

3 Ergebnisse

3.1 Chemokin-mRNA-Expression in der entzündeten Pfote

Die Chemokin-mRNA-Expression der vier Chemokine (KC, CINC-2, MIP-2, LIX) stieg im Verlauf der FCA induzierten Entzündung signifikant an (Tab. 4, bei allen Chemokinen war * $p < 0,05$, ANOVA on ranks). 2 h nach FCA-Injektion war nur der Anstieg von KC signifikant. KC zeigte von allen vier Chemokinen den stärksten Anstieg und verzehnfachte sich von der ersten bis zur zwölften Stunde. LIX war nach 2 h noch nicht nachweisbar und verzeichnete nach 12 h Entzündung die geringste Anzahl der Kopien. Die Expression von CINC-2 und MIP-2 war stärker als die von LIX, erreichte aber nicht die Werte von KC.

Chemokin	Entzündungsdauer (h nach FCA-Injektion)			
	0	1	2	12
KC	< 10	780 ± 170*	3460 ± 880*	7170 ± 1190*
CINC-2	< 10	100 ± 60	60 ± 20	4450 ± 1220*
LIX	< 10	< 10	20 ± 10	2120 ± 360*
MIP-2	< 10	10 ± 4	30 ± 10	3400 ± 630*

Tab. 4 Chemokin-mRNA-Expression der Pfote zu verschiedenen Entzündungszeitpunkten: Chemokin- und Referenzgen-mRNA (RPL-19) aus Pfortengewebe wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach FCA-Injektion mit Hilfe der Light Cycler-PCR quantifiziert (n = 5 Ratten für jeden Zeitpunkt). Die Anzahl der Chemokin-mRNA-Kopien wurde pro 10.000 Kopien RPL-19 berechnet und jedes Chemokin im Vergleich zur Kontrolle (0 h FCA) als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Die mit Stern bezeichneten Werte waren signifikant (* $p < 0,05$, ANOVA on ranks).

3.2 Migration gegen MIP-2

Bei der *in vitro* Zellmigration von Granulozyten unter dem Einfluss von MIP-2 war die Migration im mittleren Konzentrationsbereich bei 10^{-8} M MIP-2 am stärksten (Abb. 1). Hier verfünffachte sich die Zahl der gewanderten Granulozyten im Vergleich zur Kontrolle. Diese Veränderung war signifikant (* $p < 0,05$, ANOVA). Eine Erhöhung der MIP-2-Konzentration führte zu keiner weiteren Erhöhung des Migrationsindex.

