

3. Ergebnisse

3.1. Leukozytensubpopulationen in der entzündeten Pfote im zeitlichen Verlauf

Zu frühen Zeitpunkten der Entzündung (2, 12, 24 h) stellten die RP-1⁺ Granulozyten mit 38 ± 6 % bis 54 ± 11 % die größte Zellpopulation dar, während zu späten Zeitpunkten der Entzündung (48, 72, 96 h) mehrheitlich ED1⁺ Monozyten/Makrophagen mit 56 ± 8 % bis 66 ± 5 % vorhanden waren. Die CD3⁺ T-Zellen umfassten in allen Stadien der Entzündung < 5 % der Leukozyten (Abb. 1).

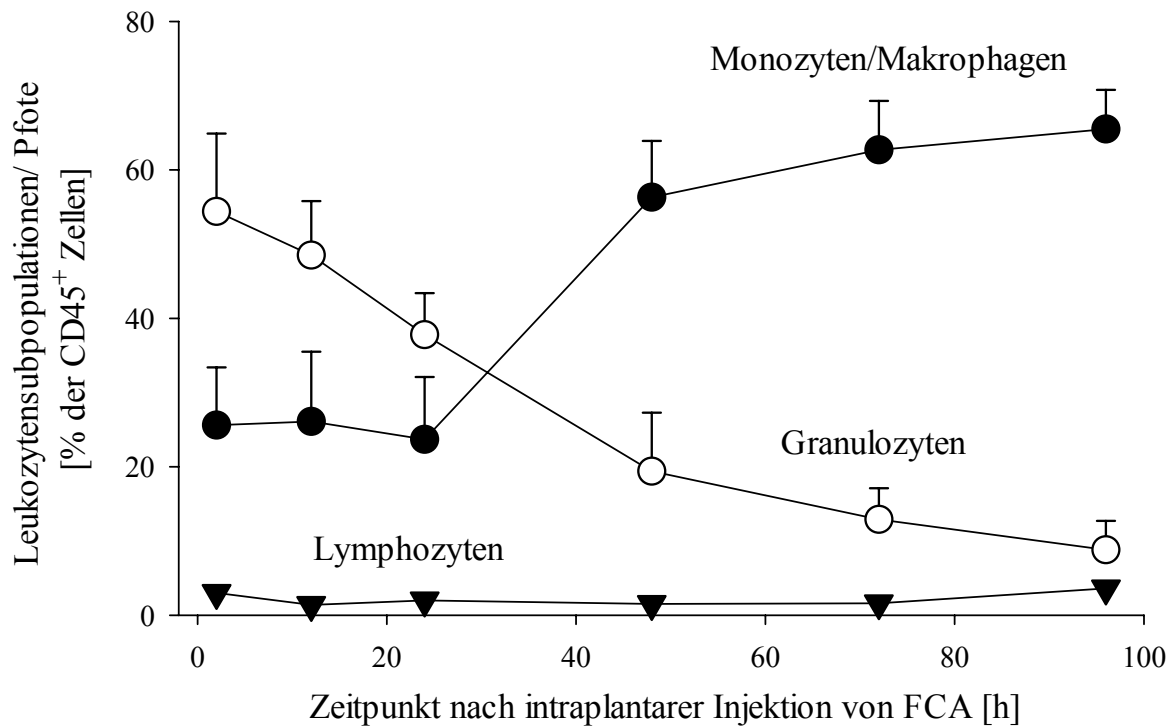


Abb. 1 Leukozytensubpopulationen in der entzündeten Pfote im zeitlichen Verlauf

Abb. 1: Leukozytensubpopulationen in der entzündeten Pfote im zeitlichen Verlauf

Der Anteil RP-1⁺ Granulozyten (weißer Kreis) sinkt mit fortdauernder Entzündung, während der Anteil ED1⁺ Monozyten/Makrophagen (schwarzer Kreis) zunimmt. Der relative Anteil CD3⁺ T-Zellen (schwarzes Dreieck) bleibt gering.

