

4 Diskussion

Die vorliegende Studie untersucht den Einfluss der Granulozyten auf die Hyperalgesie am Modell der FCA-induzierten Entzündung der Rattenhinterpfote. Es zeigte sich, dass

- 1) die CXCR2-Liganden Chemokin-mRNA-Transkription mit Ausnahme von KC nach 2 h gering ist, dann aber stark ansteigt
- 2) MIP-2 *in vitro* zu einer dosisabhängigen Migration von peripheren Blutgranulozyten mit einem Plateau bei 10^{-8} M führt
- 3) die alleinige oder Ko-Injektion des Chemokins MIP-2 *in vivo* selektiv Granulozyten rekrutiert und dass es möglich ist, die Granulozyten in der FCA entzündeten Pfote selektiv zu depletieren
- 4) 2 h nach FCA-Injektion die thermale Hyperalgesie unabhängig von der Anzahl der in der Pfote vorhandenen Granulozyten ist und dass sowohl eine Granulozytendepletion um 90 % als auch verstärkte Granulozytenrekrutierung keine Veränderungen der Schmerzschwellen bewirken
- 5) die alleinige Chemokin-Injektion zur selektiven Granulozyteneinwanderung, nicht aber zu einer thermalen Hyperalgesie führt
- 6) in Übereinstimmung mit den Verhaltensexperimenten
 - (a) die MIP-2-Injektion keine Steigerung der c-fos-mRNA-Expression im Hinterhorn des Rückenmarks (Lamina I und II) verursacht
 - (b) die Manipulation der Granulozytenzahl (d.h. die Depletion oder die verstärkte Rekrutierung) in der FCA entzündeten Pfote keine Änderungen der c-fos-mRNA Expression verursacht.

4.1 Chemokinexpression im Entzündungszeitverlauf

Die Messungen der Chemokin-mRNA-Expression im peripheren Gewebe nach FCA-Injektion ergaben, dass KC, nicht aber die drei anderen CXCR2-Liganden (MIP-2, LIX und CINC-2), zu frühen Entzündungszeitpunkten (2 h) in größerem Umfang gebildet wird. Im weiteren Entzündungsverlauf werden dann alle vier CXCR2-Liganden exprimiert (Tab. 4). Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen, die einen ähnlichen Expressionsverlauf von CXCR2-Liganden in Entzündungsmodellen gemessen haben. Das Expressionsmuster der einzelnen CXCR2-Liganden variiert jedoch in Abhängigkeit vom untersuchten Gewebe und vom experimentellen Modell (Laparotomie, Myokardischämien sowie Endotoxämie)^{27,42,43}.

Diese Chemokine veranlassen Granulozyten, entlang eines Konzentrationsgradienten in Richtung der höheren Chemokinkonzentration zu migrieren. Das Andocken eines der vier genannten Chemokine an den CXCR2-Rezeptor führt zur Transmigration der Granulozyten in das entzündete Gewebe²³⁻²⁶.

Entscheidend scheint zu sein, dass alle vier Chemokine zu einer selektiven Granulozytenrekrutierung führen und die Zellzahlen anderer Populationen, wie z. B. der Monozyten/Makrophagen nicht signifikant ansteigen. Durch kombinierte Applikation mehrerer Chemokine ist eine zusätzliche Steigerung der Granulozytenrekrutierung möglich^{25,31}. Auch hierbei variiert die Effektivität der einzelnen Chemokine je nach untersuchtem Gewebe und verwendetem Entzündungsstimulus. Dies zeigt sich auch in Studien, in denen selektiv einzelne Chemokine und damit die Granulozytenmigration blockiert wurde. In vielen Fällen war die Blockade mehrerer Chemokine nötig, um eine vollständige Blockade der Granulozytenrekrutierung zu erzielen^{14,27,44}.