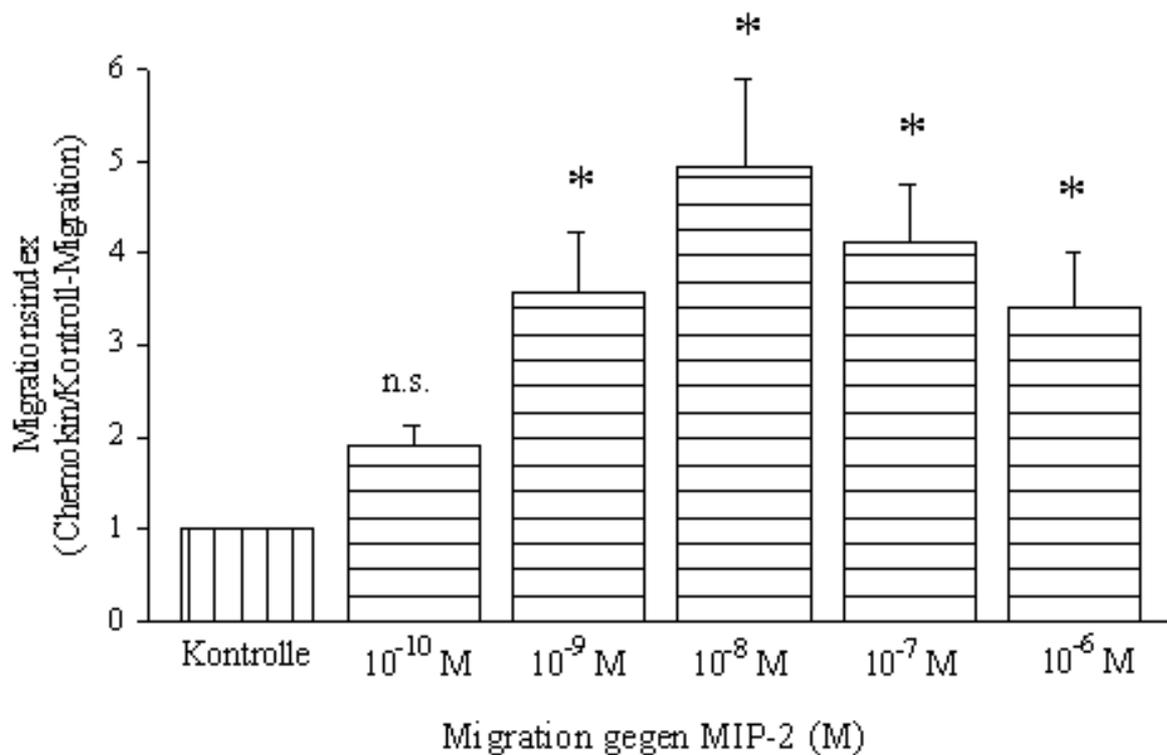


Abb.1 Effekt von MIP-2 auf die in vitro Granulozytenmigration: Die *in vitro* Migration von Granulozyten gegen verschiedene Konzentrationen von MIP-2 wurde bei $n = 5$ Ratten in der Boyden-Kammer gemessen. Der Migrationsindex errechnete sich durch Division der Granulozytenmigration gegen MIP-2 durch die Migration gegen die Kontrolle (Komplettmedium). Er wurde als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Es ergab sich eine dosisabhängige signifikante Migration der Granulozyten gegen MIP-2 (* $p < 0,05$, ANOVA).

3.3 MIP-2-Injektion in die nicht entzündete Pfote

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen der nicht entzündeten Pfote 2 h nach MIP-2-Injektion in verschiedenen Dosierungen ergab einen Anstieg sowohl der Zahl aller CD45⁺ Leukozyten, als auch der Anzahl der RP1⁺ Granulozyten. Die Zellrekrutierung war bei 3 µg MIP-2 am stärksten (Abb. 2). Diese Veränderungen waren signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit NaCl-Injektion (* $p < 0,05$, ANOVA). Die Zahl der Leukozyten versechsfachte sich. Die Zahl der Granulozyten erhöhte sich um den Faktor 12. Die Injektion von MIP-2 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der ED1⁺ Monozyten/Makrophagen bzw. der CD3⁺ Lymphozyten ($p > 0,05$, ANOVA).

