

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 170 - 220 g eingesetzt. Die Tiere stammten aus der Zucht des Institutes für Infektionsmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin. Die Ratten wurden in einem 12 h-Tag-12 h-Nacht-Rhythmus gehalten und hatten freien Zugang zu sterilisiertem Wasser und Standard-Trockenfutter. Das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin genehmigte die Tierversuche (Aktenzeichen Reg. 0010/01, Datum der Genehmigung: 14.05.2001). Die Versuchsprotokolle entsprachen den Leitlinien der International Association for the Study of Pain ³⁴.

2.2. Herstellung von Liposomen

Die Herstellung der Liposomen erfolgte im Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin Berlin (AG Drug Targeting; Frau Dr. R. Reszka und Frau J. Richter). Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Phosphatidylcholin (86 mg) und Cholesterol (8 mg) (vgl. 2.7 Chemikalien) wurden in 10 ml Chloroform in einem Kolben gelöst und unter Vakuum getrocknet. Die vakuumgetrocknete Substanz diente als Grundlage zur Herstellung dreier Liposomenarten: leere, Clodronat- und Fluoreszenz-haltige. Der am Boden der Flasche entstandene Lipidfilm wurde durch sanfte Rotation in 20 ml PBS (Phosphat gepuffertes Kochsalz, phosphate buffered saline) gelöst (leere Liposomen). Zur Herstellung Clodronat-haltiger bzw. Fluoreszenz-haltiger Liposomen wurden 5 g Clodronat oder der Fluoreszenzfarbstoff 5,6-Carboxyfluorescein (vgl. 2.7) in PBS gelöst ^{33, 35}. Von der Ausgangslösung wurden 2 - 5 % in den Liposomen verkapselt. Die Liposomen wurden jeweils zweimal in PBS resuspendiert, um nicht verkapselte Substanzen auszuwaschen, anschließend zentrifugiert (15.000 U/min in 4 °C für 30 min) und in 10 ml PBS resuspendiert. Die Liposomen wurden mit ungesättigten Fettsäuren hergestellt und über 2 h mit Stickstoff begast, um sie gegen Oxidation zu stabilisieren. Der Liposomendurchmesser wurde mit Hilfe des Partikelgrößen-Analysators gemessen und betrug 3,5 - 4 µm (vgl. 2.9 Geräte). Die Liposomen wurden vor ihrer Verwendung maximal 7 Tage bei 4 °C gelagert.

2.3. Durchflusszytometrie oder FACS (Fluorescence activated cell sorting)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich verschiedene Eigenschaften einer Zelle gleichzeitig erfassen. Durch Laserbestrahlung entstehen verschiedene Phänomene der Lichtstreuung: Die Lichtstreuung einer Zelle in der Achse des einfallenden Lichtes ist proportional der Zellgröße (Vorwärtsstreulicht, forward scatter, FSC). Die Lichtstreuung im 90°-Winkel ist proportional der Granularität (Seitwärtsstreulicht, sideward scatter, SSC). Nach einer Färbung mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern können die Fluorochrome durch Laserbestrahlung angeregt werden. Dadurch kommt es zur Emission spezifischer Fluoreszenzspektren, die durch optische Filter auf Photosensoren gelenkt und in verschiedenen Kanälen gemessen werden (vgl. Tab. 1). Die emittierte Fluoreszenzintensität entspricht der Anzahl der Antikörper-Bindungsstellen. Nach Umwandlung der optischen in elektronische Signale wurden die Daten mit der Software CellQuest Pro (vgl. 2.10 Software) analysiert ³⁶.