Um die Granulozytenmigration vollständig zu blockieren ist also die Neutralisation aller im im Gewebe gebildeten Chemokine nötig. Zur Auslösung einer selektiven signifikanten Granulozytenmigration hingegen reicht offensichtlich die Verwendung eines Chemokines aus^{25,31}. Im Rahmen dieser Studie wurde für die Experimente zur Granulozytenrekrutierung exemplarisch ein Chemokin (MIP-2) herausgegriffen. Auf den Stellenwert des CXCR2-Rezeptors wird im folgenden Abschnitt genauer eingegangen.

Ein wichtiges Kriterium für die Auswahl des Chemokins war die fehlende mRNA-Expression zu frühen Entzündungszeitpunkten (2 h). Durch zusätzliche MIP-2-Injektion scheint daher eine Steigerung der Granulozytenrekrutierung möglich.

4.2 Chemotaktische Effekte von Chemokinen

Im peripheren FCA entzündeten Gewebe stellen zu frühen Entzündungszeitpunkten (2 h) die Granulozyten mit 66 % die größte Population dar, während zu späteren Zeitpunkten (> 96 h) die Zahl der Monozyten/Makrophagen mit 73 % überwiegt⁷. Essentiell zur Granulozytenrekrutierung sind die vier bereits beschriebenen CXC-Chemokine: KC, CINC-2, MIP-2 und LIX. Sie binden an den Chemokin-Rezeptor CXCR2 auf der Granulozytenoberfläche²⁵. Mehrere Studien an CXCR2-knock-out Mäusen bzw. bei einer pharmakologischen Blockade des CXCR2-Rezeptors zeigen, dass Granulozyten ohne Aktivierung durch den CXCR2-Rezeptor nicht an den Ort der Entzündung gelangen können^{28,29,44-47}. Dies wurde in unterschiedlichen Modellen wie Pneumonien, Keratitiden und lokalen Entzündungen nachgewiesen^{29,46,47}.

In der vorliegenden Studie wurde zunächst *in vitro* die Migrationsfähigkeit von aus der Ratte isolierten Granulozyten gegen einen repräsentativen CXCR2-Liganden (MIP-2) untersucht. Dabei zeigte sich, dass höhere Chemokin-Konzentrationen ($\geq 10^{-8}$ M) keine Erhöhung der Chemotaxis bewirken (Abb. 1). Diese Ergebnisse stimmen mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* überein^{25,29}. Eine mögliche Erklärung dieses Phänomens könnte in einer Desensitivierung bzw. Rezeptorinternalisierung des CXCR2-Rezeptors zirkulierender Granulozyten bestehen⁴⁸⁻⁵⁰.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich mittels MIP-2 *in vitro* selektiv Granulozyten zur Migration anregen lassen. Diese Granulozytenrekrutierung ist bei Chemokin-Konzentrationen von 10^{-8} M am effektivsten.

4.3 Granulozyten und Hyperalgesie (nicht entzündete Pfote)

Die lokale Injektion des Chemokins MIP-2 führt zu einer selektiven Granulozytenrekrutierung in verschiedene Gewebe wie z.B. die Lunge, das Peritoneum oder eine durch Luft-Injektion erzeugte Höhle^{25,51,52}. Übereinstimmend und ergänzend zeigte die vorliegende Studie, dass MIP-2 dosisabhängig und spezifisch Granulozyten in die nicht entzündete Pfote rekrutiert (Abb. 2). Dabei stellte sich heraus, dass hohe Dosen von MIP-2 (10 μ g) in Bezug auf die Granulozytenrekrutierung weniger effektiv sind, als niedrigere Dosen (3 μ g). Dies könnte auf einer MIP-2-Absorption in die Zirkulation, die zu einem reduzierten Chemokingradienten entlang des Endothels führen würde und/oder - wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt - auf einer Desensitivierung bzw. Rezeptorinternalisierung des CXCR2-Rezeptors zirkulierender Granulozyten beruhen⁴⁸⁻⁵⁰.

Die alleinige Granulozytenrekrutierung mittels MIP-2 führte zur massiven Erhöhung der Granulozytenzahlen in der Pfote, dies bewirkte jedoch keine thermale Hyperalgesie (Abb. 5 und 6).

Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien, die zeigen, dass eine durch Leukozytenrekrutierung ausgelöste Hyperalgesie (sowohl mechanischer als auch thermischer Art) nach Granulozytendepletion reversibel ist^{18,19,53}. Levine et al. injizierten in verschiedenen Experimenten sowohl LTB₄ als auch fMLP intrakutan in die Rattenhinterpfote^{18,19}. LTB₄ und fMLP gelten in der Literatur als chemotaktisch für Granulozyten. Die Injektion rief bei den Tieren eine mechanische Hyperalgesie hervor. Nach Depletion der Granulozyten mittels Hydroxyurea war die Hyperalgesie nicht mehr nachweisbar. Zudem aktivierten sie *in vitro* mittels fMLP Granulozyten und injizierten den Überstand in die Rattenpfote granulo-

zytendepletierter Tiere. Dies rief ebenfalls eine mechanische Hyperalgesie hervor. Die von Levine et al. eingesetzten Mediatoren (fMLP und LTB₄) sind nicht spezifisch für Granulozyten, sondern werden auch auf anderen Zellpopulationen (z. B. Monozyten) exprimiert. Ebenso war die Methode der Depletion nicht granulozytenspezifisch. Als einzige Leukozytenpopulation wurden in diesen Arbeiten Granulozyten gemessen⁵⁴⁻⁵⁷. Interessanter Weise beschrieben Levine et al., dass Glykogen eine selektive Granulozytenrekrutierung erzielt, ohne dass eine mechanische Hyperalgesie auftritt^{18,19}. Levine et al. erklärten dies mittels fehlender Aktivierung der rekrutierten Granulozyten. Die alleinige Anwesenheit von Granulozyten ist in ihren Untersuchungen nicht ausreichend, um eine mechanische Hyperalgesie auszulösen.

Bennett et al. injizierten NGF intraplantar in die Rattenhinterpfote und verursachten dadurch eine durch Myeloperoxidaseaktivität nachgewiesene Rekrutierung von Granulozyten. Dies führte zu einer thermalen Hyperalgesie, die durch Depletion der Granulozyten mittels anti-PMN Serum reversibel war⁵³. Mögliche Erklärungen waren eine Beteiligung von LTB₄ oder eines alternativen Produktes der 5-Lipoxygenase an der Generierung der thermalen Hyperalgesie. In einer weiteren Arbeit zeigte dieselbe Gruppe, dass bei der Behandlung mit anti-PMN Serum auch die Anzahl der Makrophagen signifikant absank⁵⁴. Zudem führt NGF selbst zu einer Reizung sensorischer Neurone, welche auf diesen Stimulus hin pro-algetische Mediatoren wie Calcitonin Gene Related Peptide (CGRP) und Substanz P freisetzen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass fMLP, LTB₄, Komplementfaktor C5A und NGF auch Einfluss auf andere Leukozytenpopulationen als Granulozyten haben können⁵⁴⁻⁵⁷. Somit lässt sich nicht ausschließen, dass die Hyperalgesie bzw. der Verlust derselben durch Manipulation anderer Zellpopulationen als der Granulozyten verursacht wird. Zudem lässt sich die chemotaktische Wirkung der Mediatoren nicht von einer durch direkte neuronale Aktivierung ausgelösten Hyperalgesie abgrenzen.

Es lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Studie die selektive Granulozytenrekrutierung mittels MIP-2 in nicht entzündetes Gewebe keine thermale Hyperalgesie zur Folge hat

4.4 Granulozyten, Chemokine und Hyperalgesie (nicht entzündete Pfote)

In der vorliegenden Studie wird das Chemokin MIP-2 zur Granulozytenrekrutierung verwendet. Im Gegensatz dazu gibt es mehrere Untersuchungen, die eine Hyperalgesie nach Injektion von CXCR2-Liganden nachweisen. Gemeinsam ist diesen Studien, daß eine wesentlich geringere Chemokindosierung (3 µg MIP-2 in der vorliegenden eigenen Studie versus Chemokin-

dosierungen im ng-, bzw. pg-Bereich) verwendet und dass eine Granulozytenmigration nicht untersucht wurde⁵⁸⁻⁶⁴.