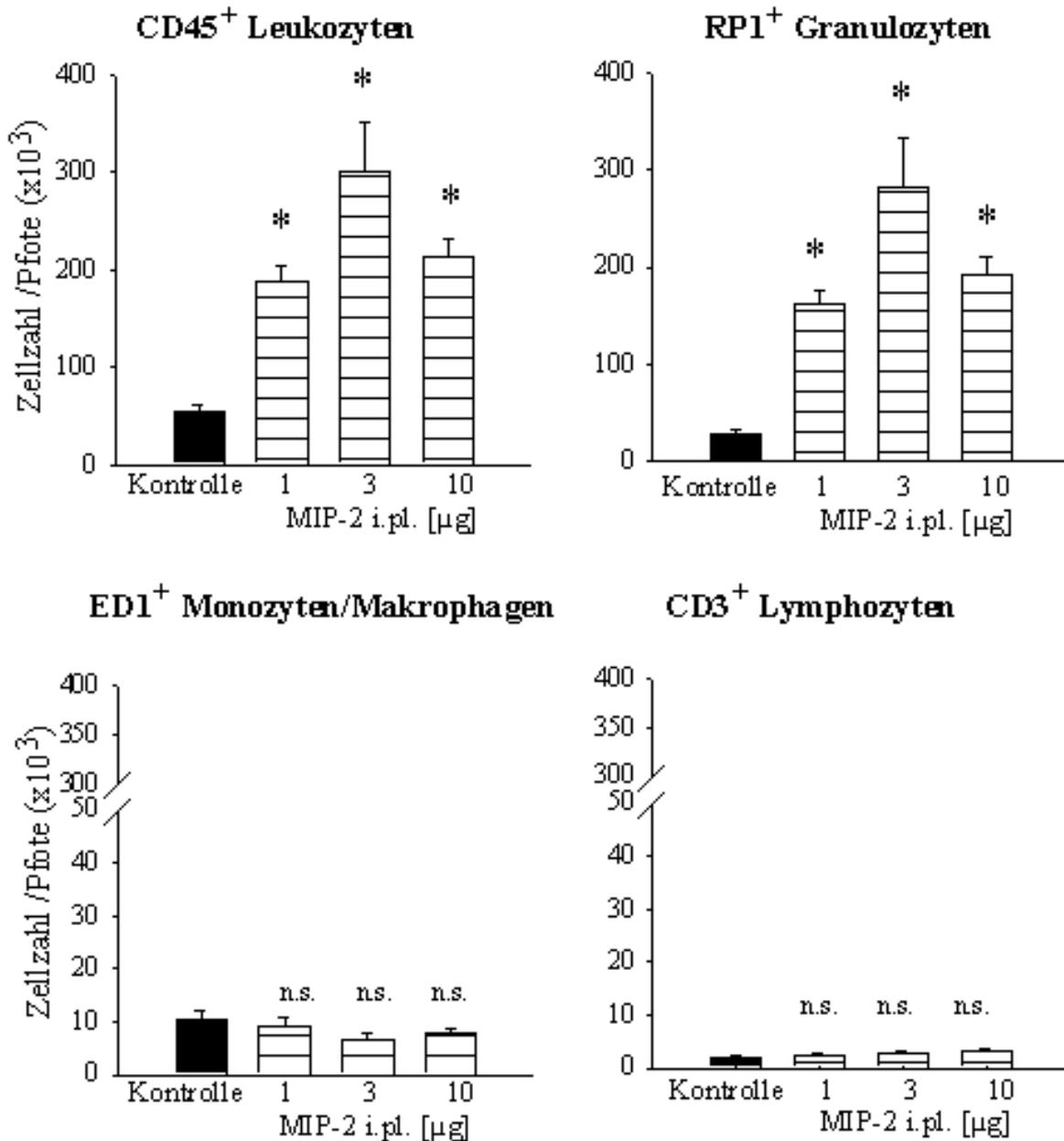


Abb. 2 Effekt von MIP-2 auf die Leukozytenmigration in die nicht entzündete Pfote: Ratten (n = 6-7) wurde i.pl. verschiedene Dosen von MIP-2 (quergestreifte Balken), sowie 0,9 %-ige NaCl-Lösung als Kontrolle (schwarzer Balken) injiziert. Nach 2 h wurden die Leukozytensubpopulationen mit Hilfe der Durchflusszytometrie quantifiziert und als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Die MIP-2-Injektion resultierte in einem dosisabhängigen Anstieg der Leukozytenzahlen, sowie der Granulozytenzahlen (* p < 0,05, ANOVA). Die Anzahl der Monozyten/Makrophagen bzw. der Lymphozyten wurde nicht signifikant verändert (p > 0,05 ANOVA).

