

Aus dem CharitéCentrum 7 für Anästhesiologie, OP-Management und Intensivmedizin, Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin,
Campus Benjamin Franklin,
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle von Substanz P in der peripheren Opioidanalgesie

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Christian Nicolas Lux

aus Berlin

Gutachter/in: 1.: Priv.-Doz. Dr. H. Rittner
2.: Prof. Dr. B. Rehberg-Klug
3.: Priv.-Doz. Dr. J. Kraus

Datum der Promotion: 03. September 2010

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	7
1.1	Stand der Wissenschaft.....	7
1.2	Schmerzdefinition.....	8
1.3	Opioidhaltige Immunzellen im entzündeten Gewebe.....	9
1.4	Das periphere Nervensystem (PNS).....	12
1.5	Das Neuropeptid Substanz P.....	13
1.5.1	Einführung der NK1-R-Antagonisten.....	14
1.6	Fragestellung.....	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Versuchstiere.....	16
2.2	Versuchsmodell.....	16
2.2.1	<i>Systemische</i> Applikation.....	16
2.2.2	<i>Zentrale</i> Applikation.....	16
2.3	ELISA (enzyme linked immunosorbent assay).....	17
2.3.1	Gewebeaufbereitung.....	17
2.3.2	Protokoll.....	18
2.4	Durchflusszytometrie.....	18
2.4.1	Gewebeaufbereitung.....	19
2.4.2	Antikörper.....	19
2.4.3	Protokolle der Antikörperfärbungen.....	21
2.5	Verhaltensexperimente.....	22
2.6	Versuchsprotokolle.....	23
2.6.1	Substanz P-Messung in der entzündeten Pfote.....	23
2.6.2	Färbung des NK1-R auf den Leukozyten.....	23

2.6.3	Die <i>systemische</i> Applikation des NK1-R-Antagonisten L-733,060.....	23
2.6.4	Die <i>zentrale</i> Applikation des NK1-R-Antagonisten L-733,060.....	23
2.6.5	Die <i>systemische</i> Applikation des NK1-R-Antagonisten SR140333.....	24
2.6.6	Die <i>zentrale</i> Applikation des NK1-R-Antagonisten SR140333.....	24
2.7	Statistische Auswertung	25
2.8	Lösungen	25
2.9	Substanzen	26
2.10	Geräte	26
2.11	Software.....	27
3	ERGEBNISSE.....	28
3.1	Substanz P-Messung in der entzündeten Pfote.....	28
3.2	NK1-R-Expression auf Leukozyten	28
3.3	Die <i>systemische</i> Gabe von L-733,060	30
3.3.1	Blockade der Einwanderung von Immunzellen in die entzündete Pfote	30
3.3.2	Hemmender Einfluss auf die endogene, opioidvermittelte Antinozizeption nach systemischer Anwendung	32
3.4	Die <i>zentrale</i> Gabe von L-733,060.....	33
3.4.1	Unveränderte Einwanderung der Leukozyten nach zentraler Applikation	33
3.4.2	Unveränderte endogene, opioidvermittelte Antinozizeption nach zentraler Applikation	34
3.5	Die <i>systemische</i> Gabe von SR140333	35
3.5.1	Selektiv peripher wirkende NK1-R-Antagonisten blockieren die Einwanderung von Leukozytensubpopulationen.....	35
3.5.2	Inhibition der endogenen, opioidvermittelten Antinozizeption.....	36
3.6	Die <i>zentrale</i> Gabe von SR140333.....	37
4	DISKUSSION	38

4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	38
4.2	Diskussion von Material und Methoden	38
4.2.1	Das FCA-Entzündungsmodell.....	38
4.2.2	L-733,060	39
4.2.3	SR140333	40
4.3	Diskussion der Ergebnisse	41
4.3.1	Steigender Gehalt an Substanz P im Entzündungsverlauf	41
4.3.2	Leukozyten mit positiver NK1-R-Expression.....	41
4.3.3	Die <i>systemische</i> Gabe der NK1-R-Antagonisten	42
4.3.4	Die <i>zentrale</i> Gabe der NK1-R-Antagonisten	45
4.4	Diskussion der Substanz P-getriggerten Leukozytenrekrutierung	46
4.5	Ausblick.....	47
5	ZUSAMMENFASSUNG	49
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	51
7	LITERATURVERZEICHNIS	52
8	DANKSAGUNG	60
9	LEBENS LAUF	61
10	ERKLÄRUNG.....	62

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf der *International Narcotics Research Conference (INRC) 2007* in Berlin im Rahmen des Symposiums „Opioid-Nonopioid Interactions“ unter dem Titel „*Recruitment of opioid-containing leukocytes and peripheral antinociception is inhibited by neurokinin (NK)1 receptor antagonists*“ von Christian Lux präsentiert. Unter dem Titel „*Neurokinin-1 Receptor Antagonists Inhibit the Recruitment of Opioid-containing Leukocytes and Impair Peripheral Antinociception*“ wurde diese Arbeit von Heike L. Rittner, Christian Lux, Dominika Labuz, Shaaban A. Mousa, Michael Schäfer, Christoph Stein und Alexander Brack in *Anesthesiology* veröffentlicht (Anesthesiology. 2007 Dec;107(6):1009-17).

1 Einleitung

1.1 Stand der Wissenschaft

Die analgetische und narkotische Wirkung des aus dem Schlafmohn (*Papaver somniferum*) gewonnenen Opiums ist im Mittelmeerraum schon etwa ab dem 3. bis 4. Jahrhundert v. Chr. bekannt gewesen. Für diese Wirkungen sind die im Opium enthaltenen Opiumalkaloide, die *Opiate* verantwortlich, deren Hauptvertreter das Morphin ist.

Morphin wurde erstmals 1805 vom Apotheker Friedrich Wilhelm Adam Sertürner in Paderborn isoliert. Die Strukturformel ermittelte Robert Robinson 1925. Die erste Totalsynthese führte M. Gates 1952 in Rochester durch.¹ Die synthetisch hergestellten Abkömmlinge des Morphins werden als *Opioide* bezeichnet. Heute stehen die Opioide in der Schmerztherapie an hervorgehobener Stelle. Sowohl in der Therapie akuter wie auch Tumorschmerzen finden sie Anwendung. Im Stufenschema der Weltgesundheitsorganisation (World Health Organisation) für Schmerzzustände/Tumorschmerzen werden sie für die mittlere und höchste Stufe eingesetzt. Leider sind Opioide nicht frei von Nebenwirkungen. Neben Übelkeit und Sedierung führen Opioide auch zu Abhängigkeit und Atemdepression. Diese Eigenschaften erschweren bisweilen ihren klinischen Einsatz. Ihre Wirkung erzielen die Opioide über die Bindung an spezifische Opioidrezeptoren (μ , δ und κ), die in unterschiedlich starker Expression nahezu im gesamten Nervensystem vorkommen. In somatischen und viszeralen, sensorischen Neuronen, im Rückenmark, im Mittelhirn und im Cortex sind diese Rezeptortypen u.a. für die Schmerzhemmung verantwortlich.² Neben den für die Medizin synthetisch hergestellten Opiatabkömmlingen werden im menschlichen und tierischen Organismus auch körpereigene, endogene *Opioidpeptide* produziert. Dabei unterscheidet man 3 Gruppen von endogenen Opioidpeptiden: die Endorphine, die Enkephaline und die Dynorphine. Hauptorte ihrer Produktion sind der Hypothalamus und die Hypophyse. Sie alle binden an die 3 (μ , δ und κ) Opioidrezeptoren. Der analgetische Effekt, der für diese Arbeit von Interesse ist, wurde lange Zeit auf die Bindung der Opioide an zentralnervöse Rezeptoren bezogen.³

In den 1980er Jahren wurden dann zum ersten Mal opioidhaltige Leukozyten im menschlichen Blut und in der Milz von Mäusen nachgewiesen.⁴ Wenig später konnte gezeigt werden, dass die Opioidpeptide dieser Immunzellen an Opioidrezeptoren auf peripheren, primär sensorischen Neuronen binden und dadurch eine antinozizeptive Wirkung im entzündeten Gewebe haben.⁵

1.2 Schmerzdefinition

Die International Association for the Study of Pain hat in ihrer "Classification of Chronic Pain" von 1994 eine Taxonomie des Schmerzes zusammengestellt. Die Definitionen, der in dieser Arbeit häufig wiederkehrenden Begriffe, sollen an dieser Stelle genannt werden, um das weitere Verständnis zu erleichtern:

Ein *Nozizeptor* ist ein Rezeptor, der sensitiv ist für einen schmerzhaften Reiz oder einen Reiz, der bei längerem Einwirken schmerzhaft wird. *Schmerz* ist definiert als ein unerfreuliches, sensorisches und emotionales Ereignis, welches mit einer tatsächlichen oder möglichen Gewebsschädigung verbunden ist oder als eine solche beschrieben wird. Da Schmerz auch eine subjektive Komponente besitzt, welche z.B. durch emotionale oder kulturelle Einflüsse bedingt ist, verwenden wir diesen Begriff nur im Zusammenhang mit Untersuchungen am Menschen. Für die Quantifizierung von Schmerzen beim Menschen bedient man sich dafür beispielsweise der visuellen oder numerischen Analogskala. Hierbei wird dem momentan empfundenen Schmerz eine entsprechende Mimik bzw. ein Zahlenwert zugeordnet. Das Fehlen von Schmerz als Antwort auf eine Stimulation, die normalerweise schmerzhaft wäre, bezeichnet man als *Analgesie*. Da sich im Tierexperiment keine subjektiven Empfindungen der Tiere messen lassen und diese auch nicht in der Lage sind ein Gefühl wie Schmerz zu verbalisieren, spricht man in diesem Zusammenhang von *Nozizeption*. Unter dem Begriff *Hyperalgesie* versteht man die gesteigerte Antwort auf einen normalerweise schwach schmerzhaften Stimulus. Man beobachtet das Verhalten der Tiere auf einen schwach schmerzhaften Stimulus, beispielsweise das Wegziehen der Pfote auf einen mechanischen Reiz hin. Die *Antinozizeption* ist demnach die Nicht-Weiterleitung von Schmerz über eben diesen Rezeptor.⁶

Kommt es zu einer wie auch immer gearteten Gewebsschädigung, wandeln primär sensorische Neurone mechanische, chemische oder thermische Reize in Aktionspotentiale um. Die daran maßgeblich beteiligten Nervenfasern lassen sich in 2 Gruppen unterteilen. Zum einen handelt es sich dabei um die so genannten „schnellen“ Fasern (A δ -Fasern), welche durch eine Myelinscheide isoliert sind und mit einer Nervenleitgeschwindigkeit von bis zu 20 m/s die Schmerzinformation weitergeben können. Sie sind für den scharfen, stechenden Schmerzcharakter und eine genaue Schmerzlokalisierung im Körper verantwortlich. Die unmyelinisierten, „langsamen“ Fasern (C-Fasern) dagegen leiten den Schmerz nur mit einer Geschwindigkeit von ca. 2 m/s weiter. Sie sorgen für einen dumpfen, nicht genau lokalisierbaren Schmerz. Über den Vorderseitenstrang des Rückenmarks (Tractus spinothalamicus) gelangen die durch den Schmerzreiz ausgelösten Impulse in das limbische System und den cerebralen Cortex. Im limbischen System, hier speziell im

Thalamus, wird das Ereignis „Schmerz“ emotional bewertet. Im Bereich des Gyrus postcentralis des sensiblen Cortex wird dem Schmerzgeschehen die genaue Lokalisation im Körper zugeordnet.

Auf den primär sensorischen Neuronen werden μ -, κ - und δ -Opioidrezeptoren exprimiert, die zuvor von ihrem Synthesort in der Rückenmarkshinterwurzel axonal in die Peripherie transportiert werden.^{7,8}

Binden nun endogene oder exogene Opioide an diese Rezeptoren, wird am peripheren Neuronenende über ein inhibitorisches G-Protein und darauf folgende intrazelluläre cyclische Adenosinmonophosphat-Erniedrigung unter anderem der Na^+ - und Ca^{2+} -Einstrom in das Neuron vermindert. Die Reizweiterleitung wird dadurch blockiert.

1.3 Opioidhaltige Immunzellen im entzündeten Gewebe

Das für diese Arbeit angewandte Modell der „Entzündung in der Hinterpfote der Ratte“ wurde in dieser Form bereits Ende der 1980er Jahre von Stein et al. etabliert. Als Agens für die Auslösung dieser Entzündung wird modifiziertes Freund's komplettes Adjuvans (modified Freund's Complete Adjuvant/FCA) benutzt, daher auch kurz „FCA-Modell“. Es handelt sich hierbei um eine 0,1%ige ölige Lösung hitzeinaktivierter Mykobakterien (*Mycobacterium butyricum*) in 85% Drakeol 5 NF und 15% Arlacel A. Bereits 2 h nach intraplantarer (i.pl.) Injektion sind deutliche Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung und Überwärmung zu erkennen.

Die mittels eines Algesiometers gemessene Pfortendruckschwelle ist auf der entzündeten Seite im Vergleich zur anderen Seite deutlich erniedrigt. Die Pfortendruckschwelle bezeichnet den Druck bzw. das Gewicht, ab welchem das Versuchstier einen schmerzhaften Reiz empfindet und die Pfote zurückzieht. Das Algesiometer übt dabei einen zunehmenden Druck auf die Rattenpfote aus. Eine nähere Beschreibung des Versuchablaufs ist unter Kapitel 2.5 zu finden. Dies lässt darauf schließen, dass die im entzündeten Gewebe entstandene periphere Hypersensitivität für die Veränderungen der Pfortendruckschwelle verantwortlich ist.⁹

Wie bereits erwähnt, wurde der für die Analgesie verantwortliche Angriffspunkt der Opioide lange Zeit allein im zentralen Nervensystem (ZNS) vermutet.³ Stein et. al. konnten jedoch zeigen, dass auch periphere Opioidrezeptoren eine Rolle bei der Vermittlung von Analgesie spielen.¹⁰

Externe Stimuli wie der „cold water swim“ (CWS), der an anderer Stelle noch ausführlich erläutert wird, können endogene Opioide freisetzen, welche u.a. für Analgesie sorgen. Beim CWS werden die Versuchstiere in kaltes Wasser gesetzt und müssen darin für etwa 1 Minute schwim-

men. Der dabei erzeugte Stress führt zur Ausschüttung von Stresshormonen wie etwa dem Corticotropin-releasing Hormone (CRH). Im Verhaltensexperiment konnte nun gezeigt werden, dass (i) die Pfotendruckschwelle in der entzündeten Pfote nach dem CWS signifikant gegenüber sowohl der Basalschwelle als auch der nicht-entzündeten Pfote ansteigt. (ii) Durch i.pl. Injektion von Naloxon, einem Opioidrezeptorantagonisten, konnte dieser einseitige antinozizeptive Effekt dosisabhängig reduziert werden. Eine systemische Applikation von Naloxon derselben Konzentration, intravenös (i.v.) oder subkutan, hatte keine Auswirkung auf die Pfotendruckschwelle. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass (i) der antinozizeptive Effekt an das Vorhandensein der Entzündung gekoppelt ist und (ii) es sich hierbei sehr wahrscheinlich um eine periphere, opioidvermittelte Antinozizeption handelt.

Mittels lokal (i.pl.) injizierter opioidrezeptorspezifischer Antagonisten (μ , δ , κ) konnte zudem gezeigt werden, dass μ - und δ -Opioidrezeptoren für die periphere Antinozizeption hauptverantwortlich sind. Außerdem konnten Antikörper gegen β -Endorphin den CWS-Effekt rückgängig machen, während Antisera gegen Met-Enkephalin und Dynorphin keine Veränderungen brachten. Diese Erkenntnisse scheinen aber nur für die Spätphase (> 4 Tage) der Entzündung zu gelten. Neuere Versuchsreihen konnten eine Beteiligung von Met-Enkephalin und Dynorphin an der peripheren Antinozizeption in der frühen Entzündungsphase (6 h) zeigen.¹¹ Die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse ist als neuroendokrines System u.a. für die Freisetzung endogener Opioide in Stresssituationen verantwortlich. Sie scheint jedoch im Falle der peripheren, opioidvermittelten Antinozizeption nicht die Quelle für die endogenen Opioidliganden zu sein.¹² Vielmehr lassen sich im entzündeten Gewebe eine Vielzahl von unterschiedlichsten Immunzellen (Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Plasmazellen und Granulozyten) nachweisen, welche sich mit einem Antikörper gegen β -Endorphin positiv färben lassen. Eine immunsuppressive Therapie mit Cyclosporin A hebt den antinozizeptiven Effekt des CWS auf.⁵

Um die Einwanderung von Immunzellen in das entzündete Gewebe auszulösen, sind chemotaktisch wirkende Substanzen von Nöten. Sie sollen den Leukozyten den Weg zum Ort des Geschehens weisen. Neben anderen Substanzen (Komplementfaktoren, Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanin etc.) sind im menschlichen und tierischen Organismus Mediatoren, die sog. „Chemokine“ (von chemotaktische Zytokine), dafür verantwortlich.¹³ Sie werden am Ort der Entzündung von Endothelzellen oder Makrophagen sezerniert, um dann über die Bindung an Chemokin-Rezeptoren auf den zirkulierenden Immunzellen deren Auswanderung ins Gewebe zu forcieren.