Oh et al. untersuchten beispielsweise *in vivo* die Wirkung von intradermal in die Rattenpfote injizierten Chemokinen in einer Dosierung von 250 ng auf die Hyperalgesie. Ein wichtiger Unterschied zu den vorliegenden eigenen Untersuchungen besteht darin, dass die von Oh et al. *in vivo* untersuchten Chemokine, welche eine Hyperalgesie auslösten, keine Liganden des CXCR2-Rezeptors, sondern Liganden der CC-Rezeptoren bzw. des CXCR4-Rezeptors waren. Lorenzetti et al. untersuchten ebenfalls die Hyperalgesie nach Chemokin-Injektion in noch geringeren Dosen (3-300 pg) als Oh et al.⁶³. Im Gegensatz zu dem in der vorliegenden eigenen Studie verwendeten Schmerzmodell, in dem eine Detektionsschwelle gemessen wurde, setzten Lorenzetti et al. einen stärkeren Schmerzreiz: Hierbei wurde ein konstanter Druck von 20 mmHg auf die Rattenpfote appliziert, bis die Ratte eine sogenannte „freezing reaction“ zeigte. Dies bedeutet, dass die Ratte eine kurze Apnoe entwickelt, Kopf und Vorderpfoten zurückzieht und gleichzeitig die Fluchtbewegungen verringert. Gemessen wurde bei diesem Modell das Zeitintervall bis zum Auftreten der „freezing reaction“. Dieses Schmerzmodell beinhaltet die Aktivierung des sympathischen Nervensystems, so dass die 2 h nach intraplantarer CINC-1-Injektion hergerufene mechanische Hyperalgesie nicht lokal beschränkt war, sondern systemischer Natur, d.h. auch in der kontralateralen, nicht Chemokin-injizierten Pfote auftrat.

Ebenso fand die Arbeitsgruppe von Cunha et al. in mehreren Studien eine mechanische Hyperalgesie nach intraplantarer IL-8-, bzw. KC-Injektion bei Verwendung niedriger Chemokindosen (1-100 pg, bzw. 1-10 ng)⁵⁸. Die Messung der Hyperalgesie erfolgte analog zu der zuvor beschriebenen Schmerzmessung der Arbeitsgruppe von Lorenzetti et al., indem ein Zeitintervall bis zum Auftreten einer „freezing reaction“ gemessen wurde bzw. mittels eines elektronischen Anästhesiometers⁶¹. Cunha et al. gehen davon aus, dass die KC-vermittelte Hyperalgesie sowohl über das sympathische Nervensystem, als auch über den Cyclooxygenase (COX)-Signalweg zustande kam, da die Hyperalgesie durch Guanethidin und Indomethacin verringert wurde. Unterschiede zu den Ergebnissen der vorliegenden eigenen Studie könnten daher in der sehr geringen verwendeten Chemokindosierung, in der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege (sympathisches Nervensystem), in der Auswahl des Schmerzmodelles und in der Methode der Schmerzmessung liegen.

Unterstützend zu den eigenen Daten zeigten Oprea et al. *in vitro*, dass CXCR2-Liganden (IL-8) keine Freisetzung des potentiell hyperalgetischen Mediators CGRP zur Folge haben⁶⁵. Die