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

Die Leukozyten wurden anhand der CD45 CyChrome-Färbung und ihrer Größe (FSC) identifiziert. Von den Monozyten/Makrophagen (rechter oberer plus rechter unterer Quadrant) enthielten 36 bzw. 37 % Opioidpeptide (rechter oberer Quadrant) nach 48 h bzw. 96 h Entzündung an den gesamten Monozyten/Makrophagen (Abb. 2B). Der Anteil der Opioidpeptid-haltigen Monozyten/Makrophagen (rechter oberer Quadrant) an den Gesamtzahl der Opioidpeptid-haltigen Leukozyten (linker oberer und rechter oberer Quadrant) betrug 71 % nach 48 h Entzündung und 77 % nach 96 h Entzündung. Die Färbung mit isotypengleichen Kontrollantikörpern ist in Abb. 2C dargestellt.

Abb. 2: Opioidpeptid-haltige Monozyten/Makrophagen in der späten Entzündung

2A Leukozyten in der Einzelzellsuspension werden anhand der CD45 CyChrome-Färbung und der Größe der Zellen (FSC = Vorwärtsstreulicht) identifiziert.

2B In der weiteren Analyse der CD45⁺ Zellen werden die Opioidpeptid-haltigen (3E7⁺) Monozyten/Makrophagen (ED1⁺) näher untersucht. Im rechten oberen und unteren Quadranten sind die ED1⁺ Monozyten/Makrophagen dargestellt, im rechten und linken oberen Quadranten die 3E7⁺ gefärbten Opioidpeptid-haltigen Zellen. Die Schnittmenge (i.e. rechter oberer Quadrant) identifiziert die ED1⁺ 3E7⁺ Opioidpeptid-haltigen Monozyten/Makrophagen. Monozyten/Makrophagen stellen in der späten Entzündung den prozentual größten Anteil an Opioidpeptid-haltigen Leukozyten dar.

2C Darstellung der Isotypenkontrolle zur in Abb. 2B gezeigten Färbung. Die unspezifischen Bindungen werden im linken unteren Quadranten eingegrenzt.

