

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Granulozyten auf die Hyperalgesie am Modell der FCA-induzierten Entzündung der Rattenhinterpfote untersucht. Sämtliche Untersuchungen beziehen sich auf frühe Zeitpunkte (2 h nach FCA-Injektion), da zu diesem Zeitpunkt Granulozyten als quantitativ größte Leukozytenpopulation in das entzündete Gewebe migrieren<sup>7</sup>. Um den Zusammenhang zwischen der Anzahl der im entzündeten Gewebe vorhandenen Granulozyten und der zeitgleich auftretenden Hyperalgesie genauer untersuchen zu können, wurde die Zahl der Granulozyten im Gewebe variiert. Dazu wurde ein Chemokin benutzt, das speziell Granulozyten rekrutiert, sowie ein Antiserum, das Granulozyten gezielt signifikant reduziert.

Granulozyten werden über eine Signalkaskade von Adhäsionsmolekülen zur Transmigration durch das Endothel des entzündeten Gewebes angeregt<sup>14</sup>. Die Chemokine KC, MIP-2, CINC-2 und LIX spielen dabei eine wichtige Rolle. Granulozyten migrieren entlang eines Konzentrationsgradienten in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration<sup>23-26</sup>. Die Granulozytenrekrutierung mittels Chemokinen erfolgt bei Ratten ausschließlich über den CXCR2-Rezeptor, an den die vier CXCR2-Liganden KC, MIP-2, CINC-2 und LIX binden.

Im ersten Schritt wurde die Chemokin-mRNA-Expression von KC, MIP-2, CINC-2 und LIX nach FCA-Injektion in die Rattenpfote zu frühen Entzündungszeitpunkten gemessen. Dabei zeigte sich, dass die mRNA-Produktion mit Ausnahme von KC zu frühen Zeitpunkten ( $\leq 2$  h nach FCA) noch gering ist und erst im späteren Entzündungsverlauf (12 h nach FCA) deutlich ansteigt. Zum Zeitpunkt 2 h erscheint eine Steigerung der Granulozytenmigration durch zusätzliche Chemokin-Injektion möglich. Da alle vier Chemokine die Granulozyten über denselben Rezeptor (CXCR2) selektiv und spezifisch rekrutieren<sup>25,31</sup> und Studien nachweisen, dass MIP-2 hinsichtlich der Granulozytenrekrutierung wirksamer ist als KC<sup>30,31</sup>, wurde für die weiteren Untersuchungen das Chemokin MIP-2 ausgewählt. *In vitro* wurde die Migration von Granulozyten durch MIP-2 spezifisch induziert. Die höchste Migration wurde mit einer MIP-2-Konzentration von  $10^{-8}$  M erreicht, bei höheren Konzentrationen fiel der Migrationssindex ab. Versuche anderer Arbeitsgruppen *in vivo* zeigen, dass bei höheren Chemokin-Konzentrationen eine Rezeptorinternalisierung bzw. Rezeptorherunterregulation stattfindet, so dass noch höhere Chemokindosen auf Grund der limitierten Anzahl an Rezeptoren vermutlich keine stärkere Migration erzielen können<sup>48-50</sup>.

Im nächsten Schritt wurde *in vivo* gezeigt, dass zum Zeitpunkt 2 h eine selektive und effiziente Granulozytenrekrutierung durch MIP-2 möglich ist, sowohl in Kombination mit, als auch ohne eine FCA-Injektion. Andere Zellpopulationen, wie z.B. Monozyten/Makrophagen, die die Hyperalgesie möglicherweise zusätzlich beeinflussen, wurden nicht signifikant verändert. Mittels eines anti-PMN Serums wurden die Granulozyten in der Pfote selektiv signifikant reduziert. 2 h nach FCA-Injektion waren bei granulozytendepletierten Ratten nur noch 10 % Granulozyten in der Pfote vorhanden, während sich die Zahlen anderer Zellen, wie z.B. der Monozyten/Makrophagen nicht signifikant veränderten.

Der Einfluss der Granulozytenzahl auf die Hyperalgesie liess sich so näher quantifizieren: die FCA-induzierte Entzündung führte zu einer von der Anzahl der Granulozyten weitgehend unabhängigen thermalen Hyperalgesie. In der FCA entzündeten Rattenhinterpfote stand offensichtlich der Entzündungsstimulus durch FCA im Vordergrund. Weder die Steigerung der Granulozytenanzahl noch die signifikante Reduktion der Granulozyten bewirkte Veränderungen der thermalen Hyperalgesie. Zudem zeigte sich, dass die alleinige MIP-2-Injektion zwar die Granulozytenanzahl in der Rattenpfote selektiv erhöhte, dass dies jedoch keine thermale Hyperalgesie bewirkte.

Um die Ergebnisse der Verhaltensexperimente zu unterstützen, wurde die *c-fos*-mRNA-Expression im ipsilateralen Hinterhorn des korrespondierenden Rückenmarkanteiles gemessen. Dieser Ansatz basiert auf den Ergebnissen verschiedener Studien, in denen die Höhe der Expression von *c-Fos*-Protein mit der Intensität eines peripher einwirkenden schmerzhaften Stimulus positiv korrelierte<sup>36,37</sup>. Dabei war die Höhe der *c-Fos* Proteinexpression direkt von der Intensität des schmerzhaften Reizes abhängig. Die Ergebnisse der Messung der *c-fos*-mRNA-Produktion im Rückenmark bestätigten die Ergebnisse der thermalen Hyperalgesie: (1) Weder die verstärkte Granulozyteneinwanderung noch die Depletion bewirkten Veränderungen der *c-fos*-mRNA-Produktion verglichen mit der alleinigen FCA-Injektion. (2) Die alleinige MIP-2-Injektion führte zur signifikanten Granulozyteneinwanderung, aber in Übereinstimmung mit den Verhaltensexperimenten zu keiner erhöhten *c-fos*-mRNA-Produktion.

### Schlussfolgerung

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Modell der FCA-induzierten Entzündung der Rattenhinterpfote der Entzündungsstimulus durch FCA offensichtlich derart im Vordergrund steht, dass Erhöhung bzw. signifikante Reduktion der Granulozyten keine Veränderungen der thermalen Hyperalgesie bewirken. Da Granulozyten nur eine an der FCA-Entzündung betei-

ligte Leukozytenpopulation darstellen, sind möglicherweise andere Leukozyten, wie z.B. Monozyten oder Lymphozyten von größerer Bedeutung für die Entstehung einer Hyperalgesie. Die alleinige Chemokin-Injektion (hier von MIP-2) führt zu einer signifikanten Granulozytenrekrutierung, aber nicht zu einer Hyperalgesie.

Da in der vorliegenden Studie keine Hinweise einer Beteiligung der Granulozyten bzw. eines speziell Granulozyten rekrutierenden CXCR2-Liganden (MIP-2) an der Hyperalgesie gefunden werden konnten, erscheint es sinnvoll, in weiterführenden Studien die analgetische Wirkung der Granulozyten näher zu untersuchen. Möglicherweise wird dies letztlich zur Entwicklung neuer Medikamente führen, die lokal analgetisch wirksam sind und im Idealfall keine Nebenwirkungen verursachen.