Tab. 1: Verwendete FACS-Fluorochrome mit Absorptions- und Emissionswellenlängen ³⁶

Fluoreszenz-Kanal	Fluorochrom	Abkürzung/ Handelsname	Absorptions- Maximum [nm]	Emissions- Maximum [nm]
FL1	Fluorescein Isothiocyanat	FITC	490	530
FL2	Phycoerythrin	PE	480/545/565	575
FL3	Cy5	CyChrome	650	666

2.3.1. Gewebeaufbereitung

Die Ratten wurden zu festgesetzten Zeitpunkten nach der FCA-Injektion durch eine hochdosierte Halothan- oder Isofluraninhalation getötet. Das entzündete subkutane Pfotengewebe wurde mit einem Skalpell nach einem queren Schnitt distal des Calcaneus und zwei Längsschnitten entlang der lateralen Fellgrenze unter Zug von der tiefen Beugersehne abpräpariert und bis zur anschließenden Weiterverarbeitung in PBS auf Eis gelegt. Das Subkutangewebe wurde von der Cutis abpräpariert, gewogen und in 1 - 2 mm große Stücke geschnitten. Zum enzymatischen Gewebeverdau wurde jede Pfote für 60 min bei 37 °C in 3 ml Verdaulösung inkubiert (vgl. 2.8 Lösungen). Anschließend wurde das Gewebe durch ein

Zellsieb gedrückt (vgl. 2.9 Geräte) und in 10 ml Medium resuspendiert. Die so gewonnene Einzelzellsuspension wurde zentrifugiert (1200 U/min über 10 min), dekantiert und in 3,5 ml PBS resuspendiert. Pro Färbung wurden 1000 µl der Zellsuspension zentrifugiert (1200 U/min über 5 min) und dekantiert ⁸.

2.3.2. Antikörperfärbungen

Die verwendeten Antikörper wurden in Tab. 2 aufgelistet. Die Lösungen sind in Kapitel 2.8 aufgeführt. Alle Antikörperfärbungen wurden bei Raumtemperatur und unter Lichtausschluss durchgeführt, um das Ausbleichen der Farbstoffe zu verhindern.

2.3.2.1. *Protokoll extrazelluläre Antikörperfärbungen*

1. Zugabe der extrazellulären Antikörper (anti-Ratten CD3 PE Ak und anti-Ratten CD45 CyChrome Ak).
2. 15 min Inkubation.
3. Waschen in 2 ml PBS, Zentrifugieren bei 1200 U/min über 5 min, Dekantieren.
4. Fixation in 250 µl 1 % PFA (Paraformaldehyd) für 30 min.

2.3.2.2. *Protokoll intrazelluläre Antikörperfärbungen*

1. Fixation in 500 µl 1 % PFA für 30 min.
2. Waschen mit 2 ml PBS, Zentrifugieren bei 1200 U/min über 5 min, Dekantieren.
3. Permeabilisierung mit 2 ml Saponin, Zentrifugieren bei 1200 U/min über 5 min, Dekantieren.
4. Zugabe der intrazellulären Antikörper (anti Ratten RP-1 PE Ak, anti Ratten ED1 FITC Ak, anti pan-Opioid 3E7 Ak oder seiner Isotypenkontrolle IgG_{2a}).
5. Inkubation für 30 min.
6. Waschen mit 2 ml Saponin.
7. Zugabe des sekundären intrazellulären Antikörpers für 3E7 (Ratten anti-Maus IgG_{2a+b} PE) und der Zelloberflächenmarker (anti Ratten CD45 CyChrome Ak).
8. Inkubation für 15 min.
9. Zwei Waschschrte mit je 2 ml Saponin bzw. 2 ml PBS, Zentrifugieren bei 1200 U/min über 5 min, Dekantieren, Aufnahme in 250 µl PBS.

Tab. 2: Verwendete Durchflusszytometrie-Antikörper

Bezeichnung [Zitat]	Antigen	Zielzelle	Fluorochrom	Bindungs- stelle	Firma	Konzentration [µg/ml]
Maus anti-Ratte CD45 [37]	Protein Tyrosin Phosphatase (PTP)	Alle hämatopoetischen Zellen	Cy5 (CyChrome)	Extrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	2
Maus anti-Ratte RP-1 [38]	Nicht charakterisiert	Neutrophile Granulozyten	Phycoerythrin (PE)	Intrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	12
Maus anti-Ratte ED1 [39-41]	Lysosomales Membranantigen (CD68)	Monozyten/Makrophagen	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Intrazellulär	Serotec, Oxford, UK	2
Maus IgG1		Isotypen-Kontrolle	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Intrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	2
Maus anti-Ratte CD3 [42]	T-Zell-Rezeptor assoziiertes Zellmembranprotein	T-Zellen	Phycoerythrin (PE)	Extrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	4
Maus anti-pan-Opioid 3E7 (IgG2a) [8, 43]	Opioid-peptide außer Endomorphinen	Opioid-peptid-haltige Zellen	unkonjugiert	Intrazellulär	Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Deutschland	20
Maus IgG2a		Isotypen-Kontrolle	Phycoerythrin (PE)	Intrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	20
RAM (Ratten anti-Maus) IgG2a		Sekundärer Antikörper	Phycoerythrin (PE)	Intrazellulär	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	20