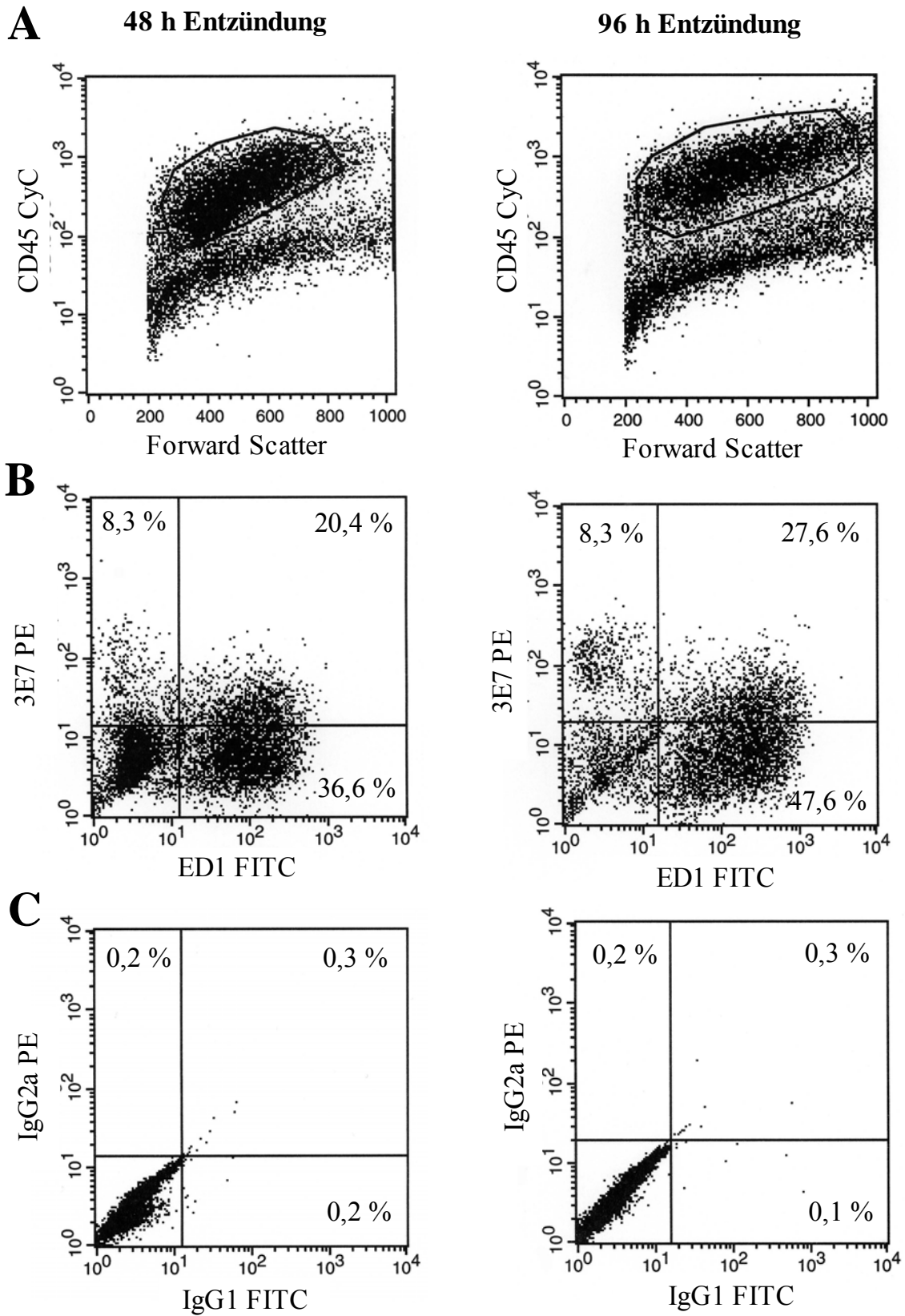


Abb.2 Hauptproduzenten von Opioidpeptiden zu späten Zeitpunkten der Entzündung

3.3. Intraperitoneale Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen

96 h nach FCA-Injektion und dreimaliger intraperitonealer Injektion Clodronat-haltigen Liposomen und ließen sich keine signifikanten Änderungen in der Anzahl der Monozyten/Makrophagen und der Opioidpeptid-haltigen Leukozyten in der Pfote nachweisen (Abb. 3).

