

4. Diskussion

4.1. Diskussion von Material und Methoden

4.1.1. Clodronat

Clodronat (Cl₂MDP, Dichlormethylen-disphosphonat) ist ein Bisphosphonat. Freies Clodronat ist hydrophil und negativ geladen. Dadurch ist es in geringem Maße zellmembrangängig und wird rasch eliminiert. Um Clodronat intrazellulär anzureichern, bedarf es einer liposomalen Verkapselung (siehe 4.1.2 Liposomen). Die Clodronat-haltigen Liposomen werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen. Das Clodronat wird intrazellulär durch lysosomale Enzyme aus den Liposomen freigesetzt³³. Der Wirkmechanismus von Clodronat ist noch nicht endgültig geklärt. *In vivo* wird Clodronat in peritonealen Monozyten/Makrophagen zu dem ATP-Analogon Adenosin-5'-(β-dichlormethylen)-Triphosphat (AppCCl₂p) metabolisiert⁴⁵. *In vitro* Studien an isolierten Mitochondrien und in humanen Osteoklasten zeigten, dass AppCCl₂p an der inneren mitochondrialen Membran die ADP/ATP-Translokase inhibiert. In der Folge bricht das mitochondriale Membranpotential zusammen. Es kommt zu einer erhöhten Permeabilität der Mitochondrien und zur Freisetzung proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom c. Die Apoptose wird durch die Aktivierung der Caspase-Kaskade eingeleitet^{46, 47}.

4.1.2. Liposomen

Liposomen bestehen aus einer sphärischen mehrschichtigen Phospholipidmembran, die ein wässriges Kompartiment umschließt. Die Phospholipide haben die Eigenschaft, sich in wässriger Umgebung so auszurichten, dass die hydrophoben Fettsäureketten sich einander zuwenden und durch die hydrophilen Gruppen vom Wasser abgeschirmt werden. Sie werden in der Pharmakologie als Vehikel verwendet, um hydrophobe Substanzen (z.B. Clodronat) in phagozytierende Zellen einzuschleusen. *In vitro* Studien an RAW 264-Makrophagen haben gezeigt, dass freies Clodronat nur in sehr hohen Konzentrationen das Wachstum von Monozyten/Makrophagen-Wachstum hemmt. Freies Clodronat ist 20-1000 mal weniger wirksam in der Depletion von Monozyten/Makrophagen als liposomal verkapseltes Clodronat⁴⁸.

Als Kontrolle wurde PBS verwendet, da immunmodulatorische Effekte bereits nach Injektion leerer Liposomen auftreten können. Ziel dieser Untersuchung war die Depletion von Monozyten/Makrophagen, so dass nicht zwischen einem durch leere Liposomen bzw. durch verkapseltes Clodronat erzielten Effekt unterschieden werden sollte ³³.

4.1.3. Clodronat-haltige Liposomen zur Depletion von Monozyten/Makrophagen.

In der Literatur wird eine Vielzahl von Strategien zur Depletion von Monozyten/Makrophagen beschrieben, wie die Anwendung von Silicateilchen, Carrageenan oder Antisera, wie sie zur Depletion von Granulozyten üblich sind. Diese Strategien haben sich zur Depletion von Monozyten/Makrophagen als nicht ausreichend effizient und/oder als unselektiv erwiesen ³². Clodronat-haltige Liposomen wurden in verschiedenen Tiermodellen und Geweben zur Depletion von Monozyten/Makrophagen angewendet. Die Methode erwies sich als selektiv ³³. Es zeigten sich jedoch je nach untersuchtem Tiermodell und Gewebe, sowie je nach Applikationsschema Unterschiede in der Effektivität der Methode. Die entsprechenden Studien werden in den Kapiteln 4.2.2 und 4.2.4 in Bezug zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gesetzt.