Arbeitsgruppe untersuchte die Haut der Rattenhinterpfote mit dem dazugehörigen Subkutangewebe in temperaturkontrollierten Teströhrchen mit physiologischer Flüssigkeit. Als Maß für die Hyperalgesie bestimmten sie die Hitze-induzierte Freisetzung von CGRP. Dieses ist ein in Vesikeln peripherer Nozizeptoren vorhandenes Neuropeptid. Ein peripherer, schmerzhafter Reiz führt zur Aktivierung von Nozizeptoren, die daraufhin Neuropeptide freisetzen. Eine der freigesetzten Substanzen ist CGRP. Oprea et al. verwendeten die CGRP-Freisetzung als Maß für eine thermale Hyperalgesie. Nach Erhöhung der Hauttemperatur detektierten sie die Freisetzung von CGRP. Während die CGRP-Freisetzung durch IL-6 gesteigert wurde, änderte sie sich nach Hinzufügen von IL-8 nicht. Das deutet darauf hin, dass IL-8, ein Ligand des CXCR2-Rezeptors, in diesem Modell nicht zur Hyperalgesie beiträgt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einige Chemokine vermutlich in der Lage sind, durch direkte neuronale Aktivierung eine Hyperalgesie auszulösen. Es gibt bisher keine Studien, die an einem peripheren Schmerzmodell *in vivo* eine Hyperalgesie nach Gabe eines CXCR2-Liganden nachweisen. Im Gegenteil: Die Gabe eines beispielhaft ausgewählten CXCR2-Liganden (MIP-2) führte in der vorliegenden Studie zu keiner thermalen Hyperalgesie.

4.5 Granulozyten und Hyperalgesie (FCA entzündete Pfote)

Bisher gibt es noch keine Untersuchungen zur Ko-Injektion eines unspezifischen Entzündungsagens mit einem Chemokin. In den hier vorgelegten Untersuchungen führte die Ko-Injektion von FCA und MIP-2 zu einem erheblichen Anstieg der Anzahl der Granulozyten (Abb. 3). Hingegen führte die systemische Depletion der Granulozyten zu einer Abnahme der Granulozyten in der Pfote um > 90% (Abb. 4). Weder die vermehrte Granulozytenrekrutierung noch die selektive und hochgradige Depletion führte zu einer Veränderung der thermalen Hyperalgesie (Abb.5).

Unterstützend zu diesen Daten wurde in einer weiterführenden Studie gezeigt, dass 2 h nach Ko-Injektion von FCA und MIP-2 bzw. nach Granulozytendepletion nicht nur die thermale, sondern auch die mechanische Hyperalgesie unverändert bleibt⁶⁶. In einer anderen Studie konnte durch die kombinierte Blockade zweier Chemokine (anti-KC und anti-MIP-2 Antisera) eine signifikante Reduktion der Granulozytenmigration erzielt werden, ohne dass hierdurch Veränderung der mechanischen Hyperalgesie auftrat¹⁴. Auch in diesen Studien war die Hyperalgesie unabhängig von der in der entzündeten Pfote vorhandenen Granulozytenanzahl. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass FCA zur Bildung und Sekretion einer Vielzahl proalgetischer Mediatoren (z.B. Zytokine, Bradykinin, Protonen^{1,2}) durch ortsständige Zellen

und Immunzellen führt. Eine Veränderung der Granulozytenanzahl hätte daher keinen Einfluss auf die Hyperalgesieschwelle. Offensichtlich stehen die Auswirkungen der FCA-induzierten Entzündung im Vordergrund und haben in Bezug auf die Hyperalgesie der Ratte eine größere Bedeutung als Veränderungen der Granulozytenzahlen.

Andere Untersuchungen weisen darauf hin, dass Mastzellen und Makrophagen hinsichtlich der Hyperalgesie eine entscheidendere Rolle spielen könnten als Granulozyten: Ribeiro et al. fanden beispielsweise am Modell der Zymosan-, bzw. Essigsäure-induzierten Hyperalgesie eine Abnahme der Schmerzantwort nach Mastzellen- und Makrophagendepletion. Sie wiesen nach, dass Makrophagen und Mastzellen pro-algetische Mediatoren wie TNF- α und IL-1 β sezernieren⁶⁷.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Falle der FCA entzündeten Hinterpfote die Auswirkungen dieses Entzündungsstimulus offenbar derart im Vordergrund stehen, dass Manipulationen der Granulozytenzahlen (massive Rekrutierung oder hochgradige Reduktion) hinsichtlich der thermalen Hyperalgesie eine allenfalls untergeordnete Rolle spielen. Die Granulozytendepletion um > 90 % bei gleichzeitig unveränderter Hyperalgesie spricht gegen eine signifikante Rolle dieser Leukozytenpopulation; jedoch lässt sich ein Einfluß der verbliebenen 10 % der Granulozyten nicht sicher ausschließen.