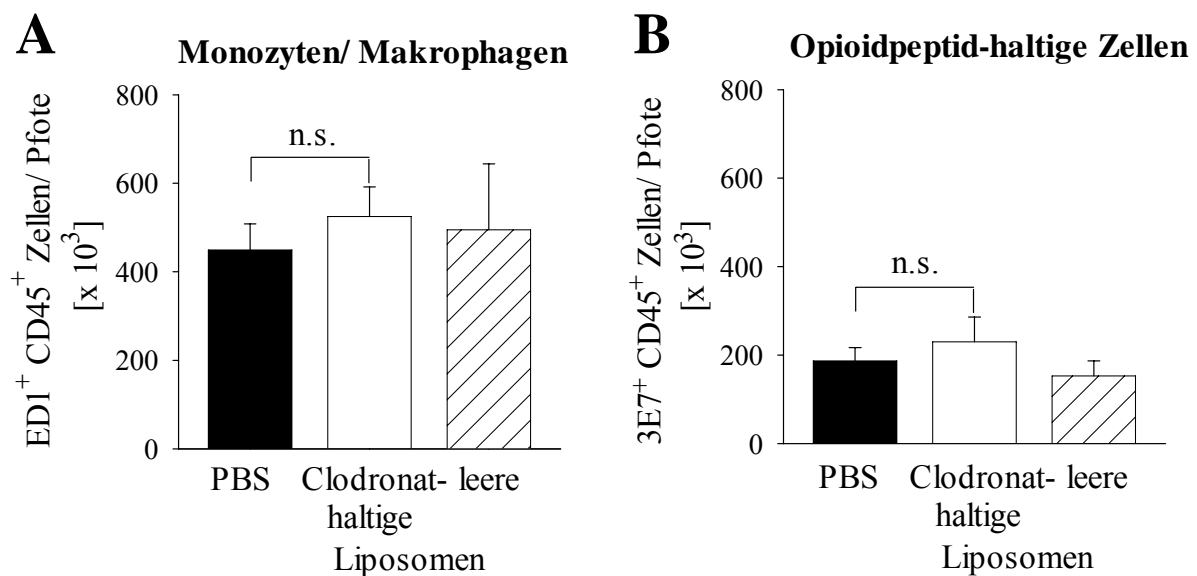


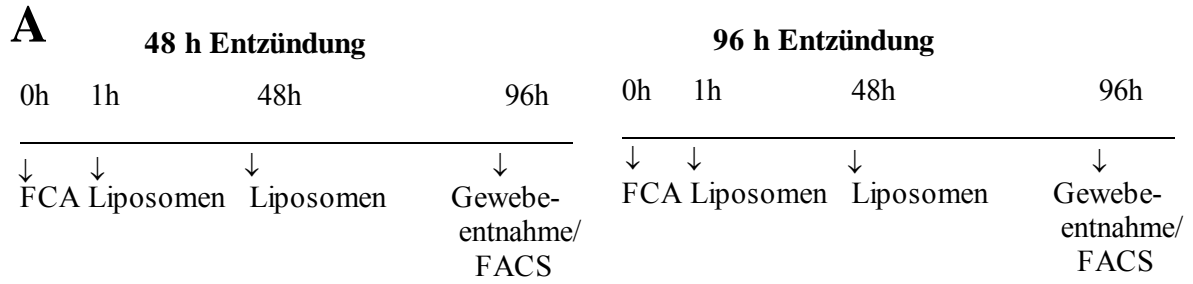
Abb. 3 Systemische Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen

Abb. 3: Intraperitoneale Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen

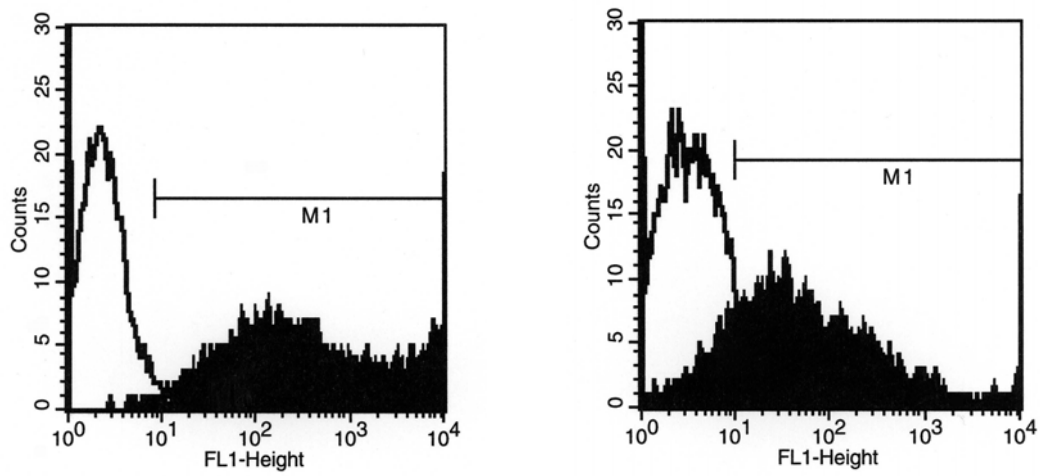
Es sind keine signifikante Veränderung der Anzahl der Monozyten/Makrophagen (**3A**) und der Opioidpeptid-haltigen Leukozyten (**3B**) in der Pfote nachweisbar (PBS = schwarz, Clodronat-haltige Liposomen = weiß, leere Liposomen = schraffiert). Angegeben werden absolute Zellzahlen pro Pfote als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes.

3.4. Aufnahme Fluoreszenz-haltiger Liposomen in Leukozyten nach lokaler Injektion

Gegenüber der PBS-Kontrolle nahm nach Injektion Fluoreszenz-haltiger Liposomen der Anteil der fluoreszierenden Zellen in der Pfote signifikant zu (FL-1 Kanal). Er betrug nach 48 h Entzündung 99 % und nach 96 h Entzündung 77 % (Abb. 4C).