2.3.3. Kalibrierung und Kompensation

Zur Eichung (Kalibrierung) des FACS-Gerätes wurden Calibrite Partikel verwendet (vgl. 2.7 Chemikalien).

Um die einzelnen Zellpopulationen der verschiedenen Proben optimal eingrenzen zu können, war es nötig, die Einstellungen des FACS-Gerätes vor der Aufnahme der eigentlichen Daten zu adjustieren (Kompensation). Dazu stellte man eine Mischung der unterschiedlichen Proben (Pool) her und färbte diese mit den einzelnen verwendeten Antikörpern.

2.3.4. Auswertung

Die Daten wurden als zweidimensionale Punktdiagramme (dot-plots, jeder Punkt entspricht einem Ereignis) oder eindimensionale Histogramme (Fluoreszenzintensität gegenüber einer Färbung) dargestellt. Über das Eingrenzen einzelner Zellpopulationen wurde die prozentualen Anteile der Leukozytensubpopulationen bestimmt.

2.3.5. Quantitative FACS-Analysen

Quantitative FACS-Analysen wurden durch Mischung der Antikörper-gefärbten Einzelzellsuspension mit in allen Kanälen fluoreszierenden TruCOUNT™ Partikeln definierter Größe erzielt (vgl. 2.7 Chemikalien). Nach Aufnahme der Daten von insgesamt 70.000 Ereignissen und FACS-Analyse des prozentualen Anteils der Zellpopulation im Verhältnis zu den TruCOUNT™ Partikeln ließ sich daraus die absolute Zellzahl dieser Zellpopulation berechnen⁸. Ein Beispiel für die Berechnung absoluter Zellzahlen mit Hilfe der TruCOUNT™ Partikel findet sich im Anhang (vgl. 10. Anhang).

2.4. Untersuchungen zum Schmerzverhalten

Die Darstellung der Verhaltensuntersuchungen demonstriert die funktionelle Bedeutung der in dieser Studie beschriebenen zellulären Veränderungen und erschien in diesem Kontext für das bessere Gesamtverständnis dieser Dissertationsarbeit wichtig. Die Verhaltensexperimente wurden durch Frau Dr. D. Labuz, klinische Forschergruppe „Molekulare Mechanismen der Opiatanalgesie unter Entzündungsbedingungen“, Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin, Charité – Universitätsmedizin Berlin, durchgeführt. Die Ratten wurden über vier Tage täglich aus dem Käfig genommen und an den Versuchsaufbau gewöhnt (Handling).

Die Hyperalgesie- und Antinozizeptionsmessung erfolgte durch die Bestimmung der Pfootendruckschwelle mit Hilfe eines Pfootendruck-Algesiometer (Ugo Basile, Comerio, Italien, modifizierter Randall-Selitto-Test). Dabei wurde über einen Stempel zunehmend Druck auf die Hinterpfote der Ratte ausgeübt bis diese die Hinterpfote wegzog. Das ausgeübte Gewicht entsprach der Pfootendruckschwelle (Paw pressure threshold, PPT). Basierend auf Vorarbeiten wurde die maximale Druckbelastung auf 250 g festgelegt (Cut-off), um eine Gewebeschädigung zu vermeiden. Gemessen wurden der Ausgangswert (Basalwert) der injizierten und unbehandelten Hinterpfote, sowie der Wert nach einminütigem Schwimmen in 4 °C kaltem Wasser (CWS = Cold water swim). Es wurden drei Messungen im Abstand von 10 s durchgeführt und der Mittelwert berechnet^{9, 44}. Die Daten wurden in Prozent des maximal möglichen Effektes angegeben (vgl. 10. Anhang).

2.5. Versuchsprotokolle

Zur Induktion der lokalen Entzündung erhielten die Tiere Injektionen von 150 µl FCA (Freund's Complete Adjuvant) subkutan in die rechte Hinterpfote². Alle Eingriffe wurden in Halothan- oder Isofluran-Narkose durchgeführt.

2.5.1. Leukozytensubpopulationen in der entzündeten Pfote im zeitlichen Verlauf

Ratten (n = 30) wurden in sechs Gruppen randomisiert und intraplantar mit FCA injiziert. Das Pfootengewebe wurde 2, 12, 24, 48, 72 und 96 h nach der FCA-Injektion entnommen. Einzelzellsuspensionen der entzündeten Pfote wurden für Leukozyten (anti Ratten CD45 CyChrome) und die drei Leukozytensubpopulationen Granulozyten (anti Ratten RP-1 PE), Monozyten/Makrophagen (anti Ratten ED1 FITC) und Lymphozyten (anti Ratten CD3 PE) gefärbt.

2.5.2. Opioidpeptid-haltige Monozyten/Makrophagen in der späten Entzündung

Das Pfootengewebe wurde von Ratten (n = 3) 48 bzw. 96 h nach intraplantarer FCA-Injektion entnommen. Einzelzellsuspensionen wurden für Leukozyten (anti Ratten CD45 CyChrome), Monozyten/Makrophagen (anti Ratten ED1 FITC) und Opioidpeptid-haltige Zellen (anti pan-Opioid 3E7 PE) gefärbt.

2.5.3. Intraperitoneale Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen

Zu den Zeitpunkten 24 h vor sowie 36 und 72 h nach intraplantarer FCA-Injektion wurden insgesamt 15 Ratten (n = 5 pro Gruppe) 2 ml Clodronat-haltiger Liposomen, leere Liposomen oder PBS intraperitoneal injiziert. Die Entnahme des Pfortengewebes erfolgte 96 h nach Entzündungsinduktion. Einzelzellsuspensionen der entzündeten Pforte wurden für Leukozyten (anti Ratten CD45 CyChrome), Monozyten/Makrophagen (anti Ratten ED1 FITC) und Opioidpeptid-haltige Zellen (anti pan-Opioid 3E7 PE) gefärbt.

2.5.4. Aufnahme Fluoreszenz-haltiger Liposomen in Leukozyten nach intraplantarer Injektion

Um die Aufnahme von Liposomen in die Leukozyten in der Pforte zu quantifizieren, wurden Fluoreszenz-haltige Liposomen intraplantar injiziert. Zu den Zeitpunkten 1 und 24 h bzw. 1 und 48 h nach intraplantarer FCA-Injektion wurden jeweils 150 µl Fluoreszenz-haltige Liposomen bzw. PBS injiziert (n = 5 Tiere pro Gruppe). 48 bzw. 96 h nach FCA-Injektion wurde das Pfortengewebe entnommen und für das FACS aufgearbeitet. Es wurde eine Leukozytenfärbung (CD45 CyChrome) durchgeführt (Abb. 4A).

2.5.5. Leukozytensubpopulationen und Opioidpeptid-haltige Leukozyten nach intraplantarer Injektion Clodronat-haltiger Liposomen

Ratten (n = 42) erhielten intraplantare FCA-Injektionen. Zu den Zeitpunkten 1 und 24 h bzw. 1 und 48 h nach der FCA-Injektion wurden 150 µl Clodronat-haltige Liposomen, leere Liposomen oder PBS injiziert (n = 7 Tieren pro Gruppe). 48 bzw. 96 h nach Entzündungsinduktion wurden Einzelzellsuspensionen der entzündeten Pforte für Leukozyten (anti Ratten CD45 CyChrome), Monozyten/Makrophagen (anti Ratten ED1 FITC), Granulozyten (anti Ratten RP-1 PE) oder Lymphozyten (anti Ratten CD3 PE) gefärbt.