4.6 Spinale c-fos-mRNA-Expression als Hyperalgesiemarker

Peripher einwirkende Reize, die für die Ratte schmerzhaft sind, führen zu einer gesteigerten c-Fos-Produktion in korrespondierenden Rückenmarksanteilen der ipsilateralen Seite. Der exakte Bereich der c-Fos-positiven Neurone unterscheidet sich je nach Reizdauer: akute Stimuli führen zu einer Erhöhung der c-Fos-Expression in den oberflächlichen Laminae (I, II und V), während sich bei chronischen Stimuli die Mehrzahl der c-Fos-positiven Neurone in tieferen Rückenmarksanteilen (Laminae V, VI, sowie Laminae VII, VIII und X) detektieren lässt (vgl. 1). Eine FCA-Injektion kann je nach Zeitdauer der Entzündung sowohl einen akuten als auch einen chronischen Reiz darstellen. Ma et al. untersuchten nach FCA-Injektion in die Rattenhinterpfote zeitabhängig die c-Fos-Expression in den verschiedenen Rückenmarksbereichen mit Hilfe der Immunhistochemie³⁵. Dabei zeigte sich, dass zu frühen Entzündungszeitpunkten (1-2 h nach FCA-Injektion) die Mehrzahl der c-Fos-positiven Neurone in den oberflächlichen Rückenmarksschichten detektierbar war (akuter Reiz), wohingegen zu späteren Entzündungszeitpunkten (chronischer Reiz) c-Fos mehrheitlich in tieferen Schichten nachweisbar war. Die Anzahl der c-Fos-positiven Neurone ist dabei abhängig von der Intensität des Stimu-

lus: je schmerzhafter der peripher einwirkende Reiz, desto höher ist die c-Fos-Expression³⁴. Die zusätzliche Applikation eines akuten schmerzhaften Stimulus auf eine bereits entzündete Stelle, wie z.B. mechanischer Druck oder Hitze führt zu einer weiteren Steigerung der c-Fos-Produktion. Ma et al. zeigten dies am Beispiel der mechanischen Hyperalgesie: die Applikation eines 2 s andauernden Druckes auf eine chronisch FCA entzündete Rattenpfote führte zu einer massiven Erhöhung der c-Fos-Expression verglichen mit Kontrolltieren welche „nur“ eine FCA-Injektion erhalten hatten bzw. nicht-injizierten Tieren³⁵. Es gibt andere Studien bezüglich des Zusammenhangs von Schmerz und c-Fos in denen analgetische Substanzen in entzündete Bereiche injiziert wurden. Dies führte zu einer verringerten bzw. vollständigen Unterdrückung der c-Fos-Expression^{36,37}. Eine der wenigen Arbeiten, die speziell auf die Frage des Zusammenhangs zwischen Hyperalgesie und c-fos-mRNA-Expression eingehen, ist eine Untersuchung von Li et al.³⁸. Sie zeigten, dass nicht nur die erhöhte c-Fos-Protein-Produktion, sondern auch die erhöhte c-fos-mRNA-Expression mit einer Hyperalgesie einhergeht.

In Übereinstimmung mit den obengenannten Ergebnissen zeigt die vorliegende Studie, dass 2 h nach FCA-Injektion eine Erhöhung der c-fos-mRNA-Expression in den korrespondierenden Anteilen des Rückenmarkes nachweisbar ist. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen der Verhaltensexperimente zeigt sich, dass die Anzahl der Granulozyten im FCA-Modell keinen Einfluss auf die c-fos-Expression zu haben scheint. So gibt es keine signifikanten Unterschiede in der Menge der c-fos-mRNA zwischen Pfortengewebe, in das nur FCA injiziert wurde, und Gewebe, in das zusätzlich zur FCA-Injektion Granulozyten rekrutiert oder in dem Granulozyten depletiert wurden. Zudem zeigt sich, dass eine Granulozytenrekrutierung durch Injektion eines CXCR2-Liganden in nicht entzündetes Pfortengewebe zu keiner Erhöhung der c-fos-Expression führt.