B



C

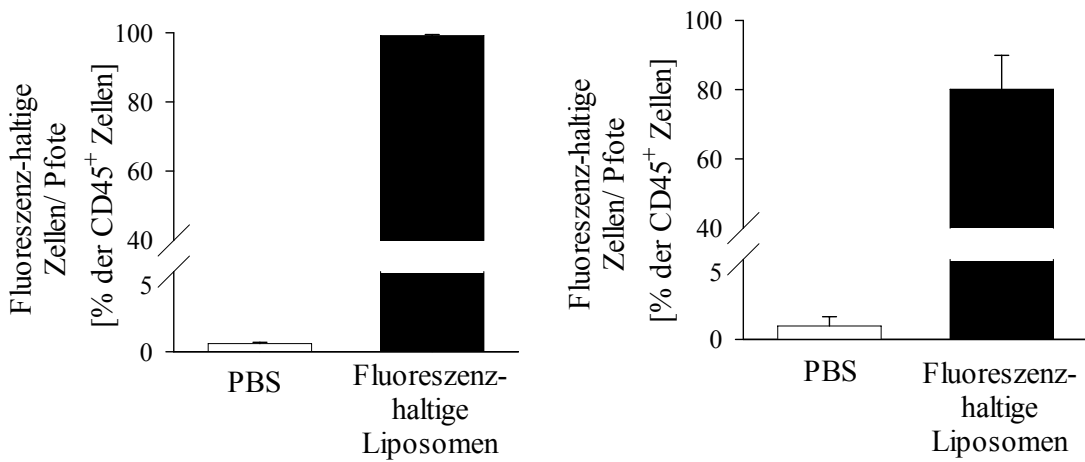


Abb. 4 Aufnahme Fluoreszenz-haltiger Liposomen bei lokaler Injektion

Abb. 4: Aufnahme Fluoreszenz-haltiger Liposomen bei lokaler Injektion

4A Injektionsschema zur intraplantaren Liposomen-Injektion.

4B Darstellung der FACS-Analyse zur Aufnahme der Fluoreszenz-haltigen Liposomen in CD45⁺ Zellen der entzündeten Pfote (Fluoreszenz-haltige Liposomen = schwarz, PBS = weiß).

4C Darstellung der fluoreszierenden Zellen pro Pfote angegeben als Prozentsatz an CD45⁺-Zellen. Die Mehrzahl aller CD45⁺ Zellen inkorporiert Fluoreszenz-haltige Liposomen (Fluoreszenz-haltigen Liposomen = schwarz; PBS = weiß). Angegeben sind die absoluten Zellzahlen pro Pfote als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes bei n = 5 Tieren pro Gruppe. Die PBS-Kontrollen wurden mittels t-Test mit der Clodronat-behandelten Gruppe verglichen.

3.5. Leukozytensubpopulationen nach lokaler Injektion Clodronat-haltiger Liposomen

Die Anzahl der ED1⁺ Monozyten/Makrophagen nahm in der Clodronat-behandelten Gruppe signifikant um 30 % nach 48 h Entzündung und um 35 % nach 96 h Entzündung gegenüber der jeweiligen PBS-Kontrolle ab (Abb. 5A; PBS vs. Clodronat-haltige Liposomen: 48 h: 661 \pm 40 vs. 468 \pm 77 x 10³ Zellen, 96 h: 622 \pm 65 vs. 401 \pm 50 x 10³ Zellen, beide p < 0,05, t-Test). Die Anzahl der RP-1⁺ Granulozyten war zu beiden Zeitpunkten der Entzündung nicht signifikant unterschiedlich (Abb. 5B; PBS vs. Clodronat-haltige Liposomen: 48 h: 345 \pm 51 vs. 295 \pm 42 x 10³ Zellen, 96 h: 104 \pm 39 vs. 144 \pm 13 x 10³ Zellen, beide p > 0,05, t-Test) . Die Anzahl CD3⁺ T-Zellen wies zum Zeitpunkt 48 h im Vergleich zur Clodronat-behandelten Gruppe mit der PBS-Kontrolle einen signifikanten Anstieg auf, während sich zum Zeitpunkt 96 h nach FCA-Injektion kein signifikanter Unterschied zeigte (Abb. 5C; PBS vs. Clodronat-haltige Liposomen: 48 h: 23 \pm 3 vs. 37 \pm 4 x 10³ Zellen, p < 0,05, t-Test; 96 h: 56 \pm 10 vs. 54 \pm 6 x 10³ Zellen, p > 0,05, t-Test).