3.4 MIP-2-Injektion in die entzündete Pfote

MIP-2 wurde in verschiedenen Konzentrationen analog zur MIP-2-Injektion in die nicht entzündete Pfote verwendet. Zeitgleich wurde FCA (150 µl) injiziert. Bei der durchflusszytometrischen Analyse der Zellen der entzündeten Pfote 2 h nach Injektion von FCA und MIP-2 zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung aller CD45⁺ Leukozyten und aller RP1⁺ Granulozyten (Abb. 3). Im mittleren Konzentrationsbereich von 3 µg war diese Veränderung im Vergleich zur Kontrolle mit FCA-Injektion signifikant (* p < 0,05, ANOVA), wobei sich die Zahl der hämatopoetischen Zellen verdreifachte, die Zahl der Granulozyten versechsfachte. Im Vergleich zur alleinigen MIP-2-Injektion waren die Gesamtzahlen bei der FCA und MIP-2-Injektion um den Faktor drei höher. Eine weitere Dosiserhöhung bei der MIP-2-Injektion führte zum Abfall der Zellzahlen. Die Injektion von FCA und MIP-2 hatte keinen Einfluss auf die Zahl der CD3⁺ Lymphozyten (p > 0,05, ANOVA). Bei den Monozyten/Makrophagen führte sie zu einem Abfall der Zellzahl, der bei höheren MIP-2-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle bei FCA-Injektion ebenfalls signifikant war (* p < 0,05, ANOVA).