Die Ergebnisse der c-fos-mRNA-Expression bestätigen somit die Ergebnisse der thermalen Hyperalgesie: (1) eine akute Entzündung durch FCA-Injektion führt zu einer von der Anzahl der vorhandenen Granulozyten unabhängigen Hyperalgesie, und (2) eine Einwanderung von Granulozyten durch Chemokin-Injektion in gesundes Gewebe bewirkt keine Hyperalgesie.

4.7 Methodenkritik

- **Zeitpunkt 2 h:** Es wurde selektiv ein Zeitpunkt (2 h) untersucht, so dass eine Aussage über spätere Zeitpunkte nicht möglich ist. In einer anderen Studie wurde die thermale Hyperalgesie im Zeitverlauf bestimmt⁹. Dabei zeigten sich auch zu späteren Entzün-

dungszeitpunkten (z.B. bis zu 12 h nach Injektion von MIP-2) keine Veränderungen in der Hyperalgesie verglichen mit den Ergebnissen nach 2 h.

- **Granulozytenrekrutierung mittels MIP-2:** Zur Granulozytenrekrutierung wurde beispielhaft das Chemokin MIP-2 untersucht. Möglicherweise wäre bei der Verwendung eines anderen Chemokines (KC, LIX oder CINC-2) eine noch stärkere Rekrutierung messbar gewesen. Dies erscheint jedoch unwahrscheinlich, da es Studien gibt, die zeigen, dass mittels MIP-2-Injektion eine effektivere Granulozytenrekrutierung möglich ist, als beispielsweise mittels KC^{30,31}.
- **Granulozytendepletion:** Die Depletion der Granulozyten mittels anti-PMN Kaninchenserum bewirkte lediglich eine Depletion um 90 %. Dies ist eine hochgradige Reduktion, jedoch keine komplette Depletion. Daher ist nicht auszuschließen, daß die verbliebenen 10 % der Granulozyten Effekte auf die Hyper- bzw. Analgesie haben. In der Mehrzahl der Experimente wurde als Kontrolle der Granulozytendepletion eine NaCl-Injektion vorgenommen. Jedoch wurde in einem Experiment vorher bestätigt, dass die Injektion von einem IgG Kontrollserum (so genanntes Präimmenserum) keine Veränderungen der Leukozytenpopulationen oder der Hyperalgesie im Vergleich zu einer NaCl-Injektion auslöst.
- **Thermale Hyperalgesie:** Manipulationen der Granulozytenzahlen führten zu keiner Veränderung der thermalen Hyperalgesie. Dies könnte ein Problem des verwendeten Testes der thermalen Hyperalgesie sein: Die Latenz bis die Ratte die Pfote wegzieht, beträgt im Falle der Ko-Injektion von FCA und einer anderen Substanz nur 5 s. Es wäre denkbar, dass die eingesetzte Messmethode nicht hinreichend sensitiv ist, um Veränderungen unterhalb eines Wertes von 5 s zu erfassen. Daher könnte eine Zunahme der Hyperalgesie eventuell nicht detektiert werden. In drei weiterführenden Studien (Daten hier nicht gezeigt^{9,14,66}) wurde die Hyperalgesie mit einem alternativen Verhaltenstest, der mechanischen Hyperalgesie (modifizierter Randall-Sellito-Test), quantifiziert. Dabei wird ein kontinuierlich zunehmender Druck auf eine definierte Stelle der Rattenpfote appliziert. Es wird der Druck bestimmt, der nötig ist, um ein Wegziehen der Pfote als Ausdruck des Schmerzes zu erreichen. Die Ergebnisse der drei weiterführenden Untersuchungen bestätigen die in dieser Studie gefundenen Daten, dass eine Manipulation der Granulozytenzahlen in der 2 h FCA entzündeten Pfote keine Veränderung der mechanischen Hyperalgesie bewirkt^{9,14,66}. Eine dritte Möglichkeit wäre die Verwendung von von Frey-Haaren. Diese Haare bestehen aus Stahl und es