4.1.4. Entzündungsmodell

Innerhalb weniger Stunden nach intraplantarer Injektion von FCA tritt eine auf die injizierte Pfote beschränkte Entzündungsreaktion mit einer Schwellung und einer reduzierten Belastbarkeit auf. Zu späteren Zeitpunkten der Entzündung (> 1 Woche) kommt es zu einer Ausbreitung auf die kontralaterale Pfote sowie zu einer Polyarthritits ⁴⁹. Dieses Entzündungsmodell wurde gewählt, da die im Tiermodell erzielten Ergebnisse in klinischen Studien an Patienten nach Arthroskopie bzw. mit einer chronischen Arthritis reproduzierbar waren ^{2, 26, 50}.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Diese Studie ergab folgende Ergebnisse:

1. Granulozyten stellen zu frühen (< 24 h nach FCA-Injektion) und Monozyten/Makrophagen zu späten Zeitpunkten der lokalen Entzündung (> 24 h nach FCA-Injektion) die größten Leukozytensubpopulationen im Gewebe dar.

Monozyten/Makrophagen sind zu späten Zeitpunkten der lokalen Entzündung die hauptsächlichste Opioidpeptid-produzierende Leukozytensubpopulation.

2. Fluoreszenz-haltige Liposomen werden bei lokaler Injektion von der Mehrzahl der phagozytierenden Leukozyten aufgenommen.
3. Monozyten/Makrophagen werden zu späten Zeitpunkten der Entzündung durch lokale Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen selektiv depletiert.
4. Die Depletion von Monozyten/Makrophagen führt zu einer Reduktion der Opioidpeptid-haltigen Leukozyten in der Pfote und zu einer verminderten peripheren Stress-induzierten Opioid-vermittelten Antinozizeption.

4.2.1. Monozyten/Makrophagen als wesentliche Subpopulation der Opioidpeptid-haltigen Leukozyten in der späten Entzündung

In der späten Entzündung (> 24 h post FCA) stellten Monozyten/Makrophagen die größte Leukozytensubpopulation dar (Abb. 1). In einer Studie an Mäusen 48 h nach intraplantarer FCA-Injektion wurden in nichtquantitativen immunhistochemischen Untersuchungen ebenfalls eine Zunahme von ED1⁺-Zellen im entzündeten Gewebe im Vergleich zum nichtentzündeten Gewebe festgestellt⁵¹. In einem anderen Entzündungsmodell wurden Ratten 7 Tage nach intramuskulärer Injektion von Carrageenan untersucht. In einer nichtquantitativen histologischen Färbung wurden Monozyten/Makrophagen als vorherrschende Leukozytensubpopulation identifiziert⁵².

Im in dieser Studie benutzten Entzündungsmodell waren 70-80 % aller Opioidpeptid-haltigen Leukozyten zu späten Zeitpunkten (> 24 h) Monozyten/Makrophagen (Abb. 2B). Hierdurch wurden frühere Studien am gleichen Entzündungsmodell bestätigt, die zum Zeitpunkt 96 h nach FCA-Injektion ebenfalls Monozyten/Makrophagen als zentrale Leukozytensubpopulation der Opioidpeptid-haltigen Leukozyten identifizierte⁸.

Die Expression von POMC (Proopiomelanocortin) mRNA (messenger Ribonukleinsäure) in Leukozyten wird kontrovers diskutiert. POMC kodiert sowohl β -Endorphin, als auch ACTH (Corticotropin) und MSH (Melanozyten stimulierendes Hormon). Das für β -Endorphin, ACTH und MSH kodierende Gen liegt im Exon 3. Das für die Expression notwendige Signalpeptid liegt im Exon 2. Bislang ist unklar, weshalb in Leukozyten die Expression des Exon 3, jedoch die vollständige mRNA (mit dem Exon 2) nicht oder nur in sehr kleinen