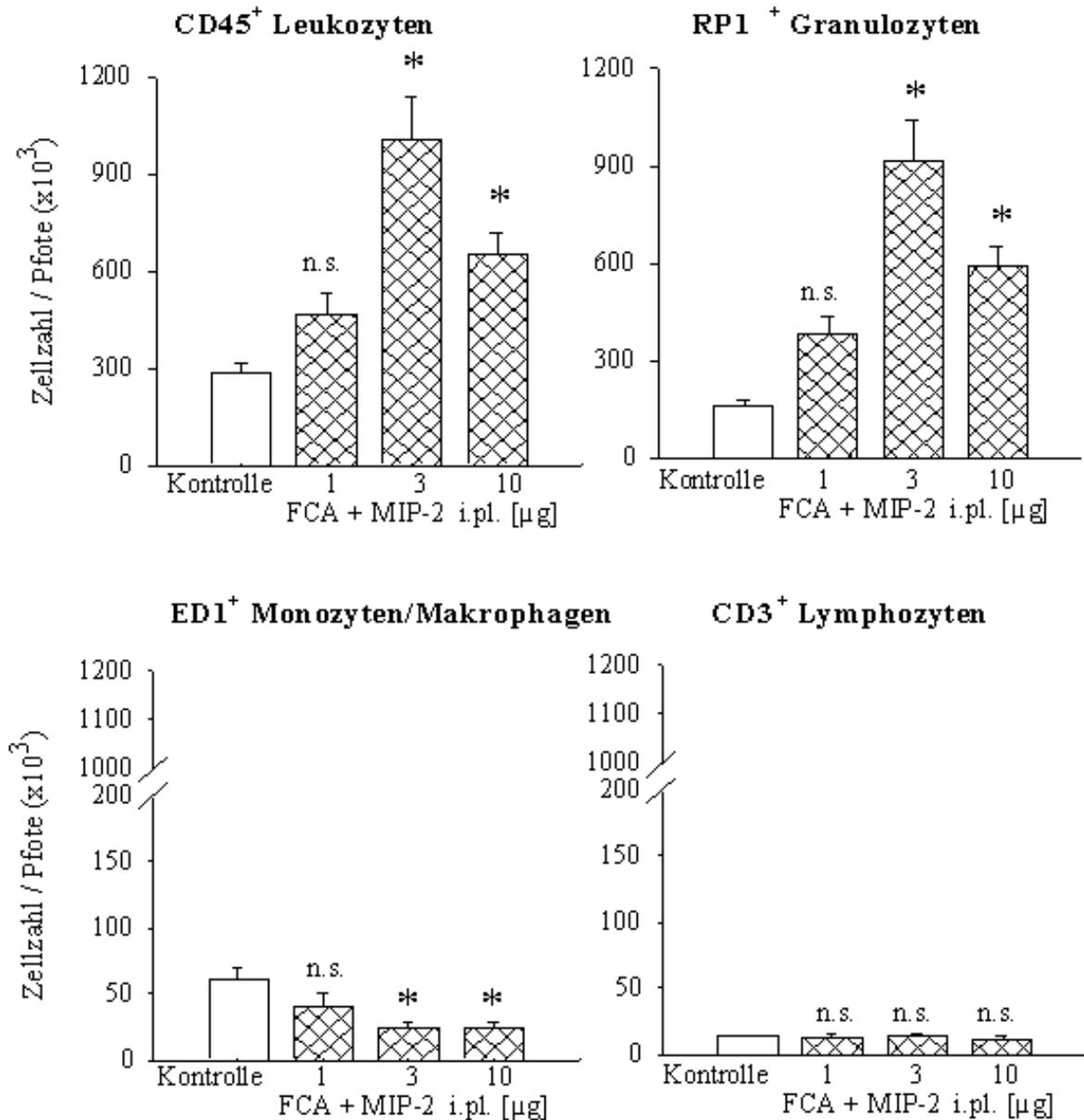


Abb. 3 *Effekt von MIP-2 auf die Leukozytenmigration in die FCA entzündete Pfote:* Ratten (n = 6-7) wurde i.pl. FCA und verschiedene Dosen von MIP-2 (Gitterbalken), sowie 0,9 %-ige NaCl-Lösung als Kontrolle (weißer Balken) injiziert. Nach 2 h wurden die Pfoten wie in Abb. 2 analysiert und die Ergebnisse analog als Mittelwert ± Standardabweichung des Mittelwertes) dargestellt. Die Ko-Injektion von FCA und MIP-2 resultierte in einem dosisabhängigen Anstieg der Leukozytenzahlen, sowie der Granulozytenzahlen (* p < 0,05, ANOVA). Die Anzahl der Monozyten/Makrophagen war signifikant verringert (* p < 0,05, ANOVA), diejenige der Lymphozyten veränderte sich nicht.

3.5 Granulozytendepletion in der entzündeten Pfote

Nach systemischer Depletion der Granulozyten zeigte sich bei der Analyse der entzündeten Pfote 2 h nach FCA-Injektion eine signifikante Verminderung aller CD45⁺ Leukozyten um 60 %. Die Anzahl der RP1⁺ Granulozyten verringerte sich um 90 % ($p < 0,05$, t-Test). Die Anzahl der ED1⁺ Monozyten/Makrophagen veränderte sich durch diese Behandlung nicht. Die Zahl der CD3⁺ Lymphozyten sank signifikant ab ($p < 0,05$, t-test) (Abb. 4). Im Vergleich der Injektion von IgG Kontrollserum (Präimmunserum) zur Injektion von NaCl zeigte sich kein Unterschied hinsichtlich der Variation der Zellgruppen von Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen (Daten hier nicht gezeigt).