Bei den Chemokinen handelt es sich um eine große Gruppe von kleinen, sehr strukturverwandten

Peptiden. Die enthaltenen Disulfidbrücken sind für die jeweils charakteristische Struktur verantwortlich. In der Nomenklatur teilt man die Chemokine in 3 Gruppen: CC, CXC oder CX₃C, abhängig von der Anzahl der Aminosäuren (0, 1 oder 3) zwischen den ersten beiden Cysteinen (C). Die meisten Chemokine werden sezerniert, einige aber auch auf der Oberfläche der Zellen exprimiert. Die für diese Liganden spezifischen Chemokinrezeptoren werden in unterschiedlicher Verteilung auf allen Immunzellsubpopulationen exprimiert. Dies ist u.a. abhängig vom Grad der Differenzierung der Leukozyten. Neben der Regulierung der Leukozytenauswanderung sind Chemokine auch an deren Ausreifung und an so entscheidenden Prozessen wie der Organogenese und der Hämatopoese beteiligt.¹⁴

Die Migration von Immunzellen ins entzündete Gewebe ist ein mehrstufiges Geschehen. Adhäsionsmoleküle führen die Leukozyten zum verletzten Gewebe. Dabei wird der erste Schritt, das „Rolling“, durch die auf den Leukozyten (L-Selektin) und die auf dem Gefäßendothel (P- und E-Selektin) exprimierten Selektine initiiert. Das Endothel exprimiert gleichzeitig Integrine, die die Bindung, das „Sticking“, der Leukozyten an die Endotheloberfläche verstärken sollen. Zu diesen gehören auch das „intercellular adhesion molecule-1“ (ICAM-1) und das „platelet-endothelial cell adhesion molecule-1“. Wird diese Kaskade an einer Stelle gestört, kann die Extravasation der Immunzellen nicht mehr regelrecht ablaufen.^{15,16}

Die Produktion von β -Endorphin in den Leukozyten wird unter Entzündungsbedingungen verstärkt, zudem werden diese Zellen vermehrt zum Ort der Entzündung rekrutiert. In der frühen Phase (2 bzw. 6 h) der Entzündung sind es vor allem die polymorphonukleären Leukozyten (PMN), auch Granulozyten genannt, die Opioidpeptide sezernieren. Im späteren Verlauf (96 h) werden sie von den Monozyten und Makrophagen abgelöst. Im nicht-entzündeten Gewebe dagegen findet man kaum opioidhaltige Immunzellen.¹⁷ Brack et al. konnten zeigen, dass die kombinierte Blockierung der Chemokine macrophage inflammatory protein-2 bzw. CXCL2/3 und keratinocyte-derived chemokine bzw. CXCL1 zu einer signifikant erniedrigten Zahl von PMN in der entzündeten Pfote führt. Gleichzeitig war die Antinozizeption im Pfortendruckschwellen-Test verringert.¹⁸ Die Gesamtzahl der PMN wurde bei diesen Versuchen jedoch nur um ca. 50% reduziert, was die Vermutung nahelegt, dass neben den Chemokinen auch noch andere Mediatoren für die Immunzellrekrutierung verantwortlich sein müssen.

Um den antinozizeptiven Effekt auszulösen, müssen die ausgewanderten Leukozyten die Opioidpeptide freisetzen. Cabot et al. konnten zeigen, dass die Stimulierung von opioidhaltigen Immunzellen *in vitro* mit Interleukin-1 oder CRH zu einer Freisetzung der Opioidpeptide führt. Dabei ließ sich außerdem nachweisen, dass diese Freisetzung an die Anwesenheit von Ca²⁺-Ionen gebunden ist und durch K⁺-Ionen ausgelöst wird. *In vivo* kann man diese Freisetzung

dosisabhängig mittels lokaler Injektion von CRH ebenfalls auslösen.¹⁹⁻²²

Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich zeigen, dass die auf den PMN exprimierten Chemokinrezeptoren-2 (CXCR2) neben der Rekrutierung dieser Zellen ins entzündete Gewebe auch für die Freisetzung von Opioidpeptiden verantwortlich sind. Bisher war bekannt, dass die Liganden des CXCR2 (CXCL2/3), zu denen u.a. Interleukin-8 zählt, über die Bindung an diese Rezeptoren einen chemotaktischen Effekt auslösen. In besagter Studie wurde nun gezeigt, dass eine *in vitro* durchgeführte Stimulierung humaner PMN mit CXCL2/3 zu einer Sekretion von Opioidpeptiden aus den Zellen führt. Dieser Vorgang ist ebenfalls vom intrazellulären Ca^{2+} -Gehalt abhängig. *In vivo* konnte die lokale Injektion von CXCL2/3 in die entzündete Pfote eine Antinozizeption induzieren. Dieser Vorgang wiederum ließ sich durch Depletion der Leukozyten und auch durch Chelatisierung des intrazellulären Ca^{2+} aufheben.²³

1.4 Das periphere Nervensystem (PNS)

Die Wirkung der Chemokine auf die Immunzellen scheint jedoch nicht allein verantwortlich für den Vorgang der Leukozytenmigration zu sein.

Einige Studien haben gezeigt, dass das PNS ebenfalls einen Beitrag dazu leistet. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von der „neurogenen Entzündung“. Werden die peripheren, sensorischen Nerven durch einen externen Stimulus (z.B. chemisch oder elektrisch) aktiviert, kommt es zu einer Vasodilatation und Plasmaextravasation in dem betroffenen Gebiet. Daraus resultierend lassen sich auch Entzündungszellen in diesem Gewebe finden.

Es konnte so beispielsweise gezeigt werden, dass die Durchtrennung von Nerven oder die chemische Zerstörung der Nozizeptoren durch Stoffe wie Capsaicin (Inhaltsstoff der Chilischote) einen Effekt auf das Entzündungsgeschehen haben. Injiziert man Ratten Capsaicin so werden selektiv die Nozizeptoren desensitiviert, also unempfindlich gemacht. Setzt man die Tiere anschließend einem chemischen Stimulus durch z.B. Senföl, Xylene oder auch Capsaicin aus, so kommt es zu keiner Schmerzempfindung. Außerdem kommt es zu einer herabgesetzten Auswanderung von Immunzellen in das von den betroffenen Nerven versorgte Gewebe und damit auch zu einer verminderten Entzündungsreaktion.²⁴

In einer anderen Studie konnte mit der intrathekalen (i.th.) Applikation von Morphin die Zahl der opioidhaltigen Immunzellen in der entzündeten Rattenpfote gesenkt werden. Die Unterbrechung der Schmerzleitung auf zentralnervöser Ebene beeinflusst demnach die Rekrutierung der Leukozyten ins periphere Gewebe.²⁵

Der Mechanismus dieser Interaktion könnte in der Wirkung der Neuropeptide liegen. Diese wer-

den von Nerven produziert und sezerniert.²⁶ Unter Entzündungsbedingungen ist diese Sekretion erhöht. Zu den bekanntesten Neuropeptiden gehören das Calcitonin-Gen Related Peptide (CGRP), das Nozizeptin und Substanz P. Diese spielen eine Rolle in der Immunzellrekrutierung. Substanz P ist in diesem Zusammenhang jedoch der bisher am intensivsten untersuchte Vertreter aus dieser Reihe.

1.5 Das Neuropeptid Substanz P

Substanz P wurde erstmals in den 1930er Jahren beschrieben. Die stark hypotensive Wirkung dieser neu entdeckten Verbindung stand damals im Vordergrund.²⁷ In den 1950er Jahren wurde Substanz P dann als neuronaler Transmitter mit Einfluss auf die Schmerzübertragung vermutet, da man hohe Konzentrationen in den Hinterwurzeln des Rückenmarks fand.²⁸ Heute weiß man, dass Substanz P sowohl im ZNS wie auch im PNS eine Vielzahl von Funktionen erfüllt.²⁹ Der Schwerpunkt des wissenschaftlichen Interesses liegt dabei hauptsächlich auf den vielfältigen peripheren Effekten. Substanz P spielt unter anderem eine wichtige Rolle bei der Entstehung einer so genannten „neurogenen Entzündung“.²⁶ Dabei setzen periphere Endungen primär sensorischer Nerven Mediatoren wie z.B. Tachykinine frei. Substanz P zählt zur Familie der Tachykinine, deren weitere Vertreter u.a. Neurokinin-A und Neurokinin-B sind. Über die Bindung an Neurokinin-Rezeptoren vermitteln diese Peptide ihre Effekte. Man unterscheidet Neurokinin-1-(NK1-R), Neurokinin-2- und Neurokinin-3-Rezeptoren, wobei die Bindungspräferenz von Substanz P beim NK1-R liegt.³⁰ Als Reaktion auf diese Freisetzung kommt es u.a. zur peripheren Vasodilatation, Plasmaextravasation und Leukozytenadhäsion an das Gefäßendothel. Nachfolgend sind einige Beispiele für die klinische Relevanz dieses Phänomens aufgeführt: In der Haut führt die Freisetzung von Substanz P über die Bindung an NK1-R zur Rötung und Quaddelbildung.³¹ Im kardiovaskulären System löst Substanz P über die Bindung an NK1-R eine Stickstoffmonoxid-vermittelte Vasodilatation mit nachfolgender Hypotension aus.³² Eine Hypothese für die Pathophysiologie der Migräne macht die Entstehung einer neurogenen Entzündung und die darauf folgende Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie Substanz P aus dem Nervus trigeminus dafür verantwortlich.³³

Die Beziehung zwischen Substanz P und dem zellulären Immunsystem ergibt bis heute widersprüchliche Antworten. Auf der einen Seite konnte ein chemotaktischer Effekt von Substanz P auf einige Leukozytensubpopulationen gezeigt werden.^{34,35} Auf der anderen Seite ist der Nachweis von NK1-R auf den entsprechenden Zellen nicht immer möglich gewesen.^{36,37} Ein Grund dafür mag auch die sich verändernde Expression verschiedener Rezeptoren während der

Leukozytenreifung sein. So gelang es, einen chemotaktischen Effekt von Substanz P auf neutrophile und eosinophile Granulozyten *in vitro* nachzuweisen.^{34,35} Substanz P konnte zudem die Zytotoxizität³⁸ und die Produktion und Freisetzung von Interleukin-8³⁹ einiger PMN-Populationen steigern. Diese vermutlich NK1-R-vermittelten Effekte waren durch entsprechende Antagonisten teilweise reversibel.^{40,41}

1.5.1 Einführung der NK1-R-Antagonisten

In den 1960er Jahren entdeckte man erstmals Peptide, die antagonistisch am NK1-R wirken.⁴² Die in Anlehnung an diese Substanzen entwickelten peptidischen Antagonisten wiesen eine hohe Neurotoxizität und Histaminfreisetzung im tierischen Organismus auf und waren daher schwierig zu untersuchen.⁴³ Eine Veränderung in der grundlegenden Struktur dieser Substanzen konnte die Nebenwirkungen verringern, sorgte aber gleichzeitig für eine schlechtere orale Bioverfügbarkeit und ZNS-Penetration. Einen echten Durchbruch erreichte man erst Anfang der 1990er Jahre als mit CP-96,345 der erste nicht-peptidische NK1-R-Antagonist entwickelt wurde. Er überwindet die Bluthirnschranke wesentlich leichter und eröffnete deshalb einen sehr viel größeren Anwendungsbereich als seine Vorgänger.^{44,45} In zahlreichen Studien mit diesen neueren Substanzen gelang es dann, die Vielseitigkeit der NK1-R-vermittelten Effekte im tierischen und menschlichen Organismus zu untersuchen. In Tiermodellen konnten neben hemmenden Effekten bei neuropathischem Schmerz,⁴⁶ auch anxiolytische Effekte,⁴⁷ anti-entzündliche Wirkungen bei Colitis⁴⁸ und anti-emetische Wirkungen bei Chemotherapie-induziertem Erbrechen^{49,50} gezeigt werden. Eine dieser Substanzen ist heute in Deutschland unter dem Wirkstoffnamen Aprepitant für die Behandlung von Chemotherapie-induziertem Erbrechen zugelassen. In einigen Ländern erstreckt sich die Zulassung außerdem auch noch auf die Prophylaxe und Therapie der postoperativen Übelkeit und Erbrechen (PONV).⁵¹

Für unsere Studien haben wir zwei der neueren, nicht-peptidischen NK1-R-Antagonisten ausgewählt. L-733,060 (*2S,3S*)-3-((3,5-bis(trifluoromethyl)phenyl)methoxy)-2-phenyl piperidine und SR140333 (*S*)-1-(2-[3-(3,4-dichlorophenyl)-1-(3-isopropoxyphenylacetyl)piperidin-3-yl]ethyl)-4-phenyl-1-azoniabicyclo[2.2.2]octane chloride sind beide bisher in zahlreichen Versuchsreihen zur Erforschung der Schmerzhemmung und der Blockierung der Leukozytenmigration mit Erfolg eingesetzt worden. Sie unterscheiden sich ganz wesentlich in einer ihrer chemischen Eigenschaften: L-733,060 ist es aufgrund seiner Struktur möglich, leicht die Blut-Hirn-Schranke zu passieren, während SR140333 dagegen nur periphere Wirksamkeit erreicht. Beide Substanzen zeichnen sich durch ihre gute Wasserlöslichkeit aus. Die Aufbereitung und Lagerung als ge-

brauchsfertige Lösung sind relativ einfach und prädestinierten diese Substanzen somit für die von uns durchgeführten Experimente.

1.6 Fragestellung

Da die Blockade mit anti-Chemokinsen nur zu einer partiellen Reduzierung der Einwanderung von opioidhaltigen Leukozyten führt, müssen auch noch andere Mediatoren die Einwanderung von opioidhaltigen Leukozyten steuern.

Substanz P erfüllt zwei wesentliche Voraussetzungen, die ein potentieller Mediator für die Leukozytenmigration braucht:

1. Der von Substanz P präferierte NK1-R wird auf PMN, Monozyten und Makrophagen (wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung) exprimiert.^{36,37}
2. Substanz P hat *in vitro* einen chemotaktischen Effekt auf diese Zellen.⁵²

Aus diesen Erkenntnissen leitet sich die Hypothese dieser Dissertation ab:

Substanz P spielt eine Rolle in der Rekrutierung opioidhaltiger Immunzellen in das entzündete Gewebe.

Um diese Hypothese zu verifizieren, sollen folgende Fragen untersucht werden:

- Wie verändert sich der Gehalt an Substanz P in der entzündeten Rattenpfote im Verlauf der FCA-Entzündung?
- In welchem Umfang wird der NK1-R auf den Immunzellen im entzündeten Pfortengewebe exprimiert?
- Welchen Effekt hat die systemische Applikation eines NK1-R-Antagonisten auf die Zahl der in das entzündete Gewebe ausgewanderten Leukozyten?
- Hat die systemische Applikation eines NK1-R-Antagonisten einen Einfluss auf die periphere, opioidvermittelte Antinozizeption?
- Welchen Effekt hat die zentrale Applikation eines NK1-R-Antagonisten auf die Zahl der in das entzündete Gewebe ausgewanderten Leukozyten und auf die periphere, opioidvermittelte Antinozizeption?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die tierexperimentellen Versuche wurden männliche Ratten vom Stamm Wistar-Hannover mit einem Gewicht von 180-250 g verwendet. Die Tiere stammten aus der Zucht des Institutes für Mikrobiologie und Hygiene, Campus Benjamin Franklin, des CharitéCentrums 5 für diagnostische und präventive Labormedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin.

Die Ratten wurden in einem 12 h-Tag und 12 h-Nacht Rhythmus gehalten. Zu Wasser und standardisiertem Trockenfutter hatten die Ratten freien Zugang. Die Genehmigung für alle Versuche wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und Technische Sicherheit Berlin (LAGetSi Berlin) erteilt (Aktenzeichen: G 0290/04, 15.03.2005). Die Versuchsprotokolle stimmten mit den Leitlinien der International Association for the Study of Pain überein. Sämtliche Eingriffe an den Tieren wurden in einer Inhalationsnarkose mit Isofluran an einem Narkosegerät der Firma Dräger (Modell „Tiberius“) durchgeführt. Dabei wurde den Ratten über eine Maske ein Atemgasgemisch aus Sauerstoff und Inhalationsnarkotikum zugeführt.

2.2 Versuchsmodell

Für alle Versuche wurde das Modell der „FCA-induzierten Entzündung“ angewandt. Dafür wurden den Ratten 150 µl der FCA-Lösung intraplantar in die rechte Hinterpfote injiziert.⁹

2.2.1 Systemische Applikation

Für die systemische Applikation wurden die Ratten wie oben beschrieben in Narkose versetzt. Dann erfolgte eine Punktion des linken Unterbauches, bei der jeweils 500 bzw. 600 µl der Lösungen intraperitoneal (i.p.) gespritzt wurden.

2.2.2 Zentrale Applikation

Für die zentrale Applikation war die Anlage eines Spinalkatheters notwendig.⁵³ Auch hierfür wurden die Ratten in einer Isoflurannarkose gehalten. Der Rücken wurde komplett rasiert. Mit einem Skalpell wurde in der dorsalen Mittellinie ein ca. 2 cm langer Schnitt vom Os sacrum nach kranial durchgeführt. Mit einer Kanüle (18G) wurde in Höhe L4/L5 der Spinalraum punktiert und der Katheter (PE 10; Portex, UK) in kranialer Richtung vorgeschoben. Nach dem Entfernen der Kanüle wurde der Katheter an der Einstichstelle mit einem Tropfen Sekundenkleber fixiert und anschließend unter der Haut bis zum Nacken getunnelt. Dort wurde der Katheter durch einen

kleinen Einschnitt wieder hervorgeholt und wiederum mit einem Tropfen Sekundenkleber fixiert. Die Katheterspitze wurde dann durch Druck mit einer Klemme versiegelt, sodass keine Liquor austreten konnte. Abschließend wurde die dorsale Inzision vernäht.

Die korrekte intrathekale Lage wurde mittels einer Injektion von 10 µl Lidocain 2% (B. Braun, Deutschland) überprüft. Nur wenn sich eine kurzfristige und vollständig reversible Lähmung beider Hinterpfoten zeigte und es auch nach einer Erholungsphase von 2 Tagen keine neurologischen Ausfälle gab, wurden die Tiere in die Studie eingeschlossen. Sämtliche Injektionen wurden mit einer 25 µl-Spritze (Microliter Syringe; Hamilton, Schweiz) durchgeführt.

2.3 ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

Der ELISA ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Mit seiner Hilfe können Peptide aus einer unbekannt Probe quantifiziert werden. Bei diesem kompetitiven Immunoassay konkurriert das Peptid der unbekannt Probe mit einem biotinylierten Peptid um die Bindungsstellen eines spezifischen Peptid-Antikörpers. Die hinzugegebene Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase bindet an den Komplex aus Peptid-Antikörper und biotinyliertem Peptid. Die 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid-Lösung reagiert nun mit der gebundenen Meerrettichperoxidase und löst dadurch eine Farbreaktion aus. Die Farbintensität ist also proportional zur Menge des biotinylierten Peptids. Daraus folgt, dass die Farbintensität bei steigender Peptidmenge in der unbekannt Probe abnimmt. Um diese Peptidmenge quantifizieren zu können, wird mit einer Standardpeptid-Lösung verglichen.

