Germany</p>
Ödemtestung	<p>LIMAB Lasersensor Precicura</p> <p>LIMAB GmbH - Mittellängerstr. 28 D-82178 Puchheim</p>
Waage	<p>Sartorius Präzisionswaage ED153-CW</p> <p>Sartorius Weighing Technology GmbH Otto-Brenner-Str. 20 37079 Göttingen, Deutschland</p>
Elektrophysiologie	<p>Tungsten Mikroelektroden 2M-Ohm (FHC, Bowdoin, USA)</p> <p>Mikromanipulator (Sutter Instrument Company, Novato, USA)</p> <p>Verstärker DAM80 (WPI, Berlin, Deutschland)</p> <p>Datenerfassung CED 1401 (Cambridge, UK)</p> <p>CED Spike2 Software (Cambridge, UK)</p>

**Tabelle 4: Material und Hersteller**

### 3.2. Pharmaka

**Analgetikum:** Bei dem verwendeten Schmerzmittel handelt es sich um den Wirkstoff Buprenorphin mit dem Handelsnamen Temgesic®. Das Medikament wurde aufgrund genauerer Applikationsmöglichkeit verdünnt und subkutan injiziert. 1ml Temgesic® enthalten 0,3mg Buprenorphin. Die Konzentration pro Kilogramm Körpergewicht Maus sollte 0,05µg betragen, also 0,0015mg bei einer Maus mit einem Gewicht von 30g. Zur Herstellung der Lösung wurden also 0,1ml Temgesic® mit 10ml Natriumchloridlösung vermischt. Zur Pipettierung wurden handelsübliche Pipetten des Herstellers Accumax verwendet.

**Antibiotikum:** Für die Versuche wurde ausnahmslos Enrofloxacin der Firma Bayer, Handelsname Baytril®, verwendet. Das Medikament wurde subkutan in verdünnter Lösung injiziert. Die Konzentration pro Kilogramm Körpergewicht der Maus sollte 5µg betragen. Bei einem durchschnittlichen Gewicht von 30g, wurde pro Maus ca. 0,006ml Baytril® verabreicht, was einem Wirkstoffgehalt von 0,15mg entspricht. Um die Lösung für zehn Mäuse herzustellen, wurden 60µl Baytril® mit 940µl Natriumchloridlösung gemischt. Die Dosis dieser Lösung betrug pro Maus 1ml. Zur Pipettierung wurden handelsübliche Pipetten des Herstellers Accumax verwendet.

**Inhalationsnarkose:** Einige der Experimente, wie Frakturen, sowie die elektrophysiologische Untersuchung, wurden unter Inhalationsnarkose durchgeführt. Dafür wurde 100%iges Isofluran der Firma Abbvie, Handelsname Forene®, in einem speziell für Isofluran ausgelegten Verdampfer (Dräger Vapor 19.3) unter einem Sauerstoff Flow von 4-6l/min verwendet. Die Isoflurankonzentration wurde dabei zwischen 1-3% eingestellt.

### 3.3. Frakturablauf

Das TFM orientiert sich an bereits etablierter und mehrfach in der Literatur beschriebenen Vorgehensweise, um eine möglichst große Vergleichbarkeit der Experimente zu gewährleisten (Wei et al., 2016, Guo et al., 2012). Nach der initialen Verhaltenstestung wurde den Mäusen eine Fraktur der rechten Tibia zugefügt. Diese Prozedur verlief wie beschrieben unter Inhalationsnarkose mit Isofluran (2-3 Vol.-%). Zusätzlich waren die Versuchstiere durch die präoperative Gabe von Buprenorphin (0.05mg/kg subkutan)

analgetisch abgeschirmt. Die Analgesie durch Buprenorphin wurde 12 Stunden sowie 24 Stunden postoperativ wiederholt. Außerdem erhielten die Tiere die geschilderte antibiotische Abdeckung, um die Gefahr der Inflammation durch Krankheitserreger zu minimieren. Dazu wurde eine einmalige Gabe von Enrofloxacin 5mg/kg subkutan verwendet. Mit dem Ziel der Risikominimierung einer Infektion wurde daher bei der Durchführung der Fraktur besonderes Augenmerk auf die Verhinderung einer offenen Fraktur gelegt. Um eine geschlossene Fraktur ohne Schädigung der Haut zu gewährleisten, wurde den Versuchstieren ein Stück einer Mullkomresse um die untere Extremität gewickelt, diese anschließend mit einem Nadelhalter nach Mayo-Hegar gefasst und dieser dann um 90° gedreht, sodass der innere Schenkel des Kopfes des Nadelhalters gegen die Tibia gedrückt und diese somit frakturiert wurde. Sobald durch den Bruch ein Klickgeräusch zu hören war, wurde der ausgeübte Druck sofort aufgehoben und der Nadelhalter abgesetzt. Hiernach erfolgte die Reposition des Knochens und die Rückführung des Beines in die physiologische Stellung. Nach der Fraktur erfolgte die Immobilisation der Extremität durch das Anlegen eines Gipses. Dieser besteht aus durch den Kontakt mit Wasser aushärtendes, mit einem Polymerkleber versetzten Fiberglasgewebe. Davon wurde ein ca. 20cm langer und 1cm breiter Streifen um die frakturierte Extremität sowie zur Stabilisierung um das Abdomen gebunden. Ziel war es die Extremität bei 90° zu fixieren. Dabei wurde stets darauf geachtet den Verband nicht zu fest anzubringen, um Abschnürungen zu verhindern, jedoch gleichzeitig eng genug anzulegen, um einen guten Halt zu gewährleisten und einem frühzeitigen Abrutschen vorzubeugen. Um Verletzungen zu verhindern, wurden spitze Kanten geglättet. Zu ihrem Schutz wurden die frisch frakturierten Tiere zu zweit in Käfige gesetzt.

### **3.4. Verhaltenstestung**

#### Sensibilitätstestung mittels von-Frey Filamenten

Zur Beurteilung der mechanischen Sensibilität und einer eventuell vorliegenden Allodynie der plantaren Hinterpfote wurde ein etabliertes von-Frey Up/Down Protokoll genutzt (Chaplan et al., 1994, Wei et al., 2016, Kingery et al., 2003). Dabei werden die Mäuse durch Plexiglas Behältnisse einzeln in Boxen (ca. 10x10cm messend), auf einem feinen Metallgitter gehalten (Base and perforated metal sheet, UGO Basile). Diese Platzierung ermöglichte eine gezielte Stimulation der Mäusepfoten zwischen dem ersten und zweiten



Metatarsalen plantar mit standardisierten und genormten von Frey Haaren durch die feinen Löcher des Gitters. Durch die Verwendung dieser Instrumente wird gewährleistet, dass stets ein exakter und somit replizierbarer Druck appliziert werden kann. Bei diesen Testungen wurden Aesthesio® von Frey Stimulatoren (DanMic Global, LLC) genutzt, welche Zieldrücke von 0.16, 0.40, 0.60, 1.0, 1.4, 2.0 und 4.0 Gramm ausüben. Nach einer 30-minütigen Habituationsphase wurde stets mit der geringsten Stärke der Filamente begonnen. Kam es zu keinerlei Reaktion, wurde in aufsteigender Reihenfolge die nächstgrößere Stärke genutzt. Kam es zu einem Rückzug der Pfote, wurde dies als Reaktion gewertet. Zur Validierung wurde nun erneut die nächstkleinere Stärke genutzt. Nach diesem Modell wurde fortgefahren, bis bei einer Stärke eindeutig dreimalig eine Reaktion hervorgerufen werden konnte. Dabei wird die Rückzugschwelle der Hinterpfoten der Mäuse untersucht und miteinander verglichen. Bei jedem Versuchstier wurden dafür jeweils zufällig ausgewählt rechte sowie linke Hinterpfote untersucht und die daraus gegebenenfalls resultierenden Unterschiede untersucht.

Von Frey Filament	Zieldruck [Gramm]
3,22	<b>0,16</b>
3,61	<b>0,40</b>
3,84	<b>0,60</b>
4,08	<b>1,0</b>
4,17	<b>1,4</b>
4,31	<b>2,0</b>
4,56	<b>4,0</b>

**Tabelle 5: Auswertungstabelle der von Frey Sensibilitätstestung**

#### Unweighting (Gewichtsbelastungstest)

Dieser Test dient der Ermittlung der Belastungsfähigkeit der Hinterläufe der Mäuse bzw. deren Einschränkung durch Entzündung und/oder Schmerz. Bei der dafür benötigten Apparatur handelt es sich um das Incapacitance Test Meter für Mäuse, Ratten und Vögel (IITC Life Science). Dieses beinhaltet eine Plexiglasbox zur Platzierung der Maus, angebracht über zwei unabhängige, das Gewicht messende Platten. Das zu untersuchende Tier wird in den Apparat eingesetzt, die Vorderpfoten ruhen dabei auf einer ansteigenden

Plexigläsebene, sodass das Gewicht auf die Hinterläufe verlagert werden muss. Die dabei auf die Waageplatten aufgebrachte, dynamische Gewichtsverteilung wurde automatisch über fünf Sekunden gemessen und für jede Pfote einzeln gemittelt in Gramm ausgegeben. Zur Fixierung in genanntem Behältnis wird der Schwanz der Maus von der untersuchenden Person leicht zwischen den Fingern gehalten. Dabei ist auf eine möglichst stressfreie Untersuchung zu achten. Um Ausreißer zu vermeiden wurde der Test pro Versuchstier fünf Mal wiederholt.

#### Plantar Test zur Bestimmung der Schmerzgrenze bei Wärmereizung

Das für den Test eingesetzte Gerät wird durch Ugo Basile S.R.L, Monvalle, Italien vertrieben. Die sogenannte Plantar Test Vorrichtung beruht auf einem durch Ken Hargreaves 1988 eingeführten Verfahren (Hargreaves et al., 1988). Seit der Einführung hat sich dieses Verfahren in der objektiven Verhaltenstestung von Nagetieren etabliert und wurde daher bereits hinreichend gut beschrieben (Montagne-Clavel and Oliveras, 1996). Es ermöglicht die Bestimmung der Schmerzgrenze durch Wärmeapplikation auf die Plantarseite der Hinterpfote des zu untersuchenden Tieres. Dazu wurden die Versuchstiere in den Versuchsaufbau eingesetzt. Dieser besteht aus einem Plexiglasbehältnis (Ugo Basile base platform) mit einzelnen Boxen (10x10cm), auf einer Glasplatte stehend. Nach einer Habituationsperiode von 30 Minuten wird mit dem Test begonnen. Der Unterbau der Konstruktion beinhaltet eine bewegliche Infrarotquelle mit einem 8mm im Durchmesser messenden Lichtpunkt, sowie einer automatischen Reaktionszeitbestimmung. Die Zeit von initialer Applikation der Wärmequelle bis zum Wegziehen der zu testenden Extremität wird dabei gemessen und bis zu 0,1 Sekunde genau bestimmt. Die erzielten Zeiten der Rückzugsschwellen der Pfoten wurden manuell dokumentiert. Der Test wurde an beiden Hinterpfoten der Maus dreimal durchgeführt. Ein ausreichender Abstand zwischen den sich wiederholenden Testungen wurde eingehalten, um Ergebnisse durch eine eventuelle Schmerzhabituation nicht zu verfälschen. Besonderes Augenmerk lag auf Beachtung der Reaktion der Maus. Es muss sichergestellt werden, dass diese die Pfote aufgrund des Schmerzreizes zurückzieht und nicht lediglich eine Positionsänderung durchführt.

	<b>Versuchstiernummer 1</b>	<b>Versuchstiernummer 2</b>
<b>Rechts</b>	t (sec) (drei Messungen)	t (sec) (drei Messungen)
<b>Links</b>	t (sec) (drei Messungen)	t (sec) (drei Messungen)

**Tabelle 6: Protokoll der Plantar Messung**

### Testung der Kälteempfindlichkeit

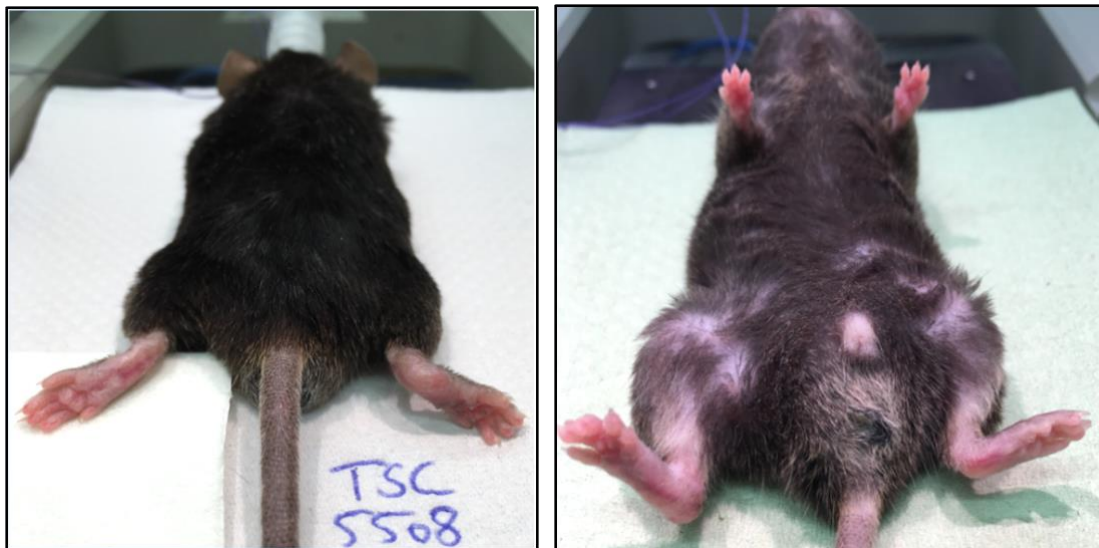
Die Messung der Kälteempfindlichkeit wurde sowie die anderen Testungen ebenfalls vor und nach Fraktur durchgeführt. Mittels dieser Testung sollte die Empfindlichkeit der Pfote für Kältereize getestet und bestimmt werden. Zur Durchführung wurden die Tiere auf das bereits zuvor erwähnte Metallgitter gesetzt (Base and perforated metal sheet, UGO Basile), auch hier in die bereits beschriebenen Plastikboxen von 10x10cm. Wieder wurde nach Umsetzen der Tiere eine 30-minütige Habituationszeit gewährt. Dem sonst in der Literatur beschriebenen Acetontest (Vissers et al., 2005, van der Wal et al., 2015) zogen wir die Durchführung eines Eiswassertests vor, um die Mäuse nicht unnötigerweise einer Chemikalie auszusetzen. Um eine allgemeine Berührungsempfindlichkeit zu testen, ging der Eiswassertestung eine Applikation mit raumtemperiertem Wasser (24°C) voraus. Dies diente der Erkennung einer ggf. bestehenden mechanischen Allodynie, welche nicht mit der Kälteallodynie verwechselt werden sollte. Diese Testung führte bei gesunden Tieren nicht zu einer Wegziehreaktion. Die Ergebnisse wurden dokumentiert und im Anschluss das Eiswasser (4°C) mittels einer 10ml Spritze aufgezogen und in stetigem Strahl auf die Pfote appliziert, ohne die Maus mit der Spritze zu berühren. Diese Eiswassertestung wurde dabei dreimal pro Tier wiederholt. Die Reaktion der Maus wurde dabei genau beobachtet und bewertet. Dabei wurde folgendes Bewertungssystem verwendet:

0	Keine Reaktion	-
1	Schwache Reaktion	Kurzes Wegziehen
2	Starke Reaktion	Lecken der Pfote
3	Anhaltende Reaktion	Dauerhaftes Lecken, Wegspringen des Tieres etc.