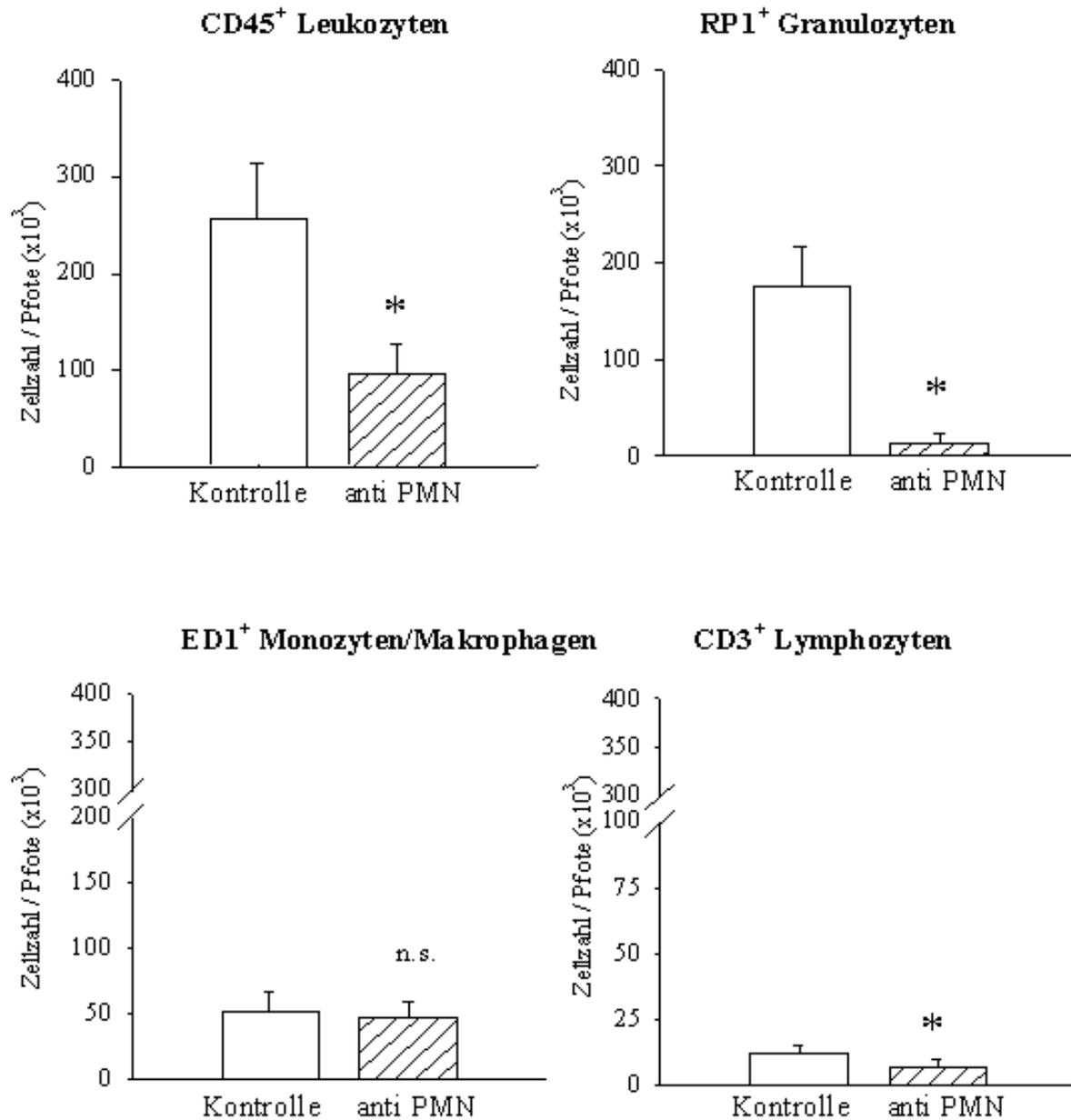


Abb. 4 Effekt von anti-PMN Serum auf die Leukozytenmigration in die FCA entzündete Pfote: Ratten (n = 9) wurde i.v. anti-PMN Kaninchenserum und 18 h später i.pl. FCA ko-injiziert (schräggestreifte Balken). Kontrolltiere erhielten FCA und IgG Kontrollserum (weiße Balken). Nach 2 h wurden die Pfoten analog zu Abb. 2 analysiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Die Ko-Injektion von FCA und anti-PMN Serum resultierte in einer signifikanten Verringerung der Leukozyten-, Granulozyten- und Lymphozytenzahlen (* p < 0,05, ANOVA). Die Anzahl der Monozyten/Makrophagen erfuhr keine signifikante Veränderung.