2.3.1 Gewebeaufbereitung

Zu festgelegten Zeitpunkten der FCA-induzierten Entzündung (0, 12, 24 oder 48 h) wurde das plantare Pfortengewebe entnommen. Dafür wurden die Tiere durch eine hochdosierte Inhalationsnarkose mit Isofluran getötet. Anschließend wurde das Gewebe durch einen queren Schnitt in Höhe des Calcaneus und zwei Längsschnitten entlang der lateralen Fellgrenzen vorsichtig abpräpariert. Die tiefe Beugersehne wurde als sichtbare Abgrenzung an der Pfote belassen. Direkt nach der Entnahme wurde das Gewebe bis zur weiteren Aufbereitung in einer phosphatgepufferten Salzlösung (phosphate buffered saline/PBS) auf Eis gelagert. Anschließend wurde das subkutane Gewebe von der Cutis abpräpariert und mit einer Schere in ca. 1-2 mm große Stücke geschnitten.

2.3.2 Protokoll

Um die Anreicherung von Substanz P im entzündeten Pfortengewebe quantitativ zu bestimmen, wurden zu den Zeitpunkten 0, 12, 24 und 48 h der FCA-Entzündung das Gewebe mittels eines ELISA untersucht.

Dafür wurde das Pfortengewebe wie in 2.2.1 beschrieben entnommen, anschließend in 1 ml des ELISA Lyse-Puffers überführt und dann bei -80°C für 3 h tiefgefroren, um dann über Nacht bei 4°C wieder aufzutauen. Am nächsten Tag wurde dann der Überstand abgenommen und bei -20°C bis zur Analyse wieder eingefroren.¹⁸ Für die Analyse benutzten wir ein kommerziell erhältliches ELISA-Kit (siehe 2.10). Das folgende Protokoll orientiert sich an den Angaben des Herstellers.

1. Zugabe von 25 μl /Loch des primären Antikörpers und Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h
2. Zugabe von 50 μl /Loch Standard Peptid oder Probe und Inkubation bei Raumtemperatur für 2 h
3. Zugabe von 25 μl /Loch biotinyliertem Peptid und Inkubation über Nacht bei $2^{\circ}\text{--}8^{\circ}\text{C}$
4. Waschen der Platte 5-mal mit 300 μl Assay-Puffer/Loch
5. Zugabe von 100 μl /Loch Streptavidin-HRP und Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h
6. Waschen der Platte 5-mal mit 300 μl Assay-Puffer/Loch
7. Zugabe von 100 μl /Loch 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin Dihydrochlorid-Lösung und Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h
8. Beenden der Reaktion mit 100 μl /Loch 2N Wasserstoffchlorid
9. Messung der Absorption bei 450 nm innerhalb von 10 min und Berechnung der Daten (SpectraMax 340 PC und SoftMax)

2.4 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence Activated Cell Sorting/FACS) eignet sich zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von Zellen und anderen Partikeln. Mittels eines Laserstrahls können Aussagen zur Größe und Granularität der zu untersuchenden Partikel getroffen werden. Dabei spielt die Veränderung des Streulichtes (Light Scatter) eine entscheidende Rolle. Die Streuung des Vorwärtsstreulichtes (Forward Light Scatter) ist proportional zur Zellgröße. Die Streuung des Seitwärtsstreulichtes (Sideward Light Scatter) im 90° -Winkel ist proportional zur

Granularität des Partikels.

Werden die Zellen nun mit einem Fluoreszenz-Antikörper gefärbt, kann dieser durch die Laserbestrahlung angeregt werden und ein Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren, das wiederum von Photosensoren im Durchflusszytometrie-Gerät gemessen wird. Die Fluoreszenzintensität gibt dabei die Anzahl der Antikörper-Bindungsstellen wieder.⁵⁴

2.4.1 Gewebeaufbereitung

Zu festgelegten Zeitpunkten der FCA-induzierten Entzündung (12, 24 oder 48 h) wurde das plantare Pfortengewebe wie in 2.2.1 beschrieben entnommen, zerkleinert und dann zum enzymatischen Abbau von Bindegewebe für 60 min bei 37 °C in 3 ml Verdauungslösung inkubiert. Diese Lösung enthält Kollagenase und Hyaluronidase, um die extrazellulären Strukturen im Pfortengewebe anzudauen.

Danach wurde das Gewebe durch ein Zellsieb gedrückt und in 10 ml komplettem Medium resuspendiert. Diese Einzelzellsuspension wurde bei 115 g über 10 min zentrifugiert, anschließend dekantiert und wieder in 3,5 ml PBS resuspendiert. Für jede einzelne Antikörperfärbung wurden 1000 µl der Suspension bei 115 g über 5 min zentrifugiert und anschließend wieder dekantiert.

2.4.2 Antikörper

Sämtliche Antikörperfärbungen wurden bei Raumtemperatur und unter Ausschluss von Tageslicht durchgeführt, um eine lichtbedingte Veränderung der Farbstoffe zu verhindern.

Folgende Antikörper wurden eingesetzt (Tab. 1):

Bezeichnung	Fluorochrome	Bindungsstelle	Hersteller	Konzentration [µg/ml]
Kaninchen Immunglobu- lin G (IgG)	unkonjugiert	keine	Santa Cruz, USA	4
Anti-NK1-R Serum	unkonjugiert	Extrazellulär	Chemicon, UK	1:100
Ziege anti- Kaninchen IgG	Fluorescein Isothiocyanat (FITC)	Extrazellulär	Vector, USA	15
Maus anti- Ratte CD45	Phycoerythrin (PE)-Cy5	Extrazellulär	BD Biosciences, Deutschland	4
Maus anti- Ratte CD3	PE	Extrazellulär	BD Biosciences	4
Maus anti- Ratte RP-1	PE	Intrazellulär	BD Biosciences	12
Maus anti- Ratte ED1 (CD68)	FITC	Intrazellulär	Serotec, UK	2
Maus anti- pan-Opioid 3E7 (IgG _{2a})	unkonjugiert	Intrazellulär	Gramsch Labora- tories, Deutsch- land	20
Maus IgG _{2a}	PE	keine	BD Biosciences	20
Ratte anti- Maus IgG _{2a+b}	PE	Intra- und Ext- razellulär	BD Biosciences	20

Tab. 1: *Verwendete Durchflusszytometrie-Antikörper*

2.4.3 Protokolle der Antikörperfärbungen

Protokoll NK1-R Färbung

1. Zugabe von 50 µl Färbepuffer und 1 µl des 1. Antikörpers (Kaninchen IgG oder Anti-NK1-R-Serum) zur Zellsuspension und Inkubation für 30 min bei 4 °C
2. Waschen mit 1,5 ml Färbepuffer
3. Zugabe von 50 µl Färbepuffer + 5 µl Ziegen Serum (10%) + 0,5 bzw. 1 µl des 2. Antikörpers (Ziege anti-Kaninchen IgG) + 1 µl des CD45-Antikörpers und Inkubation für 30 min bei 4 °C
4. Waschen mit 1,5 ml Färbepuffer, anschließend Fixierung in 250 µl 1% Paraformaldehyd (PFA)

Protokoll der Antikörperfärbung der Leukozytensubpopulationen

Extrazelluläre Antikörperfärbung

1. Zugabe der beiden extrazellulären Antikörper (Maus anti-Ratte CD3-Antikörper und Maus anti-Ratte CD45-Antikörper) zur Zellsuspension
2. Inkubation für 15 min
3. Waschen in 2 ml PBS, zentrifugieren bei 115 g über 5 min, dekantieren
4. Resuspendieren in 250 µl PBS

Intrazelluläre Antikörperfärbung

1. Fixierung in 500 µl 1% PFA für 30 min
2. Waschen in 2 ml PBS, zentrifugieren bei 115 g über 5 min, dekantieren
3. Permeabilisierung mit 2 ml Saponinpuffer, zentrifugieren bei 115 g über 5 min, dekantieren
4. Zugabe der intrazellulären Antikörper (Maus anti-Ratte RP-1-Antikörper, Maus anti-Ratte ED1-Antikörper, Maus anti-pan-Opioid 3E7-Antikörper oder Isotypenkontrolle IgG_{2a})
5. Inkubation für 15 bzw. 30 min
6. Erneutes Waschen mit 2 ml Saponinpuffer, zentrifugieren bei 115 g über 5 min, dekantieren
7. Zugabe des sekundären, intrazellulären Antikörpers für 3E7 (Ratte anti-Maus IgG_{2a+b}) und des extrazellulären Antikörpers (Maus anti-Ratte CD45-Antikörper)
8. Inkubation für 15 min
9. Waschen mit 2 ml Saponinpuffer, zentrifugieren bei 115 g über 5 min, dekantieren

10. Waschen mit 2 ml PBS, zentrifugieren bei 115 g über 5 min, dekantieren

11. Resuspendieren in 250 µl PBS

2.5 Verhaltensexperimente

Um die funktionelle Bedeutung der gewonnenen Ergebnisse zu verdeutlichen, wurden Experimente zum Schmerzverhalten durchgeführt.

Diese Verhaltensexperimente wurden freundlicherweise von Frau Dr. Dominika Labuz, Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin, Campus Benjamin Franklin, der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Es handelte sich hierbei um die Messung der Pfortendruckschwelle (Paw pressure threshold) mittels des modifizierten Randall Selitto Tests. Bei diesem Test werden die Hyperalgesie und die Antinozizeption mit Hilfe eines Pfortendruck-Algesiometers (Ugo Basile, Italien) gemessen. Mit dieser Apparatur wird über einen Stempel ein stetig steigender Druck auf die Hinterpfote ausgeübt, bis das Tier die Pfote schmerzbedingt wegzieht. Der zum Zeitpunkt des Wegziehens ausgeübte Druck entspricht der Pfortendruckschwelle in g. Die maximale Druckbelastung wurde auf 250 g festgelegt, um mögliche Gewebsschädigungen zu vermeiden.

Als externer Stimulus für die Freisetzung der Opioidpeptide wurde CWS benutzt. Hierfür wurden die Versuchstiere in ein Becken mit 4 °C kaltem Wasser gesetzt und mussten darin eine Minute schwimmen. Anschließend wurden sie abgetrocknet, bevor nach 5 min die Pfortendruckschwellenmessung durchgeführt wurde.

Es wurden jeweils beide Hinterpfoten (behandelt und unbehandelt) gemessen:

1. Basalwert
2. Wert nach CWS

Es wurden je 3 Messungen im Abstand von 10 s durchgeführt und aus diesen Ergebnissen der Mittelwert berechnet. Der Untersucher war im Bezug auf die Applikation der Wirkstoffe bzw. der Kontrolle verblindet.

2.6 Versuchsprotokolle

2.6.1 Substanz P-Messung in der entzündeten Pfote

Die Ratten (n = 6/Gruppe) wurden in 4 Gruppen aufgeteilt. Zu den Zeitpunkten 0 (native Kontrolle), 12, 24 und 48 h nach der FCA-Injektion wurde das Pfortengewebe entnommen und wie in 2.3.1. und 2.3.2. beschrieben aufgearbeitet.

2.6.2 Färbung des NK1-R auf den Leukozyten

Den Ratten (n = 2) wurde zum Zeitpunkt 0 h wie oben beschrieben FCA-Lösung injiziert. Zum Zeitpunkt 24 h erfolgte dann die Entnahme, Aufbereitung und Färbung des Gewebes (siehe 2.3.1. und 2.3.2.).

2.6.3 Die *systemische* Applikation des NK1-R-Antagonisten L-733,060

Den Ratten (n = 8/Gruppe) wurden 20 mg/kg Körpergewicht (KG) des NK1-R-Antagonisten L-733,060 gelöst in Aqua dest. (10 mg/ml) und verdünnt mit NaCl 0,9% in einem Volumen von 500 µl oder nur das Lösungsmittel verdünnt mit NaCl 0,9% als Kontrolle im gleichen Volumen i.p. injiziert. Die Dosierungen des Wirkstoffes orientierten sich an Arbeiten anderer Forschungsgruppen⁵⁵ und eigenen Pilotversuchen. Die Injektionen wurden im Abstand von 12 h durchgeführt (0 h bzw. 0 und 12 h bzw. 0, 12, 24, 36 h). Zum Zeitpunkt 0 h erhielt jedes Tier die FCA-Injektion.

Die Entnahme des entzündeten Pfortengewebes erfolgte bei diesen Experimenten zu den Zeitpunkten 12, 24 oder 48 h. Das entnommene Gewebe wurde wie in 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben aufbereitet und auf die Leukozytensubpopulationen untersucht.

Zusätzlich wurden eine behandelte und eine Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 24 h für das Verhaltensexperiment eingesetzt.

2.6.4 Die *zentrale* Applikation des NK1-R-Antagonisten L-733,060

Den Ratten (n = 8/Gruppe) wurden 0,5 mg/kg KG des NK1-R-Antagonisten L-733,060 gelöst in Aqua dest. (10 mg/ml) und weiter verdünnt mit NaCl 0,9% in einem Volumen von 20 µl oder nur das Lösungsmittel verdünnt mit NaCl 0,9% als Kontrolle im gleichen Volumen über den Spinalkatheter i.th. injiziert. Der Injektion folgte eine Spülung des Katheters mit 10 µl NaCl 0,9%, damit keine Reste des Wirkstoffes im Katheter verbleiben. Die zentrale Applikationsdosis orientierte sich an Studienergebnissen anderer Arbeitsgruppen⁵⁶ und eigenen Vorversuchen. Die Injektionen wurden im Abstand von 12 h durchgeführt (0 und 12 h). Zum Zeitpunkt 0 h erhielt

jedes Tier die FCA-Injektion.

Die Entnahme des entzündeten Pfortengewebes erfolgte bei diesem Experiment zum Zeitpunkt 24 h. Das entnommene Gewebe wurde wie in 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben aufbereitet und auf die Leukozytensubpopulationen untersucht.

Separate Gruppen wurden für das Verhaltensexperiment zur Pfortendruckschwellenmessung benutzt.

2.6.5 Die *systemische* Applikation des NK1-R-Antagonisten SR140333

Den Ratten (n = 9/Gruppe) wurden 10 mg/kg KG des NK1-R-Antagonisten SR140333 gelöst in Dimethylsulfoxid (40 mg/ml) und verdünnt mit NaCl 0,9% in einem Volumen von 600 µl oder nur das Lösungsmittel verdünnt mit NaCl 0,9% als Kontrolle im gleichen Volumen i.p. injiziert. Die Dimethylsulfoxid-Konzentration der injizierten Lösungen lag bei 8,33 Vol.-%. Das Lösungsverhältnis und die Dosierung entnahmen wir anderen Veröffentlichungen⁵⁷⁻⁵⁹ und eigenen Vorexperimenten. Die Injektionen wurden im Abstand von 12 h durchgeführt (0 und 12 h). Zum Zeitpunkt 0 h erhielt jedes Tier die FCA-Injektion.

Die Entnahme des entzündeten Pfortengewebes erfolgte bei diesem Experiment zum Zeitpunkt 24 h. Das entnommene Gewebe wurde wie in 2.3.1 und 2.3.2 beschrieben aufbereitet und auf die Leukozytensubpopulationen untersucht.

Ebenfalls zum Zeitpunkt 24 h nach FCA-Injektion wurden behandelte und nicht-behandelte Tiere im Verhaltensexperiment untersucht.

2.6.6 Die *zentrale* Applikation des NK1-R-Antagonisten SR140333

Die Ratten (n = 8/Gruppe) erhielten 3, 6, 12,5 bzw. 50 µg/kg KG von SR140333 gelöst in Dimethylsulfoxid (10 mg/ml) und verdünnt mit NaCl 0,9% in einem Volumen von 20 µl oder nur das Lösungsmittel verdünnt mit NaCl 0,9% im gleichen Volumen i.th. appliziert. Die Dimethylsulfoxid-Konzentrationen der injizierten Lösungen lagen bei 0,3, 0,6, 1,25 bzw. 5 Vol.-%. Auch hier folgte eine Spülung mit 10 µl NaCl 0,9%. Die Injektionen erfolgten zu den Zeitpunkten 0, 8 und 16 h nach FCA-Entzündung. Nach 24 h wurde das entzündete Gewebe entnommen. Für die in den Versuchen eingesetzten Mengen des Wirkstoffes haben wir uns an den Arbeiten von Kamp et al. und Luccarini et al. orientiert.^{58,60}

2.7 Statistische Auswertung

Bei allen Experimenten wurden die mit den NK1-R-Antagonisten behandelten Gruppen mit den unbehandelten Kontrollgruppen verglichen. Von den gewonnenen Rohwerten wurden die Mittelwerte errechnet und auf Normalverteilung und Varianz geprüft. Da alle Werte diese beiden Voraussetzungen erfüllten, wurde der t-Test zur Analyse eingesetzt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Fehlende Werte resultieren aus Ratten mit Hämatombildung bei der i.pl. Injektion von FCA oder durch akzidentellen Tod des Versuchstieres durch Überdosierung von Isofluran während der Narkose. Für mehrfache Messungen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (analysis of variance) für normalverteilte Werte benutzt. Für Post-hoc-Analysen wurde der Student-Newman-Keuls Test eingesetzt. Bei einer Wahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde das Ergebnis als signifikant gewertet.

2.8 Lösungen

- PBS

PBS 7.4 10x (Invitrogen, GIBCO, UK) 1:10 verdünnt in Aqua-Spüllösung

- ELISA Lyse-Puffer¹⁸

20 mM Imidazol-Wasserstoffchlorid pH 6,8, 100 mM Kaliumchlorid, 1mM Magnesiumchlorid, 10 mM Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-tetraessigsäure, 1,0% Triton X-100, 10 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriummolybdat, 1 mM Ethylendiamintetraessigsäure (alle Sigma, Deutschland), 1 mg/ml Leupeptin (Roche, Deutschland), 1 mg/ml Aprotinin (Boehringer Ingelheim, Deutschland), 1mg/ml Pefabloc (Roche)

- Komplettes Medium

500 ml Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (Invitrogen, GIBCO), 100 U/ml Penicillin, 10 mg/dl Streptomycin, 10% fetales Kälberserum (alle Invitrogen, Niederlande)
Die Antibiotika sollten eine bakterielle Besiedlung im Medium verhindern.

- Verdaulösung

30 mg Kollagenase, 10 mg Hyaluronidase (alle Sigma) und 0,5 ml 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (Invitrogen, GIBCO) in 10 ml komplettem Medium

- NK1-R Färbepuffer

PBS (Invitrogen, GIBCO), 1% bovines Serumalbumin, 0,02% Ethylendiamintetraessigsäure, 0,02% Natriumazid (alle Sigma)

- PFA 1%

1 ml Natriumhydroxid/Natronlauge 10 M (Fluka, Deutschland) auf 90 ml PBS, Zugabe von 1 g PFA (Fluka), unter pH-Kontrolle mit Wasserstoffchlorid/Salzsäure 11,7 N (Sigma) auf pH 7,45 titriert.