**Tabelle 7: Einteilung der Reaktionen der Tiere bei Testung auf Kälteallodynie**

## Ödemmessung

Zur Bestimmung der Stärke des durch die Fraktur entwickelten Ödems wurde vor und nach der Fraktur die Dicke der Pfote distal der Tibia gemessen. Dies geschah unter Zuhilfenahme etablierter, präziser Lasermesstechnik (PreciCura SR, Limab). Zunächst wurde der Messpunkt auf einer Oberfläche ausgerichtet und der gemessene Wert als Baseline eingestellt. Zur Ödemmessung wurde die Pfote der Maus nun unter dem Lasermesspunkt fixiert. Das Messprinzip des Lasers beruht dabei auf dem Prinzip der optischen Triangulation, wie in verschiedenen Veröffentlichungen beschrieben wird (Wei et al., 2016, Guo et al., 2006).



**Abb. 4:** Es zeigt sich auf beiden Bildern mit unterschiedlichen Versuchstieren, jeweils eine deutliche, ödematöse Schwellung der frakturierten rechten Pfote. Die Aufnahmen entstanden ca. drei Wochen nach Entfernung des Gipses, welcher wiederum drei Wochen nach der Frakturdurchführung entfernt wurde. Auf den Bildern zeigt sich der Versuchsaufbau für die elektrophysiologischen Untersuchungen, bei der die Mäuse zunächst narkotisiert wurden.

### Hauttemperatur

Die Hauttemperatur der Maus wurde vor und nach Fraktur mehrfach gemessen. Hierzu wurde die Maus wie in zuvor beschriebener Weise mit 2% Inhalationsanästhetikum Isofluran kurz narkotisiert. Es war darauf zu achten, diesen Prozess so kurz wie möglich zu halten, um den Einfluss des Anästhetikums auf die Körpertemperatur zu begrenzen. Im Anschluss wurde nun mittels Stabthermometer die Temperatur interdigital zwischen vierter und fünfter, zweiter und dritter und erster und zweiter Metatarsalen bestimmt. Dieser Prozess wurde an beiden Hinterpfoten jeweils zweimal durchgeführt, sodass sich pro Pfote sechs Werte ergaben, aus welchem jeweils der Mittelwert gebildet wurde (Kingery et al., 2003). Nach Messung wurden die Tiere zum Aufwachen zurück in ihre Käfige gesetzt und 15 Minuten nachbeobachtet, um bei Komplikationen rechtzeitig eingreifen zu können.

### Gewichtsbestimmung

Auf eine weitere Bestimmung des Gewichts der Mäuse wurde letztlich verzichtet, da vorangegangene Arbeiten keinen signifikanten Unterschied feststellen konnten und die Gewichtsentwicklung der Versuchstiere nur eine untergeordnete Rolle bei der Fragestellung dieser Arbeit spielte.

## **3.5. Elektrophysiologie**

Für die Freilegung des Rückenmarks wurde zunächst eine Laminektomie unter Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Dazu wurde die Maus in einem kleinen Kasten 2% Isofluran bis zur Betäubung ausgesetzt und anschließend bäuchlings auf einem OP-Tisch in eine Inhalationsmaske eingespannt. Die operative Resektion der Wirbelbogen erfolgte dabei weiterhin unter Gabe von 2% Isofluran. Die Aufzeichnung der Aktionspotentiale geschah nach Abschluss der operativen Eingriffe unter 1% Isofluran, um die Aktivität der zu beobachtenden Wide Dynamic Range (WDR)-Neurone zu gewährleisten und um Messungsartefakte durch starke Atembewegungen der Maus zu unterbinden. Das Rückenmark unter den Wirbeln Th12-L1 wurde so freigelegt, um Zugang zu den Segmenten zu bekommen, welche für die Innervation der Hinterpfote zuständig sind. Im Anschluss wurden Tungsten Mikroelektroden ( $2 \mu\Omega$ ) in das tiefe Hinterhorn (ca.  $200 \mu\text{m}$  tief von der dorsalen Oberfläche ausgehend) eingestochen. Um die bereits erwähnten WDR-Neurone zu

identifizieren, wurden unterschiedliche Reize auf die Hinterpfote der Maus ausgeübt. Hierzu wurde eine schwacher (6g), mittlerer (26g), sowie starker (80g) von Frey Stimulus ausgeübt. Aktionspotentiale der gleichen Form und Amplitude wurden dabei als Aktivität derselben Einheit interpretiert. Reaktionen auf verschiedene Reize und nicht nur auf schmerzvolle, niedrig- oder hochschwellige Reize, legen dabei die Aktivität von Neuronen nahe, welche somatosensorische Signale von unterschiedlichen, primär afferenten, sensiblen Neuronen bündeln – in diesem Fall sprechen wir von Konvergenzneuronen bzw. Wide Dynamic Range Neuronen (WDR-Neuronen). Sie stehen im Kontrast zu Neuronen, welche nur eine spezielle Qualität leiten, z.B. Schmerz. In einigen der beobachteten WDR-Neurone fand sich eine Spontanaktivität, was als Zeichen der dauerhaften Schmerzhaftigkeit, des Spontanschmerzes, wie er auch bei vielen CRPS-Patientinnen und -Patienten auftaucht, gewertet werden kann. In die Auswertung wurden jene Neurone inkludiert, welche auf unterschiedliche Reize im Bereich der Plantarseite der Pfote reagierten. Die durch die Reizung entstehenden elektrischen Signale wurden amplifiziert (DAM 80), digitalisiert (CED 1401), anschließend mittels Spike2 Software (CED) auf einem Laptopbildschirm betrachtet und ausgewertet. Die Größe der rezeptiven Felder der gerade betrachteten Neurone wurden als Summe aller Bereiche der Hautoberfläche, welche auf einen milden mechanischen Reiz reagierten und somit eine Aktivität in den beobachteten Neuronen verursachten, bestimmt. Dazu wurde ein 10g von Frey Stimulus eine Sekunde lang auf jeden  $\text{mm}^2$  Hautoberfläche, beginnend an den Zehen weiter proximal bis zur Ferse und darüber hinaus appliziert. Ein Punkt, der im beobachteten Neuron eine Aktivität auslöste, wurde als Teil des rezeptiven Feldes gezählt. Wurden Spontanaktivitäten ausgemacht, wurde darauf geachtet, dass nur jene Areale zum rezeptiven Feld gezählt wurden, welche auf den milden Reiz mit einer stärkeren Aktivität im beobachteten Neuron reagierten. Pro Tier wurden im Schnitt 10-12 Ableitungen (5-6 pro Seite) durchgeführt. Dabei wurden so lange die Hinterpfote innervierenden Neurone gesucht, bis rezeptive Felder der Neurone des Knöchels bzw. Hinterteils der Maus entdeckt wurden, welche unabhängig von der zu beobachtenden Pfote reagierten.

Da die mit der Elektrophysiologie verbundenen Eingriffe den Tod des Versuchstieres nach sich ziehen, gab es keine Möglichkeit die Testungen an denselben Mäusen vor und nach Fraktur durchzuführen um die Ergebnisse anschließend individuell gegenüberzustellen. Hirsch et al. zeigten, dass eine Wiederherstellung der ursprünglichen Sensibilität, sowie Normalisierung der Größe der Rezeptiven Felder zwölf Wochen nach Fraktur stattfindet (Hirsch et al., 2017). So ergibt sich dieses Intervall als möglicher Untersuchungszeitraum.

Daher wurden in dieser Arbeit die elektrophysiologischen Untersuchungen der Versuchstiere innerhalb von 4-11 Wochen nach Fraktur durchgeführt.

### **3.6. Statistische Methoden**

Die bei der Versuchsdurchführung erhobenen Daten wurden zunächst aus dem während den Experimenten benutzten Laborbuch, in Excel Tabellen überführt (Microsoft Excel 2019 für Mac) und darin einfache Berechnungen wie Mittelwerte, Ermittlung von Differenzen etc. durchgeführt.

Zur genaueren Datenausarbeitung wurden diese Datensätze anschließend in das Statistikprogramm SPSS (IBM® SPSS® Statistics Version 27) überführt. Dabei wurde für alle durchgeführten Tests das übliche Signifikanzniveau von 5% ( $\alpha = 0,05$ ) festgelegt.

Alle stetigen Variablen wurden zunächst einer Testung auf Normalverteilung unterzogen. Hierfür wurde der Shapiro-Wilk Test genutzt. Bei einer Signifikanz von  $p < 0,05$  wurde die Nullhypothese beibehalten, die Daten also als normalverteilt erachtet.

Im Falle einer Normalverteilung wurden die Daten dann auf einen statistisch signifikanten Unterschied hin geprüft. Dazu wurde der t-Test zum Vergleich der Mittelwerte bei nicht verbundenen Stichproben durchgeführt. Die statistische Signifikanz wurde hier ebenfalls mit einem p-Wert von 0,05, also einem 5% Signifikanzniveau, festgelegt. Wurden mehr als zwei normalverteilte Gruppen miteinander verglichen, wurde dafür eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc Test durchgeführt.

Eine Welch-ANOVA mit anschließendem Games-Howell post-hoc Test wurde bei fehlender Varianzhomogenität genutzt.

Stellten sich Daten als nicht normalverteilt dar, wurde für die weitere Analyse als nicht parametrischer Test für den Vergleich von zwei Gruppen der Mann-Whitney-U-Test verwendet. Hier wurde immer die exakte Signifikanz zur Ergebnisanalyse angeführt.

Die Darstellung der erhobenen Ergebnisse erfolgt größtenteils als Balkendiagramm. Erwiesen sich andere Diagrammformen als anschaulicher, wurde die grafische Darstellung dementsprechend angepasst. Die angezeigten Fehlerbalken zeigen stets den Standardfehler ( $\pm 1$  SE).

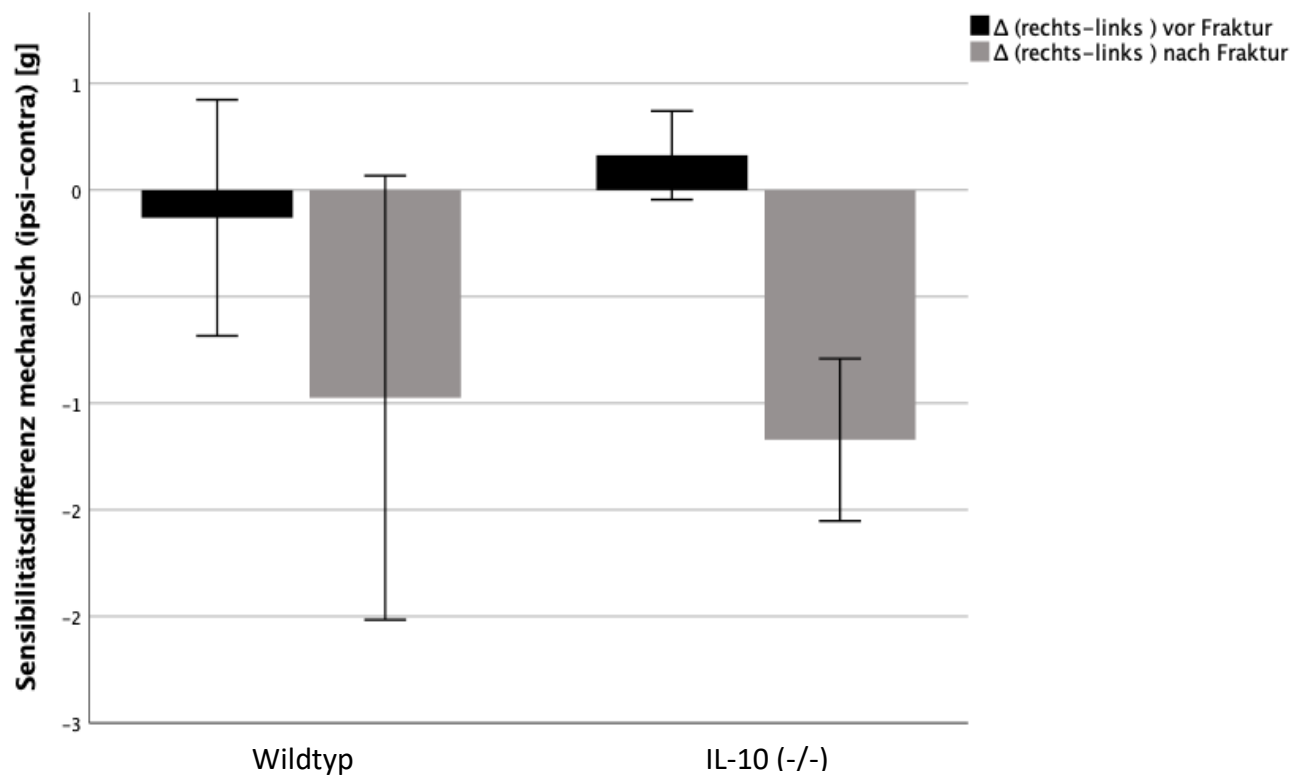
## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Sensibilitätstestung im Vergleich WT-Mäuse vs. IL-10 KO-Mäuse**

Die unterschiedlichen Testungen der Sensibilität wurden jeweils vor und nach Fraktur durchgeführt. Hier war zu erwarten, dass es durch die zugefügte Verletzung mit nachfolgender akut entzündlicher Reaktion zu einer Erhöhung der mechanischen Sensibilität sowie der Kälte- und Hitzeempfindlichkeit kommt. Dabei wurden die IL-10 KO-Mäuse gegen eine Vergleichsgruppe von Wildtypen (WT) getestet. In beiden Gruppen zeigt sich nach der Fraktur die Zunahme der Sensibilität für die angesprochenen Parameter. In der Mann-Whitney-U-Testung zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den genannten Gruppen, wie folgend weiter ausgeführt wird.