gibt verschiedene Haarstärken. Der Druck auf das zu untersuchende Gewebe wird kontinuierlich erhöht, bis sich das verwendete Haar biegt. Zieht die Ratte die Pfote nicht weg, wird das nächst stärkere Haar verwendet. Dieser Schritt wird so lange in auf- und absteigender Reihenfolge wiederholt, bis die nozizeptive Schwelle ermittelt wurde. Hierbei wird also ebenfalls eine Detektionsschwelle gemessen, wobei die logarithmischen Unterschiede der Steifheit der Haare möglicherweise eine höhere Sensitivität gehabt hätte. Zusammenfassend zeigen sich also gleiche Ergebnisse bei zwei Standardverfahren der Schmerzmessung, wobei ein alternatives drittes in weiteren Studien ebenfalls untersucht werden sollte.

- **Thermale Hyperalgesie nach alleiniger MIP-2-Injektion:** Nach alleiniger MIP-2-Injektion ohne FCA findet möglicherweise keine Aktivierung der Granulozyten statt, so dass keine thermale Hyperalgesie messbar ist. In einer weiterführenden Studie wurde diese Frage näher untersucht (nicht dargestellte eigene Daten⁹). Es zeigte sich, dass die alleinige MIP-2-Injektion nach 2 h eine vollständige Aktivierung der Granulozyten, d.h. unter anderem eine Hochregulation von Cluster of Differentiation 11b (CD11b) und CD18, einhergehend mit einer Herunterregulation von L-Selektin zur Folge hat. CD11b, CD18 und L-Selektin sind Zelloberflächenmarker, die essentieller Bestandteil der Transmigration der Granulozyten durch das Endothel in entzündetes Gewebe sind¹³. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Ursache der fehlenden Nachweisbarkeit der thermalen Hyperalgesie in der mangelnden Granulozytenaktivierung liegt.
- **Chemokin-mRNA-Nachweis:** Da mit Hilfe der Light Cycler-PCR lediglich die Chemokin-mRNA quantifiziert wurde, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Chemokin-mRNA-Expression eine Produktion der Chemokinproteine nach sich zieht. In einer anderen Arbeit wurde mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) nachgewiesen, dass die Chemokine KC, MIP-2 und CINC-2 zum Zeitpunkt 12 - 24 h nach FCA-Injektion das Maximum ihrer Produktion erreichen. Zu frühen Zeitpunkten (2 h nach FCA) sind nur KC- und MIP-2-Protein, nicht aber CINC-2-Protein signifikant erhöht¹⁴.
- **C-fos-mRNA-Nachweis:** Im Gegensatz zu den meisten in der Literatur vorhandenen Studien wurde hier nicht das Protein c-Fos nachgewiesen, sondern die c-fos-mRNA im Rückenmark quantifiziert. Die Expression wurde nicht in den einzelnen Laminae gemessen, sondern lediglich die Gesamt-c-fos-mRNA-Menge im korrespondierenden

ipsilateralen Hinterhorn. Im Hinblick auf die Frage, ob die Messung der c-fos-mRNA mit der Messung des Proteines c-Fos korreliert, zeigte eine weiterführende Studie, dass die Immunhistochemie der c-Fos-positiven Neurone im Rückenmark in einem analogen Versuchsaufbau mit den Ergebnissen der c-fos-mRNA-Messung übereinstimmt⁹. 2 h nach MIP-2-Injektion in die Rattenhinterpfote (akuter Stimulus) wurde im ipsilateralen korrespondierenden Hinterhorn des Rückenmarkes in den Laminae I und II keine Veränderung der Anzahl der c-Fos-positiven Neurone im Vergleich zur Kontroll-Injektion von 0,9 % NaCl gefunden. Die Zahl der c-Fos-positiven Neurone war jedoch wie erwartet 2 h nach FCA-, FCA- und MIP-2-Injektion bzw. nach FCA-Injektion und Granulozytendepletion signifikant hochreguliert.