Die PFA-Lösung wurde bei 4 °C für maximal eine Woche gelagert.

- Saponin-Puffer

2,5 g (0,5%) Saponin, 2,5 g (0,5%) bovines Serumalbumin und 0,25 g (0,05%) Natriumazid (alle Sigma) auf 500 ml PBS

Saponin ist ein Detergenz und permeabilisiert die Zellmembran, um das Zytosol für intrazelluläre Antikörper zugänglich zu machen. Bovines Serumalbumin wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungen hinzugegeben, Natriumazid hemmte als Zellgift den Stoffwechsel der Zellen.

2.9 Substanzen

- | | |
|-------------|----------------------------|
| • Isofluran | Abbott, Deutschland |
| • FCA | Calbiochem, UK |
| • L-733,060 | Tocris Biosciences, UK |
| • SR140333 | Sanofi Aventis, Frankreich |

2.10 Geräte

- | | |
|---------------------------------|-----------------------------|
| • Nakosegerät Modell „Tiberius“ | Dräger, Deutschland |
| • EIA for Substance P | Peninsula Laboratories, USA |
| • SpectraMax 340 PC | Molecular Devices, USA |
| • 70 µm Nylon-Zellsieb Falcon | BD Biosciences |
| • Inkubator Function line B 12 | Heraeus, Deutschland |
| • Zentrifuge Megafuge 2.0 R | Heraeus |

- Durchflusszytometer FACS Calibur BD Biosciences
- Pfortendruck-Algesiometer Ugo Basile, Italien

2.11 Software

- ELISA SoftMax Molecular Devices
- FACS-Analyse CellQuest Pro BD Biosciences
- Statistik Microsoft Excel 2000 Microsoft, USA
- Sigmastat Ver. 2.03 SPSS, USA
- Grafik Sigmaplot Ver. 8.0 SPSS
- Literaturverzeichnis EndNote Ver. 9.0 Thomson Reuters, USA
- Textverarbeitung Microsoft Word 2000 Microsoft

3 Ergebnisse

3.1 Substanz P-Messung in der entzündeten Pfote

In diesem Versuch wurde der Gehalt an Substanz P im entzündeten Pfortengewebe im Zeitraum bis 48 h nach FCA-Injektion gemessen. In unserer Arbeitsgruppe ist dieses Intervall genau charakterisiert worden.⁶¹ In der nicht-entzündeten Pfote ist der Gehalt an Substanz P niedrig. Bereits nach 12 h der FCA-Entzündung steigt der Gehalt an Substanz P in der entzündeten Pfote auf mehr als das 10fache verglichen mit der nicht-entzündeten Pfote. Im Verlauf der Entzündung nimmt die an Substanz P gemessene Menge noch weiter aber nicht signifikant verglichen mit 12 h zu (Abb. 1 A).

3.2 NK1-R-Expression auf Leukozyten

Entscheidend für die Verifizierung unserer These ist das Ausmaß der NK1-R-Expression auf den Leukozyten. Sie kann u.a. vom Reife- und Differenzierungsgrad der Immunzellen abhängen oder sich nur auf eine bestimmte Subpopulation beschränken.

Abb. 1 B zeigt die Population der CD45⁺-Zellen (Leukozyten) innerhalb aller in der Pfote gemessenen Zellen bzw. Zellbestandteilen. Sie ist entsprechend ihrer Zellgröße (x-Achse, Forward Light Scatter(FSC)-Height) und ihrer Antikörperfärbung (y-Achse, CD45 CyC) zu erkennen. Um diese Gruppe ist ein Fenster gelegt, das die für die weitere Untersuchung gewünschte Zellgruppe auswählt. Abb. 1 C zeigt die Gruppe der CD45⁺-Zellen mit 3 unterschiedlichen zusätzlichen Färbungen (ungefärbte Kontrolle, Antikörper-Isotypen-Kontrolle, Anti-NK1-R-Antikörper. Sie sind aufgetragen gegen Fluoreszenzintensität (x-Achse) und Zellzahl („Counts“, y-Achse). Man erkennt eine Rechtsverschiebung der Population, was bedeutet, dass beinahe alle CD45⁺-Zellen den NK1-R exprimieren.

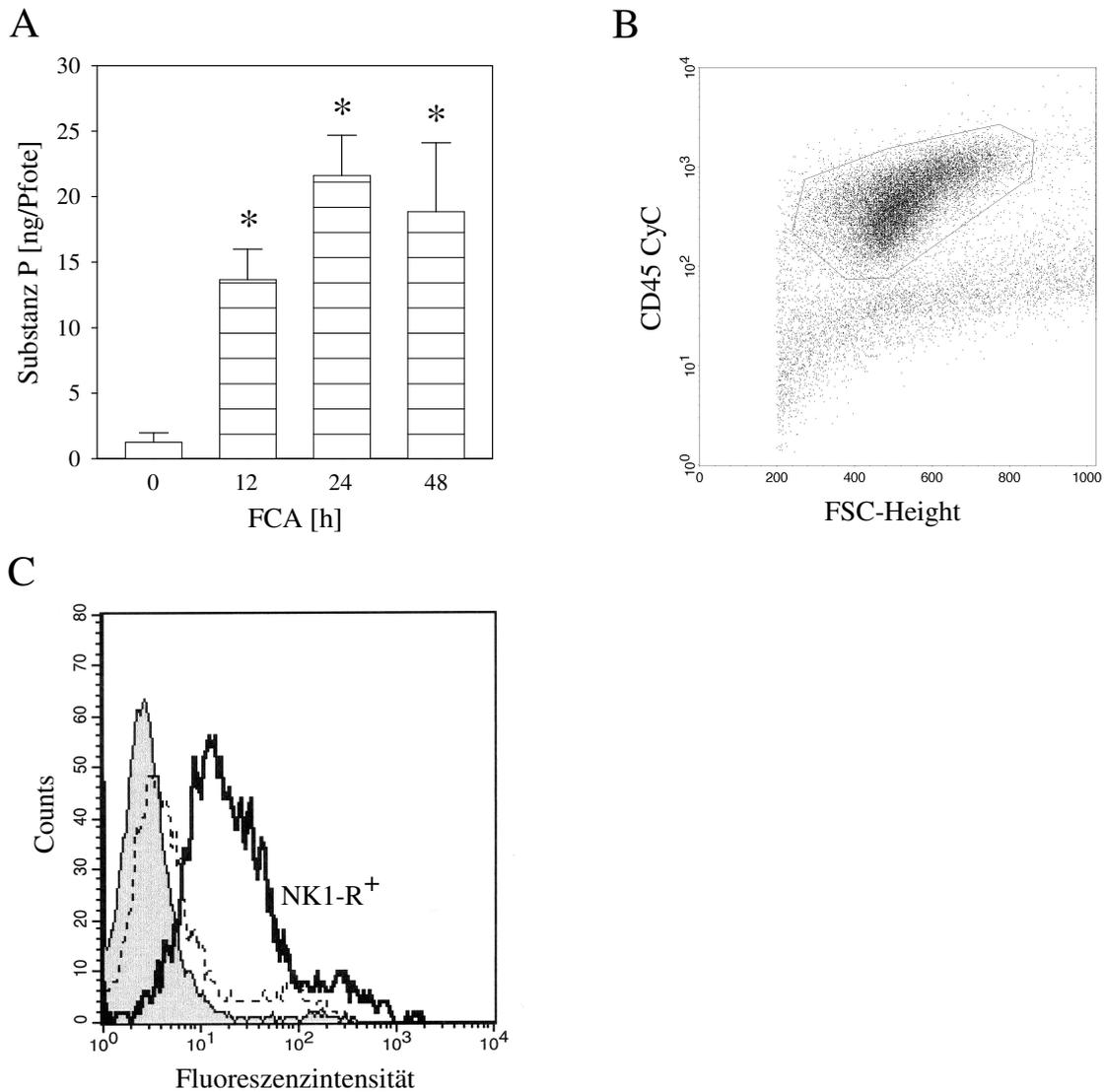


Abb. 1: (A) *Der Substanz P-Gehalt in der entzündeten Pfote steigt mit der Entzündungsdauer.* Substanz P-Gehalt im subkutanen Gewebe 0-48 h nach FCA-Entzündung, (n = 6/Gruppe, * = p < 0,05, analysis of variance, Student-Newman-Keuls Test); (B) *Population der CD45⁺-Zellen (Leukozyten)* im entzündeten Pfortengewebe (umrandeter Bereich); (C) *NK1-R-Expression auf CD45⁺-Zellen* im entzündeten Pfortengewebe nach 24 h, (*graues Histogramm* = ungefärbte Kontrolle, *unterbrochene Linie* = Antikörper-Isotypen-Kontrolle, *durchgezogene Linie* = Anti-NK1-R-Antikörper).

3.3 Die systemische Gabe von L-733,060

3.3.1 Blockade der Einwanderung von Immunzellen in die entzündete Pfote

L-733,060 ist ein NK1-R-Antagonist mit guter ZNS-Gängigkeit. Bei einer systemischen Anwendung in ausreichender Dosierung kommt es zu einer Blockade sowohl peripherer als auch zentraler NK1-R. In unserem Modell konnten wir zeigen, dass sich nach 12 h FCA-Entzündung noch keine Veränderung der Leukozytensubpopulationen nach Behandlung mit diesem NK1-R-Antagonisten zeigt (Tab. 2). Nach 24 h jedoch ist ein signifikanter Abfall sowohl der Monozyten/Makrophagen (ED1⁺) als auch der opioidhaltigen Leukozyten (3E7⁺) in der behandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar. Bei den PMN und den T-Zellen ist ein deutlicher Trend zur Abnahme festzustellen, der aber nicht signifikant ist (Abb. 2). 48 h nach Beginn der Entzündung ist eine statistisch signifikante Erniedrigung aller Subpopulationen zu erkennen (Tab. 2).

12 h FCA	Kontrolle	L-733,060
Leukozyten	Zellen [x 10 ³ /Pfote]	
RP-1 ⁺ CD45 ⁺ PMN	177 ± 35	217 ± 29
ED1 ⁺ CD45 ⁺ Makrophagen	65 ± 7	50 ± 7
CD3 ⁺ CD45 ⁺ T-Zellen	22 ± 4	20 ± 3
3E7 ⁺ CD45 ⁺ opioidhaltige Zellen	64 ± 7	66 ± 6
48 h FCA	Kontrolle	L-733,060
Leukozyten	Zellen [x 10 ³ /Pfote]	
RP-1 ⁺ CD45 ⁺ PMN	142 ± 19	88 ± 12*
ED1 ⁺ CD45 ⁺ Makrophagen	285 ± 20	100 ± 18*
CD3 ⁺ CD45 ⁺ T-Zellen	8 ± 1	4 ± 1*
3E7 ⁺ CD45 ⁺ opioidhaltige Zellen	233 ± 17	117 ± 15*

Tab. 2: *Die systemische Gabe von L-733,060 senkt signifikant die Zahl der Immunzellen im entzündeten Gewebe nach 48 h FCA-Entzündung.* L-733,060 (20 mg/kg KG i.p.) zu den Zeitpunkten 12 und 48 h nach FCA-Entzündung. Sämtliche Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben, (n = 8/Gruppe, * = p < 0,05, t-Test).

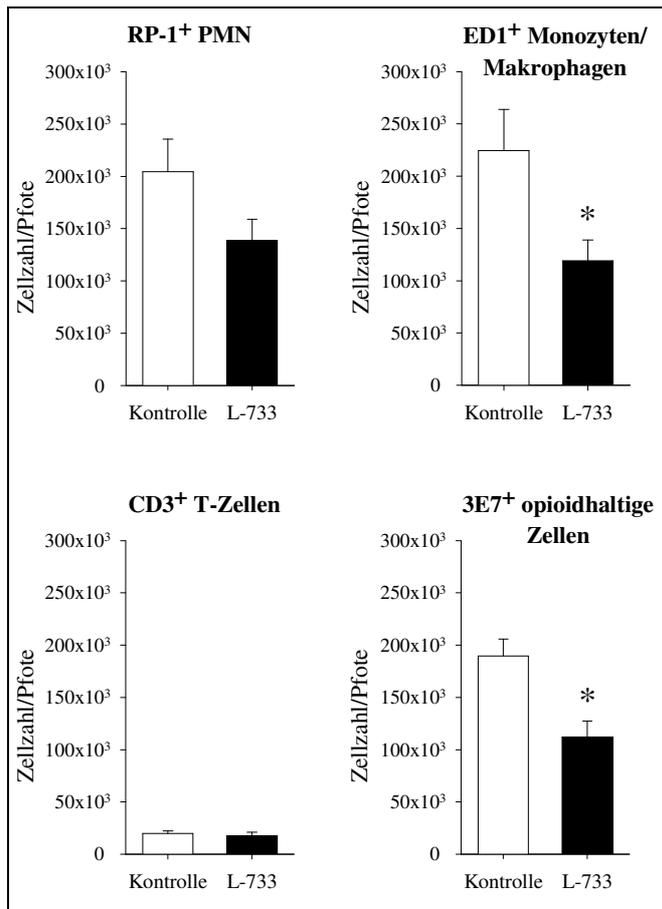


Abb. 2: *Die systemische Anwendung von L-733,060 reduziert die Zahl der eingewanderten Leukozytensubpopulationen teilweise signifikant nach 24 h FCA-Entzündung.* L-733,060 (20 mg/kg KG i.p.) zum Zeitpunkt 24 h nach FCA-Entzündung. Alle Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben (n = 8/Kontrollgruppe, n = 7/behandelte Gruppe, * = p < 0,05, t-Test).

3.3.2 Hemmender Einfluss auf die endogene, opioidvermittelte Antinozizeption nach systemischer Anwendung

Um zu überprüfen, ob die Reduktion der opioidhaltigen Zellen auch eine funktionelle Konsequenz für die periphere opioidvermittelte Antinozizeption hat, wurden Pfortendruckschwellenmessungen durchgeführt. Durch den einminütigen CWS konnte die Pfortendruckschwelle in der entzündeten Pfote der Kontrollgruppe bei Ratten mit 24 h FCA-Entzündung erhöht werden (Abb. 3). In der behandelten Gruppe war die Druckschwellenerhöhung signifikant kleiner. In der nicht-entzündeten Pfote änderte sich die Pfortendruckschwelle erwartungsgemäß nicht. Eine Veränderung in der basalen Pfortendruckschwelle wurde in keiner der beiden Pfoten bewirkt.

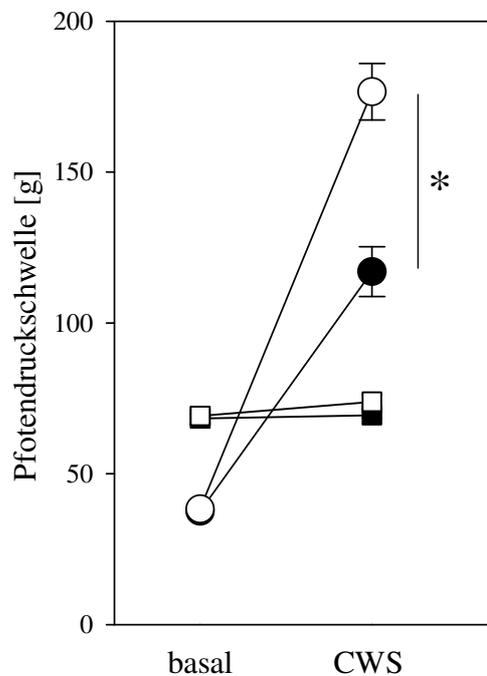


Abb. 3: *L-733,060* beeinträchtigt die endogene, opioidvermittelte Antinozizeption. *L-733,060* (20 mg/kg KG i.p.) zum Zeitpunkt 24 h nach FCA-Entzündung. Entzündete Pfote (○,●), nicht-entzündete, kontralaterale Pfote (□,■), Kontrollgruppe (○,□), behandelte Gruppe (●,■). Alle Daten wurden als Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwertes angegeben (n = 6/Gruppe, * = p < 0,05, t-Test).

3.4 Die zentrale Gabe von L-733,060

3.4.1 Unveränderte Einwanderung der Leukozyten nach zentraler Applikation

Da dieser Antagonist sowohl periphere als auch zentrale Wirkung besitzt, applizierten wir den Wirkstoff über einen Katheter i.th., um einen möglicherweise zentralen Effekt zu zeigen. Die zentrale Applikation von L-733,060 zeigte jedoch keine Veränderung der Leukozytensubpopulationen in der Pfote nach einer FCA-Entzündung über 24 h (Abb. 4).

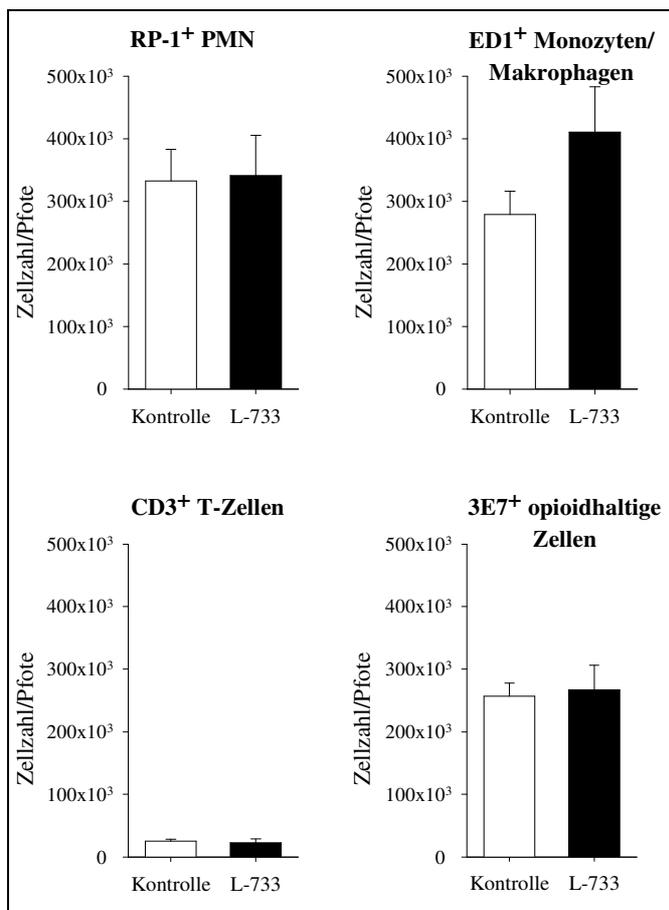


Abb. 4: Die zentrale Anwendung von L-733,060 zeigt keinen Effekt auf die Immunzellzahl nach 24 h FCA-Entzündung. L-733,060 (0,5 mg/kg KG i.th.) nach 24 h FCA-Entzündung. Sämtliche Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt (n = 8/Kontrollgruppe, n = 6/behandelte Gruppe, t-Test).