3.6 Thermale Hyperalgesie

Bei der Messung der thermalen Schmerzschwellen zeigte sich eine signifikante Hyperalgesie 2 h nach FCA-, FCA + MIP-2- und FCA + anti-PMN-Injektion im Vergleich zur Kontrollinjektion mit 0,9 % NaCl (* $p < 0,05$, ANOVA) (Abb. 5). Die Reaktionslatenz halbierte sich, wenn die Ratte für 2 h mit FCA, FCA + MIP-2 oder FCA + anti-PMN behandelt war. Die Injektion von MIP-2 zeigte keine Veränderung der Schmerzschwelle verglichen mit der Injektion von 0,9 % NaCl.

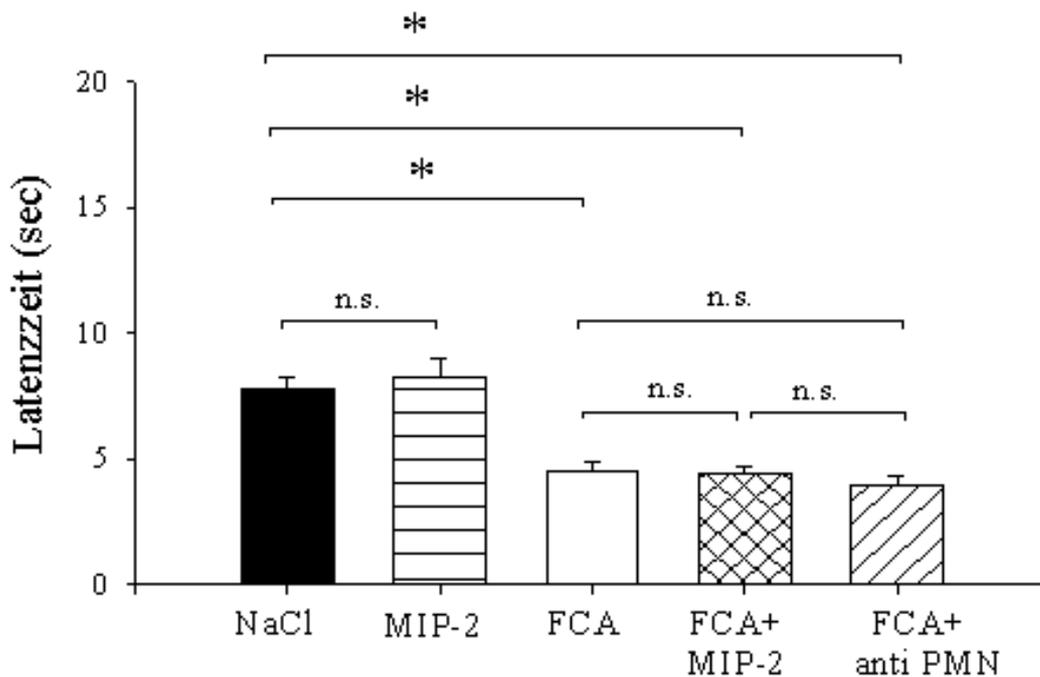


Abb. 5 Effekt von Chemokininjektion bzw. Variation der Granulozytenzahlen auf die thermale Hyperalgesie: Messung der Hyperalgesie der Rattenpfote ($n = 6$) mit Hilfe des Hargreaves-Testes 2 h nach Injektion verschiedener Substanzen. Die Werte wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle mit 0,9 % NaCl (schwarzer Balken) zeigte sich eine signifikante Hyperalgesie nach Injektion von FCA (weißer Balken), sowie nach Ko-Injektion von FCA und MIP-2 (Gitternetzblock) und Ko-Injektion von FCA und anti-PMN Serum (schräggestreifter Balken) (* $p < 0,05$, ANOVA). Die alleinige Injektion von MIP-2 (quergestreifter Balken) führte zu keiner signifikanten Veränderung ($p > 0,05$, ANOVA).