Mengen nachweisbar war ⁵³⁻⁵⁵. In mehreren vorangegangenen Arbeiten wurde auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen, dass Monozyten/Makrophagen Opioidpeptide (β -Endorphin, Met-Enkephalin, Dynorphin und Endomorphine) enthalten. In Monozyten/Makrophagen in der Milz der Ratte wurde POMC mRNA mittels Northern Blot bzw. In-situ-Hybridisation nachgewiesen ^{3, 4, 55}. Die POMC mRNA Transkripte in Monozyten/Makrophagen der Milz waren von derselben Länge wie diejenigen der Hypophyse ⁵⁶. In mononukleären Zellen aus humanem Blut wurde dagegen weder unter Kontrollbedingungen noch nach Lipopolysaccharid-Stimulation POMC mRNA in voller Länge nachgewiesen ⁵⁷. Auf Proteinebene wurde β -Endorphin im Milzextrakt mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) und RIA (Radioimmunoassay) ⁴ sowie immunhistochemisch in Monozyten/Makrophagen des entzündeten Subkutangewebes identifiziert ^{2, 3}. Die Expression der anderen Opioidpeptide (Met-Enkephalin, Dynorphin und Endomorphin-1 und -2) in Monozyten/Makrophagen erfolgte sowohl auf der mRNA als auch auf der Proteinebene ^{6, 7}.

Unter Entzündungsbedingungen migrieren Monozyten/Makrophagen verstärkt in das Gewebe, und die Anzahl Opioidpeptid-haltiger Leukozyten sowie der Gehalt an β -Endorphin nimmt im Vergleich zu den Kontrollbedingungen zu ⁸. In Monozyten in der Blutzirkulation und in Monozyten/Makrophagen im entzündeten Gewebe wurden zudem die Enzyme und Bindungsproteine nachgewiesen, die für die POMC-Prozessierung und die β -Endorphin-Freisetzung nötig sind. Das weist darauf hin, dass Monozyten/Makrophagen in der Lage sind, β -Endorphin-Peptide zu produzieren und aus sekretorischen Granula freizusetzen ⁵⁸. Um die funktionelle Bedeutung der Opioidpeptid-Expression von Monozyten/Makrophagen zu untersuchen, wurde die Depletionsstrategie mit Clodronat-haltigen Liposomen gewählt ^{33, 35}.

Die Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen führte zur Depletion Opioidpeptid-haltiger Monozyten/Makrophagen, allerdings wurden nicht spezifisch Opioidpeptid-haltige Monozyten/Makrophagen depletiert, sondern unspezifisch alle Monozyten/Makrophagen und damit auch andere von ihnen freigesetzte Transmitter, wie Interleukine und Tumornekrosefaktor. Es stellt sich deshalb die Frage, ob möglicherweise das Fehlen von anderen Transmittern für die reduzierte Schmerzkontrolle von Bedeutung ist. Basierend auf

Vorarbeiten zur CRH-vermittelten Induktion der Opioidpeptid-Freisetzung durch Stress wurde in dieser Arbeit von einer peripheren, Stress-induzierten, Opioid-vermittelten Antinozizeption ausgegangen 14-16.

4.2.2. Intraperitoneale Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen

Die Effektivität der Depletion von Monozyten/Makrophagen mittels Clodronat-haltiger Liposomen wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In vorangegangenen Arbeiten wurde *in vivo* nach systemischer Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen eine effektive Depletion von Monozyten im Blut und von gewebeständigen Makrophagen in Leber und Milz erzielt 33, 59, 60. Andere Arbeitsgruppen zeigten hingegen, dass die systemische Gabe von Clodronat-haltigen Liposomen die Anzahl der gewebeständigen Monozyten/Makrophagen im Synovium in einem Arthritismodell nicht beeinflusst 61. Aufgrund der fehlenden Depletion gewebeständiger Monozyten/Makrophagen bei intraperitonealer Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen in unserem Modell (Abb. 3A) wurden die nachfolgenden Experimente mit einer intraplantaren Injektion durchgeführt. Eine solche lokale Anwendung wurde von anderen Gruppen intraartikulär 62, intratestikulär 63, intranasal/ intratracheal 64, 65 und subkonjunktival 66 erfolgreich eingesetzt.

4.2.3. Aufnahme Fluoreszenz-haltiger Liposomen bei intraplantarer Injektion

Nach intraplantarer Injektion Fluoreszenz-haltiger Liposomen inkorporierte ein hoher Prozentsatz (99 % nach 48 h und 77 % nach 96 h Entzündung) CD45⁺-Zellen den Fluoreszenzfarbstoff. Der Prozentsatz fluoreszierender Zellen war jedoch bei der 96 h dauernden Entzündung im Vergleich zu der 48 h dauernden Entzündung geringer (Abb. 4C). Mögliche Erklärungen hierfür sind die Migration von Monozyten ins Gewebe in den 48 h nach der letzten Injektion der Liposomen und eine Abnahme der Fluoreszenzintensität des Farbstoffes über den relativ längeren Zeitraum. (Vergleiche hierzu auch 4.2.5).

4.2.4. Leukozytensubpopulationen nach intraplantarer Injektion Clodronat-haltiger Liposomen

Nach intraplantarer Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen kam es zu einer signifikanten aber mäßigen Reduktion der Monozyten/Makrophagen um 30 - 35 % (Abb. 5A).

Diese Reduktion war selektiv, da andere Leukozytensubpopulationen (i.e. Granulozyten und Lymphozyten) nicht vermindert waren (Abb. 5BC). Selektive Depletionsergebnisse wurden auch im Differentialblutbild nach systemischer Anwendung Clodronat-haltiger Liposomen beschrieben⁶¹. In scheinbarem Widerspruch hierzu steht die hohe Effizienz der Inkorporation Fluoreszenz-haltiger Liposomen (siehe Kapitel 4.2.3.) und *in vitro* Studien, in denen gezeigt wurde, dass phagozytierende Zellen wie Monozyten/Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Endothelzellen Liposomen aufnehmen. Eine zur Depletion ausreichende zytotoxische Wirkung wurde jedoch *in vitro* nur in durch Lipopolysaccharid aktivierten Monozyten/Makrophagen erzielt⁶⁷. Die Selektivität der Depletion durch Clodronat-haltige Liposomen wurde auch in verschiedenen *in vivo* Studien beschrieben^{59, 68}. Es wurde vermutet, dass nur in aktivierten Monozyten/Makrophagen eine zur Apoptose-Induktion ausreichende Konzentration an Clodronat zu dem ATP-Analogon metabolisiert werde. Denkbar ist auch ein höherer Gehalt an Mitochondrien in aktivierten Monozyten/Makrophagen oder zellspezifische Unterschiede in der ADP-ATP-Translokase der mitochondrialen Membran⁶⁹.

Die Effektivität der Depletion von Monozyten/Makrophagen durch Clodronat-haltige Liposomen wies in der Literatur je nach Zielgewebe erhebliche Unterschiede auf³³. Monozyten in der Zirkulation und bestimmte Gewebemakrophagen, etwa in der Leber und der Milz, wurden mit einer Effizienz von > 70 % eliminiert^{59, 68}. Im entzündetem Synovium (FCA-induziertes Arthritismodell)^{61, 70, 71} oder in der Umgebung einer peripheren Nervenverletzung (Wallerische Nervendegeneration nach Nerven transektion)^{72, 73} wurden dagegen Depletionen von 15 - 60 % beschrieben. Die in dieser Arbeit erzielte Effizienz der Monozytendepletion von 30 - 35 % lag damit im Bereich der von anderen Arbeitsgruppen erzielten Ergebnisse im peripheren entzündeten Gewebe. Die Differenzen waren vermutlich durch Unterschiede in der Gewebegängigkeit der Liposomen bedingt und durch die Heterogenität der Monozyten/Makrophagen in verschiedenen Geweben. Auch waren die in den verschiedenen Studien verwendeten Clodronat-haltigen Liposomen nur eingeschränkt vergleichbar, da die Herstellungstechniken nicht einheitlich waren. Es wurden verschiedene Liposomendurchmesser (gefiltert vs. ungefiltert) verwendet und die endgültige Clodronat-Konzentration konnte bisher nicht reproduzierbar bestimmt werden³³.

Möglicherweise ließe sich der Depletionserfolg durch eine häufigere Injektion von intraplantaren Injektionen steigern. Eine solche Strategie führte jedoch zu einer hohen Inzidenz intraplantarer Hämatom, die das Entzündungsgeschehen beeinträchtigten. Zudem wurde in der Literatur eine abnehmende Effektivität der Depletion bei einer zweiten intravenösen Injektion beschrieben ⁷⁴.

Eine höhere Dosis von Clodronat pro Liposom ließ sich aufgrund der beschränkten Löslichkeit des Stoffes nicht erreichen. Es gibt Hinweise darauf, dass eine negative Oberflächenladung zu einer gesteigerten Aufnahme von Liposomen in Monozyten/Makrophagen führt ^{75, 76}. Eigene Versuche mit Liposomen positiver oder negativer Ladung führten jedoch nicht zu einer effizienteren Depletion als die im folgenden verwendeten neutralen Liposomen (nicht dargestellte eigene Daten).

4.2.5. Opioidpeptid-haltige Leukozyten nach lokaler Injektion Clodronat-haltiger Liposomen in der späten Entzündung

Die Anzahl Opioidpeptid-haltiger Leukozyten nahm parallel zur Verringerung der Monozyten/Makrophagen-Anzahl ab (um 30 - 42 %; Abb. 6A). Mit dem gleichen Injektionsschema (Abb. 4A) behandelte Ratten wurden von Dr. D. Labuz Verhaltensuntersuchungen unterzogen. Diese Tests ergaben bei vergleichbaren Basalwerten in der behandelten und der Kontrollgruppe ein signifikant verminderte CWS-induzierte Antinozizeption in der behandelten Gruppe. Die Abnahme betrug sowohl 48 als auch 96 h nach FCA-Injektion 20 % (Abb. 6B). Geht man von den Ergebnissen der Fluoreszenzaufnahme aus, die nach 48 h Entzündung mit 99 % höher war, als nach 96 h mit 77 %, so wäre zunächst eine effizientere Depletion der Monozyten nach 48 h Entzündung zu erwarten. Andererseits war die Abnahme der Opioidpeptid-haltigen Leukozyten mit 35 % nach 48 h und 42 % nach 96 h Entzündung nicht signifikant unterschiedlich. Die mögliche Erklärung für diese Ergebnisse liegt in der abnehmenden Intensität der Fluoreszenz und dem Einwandern neuer Monozyten/Makrophagen mit Fortdauer der Entzündung. Eine in vitro Arbeit zeigte, dass ein Maximum an Inkorporation von Fluoreszenz-haltigen Liposomen unter Kontrollbedingungen nach 24 h und unter LPS-Stimulation nach 13 h erreicht war ⁶⁷. In früheren Studien ließ sich nachweisen, dass der antinozizeptive Effekt des Kaltwasserschwimmens durch eine lokale nicht aber durch eine systemische Gabe von

Naloxon (= Opiatrezeptorantagonist) aufgehoben wurde und es sich somit um eine periphere Opioid-vermittelte Antinozizeption handelt⁴⁴. Immunzytochemische Färbungen für die einzelnen Opioidpeptide wiesen zum Zeitpunkt 96 h mehr β -Endorphin als Enkephalin und wenig Dynorphin nach. Unter Kontrollbedingungen ohne Entzündung waren praktisch keine Opioidpeptide im Gewebe nachweisbar. Die Opioidpeptid-haltigen Zellen wurden morphologisch als Makrophagen, Mastzellen und Lymphozyten beschrieben. Die Anwendung von Anti-pan-Opioid-Antikörper 3E7 und von spezifischem Anti- β -Endorphin-Antikörper blockierte die CWS-induzierte Antinozizeption, nicht aber Anti-Enkephalin- oder Anti-Dynorphin-Antikörper. Dadurch wird die funktionelle Bedeutung des β -Endorphin für die periphere Antinozizeption unterstützt^{2, 44}. Hinsichtlich der Seite der Opiatrezeptoren fand sich im gleichen Entzündungsmodell eine zunehmende Transkription von MOR (μ -Opioidrezeptoren) mRNA in Hinterhornanglien und ein gesteigerter axonaler Transport von MOR in periphere Nerven im Entzündungsgebiet^{19, 77}. Es ließ sich eine zweiphasige Zunahme der MOR mRNA zu den Zeitpunkten 2 und 96 h nach Entzündungsinduktion nachweisen. Die Anzahl der DOR mRNA (δ -Opioidrezeptoren) blieb dabei unverändert⁷⁸. Weiterhin wurde eine enge Korrelation zwischen der Anzahl Opioidpeptid-haltiger Leukozyten im entzündeten Gewebe und dem Ausmaß der peripheren Opioid-vermittelten Antinozizeption beschrieben⁸. In früheren Studien wurde eine systemische Immunsuppression durch Ganzkörperbestrahlung oder Gabe von Cyclosporin A erzielt. Die endogene Opioid-vermittelte CWS-induzierte Schmerzkontrolle war dadurch aufgehoben^{2, 3}. In dieser Arbeit konnte jedoch wegen der nicht gegen eine bestimmte Zellpopulation gerichteten Immunsuppression die Rolle der verschiedenen Leukozytensubpopulationen nicht untersucht werden. Im Gegensatz dazu wurden in der vorliegenden Arbeit die Monozyten/Makrophagen selektiv depletiert und die CWS-induzierte Schmerzkontrolle signifikant vermindert (Abb. 5A und 6B). Die CWS-induzierte Schmerzkontrolle wurde jedoch lediglich vermindert und nicht ausgeschaltet. Eine mögliche Erklärung wäre die partielle Depletion der Monozyten/Makrophagen, so dass nach der Behandlung mit Clodronat-haltigen Liposomen noch 60 % der Opioidpeptid-haltigen Leukozyten vorhanden waren. Eine andere Arbeit untersuchte, ob polymorphnukleäre Granulozyten in der frühen Entzündung (2 h nach FCA-Injektion) die periphere, Stress-induzierten, Opioid-vermittelte Antinozizeption vermitteln. Hierbei wurden die zirkulierenden und gewebeständigen

Granulozyten zu > 90 % depletiert, was die periphere Opioid-vermittelte Antinozizeption vollständig aufhob⁷⁹. Eine immunhistochemische Arbeit wies nach 96 h Entzündung in einer Doppelfärbung sowohl in Monozyten/Makrophagen als auch in B- und T-Lymphozyten β -Endorphin nach³. Die Untersuchung zum zeitlichen Verlauf der Leukozyteneinwanderung (Abb. 1) zeigte, dass die CD3⁺-Lymphozyten unter 5 % der Leukozyten im entzündeten Gewebe ausmachten. Eine funktionelle Bedeutung dieser Leukozytensubpopulation kann damit jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Alternativ sind Opioidpeptide auch in Keratinozyten nachgewiesen worden und tragen möglicherweise ebenfalls zur peripheren Opioid-vermittelten Antinozizeption bei⁸⁰. Insgesamt kann man feststellen, dass die periphere, Opioid-vermittelte, Stress-induzierte Antinozizeption bereits durch eine moderate Abnahme der Opioidpeptid-haltigen Monozyten/Makrophagen vermindert wird und dass Monozyten/Makrophagen zur peripheren, Stress-induzierten, Opioid-vermittelten Antinozizeption beitragen.

4.3. Ausblick

In der Zukunft könnte die periphere Anwendung exogen zugeführter oder gentechnisch exprimierter endogener Opiode eine nebenwirkungsärmere Schmerztherapie im Vergleich zur klassischen systemischen Opioidgabe darstellen^{24, 81}. In der Gentherapie werden Möglichkeiten untersucht, die POMC-Expression in Leukozyten oder die Expression von Opioidrezeptoren auf Neuronen der Hinterhornanglien zu steigern und zur Antinozizeption zu nutzen^{82, 83}. Der letztgenannte Ansatz wird von der Erkenntnis unterstützt, dass in der frühen Entzündung die körpereigene Schmerzkontrolle nicht durch die Anzahl der Opioidpeptid-haltigen Leukozyten begrenzt wird, sondern durch die Expression von Opioidrezeptoren auf Hinterhornanglien-Neuronen⁸⁴. Ob auch in der späten Entzündung die Opioidrezeptorexpression der limitierende Faktor für die körpereigene Schmerzkontrolle ist oder ob hier die Opioidpeptid-Freisetzung aus Leukozyten begrenzend wirkt, ist noch nicht geklärt.