3.4.2 Unveränderte endogene, opioidvermittelte Antinozizeption nach zentraler Applikation

Den Ergebnissen aus 3.4.1 entsprechend zeigte sich auch im Randall Selitto Test kein Effekt der zentralen Applikation von L-733,060 auf das Schmerzverhalten (Abb. 5). Die CWS-induzierte Antinozizeption war in beiden Gruppen gleich. Es gab keine Veränderungen in den basalen Pfotendruckschwel­len beider Pfoten.

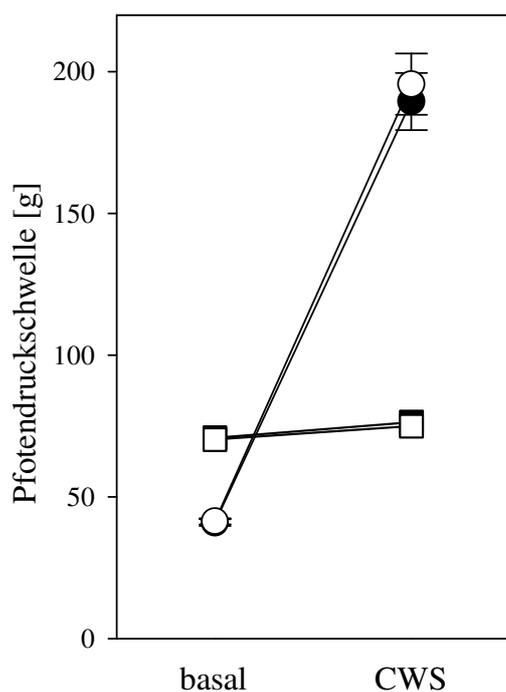


Abb. 5: *Kein Einfluss auf die endogene, opioidvermittelte Antinozizeption nach zentraler Gabe von L-733,060 zum Zeitpunkt 24 h nach FCA-Entzündung.* L-733,060 (0,5 mg/kg KG i.th.) zum Zeitpunkt 24 h nach FCA-Entzündung. Entzündete Pfote (○,●), nicht-entzündete, kontralaterale Pfote (□,■), Kontrollgruppe (○,□), behandelte Gruppe (●,■). Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes angegeben (n = 7/Kontrollgruppe, n = 6/behandelte Gruppe, t-Test).

3.5 Die systemische Gabe von SR140333

3.5.1 Selektiv peripher wirkende NK1-R-Antagonisten blockieren die Einwanderung von Leukozytensubpopulationen

Um die Rolle der peripheren NK1-R in der Immunzellrekrutierung weiter zu beleuchten, haben wir ergänzende Experimente mit einem selektiv peripher wirkenden NK1-R-Antagonisten (SR140333) durchgeführt. Die systemische Gabe von SR140333 führt nach 24 h FCA-Entzündung zu einem signifikanten Abfall der Monozyten/Makrophagen ($ED1^+$) und der opioidhaltigen Leukozyten ($3E7^+$) in der behandelten Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe (Abb. 6).

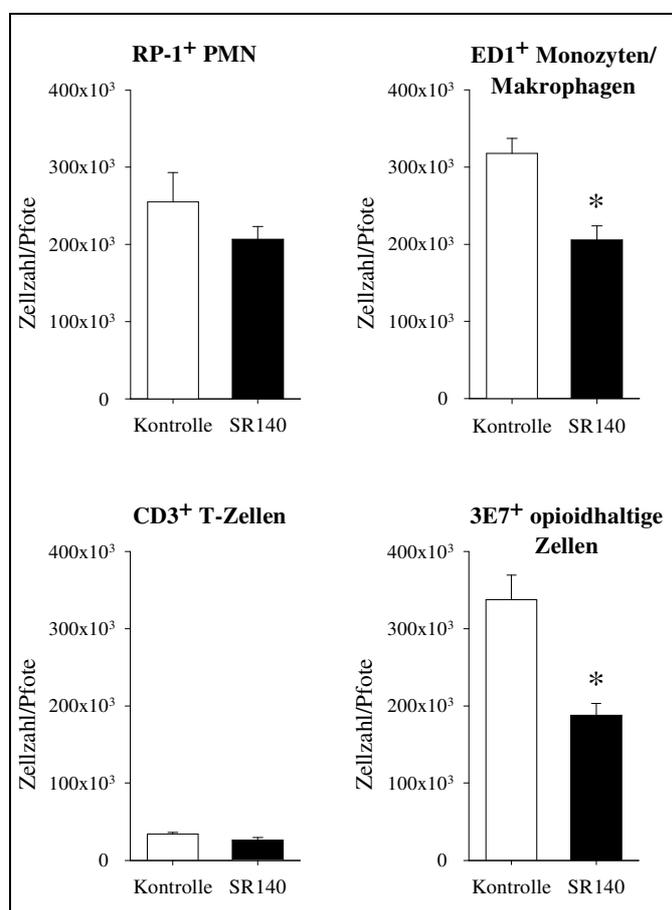


Abb. 6: Die systemische Gabe von SR140333 inhibiert die Einwanderung von Leukozytensubpopulationen nach 24 h FCA-Entzündung. SR140333 (10 mg/kg KG i.p.) nach 24 h FCA-Entzündung. Sämtliche Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes berechnet (n = 8/Gruppe, * = p < 0,05, t-Test).

3.5.2 Inhibition der endogenen, opioidvermittelten Antinozizeption

Dieser NK1-R-Antagonist konnte ebenfalls die durch CWS ausgelöste Antinozizeption blockieren (Abb. 7). Die basalen Pfortendruckschwellen in der entzündeten und in der nicht-entzündeten Pfote blieben unverändert.

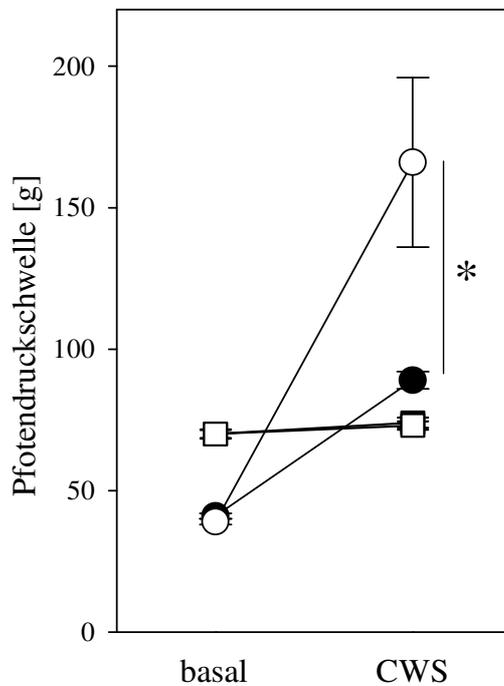


Abb. 7: **Signifikante Inhibition der endogenen, opioidvermittelten Antinozizeption nach systemischer Gabe von SR140333.** SR140333 (10 mg/kg KG i.p.) nach 24 h FCA-Entzündung. Entzündete Pfote (○,●), nicht-entzündete, kontralaterale Pfote (□,■), Kontrollgruppe (○,□), behandelte Gruppe (●,■). Alle Daten stellen den Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dar (n = 6/Gruppe, * = p < 0,05, t-Test).

3.6 Die zentrale Gabe von SR140333

Die zentrale Applikation von 50 µg/kg KG SR140333 führte bei einigen der Versuchstiere zu schwerwiegenden neurologischen Ausfällen oder sogar zum Tode. Auch mit 12,5 und 6 µg/kg KG waren noch neurologische Defizite wie Paralysen bei den Versuchstieren feststellbar. Erst bei der niedrigsten Dosis von 3 µg/kg KG i.th. waren keine derartigen Nebenwirkungen mehr erkennbar. Bei keinem dieser Versuche kam es zu einer Reduktion der Leukozytenzahlen im entzündeten Gewebe. Da sich die gewonnenen Daten aufgrund der erheblichen Nebenwirkungen nicht sicher objektivieren lassen, wurden diese nicht verwertet.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

In unseren Studien haben wir die Rolle von Substanz P in der peripheren Opioidanalgesie untersucht. Wir konnten zeigen, dass der Gehalt an Substanz P im peripheren Gewebe ansteigt, wenn eine lokale Entzündung vorliegt. Die in diesem Zusammenhang eingewanderten Leukozyten exprimieren in ihrer Mehrzahl den von Substanz P präferierten NK1-R. Blockiert man nun diesen Rezeptor systemisch mittels eines hochaffinen Antagonisten, so lässt sich die Migration der Immunzellen in das entzündete Gewebe reduzieren. Die durch CWS hervorgerufene und durch die Opioidpeptidfreisetzung aus den Leukozyten umgesetzte periphere Antinozizeption ist ebenfalls verringert. Dieser ganze Vorgang scheint über periphere NK1-R vermittelt zu sein, da auch die systemische Anwendung eines selektiv peripher wirkenden Antagonisten effektiv ist, während die zentrale Applikation von NK1-R-Antagonisten keinen Einfluss auf die Einwanderung von opioidhaltigen Leukozyten und die endogene, opioidvermittelte Antinozizeption hat.

4.2 Diskussion von Material und Methoden

4.2.1 Das FCA-Entzündungsmodell

Für unsere Experimente haben wir mit dem in 1.3 und 2.2 bereits erwähnten Modell der einseitigen Entzündung in der Hinterpfote der Ratte gearbeitet. Es wurde von Stein et al. entwickelt und ist seitdem in unserer Arbeitsgruppe etabliert.⁹ Es sind zahlreiche Studien mit diesem Modell durchgeführt worden, um die Abläufe der Entzündung, die Migration der Leukozyten und die periphere, opioidvermittelte Antinozizeption zu untersuchen.² Bereits wenige Stunden nach Injektion von FCA in die Rattenpfote sind deutliche Zeichen einer Entzündung wie Rötung, Schwellung und Überwärmung zu erkennen. Zudem kommt es zu einer Schmerzhaftigkeit in der behandelten Pfote, aufgrund welcher die Tiere eine deutliche Schonhaltung einnehmen. Im weiteren Verlauf der FCA-Entzündung - später als in den hier untersuchten Zeiträumen - kommt es dann zu einer einseitigen Mono- bzw. Oligoarthritis der Gelenke der unteren Extremität, bis sich schließlich eine ausgeprägte, beidseitige Polyarthritis im späten Stadium nach 3-5 Wochen entwickelt.⁶² In einigen klinischen Studien an Patienten mit z.T. entzündlich veränderten Kniegelenken, die sich einer Arthroskopie unterziehen mussten, ließen sich die aus den Tierexperimenten gewonnenen Erkenntnisse verifizieren. So konnte die periphere, opioidvermittelte Antinozizeption mit einer intraartikulären Injektion von Naloxon reduziert werden. Bei den so

behandelten Patienten stieg der Wert auf der numerischen Analogskala an und mit ihr gleichzeitig der Schmerzmittelverbrauch.^{63,64} Eine neuere klinische Studie von Likar et al. konnte zeigen, dass die intraartikuläre Injektion von CRH bei Patienten nach Kniearthroskopie den postoperativen Schmerz reduzierte.⁶⁵ Wir haben das Augenmerk in den von uns durchgeführten Versuchen auf den Zeitraum von 12 bis 48 Stunden nach FCA-Injektion gelegt. Der Grund für das gewählte Zeitintervall war die Tatsache, dass zu einem so frühen Zeitpunkt der Entzündung noch nicht die gesamte Kaskade an proinflammatorischen Mediatoren aktiviert und eine ausreichende Blockierung daher noch möglich ist. Die PMN bilden die größte Leukozytensubpopulation im entzündeten Gewebe der Frühphase bis 24 h. Zum späteren Zeitpunkt der Entzündung (48 und 96 h) hingegen sind Monozyten/Makrophagen im entzündeten Gewebe vorherrschend. Zugleich sind sie in diesem Augenblick auch die Hauptproduzenten von leukozytären Opioidpeptiden.⁶⁶ Zu jedem dieser Zeitpunkte ist die Zahl der Immunzellen im entzündeten Pfoten­gewebe gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht und die peripheren, opioidvermittelten antinozizeptiven Effekte sind nur dort im Verhaltensexperiment messbar.¹⁷ Für die Rekrutierung der Immunzellen in das entzündete Gewebe sind – wie bereits erwähnt – Chemokine verantwortlich. In unserem FCA-Modell konnte noch zusätzlich gezeigt werden, dass der CXCR2 auch die Freisetzung der Opioidpeptide steuert. Durch die lokale Gabe eines CXCL2/3 in die FCA-entzündete Rattenpfote wurden Opioidpeptide aus den PMN freigesetzt und dadurch eine periphere Antinozizeption ausgelöst. Diese Opioidfreisetzung ist an einen intrazellulären Signalweg mit der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen gekoppelt.²³

4.2.2 L-733,060

Der von uns eingesetzte nicht-peptidische NK1-R-Antagonist L-733,060 ist eine Entwicklung der Merck Sharp & Dome Research Laboratories, UK. Aufgrund seiner Struktur und seiner chemischen Eigenschaften passiert er sehr leicht die Blut-Hirn-Schranke. Zum humanen NK1-R besitzt er eine hohe Affinität (mittlere inhibitorische Dosis = 0,8 nM). In *in vitro*-Experimenten mit Ovarialzellen des Chinesischen Hamsters zeigte dieser Wirkstoff konzentrationsabhängig hemmende Effekte auf die Substanz P-vermittelte, intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisation.⁶⁷ Im Tierversuch bewirkte die i.v. Gabe (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG i.v.) eine signifikante und ebenfalls dosisabhängige Reduktion der Plasmaextravasation in der Dura mater von Ratten, die zuvor eine elektrische Stimulation des Ganglion trigeminale erhalten hatten. Mit diesem Modell soll eine mögliche Hypothese für die Entstehung der Migräne erklärt werden, welche auf eben diese Plasmaextravasation aus den hirnhautversorgenden Gefäßen zurückzuführen sei. Bei i.v.-Dosen < 3000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ KG kam es zu keinen deutlichen kardiovaskulären Nebenwirkungen.⁶⁷ Bang et al.

untersuchten die Wirkung von L-733,060 in einem Modell der Lipopolysaccharid-induzierten Leberentzündung der Maus. Dabei bewirkt das Lipopolysaccharid, systemisch angewandt, in der Maus einen T-Zell-vermittelten, entzündlichen Leberschaden mit Ödembildung, PMN-Infiltration, Apoptose und Nekrose von Hepatozyten.⁵⁵ Dieser Prozess lässt sich durch eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit Capsaicin verhindern, was für den Einfluss der primär afferenten, sensorischen Neurone auf die Entzündungsbildung spricht.⁶⁸ In einer ihrer Studien konnten Bang et al. nun zeigen, dass eine vorab durchgeführte systemische Gabe von L-733,060 (20 mg/kg KG) diese Vorgänge in der Leber ebenfalls signifikant reduzieren kann. Dies ist als weiterer Beleg dafür zu werten, dass Substanz P von peripheren, sensorischen Neuronen sezerniert wird und außerdem einen Einfluss auf die Leukozyteneinwanderung hat.⁵⁵

Rupniak et al. zeigten im Formalin-Test, einem Schmerzverhaltenstest nach i.pl.

Formalininjektion, eine dosisabhängige, komplette Antinozizeption durch L-733,060 (mittlere effektive Dosis = 0,17 mg/kg KG i.v.). Dieser Effekt scheint über zentralnervöse NK1-R vermittelt zu sein, da ein Vergleichsexperiment mit einem selektiv peripher wirkenden Antagonisten (L-743,310) keine antinozizeptive Wirkung zeigte.⁶⁹ Die Arbeitsgruppe um Jang konnte in einem Ratten-Modell des neuropathischen Schmerzes zeigen, dass die lokale (plantare) Applikation von L-733,060 (100 µg) die Entstehung einer mechanischen Hyperalgesie verzögern kann. Ein Hinweis darauf, dass Substanz P eine wichtige Rolle in der peripheren Schmerzentstehung bei neuropathischen Schmerzen spielt.⁷⁰

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass L-733,060 sehr leicht die Blut-Hirn-Schranke passiert und bereits in mehreren Studien erfolgreich eine Blockade der chemotaktischen Wirkung von Substanz P und seine analgetische Potenz zeigen konnte.

4.2.3 SR140333

Beim zweiten von uns eingesetzten Antagonisten SR140333 handelt es sich ebenfalls um einen der neueren nicht-peptidischen NK1-R-Antagonisten. Er besitzt im Gegensatz zu L-733,060 nahezu keine ZNS-Gängigkeit, was ihn damit als selektiv peripher wirkend auszeichnet. Diese Substanz wurde von Sanofi Aventis, Frankreich entwickelt. Emonds-Alt et al. untersuchten diesen Wirkstoff sehr genau. Bindungsstudien an tierischen und humanen Zellreihen ergaben eine mittlere inhibitorische Dosis im Bereich von 0,019 bis 0,7 nM für die Affinität am NK1-R.⁷¹ Im Tierversuch konnte auch dieser Antagonist die Plasmaextravasation dosisabhängig reduzieren. Hier jedoch wurde dies im peripheren Gewebe nach Injektion eines Substanz P-Analogons bzw. der elektrischen Stimulation eines peripheren Nervens untersucht.⁷¹ Dieser Arbeitsgruppe gelang es auch, in einem Schmerzmodell einen hemmenden Effekt von SR140333 zu zeigen. In diesem

Versuchsaufbau wurden periphere Schmerzreize gesetzt und dann entsprechende neuronale Aktivitäten im Thalamus abgeleitet.⁷¹ Diese Daten wurden als Nachweis für die vermeintliche ZNS-Gängigkeit gewertet.⁷¹ Rupniak et al. konnten diese Erkenntnis jedoch in zahlreichen Verhaltensexperimenten widerlegen.^{59,72,73} Abschließend stellt sich SR140333 als selektiv peripher wirkender NK1-R-Antagonist da.