## Mechanische Sensibilität: Von Frey Test



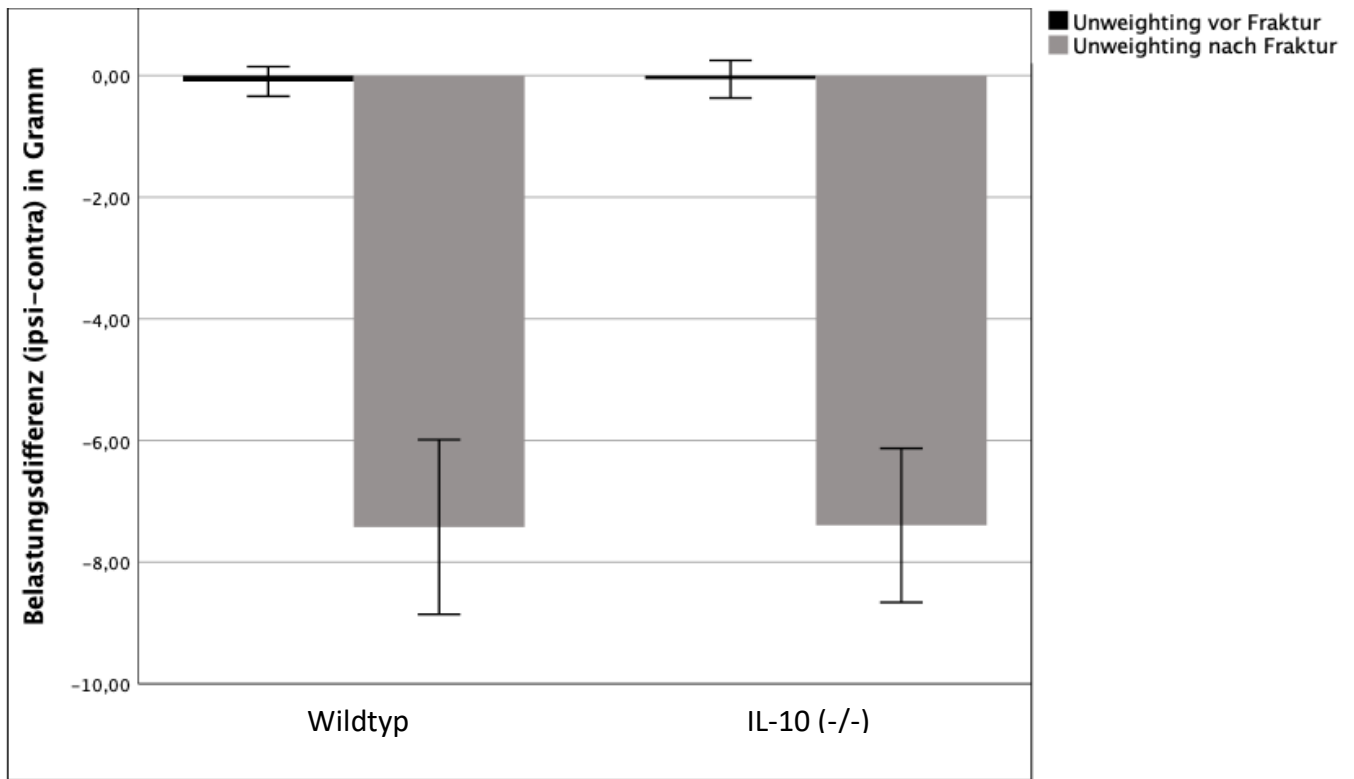
### **Abb. 5: Von Frey Test für mechanische Sensibilität**

Bestimmung der mechanischen Sensibilität der rechten Pfote durch das etablierte Von Frey Testungsprotokoll. Gemessen wird jeweils vor Tibiafraktur sowie drei Wochen danach. Dabei wird eine Gruppe naiver Mäuse (n=20) mit IL-10 (-/-) (n=40) Mäusen verglichen. Nach Fraktur ergibt sich für die Knockout Gruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich der mechanischen Sensibilität.

Die Daten des Von Frey Tests zeigen sich im Shapiro-Wilk Test als nicht normalverteilt und werden daher mittels Mann-Whitney-U-Test auf ihre Signifikanz hin untersucht.

p=0,483 für mechanische Sensibilität nach Fraktur der rechten Pfote bei IL-10(-/-) vs. Naives.

## Unweighting



### **Abb. 6: Belastungsdifferenzbestimmung mittels Unweighting Testung**

Bestimmung der Belastungsdifferenz frakturiertes vs. gesundes Bein (ipsi-contra) in Gramm, vor und drei Wochen nach Tibiafraktur. Dabei wird eine Gruppe naiver Mäuse (n=20) mit IL-10 (-/-) (n=40) Mäusen verglichen.

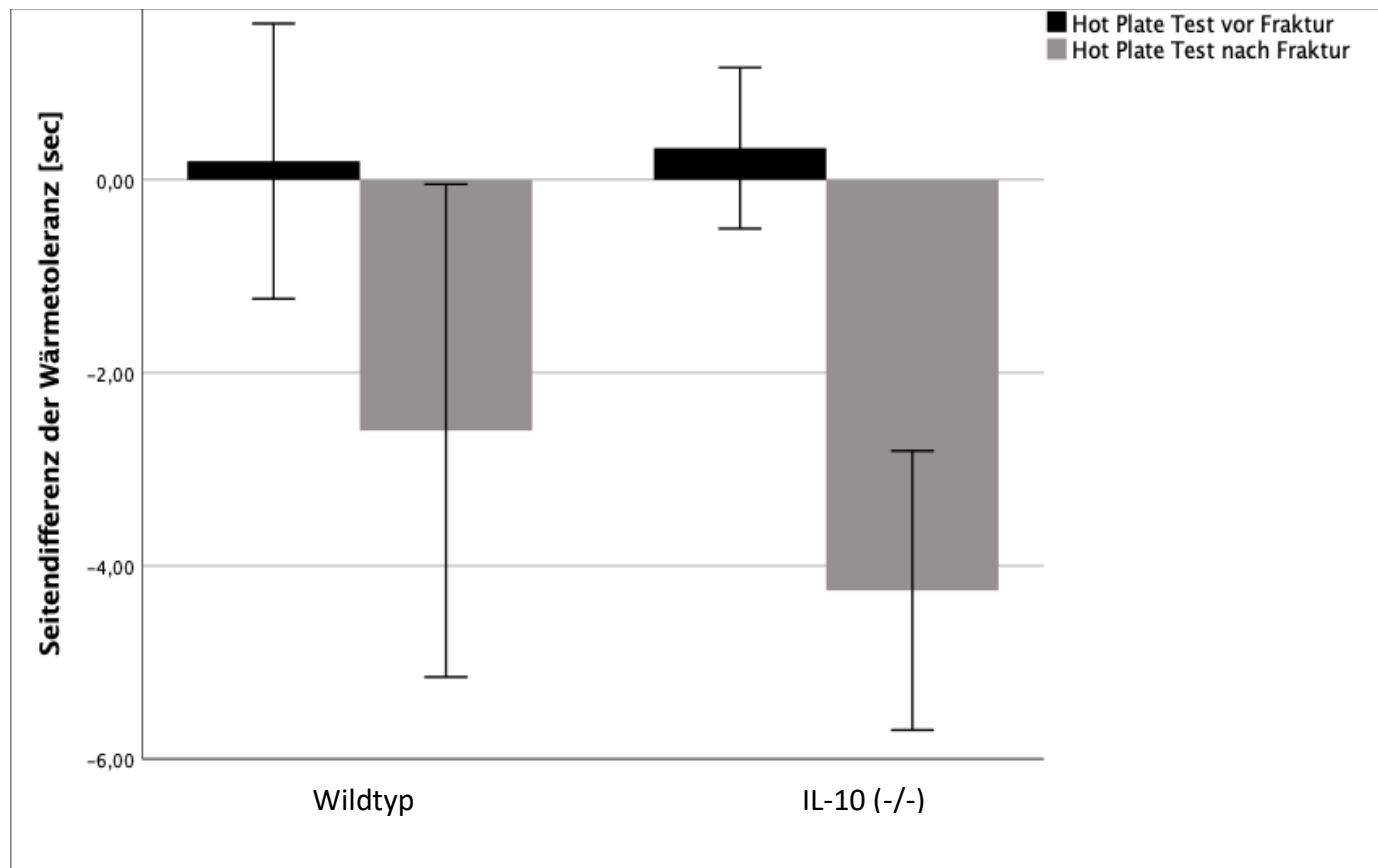
Nach Fraktur ergibt sich für die IL-10(-/-) Gruppe kein signifikanter Unterschied bezüglich der Belastungsdifferenz verglichen mit den naiven Mäusen.

Die Daten des Von Frey Tests zeigen sich im Shapiro-Wilk Test als nicht normalverteilt und werden daher mittels Mann-Whitney-U-Test auf ihre Signifikanz hin untersucht.

p=0,518 für Unweighting Naive vs. IL-10(-/-) präFX.

p=0,874 für Unweighting Naive vs. IL-10(-/-) postFX.

## Plantar Test for thermal stimulation (Hot Plate)



### **Abb. 7: Wärmetoleranztestung Plantar Test**

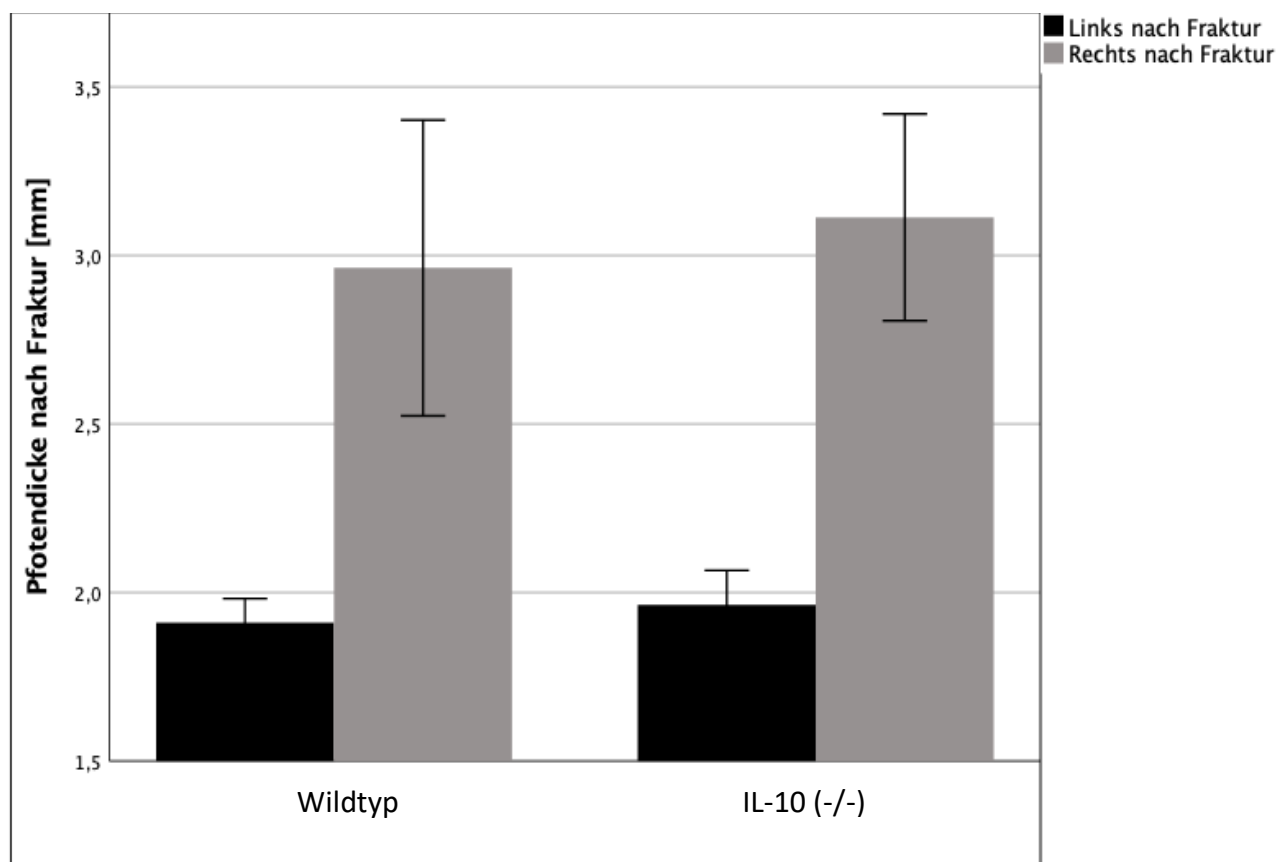
Bestimmung der Wärmetoleranz in der Seitendifferenz frakturiertes Bein – gesundes Bein (ipsi-contra) in Sekunden. Getestet wurde vor und drei Wochen nach der Tibiafraktur.

Dabei wurde eine Gruppe naiver Mäuse (n=20) mit IL-10 (-/-) (n=40) Mäusen verglichen.

Die Daten können nach Shapiro-Wilk Testung als normalverteilt angesehen werden, weshalb mittels ungepaartem t-Test auf Signifikanz untersucht wurde. Auch wenn in der grafischen Darstellung ein gewisser Trend erkennbar scheint, zeigen die Daten keinen signifikanten Unterschied.

$t(98)=8.59$ ,  $p=0.266$  für die Seitendifferenz der Wärmetoleranztestung nach Fraktur für die Gruppen naive Mäuse vs. IL-10(-/-).

## Ödemmessung



**Abb. 8: Pfetendicke vor und nach Fraktur**

Sechs Wochen nach Fraktur wurden jeweils das linke und das rechte Bein auf die Ausbildung eines Ödems untersucht. Die Stichprobenzahl dabei wie folgt: Naives links n=19, Naives rechts n=20, IL10 links n=38, IL10 rechts n=40. Fehlende Werte links ergeben sich aus nekrotischen Veränderungen der linken Pfote, wahrscheinlich aufgrund eines zu engen Gipses, weshalb hier auf eine Bestimmung verzichtet werden musste.

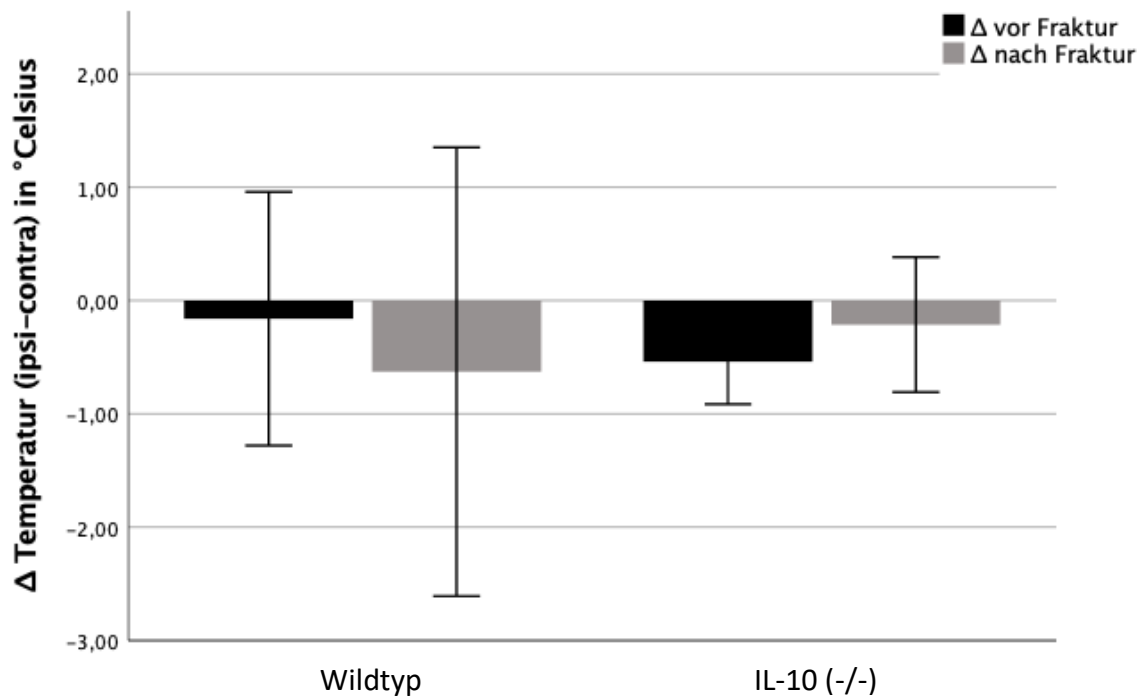
Die Daten werden auf Normalverteilung getestet. Hier zeigen sich diese für das Ödem nach Fraktur rechts und links als nicht normalverteilt.

Mittels Mann-Whitney-U-Test wird gezeigt, dass zwischen den Gruppen Naives und IL-10 (-/-) keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ausprägung des Ödems nach Fraktur der linken oder rechten Pfote bestehen.