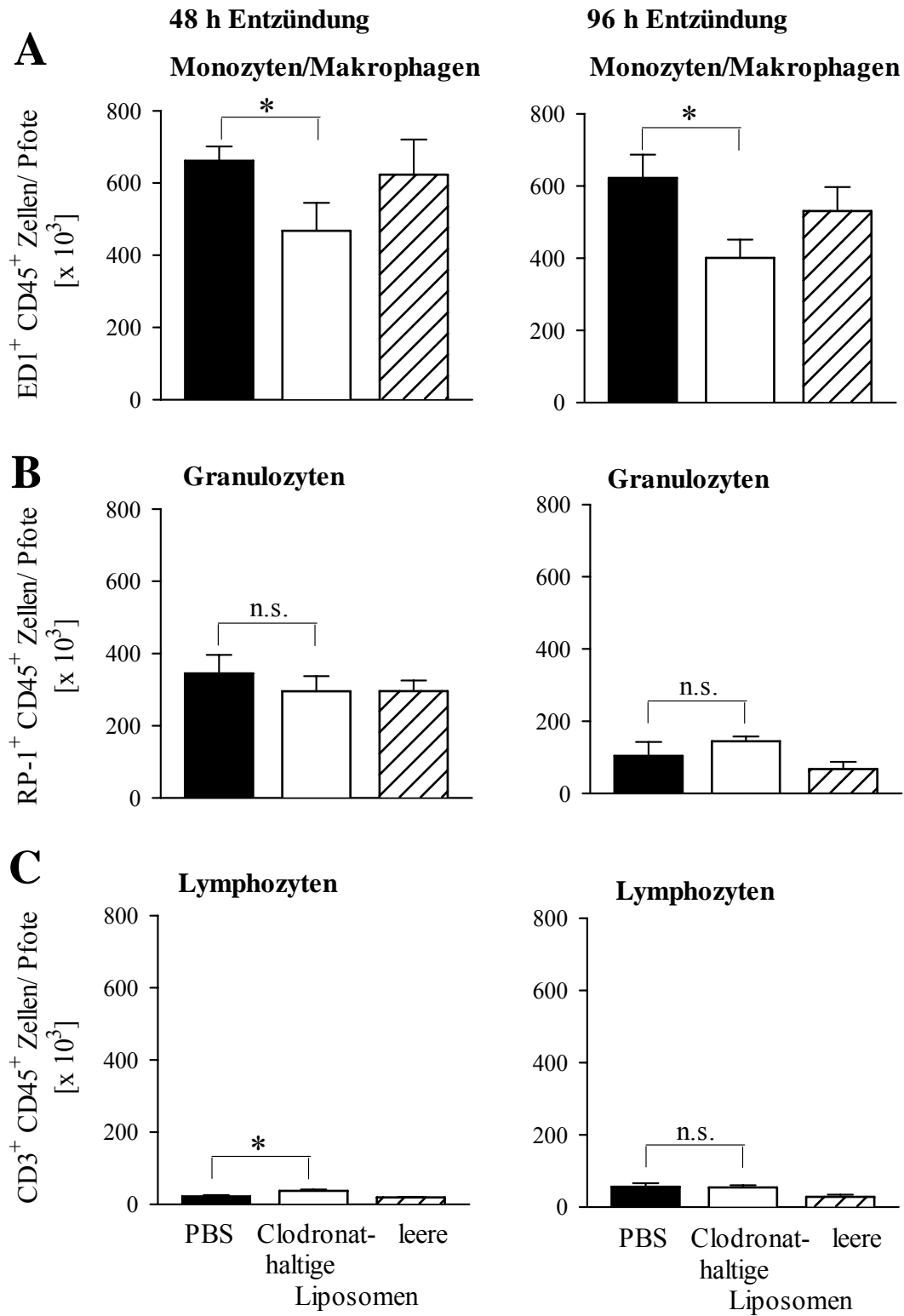


Abb. 5 Lokale Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen

Abb. 5: Leukozytensubpopulationen nach lokaler Injektion Clodronat-haltiger Liposomen in der entzündeten Pfote