4.3 Diskussion der Ergebnisse

4.3.1 Steigender Gehalt an Substanz P im Entzündungsverlauf

Als möglicher Ursprung von Substanz P, welche wir im Laufe des Entzündungsgeschehens in steigender Menge im peripheren Gewebe messen konnten, sind die peripheren sensorischen Nerven zu nennen. Wie in 1.4. beschrieben sezerniert das PNS Neuropeptide wie Substanz P. In verschiedenen Modellen der akuten und der chronischen Entzündung konnte eine Zunahme von Substanz P in den Hinterhornwurzeln des Rückenmarks nachgewiesen werden. Ebenso konnten in der Peripherie erhöhte Werte der mRNA sowohl für Substanz P als auch für den präferierten Rezeptor (NK1-R) gemessen werden.^{74,75} Donnerer et al. benutzten für ihre Studien ebenfalls das FCA-Modell der einseitigen Entzündung in der Rattenpfote. Im Verlauf der Entzündung fanden sie einen signifikant erhöhten Gehalt an Substanz P im Nervus ischiadicus der entzündeten Seite. Ebenso konnten sie einen erhöhten axonalen Transport von Substanz P in Richtung des entzündeten Gewebes messen. Im peripheren, entzündeten Gewebe selbst allerdings blieb die gemessene Menge an Substanz P im Vergleich zur kontralateralen Seite gleich oder war sogar herabgesetzt. Dies wurde als Zeichen einer verminderten Speicherung und erhöhten Freisetzung von Substanz P ins Gewebe gedeutet.⁷⁶ In mehreren Publikationen konnte zusätzlich gezeigt werden, dass Substanz P auch von Immunzellen selbst produziert wird.⁷⁷ Weinstock et al. konnten die Bildung von Substanz P in eosinophilen Leukozyten der Maus nachweisen.⁷⁸ Anderen gelang der Nachweis von Substanz P in den Makrophagen der Ratte.^{79,80} Ob nur eine oder aber beide Quellen in unseren Experimenten eine entscheidende Rolle spielen, bleibt unklar, da die Herkunft von Substanz P nicht untersucht wurde.

4.3.2 Leukozyten mit positiver NK1-R-Expression

Auf eine mögliche Ursache für unterschiedliche Ergebnisse bei der Bestimmung der Rezeptorexpression auf Leukozyten wurde in 1.5. hingewiesen. Da sich speziell die Immunzellen im Laufe ihres Lebens einer z.T. sehr differenzierten Entwicklung unterziehen, kommt es

dabei auch zu einer variablen Expression verschiedener Oberflächenstrukturen. Dazu zählen auch die NK1-R. Wir konnten bei der Mehrzahl der von uns aus dem entzündeten Pfortengewebe der Ratte gewonnenen CD45⁺-Zellen (Leukozyten) den NK1-R nachweisen. Für den Nachweis einer NK1-R-Expression auf menschlichen Immunzellen gibt es widersprüchliche Angaben in der Literatur. Während es teilweise nicht gelang den NK1-R auf humanen Lymphozyten oder PMN zu zeigen^{81,82}, konnte in anderen Studien der Nachweis für diesen Rezeptor auf humanen Monozyten und Makrophagen erbracht werden^{37,83}.

4.3.3 Die *systemische* Gabe der NK1-R-Antagonisten

In einer Vielzahl von tierexperimentellen Studien wurde bisher nahezu ausschließlich die antinozizeptive Wirkung der NK1-R-Antagonisten untersucht. Dies scheint soweit nicht verwunderlich, ist doch Substanz P als endogener Agonist an diesem Rezeptor als schmerzübermittlender Neurotransmitter bekannt. So konnten mehrere Arbeitsgruppen zeigen, dass sowohl die systemische wie auch die lokale Anwendung eines NK1-R-Antagonisten zu einer Antinozizeption führen. Dabei wurden unterschiedliche Tiermodelle eingesetzt, wie z.B. der Formalin-Test oder die i.pl. Injektion von Capsaicin bzw. Glutamat.⁸⁴⁻⁸⁷ Ähnliche Ergebnisse konnten auch nach der zentralen Applikation von NK1-R-Antagonisten erzielt werden. Dabei handelte es sich ebenfalls um Studien mit o.g. Modellen.⁸⁶⁻⁸⁸ Aufgrund dieser teilweise sehr überzeugenden Ergebnisse wurden einige NK1-R-Antagonisten auch in klinischen Studien am Menschen erprobt. Dort konnten sie leider nicht den erwünschten Effekt zeigen. In einem Falle waren sie dem Vergleichsmedikament ebenbürtig,⁸⁹ in zahlreichen weiteren Studien zur Therapie und Prophylaxe von Schmerzzuständen hatten sie keine überzeugende Wirkung.⁹⁰⁻⁹⁷ Mehrere Gründe dafür werden diskutiert: Eventuell spielt die unterschiedliche NK1-R-Pharmakologie der verschiedenen Spezies (Ratte, Meerschweinchen, Mensch) eine Rolle und tierexperimentell gewonnene Daten lassen sich nicht so einfach auf den Menschen übertragen. Möglicherweise ist es aber auch die Vielschichtigkeit der Schmerzübermittlung. Die selektive Blockade eines Mediators, in diesem Falle Substanz P, ist eventuell nicht ausreichend um klinisch eine ausreichende Analgesie zu erreichen.⁹⁸

Die beiden von uns verwendeten NK1-R-Antagonisten L-733,060 und SR140333 sind bereits vielfach in der Fachliteratur beschrieben. So haben, wie bereits erwähnt, die Arbeitsgruppe Rupniak et al. in mehreren Studienreihen zeigen können, dass L-733,060 sehr leicht die Blut-Hirn-Schranke passiert. In Dosierungen von 0,1 bis 10 mg/kg KG konnten sie ZNS-vermittelte, inhibierende Effekte in einem Schmerzmodell und einem Modell der Vokalisation bei Meerschweinchen und Mäusen zeigen. Bei letzterem werden die Jungtiere räumlich von der Mutter

getrennt, um eine Stress-induzierte Vokalisation als „kindlichen Hilferuf“ zu erreichen. Dieses Modell ist in der Verhaltensforschung etabliert und wird bei der Untersuchung von Anxiolytika und Antidepressiva eingesetzt. Die Halbwertszeit für die Wirkung von L-733,060 nach i.v. Gabe wurde mit 6,3 h berechnet. Nach dieser Zeit war die Inhibition im Schmerzmodell auf 50% vom maximalen Effekt gesunken.^{69,99} Bang et al. zeigten in einem *in vivo*-Modell der induzierten Leberentzündung zeigen, dass die systemische NK1-R-Blockade mit L-733,060 (20 mg/kg KG) die Entzündungsreaktion mildern konnte.⁵⁵ Im Einzelnen waren dies eine reduzierte Ödembildung, eine verminderte Einwanderung von PMN und ein geringerer Untergang von Leberzellen. Sie applizierten den Antagonisten unmittelbar vor der Induktion der Entzündung und untersuchten den Zeitpunkt nach 8 h.⁵⁵ Da wir für unsere Versuche den Zeitraum von 12 bis 48 h nach Entzündungsbeginn untersuchen wollten, haben wir uns für repetitive Injektionen mit einem Abstand von 12 h entschieden. Zudem haben wir uns an der höheren Dosierung von 20 mg/kg KG orientiert. Mit diesem Experiment konnten wir zeigen, dass nach 24 h ein Teil der Leukozytensubpopulationen, nämlich die Monozyten/Makrophagen und die opioidhaltigen Immunzellen, signifikant erniedrigt war. Zu diesem Zeitpunkt war auch die Pfortendruckschwelle nach CWS im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erniedrigt. Die basale Pfortendruckschwelle blieb unverändert. Dies zeigt, dass die Blockade der NK1-R keine direkte neuronale Antinozizeption bewirkt. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in anderen Studien gezeigt werden.^{100,101} Nach 48 h waren sämtliche von uns bestimmte Leukozytengruppen (PMN, Monozyten/Makrophagen, T-Zellen und opioidhaltige Immunzellen) signifikant gesenkt, was vermutlich auf die nachhaltige Wirkung der NK1-R-Antagonisten auf die Entzündungskaskade zurückzuführen ist.

Der zweite von uns eingesetzte NK1-R-Antagonist (SR140333) wurde ebenfalls in zahlreichen Studien untersucht. In einem Schmerzmodell waren 10 mg/kg KG nicht erfolgreich wirksam.⁵⁹ In einer weiteren Versuchsreihe benutzten Luccarini et al. 5, 15 und 30 mg/kg KG auf systemischem Wege, um einen durch Formalin verursachten Schmerzreiz zu unterbinden. Sie berechneten eine mittlere effektive Dosis von 16,9-19,1 mg/kg KG.⁵⁸ Amann et al. konnten in einem Tiermodell der neurogenen Entzündung eine Hemmung der Plasmaextravasation nach systemischer Anwendung zeigen. Bei Dosen von 0,1 mg/kg KG war diese bis zu 6 h signifikant erniedrigt, bei Dosen von 1,0 mg/kg KG sogar noch nach 24 h. In diesem Dosisbereich konnten keine direkten hemmenden Effekte auf die thermische bzw. chemische Nozizeption gezeigt werden.⁵⁷ In einigen Arbeiten wurde der Einfluss von SR140333 auf die Leukozytenrekrutierung untersucht. Mit einer Dosis von 480 nmol (0,3 mg/kg KG) konnte die Einwanderung von PMN in das

entzündete Gewebe signifikant gehemmt werden. Dieser Vorgang hielt über 5 h an.³⁶ In einem Reperfusionmodell konnte SR140333 mit einer Dosierung von 0,15 bis 0,5 mg/kg KG sowohl die Ausbildung einer erhöhten Gefäßpermeabilität als auch die Auswanderung von PMN unterbrechen.¹⁰² Mit Hilfe eines Allergiemodells, in welchem die Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten untersucht wird, wurde die Wirkung von 10-50 nmol (6,6-32,8 µg/kg KG) lokal bzw. 100-300 nmol (65,6-196,8 µg/kg KG) systemisch untersucht. In beiden Fällen waren die Zellzahlen nach 48 h signifikant zur Kontrollgruppe erniedrigt.¹⁰³ Denadai-Souza et al. konnten in einem Entzündungsmodell des Temporomandibulargelenkes der Ratte zeigen, dass die einmalige systemische Applikation von SR140333 (1 mg/kg KG) zu einer signifikant niedrigeren Plasmaextravasation und Leukozyteneinwanderung ins Gewebe führt. Die Nozizeption blieb jedoch unverändert.¹⁰⁴ In einem Entzündungsmodell der Rattenlunge mit Staphylokokken-Enterotoxin A + B konnte SR140333 (80 µg/kg KG) die Auswanderung von neutrophilen Granulozyten ins Lungengewebe hemmen.¹⁰⁵

Da wir wieder einen Zeitraum von 24 h nach FCA-Injektion untersuchen wollten, haben wir uns für eine wiederholte Gabe von SR140333 zu den Zeitpunkten 0 und 12 h entschieden. Mit der Dosierung von 10 mg/kg KG pro Injektion orientierten wir uns an den Arbeiten von Rupniak et al. und Luccarini et al.. Über 24 h haben wir eine Gesamtmenge von 20 mg/kg KG appliziert. Auch hier waren unsere Ergebnisse analog zu den oben genannten. Sowohl in den Zellzahlen als auch im Verhaltensexperiment waren signifikante Veränderungen zu erkennen. Die basalen Pfortendruckschwellen waren unverändert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die tierexperimentell gewonnenen Daten einen antinozizeptiven Effekt des von uns eingesetzten ZNS-gängigen NK1-R-Antagonisten L-733,060 zeigen. Für den selektiv peripher wirkenden Blocker SR140333 werden widersprüchliche Angaben gemacht. In zahlreichen klinischen Studien am Menschen konnte diese analgetische Wirkung jedoch nicht belegt werden. Ebenso haben viele Studien die Auswirkungen auf die Leukozytenmigration untersucht. Unsere Versuche bestätigen den hemmenden Effekt der NK1-R-Antagonisten auf die Auswanderung von Leukozyten in das entzündete Gewebe.

Da wir in unserem Schmerzmodell im Wesentlichen die periphere, opioidvermittelte Antinozizeption messen, weichen unsere Ergebnisse in diesem Punkt von den in der Literatur beschriebenen ab. Anstatt die Hyperalgesie durch die Antagonisierung von Substanz P zu reduzieren, führt die Blockade der NK1-R zu einer Beeinträchtigung der peripheren, opioidvermittelten Antinozizeption im entzündeten Gewebe.

4.3.4 Die *zentrale* Gabe der NK1-R-Antagonisten

Um die Rolle der zentralen NK1-R für die Rekrutierung opioidhaltiger Immunzellen zu klären und unsere gewonnenen Einsichten über die offenbar periphervermittelten Effekte zu überprüfen, haben wir Testreihen mit zentralen Gaben der beiden Antagonisten durchgeführt. In der Literatur werden nur wenige Arbeiten genannt, die die Effekte von L-733,060 nach zentraler Applikation beschreiben. In einer gelang es in einem ähnlichen Entzündungsmodell die Tyrosinphosphorylierung der NR2B-Einheit des N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptors im Rückenmark der Ratte zu inhibieren. Hierfür wurden 0,1 mg (etwa 0,5 mg/kg KG) i.th. verabreicht. Für diese Dosis wurden keine relevanten Nebenwirkungen berichtet. Allerdings wurden die Versuche bereits 40 min nach spinaler Injektion beendet und die Tiere getötet. Eine Messung einer möglichen Antinozizeption wurde nicht durchgeführt.⁵⁶ Eine andere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die i.th. Applikation von L-733,060 in Höhe des Hirnstamms (rostral-ventromediale Medulla) in einer sehr niedrigen Dosierung von 1,5 pmol (etwa 1,8 ng/kg KG) effektiv war: In einem Schmerzmodell, bei welchem den Ratten Capsaicin in die Hinterpfote injiziert wurde, konnte die zentrale Gabe von L-733,060 die Pfortendruckschwelle signifikant erhöhen und die Hitzeempfindlichkeit signifikant reduzieren.¹⁰⁶ In einem Modell, das den Substanz P-vermittelten spinalen Miktionsreflex der Ratte mit kompletter Rückenmarksdurchtrennung untersucht, konnte die i.th. Gabe von 0,5 mg/kg KG diesen Reflex erfolgreich unterdrücken.¹⁰⁷ Wir haben uns für unsere Versuchsreihen an der gewählten Dosierung der Arbeitsgruppe um Guo orientiert und ebenfalls 0,5 mg/kg KG i.th. appliziert. Für die Entzündungs- bzw. Versuchsdauer von 24 h wählten wir ein Injektionsschema mit einem 12 h-Intervall zu den Zeitpunkten 0 und 12 h. Die Ergebnisse bestätigten unsere Vermutung von der peripheren Wirkung des Antagonisten L-733,060. Es waren keine Veränderungen bei den Zellzahlen oder den Verhaltensexperimenten im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar.

Die zentrale Anwendung von SR140333 gestaltete sich aufgrund von neurologischen Nebenwirkungen als äußerst schwierig. Bei Injektionen mit 50 µg/kg KG i.th. sahen wir neurotoxische Effekte, die für die Versuchstiere zum Teil tödlich waren. Bei Dosierungen von 12,5 und 6 µg/kg KG i.th. traten noch teilweise neurologische Defekte wie Paraplegien auf. Lediglich bei 3 µg/kg KG i.th. kam es zu keinen relevanten Nebenwirkungen. In keinem dieser Fälle kam es zu einer Reduktion der Leukozyten im entzündeten Gewebe. Bereits 1987 konnten Vaught et al. zeigen, dass die spinale Applikation von NK1-R-Antagonisten bei Ratten zu neurologischen Defiziten wie Paraplegien führt.¹⁰⁸ Bei den hier benutzten Substanzen handelte es sich allerdings um die älteren, peptidischen Antagonisten, welche wesentlich neurotoxischer sind als die neueren, nicht-

peptidischen.¹⁰⁹ Aber auch neuere Substanzen wie CP-96,344, ein nicht-peptidischer und liquorgängiger NK1-R-Antagonist, zeigen motorische Defizite nach zentraler Injektion.¹¹⁰ Kamp et al. zeigten in einem Schmerzverhaltensexperiment mit Ratten, dass 6, 10 und 30 µg (etwa 15, 25 und 75 µg/kg KG) von SR140333 spinal appliziert zu einer Antinozizeption und gleichzeitiger Paralyse führten. Eine niedrigere Dosierung von 3 µg (etwa 7,5 µg/kg KG) SR140333 führte zu keinen neurologischen Defiziten, wirkte aber auch nicht mehr antinozizeptiv.⁶⁰ Eine andere Studie zeigte ähnliche Resultate: 0,35 und 0,7 µg (etwa 1,4 und 2,8 µg/kg KG) i.th. bei Ratten bewirkte keine Antinozizeption und zeigte keine neurologischen Nebenwirkungen.¹¹¹ Während in diesen Studien der Wirkstoff über einen Spinalkatheter im Bereich des lumbalen Rückenmarks verabreicht wurde, ist er in der folgenden Arbeit direkt in die Cisterna magna (Cisterna cerebellomedullaris) zwischen verlängertem Rückenmark und Kleinhirn injiziert worden. 10 bis 90 µg (etwa 50 bis 450 µg/kg KG) bewirkten einen antinozizeptiven Effekt, es kam aber zu keinerlei neurologischen Ausfällen.⁵⁸ Daraus lässt sich schließen, dass die schädliche Wirkung der Antagonisten auf segmentaler Ebene des Rückenmarks stattgefunden haben muss. Abschließend betrachtet, lassen sich folgende Punkte hervorheben: die zentrale Anwendung von NK1-R-Antagonisten kann eine Antinozizeption hervorrufen. Aufgrund der teilweise stark ausgeprägten Neurotoxizität kam es bei einigen Substanzen zu neurologischen Ausfallerscheinungen, was die Verwertbarkeit der gewonnenen Daten erschwert.