Nach Fraktur links (Naives vs. IL-10(-/-)): p=0.385

Nach Fraktur rechts (Naives vs. IL-10(-/-)): p=0.888

## Hauttemperatur



### **Abb. 9: Temperaturdifferenz vor und nach Fraktur**

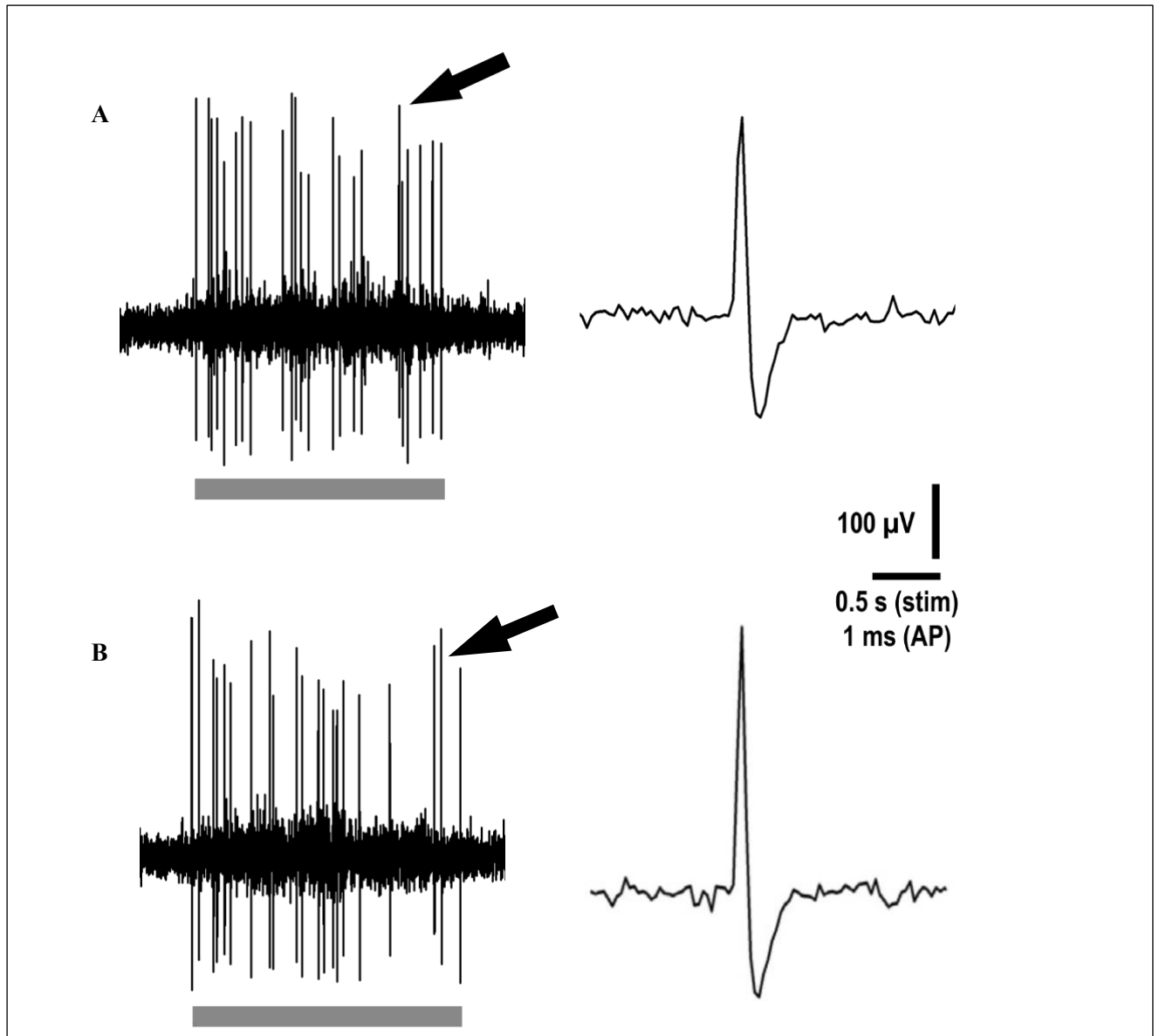
Die Temperaturdifferenz der Pfoten von IL-10 KO-Mäusen und WT unterscheidet sich weder vor noch drei Wochen nach Fraktur (vor Fraktur: WT (n=16), IL-10 KO (n=30), nach Fraktur WT (n=12), IL-10 KO (n=31)).

Δ vor Fraktur: p=0.086, Δ nach Fraktur: p=0.878

## 4.2. Elektrophysiologie

Extrazelluläre Ableitungen von WDR-Neuronen, welche mit ihren rezeptiven Feldern die Sensibilität der Hinterpfote der Mäuse nach Fraktur repräsentieren, zeigen Entladungsfrequenzen, welche mit der Stärke des Stimulus zunehmen. Als Reiz wurden dafür, wie auch in den vorangegangenen Sensibilitätstestungen, von Frey-Stimuli verwendet. Dabei handelt es sich um einen leichten, mittleren und starken Reiz, dies entspricht einem 10 g, 26 g, bzw. 80 g von Frey-Stimulus der punktuell appliziert wird.

In den hier durchgeführten Untersuchungen findet sich dabei kein signifikanter Unterschied zwischen der mittleren Größe der rezeptiven Felder, noch bei den Entladungsfrequenzen auf Stimulation der frakturierten Seite bei WT und IL-10 KO-Mäusen. Da in der Literatur zudem auch eine Veränderung der Größe der rezeptiven Felder auf der kontralateralen Seite gesehen wurde, wurden ebenfalls Ableitungen an der linken, nicht frakturierten Extremität erhoben. Es zeigen sich für die kontralaterale Seite ebenso keine signifikanten Unterschiede der Größe der rezeptiven Felder oder der Entladungsfrequenzen zwischen WT und IL-10 KO-Mäusen nach Frakturdurchführung.

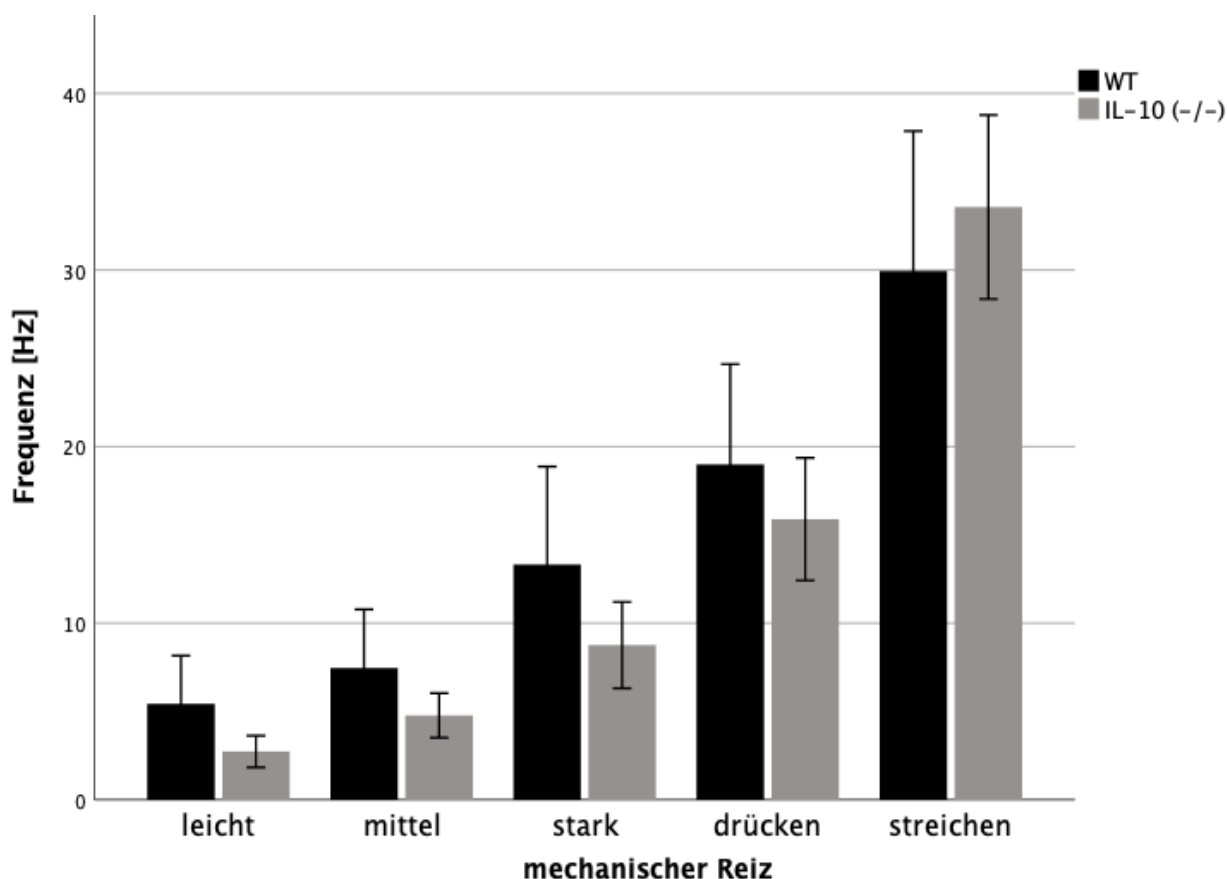


**Abb.10: Beispielhafte Frequenzen von Aktionspotentialen abgeleitet von WDR-Neuronen des Rückenmarks bei mechanischer Stimulation der ipsilateralen Pfote nach Fraktur.**

**A)** Antwort einer Zelle auf einen Stimulus, ausgelöst durch Bestreichen der Pfote.

**B)** Antwort einer Zelle auf einen starken Stimulus mittels 80 g von-Frey Filament.

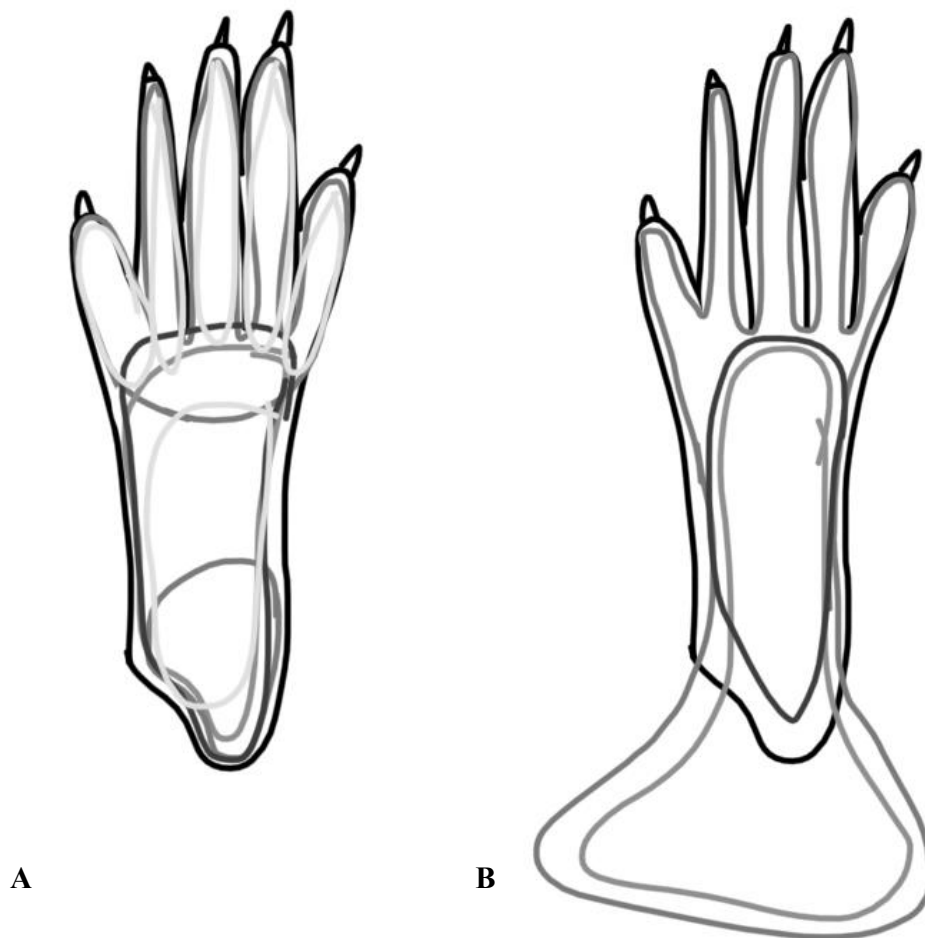
Das mit Pfeil markierte Aktionspotential ist jeweils auf der rechten Seite vergrößert dargestellt. Die Dauer des Reizes ist durch den grauen Balken angezeigt.



**Abb.11:** Frequenz der gemessenen Aktionspotentiale von WDR-Neuronen der **rechten** Pfote nach Fraktur bei WT und IL-10 KO-Mäusen auf unterschiedliche Reize. Der leichte Reiz entspricht dabei der Applikation eines punktuellen Druckes mit einem 10 g, der mittlere einem 26 g, der starke einem 80 g von-Frey- Filament. Zu sehen ist ein starker Anstieg der Entladungsrates der abgeleiteten WDR-Neurone bei Erhöhung des Drucks mittels von-Frey Filament. Die stärksten Antworten kamen durch Drücken sowie Streichen der Pfote mit dem Finger zu Stande.

Die Untersuchung der Entladungsfrequenzen bei WT und IL-10 KO-Mäusen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied (einfaktorielle ANOVA).