2.6. Statistische Auswertung

Die mit Clodronat-Liposomen behandelte Gruppe wurde mit der PBS-Kontrolle verglichen. Die Daten wurden auf Normalverteilung und Gleichheit der Varianz geprüft. Da alle Daten diese Voraussetzungen erfüllten, wurde der t-Test zur statistischen Analyse angewandt und alle Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Ergebnisse mit einem $p < 0,05$ wurden als signifikant gewertet. Die Ergebnisse der leeren Liposomen wurden

mittels deskriptiver Statistik dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte nach Beratung durch Herrn Prof. Dr. rer. nat. P. Martus, Institut für Medizinische Informatik, Biometrie und Epidemiologie, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin.

2.7. Chemikalien

Phosphatidylcholin	Lipoid KG, Ludwigshafen, Deutschland
Cholesterol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Clodronat	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
5,6-Carboxyfluorescein	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Freund's Complete Adjuvant	Calbiochem, La Jolla, CA, USA
Halothan	Eurim-Pharm Arzneimittel GmbH, Piding, Deutschland
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Calibrite Partikel	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
TruCOUNT™ Partikeln	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.8. Lösungen

Phosphat gepuffertes Kochsalz (Phosphate buffered saline)

PBS 7.4 10x (Gibco™, Paisley, UK) 1:10 in Aqua-Spüllösung (Delta-Pharma GmbH, Dreieich, Deutschland)

Komplettes Medium

500 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Gibco™, Paisley, UK)
100 U/ml Penicillin, 10 mg/dl Streptomycin, 10 % fetales Kälberserum (alle von Invitrogen, Groningen, Niederlande). Die Antibiotika im Medium verhinderten das Wachstum von Bakterien.

Verdaulösung

30 mg Kollagenase, 10 mg Hyaluronidase, 0,5 ml HEPES, 1 M (alle von Sigma, Deisenhofen, Deutschland), Komplettes Medium ad 10 ml. Diese Lösung wurde vor jedem Versuch frisch angesetzt.

Fixierlösung

1 % Paraformaldehyd (PFA, Fluka, Buchs, Deutschland) in PBS. PFA diente dem Fixieren der Zellen. Da sich PFA nur im alkalischen Milieu löst, wurden 90 ml PBS mit 1 ml NaOH (Natronlauge 10 M, Fluka, Buchs, Deutschland) alkalisiert, es wurde 1 g PFA hinzugefügt

und die Lösung unter pH-Kontrolle mit HCl neutralisiert (Salzsäure 11,7 N, Sigma, Deisenhofen, Deutschland). Ziel-pH war dabei 7,45. Die Lösung wurde bei 4 °C maximal eine Woche gelagert.

Saponin-Puffer

0,5 % Saponin, 0,5 % BSA (Rinderserumalbumin, bovines Serumalbumin) und 0,05 % Natriumazid (NaN₃) (alle von Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in PBS. Saponin ist ein Detergenz und dient der Permeabilisation der Zellmembran. Dadurch wurde das Zytosol den intrazellulär bindenden Antikörpern zugänglich. Das BSA diente der Absättigung unspezifischer Bindungen. Das NaN₃ wirkte als Zellgift und hemmte den Zellstoffwechsel.

2.9. Geräte

Vakuumpumpe PC510	Vacubrand GmbH, Wertheim, Deutschland
Rotationsevaporator R-124	Büchi Labortechnik AG, Faval, Schweiz
Particle size analyzer LS	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Germany
Inkubator Function line B 12	Heraeus, Berlin, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 2.0 R	Heraeus, Berlin, Deutschland
70 µm Nylon-Zellsieb Falcon™	Pharming/Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Calibur Seriennummer E 4840	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

2.10. Software

FACS-Analyse	CellQuest Pro Software	Becton Dickinson Biosciences, USA
Statistik	Microsoft Excel 2000	Microsoft Corporation, USA
	Sigmastat Version 2.03	SPSS Inc., USA
Grafik	Sigmaplot Version 8.0	SPSS Inc., USA
Literaturverzeichnis	Endnote Plus 2.3.0.2	Niles & Associates Inc., USA
Textverarbeitung	Word 2000	Microsoft Corporation, USA