Intraplantare Injektion von PBS (schwarz), Clodronat-haltigen Liposomen (weiß) und leeren Liposomen (schraffiert). Das Injektionsschema ist in 4A dargestellt. Analysiert werden die CD45⁺ Leukozyten (vgl. hierzu 2A). Angegeben wird jeweils die absolute Zellzahl pro Pfote als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes. Die PBS-Kontrollen wurden mittels t-Test mit der Clodronat-behandelten Gruppe verglichen.

5A Die Anzahl der ED1⁺ Monozyten/Makrophagen nimmt nach Injektion Clodronat-haltiger Liposomen signifikant gegenüber der PBS-Kontrollen 30 % - 35 % ab.

5B Die Zellzahl der RP-1⁺ Granulozyten weist keine signifikanten Unterschiede zwischen der mit Clodronat-haltigen Liposomen behandelten und der PBS injizierten Gruppe auf.

5C Die Anzahl CD3⁺ T-Zellen in der mit Clodronat-haltigen Liposomen behandelten Gruppe ist zum Zeitpunkt 48 h, nicht jedoch 96 h post FCA, signifikant höher als in der PBS-Kontrolle.

Angegeben sind jeweils die absolute Zellzahl pro Pfote als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes. Die PBS-Kontrollen wurden mittels t-Test mit der Clodronat-behandelten Gruppe verglichen.

3.6. Opioidpeptid-haltige Leukozyten nach lokaler Injektion Clodronat-haltiger Liposomen

Die Anzahl der 3E7⁺ Opioidpeptid-haltigen Leukozyten war in der Clodronat-behandelten Gruppe gegenüber der PBS-Kontrolle um 35 % bzw. 42 % nach 48 h bzw. 96 h der Entzündung signifikant niedriger (Abb. 6A; PBS vs. Clodronat-haltige Liposomen: 48 h: 381 \pm 45 vs. 247 \pm 29 x 10³ Zellen, 96 h: 314 \pm 47 vs. 181 \pm 24 x 10³ Zellen, beide p < 0,05, t-Test).

3.7. Stress-induzierte Antinozizeption nach intraplantarer Injektion Clodronat-haltiger Liposomen

Die durch Kaltwasserschwimmstress-induzierte Zunahme der PPT nahm in der Clodronat-behandelten Gruppe im Vergleich zur PBS-Kontrolle signifikant um 20 % ab. Dieses Ergebnis ergab sich sowohl 48 h als auch 96 h nach der FCA-Injektion (Abb. 6B; PBS vs. Clodronat-haltige Liposomen: 48 h: 75 ± 4 vs. 61 ± 5 % MPE; 96 h: 76 ± 6 vs. 62 ± 3 % MPE, beide $p < 0,05$, t-Test). Die Daten wurden von Frau Dr. Labuz erhoben.