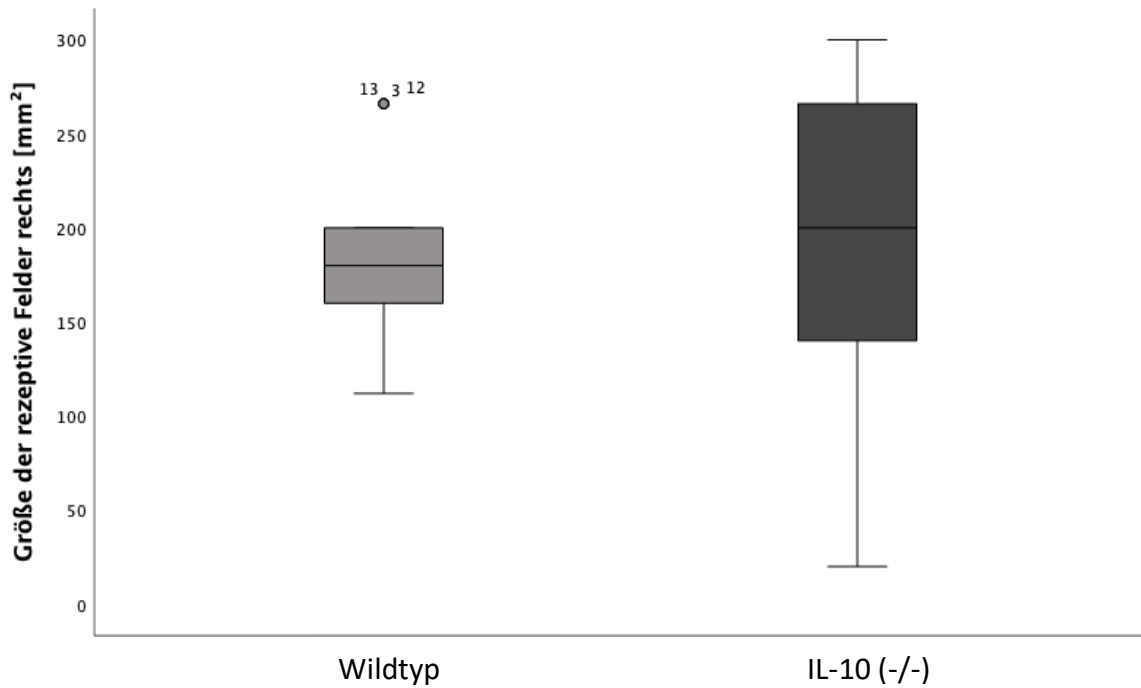




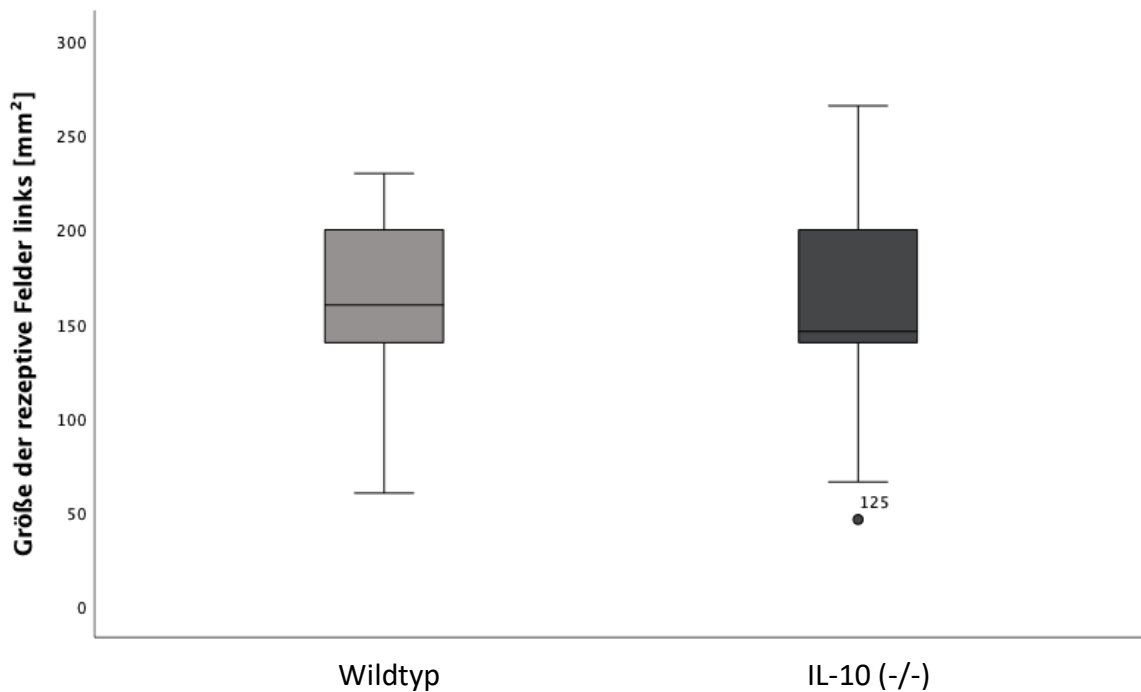
**Abb. 12:** Beispielhafte, schematische Darstellung rezeptiver Felder der **frakturierten Pfoten**, bei Ableitung einzelner WDR-Neurone unter mechanischer Stimulation.

**A)** Verteilung rezeptiver Felder mit einer Größe bis  $66\text{mm}^2$ .

**B)** Die komplette Pfote, sowie Unterschenkel und Teile des Hinterteils reagieren auf mechanische Reizung bei Ableitung einer einzelnen Zelle. Die Größe des rezeptiven Feldes entspricht bis  $200\text{mm}^2$ .



**Abb. 13: Größe der rezeptiven Felder von WDR-Neuronen der ipsilateralen, frakturierten Pfote im Vergleich bei WT und IL-10-KO-Mäusen.**



**Abb. 14: Größe der rezeptiven Felder von WDR-Neuronen der kontralateralen Pfote im Vergleich bei WT und IL-10-KO-Mäusen.**

## **5. Diskussion**

In dieser Arbeit wurde das Tibiafrakturmodell (TFM) auf Interleukin-10 Knockout (IL-10 (-/-)) Mäuse sowie eine Vergleichsgruppe bestehend aus Wildtypen (WT) von ebenfalls männlichen C57BL/6-Mäusen angewendet und die Resultate der Untersuchungen bestehend aus Sensibilitätstestung vor und nach Fraktur, sowie der elektrophysiologischen Begutachtung miteinander verglichen. Zwischen IL-10 (-/-) und WT-Mäusen konnten dabei keine signifikanten Unterschiede erhoben werden.

Anders als in zuvor genannten Studien bei Interleukin-4 Knockout Mäusen (Uceyler et al., 2011), konnten wir in unseren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede in der Testung der Sensibilität zwischen Interleukin-10 Knockout Mäusen und Wildtyp Mäusen darstellen. Die Reaktion der IL-10 Knockout Mäuse zeigte sich nach Fraktur in allen Untersuchungen der Sensibilität, seien es mechanische Sensibilität, Reaktion auf Wärme oder Kältereiz sowie in der Seitenbelastung gleich, bzw. nicht signifikant verändert.

Durch das bereits etablierte TFM soll es zu einer Annäherung an die Pathophysiologie des CRPS kommen. Da sich ein CRPS meist nach Frakturhergang entwickelt (Veldman et al., 1993), soll durch die Fraktur der Tibia mit anschließender dreiwöchiger Immobilisierung durch Gips eine dem CRPS ähnelnde Symptomatik ausgelöst werden. Es zeigt sich eine ähnliche Symptomatik, wie bei vielen CRPS-Patientinnen und -Patienten beschrieben. Nach der Abnahme des Gipses lassen sich Veränderungen der Motorik, wie Bewegungseinschränkungen, Sensibilitätsstörungen mit Hyperalgesie und trophischen Veränderungen, wie Ausfall von Fell oder ödematöse Veränderungen an der betroffenen Extremität nachweisen. Diese Befunde zeigen die Validität des TFM der Maus als Model für posttraumatische Entzündungsreaktionen und mit gewissen Einschränkungen auch des humanen CRPS.

Diese posttraumatische Reaktion zeigt sich in ähnlicher Ausprägung auch bei Menschen nach Fraktur und Gipsimmobilisation und wird charakterisiert durch Schmerzen, Schwellung und überwärmte Extremität. Diese Befunde finden sich auch in den ersten Phasen eines CRPS. Daher kann angenommen werden, dass die posttraumatische Entzündung sowie die initiale Phase des CRPS einige molekulare Mechanismen teilen, bzw. dass die posttraumatische Entzündungsreaktion in überschießender Form den Beginn des CRPS darstellt (Birklein et al., 2018).

In früheren Untersuchungen an WT-Mäusen findet sich meist eine Seitendifferenz der auch durch uns erhobenen mechanischen Hypersensibilität mittels von Frey Filamenten, von ca. 1-2 g (Tajerian et al., 2015, Guo et al., 2012) nach Fraktur. Diese Differenz findet sich so auch in den für diese Arbeit untersuchten Tieren. Hier liegt die Seitendifferenz bei 1-1,3 g. Eine auf der gesunden Seite ebenfalls nachweisbaren mechanischen Hypersensibilität kann zumindest teilweise durch eine neuronale Plastizität mit zentraler Sensibilisierung erklärt werden (Woolf and Salter, 2000). Entweder kommt es zu einer Sensibilisierung spinaler Neurone oder die kontralaterale Hyperalgesie ist ebenfalls Folge der Entzündungsreaktion. Auch für die Belastungsdifferenz beim Unweighting gibt es vergleichbare Daten aus anderen Experimenten. Hier zeigte sich eine Belastungsdifferenz des betroffenen Beines akut nach Fraktur von 50-60% im Vergleich zur gesunden Gegenseite (Gallagher et al., 2013, Guo et al., 2012). In unseren Experimenten zeigte sich dabei eine Belastungsdifferenz der rechten Pfote 3 Wochen nach Fraktur von 40%. Dass es hier zu einer leichten Abweichung mit vergleichbaren Daten kommt, kann mit einigen Ausreißern nach unten erklärt werden. Hier gab es Versuchstiere, welche aufgrund einer Nekrose der betroffenen Pfote schmerzempfindlicher waren als Tiere, welche lediglich Entzündungszeichen und ödematöse Veränderungen der Pfote zeigten. Um diese Ausreißer bereinigt, zeigt sich die Belastungsdifferenz um 48% und liegt damit nahe an den Ergebnissen der Literatur (Guo et al., 2006, Kingery, 2010, Gallagher et al., 2013).

Bei den Ergebnissen bezüglich der Temperatur der Pfoten kommt es bei den hier erhobenen Daten zu einer leichten Abweichung der zu erwartenden Ergebnisse im Vergleich zur Literatur. In der Literatur findet sich 3 Wochen nach Fraktur ein Temperaturanstieg der betroffenen Pfote um bis zu 2°C (Guo et al., 2012, Gallagher et al., 2013). In unseren Experimenten konnte kein Temperaturanstieg nachgewiesen werden. Vielmehr zeigt sich bei den Tieren im Mittel keinerlei Veränderung bei der Temperatur der Pfote vor und nach Durchführung der Fraktur.

Insgesamt lässt sich aus den vergleichbaren Ergebnissen der Literatur schlussfolgern, dass der Aufbau zur Testung der Sensibilität bei WT-Mäusen gut reproduzierbar ist und valide Ergebnisse produziert werden können.

Für tierexperimentelle Studien mit elektrophysiologischen Untersuchungen wurde vor allem mit dem Nerve-Ligation-Modell gearbeitet, um einen Zustand von neuropathischen Schmerzen abzubilden (Chapman et al., 1998, Chu et al., 2004). Dabei wird meist eine enge Ligatur um die Spinalnerven L5-L6 angebracht. Dieser Eingriff löst im Verlauf eine Veränderung des peripheren und zentralen Nervensystems aus, welche das Auftreten einer Hypersensibilität verursachen. Dabei konnte bereits in diesen Modellen eine Vergrößerung von rezeptiven Feldern der untersuchten WDR-Neurone festgestellt werden. Darüber hinaus beschreiben Chapman et al. eine erhöhte Entladungsfrequenz von untersuchten WDR-Neuronen, welche die Gruppe ebenfalls als einen grundlegenden Aspekt der Entwicklung einer Hypersensibilität ansieht (Chapman et al., 1998). Die in dieser Arbeit untersuchten WDR-Neurone nach Fraktur zeigten ebenfalls häufig spontane Aktionspotentiale ohne mechanische Reizung. Auch in den hier dargestellten Untersuchungen fanden sich bei Ableitung der WDR-Neurone immer wieder diese Spontanaktivitäten. Bei den IL-10 KO-Mäusen konnte jedoch auch in den elektrophysiologischen Untersuchungen kein signifikanter Unterschied zu den WT-Mäusen festgestellt werden.

Üceyler et al. zeigten, dass Interleukin-4 KO-Mäuse eine erhöhte Sensibilität auf von Frey Reize aufweisen (Uceyler et al., 2011). Aufbauend auf diese Erkenntnisse wurden weitere Untersuchungen an IL-4 KO-Mäusen durchgeführt, um herauszufinden, ob eine gesteigerte Sensibilität von nozizeptiven Neuronen im Hinterhorn für diese Hypersensibilität verantwortlich sein kann (Lemmer et al., 2015). Tatsächlich zeigte sich bei IL-4 KO-Mäusen eine gesteigerte Entladungsfrequenz spinaler WDR-Neurone bei Stimulation des rezeptiven Feldes durch schmerzhafte Reize im Vergleich zu den WT-Mäusen. Da Interleukin-10 als ebenfalls antiinflammatorisches wirkendes Zytokin bei der Entwicklung, bzw. Resolution von posttraumatischen Entzündungszuständen eine ebenso große Rolle spielt (Wei et al., 2019), lag eine solche Untersuchung an Interleukin-10 KO-Mäusen nahe. Aufgrund dessen entschieden wir uns für eine Kombination aus Sensibilitätsstestung und elektrophysiologischen Untersuchungen der Versuchstiere nach Anwendung des TFM. Zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit war keine Literatur bekannt, in welcher die Kombination aus Interleukin-10 KO und TFM am Tiermodell auf Veränderungen der Aktivität von nozizeptiven Neuronen des Hinterhorns und der Größe deren rezeptiver Felder untersucht wurde. Die für diese Arbeit erhobenen Daten der Größe der rezeptiven Felder, sowie der Entladungsfrequenz der WDR-Neurone decken sich dabei mit der in der genannten Literatur erhobenen Werte für WT-Mäuse (Sokal and Chapman, 2003, Liu et al.,

2011). Es zeigte sich eine Vergrößerung der rezeptiven Felder auf bis zu 200 mm<sup>2</sup>. Für die Größe der rezeptiven Felder von IL-10 KO im Vergleich zu WT-Mäusen nach Fraktur konnte jedoch kein Unterschied festgestellt werden. Auch für die Entladungsfrequenzen der abgeleiteten WDR-Neurone konnten im Vergleich der beiden Gruppen keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden.

Ebenfalls passend zur Literatur zeigte nicht nur die ipsilaterale Pfote nach Fraktur, sondern ebenso die kontralaterale Pfote Veränderungen in der Entladungsfrequenz auf Reize, als auch in der Größe der rezeptiven Felder. Diese Daten passen zu der beobachteten Hyperalgesie der Mäuse während der Sensibilitätstestung, welche ebenfalls teilweise auf der kontralateralen Seite gezeigt werden konnte. Diese Veränderung im Verhalten und der rezeptiven Felder könnte auf eine spinale Reorganisation sowie Sensibilisierung der nozizeptiven Prozesse hindeuten (Hirsch et al., 2017, Hoheisel and Mense, 2015, Gallagher et al., 2013).

Die Sensibilität, sowie die elektrophysiologischen Untersuchungen der Größe der rezeptiven Felder, sowie der Entladungsfrequenzen auf unterschiedliche Reize der hier getesteten IL-10 KO-Mäuse zeigt sich dabei vergleichbar mit den zur Kontrolle verwendeten WT. Bezüglich Hypersensibilität in der Testung mit von Frey-Filamenten, bei der Messung der Belastungsdifferenz mittels Unweighting, bei Ödemmessung, Temperaturbestimmung und plantarer Wärmetoleranzmessung ergeben sich keine statistisch relevanten Unterschiede zu den WT-Mäusen.

Auch wenn IL-10 als antiinflammatorischem Mediator eine wichtige Rolle in der Resolution der akuten Entzündungsreaktion und der Verhinderung von chronischen Schmerzzuständen zugesprochen wird (Saxton et al., 2021, Ouyang and O'Garra, 2019, Leon et al., 1998), scheint im TFM der Maus ein globaler IL-10 KO keinen Einfluss auf die für in dieser Arbeit gemessenen Sensibilitätstestungen zu haben. Da das angeborene, als auch das adaptive Immunsystem mit all seinen Mediatoren redundant aufgebaut und komplex untereinander verknüpft ist, scheint die Erklärung nahezuliegen, dass andere antiinflammatorische Mediatoren ein Fehlen von IL-10 kompensieren können. Bereits bei Interleukin-4 Knockout Mäusen wurde in anderen Untersuchungen eine kompensatorische Hyperexpression von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 oder IL-13 gezeigt (Lemmer et al., 2015). Auch wenn Interleukin-10 ein wichtiges antiinflammatorischen Zytokin darstellt sind weitere Mediatoren vorhanden, um überschießende Immunreaktionen und anhaltende

Inflammationen zu limitieren, wie z.B. Interleukin-4 oder Interleukin-13 (Saxton et al., 2021).