3.7 c-fos-mRNA-Expression im Rückenmark bei entzündeter Pfote

Nach Injektion von FCA, FCA + MIP-2 und FCA + anti-PMN verdoppelte sich die Anzahl der c-fos-mRNA-Kopien auf der injizierten Seite des Rückenmarks im Vergleich zur NaCl-Injektion (Abb. 6). Dieser Anstieg war signifikant (* $p < 0,05$, ANOVA). Die Behandlung von nicht entzündetem Gewebe mit MIP-2 hatte verglichen mit der Kontrollinjektion von 0,9 % NaCl keine Veränderung der c-fos-mRNA-Expression zur Folge ($p > 0,05$, ANOVA).

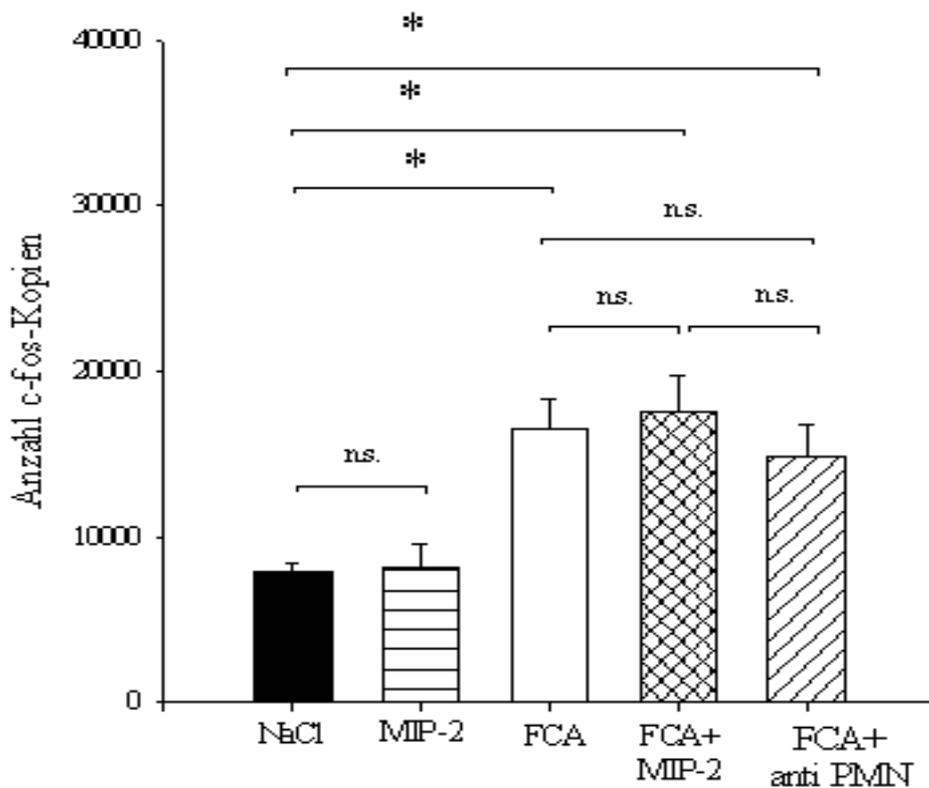


Abb. 6 Effekt von Chemokin-Injektion bzw. Variation der Granulozytenzahlen auf die c-fos-mRNA-Expression im Rückenmark: c-fos-mRNA aus Rückenmarksgewebe des ipsilateralen Hinterhorns wurde mit Hilfe der Light Cycler-PCR quantifiziert (n = 5 Ratten, 2 h nach intraplantarer Injektion verschiedener Substanzen wie unter 3.6). Die Anzahl der c-fos-mRNA-Kopien wurde als Mittelwert \pm Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle mit 0,9 % NaCl (schwarzer Balken) zeigte sich eine signifikante Steigerung der c-fos-mRNA-Expression 2 h nach Injektion von FCA (weißer Balken), sowie nach Ko-Injektion von FCA und MIP-2 (Gitternetzbalken) und Ko-Injektion von FCA und anti-PMN Serum (schräggestreifter Balken) (* $p < 0,05$, ANOVA). Die alleinige Injektion von MIP-2 (quergestreifter Balken) führte zu keiner signifikanten Veränderung ($p > 0,05$, ANOVA).