4.4 Diskussion der Substanz P-getriggerten Leukozytenrekrutierung

Bei der Rekrutierung opioidhaltiger Leukozyten in das entzündete Gewebe spielen Chemokine und Adhäsionsmoleküle eine bedeutende Rolle. Sie initiieren und regulieren diesen differenzierten und mehrstufigen Prozess (siehe auch 1.3 und 1.4). Aus zahlreichen, eigenen Studien wissen wir, dass insbesondere die Liganden des Chemokinrezeptors CXCR2 in der frühen Phase der Entzündung dominieren. Sie sind nicht nur an der PMN-Rekrutierung sondern auch an der Freisetzung der Opioidpeptide aktiv beteiligt.^{18,23} Ebenso konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass die Synthese von Adhäsionsmolekülen auf dem Gefäßendothel während eines Entzündungsgeschehens verstärkt ist.¹¹²⁻¹¹⁴ Blockiert man nun selektiv diese Adhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1), so kommt es ebenfalls zu einer verminderten Auswanderung der Leukozyten in das entzündete Gewebe.^{112,113,115} Mit diesem Wissen und den Erkenntnissen aus der hier vorliegenden Arbeit – die Antagonisierung von Substanz P führt zu einer verminderten Zahl an opioidhaltigen Leukozyten in der entzündeten Rattenpfote und damit zugleich zu einer Abnahme der Antinozizeption – haben sich uns folgende Fragen aufgedrängt:

Erreicht Substanz P seine Wirkung (i) durch einen *direkten*, hemmenden Effekt auf die Leukozyten oder ist es vielmehr das *indirekte* Ergebnis durch eine Beeinflussung (ii) der Chemokine bzw. (iii) der Adhäsionsmoleküle.

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits in der Vergangenheit zeigen, dass Substanz P die Produktion von Chemokinen in Leukozyten und Epithelzellen anregt.^{116,117} Dagegen konnte die Chemokinbildung unter der Zugabe eines NK1-R-Antagonisten gehemmt werden.¹¹⁸ Für die Adhäsionsmoleküle konnten zahlreiche Studien zeigen, dass die Expression von ICAM-1 in Anwesenheit von Substanz P zunahm.^{37,119} Eine inhibierende Wirkung von NK1-R-Antagonisten auf die ICAM-1-Expression ist beschrieben worden.¹²⁰

Unsere Arbeitsgruppe konnte in weiteren Experimenten zeigen, dass in der entzündeten Pfote nicht nur auf den Leukozyten NK1-R exprimiert werden. Sie konnte diesen Rezeptor auch auf Endothelzellen peripherer Blutgefäße nachweisen, die auch ICAM-1 exprimieren. Zudem gelang der Nachweis von NK1-R auf peripheren Nerven. Durch die systemische Blockade der NK1-R mit SR140333 veränderte sich weder die Expression der NK1-R noch die Expression von ICAM-1 auf den Endothelzellen. Der Gehalt an relevanten Chemokinen (CXCL1, CCL2 und Interleukin-1 β) in der entzündeten Pfote blieb ebenfalls unverändert.¹²¹ Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Migration der Leukozyten ins entzündete Gewebe durch eine direkte, chemotaktische Wirkung von Substanz P gesteuert wird. Durch die Blockade der auf den Leukozyten exprimierten NK1-R lässt sich dieser Vorgang somit hemmen.

4.5 Ausblick

Opioidhaltige Leukozyten vermitteln über Opioidrezeptoren auf peripheren Nerven eine Analgesie. Die Rekrutierung dieser Immunzellen und die Freisetzung der Opioidpeptide werden über ein komplexes Zusammenspiel von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und weiteren Mediatoren gesteuert. Wir sind zu der Erkenntnis gelangt, dass Substanz P als einer dieser Faktoren eine Rolle spielt. Die Blockade des präferierten Rezeptors (NK1-R) führt zu einer verminderten Auswanderung von Leukozyten ins entzündete Gewebe und somit auch zu einer reduzierten Freisetzung von Opioidpeptiden. Dies wäre insoweit eine Erklärung dafür, dass sich NK1-R-Antagonisten in der klinischen Schmerztherapie bisher nicht durchsetzen konnten.¹²² Es ist jedoch zu bedenken, dass heute bereits NK1-R-Antagonisten erfolgreich zur Prophylaxe und Therapie des Chemotherapie-induzierten Erbrechens und des PONV eingesetzt werden. Es scheint bei diesen Patienten durchaus möglich, dass ihre periphere, opioidvermittelte Analgesie herabgesetzt sein könnte. Aus

diesem Grunde ist bei der Anwendung von NK1-R-Antagonisten auch stets eine Evaluation der eventuell parallel durchgeführten Schmerztherapie angebracht.

5 Zusammenfassung

Einleitung: Opioide gehören zu den stärksten Schmerzmitteln. Ihre Hauptwirkung erzielen sie über die Aktivität an Opioidrezeptoren im Gehirn und dem Rückenmark. Aber auch auf peripheren Nerven werden diese Rezeptoren exprimiert. Seit einigen Jahren weiß man, dass Leukozyten selbst Opioidpeptide produzieren und im Gewebe sezernieren. Auf diesem Wege erzeugen die Leukozyten eine periphere, opioidvermittelte Analgesie, die frei von den zentralen, opioidbedingten Nebenwirkungen wie Atemdepression, Sedierung und Übelkeit ist. Für die Rekrutierung dieser Immunzellen ins entzündete Gewebe ist eine Vielzahl von Mechanismen verantwortlich. Eine entscheidende Rolle spielen die Chemokine, welche im entzündeten Gewebe von Immunzellen, Gefäßendothelzellen und peripheren Nervenzellen freigesetzt werden. Allerdings scheinen auch noch andere Stoffe beteiligt zu sein, wobei wir unser Augenmerk auf Neuropeptide des PNS gelegt haben. Eines dieser Neuropeptide ist Substanz P. Es wurde – obwohl ein klassischer Neurotransmitter – schon oft auf seine chemotaktischen Eigenschaften im Bezug auf Leukozyten untersucht. In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Substanz P in der peripheren Opioidanalgesie analysiert. Dabei wurden folgende Fragestellungen bearbeitet: Wie hoch ist der Gehalt an Substanz P im entzündeten Gewebe im Vergleich zum nicht-entzündeten Gewebe? Wie hoch ist die Expression des von Substanz P präferierten Neurokinin-1-Rezeptors (NK1-R) auf den Leukozyten? Wie ist der Effekt einer systemischen bzw. einer zentralen Behandlung mit einem NK1-R-Antagonisten auf die Zahl der opioidhaltigen Immunzellen im entzündeten Gewebe und wie wirkt sich dies auf die periphere, opioidvermittelte Antinozizeption aus?

Material und Methoden: Als Grundlage für unsere Untersuchungen haben wir das FCA-Entzündungsmodell der Rattenpfote gewählt. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Entzündung haben wir das Pfortengewebe auf den Gehalt von Substanz P untersucht. Zusätzlich haben wir die im Gewebe enthaltenen Leukozyten auf die Expression des NK1-R getestet. Um die Relevanz des NK1-R für die Immunzellrekrutierung zu prüfen, haben wir ihn mit zwei verschiedenen Antagonisten blockiert. Anschließend haben wir die Zellen aus dem entzündeten Gewebe mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert und in einem Verhaltensexperiment die Pfortendruckschwellen gemessen.

Ergebnisse: Der Gehalt an Substanz P im entzündeten Pfortengewebe ist 12 h nach der FCA-Injektion schon auf mehr als das 10-fache des Ausgangswertes gestiegen. Die Werte nach 24 und 48 h liegen noch weit darüber. Eine Expression des NK1-R ist auf nahezu allen von uns unter-

suchten Immunzellen aus dem entzündeten Gewebe nachweisbar. Die systemische Gabe der NK1-R-Antagonisten führte zu einer Reduktion der opioidhaltigen Leukozyten im entzündeten Pfortengewebe. Dabei war der Effekt im Verlauf des Entzündungsgeschehens zunehmend (*nach 24 h*: 3E7⁺ Leukozyten: 190 ± 16 vs. 112 ± 15 [$\times 10^3$ Zellen], *nach 48 h*: 3E7⁺ Leukozyten: 233 ± 17 vs. 117 ± 15 [$\times 10^3$ Zellen]). Auch im Verhaltensexperiment zeigten sich eine Erniedrigung der Pfortendruckschwelle nach CWS und damit eine verminderte periphere, opioidvermittelte Antinozizeption. Die zentrale Applikation der Antagonisten zeigte keinen Effekt auf die Leukozytenrekrutierung und die Antinozizeption. Einer der Antagonisten führte sogar zu schwersten neurologischen Ausfällen.

Fazit: Neben den bereits vielfach untersuchten Chemokinen scheinen auch noch andere Mediatoren für die Rekrutierung opioidhaltiger Immunzellen ins entzündete Gewebe verantwortlich zu sein. In dieser Arbeit wurde das vom PNS sezernierte Neuropeptid Substanz P untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des von Substanz P präferierten NK1-R zu einer verminderten Anzahl von opioidhaltigen Leukozyten im entzündeten Gewebe und damit auch zu einer verminderten opioidvermittelten Antinozizeption nach CWS führt. Die Wirkung von Substanz P auf die Immunzellen scheint direkt zu sein, da die Blockade der NK1-R keine Veränderungen bei den Chemokinen bzw. Adhäsionsmolekülen bewirkt.

Ausblick: Die Erkenntnisse dieser Arbeit geben eine mögliche Erklärung dafür, warum NK1-R-Antagonisten in der klinischen Anwendung als Analgetika versagt haben. Da sie aber im Bereich der Prophylaxe und Therapie des Chemotherapie-induzierten Erbrechens und des PONV bisher erfolgreich eingesetzt werden, ist speziell für diese Patienten eine adäquate und angepasste Schmerztherapie nötig.

6 Abkürzungsverzeichnis

3E7	intrazellulärer Marker für opioidhaltige Leukozyten
CD	Cluster of differentiation (Oberflächenmerkmale von Zellen)
CRH	Corticotropin-releasing Hormone
CWS	cold water swim
CyChrome	Cy5 (Farbstoff)
ED1	Marker für Monozyten/Makrophagen
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FCA	Freund's Complete Adjuvant
FITC	Fluorescein Isothiocyanat (Farbstoff)
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
i.p.	intraperitoneal
i.pl.	intraplantar
i.th.	intrathekal
i.v.	intravenous
KG	Körpergewicht
NK1-R	Neurokinin-1-Rezeptor
PBS	phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)
PE	Phycoerythrin (Farbstoff)
PFA	Paraformaldehyd
PMN	polymorphonucleäre Leukozyten
PNS	peripheres Nervensystem
PONV	Postoperative Nausea and Vomiting (postoperative Übelkeit und Erbrechen)
RP-1	Marker für PMN

7 Literaturverzeichnis

1. Ammon HPT: *Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch*. 2004; 9. Auflage: 1679
2. Stein C, Schäfer M, Machelska H: Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 2003; 9: 1003-8
3. Mayer DJ, Price DD: Central nervous system mechanisms of analgesia. *Pain* 1976; 2: 379-404
4. Harbour-McMenamin D, Smith EM, Blalock JE: Bacterial lipopolysaccharide induction of leukocyte-derived corticotropin and endorphins. *Infect Immun* 1985; 48: 813-7
5. Stein C, Hassan AH, Przewlocki R, Gramsch C, Peter K, Herz A: Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 5935-9
6. Merskey H, Bogduk N: *Classification of Chronic Pain, Descriptions of Chronic Pain Syndromes and Definitions of Pain Terms*. IASP Press 1994; Second Edition: 209-214
7. Hassan AH, Ableitner A, Stein C, Herz A: Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* 1993; 55: 185-95
8. Mousa SA, Zhang Q, Sitte N, Ji R, Stein C: beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol* 2001; 115: 71-8
9. Stein C, Millan MJ, Herz A: Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav* 1988; 31: 455-51
10. Stein C, Gramsch C, Hassan AH, Przewlocki R, Parsons CG, Peter K, Herz A: Local opioid receptors mediating antinociception in inflammation: endogenous ligands. *Prog Clin Biol Res* 1990; 328: 425-7
11. Machelska H, Schopohl JK, Mousa SA, Labuz D, Schäfer M, Stein C: Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *J Neuroimmunol* 2003; 141: 30-9
12. Parsons CG, Czlonkowski A, Stein C, Herz A: Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Activation by endogenous opioids and role of the pituitary-adrenal axis. *Pain* 1990; 41: 81-93
13. Rossi D, Zlotnik A: The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-42
14. Olson TS, Ley K: Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2002; 283: R7-28
15. Butcher EC, Picker LJ: Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; 272: 60-6
16. Petruzzelli L, Takami M, Humes HD: Structure and function of cell adhesion molecules. *Am J Med* 1999; 106: 467-76
17. Rittner HL, Brack A, Machelska H, Mousa SA, Bauer M, Schäfer M, Stein C: Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* 2001; 95: 500-8
18. Brack A, Rittner HL, Machelska H, Leder K, Mousa SA, Schäfer M, Stein C: Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells. *Pain* 2004; 112: 229-38

19. Cabot PJ: Immune-derived opioids and peripheral antinociception. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001; 28: 230-2
20. Cabot PJ, Carter L, Gaiddon C, Zhang Q, Schäfer M, Loeffler JP, Stein C: Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. *J Clin Invest* 1997; 100: 142-8
21. Schäfer M, Carter L, Stein C: Interleukin 1 beta and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 4219-23
22. Schäfer M, Mousa SA, Zhang Q, Carter L, Stein C: Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6096-100
23. Rittner HL, Labuz D, Schaefer M, Mousa SA, Schulz S, Schäfer M, Stein C, Brack A: Pain control by CXCR2 ligands through Ca²⁺-regulated release of opioid peptides from polymorphonuclear cells. *Faseb J* 2006; 20: 2627-9
24. Jancso N, Jancso-Gabor A, Szolcsanyi J: Direct evidence for neurogenic inflammation and its prevention by denervation and by pretreatment with capsaicin. *Br J Pharmacol Chemother* 1967; 31: 138-51
25. Schmitt TK, Mousa SA, Brack A, Schmidt DK, Rittner HL, Welte M, Schäfer M, Stein C: Modulation of peripheral endogenous opioid analgesia by central afferent blockade. *Anesthesiology* 2003; 98: 195-202
26. Geppetti P, Bertrand C, Ricciardolo FL, Nadel JA: New aspects on the role of kinins in neurogenic inflammation. *Can J Physiol Pharmacol* 1995; 73: 843-7
27. Von Euler US, Gaddum JH: An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. *J Physiol* 1931; 72: 74-87
28. Lembeck F: [Central transmission of afferent impulses. III. Incidence and significance of the substance P in the dorsal roots of the spinal cord.]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmacol* 1953; 219: 197-213
29. Otsuka M, Yoshioka K: Neurotransmitter functions of mammalian tachykinins. *Physiol Rev* 1993; 73: 229-308
30. Regoli D, Boudon A, Fauchere JL: Receptors and antagonists for substance P and related peptides. *Pharmacol Rev* 1994; 46: 551-99
31. Baluk P: Neurogenic inflammation in skin and airways. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1997; 2: 76-81
32. Fiscus RR, Gross DR, Hao H, Wang X, Arden WA, Maley RH, Salley RK: N omega-nitro-L-arginine blocks the second phase but not the first phase of the endothelium-dependent relaxations induced by substance P in isolated rings of pig carotid artery. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 Suppl 12: S105-8
33. Moskowitz MA: Neurogenic versus vascular mechanisms of sumatriptan and ergot alkaloids in migraine. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13: 307-11
34. Carolan EJ, Casale TB: Effects of neuropeptides on neutrophil migration through noncellular and endothelial barriers. *J Allergy Clin Immunol* 1993; 92: 589-98
35. Roch-Arveiller M, Regoli D, Chanaud B, Lenoir M, Muntaner O, Stralzko S, Giroud JP: Tachykinins: effects on motility and metabolism of rat polymorphonuclear leucocytes. *Pharmacology* 1986; 33: 266-73
36. Cao T, Pinter E, Al-Rashed S, Gerard N, Hoult JR, Brain SD: Neurokinin-1 receptor agonists are involved in mediating neutrophil accumulation in the inflamed, but not normal, cu-

taneous microvasculature: an in vivo study using neurokinin-1 receptor knockout mice. *J Immunol* 2000; 164: 5424-9

37. Ho WZ, Lai JP, Zhu XH, Uvaydova M, Douglas SD: Human monocytes and macrophages express substance P and neurokinin-1 receptor. *J Immunol* 1997; 159: 5654-60
38. Wozniak A, Betts WH, McLennan G, Scicchitano R: Activation of human neutrophils by tachykinins: effect on formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine- and platelet-activating factor-stimulated superoxide anion production and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Immunology* 1993; 78: 629-34
39. Serra MC, Calzetti F, Ceska M, Cassatella MA: Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology* 1994; 82: 63-9
40. El-Shazly AE, Masuyama K, Eura M, Ishikawa T: Immunoregulatory effect of substance P in human eosinophil migratory function. *Immunol Invest* 1996; 25: 191-201
41. Tanabe T, Otani H, Bao L, Mikami Y, Yasukura T, Ninomiya T, Ogawa R, Inagaki C: Intracellular signaling pathway of substance P-induced superoxide production in human neutrophils. *Eur J Pharmacol* 1996; 299: 187-95
42. Schröder E, Lübke K: [On peptide synthesis. C-terminal partial sequences of eledoisins and eledoisin analogs]. *Experientia* 1964; 20: 19-21
43. Devillier P, Renoux M, Giroud JP, Regoli D: Peptides and histamine release from rat peritoneal mast cells. *Eur J Pharmacol* 1985; 117: 89-96
44. McLean S, Ganong A, Seymour PA, Snider RM, Desai MC, Rosen T, Bryce DK, Longo KP, Reynolds LS, Robinson G, et al.: Pharmacology of CP-99,994; a nonpeptide antagonist of the tachykinin neurokinin-1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267: 472-9
45. Snider RM, Longo KP, Drozda SE, Lowe JA, 3rd, Leeman SE: Effect of CP-96,345, a nonpeptide substance P receptor antagonist, on salivation in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10042-4
46. Campbell EA, Gentry CT, Patel S, Panesar MS, Walpole CS, Urban L: Selective neurokinin-1 receptor antagonists are anti-hyperalgesic in a model of neuropathic pain in the guinea-pig. *Neuroscience* 1998; 87: 527-32
47. File SE: Anxiolytic action of a neurokinin1 receptor antagonist in the social interaction test. *Pharmacol Biochem Behav* 1997; 58: 747-52
48. Di Sebastiano P, Grossi L, Di Mola FF, Angelucci D, Friess H, Marzio L, Innocenti P, Buchler MW: SR140333, a substance P receptor antagonist, influences morphological and motor changes in rat experimental colitis. *Dig Dis Sci* 1999; 44: 439-44
49. Gardner CJ, Armour DR, Beattie DT, Gale JD, Hawcock AB, Kilpatrick GJ, Twissell DJ, Ward P: GR205171: a novel antagonist with high affinity for the tachykinin NK1 receptor, and potent broad-spectrum anti-emetic activity. *Regul Pept* 1996; 65: 45-53
50. Tattersall FD, Rycroft W, Cumberbatch M, Mason G, Tye S, Williamson DJ, Hale JJ, Mills SG, Finke PE, MacCoss M, Sadowski S, Ber E, Cascieri M, Hill RG, MacIntyre DE, Hargreaves RJ: The novel NK1 receptor antagonist MK-0869 (L-754,030) and its water soluble phosphoryl prodrug, L-758,298, inhibit acute and delayed cisplatin-induced emesis in ferrets. *Neuropharmacology* 2000; 39: 652-63
51. MSD, GMBH: Fachinformation EMEND®. 2007; EMD-GPC-2007 02 28/Variation 017: 1-7
52. Schratzberger P, Reinisch N, Prodinger WM, Kahler CM, Sitte BA, Bellmann R, Fischer-Colbrie R, Winkler H, Wiedermann CJ: Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol* 1997; 158: 3895-901