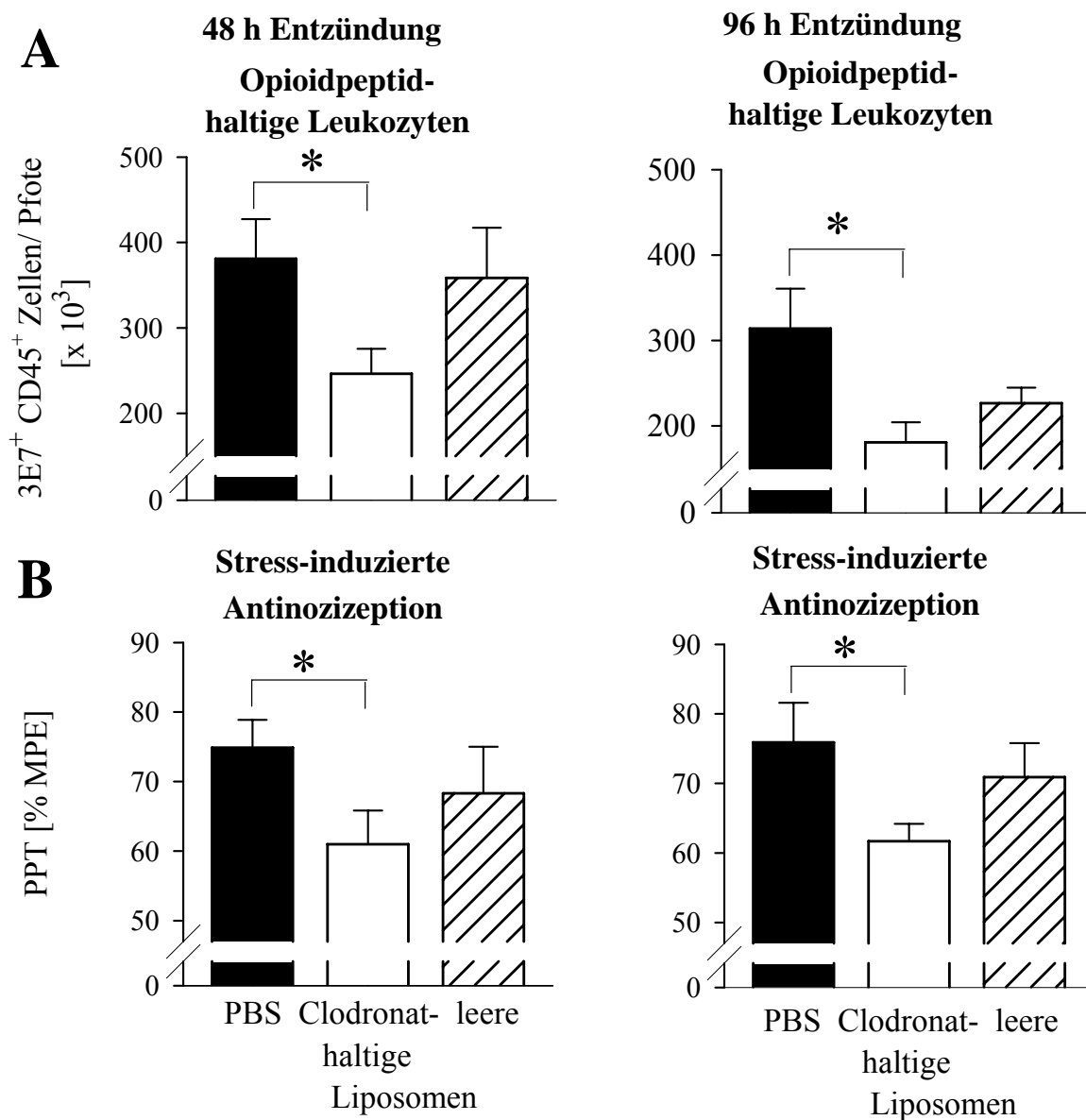


Abb. 6 Lokale Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen

Abb. 6: Opioidpeptid-haltige Leukozyten nach lokaler Injektion Clodronat-haltiger Liposomen in der späten Entzündung und CWS-induzierte Schmerzkontrolle

Der Versuchsaufbau ist in Abb. 4A beschrieben.

6A Die Anzahl der $3E7^+$ Opioidpeptid-haltigen Leukozyten sinkt in der Clodronat-behandelten Gruppe signifikant gegenüber der PBS-Kontrolle (PBS = schwarz, Clodronat-haltige Liposomen = weiß, leere Liposomen = schraffiert). Das Ausmaß der Depletion beträgt nach 48 h Entzündung 35 % und nach 96 h Entzündung 42 %.

6B Die PPT (Pfortendruckmessung) zeigt eine signifikant verringerte Schmerzkontrolle in der mit Clodronat-haltigen Liposomen injizierten Gruppe im Vergleich zur PBS-Injektion. Die Abnahme der PPT beträgt 20 %.

Angegeben sind jeweils der Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes. Die PBS-Kontrollen wurden mittels t-Test mit der Clodronat-behandelten Gruppe verglichen.