Die Zytokinfamilie von IL-10 umfasst dabei einige weitere, in ihrer Wirkung teils sehr ähnliche Moleküle (Saraiva et al., 2020, Wei et al., 2019). So bindet z.B. Interleukin-22 neben den eigenen IL-22 Rezeptoren ebenfalls an IL-10R2 und kann nachgeschaltete Signalwege auslösen. In der Literatur finden sich Untersuchungen, welche die Eindämmung von proinflammatorischen Antworten durch die IL-10 Zytokinfamilie vor allem durch die Auslösung des Transkriptionsfaktors STAT3 belegen (Ouyang and O'Garra, 2019, Ouyang et al., 2011). Der supprimierende Einfluss von IL-10 auf die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren ist bei STAT3 defizienten Mäusen komplett aufgehoben (Takeda et al., 1999). Darüber hinaus findet sich der IL-22R in verschiedenen epithelialen Zellen und Fibroblasten (Ouyang et al., 2011).

Bei einem globalen Knockout werden bestimmte Gene mittels Genmanipulation an embryonalen Stammzellen gezielt deaktiviert, anschließend in Blastozysten injiziert und in den Empfängerorganismus eingebracht. So können dann weitere Tiere gezüchtet werden, dessen Zellen alle das abgeschaltete Gen enthalten. Dass es bei diesem Vorgang zu einer Kompensation der ausgeschalteten Gene während der Ontogenese und damit zu unterschiedlichen Phänotypen kommen kann, wird in aktueller Literatur diskutiert (Zundo, 2021, El-Brolosy and Stainier, 2017). Ein solcher, kompensatorischer Mechanismus kann also dazu führen, dass ein globaler IL-10 KO keinen weiteren Einfluss auf die Entzündungsreaktion hat. Besser wären hier vielleicht konditionelle oder interventionelle, pharmakologische Untersuchungen geeignet, wie sie zum Beispiel mit monoklonalen Antikörpern gegen Interleukin-10, bzw. Interleukin-10R im Mausmodell der Leishmaniose eingesetzt werden (Murray et al., 2003).

Ein globaler Knockout von IL-10 bei Mäusen führt zur spontanen Ausprägung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitits ulcerosa, was die wichtige antiinflammatorische Wirkung von IL-10 im Rahmen der Eindämmung von inflammatorischen Prozessen, zumindest in der Darmschleimhaut, bestätigt (Saxton et al., 2021, Saraiva et al., 2020, Ouyang and O'Garra, 2019, Wei et al., 2019). Die vorliegenden Ergebnisse betrachtend, scheint die antiinflammatorische Rolle von Interleukin-10 bei der Homöostase der Entzündungsreaktionen im enteralen System jedoch eine wichtigere Rolle zu spielen als in anderem Gewebe. Aktuelle Literatur zeigt, dass die Resolution akuter Entzündungen ein hochkomplexer, aktiver Prozess ist, an welchem, je nach Gewebetyp,

unterschiedlichste Prozesse beteiligt sind. Es handelt sich nicht wie lange angenommen um einen passiven Prozess, bei dem es einfach nur zu einer Abnahme von proinflammatorischen Mediatoren kommt, sondern vielmehr um einen ebenfalls komplex regulierten Mechanismus, welcher nicht auf ein einzelnes Zytokin reduziert werden kann (Gilroy and De Maeyer, 2015, Muire et al., 2020). Erst die Konvergenz unterschiedlichster antiinflammatorischer Komponente wie leukozytischer Infiltration, Efferozytose, proinflammatorischer Leukozytenclearance, immunsupprimierender Eikosanoide und Zytokinen führt in Gemeinsamkeit zu einer Beendigung entzündlicher Stadien (Gilroy and De Maeyer, 2015).

Auch stellt sich die Frage, ob die qualitativen Sensibilitätstestungen die richtigen Untersuchungen darstellen, um die Auswirkungen von IL-10, bzw. dessen Abwesenheit, auf die Entzündungsreaktion zu messen. Da IL-10 einen wichtigen Mediator der Resolution der akuten Entzündungsreaktion darstellt, könnten weitere Untersuchungen die Dauer der entstanden Entzündungsreaktion untersuchen, die über die hier stattgefundenen 4-11 Wochen Spanne hinausgeht.

Bezüglich der Pathologie des CRPS ist fraglich, ob diese maßgeblich durch die unterschiedlichen Konzentrationen an Zytokinen und deren löslichen Rezeptoren gemessen und bestimmt werden kann. Vorige Studien, in welchen die Plasmakonzentration von Zytokinen bei CRPS-Patientinnen und -Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen wurde, zeigen teils widersprüchliche Ergebnisse. Einige Studien zeigen, dass sich die Konzentration von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen nicht verändert darstellt (Huygen et al., 2002, Schinkel et al., 2009, van de Beek et al., 2001), wohingegen andere Studien eine Reduzierung von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-4 und IL-10 bei gleichzeitiger Hyperexpression von proinflammatorischen Zytokinen feststellen (Maihofner et al., 2005, Schinkel et al., 2006, Uçeyler et al., 2007). Auch wenn IL-4 Knockout Mäuse eine mechanische Hypersensitivität aufzuweisen scheinen (Uceyler et al., 2011), zeigt sich auch hier bei Abwesenheit weiterer typischer Symptome nicht das Bild eines vollständig ausgeprägten CRPS. Die dazu in dieser Arbeit an IL-10 Knockout Mäusen erhobenen Daten legen daher nahe, dass die Entwicklung und die Symptomatik des CRPS-ähnlichen TFM bei Mäusen nicht auf ein einzelnes Zytokin zurückgeführt werden kann, sondern eher als Zusammenspiel vieler Faktoren betrachtet werden muss.



Es benötigt daher weitere experimentelle und interventionelle Studien, um eventuelle pharmakologische Ziele zur Therapie oder auch Prävention des CRPS beim Menschen liefern zu können. Auch wenn die Ergebnisse der tierexperimentellen Untersuchungen nicht direkt auf den Menschen übertragbar sind, bietet das TFM ein wertvolles Modell, insbesondere für die akute Phase des CRPS und dessen weitere Erforschung.

## Limitationen

Die tierexperimentellen Studien, welche zur Aufklärung der Pathophysiologie des CRPS beitragen sollen, wurden meist unter Verwendung männlicher Tiere, zunächst Ratten, später auch Mäusen des Stammes C57BL/6J durchgeführt. Dabei wurde stets außer Acht gelassen, dass das weibliche Geschlecht in der Epidemiologie des CRPS einen Risikofaktor darstellen kann (Beerthuisen et al., 2009, Beerthuisen et al., 2011). Da jedoch in der Literatur zumeist männliche Versuchstiere genutzt werden, fiel die Entscheidung aufgrund der Vergleichbarkeit zueinander, in dieser Studie ebenfalls auf Gruppen rein männlichen Geschlechts. Auch in diesem Versuchsaufbau wurden dabei Mäuse des Stamms C57BL/6J genutzt. Zu Beginn der Experimente wurde bei 80 Mäusen die Sensibilitätstestungen durchgeführt. Im Verlauf sind davon vier Tiere verstorben, was eine Mortalität von 5% ergibt. Einige Tiere sind dabei während der Frakturdurchführung, am ehesten durch die Narkose mit Isofluran an einem Atemstillstand verstorben. Andere Tiere wurden einige Tage nach der Frakturdurchführung tot in ihren Käfigen aufgefunden, ohne die Todesursache bestimmen zu können. Buprenorphin wurde nach der Frakturdurchführung zur Analgesie verabreicht. Die Analgesie mit Buprenorphin ist in tierexperimentellen Studien aufgrund des vorteilhaften „ceiling“ Effektes verbreitet. Darunter versteht man, dass die pharmakologischen Wirkungen, bzw. Nebenwirkungen wie atemdepressive Wirkung, auch bei initialer Überdosierung gedeckelt werden kann (Zoorob et al., 2018). Auch die postoperative Gabe ist weit verbreitet und erprobt (Gallagher et al., 2013), sodass eine potentielle Atemdepression als Nebenwirkung keine große Rolle spielt. Plötzlicher Herztod oder Infektionen aufgrund von Entzündungszeichen und Nekrosen können weiterführend als mögliche Ursachen gemutmaßt werden.

Eine Sham-Kontrolle, bei der nur der Gips ohne vorherige Fraktur angebracht wurde, wurde in unseren Experimenten nicht durchgeführt, da es in der Literatur bereits Ergebnisse solcher Untersuchungen gibt. Hier zeigte sich, dass bei alleiniger Gipsanlage ohne Tibiafraktur ebenfalls eine der posttraumatischen Entzündung ähnelnde Inflammation entsteht, welche jedoch in ihrer Symptomatik reduzierter und weniger lang ausgeprägt imponiert (Guo et al., 2004).

Bei unbehandelten CRPS-Patientinnen und -Patienten verschlechtern sich mit der Zeit die bekannten Symptome, was im Gegensatz zu den erhobenen Daten der hier untersuchten Mäuse nach TFM steht. Deshalb stellt sich allgemein die Frage, ob die von uns angewandte

Methodik des TFM überhaupt das Erkrankungsbild des menschlichen CRPS in seiner Gänze abbilden kann. Der Beantwortung dieser Frage stellen sich in einem ausführlichen Review Birklein et al. (Birklein et al., 2018). Viele an Versuchstieren nach Durchführung des TFM erhobene Untersuchungsbefunde decken sich mit der Symptomatik von CRPS-Patientinnen und -Patienten, weisen aber weiterhin signifikante Unterschiede in Ausprägung und zeitlichem Verlauf auf.

Bezüglich der elektrophysiologischen Erhebungen stellt sich die Frage, ob sich rezeptive Felder der WDR-Neurone, bzw. Entladungsfrequenzen auf unterschiedliche Reize als Faktor zur Bestimmung des Einflusses von Interleukin-10 auf die posttraumatische Entzündungsreaktion überhaupt als sinnvoll Messgröße erweisen.

Nicht zuletzt sei zu erwähnen, dass weitere Experimente fehlen, die nicht nur den globalen Knockout von Interleukin-10 untersuchen, sondern andere Methoden, wie interventionelle Blockade oder konditionelle Knockouts ebenfalls abbilden.

## **6. Zusammenfassung**

Die Forschungsfrage in dieser Arbeit bezog sich auf den Einfluss von immunmodulatorischen Komponenten des Immunsystems, explizit der Bedeutung des antiinflammatorischen Zytokins Interleukin-10, auf die pathophysiologischen Prozesse, die der Klinik im TFM bei Mäusen und damit der Entstehung des CRPS zugrunde liegen können. Untersucht wurde, ob es bei Abwesenheit von Interleukin-10 bei Mäusen zu einem veränderten Schmerzverhalten bzw. zu einer Veränderung der entsprechenden WDR-Neurone, deren Antwort auf Unterschiedliche Reize und deren rezeptiven Feldern des Rückenmarks kommt.

Zu diesem Zweck wurde zunächst die Sensibilität von WT-Mäusen mit denen von IL-10 KO-Mäusen verglichen. Untersucht wurden mechanische Hypersensibilität, Empfindlichkeit auf Kälte- und Hitzereizung, Belastbarkeit der hinteren Extremität, Pfortendicke zur späteren Bestimmung einer möglichen Ödem Ausprägung sowie Temperatur. Nach diesen initialen Sensibilitätstestungen, bei welchen sich keine Unterschiede zeigten, erfolgte die Fraktur der rechten Tibia im etabliertem TFM. An die Frakturdurchführung schloss sich die Immobilisation durch Eingipsen der frakturierten Extremität für drei Wochen an. Nach dieser Zeit wurde der Gips entfernt und die Sensibilitätstestungen wiederholt. Wie zu erwarten, zeigten sich die Tiere aller Gruppen nach Fraktur deutlich schmerzempfindlicher als zuvor. Zwischen WT und IL-10 KO gab es jedoch auch nach Fraktur keine Unterschiede.

Nach der Fraktur und der zweiten Sensibilitätstestung wurden die Versuchstiere schließlich elektrophysiologisch untersucht. Hierbei wurden Entladungsfrequenzen von WDR-Neuronen der unteren Extremität im Rückenmark abgeleitet und die Größe der rezeptive Felder bestimmt. Die Entladungsfrequenzen der abgeleiteten Aktionspotentiale nahm bei beiden Gruppen mit Anstieg der Reizungsintensität zu. Die höchsten Frequenzen ließen sich bei Bestreichen der Pfote erreichen.

Die Daten zeigen keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Sie passten jedoch zu den in der Literatur beschriebenen Vorbefunden. Auch wenn bei den frakturierten IL-10 KO-Mäusen die Größe der rezeptiven Felder variabler war, konnten keine signifikanten Unterschiede zu den WT-Mäusen ausgemacht werden. In vorliegenden Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass sich die Größe der rezeptiven Felder

sowohl auf der ipsilateralen frakturierten als auch an der kontralateralen gesunden Pfote verändern. Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass im gewählten Modell das Fehlen von Interleukin-10 keinen erkennbaren Einfluss auf den Phänotyp hat. Um zu erforschen und die Frage zu beantworten ob IL-10 in der posttraumatischen Entzündung wirklich nur eine untergeordnete Rolle spielt, oder ob globale IL-10 KO-Mäuse ungeeignet sind, müssen weitere Experimente erfolgen.

## Referenzen

- ALEXANDER, G. M., PETERLIN, B. L., PERREAULT, M. J., GROTHUSEN, J. R. & SCHWARTZMAN, R. J. 2012. Changes in plasma cytokines and their soluble receptors in complex regional pain syndrome. *J Pain*, 13, 10-20.
- ALEXANDER, G. M., VAN RIJN, M. A., VAN HILTEN, J. J., PERREAULT, M. J. & SCHWARTZMAN, R. J. 2005. Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. *Pain*, 116, 213-9.
- APRIL LOWELL, P. 2022. *Immunology Overview: How Does Our Immune System Protect Us?* [Online]. Available: <https://blog.cellsignal.com/immunology-overview-how-does-our-immune-system-protect-us> [Accessed].
- ASCHERL, R. & BLUMEL, G. 1981. [Clinical picture in Sudeck's dystrophy]. *Fortschr Med*, 99, 712-20.
- BARNHOORN, K. J., VAN DE MEENT, H., VAN DONGEN, R. T., KLOMP, F. P., GROENEWOUD, H., SAMWEL, H., NIJHUIS-VAN DER SANDEN, M. W., FRÖLKE, J. P. & STAAL, J. B. 2015. Pain exposure physical therapy (PEPT) compared to conventional treatment in complex regional pain syndrome type 1: a randomised controlled trial. *BMJ Open*, 5, e008283.
- BARON, R., BINDER, A., ULRICH, W. & MAIER, C. 2003. [Complex regional pain syndrome. Sympathetic reflex dystrophy and causalgia]. *Schmerz*, 17, 213-26.
- BARONIO, M., SADIA, H., PAOLACCI, S., PRESTAMBURGO, D., MIOTTI, D., GUARDAMAGNA, V. A., NATALINI, G., SULLIVAN, S. G. B. & BERTELLI, M. 2020. Molecular Aspects of Regional Pain Syndrome. *Pain Research and Management*, 2020, 7697214.
- BATOON, L., MILLARD, S. M., RAGGATT, L. J. & PETTIT, A. R. 2017. Osteomacs and Bone Regeneration. *Curr Osteoporos Rep*, 15, 385-395.
- BEAN, D. J., JOHNSON, M. H., HEISS-DUNLOP, W., LEE, A. C. & KYDD, R. R. 2015. Do psychological factors influence recovery from complex regional pain syndrome type 1? A prospective study. *Pain*, 156, 2310-8.
- BEERTHUIZEN, A., STRONKS, D. L., HUYGEN, F. J., PASSCHIER, J., KLEIN, J. & SPIJKER, A. V. 2011. The association between psychological factors and the development of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS1)--a prospective multicenter study. *Eur J Pain*, 15, 971-5.
- BEERTHUIZEN, A., VAN 'T SPIJKER, A., HUYGEN, F. J., KLEIN, J. & DE WIT, R. 2009. Is there an association between psychological factors and the Complex Regional Pain Syndrome type 1 (CRPS1) in adults? A systematic review. *Pain*, 145, 52-9.
- BERRY, J. D., ROWBOTHAM, M. C. & PETERSEN, K. L. 2004. Complex regional pain syndrome-like symptoms during herpes zoster. *Pain*, 110, e1-12.
- BIRKLEIN, F. 2018. Diagnostik und Therapie komplexer regionaler Schmerzsyndrome (CRPS), S1-Leitlinie. Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.).
- 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., RIEDL, B., SIEWEKE, N., WEBER, M. & NEUNDORFER, B. 2000. Neurological findings in complex regional pain syndromes--analysis of 145 cases. *Acta Neurol Scand*, 101, 262-9.
- BIRKLEIN, F. & SCHLERETH, T. 2013. [Current aspects of the therapy of complex regional pain syndrome]. *Nervenarzt*, 84, 1436-44.
- BIRKLEIN, F. & SCHMELZ, M. 2008. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett*, 437, 199-202.
- BLUMBERG, H., GRIESSER, H. J. & HORNYAK, M. 1991. [Neurologic aspects of clinical manifestations, pathophysiology and therapy of reflex sympathetic dystrophy (causalgia, Sudeck's disease)]. *Nervenarzt*, 62, 205-11.
- BROWN, S., JOHNSTON, B., AMARIA, K., WATKINS, J., CAMPBELL, F., PEHORA, C. & MCGRATH, P. 2016. A randomized controlled trial of amitriptyline versus gabapentin for complex regional pain syndrome type I and neuropathic pain in children. *Scand J Pain*, 13, 156-163.
- BRUBAKER, S. W., BONHAM, K. S., ZANONI, I. & KAGAN, J. C. 2015. Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. *Annu Rev Immunol*, 33, 257-90.
- BRUNNER, F. 2017. Komplexes regionales Schmerzsyndrom. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 76, 335-347.
- BÜCHNER, S. 2010. [Differential diagnosis of CRPS from a dermatologist's viewpoint]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 42, 15-8.
- BUCKLEY, C. D., GILROY, D. W., SERHAN, C. N., STOCKINGER, B. & TAK, P. P. 2013. The resolution of inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 13, 59-66.
- BUSSA, M., MASCARO, A., CUFFARO, L. & RINALDI, S. 2017. Adult Complex Regional Pain Syndrome Type I: A Narrative Review. *PM R*, 9, 707-719.
- CAHILL, L. 2006. Why sex matters for neuroscience. *Nat Rev Neurosci*, 7, 477-484.
- 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.
- CHAPMAN, V., SUZUKI, R. & DICKENSON, A. H. 1998. Electrophysiological characterization of spinal neuronal response properties in anaesthetized rats after ligation of spinal nerves L5-L6. *J Physiol*, 507 ( Pt 3), 881-94.
- 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.
- CHU, K. L., FALTYNEK, C. R., JARVIS, M. F. & MCGARAUGHTY, S. 2004. Increased WDR spontaneous activity and receptive field size in rats following a neuropathic or inflammatory injury: implications for mechanical sensitivity. *Neurosci Lett*, 372, 123-6.
- CLARK, A. K., OLD, E. A. & MALCANGIO, M. 2013. Neuropathic pain and cytokines: current perspectives. *J Pain Res*, 6, 803-14.
- 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.
- COPUROGLU, C., CALORI, G. M. & GIANNOUDIS, P. V. 2013. Fracture non-union: who is at risk? *Injury*, 44, 1379-82.

- CURTALE, G., MIROLO, M., RENZI, T. A., ROSSATO, M., BAZZONI, F. & LOCATI, M. 2013. Negative regulation of Toll-like receptor 4 signaling by IL-10-dependent microRNA-146b. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 11499-504.
- 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 ROOIJ, A. M., DE MOS, M., STURKENBOOM, M. C., MARINUS, J., VAN DEN MAAGDENBERG, A. M. & VAN HILTEN, J. J. 2009. Familial occurrence of complex regional pain syndrome. *Eur J Pain*, 13, 171-7.
- DI PIETRO, F., MCAULEY, J. H., PARKITNY, L., LOTZE, M., WAND, B. M., MOSELEY, G. L. & STANTON, T. R. 2013. Primary motor cortex function in complex regional pain syndrome: a systematic review and meta-analysis. *J Pain*, 14, 1270-88.
- DIJKSTRA, P. U., GROOTHOFF, J. W., TEN DUIS, H. J. & GEERTZEN, J. H. 2003. Incidence of complex regional pain syndrome type I after fractures of the distal radius. *Eur J Pain*, 7, 457-62.
- DIMOVA, V. & BIRKLEIN, F. 2019. Das komplexe regionale Schmerzsyndrom (CRPS). *Der Anaesthetist*, 68, 115-128.
- DUONG, S., BRAVO, D., TODD, K. J., FINLAYSON, R. J. & TRAN, D. Q. 2018. Treatment of complex regional pain syndrome: an updated systematic review and narrative synthesis. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie*, 65, 658-684.
- EGLE, U. T. & HOFFMANN, S. O. 1992. [Is sympathetic reflex dystrophy really "defined as an entirely neurologic disorder"? Critical remarks on the contribution by H. Blumberg, H.-J. Griesser and M. Hornyak. Neurologic aspects of clinical manifestations, pathophysiology and therapy of sympathetic reflex dystrophy (causalgia, Sudeck's disease)]. *Nervenarzt*, 63, 120-2.
- EL-BROLOSY, M. A. & STAINIER, D. Y. R. 2017. Genetic compensation: A phenomenon in search of mechanisms. *PLoS Genet*, 13, e1006780.
- EVANS, J. A. 1947. Reflex sympathetic dystrophy; report on 57 cases. *Ann Intern Med*, 26, 417-26.
- FAJGENBAUM, D. C. & JUNE, C. H. 2020. Cytokine Storm. *N Engl J Med*, 383, 2255-2273.
- FRETTLOH, J., HUPPE, M. & MAIER, C. 2006. Severity and specificity of neglect-like symptoms in patients with complex regional pain syndrome (CRPS) compared to chronic limb pain of other origins. *Pain*, 124, 184-9.
- 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.
- GEERTZEN, J. H., DE BRUIJN-KOFMAN, A. T., DE BRUIJN, H. P., VAN DE WIEL, H. B. & DIJKSTRA, P. U. 1998. Stressful life events and psychological dysfunction in Complex Regional Pain Syndrome type I. *Clin J Pain*, 14, 143-7.



- GIBBONS, J. J. & WILSON, P. R. 1992. RSD score: criteria for the diagnosis of reflex sympathetic dystrophy and causalgia. *Clin J Pain*, 8, 260-3.
- GILROY, D. & DE MAEYER, R. 2015. New insights into the resolution of inflammation. *Seminars in Immunology*, 27, 161-168.
- GOEBEL, A. 2011. Complex regional pain syndrome in adults. *Rheumatology (Oxford)*, 50, 1739-50.
- GOH, E. L., CHIDAMBARAM, S. & MA, D. 2017. Complex regional pain syndrome: a recent update. *Burns Trauma*, 5, 2.
- GRADL, G., STEINBORN, M., WIZGALL, I., MITTLMEIER, T. & SCHURMANN, M. 2003. [Acute CRPS I (morbus sudeck) following distal radial fractures--methods for early diagnosis]. *Zentralbl Chir*, 128, 1020-6.
- GUHL, C., BIRKLEIN, F. & HIRSCH, S. 2019. Sweating disorders in mice with and without nerve lesions. *Eur J Pain*, 23, 835-842.
- GUO, H., CALLAWAY, J. B. & TING, J. P. Y. 2015. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nature Medicine*, 21, 677-687.
- 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. & KINGERY, W. S. 2006. Glucocorticoid inhibition of vascular abnormalities in a tibia fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*, 121, 158-67.
- GUO, T. Z., WEI, T., SHI, X., LI, W. W., HOU, S., WANG, L., TSUJIKAWA, K., RICE, K. C., CHENG, K., CLARK, D. J. & 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.
- 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., SCHLERETH, T., CHONT, M. & VATINE, J. J. 2010. Development of a severity score for CRPS. *Pain*, 151, 870-6.
- HARDEN, R. N., BRUEHL, S., STANTON-HICKS, M. & WILSON, P. R. 2007. Proposed new diagnostic criteria for complex regional pain syndrome. *Pain Med*, 8, 326-31.
- HARDEN, R. N., SWAN, M., KING, A., COSTA, B. & BARTHEL, J. 2006. Treatment of complex regional pain syndrome: functional restoration. *Clin J Pain*, 22, 420-4.
- HARGREAVES, K., DUBNER, R., BROWN, F., FLORES, C. & JORIS, J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32, 77-88.
- HIRSCH, S., IBRAHIM, A., KRÄMER, L., ESCOLANO-LOZANO, F., SCHLERETH, T. & BIRKLEIN, F. 2017. Bone Trauma Causes Massive but Reversible Changes in Spinal Circuitry. *The Journal of Pain*, 18, 468-476.
- HOHEISEL, U. & MENSE, S. 2015. Inflammation of the thoracolumbar fascia excites and sensitizes rat dorsal horn neurons. *Eur J Pain*, 19, 419-28.
- HUYGEN, F. J., DE BRUIJN, A. G., DE BRUIN, M. T., GROENEWEG, J. G., KLEIN, J. & ZIJLSTRA, F. J. 2002. Evidence for local inflammation in complex regional pain syndrome type 1. *Mediators Inflamm*, 11, 47-51.
- IASP. *Part III - PainTerms* [Online]. Available: <https://www.iasp-pain.org/PublicationsNews/Content.aspx?ItemNumber=1673> [Accessed 6.6.2020 2020].

- JANEWAY, C. A., JR. & MEDZHITOV, R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol*, 20, 197-216.
- JANIG, W. & BARON, R. 2003. Complex regional pain syndrome: mystery explained? *Lancet Neurol*, 2, 687-97.
- JO, Y. H., KIM, K., LEE, B. G., KIM, J. H., LEE, C. H. & LEE, K. H. 2019. Incidence of and Risk Factors for Complex Regional Pain Syndrome Type 1 after Surgery for Distal Radius Fractures: A Population-based Study. *Sci Rep*, 9, 4871.
- KEMLER, M. A., VAN DE VUSSE, A. C., VAN DEN BERG-LOONEN, E. M., BARENDSE, G. A., VAN KLEEF, M. & WEBER, W. E. 1999. HLA-DQ1 associated with reflex sympathetic dystrophy. *Neurology*, 53, 1350-1.
- KENKRE, J. & BASSETT, J. 2018. The bone remodelling cycle. *Annals of Clinical Biochemistry*, 55, 308-327.
- KINGERY, W. S. 1997. A critical review of controlled clinical trials for peripheral neuropathic pain and complex regional pain syndromes. *Pain*, 73, 123-39.
- KINGERY, W. S. 2010. Role of neuropeptide, cytokine, and growth factor signaling in complex regional pain syndrome. *Pain Med*, 11, 1239-50.
- KINGERY, W. S., DAVIES, M. F. & CLARK, J. D. 2003. A substance P receptor (NK1) antagonist can reverse vascular and nociceptive abnormalities in a rat model of complex regional pain syndrome type II. *Pain*, 104, 75-84.
- 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.
- KNUDSEN, L. F., TERKELSEN, A. J., DRUMMOND, P. D. & BIRKLEIN, F. 2019. Complex regional pain syndrome: a focus on the autonomic nervous system. *Clinical Autonomic Research*, 29, 457-467.
- KRUMOVA, E. K., FRETTLOH, J., KLAUENBERG, S., RICHTER, H., WASNER, G. & MAIER, C. 2008. Long-term skin temperature measurements - a practical diagnostic tool in complex regional pain syndrome. *Pain*, 140, 8-22.
- KÜHN, R., LÖHLER, J., RENNICK, D., RAJEWSKY, K. & MÜLLER, W. 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell*, 75, 263-74.
- KUMAZAWA, K., SOBUE, G., MITSUMA, T. & OGAWA, T. 1994. Modulatory effects of calcitonin gene-related peptide and substance P on human cholinergic sweat secretion. *Clin Auton Res*, 4, 319-22.
- KUMBHAT, S., MEYER, N. & SCHURR, M. J. 2004. Complex regional pain syndrome as a complication of a chemical burn to the foot. *J Burn Care Rehabil*, 25, 189-91.
- LEMMER, S., SCHIESSER, P., GEIS, C., SOMMER, C., VANEGAS, H. & UCEYLER, N. 2015. Enhanced spinal neuronal responses as a mechanism for the increased nociceptive sensitivity of interleukin-4 deficient mice. *Exp Neurol*, 271, 198-204.
- LENZ, M., ÜÇEYLER, N., FRETTLÖH, J., HÖFFKEN, O., KRUMOVA, E. K., LISSEK, S., REINERSMANN, A., SOMMER, C., STUDE, P., WAAGA-GASSER, A. M., TEGENTHOFF, M. & MAIER, C. 2013. Local cytokine changes in complex regional pain syndrome type I (CRPS I) resolve after 6 months. *PAIN®*, 154, 2142-2149.
- LEON, L. R., KOZAK, W. & KLUGER, M. J. 1998. Role of IL-10 in inflammation. Studies using cytokine knockout mice. *Ann N Y Acad Sci*, 856, 69-75.
- LERICHE, R. 1916. De la resection du carrefour aortico-iliaque avec double sympathectomie lombaire pour thrombose arteritique de l'aorte : le syndrome de l'obiteration terminoaortique par arterite. *Presse Med*, 48, 601-604.

- LEUNG, L. & CAHILL, C. M. 2010. TNF-alpha and neuropathic pain--a review. *J Neuroinflammation*, 7, 27.
- LI, W. W., GUO, T. Z., LIANG, D. Y., SUN, Y., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2012. Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology*, 116, 882-95.
- LITTLEJOHN, G. 2015. Neurogenic neuroinflammation in fibromyalgia and complex regional pain syndrome. *Nat Rev Rheumatol*, 11, 639-48.
- LIU, F. Y., QU, X. X., CAI, J., WANG, F. T., XING, G. G. & WAN, Y. 2011. Electrophysiological properties of spinal wide dynamic range neurons in neuropathic pain rats following spinal nerve ligation. *Neurosci Bull*, 27, 1-8.
- LOI, F., CÓRDOVA, L. A., PAJARINEN, J., LIN, T.-H., YAO, Z. & GOODMAN, S. B. 2016. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone*, 86, 119-130.
- MAIHOFNER, C., BARON, R., DECOL, R., BINDER, A., BIRKLEIN, F., DEUSCHL, G., HANDWERKER, H. O. & SCHATTSCHNEIDER, J. 2007. The motor system shows adaptive changes in complex regional pain syndrome. *Brain*, 130, 2671-87.
- MAIHOFNER, C. & BIRKLEIN, F. 2007. [Complex regional pain syndromes: new aspects on pathophysiology and therapy]. *Fortschr Neurol Psychiatr*, 75, 331-42.
- MAIHOFNER, C., HANDWERKER, H. O. & BIRKLEIN, F. 2006. Functional imaging of allodynia in complex regional pain syndrome. *Neurology*, 66, 711-7.
- MAIHOFNER, C., HANDWERKER, H. O., NEUNDORFER, B. & BIRKLEIN, F. 2005. Mechanical hyperalgesia in complex regional pain syndrome: a role for TNF-alpha? *Neurology*, 65, 311-3.
- MAILIS, A. & WADE, J. 1994. Profile of Caucasian women with possible genetic predisposition to reflex sympathetic dystrophy: a pilot study. *Clin J Pain*, 10, 210-7.
- 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.
- MARSELL, R. & EINHORN, T. A. 2011. The biology of fracture healing. *Injury*, 42, 551-555.
- MARTINEZ, F. O. & GORDON, S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*, 6, 13.
- MARUYAMA, M., RHEE, C., UTSUNOMIYA, T., ZHANG, N., UENO, M., YAO, Z. & GOODMAN, S. B. 2020. Modulation of the Inflammatory Response and Bone Healing. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 386.
- MASTERS, S. L. & DE NARDO, D. 2014. Innate immunity. *Current Opinion in Immunology*, 26, v-vi.
- MCCOMB, S., THIRIOT, A., AKACHE, B., KRISHNAN, L. & STARK, F. 2019. Introduction to the Immune System. *Methods Mol Biol*, 2024, 1-24.
- MINGOMATAJ, E. Ç. & BAKIRI, A. H. 2016. Regulator Versus Effector Paradigm: Interleukin-10 as Indicator of the Switching Response. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 50, 97-113.
- MISIDOU, C. & PAPAGORAS, C. 2019. Complex Regional Pain Syndrome: An update. *Mediterr J Rheumatol*, 30, 16-25.
- MITCHELL, S. W., MOREHOUSE, G. R. & KEEN, W. W. 1864. *Gunshot Wounds and Other Injuries of Nerves*, JB Lippincott.
- MONTAGNE-CLAVEL, J. & OLIVERAS, J. L. 1996. The "plantar test" apparatus (Ugo Basile Biological Apparatus), a controlled infrared noxious radiant heat stimulus for

- precise withdrawal latency measurement in the rat, as a tool for humans? *Somatosens Mot Res*, 13, 215-23.
- MOSELEY, G. L., HERBERT, R. D., PARSONS, T., LUCAS, S., VAN HILTEN, J. J. & MARINUS, J. 2014. Intense Pain Soon After Wrist Fracture Strongly Predicts Who Will Develop Complex Regional Pain Syndrome: Prospective Cohort Study. *The Journal of Pain*, 15, 16-23.
- MOSSER, D. M. & ZHANG, X. 2008. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, 226, 205-218.
- MUIRE, P. J., MANGUM, L. H. & WENKE, J. C. 2020. Time Course of Immune Response and Immunomodulation During Normal and Delayed Healing of Musculoskeletal Wounds. *Front Immunol*, 11, 1056.
- MUNESHIGE, H., TODA, K., KIMURA, H. & ASOU, T. 2003. Does a viral infection cause complex regional pain syndrome? *Acupunct Electrother Res*, 28, 183-92.
- MURRAY, H. W., ANDRE L., M., LU, C. M., DEVECCHIO, J. L., MATSUHASHI, M., MA, X. & HEINZEL, F. P. 2003. Determinants of Response to Interleukin-10 Receptor Blockade Immunotherapy in Experimental Visceral Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 188, 458-464.
- NEWSON, J., STABLES, M., KARRA, E., ARCE-VARGAS, F., QUEZADA, S., MOTWANI, M., MACK, M., YONA, S., AUDZEVICH, T. & GILROY, D. W. 2014. Resolution of acute inflammation bridges the gap between innate and adaptive immunity. *Blood*, 124, 1748-1764.
- NITZSCHE, E. U. 2011. [Nuclear medicine imaging for diagnosis of CRPS I]. *Handchir Mikrochir Plast Chir*, 43, 20-4.
- OERLEMANS, H. M., GORIS, R. J. & OOSTENDORP, R. A. 1998. Impairment level sumscore in reflex sympathetic dystrophy of one upper extremity. *Arch Phys Med Rehabil*, 79, 979-90.
- OERLEMANS, H. M., OOSTENDORP, R. A., DE BOO, T., VAN DER LAAN, L., SEVERENS, J. L. & GORIS, J. A. 2000. Adjuvant physical therapy versus occupational therapy in patients with reflex sympathetic dystrophy/complex regional pain syndrome type I. *Arch Phys Med Rehabil*, 81, 49-56.
- OUYANG, W. & O'GARRA, A. 2019. IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation. *Immunity*, 50, 871-891.
- OUYANG, W., RUTZ, S., CRELLIN, N. K., VALDEZ, P. A. & HYMOWITZ, S. G. 2011. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*, 29, 71-109.
- PARKIN, J. & COHEN, B. 2001. An overview of the immune system. *Lancet*, 357, 1777-89.
- 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.
- RHO, R. H., BREWER, R. P., LAMER, T. J. & WILSON, P. R. 2002. Complex regional pain syndrome. *Mayo Clin Proc*, 77, 174-80.
- ROH, Y. H., GONG, H. S. & BAEK, G. H. 2019. Prognostic Value of Pain Sensitization During Early Recovery After Distal Radius Fracture in Complex Regional Pain Syndrome. *Pain Med*, 20, 1066-1071.
- 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.

- ROTHKIRCH, T., BLAUTH, W. & HELBIG, B. 1989. Das Sudeck-Syndrom der Hand: Historischer Überblick, Behandlungskonzept und Ergebnisse. *Handchirurgie Mikrochirurgie Plastische Chirurgie*, 21, 115-126.
- 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.
- SARAIVA, M., VIEIRA, P. & O'GARRA, A. 2020. Biology and therapeutic potential of interleukin-10. *J Exp Med*, 217.
- SAXTON, R. A., TSUTSUMI, N., SU, L. L., ABHIRAMAN, G. C., MOHAN, K., HENNEBERG, L. T., ADURI, N. G., GATI, C. & GARCIA, K. C. 2021. Structure-based decoupling of the pro- and anti-inflammatory functions of interleukin-10. *Science*, 371.
- 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.
- SCHINKEL, C., SCHERENS, A., KOLLER, M., ROELLECKE, G., MUHR, G. & MAIER, C. 2009. Systemic inflammatory mediators in post-traumatic complex regional pain syndrome (CRPS I) - longitudinal investigations and differences to control groups. *Eur J Med Res*, 14, 130-5.
- 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. *Autonomic Neuroscience*, 182, 102-107.
- SCHWARTZMAN, R. J., ALEXANDER, G. M., GROTHUSEN, J. R., PAYLOR, T., REICHENBERGER, E. & PERREAU, M. 2009a. Outpatient intravenous ketamine for the treatment of complex regional pain syndrome: a double-blind placebo controlled study. *Pain*, 147, 107-15.
- SCHWARTZMAN, R. J., ERWIN, K. L. & ALEXANDER, G. M. 2009b. The natural history of complex regional pain syndrome. *Clin J Pain*, 25, 273-80.
- SHI, X., GUO, T. Z., WEI, T., LI, W. W., CLARK, D. J. & KINGERY, W. S. 2015. Facilitated spinal neuropeptide signaling and upregulated inflammatory mediator expression contribute to postfracture nociceptive sensitization. *Pain*, 156, 1852-1863.
- SHIRANI, P., JAWAID, A., MORETTI, P., LAHIJANI, E., SALAMONE, A. R., SCHULZ, P. E. & EDMONDSON, E. A. 2010. Familial occurrence of complex regional pain syndrome. *Can J Neurol Sci*, 37, 389-94.
- SIBANC, B. & LESNICAR, G. 2002. Complex regional pain syndrome and lyme borreliosis: two different diseases? *Infection*, 30, 396-9.
- SIGTERMANS, M. J., VAN HILTEN, J. J., BAUER, M. C. R., ARBOUS, S. M., MARINUS, J., SARTON, E. Y. & DAHAN, A. 2009. Ketamine produces effective and long-term pain relief in patients with Complex Regional Pain Syndrome Type 1. *Pain*, 145, 304-311.
- SINGH, G., WILLEN, S. N., BOSWELL, M. V., JANATA, J. W. & CHELIMSKY, T. C. 2004. The value of interdisciplinary pain management in complex regional pain syndrome type I: a prospective outcome study. *Pain Physician*, 7, 203-9.
- SOKAL, D. M. & CHAPMAN, V. 2003. Effects of spinal administration of muscimol on C- and A-fibre evoked neuronal responses of spinal dorsal horn neurones in control and nerve injured rats. *Brain Res*, 962, 213-20.

- STANTON-HICKS, M., JANIG, W., HASSENBUSCH, S., HADDOX, J. D., BOAS, R. & WILSON, P. 1995. Reflex sympathetic dystrophy: changing concepts and taxonomy. *Pain*, 63, 127-33.
- STANTON-HICKS, M. D. 2019. CRPS: what's in a name? Taxonomy, epidemiology, neurologic, immune and autoimmune considerations. *Reg Anesth Pain Med*, 44, 376-387.
- SUDECK, P. 1900. Über die akute entzündliche Knochenatrophie. *Archiv für klinische Chirurgie*. Germany: Springer.
- SUZUKI, R., KONTINEN, V. K., MATTHEWS, E., WILLIAMS, E. & DICKENSON, A. H. 2000. Enlargement of the receptive field size to low intensity mechanical stimulation in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. *Exp Neurol*, 163, 408-13.
- TAJERIAN, M., SAHBAIE, P., SUN, Y., LEU, D., YANG, H. Y., LI, W., HUANG, T. T., KINGERY, W. & DAVID CLARK, J. Sex differences in a Murine Model of Complex Regional Pain Syndrome.
- 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.
- TAKEDA, K., CLAUSEN, B. E., KAISHO, T., TSUJIMURA, T., TERADA, N., FÖRSTER, I. & AKIRA, S. 1999. Enhanced Th1 activity and development of chronic enterocolitis in mice devoid of Stat3 in macrophages and neutrophils. *Immunity*, 10, 39-49.
- TAUB, E., USWATTE, G., MARK, V. W. & MORRIS, D. M. 2006. The learned nonuse phenomenon: implications for rehabilitation. *Eura Medicophys*, 42, 241-56.
- TERKELSEN, A. J., MOLGAARD, H., HANSEN, J., FINNERUP, N. B., KRONER, K. & JENSEN, T. S. 2012. Heart rate variability in complex regional pain syndrome during rest and mental and orthostatic stress. *Anesthesiology*, 116, 133-46.
- TOREBJORK, E., WAHREN, L., WALLIN, G., HALLIN, R. & KOLTZENBURG, M. 1995. Noradrenaline-evoked pain in neuralgia. *Pain*, 63, 11-20.
- TRAVIS, J. 2009. Origins. On the origin of the immune system. *Science*, 324, 580-2.
- UÇEYLER, N., EBERLE, T., ROLKE, R., BIRKLEIN, F. & SOMMER, C. 2007. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. *Pain*, 132, 195-205.
- UÇEYLER, N., ROGAUSCH, J. P., TOYKA, K. V. & SOMMER, C. 2007. Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. *Neurology*, 69, 42-9.
- ÜÇEYLER, N. & SOMMER, C. 2008. Zytokinregulation und Schmerz. *Der Schmerz*, 22, 652.
- UÇEYLER, N., TOPUZOĞLU, T., SCHIESSER, P., HAHNENKAMP, S. & SOMMER, C. 2011. IL-4 deficiency is associated with mechanical hypersensitivity in mice. *PLoS One*, 6, e28205.
- UPTODATE.COM. 2023. *Contributions of important cytokines, chemokines, colony-stimulating factors, and growth factors to immunologic responses* [Online]. Available: [https://www.uptodate.com/contents/the-adaptive-cellular-immune-response-t-cells-and-cytokines?search=zytokine&sectionRank=1&usage\\_type=default&anchor=H4174039912&source=machineLearning&selectedTitle=1~150&display\\_rank=1#H4174039912](https://www.uptodate.com/contents/the-adaptive-cellular-immune-response-t-cells-and-cytokines?search=zytokine&sectionRank=1&usage_type=default&anchor=H4174039912&source=machineLearning&selectedTitle=1~150&display_rank=1#H4174039912) [Accessed].
- VAN DE BEEK, W. J. T., REMARQUE, E. J., WESTENDORP, R. G. J. & VAN HILTEN, J. J. 2001. Innate cytokine profile in patients with complex regional pain syndrome is normal. *Pain*, 91, 259-261.

- 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.
- VAN DER WAL, S., CORNELISSEN, L., BEHET, M., VANEKER, M., STEEGERS, M. & VISSERS, K. 2015. Behavior of neuropathic pain in mice following chronic constriction injury comparing silk and catgut ligatures. *SpringerPlus*, 4, 225.
- VAN ROOIJEN, D. E., ROELEN, D. L., VERDUIJN, W., HAASNOOT, G. W., HUYGEN, F. J., PEREZ, R. S., CLAAS, F. H., MARINUS, J., VAN HILTEN, J. J. & VAN DEN MAAGDENBERG, A. M. 2012. Genetic HLA associations in complex regional pain syndrome with and without dystonia. *J Pain*, 13, 784-9.
- 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.
- VELDMAN, P. H. J. M. Clinical aspects of reflex sympathetic dystrophy. 1995.
- VISSERS, K. C., HOFFMANN, V. L., ADRIAENSEN, H. F., HEYLEN, R. J. & MEERT, T. F. 2005. Increased cold allodynia following intrathecal N-methyl-D-aspartate in rats with a mononeuropathy. *Life Sci*, 77, 414-22.
- WASNER, G., SCHATTSCHNEIDER, J., HECKMANN, K., MAIER, C. & BARON, R. 2001. Vascular abnormalities in reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): mechanisms and diagnostic value. *Brain*, 124, 587-99.
- WEI, H., LI, B., SUN, A. & GUO, F. 2019. Interleukin-10 Family Cytokines Immunobiology and Structure. *Adv Exp Med Biol*, 1172, 79-96.
- 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.
- WILBERS, R. H. P., VAN RAAIJ, D. R., WESTERHOF, L. B., BAKKER, J., SMANT, G. & SCHOTS, A. 2017. Re-evaluation of IL-10 signaling reveals novel insights on the contribution of the intracellular domain of the IL-10R2 chain. *PLoS One*, 12, e0186317.
- WOOLF, C. J. & SALTER, M. W. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288, 1765-9.
- WUPPENHORST, N., MAIER, C., FRETTLOH, J., PENNEKAMP, W. & NICOLAS, V. 2010. Sensitivity and specificity of 3-phase bone scintigraphy in the diagnosis of complex regional pain syndrome of the upper extremity. *Clin J Pain*, 26, 182-9.
- ZINDEL, J. & KUBES, P. 2020. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol*, 15, 493-518.
- ZOOROB, R., KOWALCHUK, A. & MEJIA DE GRUBB, M. 2018. Buprenorphine Therapy for Opioid Use Disorder. *Am Fam Physician*, 97, 313-320.
- ZUNDO, G. 2021. *Genetic compensation in knockouts: a review and evaluation of current models explaining discrepancies in loss-of-function studies.*

## **Danksagung**

Besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater aussprechen, der mir dieses Thema zur Verfügung stellte und mich über die Zeit der Promotion gut betreut hat.

Darüber hinaus danke ich herzlichst meiner Betreuerin, welche mir während dieser Arbeit, trotz vieler anderer Verpflichtungen, mit allen Problemen weiterhelfen konnte und jederzeit ein offenes Ohr für meine Nöte hatte.

Ohne den Rückhalt meiner Eltern wäre diese Arbeit, wie auch das vorangegangene Studium, nicht möglich gewesen. Danke für eure Unterstützung.