53. Bahar M, Rosen M, Vickers MD: Chronic cannulation of the intradural or extradural space in the rat. *Br J Anaesth* 1984; 56: 405-10
54. Radbruch A: *Flow Cytometry and Cell Sorting (Springer Laboratory Manual)*. 1992: 223
55. Bang R, Sass G, Kiemer AK, Vollmar AM, Neuhuber WL, Tiegs G: Neurokinin-1 receptor antagonists CP-96,345 and L-733,060 protect mice from cytokine-mediated liver injury. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 305: 31-9
56. Guo W, Zou S, Guan Y, Ikeda T, Tal M, Dubner R, Ren K: Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* 2002; 22: 6208-17
57. Amann R, Schuligoi R, Holzer P, Donnerer J: The non-peptide NK1 receptor antagonist SR140333 produces long-lasting inhibition of neurogenic inflammation, but does not influence acute chemo- or thermociception in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995; 352: 201-5
58. Luccarini P, Henry M, Alvarez P, Gaydier AM, Dallel R: Contribution of neurokinin 1 receptors in the cutaneous orofacial inflammatory pain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2003; 368: 320-3
59. Rupniak NM, Tattersall FD, Williams AR, Rycroft W, Carlson EJ, Cascieri MA, Sadowski S, Ber E, Hale JJ, Mills SG, MacCoss M, Seward E, Huscroft I, Owen S, Swain CJ, Hill RG, Hargreaves RJ: In vitro and in vivo predictors of the anti-emetic activity of tachykinin NK1 receptor antagonists. *Eur J Pharmacol* 1997; 326: 201-9
60. Kamp EH, Beck DR, Gebhart GF: Combinations of neurokinin receptor antagonists reduce visceral hyperalgesia. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 105-13
61. Rittner HL, Machelska H, Stein C: Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *J Leukoc Biol* 2005; 78: 1215-22
62. Millan MJ, Czlonkowski A, Morris B, Stein C, Arendt R, Huber A, Holtt V, Herz A: Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain: influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat. *Pain* 1988; 35: 299-312
63. Stein C, Hassan AH, Lehrberger K, Giefing J, Yassouridis A: Local analgesic effect of endogenous opioid peptides. *Lancet* 1993; 342: 321-4
64. Mousa SA, Schäfer M, Mitchell WM, Hassan AH, Stein C: Local upregulation of corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 receptors in rats with painful hindlimb inflammation. *Eur J Pharmacol* 1996; 311: 221-31
65. Likar R, Mousa SA, Steinkellner H, Koppert W, Philippitsch G, Stein C, Schäfer M: Involvement of intra-articular corticotropin-releasing hormone in postoperative pain modulation. *Clin J Pain* 2007; 23: 136-42
66. Brack A, Labuz D, Schiltz A, Rittner HL, Machelska H, Schäfer M, Reszka R, Stein C: Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception. *Anesthesiology* 2004; 101: 204-11
67. Seabrook GR, Shephard SL, Williamson DJ, Tyrer P, Rigby M, Cascieri MA, Harrison T, Hargreaves RJ, Hill RG: L-733,060, a novel tachykinin NK1 receptor antagonist; effects in $[Ca^{2+}]_i$ mobilisation, cardiovascular and dural extravasation assays. *Eur J Pharmacol* 1996; 317: 129-35
68. Tiegs G, Bang R, Neuhuber WL: Requirement of peptidergic sensory innervation for disease activity in murine models of immune hepatitis and protection by beta-adrenergic stimulation. *J Neuroimmunol* 1999; 96: 131-43

69. Rupniak NM, Carlson E, Boyce S, Webb JK, Hill RG: Enantioselective inhibition of the formalin paw late phase by the NK1 receptor antagonist L-733,060 in gerbils. *Pain* 1996; 67: 189-95
70. Jang JH, Nam TS, Paik KS, Leem JW: Involvement of peripherally released substance P and calcitonin gene-related peptide in mediating mechanical hyperalgesia in a traumatic neuropathy model of the rat. *Neurosci Lett* 2004; 360: 129-32
71. Emonds-Alt X, Doutremepuich JD, Heaulme M, Neliat G, Santucci V, Steinberg R, Vilain P, Bichon D, Ducoux JP, Proietto V, et al.: In vitro and in vivo biological activities of SR140333, a novel potent non-peptide tachykinin NK1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 1993; 250: 403-13
72. Rupniak NM, Carlson EJ, Shephard S, Bentley G, Williams AR, Hill A, Swain C, Mills SG, Di Salvo J, Kilburn R, Cascieri MA, Kurtz MM, Tsao KL, Gould SL, Chicchi GG: Comparison of the functional blockade of rat substance P (NK1) receptors by GR205171, RP67580, SR140333 and NKP-608. *Neuropharmacology* 2003; 45: 231-41
73. Rupniak NM, Fisher A, Boyce S, Clarke D, Pike A, O'Connor D, Watt A: P-Glycoprotein efflux reduces the brain concentration of the substance P (NK1 receptor) antagonists SR140333 and GR205171: a comparative study using *mdr1a*^{-/-} and *mdr1a*^{+/+} mice. *Behav Pharmacol* 2003; 14: 457-63
74. McCarson KE: Central and peripheral expression of neurokinin-1 and neurokinin-3 receptor and substance P-encoding messenger RNAs: peripheral regulation during formalin-induced inflammation and lack of neurokinin receptor expression in primary afferent sensory neurons. *Neuroscience* 1999; 93: 361-70
75. Noguchi K, Morita Y, Kiyama H, Ono K, Tohyama M: A noxious stimulus induces the preprotachykinin-A gene expression in the rat dorsal root ganglion: a quantitative study using in situ hybridization histochemistry. *Brain Res* 1988; 464: 31-5
76. Donnerer J, Schuligoi R, Stein C: Increased content and transport of substance P and calcitonin gene-related peptide in sensory nerves innervating inflamed tissue: evidence for a regulatory function of nerve growth factor in vivo. *Neuroscience* 1992; 49: 693-8
77. O'Connor TM, O'Connell J, O'Brien DI, Goode T, Bredin CP, Shanahan F: The role of substance P in inflammatory disease. *J Cell Physiol* 2004; 201: 167-80
78. Weinstock JV, Blum A, Walder J, Walder R: Eosinophils from granulomas in murine schistosomiasis *mansoni* produce substance P. *J Immunol* 1988; 141: 961-6
79. Bost KL, Breeding SA, Pascual DW: Modulation of the mRNAs encoding substance P and its receptor in rat macrophages by LPS. *Reg Immunol* 1992; 4: 105-12
80. Killingsworth CR, Shore SA, Alessandrini F, Dey RD, Paulauskis JD: Rat alveolar macrophages express preprotachykinin gene-I mRNA-encoding tachykinins. *Am J Physiol* 1997; 273: L1073-81
81. Kavelaars A, Jeurissen F, Heijnen CJ: Substance P receptors and signal transduction in leukocytes. *Immunomethods* 1994; 5: 41-8
82. Marazziti D, Giannaccini G, Baroni S, Betti L, Giusti L, Lucacchini A, Cassano GB: Absence of NK1 receptors in human blood lymphocytes and granulocytes. *Neuropsychobiology* 2004; 50: 221-5
83. Simeonidis S, Castagliuolo I, Pan A, Liu J, Wang CC, Mykoniatis A, Pasha A, Valenick L, Sougioultzis S, Zhao D, Pothoulakis C: Regulation of the NK-1 receptor gene expression in human macrophage cells via an NF-kappa B site on its promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 2957-62

84. Beirith A, Santos AR, Calixto JB: The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain Res* 2003; 969: 110-6
85. Rupniak NM, Boyce S, Williams AR, Cook G, Longmore J, Seabrook GR, Caesar M, Iversen SD, Hill RG: Antinociceptive activity of NK1 receptor antagonists: non-specific effects of racemic RP67580. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 1607-13
86. Santos AR, Calixto JB: Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides* 1997; 31: 381-9
87. Yamamoto T, Yaksh TL: Stereospecific effects of a nonpeptidic NK1 selective antagonist, CP-96,345: antinociception in the absence of motor dysfunction. *Life Sci* 1991; 49: 1955-63
88. Sakurada T, Yogo H, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K, Ohba M: Differential antinociceptive effects of sendide, a NK1-receptor antagonist, and morphine in the capsaicin test. *Brain Res* 1994; 649: 319-22
89. Dionne RA, Max MB, Gordon SM, Parada S, Sang C, Gracely RH, Sethna NF, MacLean DB: The substance P receptor antagonist CP-99,994 reduces acute postoperative pain. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 64: 562-8
90. Poster Presentations IV. *Neurology* 1998; 50: 37-39
91. Connor H, Bertin L, Gillies S: Clinical evaluation of a novel, potent, CNS penetrating NK1 receptor antagonist in the acute treatment of migraine. *Cephalalgia* 1998; 18: 392
92. Goldstein DJ, Wang O, Gitter BD, Iyengar S: Dose-response study of the analgesic effect of lanepitant in patients with painful diabetic neuropathy. *Clin Neuropharmacol* 2001; 24: 16-22
93. Goldstein DJ, Offen WW, Klein EG, Phebus LA, Hipskind P, Johnson KW, Ryan RE, Jr.: Lanepitant, an NK-1 antagonist, in migraine prevention. *Cephalalgia* 2001; 21: 102-6
94. Goldstein DJ, Wang O, Saper JR, Stoltz R, Silberstein SD, Mathew NT: Ineffectiveness of neurokinin-1 antagonist in acute migraine: a crossover study. *Cephalalgia* 1997; 17: 785-90
95. Goldstein DJ, Wang O, Todd LE, Gitter BD, DeBrotta DJ, Iyengar S: Study of the analgesic effect of lanepitant in patients with osteoarthritis pain. *Clin Pharmacol Ther* 2000; 67: 419-26
96. Norman B, Panebianco D, Block G: A placebo controlled in clinic study to explore the preliminary safety and efficacy of intravenous L-758,298 (a prodrug of the NK1 receptor antagonist) in the acute treatment of migraine. *Cephalalgia* 1998; 18: 407-422
97. Reinhardt R, Laub J, Fricke J, Polis A, Gertz B: Comparison of a neurokinin-1 antagonist, L-745,030, to placebo, acetaminophen and ibuprofen in the dental pain model. *Clin Pharmacol Ther* 1998; 30: 168
98. Herbert MK, Holzer P: [Why are substance P(NK1)-receptor antagonists ineffective in pain treatment?]. *Anaesthesist* 2002; 51: 308-19
99. Rupniak NM, Carlson EC, Harrison T, Oates B, Seward E, Owen S, de Felipe C, Hunt S, Wheeldon A: Pharmacological blockade or genetic deletion of substance P (NK(1)) receptors attenuates neonatal vocalisation in guinea-pigs and mice. *Neuropharmacology* 2000; 39: 1413-21
100. De Felipe C, Herrero JF, O'Brien JA, Palmer JA, Doyle CA, Smith AJ, Laird JM, Belmonte C, Cervero F, Hunt SP: Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature* 1998; 392: 394-7

101. Sluka KA, Milton MA, Willis WD, Westlund KN: Differential roles of neurokinin 1 and neurokinin 2 receptors in the development and maintenance of heat hyperalgesia induced by acute inflammation. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 1263-73
102. Souza DG, Mendonca VA, de ACMS, Poole S, Teixeira MM: Role of tachykinin NK receptors on the local and remote injuries following ischaemia and reperfusion of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol* 2002; 135: 303-12
103. Alessandri AL, Pinho V, Souza DG, Castro MS, Klein A, Teixeira MM: Mechanisms underlying the inhibitory effects of tachykinin receptor antagonists on eosinophil recruitment in an allergic pleurisy model in mice. *Br J Pharmacol* 2003; 140: 847-54
104. Denadai-Souza A, Camargo Lde L, Ribela MT, Keeble JE, Costa SK, Muscara MN: Participation of peripheral tachykinin NK1 receptors in the carrageenan-induced inflammation of the rat temporomandibular joint. *Eur J Pain* 2009; 13: 812-9
105. Desouza IA, Camargo EA, Mariano NS, Optiz-Neto JB, Resende JS, Mello GC, Costa SK, De Nucci G, Antunes E: Role of sensory innervation in the rat pulmonary neutrophil recruitment induced by staphylococcal enterotoxins type A and B. *Eur J Pharmacol* 2009; 613: 128-34
106. Pacharinsak C, Khasabov SG, Beitz AJ, Simone DA: NK-1 receptors in the rostral ventromedial medulla contribute to hyperalgesia produced by intraplantar injection of capsaicin. *Pain* 2008; 139: 34-46
107. Zhang X, Douglas KL, Jin H, Eldaif BM, Nassar R, Fraser MO, Dolber PC: Sprouting of substance P-expressing primary afferent central terminals and spinal micturition reflex NK1 receptor dependence after spinal cord injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008; 295: R2084-96
108. Vaught JL, Scott R: Species differences in the behavioral toxicity produced by intrathecal substance P antagonists: relationship to analgesia. *Life Sci* 1987; 40: 175-81
109. Harrison S, Geppetti P: Substance p. *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 555-76
110. Traub RJ: The spinal contribution of substance P to the generation and maintenance of inflammatory hyperalgesia in the rat. *Pain* 1996; 67: 151-61
111. Powell KJ, Quirion R, Jhamandas K: Inhibition of neurokinin-1-substance P receptor and prostanoid activity prevents and reverses the development of morphine tolerance in vivo and the morphine-induced increase in CGRP expression in cultured dorsal root ganglion neurons. *Eur J Neurosci* 2003; 18: 1572-83
112. Machelska H, Brack A, Mousa SA, Schopohl JK, Rittner HL, Schäfer M, Stein C: Selectins and integrins but not platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 regulate opioid inhibition of inflammatory pain. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 772-80
113. Machelska H, Cabot PJ, Mousa SA, Zhang Q, Stein C: Pain control in inflammation governed by selectins. *Nat Med* 1998; 4: 1425-8
114. Mousa SA, Machelska H, Schäfer M, Stein C: Co-expression of beta-endorphin with adhesion molecules in a model of inflammatory pain. *J Neuroimmunol* 2000; 108: 160-70
115. Machelska H, Mousa SA, Brack A, Schopohl JK, Rittner HL, Schäfer M, Stein C: Opioid control of inflammatory pain regulated by intercellular adhesion molecule-1. *J Neurosci* 2002; 22: 5588-96
116. Guo CJ, Lai JP, Luo HM, Douglas SD, Ho WZ: Substance P up-regulates macrophage inflammatory protein-1beta expression in human T lymphocytes. *J Neuroimmunol* 2002; 131: 160-7

117. Koon HW, Zhao D, Zhan Y, Simeonidis S, Moyer MP, Pothoulakis C: Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves protein kinase Cdelta activation. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314: 1393-400
118. Sun J, Ramnath RD, Bhatia M: Neuropeptide substance P upregulates chemokine and chemokine receptor expression in primary mouse neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C696-704
119. Quinlan KL, Song IS, Bunnett NW, Letran E, Steinhoff M, Harten B, Olerud JE, Armstrong CA, Wright Caughman S, Ansel JC: Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. *Am J Physiol* 1998; 275: C1580-90
120. Nessler S, Stadelmann C, Bittner A, Schlegel K, Gronen F, Brueck W, Hemmer B, Sommer N: Suppression of autoimmune encephalomyelitis by a neurokinin-1 receptor antagonist--a putative role for substance P in CNS inflammation. *J Neuroimmunol* 2006; 179: 1-8
121. Rittner HL, Lux C, Labuz D, Mousa SA, Schäfer M, Stein C, Brack A: Neurokinin-1 receptor antagonists inhibit the recruitment of opioid-containing leukocytes and impair peripheral antinociception. *Anesthesiology* 2007; 107: 1009-17
122. Hill R: NK1 (substance P) receptor antagonists--why are they not analgesic in humans? *Trends Pharmacol Sci* 2000; 21: 244-6

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Heike Rittner und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Alexander Brack für die freundliche Überlassung des Themas und ihre stets verfügbare, sehr hilfreiche Unterstützung bei der experimentellen Arbeit und der Erstellung dieser Dissertation.

Mein Dank gilt außerdem Frau Dr. rer. nat. Dominika Labuz für die Durchführung der Verhaltensexperimente. Frau Susanne Kotré und Frau Katharina Kuschfeldt danke ich für die technische Hilfe bei der Durchflusszytometrie und dem ELISA.

Das Projekt wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bonn (KFO 100/1) gefördert. Außerdem gilt mein Dank dem Forschungskomitee der Charité, das meine Arbeit mit einem 2-jährigen Promotionsstipendium mitfinanziert hat.

Der NK1-R-Antagonist SR140333 wurde uns von der Firma Sanofi Aventis, Frankreich kostenlos zur Verfügung gestellt.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern und meiner Frau für die mentale und auch finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

9 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10 Erklärung

„Ich, Christian Nicolas Lux, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Rolle von Substanz P in der peripheren Opioidanalgesie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift