

Aus der Medizinischen Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Regulation der Opioidrezeptor Expression sensorischer Neurone bei
diabetischer Neuropathie**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Jonas Christoph Schneider
aus Lauterbach (Hessen)

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Schäfer
2. Prof. Dr. med. U. Dirnagel
3. Prof. Dr. med. T. Volk

Datum der Promotion: 9. September 2011

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Hintergrund	1
1.2 Einführung in das STZ-Tiermodell Diabetes und die experimentelle Neuropathie	3
1.3 Opioide und ihre Rezeptoren: Der μ -Opioid-Rezeptor (MOR)	4
1.4 Proteinkinase C	6
1.5 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)	7
1.6 Nervenwachstumsfaktor (NGF)	8
1.7 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (IGF1)	10
1.8 Protein Gene Product 9.5 (PGP-9.5)	11
1.9 Stand der Forschung und Ziel der Arbeit	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Materialien	14
2.1.1 Substanzen	14
2.1.1.1 Antisera	14
2.1.1.2 Medikamente	14
2.1.1.3 Wachstumsfaktoren	15
2.1.1.4 Chemikalien	15
2.1.1.5 Geräte	16
2.1.1.6 Verschiedene Materialien	16
2.1.2 Versuchslösungen	17
2.1.2.1 Pfosphatpuffer (PBS)	17
2.1.2.2 Natrium-Citrat Lösung	17
2.1.2.3 Streptozotocin	17
2.1.2.4 Artificielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF)-Trägerlösung	18
2.1.2.5 Fixierlösung	18
2.1.2.6 Saccharoselösung	18

2.1.2.7	Blockierungslösung	19
2.1.3	Versuchstiere	19
2.2	Methoden	19
2.2.1	Tiermodell	19
2.2.1.1	Narkose	19
2.2.1.2	Induktion des Diabetes mellitus mit Streptozotocin	20
2.2.1.3	Messung des Blutglucosegehaltes	20
2.2.1.4	Applikation von NGF/IGF1	20
2.2.1.5	Applikation von Calphostin C	21
2.2.1.6	Gewebeentnahme	21
2.2.2	Immunhistochemie	21
2.2.2.1	Beschichtung der Objektträger	21
2.2.2.2	Herstellung der Gewebeschnitte	22
2.2.2.3	Immunhistochemische Anfärbung	22
2.2.2.3.1	Allgemeines Protokoll zur immunhistochemischen Färbung	23
2.2.2.3.2	Protokoll zur immunhistochemischen Färbung MOR+CGRP	23
2.2.2.3.3	Protokoll zur immunhistochemischen Färbung MOR+PCK α	24
2.2.2.3.4	Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von pMOR	24
2.2.2.3.5	Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von PGP-9.5	24
2.2.3	Auswertung	25
2.2.3.1	Mikroskopische Auswertung	25
2.2.3.2	Auswertung der Rückenmarksschnitte	25
2.2.3.3	Auswertung der Schnitte durch Spinalganglien	27
2.2.3.4	Auswertung der Schnitte nach Ligatur des Nervus ischiadicus	27
2.2.3.5	Auswertung der Schnitte durch subkutanes Pfortengewebe	28
2.2.3.6	Statistische Auswertung	28
3.	Ergebnisse	29
3.1	Späte Phase eines STZ-induzierten Diabetes mellitus	29
3.1.1	NGF-Gruppe	29
3.1.1.1	Hinterhorn des Rückenmarks	29

3.1.1.2	Sensible Spinalganglien (DRG)	32
3.1.1.3	Nervus ischiadicus	35
3.1.1.4	Subkutanes Pfortengewebe	37
3.1.2	IGF1-Gruppe	40
3.1.2.1	Hinterhorn des Rückenmarks	40
3.1.2.2	Sensible Spinalganglien (DRG)	43
3.1.2.3	Nervus ischiadicus	45
3.2	Protein Gene Product 9.5	48
3.3	Frühe Phase des STZ-induzierten Diabetes mellitus	50
3.3.1	Phosphorylierte MOR im sensiblen Spinalganglion	50
3.3.2	PKC α im sensiblen Spinalganglion	53
4.	Diskussion	55
4.1	Co-Lokalisation von MOR und CGRP in sensorischen Neuronen	56
4.2	Diabetes-induzierter Verlust der MOR-/CGRP-immunoreaktiver sensorischen Neurone	57
4.2.1	Rückenmark und sensible Spinalganglien	57
4.2.2	Nervus ischiadicus und subkutanes Pfortengewebe	59
4.3	Einfluss von NGF auf periphere Nerven	62
4.4	Einfluss von IGF1 auf periphere Nerven	63
4.5	Protein Gene Product 9.5	65
4.6	Anstieg der phosphorylierten MOR in sensiblen Spinalganglien	66
4.7	Anstieg von PKC α in sensiblen Spinalganglien	67
4.8	Reversibilität nach Gabe von Calphostin C	69
5.	Schlussfolgerungen	71
6.	Literatur	73
6.1	Referenzliste	73

7.	Anhang	80
7.1	Abkürzungsverzeichnis	80
7.2	Erklärung der Selbständigkeit	82
7.3	Lebenslauf	83
7.4	Danksagung	84

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Die diabetische Polyneuropathie ist Hauptursache (Chong und Hester, 2007) des neuropathischen Schmerzes und neben anderen Veränderungen eine Langzeitkomplikation im Rahmen des Diabetes mellitus. Etwa jeder dritte Diabetes-Patient entwickelt im Laufe seiner Erkrankung eine distal-symmetrische Polyneuropathie (DSP). Hierbei kann die DSP sich in Form neuropathischer Schmerzen äußern, zu denen das Empfinden brennender oder elektrisch einschießender (elektrisierender) Schmerzen, Parästhesien, Hyperästhesien und Tiefenschmerz gehört. Im Rahmen dieses Krankheitsbildes werden die Schmerzen zumeist nachts stärker empfunden und finden sich besonders beinbetont („restless leg“ Syndrom). Als weitere Manifestation – häufig im Spätstadium - kann die DSP jedoch auch mit einem Verlust des Schmerzempfindens einhergehen, was in vielen Fällen zu schmerzlosen Ulcera führt (Boulton et al., 2005; Ziegler, 2008). In diesem Kontext zeigten Studien, dass ca. 16 % der Patienten mit Diabetes mellitus an chronischen neuropathischen Schmerzen leiden (Daouisi et al., 2004). Eine weitere multizentrische Studie zeigte sogar bei 65,3 % der untersuchten Patienten mit Diabetes mellitus Hinweise auf neuropathische Schmerzen (Halawa et al., 2010). Dabei ist neuropathischer Schmerz definiert als Schmerz, der als direkte Konsequenz einer Läsion oder Erkrankung des somatosensorischen Systems hervorgerufen wird (Treede et al., 2008).

Neuropathische Schmerzen gehören zu den am schlechtesten beeinflussbaren Schmerzen im klinischen Alltag. In Abgrenzung zum Nozizeptorschmerz sprechen neuropathische Schmerzen bei Standarddosierungen von Analgetika nicht oder nur unzureichend auf gängige Medikamente an. Neuere Studien belegen nicht nur im Tiermodell die Wirksamkeit von intrathekal applizierten selektiven Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren (SNRI) und selektiven Serotonin-Reuptake-Inhibitoren bei der Behandlung des neuropathischen Schmerzes (Ikeda et al., 2009; Smith, 2007). Auch Untersuchungen an Patienten mit diabetischer Neuropathie zeigen nach Behandlung mit trizyklischen Antidepressiva oder SNRI ähnliche Ergebnisse (Dworkin et al., 2007). Ein suffizientes Therapieregime zu finden zeigt sich dennoch oft schwierig. Hierbei hat sich ein multimodales Therapiekonzept bewährt. Es umfasst neben der Pharmakotherapie des Schmerzes selbst auch die Pharmakotherapie der ursächlichen Erkrankung (medikamentöse Einstellung des Diabetes mellitus), sowie nicht-medikamentöse Therapiemaßnahmen. Hierzu zählen Physio- und Psychotherapie. Außerdem kommen interventionelle Verfahren wie Nervenblockaden zur Anwendung.

Die in diesem Kontext fast immer eingeleitete Pharmakotherapie basiert meist auf einer Kombination verschiedener Substanzklassen. Neben Opiaten kommen auch Antikonvulsiva und Antidepressiva, sowie topische Therapieoptionen zum Einsatz (Ziegler, 2008). Als häufiges Problem in der Pharmakotherapie stellt sich dabei die verminderte Beeinflussbarkeit des neuropathischen Schmerzes durch Opiate dar. Oftmals müssen deutlich höhere Dosen des Opiats als normalerweise üblich bis zum Erreichen einer suffizienten Analgesie eingesetzt werden, wodurch gleichzeitig das Risiko opioid-assoziiierter Nebenwirkungen steigt. Die Ursachen für diese reduzierte Ansprechbarkeit auf Opioidanalgetika sind bislang nur unzureichend verstanden.

Zur Klärung des zugrundeliegenden Pathomechanismus wurden Untersuchungen an Tieren mit unterschiedlich induzierter Neuropathie durchgeführt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass auch im Tier - ähnlich den klinischen Erfahrungen beim Patienten - unter neuropathischen Bedingungen die Effektivität von Opiaten deutlich reduziert war. (Arner und Meyerson, 1988; Chen und Pan, 2003; Zurek et al., 2001). Simon und Dewey zeigten bereits 1984, dass Ratten mit Diabetes mellitus schlechter auf Morphin ansprachen als Kontrolltiere (Simon und Dewey, 1981). Verschiedene Pathomechanismen wurden auf der Grundlage tierexperimenteller Studien diskutiert: Zurek et al. vermuteten eine Beteiligung supraspinaler Mechanismen (Zurek et al., 2001), während andere Autoren von einer veränderten Funktionalität eines Subtyps der Opioidrezeptoren, der μ -Opioid-Rezeptoren (MOR) auf spinaler Ebene ausgingen (s. auch Abschnitt 1.3) (Chen et al., 2002; Chen und Pan, 2003).

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte sein, einen Beitrag zur weiteren Aufklärung möglicher Mechanismen der zuvor beschriebenen Veränderungen zu leisten. Dabei sollte zunächst das verwendete Tiermodell beschrieben werden. Es wurde die Funktionsweise des MOR, Regulationsmechanismen, sowie die Bedeutung des Neuropeptids CGRP erläutert. Außerdem sollte auf zwei Neurotrophine, den Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor, NGF) und den Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor, IGF), sowie den neuronalen Marker, das Proteine Gene Product 9.5 (PGP 9.5), eingegangen werden.

1.2 Einführung in das STZ-Tiermodell Diabetes und die experimentelle Neuropathie

Im Verlauf der letzten Jahrzehnte wurden unterschiedliche Methoden zur Induktion neuropathischer Schmerzen im Tiermodell entwickelt. Grundsätzlich kann zwischen einer traumatischen und einer metabolischen Induktion unterschieden werden.

Die traumatische Induktion des neuropathischen Schmerzes erfolgt häufig durch eine Ligatur des peripheren Nervs (Bennett und Xie, 1988; Seltzer et al., 1990).

Die metabolische Induktion des neuropathischen Schmerzes kann zum Beispiel durch Injektion von Streptozotocin (STZ) erfolgen. Streptozotocin wirkt selektiv zytotoxisch auf die β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas und führt durch den Verlust der Insulinproduktion zu Hyperglykämie (Kawada, 1992). In Folge der STZ-Injektion entwickeln die Tiere bereits nach 1-3 Tagen einen Diabetes mellitus, in dessen Rahmen regelhaft neuropathische Schmerzen auftreten (Aley und Levine, 2001; Calcutt, 2004). Das STZ-Modell verursacht die Neuropathie somit durch einen Eingriff in den Insulinstoffwechsel und nicht durch traumatische Beeinflussung des peripheren Nervs. Es ist daher dasjenige Modell einer Neuropathie, das die größte Ähnlichkeit mit der Pathogenese des Diabetes mellitus aufweist. Aus diesem Grund soll es im Rahmen dieser Arbeit benutzt werden. Neben der STZ-induzierten diabetischen Neuropathie gibt es andere etablierte Modelle, beispielsweise die Chemotherapeutika-induzierte Neuropathie (Colleoni und Sacerdote, 2009).

Aktuell werden drei verschiedene Stoffwechselwege diskutiert, die aufgrund der Hyperglykämie zur Schädigung des Nervs mit konsekutiver Neuropathie führen: (1) Die enzymunabhängige Glykierung, durch die unter anderem Proteine der Extrazellulärmatrix in Zahl und Funktion verändert werden können, wodurch die Funktion des Nerves u.a. durch Interaktion der veränderten Proteine mit Makrophagen und Endothelzellen beeinträchtigt wird (Brownlee, 1992), (2) der Polyol-Stoffwechselweg, über den bei Hyperglykämie Glucose zu Sorbitol verstoffwechselt wird, wobei NADPH verbraucht wird. Hierdurch kommt es zu einer gestörten Synthese von NO und anschließender Minderperfusion des Gewebes (Yagihashi et al., 2007) und (3) die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale, die zellschädigenden oxidativen Stress verursachen (Naik et al., 2006).

Nach der Induktion des Diabetes mellitus mittels STZ-Injektion kann die Entwicklung des neuropathischen Schmerzes mithilfe des sogenannten Pfotendrucktestes verfolgt und

quantifiziert werden (Romanovsky et al., 2004). Hierbei wird die Pfote des Tieres unter standardisierten Bedingungen einem ansteigenden Druck solange ausgesetzt, bis dieses mit Zurückziehen der Pfote reagiert. Mithilfe dieses Tests kann ein Schwellenwert für die vermehrte Schmerzhaftigkeit ermittelt werden. Eine Vielzahl von Studien zeigte übereinstimmend, dass der Schwellenwert bei neuropathischen Bedingungen absinkt und diabetische Tiere schon bei leichterem Pfootendruck mit Wegziehen der Pfote reagierten.

1.3 Opiode und ihre Rezeptoren: Der μ -Opioid-Rezeptor (MOR)

Opiate sind bis heute die am stärksten wirksamen Analgetika. Sie finden im klinischen Alltag vielfache Verwendung als intraoperative Analgetika, zur postoperativen Schmerzbekämpfung sowie zur Behandlung anderer akuter (z.B. Nierensteine) und chronischer (z.B. Tumorschmerzen) Schmerzzustände.

Die analgetische Wirkung von Opiaten erfolgt rezeptorvermittelt über verschiedene Opioidrezeptoren, von denen aktuell drei Subtypen unterschieden werden: μ -Opioid-, δ -Opioid- und κ -Opioid-Rezeptoren. Diese Rezeptoren finden sich unter anderem auf Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems. Bei all diesen Rezeptoren handelt es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen. Aktivierung des Opioidrezeptors durch einen Agonisten führt zur Kopplung mit dem Pertussistoxin-sensitiven G-Protein (G_i -P, G_o -P, G_q -P). Das G-Protein als solches besteht aus den drei Untereinheiten α , β und γ . Nach der Anlagerung des Agonisten an den Rezeptor findet zunächst ein Nukleotid-Austausch statt. Guanosindiphosphat (GDP), welches im Ruhezustand an die $G\alpha$ Untereinheit des G-Proteins gebunden ist, wird gegen Guanosintriphosphat (GTP) getauscht, wobei sich das $G\alpha$ -GTP vom $\beta\gamma$ -Komplex abspaltet. Als zellulärer Effekt der Aktivierung der Opioidrezeptoren kommt es zu einem verstärkten Ausstrom von Kalium- und einem verminderten Einstrom von Natrium- und Calcium-Ionen (Schneider et al., 1998; Wilding et al., 1995). Weiterhin kommt es zu einer Abnahme des intrazellulären Gehalts an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Daraus kann unter anderem eine Hyperpolarisation der Zelle und eine konsekutive verminderte Erregbarkeit der Nervenzelle resultieren (Birnbaumer et al., 1990). In der Folge kommt es zu einer herabgesetzten Weiterleitung von Schmerzimpulsen in Richtung des zentralen Nervensystems.

Opiate vermitteln ihre analgetische Wirkung nicht nur über zentrale, im Gehirn ansässige Rezeptoren, sondern auch im peripheren Nervensystem über unmyelinisierte C-Fasern und

schwach myelinisierte A δ -Fasern (Stein et al., 2003). Dabei werden die MOR Rezeptorproteine im Spinalganglion synthetisiert und axonal entlang des Nervs in die Peripherie transportiert (Mousa et al., 2001; Young, III et al., 1980).

Die diabetische Neuropathie ist in erster Linie eine Erkrankung der peripheren Nerven. Daher ist das Ziel dieser Untersuchung, als mögliche Ursache einer reduzierten Ansprechbarkeit auf Opioide nachzuweisen, inwiefern periphere Opioidrezeptoren im Rahmen einer diabetischen Neuropathie Veränderungen unterliegen. Bereits bekannt ist, dass die Zahl der auf den sensorischen Neuronen exprimierten MOR eine Rolle bei der Beeinflussbarkeit neuropathischer Schmerzen mit Opiaten hat (Rashid et al., 2004; Shaqura et al., 2004).

Zum quantitativen und qualitativen Nachweis von MOR stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung. Dies ist zum einen der immunhistochemische Nachweis von MOR im Gewebe (s. unten). Der Vorteil immunhistochemischer Nachweisverfahren liegt in einer hohen zellulären Auflösung, die jedoch keine reine Quantifizierung der Proteinmenge zulässt. Zum anderen kann der Nachweis mittels [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]enkephalin (DAMGO)-Bindungsstudien, die zwar keine hohe räumliche Auflösung, jedoch die Möglichkeit einer guten Quantifizierung bieten, erfolgen. DAMGO ist ein selektiver Agonist am MOR. Zum funktionellen Nachweis von MOR steht ein G-Protein-Kopplungstest zur Verfügung.

In früheren Untersuchungen an sensiblen Spinalganglien unbehandelter Ratten wurden 20,9% der Neurone als MOR-positiv beschrieben (Ji et al., 1995). Andere Studien an Mäusen fanden bis zu 45% der Neurone im Spinalganglion MOR-positiv (Yamamoto et al., 2008). MOR-positive Neurone finden sich vor allem auf schmerzleitenden Neuronen. Bei diesen Neuronen handelt es sich hauptsächlich um kleine und/oder mittelgroße Neurone bis zu einem Durchmesser von 45 μ m (Ninkovic et al., 1982). MOR können in ihrer Aktivität durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst werden. Im nicht-phosphorylierten Zustand sind die Rezeptoren biologisch aktiv, während sie durch Phosphorylierung inaktiviert werden. Die Phosphorylierung erfolgt unter anderem durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptorkinasen (GRKs) oder auch durch second-messenger abhängige Proteinkinasen (Ferguson, 2001). Letztere sind im Rahmen dieser Arbeit von Interesse, da dieser Mechanismus auch bei der diabetischen Neuropathie von Bedeutung ist (Eichberg, 2002).

1.4 Proteinkinase C

Zu den second-messenger abhängigen Proteinkinasen, die im Rahmen der Phosphorylierung der MOR eine Rolle spielen, zählen unter anderem die Proteinkinase A (PKA) und die Proteinkinase C (PKC). Als second messenger dienen zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Ca^{2+} und 1,2-Diacylglycerin (DAG) (Ferguson, 2001).

Die Proteinkinase C liegt in mehreren Isoenzymen vor, deren Aktivität Ca^{2+} -abhängig ist. Hierzu gehören $\text{PKC}\alpha$, $\text{PKC}\beta\text{I}$, $\text{PKC}\beta\text{II}$ und $\text{PKC}\gamma$. Die verschiedenen Isoformen der PKC unterscheiden sich in ihrer Gewebeverteilung, ihrer Aktivität und ihrer Eigenschaft, verschiedene Substrate zu phosphorylieren.

Aus einer Studie am Mausmodell ist bekannt, dass es unter diabetischen Bedingungen nach Injektion von STZ zu einer signifikanten Aktivierung der PKC im Rückenmark gekommen war (Ahlgren und Levine, 1993; Honda et al., 2007). Mit dieser Aktivierung vergesellschaftet zeigten Tiere ein schmerzhaftes Verhalten auf primär nicht schmerzhaft mechanische Reize (Allodynie). Diabetische Tiere reagierten auf einen mechanischen Reiz schneller mit dem Wegziehen der Pfote als unbehandelte Kontrolltiere. Eine andere Studie an Mäusen konnte zeigen, dass $\text{PKC}\gamma$ -knockout-Mäuse, also Mäuse die keine PKC-Aktivität besitzen, auch nach Verletzung des peripheren Nervs kein neuropathisches Schmerzsyndrom entwickelten. Dies legte die Vermutung nahe, dass die PKC zur Ausbildung eines neuropathischen Schmerzsyndroms vorhanden sein muss. (Malmberg et al., 1997).

Bereits 1989 konnte in Studien gezeigt werden, dass Calphostin C die Eigenschaft besitzt, PKC selektiv zu inhibieren ohne dabei zwischen den Subtypen der PCK zu unterscheiden. Der inhibitorische Effekt auf die Proteinkinase C (IC_{50} 0,05 μM) ist >1000-fach höher als der inhibitorische Effekt auf andere Proteinkinasen (IC_{50} >50 μM). Dabei bestehen keine Unterschiede in der Hemmung der Isoenzyme der PKC (Ahlgren und Levine, 1993; Kobayashi et al., 1989). Calphostin C ist eine chemische Verbindung, die aus dem Pilz *Cladosporium cladosporioides* isoliert wurde. Honda et al. beobachteten im Mausmodell nach Gabe des PKC-Inhibitors Calphostin C bzw. nach Gabe des unspezifischen Proteinkinase-Inhibitors H-7 eine Reversibilität der Allodynie. Der PKA-Inhibitor H-89 zeigte hingegen keinen Effekt (Honda et al., 2007).

1.5 Calcitonin gene-related peptide (CGRP)

Bei den primär afferenten Neuronen, die unter anderem auch für die Schmerzleitung verantwortlich sind, können zwei Gruppen von Nervenfasern unterschieden werden: Die eine Gruppe umfasst nicht-peptidergische Neurone und stellt sich immunhistochemisch IB4-positiv dar. Isolektin B4 (IB4) ist ein Produkt der Pflanze *Griffonia simplicifolia* und bindet an bestimmte Glykopeptide der Zellmembranen unmyelinisierter Fasern. Die IB4-positiven Neurone stehen in der pränatalen Entwicklungsphase unter dem wachstumsfördernden Einfluss von NGF. Hingegen postnatal entwickeln sich IB4-positive Neurone lediglich Gliazellen-Wachstumsfaktor (Glial cell line-derived neurotrophic factor, GDNF)-abhängig.

Die andere Gruppe wird durch die peptidergischen (OR-positiven) Neurone repräsentiert und ist mittels Calcitonin gene-related peptide (CGRP) nachweisbar. Die CGRP-positiven Fasern entwickeln sich im Gegensatz zu den IB4-positiven Fasern sowohl prä- als auch postnatal NGF-abhängig (Akkinä et al., 2001). Hauptsächlich zeigen sich unmyelinisierte C-Fasern und zu einem kleinen Teil auch schwach myelinisierte A δ -Fasern CGRP-positiv, die für Schmerzleitung verantwortlich sind (Traub et al., 1990). Bei den CGRP-positiven Neuronen im Spinalganglion handelt es sich größtenteils um kleine (<25 μ m) Neurone, darüberhinaus exprimiert auch ein geringer Anteil mittelgroßer Neurone (<45 μ m) CGRP (Adeghate et al., 2006). CGRP dient daher als Marker für sensorische (schmerzleitende) Nervenfasern.

Li et al. zeigten sowohl elektronenmikroskopisch als auch immunhistochemisch, dass neben MOR-immunoreaktiven Zellen in Spinalganglien auch MOR-immunoreaktive Fasern im Rückenmark in der Mehrzahl der Fälle mit CGRP co-exprimiert waren (Li et al., 1998). Diese Beobachtungen lassen in der Zusammenschau mit den Studien über MOR den Schluss zu, dass beide Peptide in schmerzleitenden kleinen und mittelgroßen Neuronen nachweisbar sind und in der Mehrzahl der Fälle co-exprimiert werden. Im Kontext der diabetischen Polyneuropathie wurde eine Verminderung der CGRP positiven Fasern im DRG festgestellt (Apfel et al., 1994). CGRP dient somit im Rahmen dieser Arbeit der Identifizierung der durch die diabetische Neuropathie betroffenen sensorischen Nervenfasern. Im Rückenmark sind nur präsynaptische Opioid-Rezeptoren CGRP-positiv, postsynaptische Opioid-Rezeptoren hingegen nicht (Carlton et al., 1988).

1.6 Nervenwachstumsfaktor (Nerve growth factor, NGF)

Nerve growth factor (NGF) gehört zur Gruppe der Neurotrophine. Zellen, die durch einen peripheren Nerv innerviert werden, können den Nerv mittels dieser Proteine beeinflussen. Zu den Effekten der Neurotrophine auf neuronales Gewebe zählen unter anderem Wachstum, Entwicklung und Überleben der Nervenzellen. Jedoch sind nicht alle Neurone NGF sensibel, so dass man NGF-abhängige von NGF-unabhängigen Neuronen differenziert. Innerhalb der Gruppe der NGF-abhängigen Neurone finden sich sowohl nozizeptive als auch sympathische Neurone. NGF beeinflusst hauptsächlich das Wachstum kleiner und mittelgroßer Neurone, sowie deren Aussprossung in die oberflächlichen Laminae I und II (nach Rexed, s. Abb. 1.1) im Hinterhorn des Rückenmarks. Es handelt sich hierbei um die bereits oben erwähnten CGRP-positiven unmyelinisierten C-Fasern und schwach myelinisierten A δ -Fasern zur Schmerzleitung. Nervenfasern, die in die tieferen Schichten III und IV des Rückenmarks projizieren, bleiben von NGF hingegen unbeeinflusst (Zhang et al., 1994).

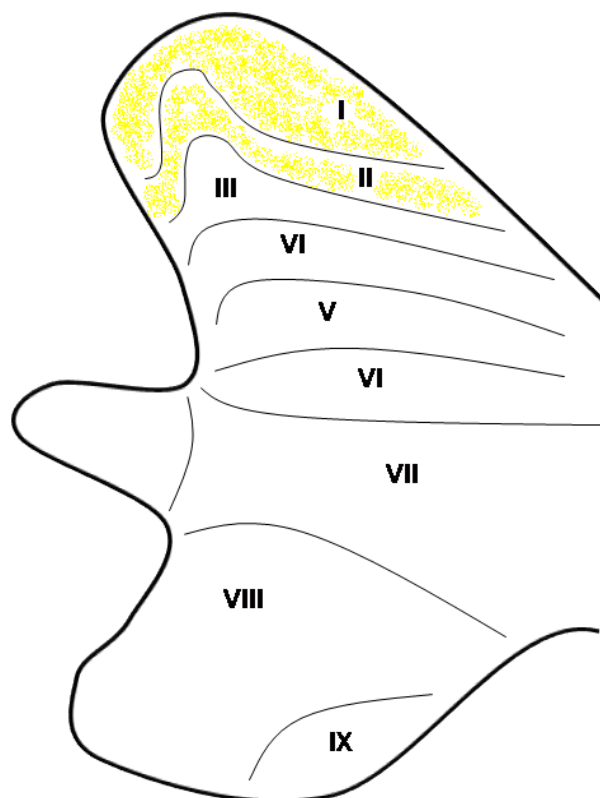


Abb. 1.1: Laminae des Rückenmarks (nach Rexed), schematische Darstellung. Gelb markiert sind die oberflächlichen Laminae I+II im Hinterhorn. Die Rexed-Laminae stellen eine histologische Einteilung der grauen Substanz des Rückenmarks dar.

Die Synthese von NGF kann zum einen nach Verletzung des Nerven durch Schwann-Zellen des peripheren Nerven selbst erfolgen, zum anderen aber auch von Keratinozyten und Mastzellen im von dem entsprechenden Nerv innervierten Gebiet (Unger et al., 1998). Nach der Synthese von NGF durch die Schwann- oder Zielzelle (Keratinzyt) erfolgt die Aufnahme in die Nervenzelle durch Neurotrophin-Rezeptoren. Hierbei wird NGF durch einen Rezeptor aufgenommen, der als Dimer aus RezeptortyrosinkinaseA und p75 besteht (trkA/p75). Anschließend erfolgt der retrograde axonale Transport des NGFs zum Perikaryon des Neurons (Boucher und McMahon, 2001), welches im Falle des peripheren Nerven im Spinalganglion liegt. Als biologischer Effekt von NGF ist unter anderem bekannt, dass es die unter neuropathischen Bedingungen verminderte Expression von CGRP in Spinalganglien und die verminderte Schmerzschwelle für thermische Reize wiederherstellen kann (Apfel et al., 1994). Darüber hinaus belegen andere Studien auch eine Verminderung der mechanischen Hyperalgesie im neuropathischen Tiermodell nach Applikation von NGF über sieben Tage (Ren et al., 1995). Wird NGF hingegen nur einmalig appliziert, führt es zu einer Zunahme der Hyperalgesie (Herzberg et al., 1997; Lewin et al., 1994).

NGF ist auch an der Regulation der MOR beteiligt. Aktuelle Studien im Tiermodell zeigen, dass Opiate in lokal entzündetem Gewebe eine signifikant verbesserte Wirkung aufweisen: Nach Induktion einer Entzündungsreaktion in der Pfote durch Injektion von Freund's complete adjuvant (FCA) war es in Spinalganglien zu einem Anstieg von MOR in immunhistochemischen Versuchen gekommen (Mousa et al., 2007). Außerdem konnten in Spinalganglien eine Hochregulation von MOR-Bindungsstellen mittels [³H]-DAMGO Bindungsstudien beobachtet werden sowie ein gesteigertes DAMGO-induziertes MOR G-Protein-coupling mittels [³⁵S]GTPγS Assay. Ursächlich hierfür scheint zu sein, dass es in entzündetem Gewebe zu einer gesteigerten Synthese von NGF kommt, welches vermehrt retrograd zum Spinalganglion transportiert wird. Hier bewirkt NGF eine gesteigerte Synthese von MOR, die nach Akkumulation im DRG dann wiederum vermehrt anterograd entlang des peripheren Nerven zu peripheren Nervenendigungen transportiert werden. Hier vermitteln die angereicherten MOR eine verbesserte analgetische Wirkung von Opiaten (Zollner et al., 2003). Dieser Arbeit liegt die Hypothese zugrunde, dass unter diabetischen Bedingungen der gegenteilige Fall eintritt. Bekannt ist bereits, dass es unter experimentell-diabetischen Bedingungen zu einer Abnahme des axonal transportierten NGF in sympathischen und sensorischen Nervenfasern kommt (Hellweg und Hartung, 1990). Daher soll nun im Tiermodell mit STZ-induziertem Diabetes mellitus gezeigt werden, inwiefern sich die Anzahl von MOR und das co-exprimierte CGRP zum einen unter

diabetischen Bedingungen und zum anderen nach intrathekalen Gabe von NGF quantitativ verändern.

1.7 Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor, IGF1)

IGF1 ist ebenfalls ein Neurotrophin und besitzt wie NGF die Eigenschaft, Nervenwachstum und das Überleben von Neuronen zu unterstützen und zu unterhalten. IGF1 wirkt über den IGF1-Rezeptor, der wie der Insulinrezeptor zur Familie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren gehört (Wada et al., 2005). Im DRG werden IGF1 sowie der IGF1-Rezeptor hauptsächlich auf kleinen Neuronen nachgewiesen (Craner et al., 2002). IGF1 wirkt nicht nur auf sensorische und sympathische Neurone, sondern hat ebenfalls Einfluss auf Motoneurone (Ishii et al., 1994). Die Synthese von IGF1 erfolgt nach dem derzeitigen Kenntnisstand hauptsächlich nach Stimulation durch Wachstumshormon (growth hormone, GH) sowie experimentell nach lokaler Applikation von Capsaicin (Okajima und Harada, 2008).

Eine Vielzahl an Studien stellte einen Zusammenhang zwischen IGF1 und der diabetischen Polyneuropathie her. Migdalis et al. konnten in einer klinischen Studie an Patienten mit Diabetes mellitus Typ II zeigen, dass sowohl IGF1 als auch der IGF1-Rezeptor im Plasma vermindert waren (Migdalis et al., 1995). Ähnliches konnte in tierexperimentellen Untersuchungen belegt werden. Craner et al. zeigten in immunhistochemischen Versuchen an Ratten mit STZ-induziertem Diabetes mellitus ebenfalls sowohl die Abnahme von IGF1 als auch eine Abnahme des IGF1-Rezeptors (Craner et al., 2002). Ähnlich dem Effekt von NGF konnte auch für IGF1 nachgewiesen werden, dass es einen Einfluss auf die diabetische Neuropathie hat: Bei Ratten mit STZ-induziertem Diabetes mellitus war die Schmerzschwelle für mechanische Reize signifikant abgesunken. Dieser Effekt konnte durch die Applikation von IGF1 verhindert werden. Hingegen unbeeinflusst blieb der Blutglukosespiegel (Zhuang et al., 1996).

Immunhistochemische Untersuchungen zum Einfluss von IGF1 auf MOR und CGRP bei diabetischer Neuropathie liegen bislang nicht vor. Vor dem Hintergrund, dass im tierexperimentellen Verhaltensmodell NGF-ähnliche Effekte beobachtet wurden, soll nun der Einfluss von IGF1 auf die Expression von MOR und CGRP im peripheren Nerv untersucht werden.

1.8 Protein Gene Product 9.5 (PGP-9.5)

Im Rahmen des Diabetes mellitus kommt es zunächst relativ früh bedingt durch hyperglykämie-induzierte Proteinveränderungen bzw. Störungen der Mikrozirkulation (Yagihashi et al., 2007) zu Schädigungen der Myelinscheiden (Dobretsov et al., 2007). Hierdurch werden Druck- und Berührungsempfinden beeinflusst, wofür hauptsächlich A β -Fasern verantwortlich sind. Protein Gene Product 9.5 (PGP-9.5) gilt als ein spezifisches Markerprotein für zentrale und periphere Neurone. Im menschlichen Gehirn liegt die Konzentration etwa 50fach über der in anderen Organen (Doran et al., 1983; Thompson et al., 1983). Da dieses Protein in allen Neuronen vorhanden ist, führt eine Veränderung der Anzahl der Neurone zu einer verminderten Menge an nachweisbarem PGP-9.5. Daher eignet sich PGP-9.5 zur Quantifizierung vorhandener Nervenfasern (Doran et al., 1983; Thompson et al., 1983).

Untersuchungen zu PGP-9.5 im Kontext des Diabetes mellitus zeigen uneinheitliche Ergebnisse. In einer immunhistochemischen Studie an humanen Hautbiopsaten wurde gezeigt, dass lediglich in der Gruppe der Patienten, die seit mehr als 10 Jahren an Diabetes mellitus Typ I erkrankt waren, ein signifikanter Rückgang von PGP-9.5-positiven Nervenfasern stattgefunden hatte. In anderen Zeiträumen (6 Monate bis 3 Jahre bzw. 5-10 Jahre) konnte dies nicht gezeigt werden (Properzi et al., 1993). Andere Arbeiten, die mittels PGP-9.5 periphere Nervenfasern am Übergang zwischen Dermis und Epidermis quantifizierten, zeigten, dass es bei Patienten mit einem seit mehr als 5 Jahren bestehenden Diabetes mellitus lediglich an der distalen unteren Extremität zu einer Abnahme der Nervenfasern gekommen war. Hautbiopsien aus Unterarm und proximaler unterer Extremität zeigten jedoch keine Veränderungen. Bei einer Dauer des Diabetes mellitus von weniger als 5 Jahren konnte auch an der distalen unteren Extremität keine signifikante Veränderung der Nervenfasern festgestellt werden (Pittenger et al., 2004).

Studien am Tiermodell zeigen keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Veränderungen von PGP-9.5. Karanth et al. zeigten bereits 1990, dass es bei Ratten nach STZ-induziertem Diabetes mellitus nach 4 und 8 Wochen zu keiner immunhistochemischen Veränderung von PGP-9.5 und damit der Anzahl von Nervenfasern im Pfortengewebe gekommen war. 12 Wochen nach Krankheitsbeginn verzeichnete die Arbeitsgruppe sogar einen Anstieg der PGP-9.5-immunoreaktiven Fasern (Karanth et al., 1990). Im Mausmodell mit STZ-induziertem Diabetes mellitus konnte jedoch 7 Wochen nach Beginn des Diabetes mellitus ein Verlust PGP-9.5-positiver Nervenfasern im Pfortengewebe beobachtet werden (Christianson et al., 2003). Allerdings erfolgte keine Auszählung der in die Epidermis einsprossenden Nervenfasern, sondern die prozentuale Angabe des von Axonen besetzten Hautareals mittels einer Software.

Auch Toth et al. beobachteten 8 Wochen nach Einsetzen eines Diabetes mellitus mittels STZ-Injektion in Ratten eine signifikante Abnahme der PGP-9.5-positiven Fasern. Hier wurden die Nervenfasern distal der Basalmembran (dermo-epidermaler Übergang) pro definierter Fläche (1 mm²) ausgezählt (Toth et al., 2006). Die uneinheitlichen Ergebnisse aus Tierstudien können die wichtige Frage, ob es zu einer zahlenmäßigen Abnahme von Nervenfasern kommt, nicht beantworten.

1.9 Stand der Forschung und Ziel der Arbeit

Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass es im Rahmen einer diabetischen Neuropathie zu einer verminderten Wirksamkeit von Opiaten kommt. Die abschließende Ursache hierfür ist bisher noch nicht ausreichend geklärt. Eine Beteiligung von MOR wird diskutiert. Bisherige Untersuchungen vermuteten primär eine Beteiligung spinaler Rezeptoren (Back et al., 2006; Obara et al., 2009). Grundsätzlich haben bisher nur wenige Arbeitsgruppen überhaupt die Rolle peripherer Neurone und MOR im Rahmen der diabetischen Neuropathie untersucht (Chen et al., 2002; Hall et al., 2001).

Darüber hinaus wurde die Mehrzahl der Untersuchungen zu Veränderungen von MOR am peripheren Nerv im Tiermodell nach Ligatur oder Durchtrennung des N. ischiadicus durchgeführt, was nicht der Pathogenese einer diabetischen Neuropathie entspricht. Zum anderen wurde oftmals nur ein Untersuchungszeitpunkt gewählt und Veränderungen im zeitlichen Verlauf blieben unberücksichtigt (Chen et al., 2002; Chen und Pan, 2003).

Diese Arbeit soll daher im zeitlichen Verlauf eines STZ-induzierten Diabetes mellitus in der Ratte Veränderungen der Expression von MOR und dem neuronalen Marker CGRP im peripheren Nerv untersuchen. Unterschieden werden soll hierbei eine späte Phase (4-12 Wochen) von einer frühen Phase (15-30 Tage) der diabetischen Neuropathie.

Hierbei basiert die vorliegende Arbeit auf der Hypothese, dass es im Rahmen des Diabetes mellitus auf Ebene des peripheren Nervs zu Veränderungen in der Anzahl der MOR kommt und nicht zu einem quantitativen Verlust von Nervenfasern. Zur Überprüfung dieser Hypothese soll in der späten Phase des Diabetes MOR auf allen Ebenen des peripheren Nervs (Rückenmark, Spinalganglion, N. ischiadicus und subkutanes Pfortengewebe) im Verlauf der Neuropathie quantifiziert werden. Die Quantifizierung der Nervenfasern soll mittels Nachweis von PGP-9.5 erfolgen. Weiterhin soll getestet werden, inwieweit die Neurotrophine NGF und IGF1 die Expression von MOR im peripheren Nerv beeinflussen.

In der frühen Phase des Diabetes mellitus soll untersucht werden, was letztendlich zum Funktionsverlust der MOR führt. Hier soll die Rolle der PKC α auf die Phosphorylierung untersucht werden. Außerdem soll gezeigt werden, inwiefern der PKC-Inhibitor Calphostin C die Phosphorylierung beeinflusst.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Substanzen

2.1.1.1 Antisera

Herkunft

Kaninchen-anti-Ratte-MOR	Dres. Schulz und Höllt, Magdeburg, Deutschland
Meerschweinchen-anti-Ratte-CGRP	Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA
Huhn-anti-Ratte-PGP-9.5	Biotechnology Inc., Florida, USA
Alexa-Fluor-488-Ziege-anti-Meerschweinchen-IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Alexa-Fluor-488-Ziege-anti-Huhn-IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Alexa-Fluor-488-Ziege-anti-Maus-IgG	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Texas-Red-Ziege-anti-Kaninchen-IgG	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Ziegenserum (normal goat serum, NGS)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Eselserum (normal donkey serum, NDS)	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Kaninchen-anti-Ratte-phospho-MOR	Cell Signaling Inc., Beverly, USA
Maus-anti-Ratte-PKCalpha	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, Deutschland
Rattenserumalbumin (RSA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA

2.1.1.2 Medikamente

Forene® (Isoflurane)	Abbot, Wiesbaden, Deutschland
Streptozotocin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

2.1.1.3 Wachstumsfaktoren

Nervenzwachstumsfaktor (NGF) aus Ratten	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
IGF1 human, rekombinant	R&D Systems, Minneapolis, USA

2.1.1.4 Chemikalien

Paraformaldehyde (PFA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Pikrinsäure	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Gelatine aus Rinderhaut	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natrium-Citrat [HOC(COONa)(CH ₂ COONa) ₂ · 2H ₂ O]	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Timerosal	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Kaliumchromsulfat (CrK(SO ₄) ₂)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland
Blaugel	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland
Methanol (CH ₃ OH)	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Ampuwa Spüllösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Braunovidon Antiseptikum	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Calphostin C human, rekombinant	Calbiochem/Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
D-Glucose	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland

2.1.1.5 Geräte

Microm HM 560	Microm GmbH, Walldorf, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Horizontalschüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Heizplatte/Magnetrührer IKA RH basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
pH-Meter Mettler Toledo MP 220	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Gefrierschrank Liebherr comfort (-18°C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Waage Sartorius BP 121 S	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Waage Sartorius BP 4100	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Kühlschrank Bosch economic cooler	Bosch AG, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Gefrierschrank GFL 6485 (-80°C)	GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Narkoseapparat Tiberius	Dräger, Lübeck, Deutschland
Perfusor	IsmaTec, Glattbrugg-Zürich, Schweiz
Inkubator Heraeus T12	Heraeus Instrumente, Hanau, Deutschland
Laborwasseraufbereiter Direct-Q™	Millipore, Eschborn, Deutschland

2.1.1.6 Verschiedene Materialien

Vectashield Fixiermedium	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Objektträger 76x26mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Deckgläser 24x50mm	Menzel GmbH&Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Eppendorf-Pipetten	Eppendorf-AG, Hamburg, Deutschland
Pippentenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Einbettmedium Neg-50	Richard-Allan-Scientific, Kalamazoo, USA
ssniff Alleinfutter	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
KäfigEinstreu (fein)	Jelu-Werk, Rosenberg, Deutschland
Makrolon-Käfig Typ IV	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Zellsieb 70µm Falcon™	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Glucose-Teststreifen Glukoflex-R	National Diagnostic Products, Sydney, Australien
Klammernahtgerät	

Minipumpe (Modell 2001)	ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, USA
Katheter Portex	Smiths Medical International Ltd., Hythe, UK
Fine Bore Polyethylene Tubing ID 0,28mm	
Katheter Portex	Smiths Medical International Ltd., Hythe, UK
Non Sterile Polyethylene Tubing ID 0,4mm	

2.1.2 Versuchslösungen

2.1.2.1 Phosphatpuffer (PBS)

Als Trägerlösung für die Immunhistochemie diente 0,1 M phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS). In 700 ml aqua bidest. wurden 8 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat und 0,28 g Kaliumdihydrogenphosphat gelöst. Anschließend erfolgte die Auffüllung der Lösung mit aqua bidest. auf 1000 ml und Titration des pH-Werts auf 7,4.

2.1.2.2 Natrium-Citrat Lösung

Als Trägerlösung für Streptozotocin bzw. zur Injektion für Tiere der Kontrollgruppe diente 0,1 M Natrium-Citrat Lösung. In 500 ml aqua bidest. wurden 1,47 g Natrium-Citrat gelöst.

2.1.2.3 Streptozotocin

Zur Induktion eines Diabetes mellitus im Tiermodell wurde Streptozotocin eingesetzt. Als N-Nitrosoverbindung fungiert Streptozotocin als NO-Gruppen Donator mit selektiv toxischer Wirkung auf die β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas.

In 1 ml Natriumcitrat-Lösung wurden 14 mg Streptozotocin gelöst. Lagerung und Verwendung der Lösung erfolgten lichtgeschützt.

2.1.2.4 Artificielle Cerebrospinalflüssigkeit (aCSF)-Trägerlösung

Als Trägerlösung für die intrathekale Applikation der Wachstumsfaktoren NGF und IGF1 sowie für Calphostin C diente artificielle Cerebrospinalflüssigkeit (artificial cerebrospinal fluid, aCSF). Für Details siehe (Hirata et al., 1997).

Es wurden 122 mM Natriumchlorid (NaCl), 3,1 mM Kaliumchlorid (KCl), 5 mM Natriumhydrogencarbonat (NaHCO₃), 0,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄), 1,3 mM Calciumchlorid (CaCl₂), 1 mM Magnesiumsulfat (MgSO₄) und 10 mM D-Glucose in aqua bidest. gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Zusätzlich wurden der Lösung 1 mg/ml Rattenserumalbumin (RSA) zugefügt. Rattenserumalbumin verhindert die Adhäsion von Wachstumsfaktoren und Calphostin C am polyethylenhaltigen Katheter.

2.1.2.5 Fixierlösung

Zur Fixierung der Gewebe wurden Paraformaldehyd und Pikrinsäure in aqua bidest. gelöst. Paraformaldehyd bewirkt durch Bildung von Methylen-Brücken die Stabilisierung der Zellmembranen und dient somit dem Erhalt der Zellmorphologie. Pikrinsäure denaturiert Aminosäuren unter Bildung von Pikrat.

In 700 ml aqua bidest. wurden zunächst 40 g Paraformaldehyd unter Erwärmung bei 65°C gelöst. Aufgrund der schlechten Löslichkeit von PFA wurden 500 µl 1 M Natriumhydroxidlösung zugesetzt. Dies führte zum Aufklaren der Lösung. Nach Abkühlen auf <25°C erfolgte die Zugabe von 2 ml Pikrinsäure. Anschließend wurde die Fixierlösung mit aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt und es erfolgte die Titration des pH-Werts auf 7,4. Aufgrund des Entweichens formalinhaltiger Dämpfe wurden sämtliche Arbeitsschritte unter dem Abzug durchgeführt.

2.1.2.6 Saccharoselösung

Zur Dehydratation der untersuchten neuronalen Gewebe wurde 10%ige Saccharose-Lösung verwendet. Aufgrund seiner antibakteriellen und fungiziden Wirkung wurde Thimerosal zugesetzt. In 10 ml PBS wurden 1 g Saccharose und 0,005 mg Thimerosal gelöst.

2.1.2.7 Blockierungslösung

Die Blockierungslösung wurde auf PBS-Grundlage hergestellt und enthielt zusätzlich Triton, Rinderserumalbumin (BSA), Ziegenserum (normal goat serum, NGS) und Eselserum (normal donkey serum, NDS). Triton bewirkt hierbei als Detergenz eine Erhöhung der Membranpermeabilität, die Sera blockieren unspezifische Immunfärbungen. 15 ml PBS wurden 45 µl Triton X-100, sowie 1 ml BSA, 1 ml NGS und 1 ml NDS zugefügt.

2.1.3 Versuchstiere

Als Versuchstiere für die Immunhistochemie dienten männliche Wistar-Ratten aus der Zucht der FEM der Charité Universitätsmedizin Berlin mit einem Gewicht von 180-220 g. Die Haltung erfolgte in Makrolon-Käfigen Typ IV bei einem zirkadianen Rhythmus von 12 Stunden (Lichtphase von 07.00-19.00 Uhr), einer Raumtemperatur von $22 \pm 0,5^\circ \text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von 60-65%. Die Tiere erhielten Wasser und Standard-Trockenfutter (Sniff Alleinfutter) ad libitum. Aufgrund des induzierten Diabetes mellitus mit konsekutiver Polyurie bei gleichzeitiger Vernachlässigung der Fellpflege durch die Tiere erfolgte der Wechsel der Käfigeinstreu (Käfigeinstreu fein, Jelu-Werk) täglich. Das Versuchsvorhaben wurde durch die Tierschutzkommission des Landesamtes für Gesundheit und technische Sicherheit genehmigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell

2.2.1.1 Narkose

Alle Eingriffe an Versuchstieren erfolgten in Narkose mit Isofluran. Isofluran ist ein volatiles Anästhetikum mit guten hypnotischen Eigenschaften. Für Kurznarkosen sowie zur Einleitung längerer Eingriffe wurden die Tiere bis zum Eintritt der Anästhesie in einen mit Isofluran getränktem Zellstoff bestückten Narkosetopf aus Glas gesetzt. Bei längeren Eingriffen erfolgte die Aufrechterhaltung der Narkose mittels Narkoseapparat unter O₂-Fluss von 0,7 l/min und Beimischung von 3% Isofluran. Den Tieren wurde hierzu ein Plastikröhrchen als Maske über Mund und Nase gestülpt.

2.2.1.2 Induktion des Diabetes mellitus mit Streptozotocin

Grundlage aller Versuche war zunächst die Induktion eines Diabetes mellitus im Tiermodell. Zur Induktion des Diabetes mellitus erhielten die Versuchstiere jeweils eine Injektion von 200 µl Streptozotocin in Natriumcitrat-Lösung ($\hat{=}$ 45 mg STZ/kg KG). Die Injektion erfolgte in eine Schwanzvene im proximalen Drittel. Kontrolltiere erhielten eine volumenmäßig äquivalente Injektion mit Vehikellösung.

2.2.1.3 Messung des Blutglucosegehaltes

Sieben Tage nach Injektion von Streptozotocin erfolgte die Messung des Blutglucosegehaltes. Mit Hilfe einer sterilen Kanüle wurde aus einer Vene am Schwanz ein Tropfen Blut entnommen und auf einen Glucoseteststreifen aufgebracht. Als diabetisch wurden hierbei Tiere gewertet, deren Blutglucosegehalt einen Wert \geq 300 mg/dl aufwies.

2.2.1.4 Applikation von NGF/IGF1

Die Applikation der Wachstumsfaktoren NGF und IGF1 erfolgte durch kontinuierliche intrathekale Infusion über die zuvor implantierte Minipumpe. Für Details siehe (Schmitt et al., 2003). Die Behandlung mit dem Wachstumsfaktor erfolgte jeweils sieben Tage vor Erreichen des Untersuchungszeitpunkts (vier, acht und 12 Wochen). NGF-Lösung wurde in einer Konzentration von 125 ng/µl bei einer konstanten Infusionsrate von 1 µl/h über 7 Tage appliziert. Die insgesamt applizierte Menge NGF betrug somit 21 µg/Tier. Im Anschluss an die kontinuierliche Gabe des Neurotrophins erfolgten Perfusion und Gewebeentnahme.

Die Applikation von IGF1 erfolgte entsprechend dem Zeitschema von NGF mit einer Konzentration der IGF1-Lösung von 0,5 µg/ml. Dies entspricht einer Gesamtmenge von 84 µg/Tier. Tiere der Kontrollgruppen erhielten eine äquivalente Infusionsmenge mit Trägerlösung (aCSF + RSA).

2.2.1.5 Applikation von Calphostin C

Der PKC-Inhibitor Calphostin C wurde sowohl intrathekal als auch subkutan appliziert. Für die intrathekale Injektion wurde Calphostin C in Trägerlösung (aCSF) in einer Konzentration von 50 ng/ μ l gelöst. Tiere der Verumgruppe erhielten jeweils 10 μ l. Dies entspricht einer Gesamtmenge von 500 ng/Tier. Für die subkutane Injektion wurde Calphostin C in einer Konzentration von 5 ng/ μ l in 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst. Hiervon wurden pro Tier 100 μ l appliziert, entsprechend einer Gesamtgabe pro Tier von 500 ng. Beide Applikation erfolgten jeweils parallel.

2.2.1.6 Gewebeentnahme

Die Versuchstiere erhielten eine tiefe Narkose mit Isofluran. Zur Entfernung des Bluts aus dem Gefäßsystem erhielten die Tiere zunächst eine Perfusion mit 150 ml PBS, anschließend erfolgte die Perfusion mit 350 ml Fixierlösung bis zum Eintritt der vollständigen Fixierung. Die Perfusionsgeschwindigkeit betrug jeweils 60 ml/min.

Nach Abschluss der Fixierung erfolgte die Entnahme des Rückenmarks, der Spinalganglien von L3-L5, des N.ischiadicus, sowie des plantarseitigen subkutanen Pfortengewebes. Der N. ischiadicus war zur besseren Beurteilbarkeit des anterograden axonalen Transports zuvor nach chirurgischer Darstellung mittels fester Ligatur für 24 Stunden ligiert worden.

2.2.2 Immunhistochemie

2.2.2.1 Beschichtung der Objektträger

Als Objektträger für die Immunhistochemie dienten Standard-Glasobjektträger 76x26 mm. Die Objektträger wurden gelatinebeschichtet. Chromalaun diente zum Härten der Gelatine. In 200 ml aqua bidest. wurden 1,0 g Gelatine aus Rinderhaut, sowie 0,1 g Kaliumchromsulfat (Chromalaun) gelöst. Anschließend wurden die Objektträger in die Lösung eingetaucht und bei 37°C im Wärmeschrank getrocknet.

2.2.2.2 Herstellung der Gewebeschnitte

Die Herstellung der Schnitte erfolgte mit Hilfe eines Kryotoms. Spinalganglien, N. ischiadicus und subkutanes Pfortengewebe wurden jeweils 9 µm dick geschnitten und direkt auf gelatinebeschichtete Objektträger aufgenommen. Rückenmarksschnitte wurden 20 µm dick geschnitten, in PBS überführt und als floating-sections weiterverarbeitet. Die Lagerung der Gewebeschnitte erfolgte bei -18°C im Gefrierschrank unter Zugabe von Blaugel zur Bindung von Kondensat.

2.2.2.3 Immunhistochemische Anfärbung

Für die im Folgenden beschriebenen immunhistochemischen Färbungen wurde das Verfahren der indirekten Immunfluoreszenz gewählt. Hierbei wird zunächst ein primärer Antikörper eingesetzt, der an antigene Epitope im zu untersuchenden Gewebe bindet. Gegen diesen primären Antikörper wird ein sekundärer, fluoreszenzmarkierter Antikörper eingesetzt (siehe Abb. 2.1). Dabei müssen die beiden Primärantikörper bei gleichzeitigem Einsatz zum Nachweis von Co-Lokalisationen aus unterschiedlichen Spezies stammen.

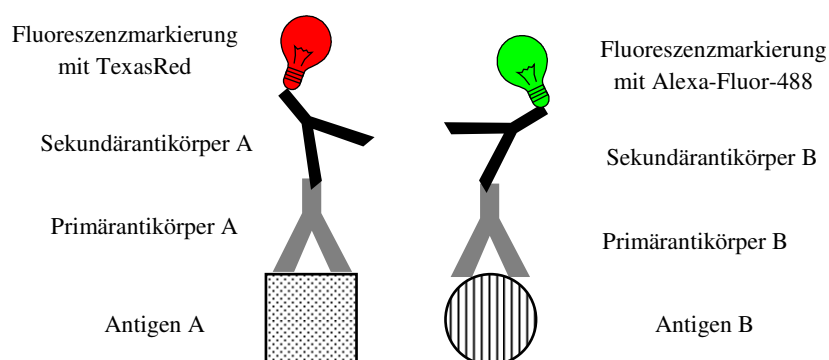


Abbildung 2.1. Funktionsweise der immunhistochemischen Anfärbung eines oder mehrerer Epitope mit Primärantikörper und fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper.

Zum Nachweis der Spezifität der immunhistochemischen Färbungen wurden sowohl Positiv- als auch Negativkontrollen durchgeführt. Für Positivkontrollen wurden synthetische Antigenpeptide 24 Stunden bei 4°C mit den eingesetzten Primärantikörpern inkubiert. Neaktivkontrollen erfolgten durch Weglassen des primären oder sekundären Antikörpers.

2.2.2.3.1 Allgemeines Protokoll zur immunhistochemischen Färbung

Dieses Protokoll beschreibt das allgemeine Protokoll der in dieser Arbeit angewandten immunhistochemischen Färbungen gegen verschiedene Antigene im Versuchstier. Nähere Beschreibungen der einzelnen Färbungen finden sich in den nachfolgenden Abschnitten.

Zu Beginn des Verfahrens wurden die Präparate 45 Minuten mit PBS auf dem Magnetrührer gewaschen. Nach 15 Minuten erfolgte jeweils ein Wechsel des Waschpuffers. Nach dem Waschen wurden die Präparate mit Blockierungslösung versetzt und 60 Minuten auf dem Horizontalschütteler gehalten. Das in der Blockierungslösung enthaltene Rinderserumalbumin (BSA), das Eselserum (NDS) und das Ziegenserum (NGS) bewirken die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen. Das ebenfalls zugesetzte Triton X-100 steigert als Detergenz die Membranpermeabilität und verbessert somit die Antigen-Antikörper-Reaktion.

Im Anschluss hieran erfolgte die Inkubation der Präparate mit einem oder mehreren Primärantikörpern in einer Verdünnung von jeweils 1:1000 auf dem Horizontalschütteler für 24 Stunden. Nach Abschluss der Inkubation wurden durch 60-minütiges Waschen auf dem Magnetrührer die nichtgebundenen Antikörper entfernt. Hierbei erfolgte der Wechsel des Waschpuffers jeweils nach 15 Minuten.

Zur Darstellung der gebildeten Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte nun die Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern gegen die eingesetzten Primärantikörper in der Konzentration 1:500. Hierbei kamen entweder TexasRed (rote Fluoreszenz, 605 nm) oder Alexa-Fluor-488 (grüne Fluoreszenz, 519 nm) zum Einsatz. Im Anschluss an die 45-minütige Inkubation wurde erneut 15 Minuten gewaschen, der Wechsel des Waschpuffers fand alle fünf Minuten statt. Abschließend wurden vor Aufbringung des Deckglases zu dessen Fixierung 30 µl Mount Flour-Fixiermedium aufgetropft. Alle Arbeitsschritte fanden zwischen 20-25°C statt. Aufgrund der Lichtinstabilität der Fluoreszenzantikörper war der Raum abgedunkelt.

2.2.2.3.2 Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von MOR + CGRP

Die Färbung erfolgte nach unter 2.2.2.3.1 genanntem Protokoll für Spinalganglien und N. ischiadicus auf Objektträgern. Rückenmarksschnitte wurden mittels Floating-sections-Technik gefärbt. Hierbei schwimmen die Schnitte frei im Medium, wodurch eine gesteigerte Diffusion der verwendeten Antikörper erreicht und somit die Anfärbung verbessert werden kann.

Als Primärantikörper wurden Antikörpern gegen MOR (Kaninchen-anti-Ratte-MOR) und CGRP (Meerschweinchen-anti-Ratte-CGRP) eingesetzt. Nach Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte die Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern. MOR-Antigen-Antikörperkomplexe wurden hierbei durch den Einsatz von Texas-Red-Ziege-IgG gerichtet gegen Kaninchen-IgG, und CGRP-Antigen-Antikörperkomplexe durch Alexa-Flour-488-Ziege-IgG gerichtet gegen Meerschweinchen-IgG dargestellt.

Schnitte des subkutanen Pfortengewebes wurden nach Inkubation mit den Sekundärantikörpern und Waschung zusätzlich für 1 Minute mit 4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.1 µg/ml in PBS) gegengefärbt, wodurch die Zellkerne zur Darstellung kamen.

2.2.2.3.3 Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von MOR + PKC α

Die Färbung erfolgte nach dem allgemeinen Protokoll aus 2.2.2.3.1 an Schnitten von sensorischen Spinalganglien auf Objektträgern.

Als Primärantikörper wurden Antikörper gegen MOR (Kaninchen-anti-Ratte-MOR) und PKC α (Maus-anti-Ratte-PKC α) benutzt. Die Fluoreszenzmarkierung mit Sekundär-Antikörpern erfolgte für MOR durch Texas-Red-Ziege-IgG gerichtet gegen Kaninchen-IgG und für PKC α durch Alexa-Flour-488-Ziege-IgG gerichtet gegen Maus-IgG.

2.2.2.3.4 Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von phosphorylierten MOR

Die Färbung von phosphorylierten MOR erfolgte an Schnitten von sensorischen Spinalganglien nach dem allgemeinen Protokoll aus 2.2.2.3.1.

Zur Darstellung phosphorylierter MOR wurde als Primärantikörper Kaninchen-anti-Ratten-IgG gegen phospho-MOR benutzt. Nach Antigen-Antikörperkomplexbildung wurden diese mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper Texas-Red-Ziege-IgG gegen Kaninchen-IgG gegengefärbt.

2.2.2.3.5 Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von PGP-9.5

Die Färbung von PGP-9.5 folgt im Allgemeinen der Beschreibung aus 2.2.2.3.1. Es kam nur der Antikörper gegen PGP-9.5 zum Einsatz. Die Darstellung dieses Proteins erfolgte mittels

Primärantikörper Huhn-anti-Ratte-PGP-9.5. Als fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper diente Alexa-fluor-488-Ziege-IgG gegen Huhn-IgG. Nach Inkubation mit dem Sekundärantikörper und nachfolgender Waschung wurde für 1 Minute mit 4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) (0.1 µg/ml in PBS) gegengefärbt, wodurch die Zellkerne dargestellt wurden.

2.2.3 Auswertung

2.2.3.1 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung der immunhistochemischen Anfärbungen erfolgte am Laser Scanning Mikroskop LSM 510 (Carl Zeiss AG). Der Vorteil dieses konfokalen Mikroskops gegenüber einem konventionellen Lichtmikroskop liegt in der Erstellung überlagerungsfreier Bilder durch Fokussierung des Anregungslichts auf lediglich eine Ebene im Präparat.

Die Anregung der Fluorochrome erfolgt durch Einstrahlung von Laserlicht verschiedener Wellenlängen. Details siehe Tab. 2.2.

Fluorochrom	Exzitationswellenlänge	Emissionswellenlänge	Lasermodule
DAPI	364 nm	454 nm	UV-Diodenlaser 405 nm
TexasRed	596 nm	615 nm	HeNe-Laser 543 nm
Alexa-Fluor-488	495 nm	519 nm	ArKr-Laser 488 nm

Tabelle 2.2: Einstellung des konfokalen Mikroskops LSM 510 zur Detektion der eingesetzten Fluorochrome. (Abkürzungen: HeNe=Helium-Neon; ArKr=Argon-Krypton)

2.2.3.2 Auswertung der Rückenmarksschnitte

Rückenmarksschnitte wurden mittels Bildbearbeitungssoftware des Laser-Scanning-Mikroskops LSM 510 Version 3.2 ausgewertet.

Das immunreaktive Areal sowohl von MOR-positiven als auch von CGRP-positiven Fasern findet sich in den Hinterhörnern des Rückenmarks im Bereich der Laminae I-II. Gegenstand der Untersuchungen war zum einen die Fläche des immunreaktiven Areals, zum andern die

Intensität der Immunfluoreszenz (arbitrary light units, ALU) von MOR und CGRP. Die Ermittlung der Parameter geschah wie folgt: Der Untersucher hatte zunächst die Möglichkeit, einen Schwellenwert für ein Fluoreszenzsignal individuell festzulegen (s. Abb. 2.3). Erreichte ein Fluoreszenzsignal diesen Schwellenwert, wurde es als positiv gewertet. Hierdurch erfolgte die Ausblendung unspezifischer Hintergrundfluoreszenz, die andernfalls mitgerechnet würde. Im Ergebnis erfolgte die rechnerische Ausgabe von (a) einer mittleren Intensität der Immunfluoreszenz (mittlere optische Dichte), sowie (b) einer Fläche errechnet aus der Summe der positiven Fluoreszenzsignale.

Für sämtliche Schnitte der Kontrollgruppe wurde zunächst jeweils ein individueller Schwellenwert sowohl für MOR als auch für CGRP ermittelt, der die Hintergrundfluoreszenz ausblendete, so dass das immunreaktive Areal sämtlich im Hinterhorn zu finden war. Die Schwellenwerte der Kontrollgruppe wurden gemittelt und auf die Verum-Gruppen angewandt. Pro Gruppe wurden 16 Schnitte untersucht.

Die Ergebnisse sämtlicher Gruppen wurden zur besseren Darstellbarkeit in Prozentränge umgerechnet wobei der Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe = 100% gesetzt wurde.

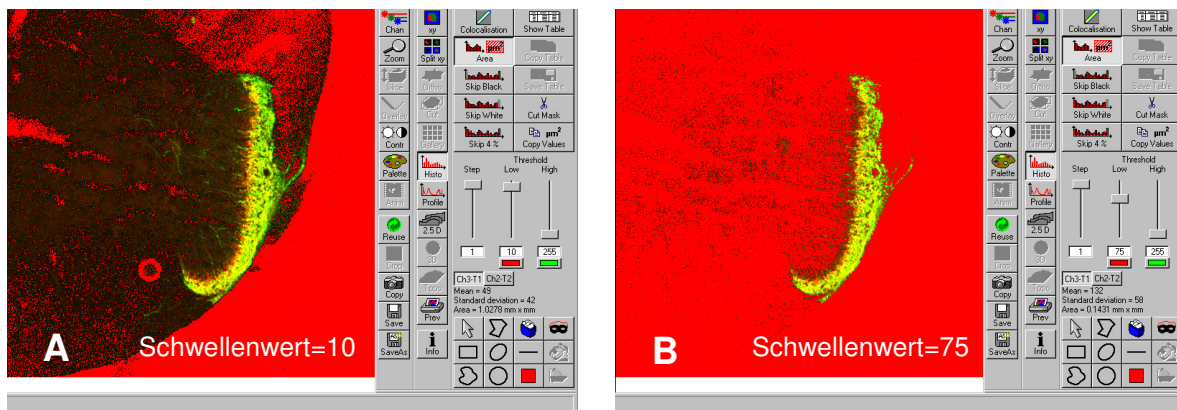


Abbildung 2.3: Bestimmung des MOR/CGRP-positiven Areals. Beispielhafte Darstellung der Ermittlung des individuellen Schwellenwerts für Schnitte der Kontrollgruppen. (A) zeigt bei einem Schwellenwert von 10 neben dem immunreaktiven Hinterhorn (gelbe Fluoreszenz) eine deutliche Mitgewichtung des umgebenden Gewebes (dunkles Areal), während in (B) bei einem Schwellenwert von 75 das umgebende Gewebe näherungsweise ausgeblendet ist.

2.2.3.3 Auswertung der Schnitte durch Spinalganglien

In der frühen Phase erfolgten zur Quantifizierung der pMOR deren Auszählung sowie die Auszählung der Gesamtzahl der Neurone im Spinalganglion mit anschließender Quotientenbildung. Als Resultat ergab sich der Anteil von pMOR an der Gesamtzahl der Neurone.

Bei der Auswertung der Spinalganglien mit immunhistochemischer Färbung von PKC α wurde wie folgt verfahren: Es erfolgte die Auszählung der MOR-positiven Neurone sowie die Auszählung jener Neurone, die zusätzlich zu MOR eine PKC α -Co-Lokalisation aufwiesen. Das dargestellte Ergebnis zeigt einen Quotienten aus MOR+PKC- α -Co-Lokalisation bezogen auf die Gesamtzahl MOR-positiver Neurone.

Zur Quantifizierung der MOR- bzw. CGRP-positiven Neurone in Spinalganglien in der späten Phase erfolgte die Auszählung der Gesamtzahl der Neurone und anschließend die Auszählung der MOR- bzw. CGRP-positiven Neurone. Aus diesen Daten wurde der Quotient aus MOR-positiven Neuronen/Gesamtzahl der Neurone, bzw. CGRP-positiven Neurone/Gesamtzahl der Neurone gebildet.

Zur besseren Darstellbarkeit wurden alle Ergebnisse mit Ausnahme der PKC α -Färbung abschließend in Prozentränge umgerechnet, wobei der Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe = 100% gesetzt wurde. Pro Gruppe wurden 16 Schnitte von jeweils fünf Tieren ausgezählt. Die Auszählung erfolgte für den Untersucher verblindet. Als Viewer diente der Zeiss LSM Image Browser 4.2.0.121.

2.2.3.4 Auswertung der Schnitte des N. ischiadicus nach Ligatur

N. ischiadicus-Schnitte wurden proximal der Ligatur ausgewertet. Als Software zum Ausmessen des MOR-/CGRP-positiven Areal diente die Bildbearbeitungssoftware des Laser-Scanning-Mikroskops LSM 510 Version 3.2. Das immunoreaktive Areal wurde jeweils manuell markiert und die Ausgabe der Ergebnisse erfolgte als (a) mittlere Intensität der Immunfluoreszenz (mittlere optische Dichte), sowie (b) eine Fläche errechnet aus der Summe der positiven Fluoreszenzsignale. Alle Ergebnisse wurden zur besseren Darstellbarkeit in Prozentränge umgerechnet, wobei der Mittelwert der Kontrollgruppen jeweils = 100% gesetzt wurde. Die Auswertung der Schnitte erfolgte für den Untersucher verblindet. Pro Gruppe wurden 12 Schnitte ausgewertet.

2.2.3.5 Auswertung der Schnitte durch subkutanes Pfortengewebe

Im subkutanen Pfortengewebe wurden die in die Epidermis einsprießenden MOR-/CGRP-positiven sensiblen Nervenfasern distal des Übergangs zwischen Dermis und Epidermis quantifiziert. Die Auszählung erfolgte als Anzahl Nervenfasern/Gesichtsfeld. Die Ergebnisse wurden zur anschaulicheren Darstellung in Prozenträge umgerechnet, wobei der Mittelwert der jeweiligen Kontrollgruppe = 100% gesetzt wurde.

Bei der immunhistochemischen Färbung von PGP-9.5 wurde analog hierzu verfahren. Die Auszählung erfolgte für den Untersucher verblindet. Pro Gruppe wurden 12 Schnitte ausgewertet. Als Viewer diente der Zeiss LSM Image Browser 4.2.0.121.

2.2.3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit SigmaStat Version 3.5. Als Test für unverbundene normalverteilte Daten diente die One-Way-ANOVA, als post-hoc Test Duncan's Multiple Range. Als Test für nicht-normalverteilte Daten diente die ANOVA on ranks mit Dunn's post-hoc Test. Als signifikant gewertet wurden Unterschiede mit $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, Veränderungen und mögliche Regulationsmechanismen der Expression von Opioidrezeptoren in sensorischen Neuronen von Tieren mit diabetischer Polyneuropathie zu identifizieren. Hierzu erhielten männliche Wistar-Ratten eine i.v. Injektion von STZ. Die Tiere entwickelten daraufhin einen Diabetes mellitus mit typischen Symptomen wie Hyperglykämie, Polyurie und Polydipsie sowie einer vermehrten Schmerzempfindlichkeit im Kontext einer peripheren Polyneuropathie.

In einer späten Phase erfolgte immunhistochemisch der Nachweis von MOR, CGRP und PGP-9.5, die von sensiblen Neuronen exprimiert werden. In der frühen Phase erfolgte der Nachweis von PKC α und phosphorylierten MOR.

3.1 Späte Phase eines STZ-induzierten Diabetes mellitus

3.1.1 NGF-Gruppe

In der späten Phase des STZ induzierten Diabetes wurden mittels Doppelfärbung MOR-immunoreaktive (MOR-ir) und CGRP-immunoreaktive (CGRP-ir) Neurone identifiziert. Eine Übersicht über die untersuchten Gewebearten gibt Tabelle 3.1.

Tabelle 3.1: Entnommene und untersuchte Gewebearten von Tieren mit STZ-induziertem Diabetes.

Behandlung	Rückenmark	Spinalganglion	N. ischiadicus	subkutanes Gewebe
control	✓	✓	✓	✓
diabetisch	✓	✓	✓	✓
diab. + NGF	✓	✓	✓	✓

diab. = diabetisch; NGF = Nerve growth factor

3.1.1.1 Hinterhorn des Rückenmarks

Im Hinterhorn des Rückenmarks (Rexed Laminae I+II) ließen sich aus der Peripherie eintreffende Nervenfasern als MOR-ir und CGRP-ir identifizieren. Die STZ-Induktion eines

Diabetes mellitus führte nach 4 Wochen noch nicht zu einem signifikanten Rückgang des MOR-ir Areal verglichen mit der Kontrollgruppe. Der Rückgang setzte sich jedoch im weiteren zeitlichen Verlauf fort und zeigte sowohl nach 8 als auch nach 12 Wochen signifikante Werte (prozentualer Mittelwert ir-Fläche bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 5,06$ vs. $77,66 \pm 8,84$ [W4] vs. $74,76 \pm 2,18$ [W8] vs. $55,12 \pm 3,67$ [W12]). Die i.t. Gabe von NGF verhinderte die Abnahme und bewirkte einen signifikanten Anstieg des immunreaktiven Areal zu allen drei Zeitpunkten ($114,42 \pm 10,4$ [W4], $92,38 \pm 5,78$ [W8], $86,04 \pm 8,12$ [W12], siehe Abb. 3.1A).

Einen signifikanten Rückgang zeigte auch die Intensität der MOR-spezifischen Immunfluoreszenz. Nach einem initialen Rückgang blieb die Intensität jedoch im Verlauf konstant (prozentualer Mittelwert Intensität bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 2,06$ vs. $91,21 \pm 2,27$ [W4] vs. $90,21 \pm 1,13$ [W8] vs. $89,9 \pm 1,4$ [W12]). Nach Applikation von NGF konnten im Vergleich zur jeweiligen diabetischen Gruppe eine signifikante Steigerung der Intensität erreicht werden ($99,78 \pm 1,66$ [W4], $94,11 \pm 1,17$ [W8], $96,26 \pm 1,44$ [W12], s. Abb. 3.1B).

Die Co-Lokalisation MOR-ir Neurone mit dem für sensorische Neurone spezifischen Neuropeptid CGRP zeigte, dass die Mehrheit der MOR-ir Neurone sich präsynaptisch auf den zentralen Nervenendigungen eintreffender sensorischer Neurone befanden. Das CGRP-ir Areal zeigte sich signifikant vermindert in diabetischen Tieren gegenüber der Kontrolle zu allen Zeitpunkten. Im zeitlichen Verlauf nahm es weiter ab (prozentualer Mittelwert der immunreaktiven Fläche bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 6,83$ vs. $72,72 \pm 4,5$ [W4] vs. $64,27 \pm 3,25$ [W8] vs. $57,02 \pm 4,2$ [W12]). Die NGF-Gabe bewirkte eine signifikante Steigerung der immunreaktiven Fläche von CGRP ($79,35 \pm 1,69$ [W4], $92,73 \pm 5,89$ [W8], $87,97 \pm 4,47$ [W12], s. Abb. 3.2A).

Die Intensität der Fluoreszenz von CGRP nahm nach 4 Wochen signifikant ab und blieb im weiteren Verlauf unverändert (prozentualer Mittelwert Intensität bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 2,32$ vs. $91,03 \pm 2,45$ [W4] vs. $90,99 \pm 2,3$ [W8] vs. $88,96 \pm 2,67$ [W12]). Nach Applikation von NGF stiegen die Werte der Intensität zu allen Zeitpunkten signifikant an ($104,39 \pm 2,12$ [W4], $100,16 \pm 1,85$ [W8], $99,32 \pm 1,77$ [W12], siehe Abb. 3.2B).

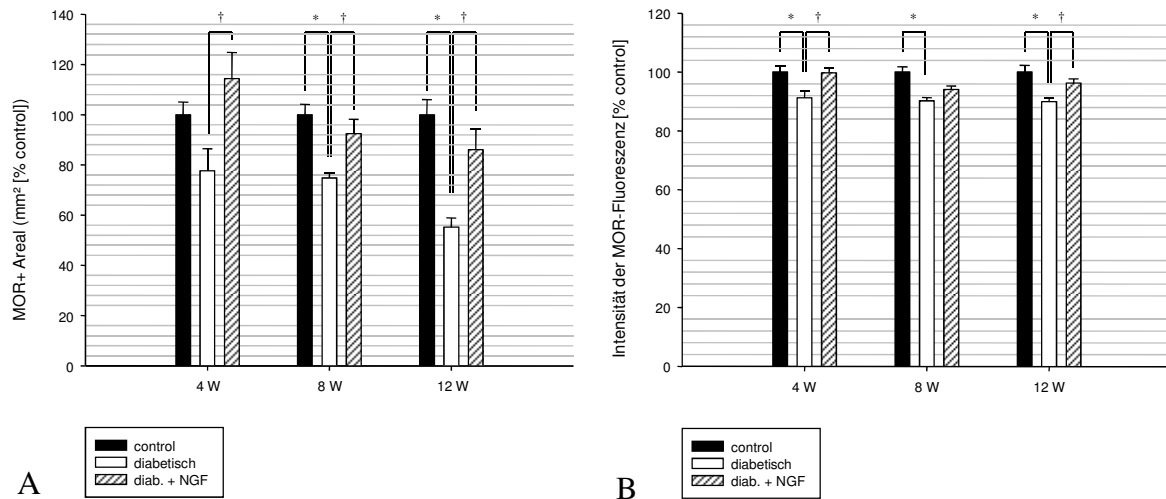


Abbildung 3.1: MOR-immunoreaktives Areal (A) und Intensität der MOR-Fluoreszenz (B) im Hinterhorn des Rückenmarks der Ratte. Noch nicht nach 4 Wochen, aber nach 8 und 12 Wochen zeigte sich ein signifikanter Rückgang des MOR-immunoreaktiven Areals (A) bei Tieren mit STZ-induziertem Diabetes mellitus. Die Effekte waren nach i.t. Gabe von NGF reversibel. Parallel zeigte sich auch ein signifikanter Rückgang der Intensität der MOR-Fluoreszenz (B) bei Tieren mit STZ-induziertem Diabetes mellitus. Zu den Zeitpunkten 4 und 12 Wochen war dieser Effekt nach i.t. Gabe von NGF reversibel. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + NGF (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

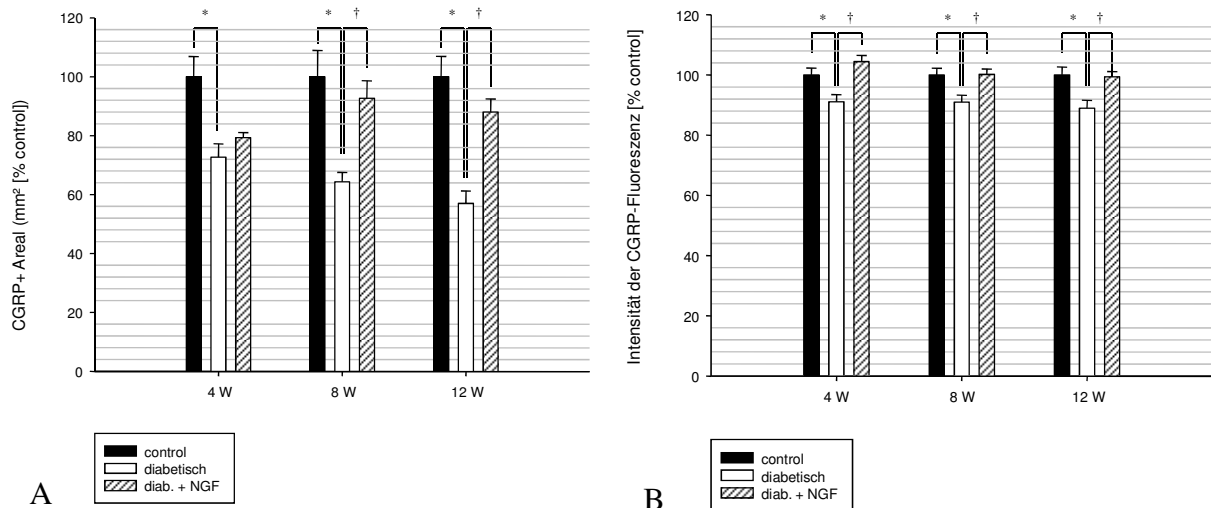


Abbildung 3.2: CGRP-immunoreaktives Areal (A) und Intensität der CGRP-Fluoreszenz (B) im Hinterhorn des Rückenmarks. Nach 4, 8 und 12 Wochen zeigte sich ein signifikanter Rückgang des CGRP-immunoreaktiven Areals bei Tieren mit STZ-induziertem Diabetes mellitus. Dieser Effekt war nach i.t. Gabe von NFG zu den Zeitpunkten 8 und 12 Wochen reversibel. Auch bei der Betrachtung der Intensität von CGRP (B) zeigte sich zu allen

Zeitpunkten eine signifikante Reduktion bei Tieren mit STZ-induziertem Diabetes mellitus. Auch dieser Effekt war nach i.t. Gabe von NGF zu allen Zeitpunkten reversibel. Daten sind dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + NGF (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

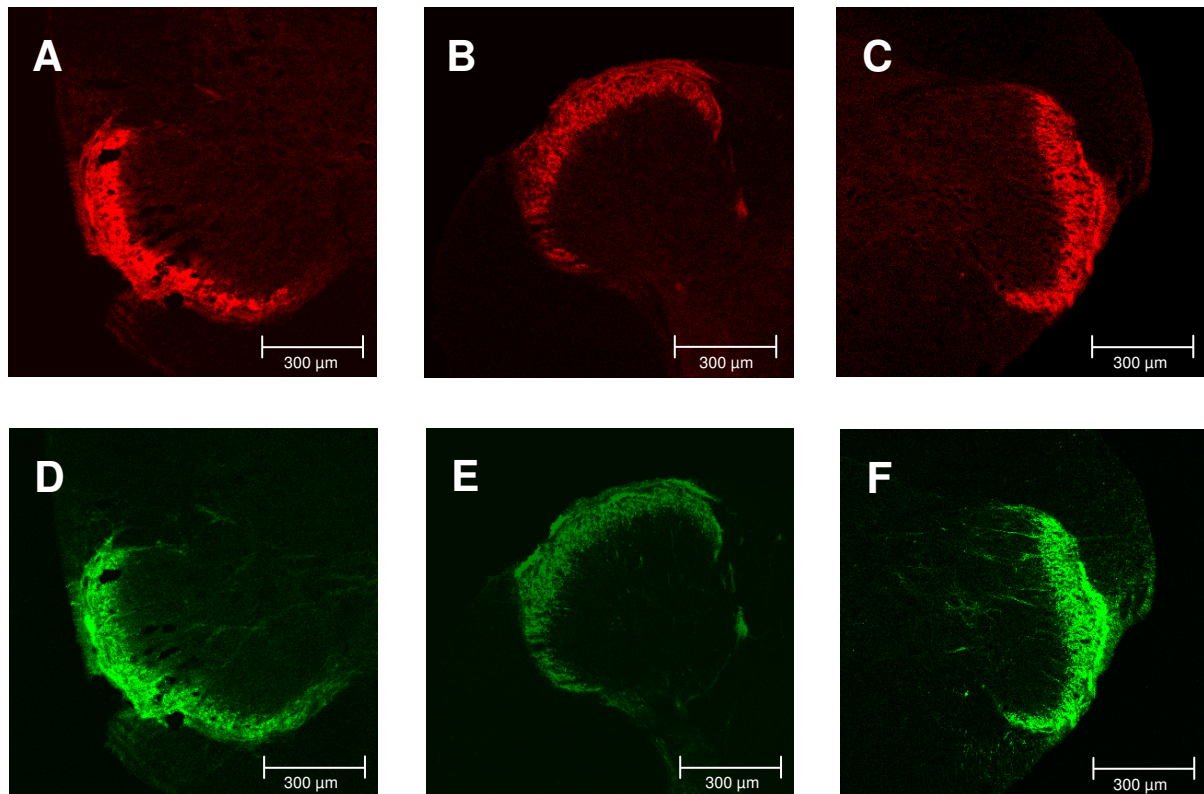


Abbildung 3.3: Immunreaktives Areal für MOR (A-C) und CGRP (D-F) im Hinterhorn des Rückenmarks auf Höhe der *Intumescentia lumbosacralis* L3-L5. (A) zeigt einen Querschnitt durch das Rückenmark eines Kontrolltieres. (B) zeigt den Querschnitt eines Rückenmarks 12 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus mit sichtbarer Reduktion des MOR-immunoreaktiven Areals (Texas red Fluoreszenz), die nach i.t. Gabe von NGF reversibel war (C). Die Immunreaktivität von CGRP (FITC green Fluoreszenz) des diabetischen Tiers (E) war ebenfalls deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe (D). Nach i.t. Gabe von NGF war dieser Effekt reversibel (F).

3.1.1.2 Sensible Spinalganglien (dorsal root ganglia, DRG)

In sensiblen Neuronen der Spinalganglien führte die STZ-Induktion eines Diabetes mellitus nach 4 Wochen nicht zu einer signifikanten Abnahme der MOR-ir Neurone. Nach 8 Wochen war der Rückgang signifikant und setzte sich zu 12 Wochen hin fort (prozentualer Mittelwert ir-Neurone

bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 6,81$ vs. $81,13 \pm 6,39$ [W4] vs. $70,13 \pm 7,61$ [W8] vs. $45,97 \pm 6,85$ [W12] siehe Abb. 3.4A).

Durch intrathekale Gabe von NGF waren die zuvor gesehenen Effekte reversibel ($129,15 \pm 4,81$ [W4], $144,72 \pm 5,64$ [W8], $126,54 \pm 6,21$ [W12], siehe Abb. 3.4A). Bei den CGRP-ir Neuronen zeigte sich bereits nach 4 Wochen ein signifikanter Rückgang, der sich bei 8 und 12 Wochen weiter fortsetzte (prozentualer Mittelwert ir-Neurone bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 5,31$ vs. $66,03 \pm 5,38$ [W4] vs. $58,76 \pm 3,3$ [W8] vs. $55,16 \pm 2,45$ [W12] siehe Abb. 3.4B). Nach Applikation von NGF konnte die Anzahl positiver Neurone bei 4, 8 und 12 Wochen wieder signifikant gesteigert werden ($111,32 \pm 7,81$ [W4], $109,81 \pm 5,17$ [W8], $101,74 \pm 7,68$ [W12], siehe Abb. 3.4B)

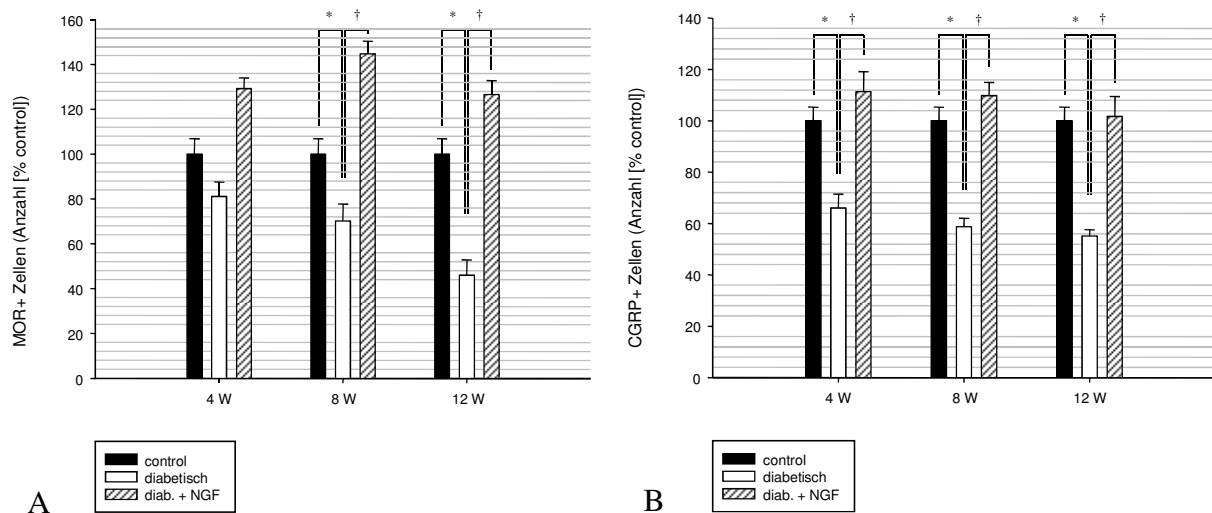


Abbildung 3.4: Anzahl MOR-positiver (A) und CGRP-positiver (B) Neurone im Spinalganglion. Zu den Zeitpunkten 8 und 12 Wochen nach Induktion eines Diabetes mellitus zeigt sich ein signifikanter Rückgang der MOR-ir Neurone im Spinalganglion (A). Bereits nach vier Wochen war eine Reduktion zu verzeichnen, die jedoch keine Signifikanz aufwies. Sämtliche diabetisch bedingten Veränderungen waren unter i.t. Gabe von NGF reversibel. Bei den CGRP-ir Neuronen (B) zeigte sich zu allen untersuchten Zeitpunkten eines STZ-induzierten Diabetes mellitus ein signifikanter Rückgang der Immunfluoreszenz im Spinalganglion mit zunehmender Progredienz. Nach i.t. Gabe von NGF waren diese Effekte vollständig reversibel. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + NGF (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

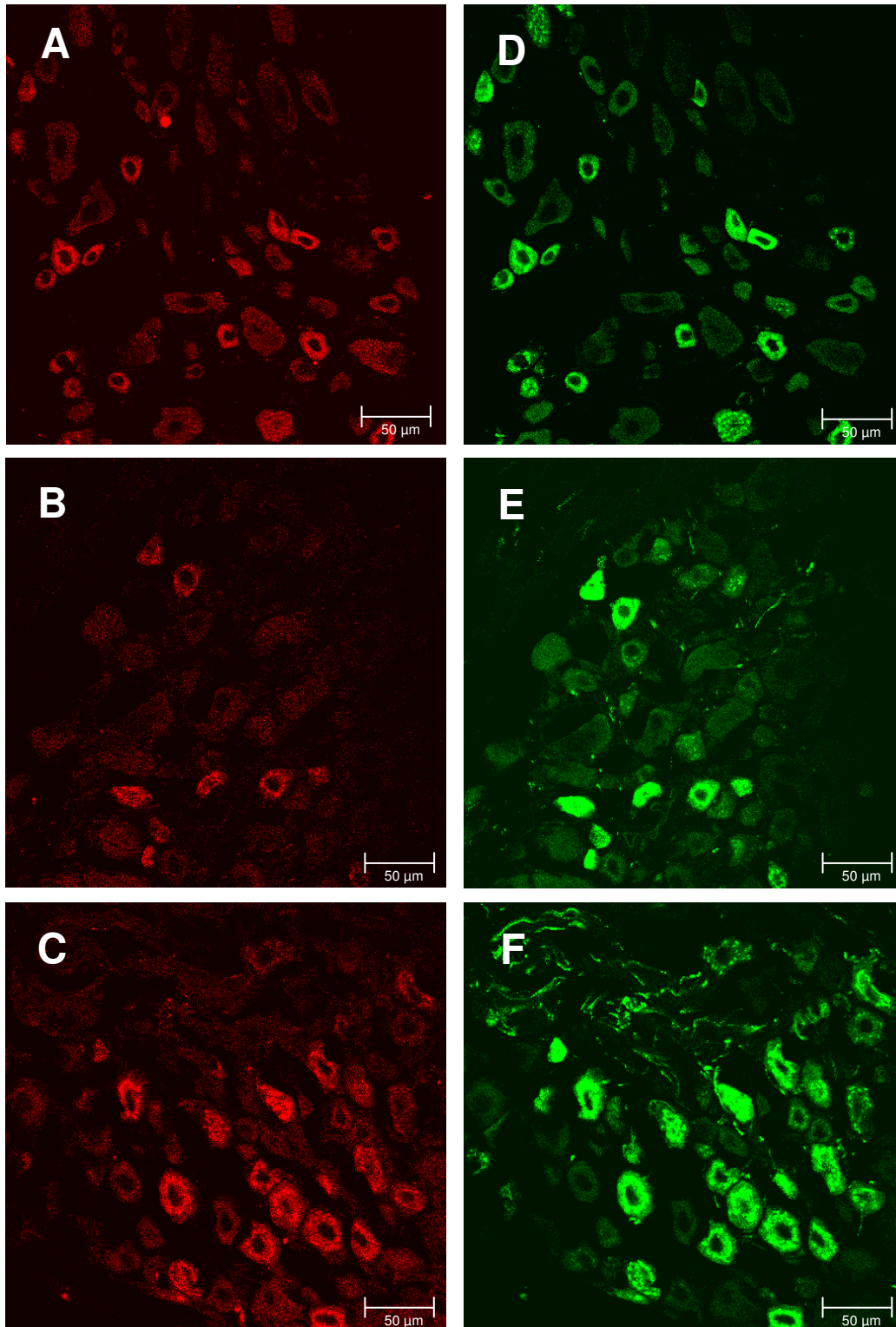


Abbildung 3.5: MOR-immunoreaktive (A-C) und CGRP-immunoreaktive Neurone (D-F) im Spinalganglion. Querschnitte durch Spinalganglien unbehandelter Kontrolltiere zeigten sowohl für MOR (A) als auch für CGRP (D) eine größere Anzahl immunoreaktiver Neurone als entsprechende Schnitte 12 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus (B, E). Nach i.t. Gabe von NGF waren MOR-immunoreaktive (C) und CGRP-immunoreaktive Neurone wieder vermehrt nachweisbar. Zur Darstellung kommen hauptsächlich kleine und mittelgroße Neurone.

3.1.1.3 Nervus ischiadicus

Im N. ischiadicus wurde der axonale Transport durch eine 24-stündige Ligatur unterbrochen. Dies bewirkte eine Akkumulation der normalerweise nach distal zum peripheren Nervenende hin transportierten MOR proximal der Ligatur. Diese Akkumulation war bei STZ-induziertem Diabetes mellitus signifikant geringer als bei unbehandelten Kontrolltieren und führte bereits 4 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus zu einer signifikanten Verringerung des MOR-ir Areal. Im zeitlichen Verlauf nahmen die Werte weiter ab (prozentualer Mittelwert ir-Fläche bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 6,05$ vs. $56,29 \pm 3,97$ [W4] vs. $51,86 \pm 3,4$ [W8] vs. $38,29 \pm 3,31$ [W12] siehe Abb. 3.6A). Nach NGF-Gabe stieg das MOR-ir Areal zu allen untersuchten Zeitpunkten wieder signifikant an ($102,14 \pm 6,19$ [W4], $78,68 \pm 4,17$ [W8], $70,07 \pm 2,79$ [W12], siehe Abb. 3.6A).

Die Intensität der Fluoreszenz von MOR unterlag im N. ischiadicus zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einer signifikanten Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe (prozentualer Mittelwert Intensität bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 9,44$ vs. $80,76 \pm 12,91$ [W4] vs. $83,28 \pm 8,74$ [W8] vs. $78,96 \pm 8,33$ [W12] siehe Abb. 3.6B). Nach NGF-Applikation konnte bei 8 und 12 Wochen eine signifikante Steigerung gegenüber diabetischen Tieren beobachtet werden ($114,2 \pm 11,02$ [W4], $174,76 \pm 10,01$ [W8], $112,72 \pm 4,77$ [W12], siehe Abb. 3.6B).

Das CGRP-ir Areal zeigte bei diabetischen Tieren ebenfalls signifikant niedrigere Werte als in unbehandelten Kontrolltieren (prozentualer Mittelwert ir-Fläche bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 7,58$ vs. $70,37 \pm 5,16$ [W4] vs. $57,79 \pm 3,72$ [W8] vs. $47,58 \pm 4,0$ [W12] siehe Abb. 3.7A). Nach NGF-Gabe stieg der Parameter wieder an und zeigt bei 4 und 12 Wochen einen signifikanten Unterschied ($94,2 \pm 6,7$ [W4], $69,1 \pm 3,17$ [W8], $78,7 \pm 3,88$ [W12], siehe Abb. 3.7A).

Die Intensität der CGRP-Fluoreszenz wies im N. ischiadicus diabetischer Tiere keine signifikante Reduktion gegenüber Kontrolltieren auf (prozentualer Mittelwert Intensität bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 6,81$ vs. $81,13 \pm 6,39$ [W4] vs. $77,91 \pm 18,71$ [W8] vs. $83,53 \pm 2,62$ [W12] siehe Abb. 3.7B). Signifikante Steigerungen nach NGF-Gabe konnten zu allen Zeitpunkten beobachtet werden ($125,3 \pm 10,55$ [W4], $147,79 \pm 2,55$ [W8], $151,23 \pm 7,84$ [W12], siehe Abb. 3.7B).

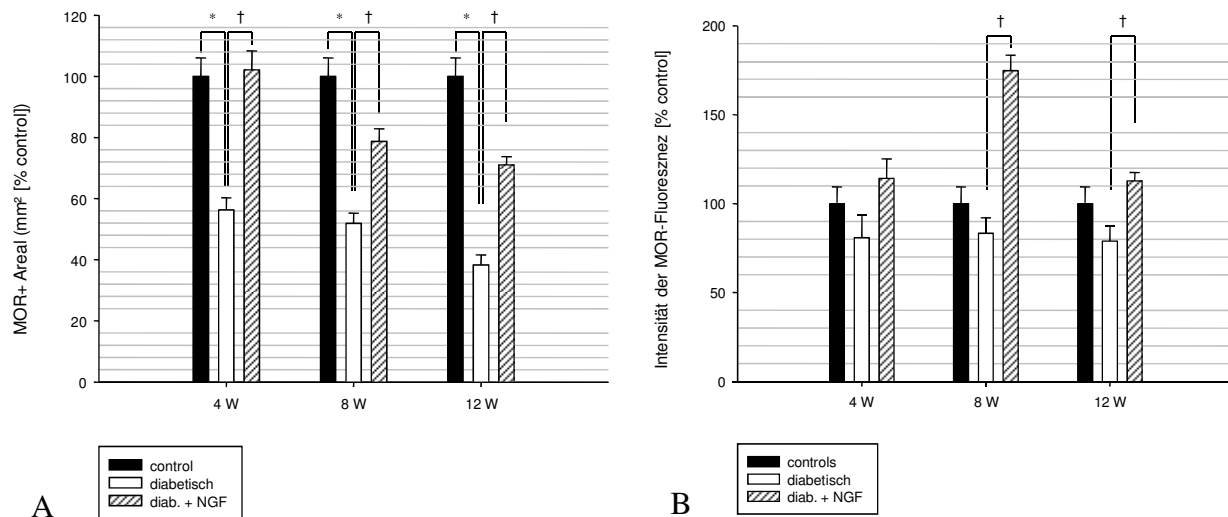


Abbildung 3.6: MOR-immunoreaktives Areal (A) und Intensität der Fluoreszenz von MOR (B) im proximalen N. ischiadicus. Der axonale Transport von MOR zum peripheren Nervenende wurde durch 24-stündige Ligatur unterbrochen. Bereits 4 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus zeigte sich eine signifikante Reduktion des MOR-ir Areal. Die Reduktion setzte sich bei 8 und 12 Wochen weiter fort und war nach i.t. Gabe von NGF vollständig reversibel. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte hingegen eine signifikante Abnahme der Intensität der MOR-Fluoreszenz beobachtet werden. Zu den Zeitpunkten 8 und 12 Wochen stieg die Intensität nach i.t. Gabe von NGF signifikant an. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) gezeigt. *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + NGF (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

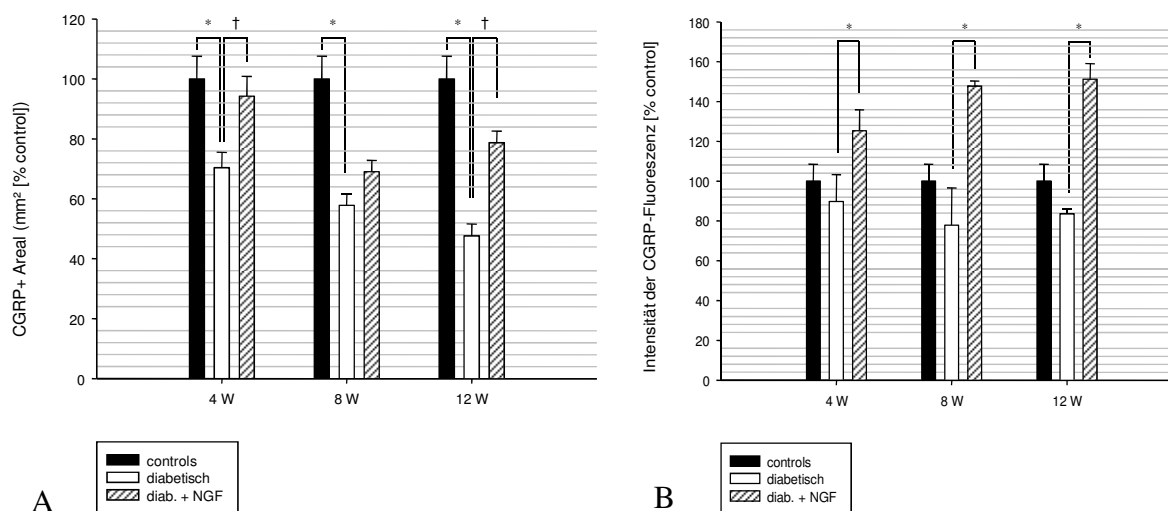


Abbildung 3.7: CGRP-immunoreaktives Areal (A) und Intensität der CGRP-Fluoreszenz (B) im proximalen N. ischiadicus. Der axonale Transport wurde durch Ligatur unterbrochen. Zu allen Zeitpunkten nach STZ-Induktion des Diabetes mellitus zeigte sich eine signifikante Abnahme des CGRP-immunoreaktiven Areal (A). Unter i.t. Applikation von NGF war bei 4

und 8 Wochen ein signifikanter Wiederanstieg zu beobachten. Die Intensität von CGRP (B) zeigte zu keinem der untersuchten Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied zwischen Kontrolltieren und Tieren mit Diabetes mellitus. Dennoch war nach NGF-Gabe zu allen drei Zeitpunkten eine signifikante Steigerung gegenüber der diabetischen Gruppe zu beobachten. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + NGF (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

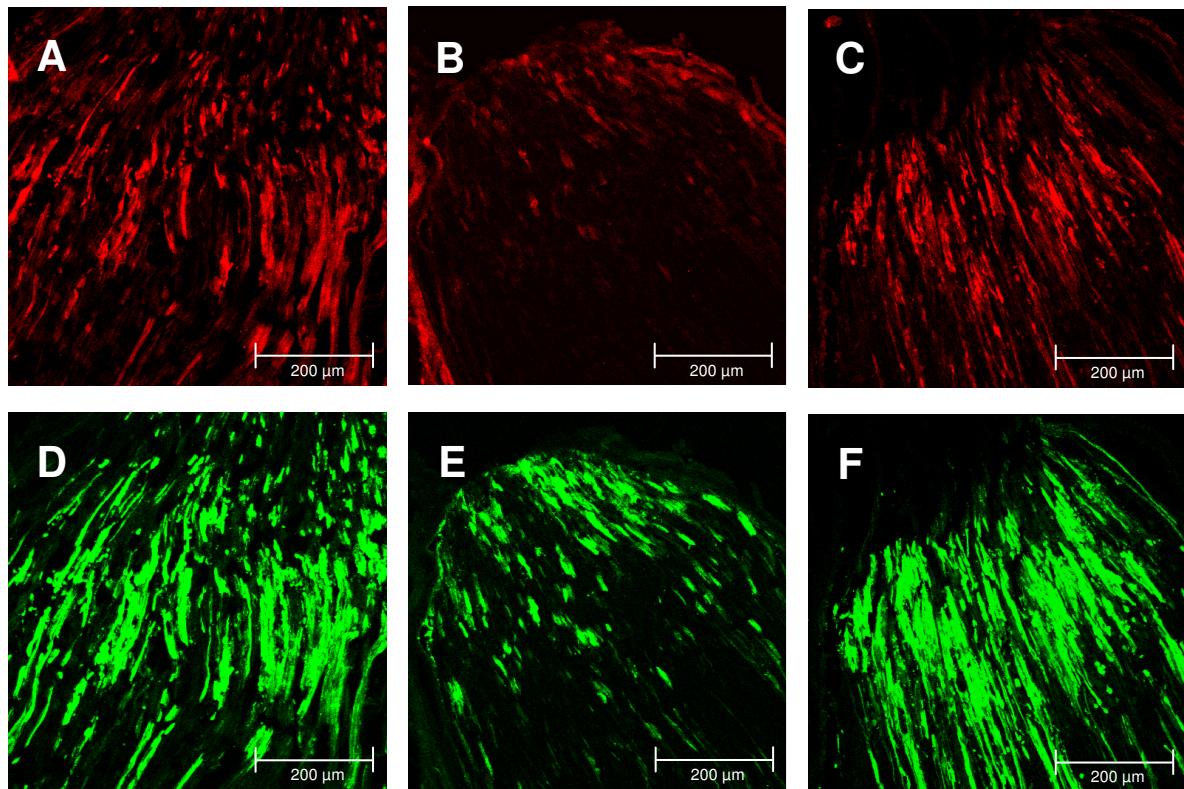


Abbildung 3.8: Immunhistochemische Darstellung von MOR (A-C) und CGRP (D-F) im proximalen N. ischiadicus nach Ligatur. MOR (Texas red Fluoreszenz) und CGRP (FITC green Fluoreszenz) kamen in unbehandelten Kontrolltieren (A,D) immunhistochemisch deutlich mehr zur Darstellung als bei Tieren mit STZ-induziertem Diabetes mellitus nach 12 Wochen (B,E). Nach i.t. Gabe von NGF nahm die Fluoreszenz sowohl von MOR als auch von CGRP wieder deutlich zu (C,F).

3.1.1.4 Subkutanes Pfortengewebe

In den tiefen Schichten der Epidermis finden sich aus der Dermis kommend die terminalen Fasern sensibler Nerven. Diese wurden distal des dermo-epidermalen Übergangs gezählt. Nach STZ-induziertem Diabetes mellitus ging die Anzahl MOR-ir Nervenfasern bereits nach 4 Wochen signifikant zurück. Diese Abnahme setzte sich bei 8 und 12 Wochen fort (prozentualer

Mittelwert immunoreaktiver-Fasern bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 6,27$ vs. $48,15 \pm 2,14$ [W4] vs. $37,04 \pm 6,76$ [W8] vs. $26,67 \pm 1,81$ [W12] siehe Abb. 3.9A). Nach NGF-Gabe stiegen die Werte signifikant an und erreichten annähernd Kontrollwerte ($112,37 \pm 14,87$ [W4], $107,41 \pm 4,78$ [W8], $90,37 \pm 6,79$ [W12], siehe Abb. 3.9A).

Auch die Zahl CGRP-ir Fasern verringerte sich bei diabetischen Tieren zu allen Zeitpunkten signifikant gegenüber Kontrolltieren (prozentualer Mittelwert immunoreaktiver-Fasern bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $100,0 \pm 7,05$ vs. $60,9 \pm 5,68$ [W4] vs. $54,14 \pm 1,84$ [W8] vs. $47,82 \pm 4,86$ [W12] siehe Abb. 3.9B). Die Abnahme war jedoch geringer ausgeprägt als bei MOR-ir Fasern. Nach Applikation von NGF konnte auch hier eine signifikante Steigerung zu allen drei Zeitpunkten erreicht werden ($100,0 \pm 10,18$ [W4], $89,1 \pm 4,56$ [W8], $79,4 \pm 3,93$ [W12], siehe Abb. 3.9B)

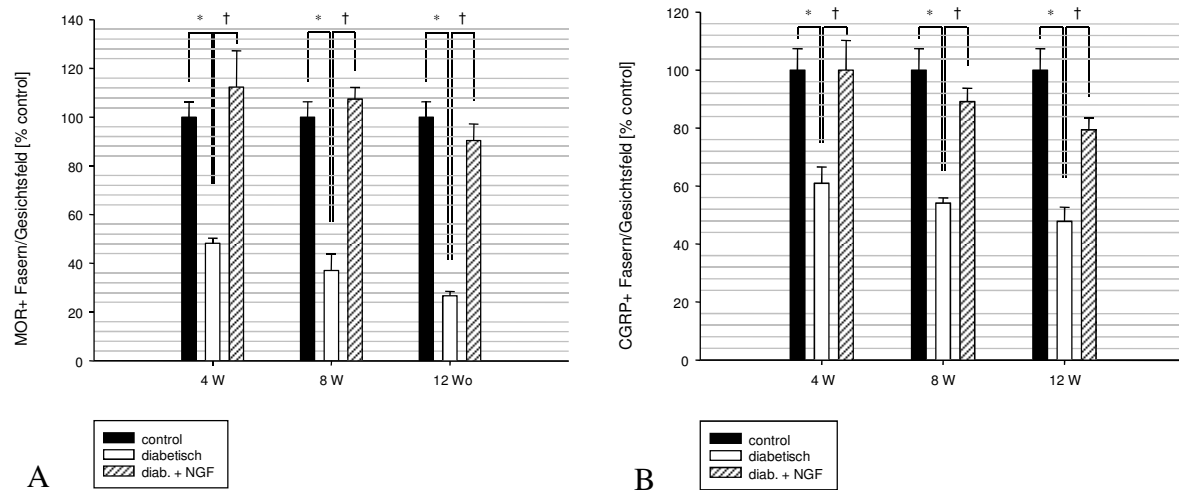


Abbildung 3.9: MOR-immunoreaktive (A) und CGRP-immunoreaktive Nervenfasern (B) im subkutanen Pfortengewebe. Die Zahl der in die Epidermis einsproßenden MOR-ir Nervenfasern hatte nach STZ-induziertem Diabetes mellitus bereits nach 4 Wochen signifikant abgenommen. Im weiteren Verlauf nahm der Rückgang weiter zu. Die diabetischen Effekte waren nach i.t. Applikation von NGF zu allen Zeitpunkten reversibel. Ebenfalls zu beobachten war ein signifikanter Rückgang der CGRP-ir Nervenfasern zu allen untersuchten Zeitpunkten in der Gruppe der diabetischen Tiere. Auch hier war der Effekt nach i.t. Behandlung mit NGF reversibel. Die Darstellung der Daten erfolgt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + NGF (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

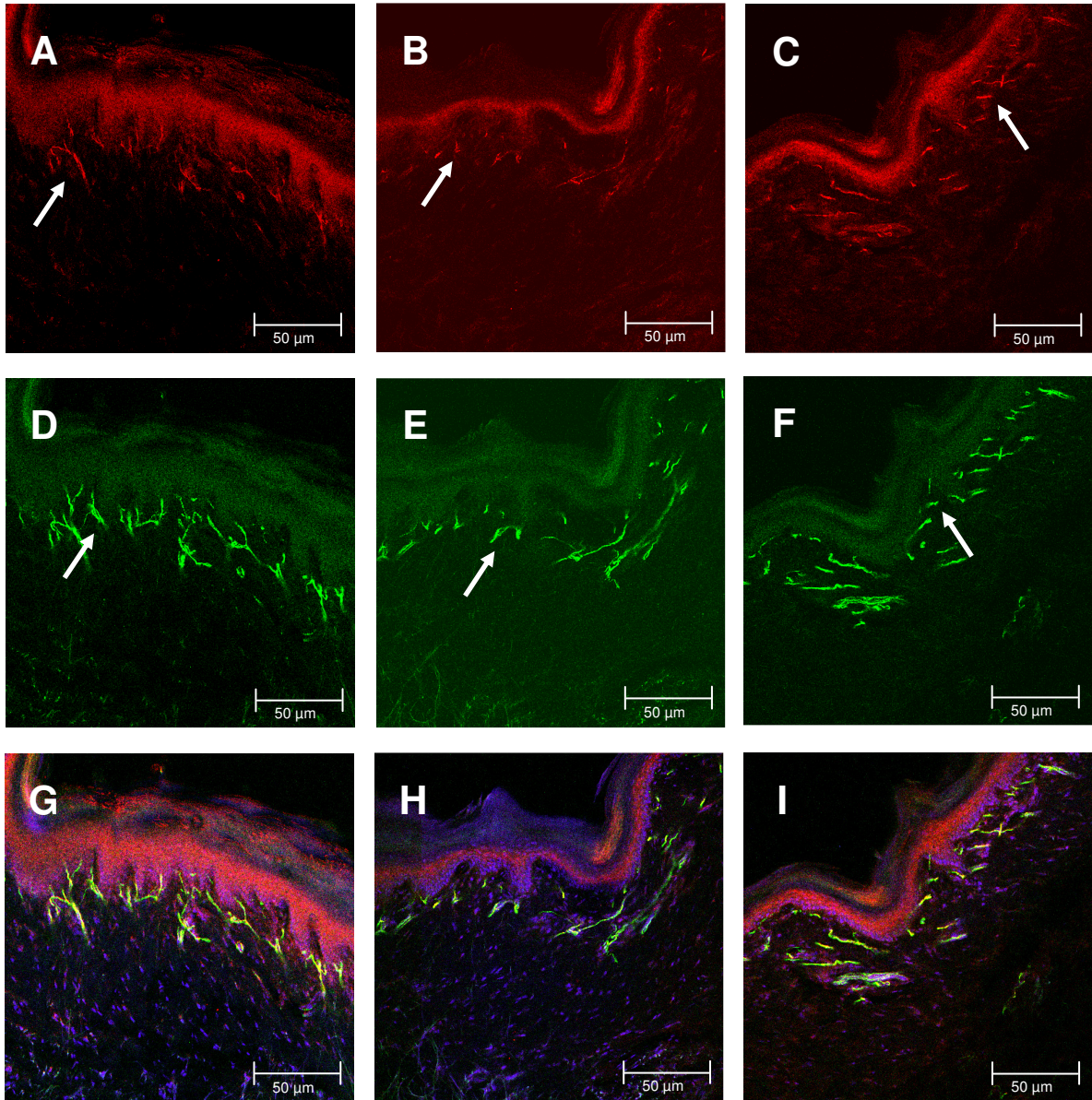


Abbildung 3.10: Nervenfasern immunoreaktiv für MOR (A-C), CGRP (D-F) sowie Zellkernfärbung (G-I) am dermo-epidermalen Übergang. Schnitte durch subkutanes Pfortengewebe unbehandelter Kontrolltiere (A) zeigten eine höhere Anzahl MOR-ir Nervenfasern als Schnitte von Tieren 12 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus (B). Die i.t. Gabe von NGF bewirkte einen Wiederanstieg der Nervenfasern (C). Die CGRP-ir Fasern entwickelten sich gleichsinnig. Diabetische Tiere (E) wiesen deutlich weniger Fasern auf als unbehandelte Kontrolltiere (D), während nach NGF-Behandlung ein Wiederanstieg zu beobachten war (F). Zur besseren Darstellung der Morphologie erfolgte die Hintergrundfärbung mit DAPI (G-I). (→ zeigt beispielhaft auf in die Epidermis einstrahlende Nervenfasern).

3.1.2 IGF1-Gruppe

In diesen Untersuchungen sollte der Einfluss des Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 1 (IGF1) auf das Nervenwachstum sensibler Neurone nach zuvor induzierter diabetischer Polyneuropathie bestimmt werden. Einen Überblick über die untersuchten Gewebearten gibt Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2: Entnommene und untersuchte Gewebearten in der späten Phase des STZ-induzierten Diabetes.

Behandlung	Rückenmark	Spinalganglion	N. ischiadicus	subkutanes Gewebe
control	✓	✓	✓	✓
diabetisch	✓	✓	✓	✓
diab. + IGF1	✓	✓	✓	

diab. = diabetisch; IGF1 = Insulin-like growth factor

3.1.2.1 Hinterhorn des Rückenmarks

Die STZ-Induktion eines Diabetes mellitus führte wie oben gezeigt zu einer signifikanten Abnahme sowohl des MOR-ir Areal in den Laminae I+II im Hinterhorn des Rückenmarks, als auch der Intensität der MOR-Fluoreszenz.

Nach IGF1-Gabe stieg das immunoreaktive Areal bei 4, 8 und 12 Wochen gegenüber rein diabetischen Tieren signifikant an (prozentualer Mittelwert ir-Fläche bezogen auf Kontrolle \pm SEM: 78,16 \pm 1,92 vs. 104,86 \pm 2,56 [W4] 61,69 \pm 4,15 vs. 107,27 \pm 8,03 [W8], 45,16 \pm 1,84 vs. 86,72 \pm 6,36 [W12] siehe Abb. 3.11A). Die Intensität der Fluoreszenz von MOR wies hingegen nur zum Zeitpunkt 4 Wochen eine signifikante Steigerung nach IGF1-Applikation auf (93,16 \pm 1,29 vs. 102,76 \pm 1,49 [W4], 88,41 \pm 1,53 vs. 91,9 \pm 1,48 [W8], 93,34 \pm 1,56 vs. 92,49 \pm 1,24 [W12], siehe Abb. 3.11B).

Unter diabetischen Bedingungen war ebenfalls das CGRP-ir Areal, sowie die Intensität von CGRP vermindert (s. oben). Die i.t. Applikation von IGF1 bewirkte zu allen Zeitpunkten eine signifikante Steigerung des CGRP-ir Areal verglichen mit rein diabetischen Tieren (prozentualer Mittelwert bezogen auf Kontrolle \pm SEM: 85,14 \pm 5,67 vs. 103,32 \pm 2,96 [W4], 75,25 \pm 2,5 vs. 92,78 \pm 3,17 [W8], 58,95 \pm 3,24 vs. 80,42 \pm 3,12 [W12] siehe Abb. 3.12A), während die Intensität der Fluoreszenz nur bei 8 und 12 Wochen signifikante Erhöhungen

gegenüber diabetischen Tieren aufwies ($100,31 \pm 1,88$ vs. $106,67 \pm 2,06$ [W4], $88,98 \pm 2,63$ vs. $103,17 \pm 2,19$ [W8], $87,21 \pm 2,81$ vs. $105,09 \pm 1,92$ [W12], siehe Abb. 3.12B).

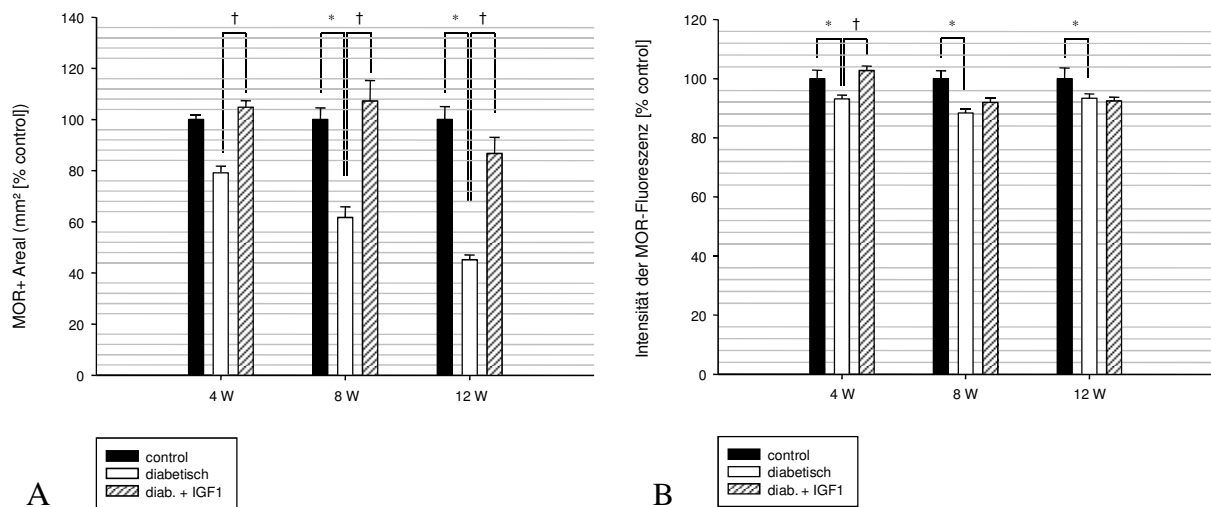


Abbildung 3.11: MOR-immunoreaktives Areal (A) und Intensität der Fluoreszenz von MOR (B) im Hinterhorn des Rückenmarks. 4 Wochen nach STZ-Induktion des Diabetes mellitus zeigte sich noch kein signifikanter Rückgang des MOR-ir Areals in Versuchstieren (A). Ein Rückgang wurde jedoch zu den Zeitpunkten 8 und 12 Wochen sichtbar. Die Intensität der Fluoreszenz von MOR (B) zeigte zu allen untersuchten Zeitpunkten (4, 8 und 12 Wochen) eine signifikante Reduktion gegenüber den Kontrolltieren. Die diabetischen Effekte waren nach i.t. Gabe von IGF1 bei Betrachtung des immunoreaktiven Areals (A) zu allen Zeitpunkten reversibel, während die Intensität nach IGF1-Gabe (B) nur zum Zeitpunkt 4 Wochen wieder signifikant anstieg. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) dargestellt. *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + IGF1 (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

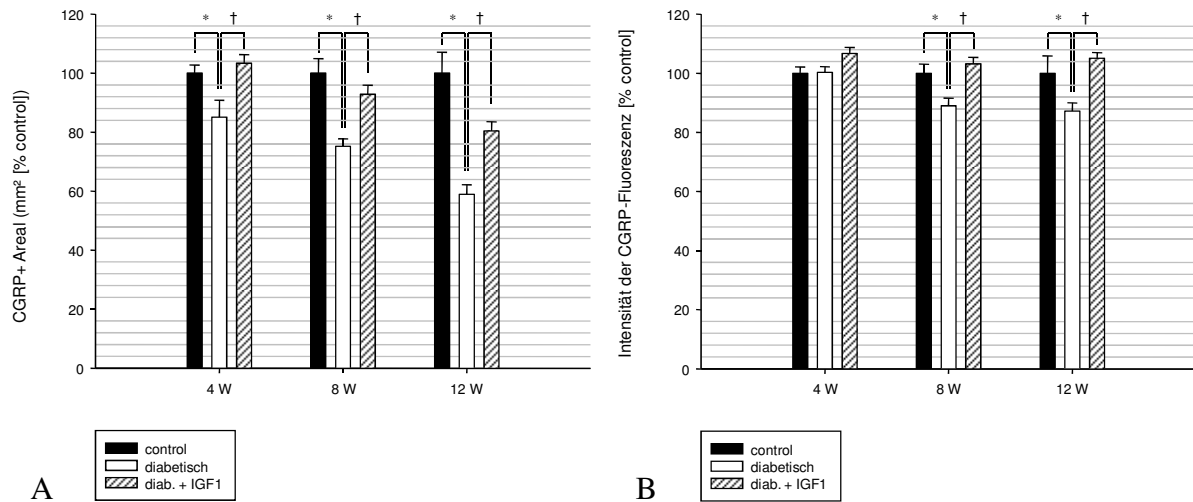


Abbildung 3.12: CGRP-immunoreaktives Areal (A) und Intensität der CGRP-Fluoreszenz (B) im Hinterhorn des Rückenmarks. Das immunoreaktive Areal bei Tieren mit einem STZ-induzierten Diabetes mellitus zeigte zu allen Zeitpunkten einen im Vergleich zu Kontrolltieren signifikanten Rückgang. Dieser Rückgang nahm im zeitlichen Verlauf weiter zu, war jedoch nach i.t. Applikation von IGF1 reversibel (A). Die Intensität der Fluoreszenz änderte sich initial (4 Wochen) nicht, nahm jedoch nach 8 und 12 Wochen signifikant ab. Nach IGF1-Gabe stieg die Intensität wieder signifikant auf Ausgangswerte an (B). Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + IGF1 (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

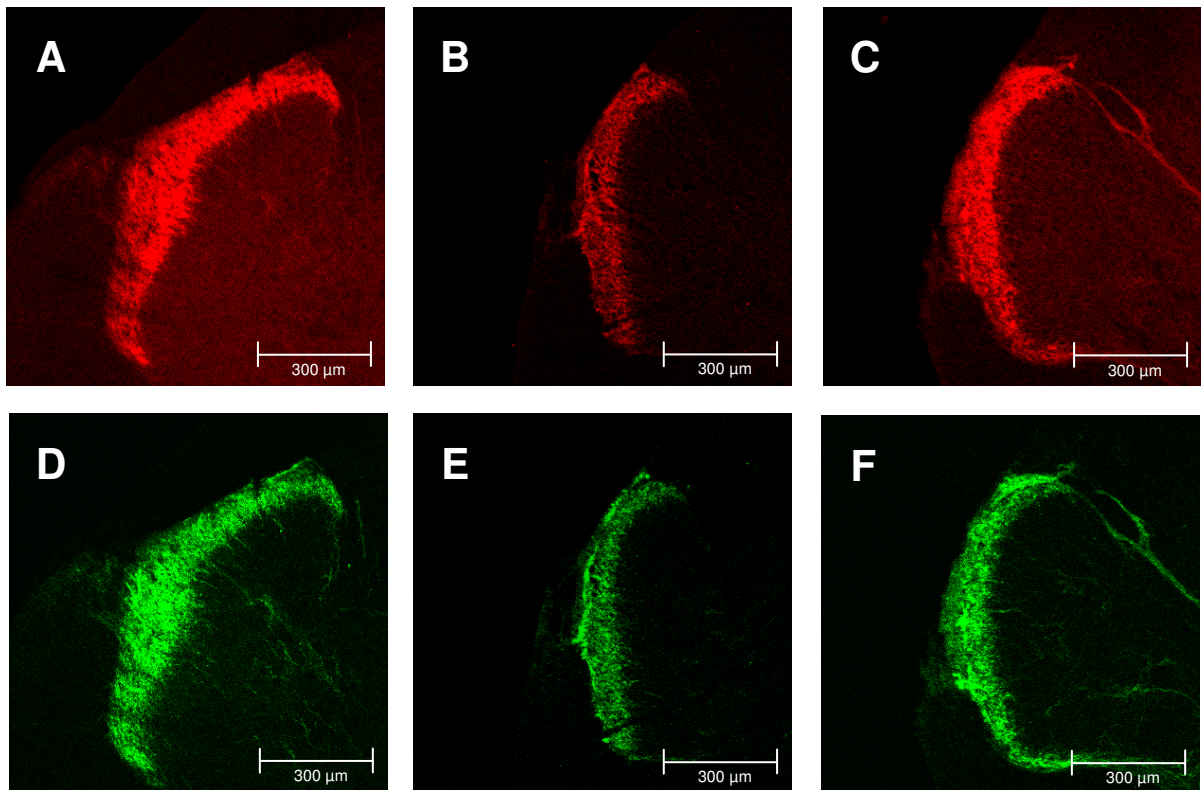


Abbildung 3.13: MOR-immunoreaktives (A-C) und CGRP-immunoreaktives Areal (D-F) in Querschnitten durch das Rückenmark auf Höhe der *Intumescencia lumbosacralis* (L3-L5). Kontrolltiere zeigten eine deutlich stärkere Immunfluoreszenz für MOR (A) als Tiere mit Diabetes mellitus 12 Wochen nach Injektion von STZ (B). Nach i.t. Applikation von IGF1 nahm die Immunfluoreszenz wieder deutlich zu (C). Verglichen mit unbehandelten Kontrolltieren (D) ist 12 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus auch CGRP deutlich vermindert (E). IGF1 verursachte auch hier eine Zunahme des Fluoreszenzsignals (F).

3.1.2.2 Sensible Spinalganglien (dorsal root ganglia, DRG)

In Spinalganglien ließen sich mittels spezifischer Antikörper MOR bzw. CGRP-haltige Neurone nachweisen. Die STZ-Induktion eines Diabetes mellitus führte auch in Spinalganglien zu einer signifikanten Abnahme von MOR-ir Neuronen nach 8 und 12 Wochen. In CGRP-ir sensiblen Neuronen fand gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe zu allen untersuchten Zeitpunkten ein Rückgang des Markers statt (s. oben).

Ähnlich wie unter der Behandlung mit NGF war auch nach i.t. Gabe von IGF1 eine signifikante Steigerung der MOR-ir Neurone zu den Zeitpunkten 8 und 12 Wochen gegenüber diabetischen Tieren zu beobachten (prozentualer Mittelwert ir-Neurone bezogen auf Kontrolle \pm SEM: 79,16 \pm 8,36 vs. 163,86 \pm 4,53 [W4], 63,18 \pm 6,84 vs. 155,91 \pm 13,93 [W8], 45,54 \pm 6,55 vs. 142,45 \pm

8,81 [W12], siehe Abb. 3.14A), Die Anzahl CGRP-ir Neurone im Spinalganglion konnte zu allen betrachteten Zeitpunkten signifikant im Vergleich zu diabetischen Tieren gesteigert werden ($68,37 \pm 5,6$ vs. $91,41 \pm 5,75$ [W4], $61,66 \pm 3,46$ vs. $88,79 \pm 5,84$ [W8], $55,16 \pm 2,45$ vs. $86,46 \pm 9,45$ [W12], siehe Abb. 3.14B).

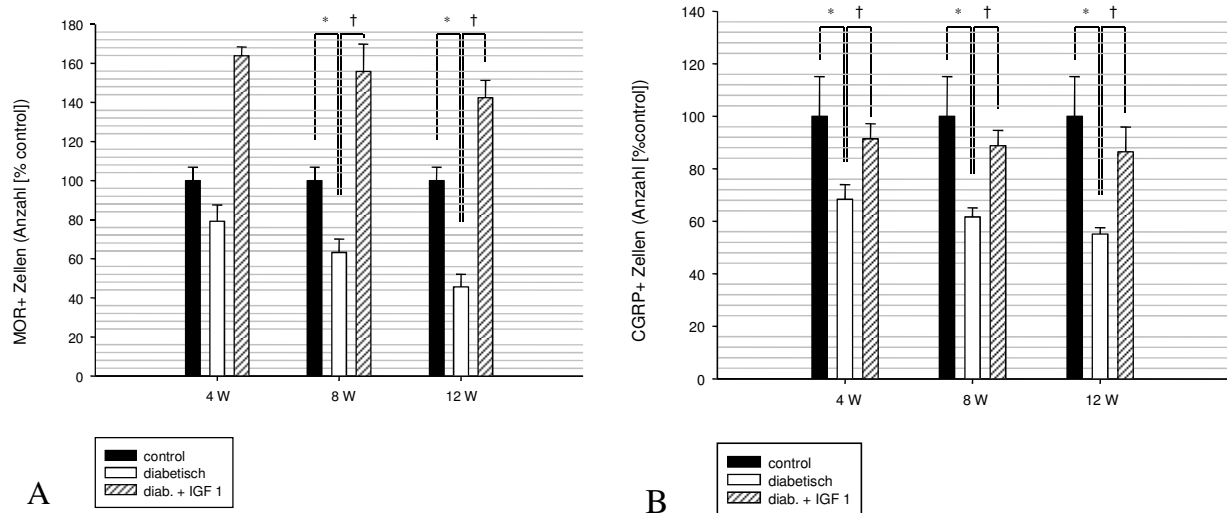


Abbildung 3.14: Anzahl der MOR-immunoreaktiven (A) und CGRP-immunoreaktiven (B) Neurone im Spinalganglion. Nach Induktion eines Diabetes mellitus mittels STZ zeigte sich nach 4 Wochen noch keine signifikante Reduktion der MOR-ir Neurone. Nach 8 Wochen und im weiteren Verlauf nach 12 Wochen sank die Anzahl immunoreaktiver Neurone signifikant ab. Diese Effekte waren durch die i.t. Gabe von IGF1 reversibel (A). Die Anzahl CGRP-ir Neurone war zu allen Zeitpunkten gegenüber den Werten von Kontrolltieren signifikant verringert. Auch hier konnte nach IGF1-Applikation eine signifikante Steigerung beobachtet werden (B). Alle Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + IGF1 (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

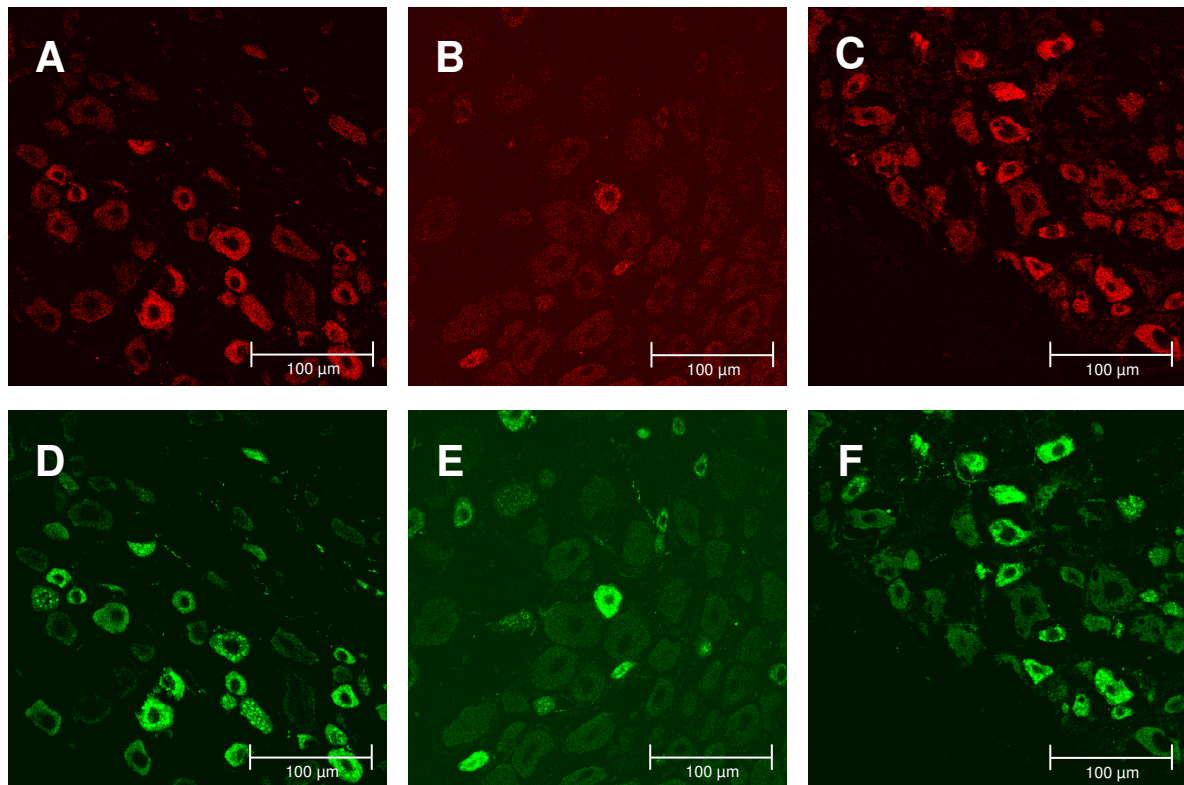


Abbildung 3.15: MOR-immunoreaktive (A-C) und CGRP-immunoreaktive Neurone (D-F) im Spinalganglion. Unbehandelte Kontrolltiere zeigten eine höhere Anzahl MOR-ir Neurone im Spinalganglion (A) als Tiere 12 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus (B). Nach i.t. Gabe von IGF1 waren MOR-ir Neurone wieder vermehrt nachweisbar (C). Ähnliche Effekte können bei CGRP-ir Neuronen beobachtet werden. Die STZ-Induktion eines Diabetes mellitus führte zu einer Abnahme der immunoreaktiven Neurone (E) gegenüber Kontrolltieren (D). Nach Behandlung mit IGF1 zeigten sich wieder mehr Neurone immunoreaktiv für CGRP (F). Als sensible Neurone stellten sich vorrangig kleine und mittelgroße Neurone dar.

3.1.2.3 Nervus ischiadicus

Die Behandlung mit STZ führte wie oben gezeigt zu einer signifikanten Reduktion des MOR-ir Areal im Nerv proximal der Ligatur, während die Intensität der MOR-Fluoreszenz keine Veränderungen zeigte. Nach Behandlung der diabetischen Tiere mit IGF1 stieg das MOR-ir Areal bei 4, 8 und 12 Wochen im Vergleich zum diabetischen Tier wieder signifikant an (prozentualer Mittelwert ir-Fläche bezogen auf Kontrolle \pm SEM: $58,63 \pm 7,87$ vs. $109,16 \pm 4,09$ [W4], $48,25 \pm 2,48$ vs. $108,96 \pm 4,14$ [W8], $39,51 \pm 3,33$ vs. $84,76 \pm 3,2$ [W12] siehe Abb. 3.16A). Daneben konnte auch die Intensität der Fluoreszenz von MOR durch IGF1-Applikation zu allen drei Zeitpunkten signifikant gesteigert werden ($114,17 \pm 5,76$ vs. $247,74 \pm 13,46$ [W4],

134,26 ± 5,94 vs. 196,85 ± 22,5 [W8], 109,24 ± 15,87 vs. 183,08 ± 19,41 [W12], siehe Abb. 3.16B).

Auch das CGRP-ir Areal, das unter diabetischen Bedingungen signifikant verringert war, wurde nach IGF1 Behandlung wieder signifikant größer (prozentualer Mittelwert ir-Fläche bezogen auf Kontrolle ± SEM: 68,53 ± 5,07 vs. 94,01 ± 5,12 [W4], 55,11 ± 2,31 vs. 86,21 ± 5,12 [W8], 54,04 ± 4,23 vs. 76,45 ± 3,96 [W12], siehe Abb. 3.17A). Gleiches galt für die Intensität von CGRP nach IGF1 Behandlung im Vergleich zu diabetischen Tieren (65,06 ± 4,79 vs. 153,15 ± 8,4 [W4], 92,26 ± 8,54 vs. 127,71 ± 15,68 [W8], 60,13 ± 8,63 vs. 109,68 ± 10,2 [W12], siehe Abb. 3.17B).

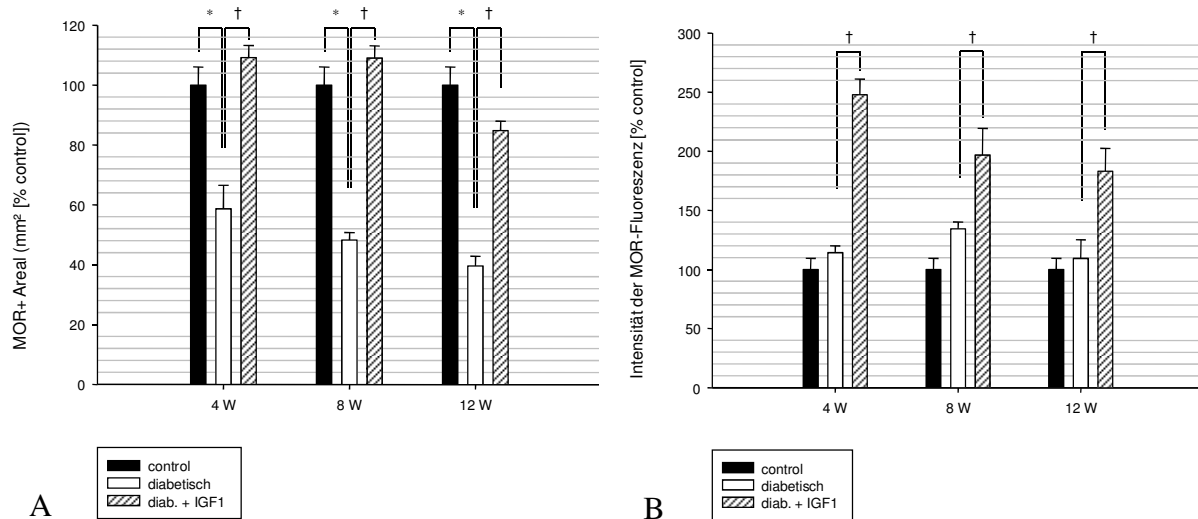


Abbildung 3.16: MOR-immunoreaktives Areal (A) und Intensität der Fluoreszenz von MOR (B) im proximalen N. ischiadicus nach Ligatur zur Unterbrechung des axonalen Transports. Das MOR-ir Areal (A) sank bereits 4 Wochen nach Induktion eines Diabetes mellitus durch STZ signifikant ab. Diese Abnahme setzte sich bei Betrachtung der Untersuchungszeitpunkte 8 und 12 Wochen weiter fort. Nach i.t. Applikation von IGF1 stieg das immunoreaktive Areal wieder signifikant an. Die Intensität der MOR-Fluoreszenz (B) zeigte zu keinem Zeitpunkt signifikante Veränderungen in der diabetischen Gruppe gegenüber Kontrolltieren. Nach IGF1-Gabe war jedoch eine signifikante Steigerung zu beobachten. Daten sind angegeben als Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwerts. *: p<0,05; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: p<0,05; STZ vs. STZ + IGF1 (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

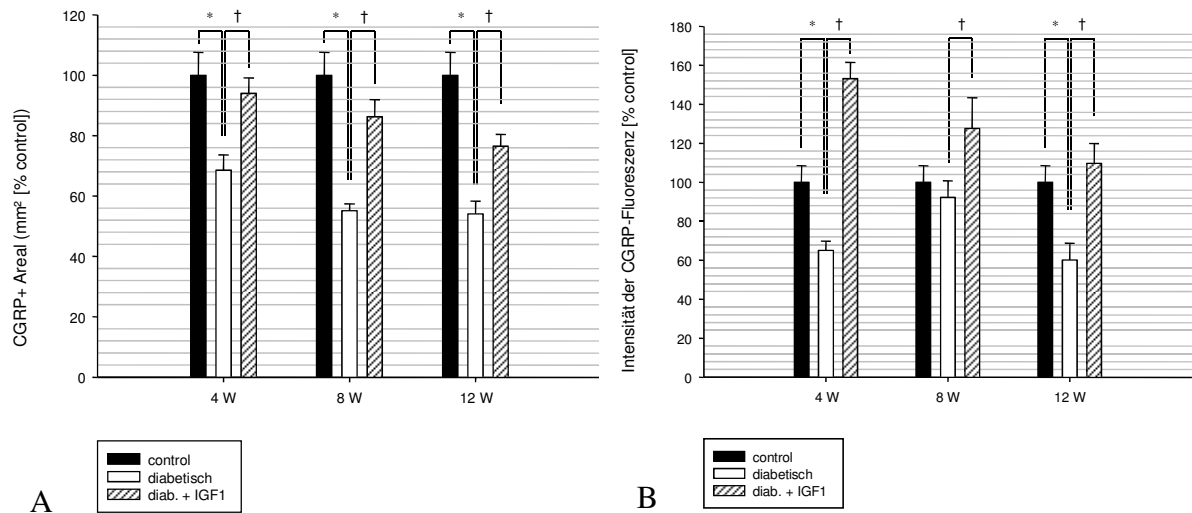


Abbildung 3.17: CGRP-immunoreaktives Areal (A) und Intensität der Fluoreszenz von CGRP (B) im proximalen N. ischiadicus. Zur Unterbrechung des axonalen Transports wurde der Nerv ligiert. Nach Induktion eines Diabetes mellitus mittels STZ sank das CGRP-ir Areal (A) nach 4, 8 und 12 Wochen signifikant gegenüber Kontrolltieren ab. Nach i.t. Applikation von IGF1 war eine signifikante Steigerung gegenüber diabetischen Tieren zu allen Untersuchungszeitpunkten zu beobachten. Die Intensität der CGRP-Fluoreszenz (B) sank bei 4 und 12 Wochen signifikant unter Kontrollniveau ab. Bei 8 Wochen zeigte sich im diabetischen Tier keine signifikante Veränderung. Zu allen Zeitpunkten war die Intensität der Fluoreszenz nach Applikation von IGF1 i.t. signifikant gesteigert. Angabe aller Werte als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); †: $p < 0,05$; STZ vs. STZ + IGF1 (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

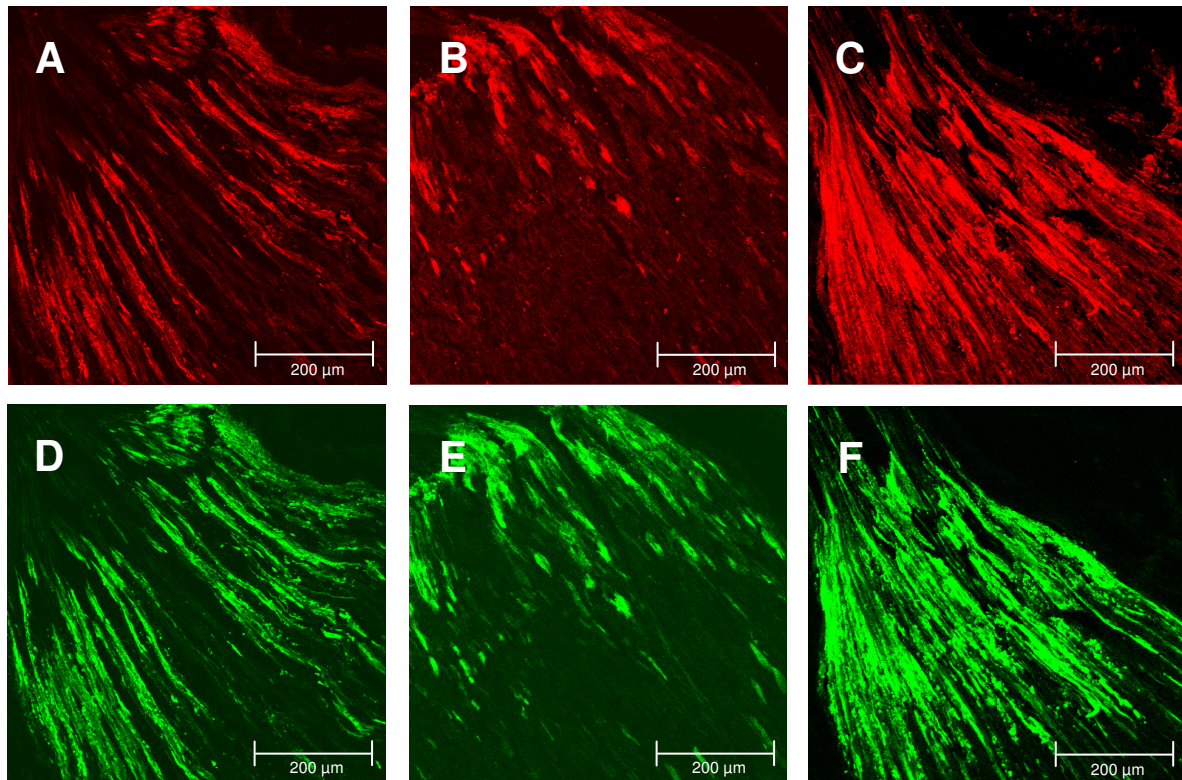


Abbildung 3.18: MOR-immunoreaktive Fasern (A-C) und CGRP-immunoreaktive Fasern (D-F) im proximalen N. ischiadicus nach Ligatur zur Unterbrechung des axonalen Transports. Dargestellt sind Schnitte durch Kontrolltiere (A, D), sowie durch Tiere 12 Wochen nach Induktion eines Diabetes mellitus durch STZ (B, E), bzw. nach i.t. Applikation von IGF1 im diabetischen Tier (C, F). Gezeigt sind jeweils MOR (rote Fluoreszenz) und CGRP (grüne Fluoreszenz) des gleichen Präparats. Sowohl die MOR-Fluoreszenz, als auch die CGRP-Fluoreszenz sind im diabetischen Tier verglichen mit Kontrolltieren deutlich vermindert. Bei Betrachtung des mit IGF1 behandelten Tiers ist eine deutliche Intensivierung der Fluoreszenz gegenüber dem diabetischen Tier zu erkennen.

3.2 Quantifizierung von Protein Gene Product 9.5 (PGP-9.5)

Protein Gene Product 9.5 (PGP-9.5) ist ein hochspezifischer Marker für Neurone jedwelcher Entität (sensorische, motorische, autonome Nervenfasern). In Ratten mit STZ-induziertem Diabetes mellitus konnte nach 4, 8 und 12 Wochen keine signifikante Veränderung des Gehalts an PGP-9.5 in den terminalen Endigungen sensibler Neurone nachgewiesen werden (Mittelwert PGP-9.5-ir Nervenfasern \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM): $13,0 \pm 0,55$ vs. $12,3 \pm 0,33$ [W4] vs. $13,0 \pm 0$ [W8] vs. $12,0 \pm 0$ [W12]).

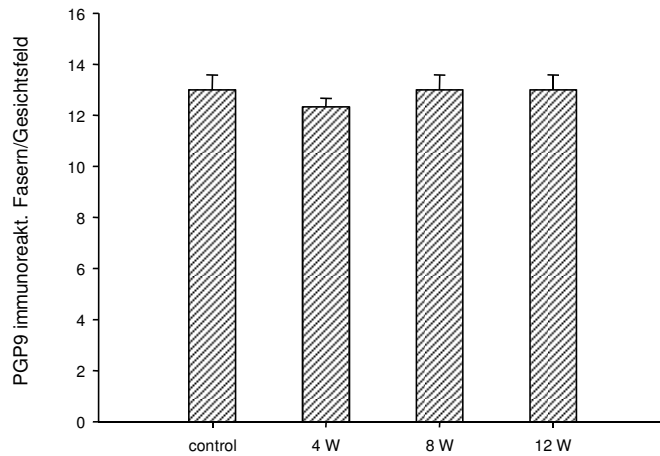


Abbildung 3.19: Anzahl PGP-9.5-positiver Nervenfasern im subkutanen Pfortengewebe der Ratte. Untersucht wurden Ratten nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus zu den Zeitpunkten 4, 8 und 12 Wochen, sowie Kontrolltiere. Es zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der PGP-9.5-positiven Fasern im Vergleich zu Kontrolltieren. Dargestellt sind Daten als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

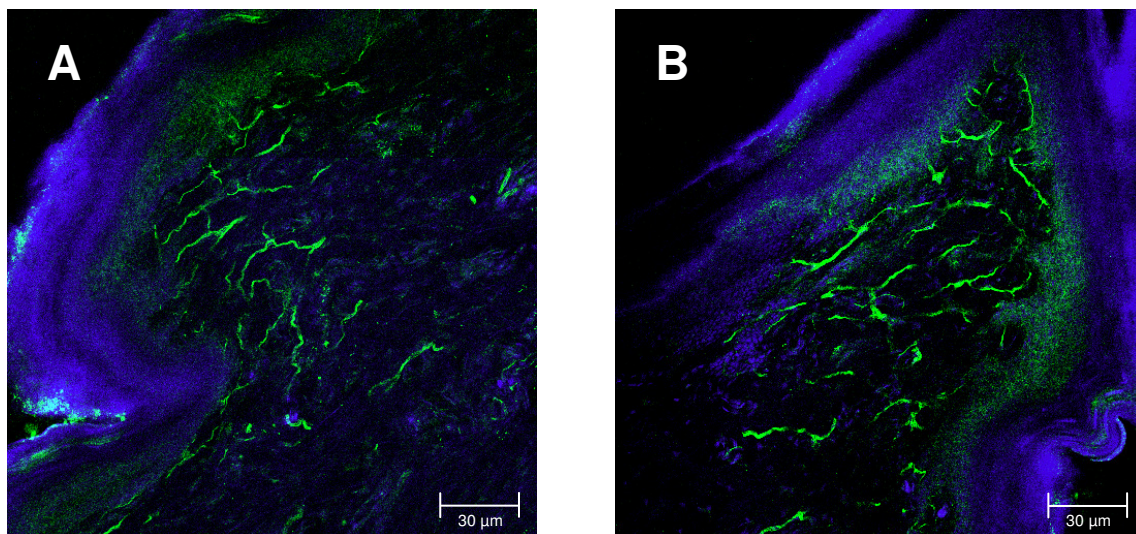


Abbildung 3.20: Immunhistochemische Darstellung der PGP-9.5-immunoreaktiven Nervenfasern im subkutanen Pfortengewebe. Dargestellt sind Nervenfasern, die in die Epidermis (blauer Saum) einstrahlen. Bei Tieren mit STZ-induziertem Diabetes mellitus (B) zeigte sich keine Abnahme von PGP-9.5-immunoreaktiven Nervenendigungen (grüne Fluoreszenz) gegenüber dem Kontrolltier (A). Die Zellkernfärbung erfolgte zur besseren Darstellung der morphologischen Strukturen mit DAPI (blaue Fluoreszenz).

3.3 Frühe Phase des STZ-induzierten Diabetes

Gegenstand der Untersuchungen der frühen Phase war der Grad der Phosphorylierung von MOR in sensiblen Neuronen des Spinalganglions. Es wurde untersucht, inwiefern sich der Anteil der phosphorylierten Rezeptoren im diabetischen Tier quantitativ veränderte. Durch die Gabe des PKC-Inhibitors Calphostin C sollte versucht werden, die Phosphorylierung zu inhibieren. Eine Übersicht der untersuchten Proteine MOR-immunoreaktiver Neurone gibt Tabelle 3.3.

Tabelle 3.3: Übersicht der durchgeführten Experimente in der frühen Phase des Diabetes mellitus.

Behandlung	pMOR	PKC α
control	✓	✓
D 15	✓	✓
D 15 + CalC	✓	x
D 30	✓	✓
D 30 + CalC	✓	x

D15 = 15 Tage p. STZ-Injektion; D30 = 30 Tage p. STZ-Injektion; CalC = CalphostinC; pMOR = phosphorylierte μ -Opioid-Rezeptoren; PKC α = Proteinkinase C alpha

3.3.1 Phosphorylierte μ -Opioid-Rezeptoren (pMOR) im sensiblen Spinalganglion

STZ-behandelte Tiere zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren nach 15 Tagen eine deutlich erhöhte Anzahl an Spinalganglienneuronen mit phosphorylierten μ -Opioid-Rezeptoren (pMOR) (prozentualer Anteil pMOR-ir Neurone pro Gewebeschnitt normalisiert auf Kontrolltiere, Mittelwert \pm SEM: $100,0 \pm 7,51$ vs. $203,26 \pm 10,1$). Zwischen dem 15. Und dem 30. Tag nahm der Anstieg weiter zu ($297,01 \pm 19,6$ nach 30 Tagen). Die Phosphorylierung zeigte sich abhängig vom Einsatz eines PKC-Inhibitors: Nach vorangegangener Gabe des PKC-Inhibitors Calphostin C fiel die Anzahl pMOR-ir Neurone zu beiden Zeitpunkten wieder auf Werte ab, die auf dem Niveau von Kontrolltieren lagen ($92,06 \pm 5,23$ [15 Tage] bzw. $96,34 \pm 7,1$ [30 Tage], siehe Abb.3.21).

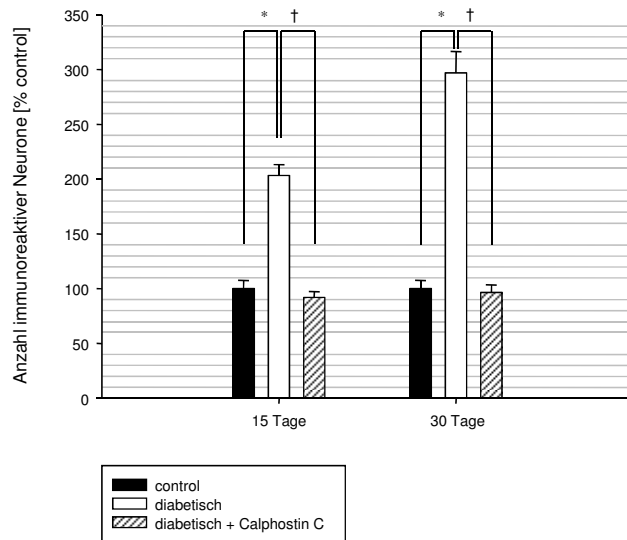


Abbildung 3.21: Anzahl Spinalganglienneurone immunoreaktiv für phosphorylierte μ -Opioid-Rezeptoren in STZ-behandelten Tieren. Zu beiden untersuchten Zeitpunkten (15 und 30 Tage) zeigte sich bei diabetischen Tieren eine signifikante Zunahme der phosphorylierten μ -Opioid-Rezeptoren. Nach i.t. Applikation von Calphostin C (PKC-Inhibitor) sanken die Werte signifikant ab und erreichten Ausgangswerte. Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). * $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test); † $p < 0,05$; STZ vs. STZ+CalC (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

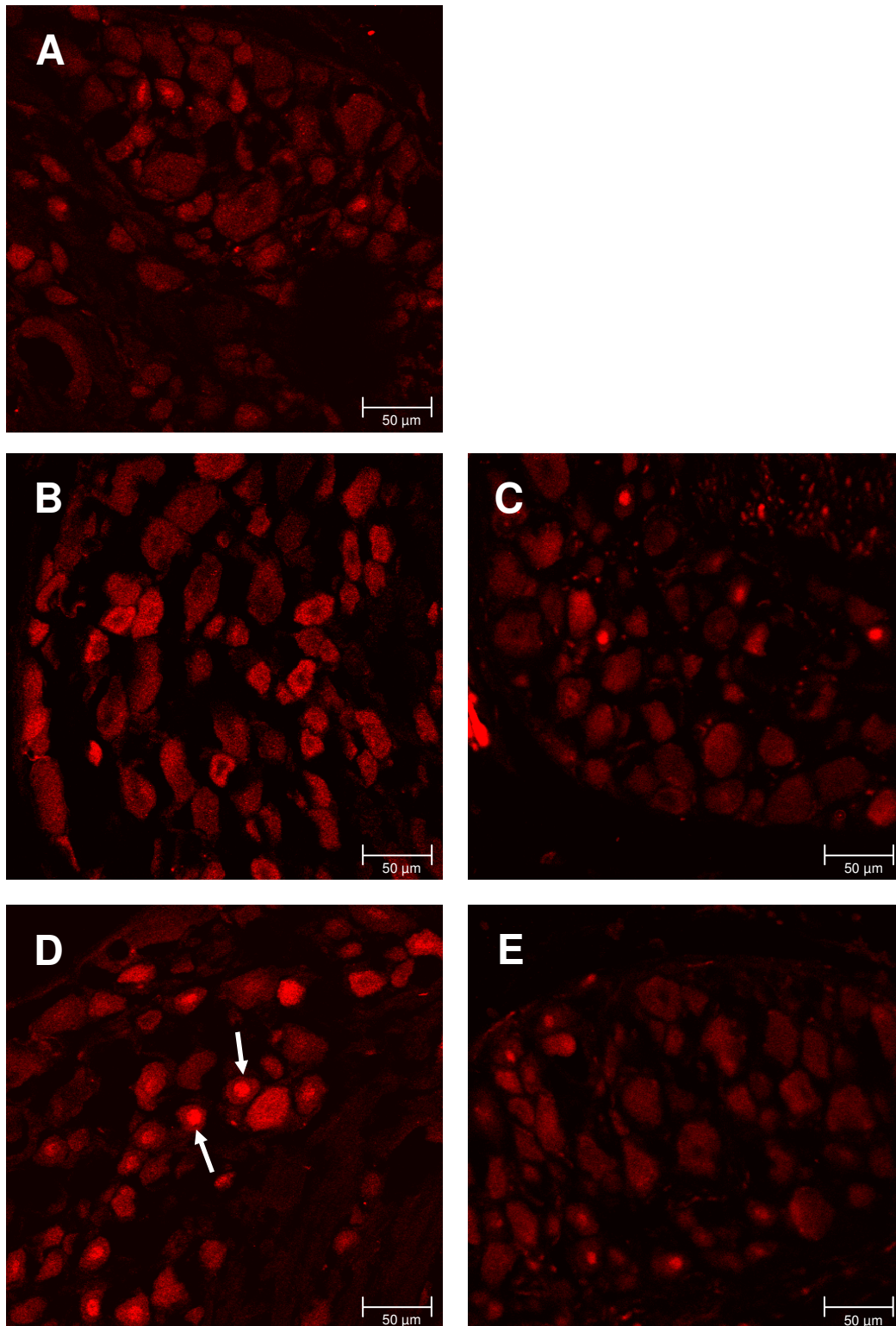


Abbildung 3.22: Immunhistochemische Darstellung von phosphorylierten MOR (pMOR) im Spinalganglion. (A) zeigt die immunhistochemische Aufnahme eines unbehandelten Tieres. (B) zeigt phosphorylierte MOR bei Tieren mit STZ-induziertem Diabetes mellitus nach 15 Tagen (rote Fluoreszenz), während die Phosphorylierung durch i.t. Gabe von Calphostin C (C) gehemmt werden konnte. (D) zeigt analog hierzu die Phosphorylierung der MOR nach 30 Tagen bzw. nach i.t. Gabe von Calphostin C (E). Deutlich zu erkennen ist die zellzentrale Dichte an phosphorylierten MOR (→).

3.3.2 PKC α im sensiblen Spinalganglion

Ziel des immunhistochemischen Nachweises von PKC α war der Nachweis einer veränderten Aktivität dieses Enzyms in MOR-ir Spinalganglienneuronen bei Tieren mit STZ-induziertem Diabetes mellitus.

Gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich 15 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus ein Anstieg des Anteils PKC α -positiver Neurone an der Gesamtzahl MOR-positiver Neurone, der jedoch nicht signifikant war (Mittelwert PKC α -positiver Neurone/Gesamtzahl MOR-positiver Neurone, Mittelwert \pm SEM: $20,6 \pm 1,55$ vs. $44,8 \pm 1,54$ /Gewebeschnitt). Nach 30 Tagen konnte jedoch eine signifikante Steigerung des Quotienten gegenüber der Kontrolle beobachtet werden ($20,6 \pm 1,55$ vs. $53,2 \pm 1,6$) (siehe Abb. 3.23).

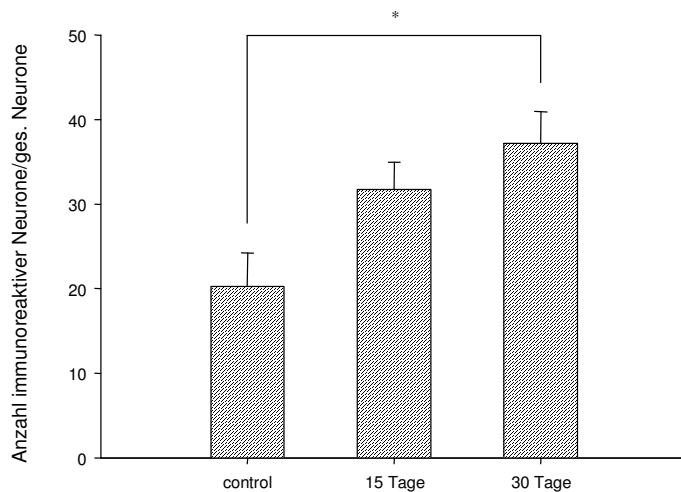


Abbildung 3.23: Anteil PKC α -positiver Neurone an der Gesamtzahl MOR-positiver Neurone. Nach 15 Tagen zeigte sich gegenüber den Kontrolltieren kein signifikanter Anstieg des Quotienten von PKC α -positiven Neuronen/MOR-positive Neurone. 30 Tage nach Induktion eines Diabetes mellitus war der Anteil von PKC α -positiven Neuronen an MOR-positiven Neuronen jedoch signifikant gestiegen. Darstellung der Daten als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) in Prozent. *: $p < 0,05$; STZ vs. Vehikellösung (One Way ANOVA, Duncan's post-hoc test)

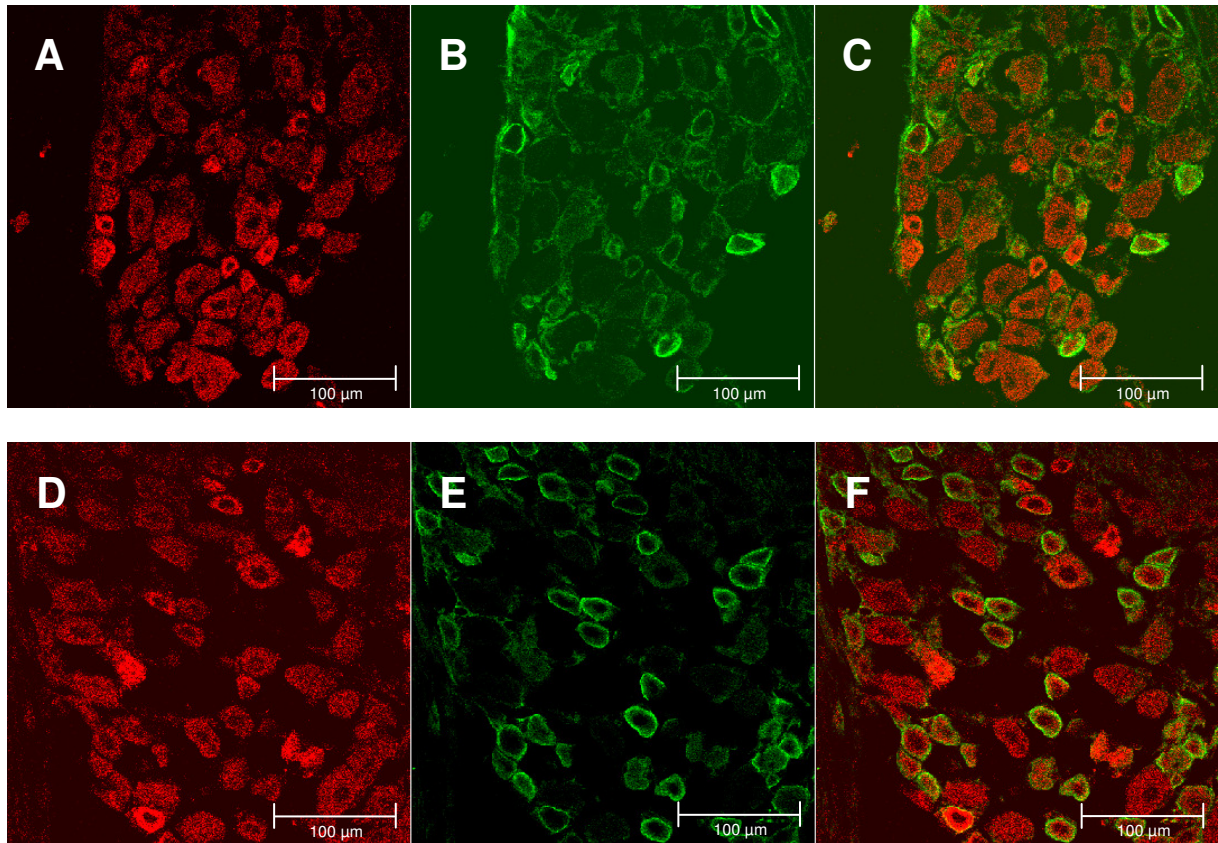


Abbildung 3.24: Schnitt durch ein Spinalganglion mit Darstellung der PKC α -positiven und MOR-positiven Neurone. Die Texas red Fluoreszenz (A) zeigte MOR-positive Neurone im Spinalganglion eines unbehandelten Kontrolltieres. Die FITC green Fluoreszenz (B) zeigte PKC α -positive Neurone. Im co-lokalisierten Bild (C) kamen Neurone zur Darstellung, die sowohl PKC α -positiv als auch MOR-positiv waren. D-F zeigen analog hierzu Schnitte 30 Tage nach Induktion eines Diabetes mellitus. Deutlich zu erkennen ist der Anstieg PKC α -positiver Neurone (E), sowie eine gestiegene Co-Lokalisation PKC α -positiver und MOR-positiver Neurone.

4. Diskussion

Bei Vorliegen neuropathischer Schmerzen zeigen sich die Opioidanalgetika allgemein weit weniger wirksam als zum Beispiel bei Tumorschmerzen. Dies liegt zum Teil an einem Rückgang der Anzahl der Opioidrezeptoren sensorischer Neurone, die durch pathologische Veränderungen der Nerven begründet zu sein scheinen. Auch bei der diabetischen Neuropathie zeigt sich ein Verlust in der Opioidwirksamkeit, jedoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen nur unzureichend erforscht. Die Identifizierung möglicher Mechanismen einer reduzierten peripheren Opioidwirksamkeit in Ratten mit einem experimentellen, STZ-induzierten Diabetes mellitus war Ziel der vorliegenden Arbeit.

In einem fortgeschrittenen Stadium des Diabetes mellitus konnte in Tieren mit STZ-induziertem Diabetes folgendes beobachtet werden:

- a) Sowohl in den neuronalen Zellkörpern in sensorischen Spinalganglien, in den sensorischen zentralen Nervenendigungen im Rückenmark als auch den sensorischen peripheren Nervenendigungen in der Epidermis zeigte sich eine starke Co-Lokalisation von MOR und dem Neuropeptid CGRP, welches spezifisch für sensorische Neurone ist.
- b) Die Expression von MOR- und CGRP in sensorischen Neuronen nimmt im Verlauf des Diabetes mellitus progredient ab. Dies ist in den neuronalen Zellkörpern in sensorischen Spinalganglien, in den sensorischen zentralen Nervenendigungen im Rückenmark sowie den sensorischen peripheren Nervenendigungen in der Epidermis deutlich erkennbar. Der axonale Transport vom Spinalganglion zum peripheren Nervenende zeigt ebenso eine signifikant verminderte Anzahl transportierter Opioidrezeptoren sowie des CGRP-Gehalts. Eine vorherige mehrtägige intrathekale Behandlung mit den Wachstumsfaktoren NGF oder IGF konnten die Abnahme MOR- und CGRP-positiver sensorischer Neurone auf allen genannten Ebenen verhindern.
- c) Die Anzahl der PGP-9.5-positiven, in die Epidermis sich aufzweigenden Nervenfasern im subkutanen Pfortengewebe diabetischer, STZ-behandelter Tiere war im beobachteten Verlauf des Diabetes mellitus nicht signifikant verändert.

In einem frühen Stadium des Diabetes mellitus konnte in Tieren nach STZ-Induktion folgendes beobachtet werden:

- a) In einem frühen Stadium (bis 4 Wochen nach STZ-Induktion) des Diabetes mellitus war die Anzahl MOR-immunoreaktiver Neurone in den Spinalganglien noch nicht signifikant verändert. Jedoch zeigte sich eine signifikante Zunahme der Anzahl sensorischer Neurone mit phosphorylierten MOR. Parallel konnte eine signifikante Zunahme der Anzahl membrantranslozierter (aktivierter) PKC α -positiver Neurone bezogen auf die Zahl der MOR-positiven Neurone beobachtet werden.
- b) Der Anstieg sensorischer Neurone mit phosphorylierten MOR konnte durch Gabe des PKC-Inhibitors Calphostin C verhindert werden.

4.1 Co-Lokalisation von MOR und CGRP in sensorischen Neuronen

MOR und CGRP zeigten sich in den durchgeführten immunhistochemischen Versuchen zum größten Teil co-exprimiert. Schnitte durch sensible Spinalganglien zeigten, dass alle MOR-positiven Neurone auch CGRP-positiv sind. Aufgrund der übersichtlichen morphologischen Verhältnisse konnte auch an Schnitten durch subkutanes Pfortengewebe nachgewiesen werden, dass alle MOR-positiven Fasern stets CGRP enthielten. In den Rexed Laminae I+II des Rückenmarks zeigte sich ebenfalls eine Überlappung von MOR-positiven und CGRP-positiven Nervenfasern. Auch hier sind die MOR-positiven Fasern stets CGRP-positiv. Da CGRP im Hinterhorn des Rückenmarks nur in präsynaptischen Neuronen nachweisbar ist, handelt es sich bei den MOR/CGRP-immunoreaktiven Nervenfasern ausschließlich um präsynaptische, aus der Peripherie eintreffende, sensorische Neurone. Diese Ergebnisse stimmen mit früheren Untersuchungen zur Klassifikation sensibler Nervenfasern im peripheren Nerv überein (Mousa et al., 2007).

Die Einteilung peripherer Nervenfasern kann in folgende Gruppen erfolgen: a) myelinisierte Nervenfasern b) unmyelinisierte Nervenfasern. Letztere können wie folgt klassifiziert werden: (1) IB4-positive, nicht peptidergische Nervenfasern sowie (2) unmyelinisierte IB4-negative, CGRP-positiv, peptidergische Nervenfasern.

Lediglich die peptidergischen Fasern sind mit Opioidrezeptoren co-lokalisiert (Akkina et al., 2001) und werden im Rahmen der vorgelegten Arbeit betrachtet.

4.2 Diabetes-induzierter Verlust von MOR-/CGRP auf sensiblen Neuronen

4.2.1 Rückenmark und sensible Spinalganglien

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Immunhistochemie gezeigt werden, dass die Zahl MOR-ir zentraler Nervenendigungen sensorischer Neurone in den superfiziellen Laminae I+II (nach Rexed) des lumbalen Rückenmarks diabetischer Ratten nach vier Wochen noch nicht signifikant abgesunken war. Im weiteren Verlauf setzte sich der Rückgang der MOR-ir Nervenfasern im Hinterhorn allerdings weiter fort, so dass acht Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus ein signifikanter Rückgang beobachtet werden konnte. Chen und Pan hatten in einer Studie an diabetischen Ratten ebenfalls festgestellt, dass es im Hinterhorn des Rückenmarks vier Wochen nach STZ-Induktion des Diabetes mellitus zu keiner signifikanten Veränderung der MOR in immunhistochemischen Versuchen gekommen war (Chen und Pan, 2003). Darüber hinaus konnten Chen und Pan auch in Bindungsstudien mit dem MOR selektiven Liganden [³H]DAMGO keine signifikanten Veränderungen im Rückenmarksgewebe diabetischer Ratten beobachten. Übereinstimmende Ergebnisse zeigen hier unveröffentlichte Bindungsstudien der eigenen Arbeitsgruppe: Vier Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus war die Anzahl der MOR-spezifischen Bindungsstellen von [³H]DAMGO unverändert. Jedoch zeigte sich nach acht und 12 Wochen eine signifikante Reduktion an MOR-spezifischen [³H]DAMGO-Bindungsstellen.

Zur weiteren Evaluierung der Wirkung von Opiaten am Rezeptor untersuchten Chen et al. die Funktionsfähigkeit der MOR mittels G-Protein-Kopplungstest. Bei diabetischen Ratten konnte so gezeigt werden, dass es vier Wochen nach STZ-Induktion des Diabetes mellitus gegenüber unbehandelten Kontrolltieren zu einer signifikant verminderten MOR-G-Protein Kopplung gekommen war (Chen et al., 2002). Die Beobachtungen von Chen et al. in Verbindung mit den eigenen Ergebnissen lassen den Schluss zu, dass die intrazelluläre Signalkaskade nach Bindung des Agonisten an den MOR alteriert ist. Eine solche Störung der Signalkaskade kann die analgetische Wirkung von Opiaten beeinträchtigen.

Nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Veränderungen der Rezeptoren führen zu Veränderungen der Schmerzbeeinflussung. So konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass auch eine zahlenmäßige Abnahme MOR-haltiger sensorischer Neurone mit einer verminderten analgetischen Wirkung von Opioiodanalgetika einherging (Kohno et al., 2005; Rashid et al., 2004). Auch in Tiermodellen mit zuvor induzierter Neuropathie konnten derartige Veränderungen beobachtet werden: Back et al. untersuchten den Einfluss der peripheren

Neuropathie auf den Gehalt spinaler MOR. Die Induktion der Neuropathie erfolgte durch Ligatur des N. ischiadicus nach chirurgischer Darstellung. 2 mm des Nervs wurden entnommen. Sowohl immunhistochemisch als auch auf Proteinebene im Western-Blot konnte in diesem Versuch bereits zwei Wochen nach Ligatur des Nervs eine signifikante Abnahme der spinalen MOR beobachtet werden (Back et al., 2006). Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Kohno et al. Hier wurde der Einfluss auf MOR in zwei verschiedenen Modellen (1. Ligatur des Spinalnervs L5; 2. Ligatur und Durchtrennung der Nn. tibialis und fibularis communis) des neuropathischen Schmerzes untersucht. Auch in dieser Studie konnte immunhistochemisch ein signifikanter Rückgang der MOR zwei Wochen nach Ligatur des peripheren Nervs beobachtet werden. Ein direkter Vergleich mit den eigenen Ergebnissen und den hier diskutierten Ergebnissen von Back et al. und Kohno et al. ist aufgrund der abweichenden Tiermodelle jedoch schwierig. Vorstellbar ist, dass es sich bei der Ligatur des Nervs mechanisch bedingt um ein sehr ausgeprägtes Trauma handelt, infolgedessen es auf immunhistochemischer Ebene sehr viel schneller zu Veränderungen der MOR kommt als nach STZ-induziertem Diabetes mellitus, bei dem sich eine Neuropathie erst allmählich im Verlauf der Erkrankung entwickelt.

Insgesamt legen Daten anderer Arbeitsgruppen sowie eigene Ergebnisse - wie oben gezeigt - die Vermutung nahe, dass es im Verlauf der peripheren Neuropathie (sowohl im Rahmen der traumatisch-induzierten als auch im Rahmen der diabetischen) zu einer Abnahme der MOR kommt. Dabei konnte an eigenen Ergebnissen nicht nur in den zentralen Nervenendigungen, sondern auch in den Zellkörpern sensorischer Neurone ein Rückgang der MOR unter diabetischen Bedingungen beobachtet werden. Ein signifikanter Rückgang war hier jedoch ebenfalls erst nach acht Wochen erkennbar. Obara et al. hatten gezeigt, dass es am Tag 3 als auch am Tag 14 nach Ligatur des N. ischiadicus bei Wistar-Ratten zu einer zwei- bis dreifachen Abnahme des Gehalts an MOR-mRNA im Spinalganglion gekommen war (Obara et al., 2009). Zhang et al. konnten ferner immunhistochemisch den Nachweis erbringen, dass 28 Tage nach peripherer Axotomie des N. ischiadicus die Zahl der MOR nicht nur im DRG sondern ebenso im Hinterhorn des Rückenmarks abgesunken war (Zhang et al., 1998). Auch hier schränken die unterschiedlichen Tiermodelle die direkte Vergleichbarkeit mit den eigenen Ergebnissen ein. Das von Obara et al. und Zhang et al. gewählte Tiermodell hat traumainduziert möglicherweise wiederum schnellere Veränderungen zur Folge als das Modell der diabetischen Neuropathie. Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen nämlich im Gegensatz zu den beiden vorgenannten Studien, dass 4 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus im DRG lediglich ein Rückgang um ca.

20% im Vergleich zu nicht-diabetischen Kontrolltieren zu beobachten ist. Dieser Rückgang der Rezeptorzahl ist jedoch noch nicht als signifikant zu werten.

Neben dem Rückgang der MOR-positiven Zellen im Spinalganglion und dem Rückgang der MOR-positiven zentralen Endigungen des peripheren Nervs im Rückenmark konnte außerdem ein Rückgang des CGRP-Gehalts dieser Neurone bzw. Nervenfasern beobachtet werden. Wie einleitend ausgeführt, dient das Neuropeptid CGRP (zunächst einmal ein wichtiges Neuropeptid mit bestimmten Funktionen, z.B. im Rahmen der neurogenen Entzündung) als Marker für unmyelinisierte, peptidhaltige Nervenfasern, deren Entwicklung NGF abhängig ist (Akkina et al., 2001). Eine Störung der Funktion des peripheren Nervs geht daher nachvollziehbar mit einem Verlust des Peptids CGRP und von MOR einher. CGRP ist daher für den qualitativen Nachweis von Nervenfasern von Interesse und zeigt eine Einschränkung der Nervenfunktion an. Vorangegangene Studien konnten dies betreffend bereits zeigen, dass es unter diabetischen Bedingungen bei Ratten zu einer signifikanten Abnahme CGRP-positiver Nervenfasern bzw. Neurone in den superfiziellen Laminae des Rückenmarks (Unger et al., 1998) sowie in sensiblen Spinalganglien kommt (Adeghate et al., 2006). Die Quantifizierung der CGRP-positiven Neurone in der letztgenannten Studie erfolgte zwar lediglich zum Zeitpunkt 4 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus, unterstützt jedoch grundsätzlich die hier vorgestellten Ergebnisse. Diese zeigen, dass im Rahmen des Diabetes mellitus bereits 4 Wochen nach dessen Induktion eine Abnahme CGRP-positiver Neurone im Spinalganglion zu beobachten ist. Im zeitlichen Verlauf nimmt der Rückgang mit Fortschreiten des Diabetes weiter zu. Anzumerken ist, dass der Rückgang von CGRP in den terminalen Fasern im Rückenmark und auch in sensiblen Spinalganglien bereits vor dem Rückgang der MOR einsetzt. Somit scheint eine gestörte Funktion des Nervs schon vor dem Verlust der MOR vorhanden zu sein. Eine mögliche Interpretation dieser Beobachtung ist die Vorstellung, dass relativ kurze Peptide wie das CGRP schneller und ausgeprägter als große Proteine wie Opioidrezeptoren auf Störungen der Nervenfunktion reagieren.

4.2.2 Nervus ischiadicus und subkutanes Pfortengewebe

Weiter distal entlang des peripheren Nervs konnte gezeigt werden, dass proximal der Nervenligatur die Akkumulation von MOR bei diabetischer Neuropathie bereits nach 4 Wochen signifikant geringer war als in Kontrolltieren, und dass sich die Abnahme im zeitlichen Verlauf fortsetzte. Unter physiologischen Bedingungen werden synthetisierte Peptide und Proteine durch

axonalen Transport anterograd in Richtung Peripherie verbracht. Nach Unterbrechung des axonalen Transports mittels Ligatur des Nervs kommt es zu einer Akkumulation der Peptide und Proteine proximal der Ligatur.

Da auch Opioidrezeptoren in den sensiblen Spinalganglien synthetisiert und anschließend anterograd zum peripheren Nerv transportiert werden (Hassan et al., 1993; Stein et al., 1990), kann anhand dieser Ergebnisse gezeigt werden, dass unter diabetischen Bedingungen deutlich weniger Rezeptoren in die Peripherie transportiert werden als in Kontrolltieren. Diese Beobachtung liefert gleichzeitig eine mögliche Erklärung für die Abnahme der Proteine im subkutanen Pfortengewebe (s. unten). Gleichgerichtete Veränderungen wurden auch für CGRP beobachtet. Unger et al. zeigten in immunhistochemischen Versuchen an Ratten 12 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus mit STZ neben den diskutierten Veränderungen von CGRP auf anderen Ebenen des peripheren Nervs auch eine Abnahme im N. ischiadicus. Allerdings werden Zahlenwerte für den N. ischiadicus nicht genannt, ferner wird keine Aussage gemacht, mit welcher Methode quantifiziert wurde. Bereits in frühen Studien konnte gezeigt werden, dass CGRP ähnlich wie MOR anterograd axonal vom Perikaryon in die Peripherie transportiert wird (Kashihara et al., 1989). Es ist daher nachvollziehbar, dass bei verminderter Synthese von CGRP im Spinalganglion konsekutiv auch eine Abnahme des Gehalts auf allen weiteren Ebenen des peripheren Nervs erfolgt.

MOR können nicht nur zentral auf spinaler und supraspinaler Ebene nachgewiesen werden, sondern wie bereits gezeigt auch entlang des peripheren Nervs (s. oben). Auch in den peripheren Endigungen der Spinalnerven, die in die Epidermis einstrahlen und sich dort aufzweigen, konnten Coggeshall et al. den immunhistochemischen Nachweis von MOR erbringen (Coggeshall et al., 1997). Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen nun, dass es bei Tieren mit diabetischer Neuropathie im subkutanen Pfortengewebe wie auf den anderen Ebenen des peripheren Nervensystems (s. oben) zu einer Abnahme der MOR auf Nervenfasern, die in die Epidermis einsproßen, kommt. Bereits vier Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus zeigte sich ein signifikanter Rückgang der immunoreaktiven Fasern mit fortschreitender Progression im weiteren zeitlichen Verlauf. Eine Studie an Mäusen hatte bereits eine verminderte Effektivität von lokal intraplantar appliziertem Morphin nach Nervenligatur gezeigt (Rashid et al., 2004). Diese Arbeitsgruppe hatte immunhistologisch lediglich sensorische Spinalganglien untersucht und dort eine Abnahme der MOR beobachtet. Die hier gezeigten Ergebnisse verifizieren mit dem Rückgang der Rezeptoren in peripheren Nervenendigungen nun weiter die Hypothese, dass das schlechte Ansprechen auf lokal appliziertes Morphin höchstwahrscheinlich durch Veränderungen des Rezeptorbesatzes auf dem peripheren Nerv bedingt ist. Bisher liegen keine

dezidierten Untersuchungen zum Einfluss der diabetischen Neuropathie auf den CGRP-Gehalt des subkutanen Pfortengewebes vor. Die hier gezeigten Daten belegen jedoch, dass es unter diabetischen Bedingungen zeitgleich mit der Abnahme von MOR auch zu einer Abnahme des Gehalts an CGRP in peripheren Nervenendigungen kommt. Diese Ergebnisse scheinen unter anderem durch den verminderten axonalen Transport bedingt zu sein.

Die bisher diskutierten Ergebnisse werfen die Frage auf, welche Mechanismen der Rezeptorregulation zugrunde liegen und welche Faktoren beteiligt sind. Obara et al. hatten (wie andere Studien auch) im Neuropathiemodell nach chronischer Konstriktion des N. ischiadicus der Ratte bereits nachgewiesen, dass die analgetische Wirksamkeit verschiedener Opioide vermindert war (Obara et al., 2009). Hingegen führte die gleiche Studie den Nachweis, dass lokal in die Pfote applizierte Agonisten des Opioidrezeptors bei Ratten mit zuvor induzierter Entzündungsreaktion zu einer signifikant verbesserten Analgesie führten. Shaqura et al. hatten dies betreffend in einer Studie gezeigt, dass ein Entzündungsgeschehen eine vermehrte G-Protein-Kopplung in Spinalganglien zur Folge hat (Shaqura et al., 2004). Die vermehrte Kopplung von G-Proteinen an MOR scheint eine verbesserte Analgesie zu bedingen. Parallel zu den hier gezeigten Versuchen wurden in der Arbeitsgruppe auch Verhaltensexperimente an Ratten mit diabetischer Neuropathie durchgeführt. Hier konnte - ähnlich den Versuchen mit Ligatur-induzierter Neuropathie - gezeigt werden, dass Fentanyl bei diabetischen Tieren im Pfortendrucktest eine signifikant geringere analgetische Wirksamkeit aufwies als bei unbehandelten Kontrolltieren.

In Zusammenschau der aufgeführten Untersuchungen kann nun davon ausgegangen werden, dass es bei Tieren mit diabetischer Neuropathie nach Injektion von STZ im Gegensatz zu Tieren mit lokaler Entzündungsreaktion zu einer Herabregulation von MOR im peripheren Nerv kommt. Die MOR-Synthese im Spinalganglion ist, wie oben gezeigt, unter diabetischen Bedingungen signifikant vermindert, wodurch es – bedingt durch den fehlenden anterograden axonalen Transport der Proteine – konsekutiv zu einer Abnahme der MOR weiter distal im peripheren Nerv kommt. Diese Ergebnisse sind sowohl mit den gezeigten vorangegangenen Studien vereinbar, erklären zum anderen aber auch die signifikant verminderte Analgesie nach Fentanyl-Gabe im Verhaltensmodell.

Es konnte gezeigt werden, dass MOR und CGRP-Gehalt des peripheren Nervs im Rahmen der diabetischen Neuropathie signifikant zurückgingen. Dies galt für alle untersuchten Abschnitte des Nervs von der zentralen Endigung im Hinterhorn des Rückenmarks bis zu Nervenfasern, die distal in die Epidermis einstrahlen. Diese Veränderungen im Rezeptorbesatz des Spinalnervs

scheinen verantwortlich zu sein für die schlechte Beeinflussbarkeit des neuropathischen Schmerzes durch lokal applizierte Opioide. Die Mechanismen der diabetischen Neuropathie scheinen denen der traumatisch-induzierten Neuropathie zu ähneln. In Zusammenschau der hier diskutierten Arbeiten erscheint es jedoch denkbar, dass der MOR-Rückgang im Rahmen der diabetischen Neuropathie später erfolgt als bei Ligatur-induziertem neuropathischem Schmerz.

4.3 Einfluss von Nervenwachstumsfaktor (NGF) auf periphere Nerven

Ziel der durchgeführten Untersuchungen war es, zu zeigen, ob die im Rahmen der diabetischen Neuropathie beobachtete Abnahme der Anzahl von MOR und CGRP-positiven Neuronen durch Gabe des Neurotrophins NGF verhindert werden kann. Diabetische Tiere wurden über einen Zeitraum von bis zu vier Tagen mit NGF behandelt. Daraus resultierte ein Wiederanstieg der Expression von MOR und CGRP im peripheren Nerv. Dieser Nachweis konnte auf allen Ebenen des peripheren Nervs (zentrale Nervenendigung, Zellkörper der sensorischen Spinalganglien, subkutanes Pfortengewebe sowie axonal transportierte Peptide und Rezeptoren) erbracht werden. Dieser Ansatz wurde gewählt, weil Studien am Tiermodell zeigen konnten, dass der NGF-Gehalt im peripheren Nerv im Rahmen des Diabetes mellitus signifikant vermindert war (Hellweg et al., 1991). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass es im Rahmen des Diabetes mellitus zu einem verminderten retrograden Transport von NGF entlang der peripheren Nerven kommt (Hellweg et al., 1994). Zum Einfluss von NGF auf die Expression von CGRP im Rahmen eines Diabetes mellitus lagen bereits Studien vor, in denen Rückenmarksgewebe und Spinalganglien untersucht wurden. Unger et al. behandelten Ratten 12 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus mit NGF in verschiedenen Konzentrationen. Die Gaben erfolgten als einmalige Injektionen drei Mal wöchentlich über weitere 12 Wochen. Die anschließende Auswertung der Spinalganglien erfolgte mittels Radioimmunassay (Unger et al., 1998). Unger et al. konnten zeigen, dass sowohl eine niedrige (0,1 mg/kg KG) als auch eine hohe (0,5 mg/kg KG) Konzentration von NGF einen signifikanten Anstieg von CGRP in Spinalganglien von NGF-behandelten gegenüber Kontrolltieren bewirkte. Auch im Hinterhorn des Rückenmarks beobachteten Unger et al. einen Wiederanstieg des CGRP-Gehaltes, Zahlen werden hier jedoch nicht genannt. Auch Studien an Spinalganglien von Mäusen nach STZ-induziertem Diabetes mellitus zum Einfluss von NGF auf die CGRP-Expression zeigten eine Prävention des Rückgangs (Sango et al., 1994).

Zusätzlich konnte nun gezeigt werden, dass neben CGRP auch die Zahl der MOR im Spinalganglion nach NGF-Behandlung wieder zunimmt. Da MOR vom Ort ihrer Synthese aus anterograd entlang des peripheren Nervs transportiert werden, kommt es in der Folge auch zu einem Wiederanstieg der MOR im Hinterhorn des Rückenmarks, im subkutanen Pfotengewebe sowie im N. ischiadicus proximal einer Ligatur. Bisherige Untersuchungen zum Einfluss von NGF hatten nicht die Veränderung von MOR, sondern lediglich den Einfluss von NGF auf die analgetische Wirksamkeit von Opioiden bei neuropathischem Schmerz betrachtet. So untersuchten Cahill et al. an Ratten nach Ligatur des N. ischiadicus einen Effekt von NGF auf die Wirksamkeit von intrathekal appliziertem Morphin (Cahill et al., 2003). Dabei fand die Arbeitsgruppe eine signifikant verbesserte analgetische Wirksamkeit des applizierten Morphins nach NGF-Behandlung. In einem anderen Versuchsansatz injizierten Mousa et al. Freund's complete adjuvans (FCA) in die Pfoten von Ratten. FCA verursacht eine lokale Entzündung im Gewebe. In der Folge zeigte sich ein signifikant gesteigerter retrograder Transport von NGF in Richtung des Spinalganglions, sowie wiederum eine gesteigerte Expression von MOR im Spinalganglion. Die Neutralisation von NGF mittels Gabe eines NGF spezifischen Antiserums hob diese Wirkung auf, während die intraplantare Gabe von NGF ähnliche Effekt wie die Induktion der Entzündung (Mousa et al., 2007) erzielte. Molliver et al. hatten außerdem zeigen können, dass bei transgenen Mäusen mit NGF-Überexpression auch die Zahl der MOR etwa 3-fach höher liegt als bei Vergleichstieren (Molliver et al., 2005). NGF ist damit als Faktor identifiziert, der durch die Regulation von MOR die Schmerzbeeinflussung moduliert.

Parallel zu den hier gezeigten Versuchen wurden Verhaltensversuche mit diabetischen Ratten durchgeführt (nicht Teil dieser Arbeit). Als Folge der NGF-Behandlung wiesen auch diese Tiere ein signifikant besseres Ansprechen auf lokal appliziertes Fentanyl auf als diabetische Kontrolltiere. Die Ergebnisse zeigen also, dass die mehrtägige Behandlung mit NGF zu einem Wiederanstieg von MOR und des Neuropeptids CGRP führen. Dieser Wiederanstieg scheint die verbesserte analgetische Potenz von lokal applizierten Opioiden im Rahmen der Diabetischen Neuropathie zu bedingen.

4.4 Einfluss von Insulin-ähnlichem Wachstumsfaktor (IGF) auf periphere Nerven

Von Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF) ist bekannt, dass sie einen regulatorischen Einfluss auf Neurone haben, die im Rahmen des Diabetes mellitus Veränderungen unterliegen

(Ishii et al., 1994). Im Tiermodell an Ratten war gezeigt worden, dass es sowohl bei diabetischer Neuropathie nach Injektion von STZ, als auch nach Axotomie des N. ischiadicus zu einer signifikanten Abnahme von IGF1 kommt (Craner et al., 2002). Hieraus leitete sich eine mögliche Beteiligung von IGF1 an der Entstehung und Beeinflussung der diabetischen Neuropathie ab. Zhuang et al. konnten an Ratten mit STZ-induziertem Diabetes mellitus bereits zeigen, dass nach kontinuierlicher i.t. Infusion von IGF1 über sieben Tage mit einer insgesamt applizierten Menge von 33,6 µg/Tier die zuvor beobachtete mechanische Hyperalgesie reversibel war (Zhuang et al., 1996). Die Behandlung mit IGF1 erfolgte sieben Tage nach Induktion des Diabetes mellitus. Über die Studie von Zhuang et al. hinaus gibt es keine Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit der Opioidanalgesie durch IGF1. Äquivalente Studien wie von Cahill et al. zur Effektivität von Opioiden bei gleichzeitiger Behandlung mit NGF liegen für IGF1 nicht vor. In Verhaltensversuchen der eigenen Arbeitsgruppe konnte jetzt erstmals gezeigt werden, dass IGF1 die Effektivität von lokal appliziertem Fentanyl in Ratten mit STZ-induziertem Diabetes mellitus wieder herstellt. IGF1 bewirkt also ähnliche Effekte wie NGF. Bisher lagen jedoch keine Untersuchungen zum Einfluss von IGF1 auf Rezeptorebene vor. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen nun in Ergänzung zu den Beobachtungen des Verhaltensmodells, dass IGF1 die Expression von MOR und CGRP signifikant steigern kann. Die erhöhte Rezeptorzahl scheint den Wirksamkeitsanstieg des Fentanyls zu begründen. Zhuang et al. beobachteten die Beeinflussung der Hyperalgesie durch IGF1 zwar unabhängig von einer Behandlung mit Opiaten (im Gegensatz zur eigenen Arbeitsgruppe), es ist jedoch anzunehmen, dass auch endogene Opioide aufgrund der durch IGF1 gesteigerten Rezeptorzahl eine höhere analgetische Potenz aufweisen. Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse würden somit auch die Beobachtungen von Zhuang erklären. Der immunhistochemisch beobachtete protektive Einfluss von IGF1 gilt für alle untersuchten Gewebe. In Spinalganglien konnte zu allen untersuchten Zeitpunkten eine Prävention des Rückgangs der MOR beobachtet werden, der mit ca. 150% deutlich über dem Ausgangswert der unbehandelten Kontrolltiere lag. Der im Hinterhorn des Rückenmarks und im N. ischiadicus beobachtete Wiederanstieg ist ebenfalls signifikant, jedoch nicht so hoch wie im Spinalganglion. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der durch die diabetische Neuropathie bedingte Rückgang von MOR und CGRP also nicht nur durch NGF, sondern auch durch das Wachstumshormon IGF1 aufgehoben werden kann.

4.5 Protein Gene Product 9.5 (PGP-9.5)

Ziel dieser immunhistochemischen Untersuchung war es, sicherzustellen, dass es im Rahmen der diabetischen Neuropathie lediglich zu einer Herabregulierung der MOR und von CGRP bei noch vitalen Nerven kommt. Es sollte ausgeschlossen werden, dass nicht der Untergang neuralen Gewebes für den Verlust von MOR und CGRP verantwortlich ist. Hierzu wurde an Schnitten durch das subkutane Pfortengewebe der Anteil PGP-9.5-positiver Nervenfasern quantifiziert.

Die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen weder vier, acht oder 12 Wochen nach Beginn des Diabetes mellitus einen Unterschied in der Anzahl PGP-9.5-positiver Fasern. Karanth et al. hatten ebenfalls, wie einleitend erwähnt, in einem Tiermodell an Ratten mit Diabetes mellitus keine Veränderungen der PGP-9.5-positiven Fasern beobachten können (Karanth et al., 1990). Die Untersuchungen erfolgten zu den Zeitpunkten zwei, vier, acht und 12 Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus. Diese Studie zeigt wie die eigenen Daten, dass es auch im Verlauf der diabetischen Neuropathie bis einschließlich der 12. Woche nicht zu Veränderungen der PGP-9.5-positiven Fasern kommt. Eine unveränderte Zahl dieser Fasern steht im Widerspruch zu Toth et al., die, wie einleitend erwähnt, bei Sprague-Dawley Ratten 8 Wochen nach STZ-Injektion, jedoch ohne den zeitlichen Verlauf zu beobachten, einen signifikanten Rückgang der PGP-9.5-positiven Neurone gefunden hatten (Toth et al., 2006). Allerdings unterscheidet sich in dieser Studie die Art der Quantifizierung der Nervenfasern: Den hier gezeigten Daten liegt eine Auszählung sämtlicher in die Epidermis distal des dermal-epidermalen Übergangs einsproßender Nervenfasern zugrunde. Toth et al. schlossen hingegen Fasern aus, die Kontakt zu dendritischen Zellen hatten oder Fasern mit Kontakt zu Talgdrüsen. Zum anderen unterscheidet sich das Tiermodell. Toth et al. injizierten STZ intraperitoneal. Vergleichende Studien zwischen intraperitonealer und intravenöser Injektion liegen zwar nicht vor, Fox et al. kommen in einer Studie zum STZ-Modell jedoch zu dem Schluss, dass die i.p. Applikation von STZ zu einem schweren Krankheitsbild führt (Fox et al., 1999). Es besteht daher die Möglichkeit, dass dies die Entwicklung einer Neuropathie beschleunigt.

Bei sehr unterschiedlichen Ergebnissen verschiedener Studien bleibt die Diskussion kontrovers. In den hier gezeigten Untersuchungen konnte kein Verlust PGP-9.5-positiver Nervenfasern nachgewiesen werden. Während dies die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützt, steht es solchen entgegen, die im Rahmen des experimentellen Diabetes mellitus bereits früh einen Verlust von Nervenfasern vermuten. Da der Rückgang von MOR und CGRP durch Applikation der neurotrophen Faktoren NGF und IGF1 verhindert werden konnte, kann in Zusammenschau aller hier gezeigten Ergebnisse angenommen werden, dass periphere Nerven, bedingt durch

einen Diabetes mellitus zwar in ihrer Funktion eingeschränkt werden, jedoch zunächst weiterhin vital bleiben. Der ausbleibende Verlust PGP-9.5-positiver Fasern unterstützt diese These. Er schließt jedoch nicht Veränderungen in den Myelinscheiden myelinisierter Nervenfasern aus. Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe (nicht veröffentlicht) konnten dies an elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigen.

4.6 Anstieg der phosphorylierten MOR in sensiblen Spinalganglien

Die Phosphorylierung und nachfolgende Inaktivierung von Opioidrezeptoren kann zum einen durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen, zum anderen jedoch auch durch second-messenger abhängige Proteinkinasen erfolgen. Gucker und Bidlack konnten 1992 bereits eine Beteiligung der PKC bei der Phosphorylierung von DOR in Neuroblastom-/Gliomhybridzellen nachweisen (Gucker und Bidlack, 1992). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte den Einfluss der PKC auch auf die Phosphorylierung von MOR auf Ovarialzellen des Hamsters (Ueda et al., 2001). Durch DAMGO wurde im Tiermodell eine Morphintoleranz erzeugt. Diese Toleranzentwicklung konnte hier durch Behandlung mit dem PKC-Inhibitor Calphostin C verhindert werden. Zhang et al. konnten in einer ähnlichen Studie zeigen, dass die Aktivierung der PKC durch Phorbol zu einem fünffachen Anstieg der Phosphorylierung von MOR führt. Die beobachteten Effekte konnten jedoch wiederum durch Calphostin C verhindert werden (Zhang et al., 1996). Diese Beobachtungen der Studien zeigen zum einen die Beteiligung der PKC an der Inaktivierung der Opioidrezeptoren und zum anderen die Beeinflussbarkeit der PKC-Aktivität. Der prinzipielle Aufbau aller Arbeiten, die eine Phosphorylierung durch Proteinkinasen beschreiben ist dahingehend ähnlich, dass zunächst eine Exposition mit einem exogenen Opioidrezeptor-Agonisten erfolgt, was eine Phosphorylierung des Rezeptors zur Folge hat. Im Modell der diabetischen Neuropathie findet diese Exposition jedoch nicht statt. Dennoch konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass der Anteil von pMOR in sensiblen Spinalganglien im Rahmen der diabetischen Neuropathie – auch ohne exogenen MOR-Agonisten – bereits 15 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus signifikant angestiegen war. Eine Studie von Narita et al. zeigte den direkten Zusammenhang zwischen peripherer Neuropathie und der Phosphorylierung von MOR: Die Neuropathie in diesem Versuchsaufbau wurde mittels Ligatur des N. ischiadicus bei Mäusen verursacht. Es wurde nachgewiesen, dass sieben Tage nach der Ligatur die Immunoreaktivität phosphorylierter MOR im Rückenmark der Tiere signifikant angestiegen war (Narita et al., 2004). Der Anstieg betrug etwa das Zweifache des Wertes unbehandelter

Kontrolltiere. Einen Anstieg dieser Größenordnung konnten Daten der eigenen Arbeit erst zwei Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus beobachten. In einer späteren Studie der Arbeitsgruppe von Narita wurde nach festgelegtem Schema Ethanol über einen Zeitraum von 70 Tagen an Ratten verabreicht. Die Aufnahme des Ethanols erfolgte per os. In Verhaltensversuchen konnte gezeigt werden, dass die Schwellenwerte für mechanische Schmerzreize signifikant sanken, dass Ethanol-behandelte Tiere also schneller mit einem Wegziehen der Pfote auf Druck reagierten als unbehandelte Kontrolltiere. Gleichzeitig war die antinozizeptive Wirkung von Morphin deutlich verringert. Im Anschluss an die Verhaltensversuche wurden von Narita et al. immunhistochemische Untersuchungen an Rückenmarksgewebe durchgeführt. Hierbei zeigte sich im Immunoblot keine Veränderung der MOR, hingegen aber eine signifikante Zunahme von PKC (Narita et al., 2007). Die Isoform der PKC wird in dem Versuch nicht genannt. Narita et al. gehen in der Zusammenschau ihrer Ergebnisse davon aus, dass die PKC an der Fehlfunktion der MOR beteiligt ist.

Beide Studien unterstützen die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse. Während sich die Zahl der MOR-positiven Neurone im Spinalganglion nach 4 Wochen zunächst noch nicht signifikant verändert hatte (s. späte Phase) kam es relativ früh bereits zu einer Phosphorylierung der Rezeptoren, die Einfluss auf die Funktion der MOR hat. Damit ist mit der Phosphorylierung von MOR ein möglicher Mechanismus identifiziert, der im Rahmen des Diabetes mellitus mitverantwortlich dafür ist, dass Morphin und andere Opiate den neuropathischen Schmerz nur unzureichend beeinflussen können. Im zeitlichen Verlauf setzte sich der Anstieg der phosphorylierter MOR in den Ergebnissen dieser Arbeit weiter fort. Dabei konnte zum Zeitpunkt 30 Tage eine deutlich zellzentrale Immunfluoreszenz (s. Abb. 3.22) beobachtet werden. Dies ist vereinbar mit der Annahme, dass die pMOR von der Zellmembran kommend zunächst internalisiert und dann intrazellulär abgebaut werden, was die zentrale Dichte der Fluoreszenz bedingt. Weitere Beispiele in der Literatur gibt es hierfür allerdings nicht.

4.7 Anstieg von PKC α in sensiblen Spinalganglien

Ein weiterführender Bestandteil dieser Arbeit war, zu untersuchen, welche Rolle die second-messenger-abhängige PKC α (eine Isoform der PKC) bei der Phosphorylierung von MOR im Rahmen der diabetischen Neuropathie spielt. Frühere Untersuchungen hatten bereits gezeigt, dass es nach Ligatur des N. ischiadicus bei Ratten zu einem signifikanten Anstieg der Expression von PCK γ im Rückenmark gekommen war (Mao et al., 1995; Miletic et al., 2000). Ferner ist

bekannt, dass PCK γ -knockout-Mäuse kein neuropathisches Schmerzsyndrom entwickeln (Malmberg et al., 1997). Dies legte die Vermutung nahe, dass die PKC insgesamt oder eines ihrer Isoenzyme eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Beeinflussung neuropathischer Schmerzen spielt. Verschiedene Studien haben sich auch mit der Rolle der PKC im Rahmen der diabetischen Neuropathie befasst. Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es nach Injektion von STZ zu einem signifikanten Anstieg der PKC-Expression im Rückenmark gekommen war (Honda et al., 2007). Welche Funktion spezifisch die PKC α übernimmt wurde nicht untersucht. Mao et al., die im Hinterhorn des Rückenmarks von Ratten (wiederum 8 Tage nach Ligatur des N. ischiadicus) eine erhöhte Aktivität von PKC γ gefunden hatten, gingen jedoch bereits davon aus, dass es unter neuropathischen Bedingungen auch zu einer Veränderung der Expression von PKC α kommt (Mao et al., 1995). In der hier vorgelegten Arbeit konnte nun ein signifikanter Anstieg der PKC α -exprimierenden Neurone, die gleichzeitig MOR-positiv waren, beobachtet werden. Nicht in sensiblen Spinalganglien sondern im N. ischiadicus diabetischer Ratten hatten Borghini et al. in einer früheren Studie 1994 keine Veränderungen der Aktivität von PKC α , β I, β II und ϵ beobachtet (Borghini et al., 1994). Geht man jedoch davon aus, dass die primäre Regulation, die Synthese und der Abbau von Rezeptoren, im Spinalganglion stattfindet, wären Veränderungen auf der Ebene des peripheren Nervs zunächst auch nicht zu erwarten. Somit stehen die hier vorgestellten Daten nicht grundsätzlich im Widerspruch zu den Ergebnissen von Borghini et al. und belegen außerdem die Annahme von Mao et al. In Ergänzung hierzu beobachteten Roberts et al. bei diabetischen Ratten eine Umverteilung der PKC α im N. ischiadicus vom zytosolischen zum korpuskulären (particulate) Kompartiment. Der Gesamtgehalt an PKC α blieb jedoch unverändert. Dies könnte als eine Aktivierung des Enzyms verstanden werden. Bei gleichzeitiger Ligatur des Nervs konnte insgesamt ein Anstieg von PKC α beobachtet werden. Auch im Rückenmark war PKC α unter diabetischen Bedingungen angestiegen (Roberts und McLean, 1997).

Mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sind die hier gezeigten Ergebnisse also gut vereinbar. Es konnte gezeigt werden, dass unter diabetischen Bedingungen relativ früh eine signifikant gesteigerte Expression von PCK α im Spinalganglion stattfindet, während sich die Zahl MOR-positiver Neurone noch nicht signifikant veränderte. Allerdings war ein signifikanter Anstieg der PKC α erst 30 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus zu verzeichnen, während die pMOR wie oben gezeigt bereits nach 15 Tagen signifikant gegenüber nicht-diabetischen Kontrolltieren gestiegen waren. Dies unterstützt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die gezeigt hatten, dass PKC α nicht alleine an der Phosphorylierung beteiligt ist. Vielmehr scheint es sich um ein Zusammenspiel mehrerer Isoenzyme zu handeln. Dennoch wurde nachgewiesen,

dass die PKC α eine wichtige Rolle bei der Phosphorylierung des G-Protein-gekoppelten MOR spielt. Die Kinase ist damit an der Inaktivierung von MOR beteiligt noch bevor immunhistochemisch eine verminderte Rezeptorzahl nachweisbar wird.

4.8 Reversibilität nach Gabe von Calphostin C

Calphostin C ist als selektiver Blocker der Proteinkinase C bekannt (Tamaoki und Nakano, 1990). Unter der Annahme, dass, wie oben beschrieben, die PKC zur Phosphorylierung und damit Inaktivierung der MOR beiträgt, wurden diabetische Ratten i.t. mit Calphostin C behandelt. Honda et al. hatten an diabetischen Ratten bereits gezeigt, dass die Applikation von Calphostin C sieben Tage nach Diabetesinduktion mit STZ zu einem Wiederanstieg der Schmerzschwelle und somit zu einer verbesserten Analgesie führte. Die Ergebnisse zeigten sich dosisabhängig von der Menge des injizierten Calphostin C (Honda et al., 2007). Auch Oshawa et al. zeigten in einer Studie an Mäusen, die 7 Tage nach Ligatur des N. ischiadicus Calphostin C erhielten, dass ein Wiederanstieg der Schmerzschwelle stattfand (Ohsawa et al., 2000). Andererseits konnten Kamei et al. nachweisen, dass die Applikation von Phorbol-Estern bei diabetischen Mäusen zu einer Verstärkung der Hyperalgesie bei thermischen Reizen führt (Kamei et al., 2001). Phorbol-Ester sind in der Lage, die PKC zu aktivieren. Verschiedene Substanzen mit Einfluss auf die PKC sind somit identifiziert. In den hier vorgestellten Untersuchungen konnte nun auf zellulärer Ebene gezeigt werden, dass die signifikant angestiegene Zahl von pMOR bei diabetischen Tieren durch i.t. Behandlung mit Calphostin C abnahm. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen dem Anteil von pMOR und der Gabe von Calphostin gibt. Gleichzeitig konnte in einem Verhaltensmodell innerhalb der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass Ratten mit diabetischer Neuropathie nach Behandlung mit Calphostin C im Pfotendrucktest signifikant besser auf Fentanyl ansprachen als rein diabetische Kontrolltiere.

Die Ergebnisse liefern damit eine Erklärung auf zellulärer Ebene für die beschriebenen Beobachtungen. Die Applikation von Calphostin C bei neuropathischem Schmerz im Tiermodell inhibiert die PKC-abhängige Phosphorylierung von MOR und verhindert somit deren Inaktivierung. Aufgrund der Tatsache, dass MOR in der frühen Phase unverändert in der Membran nachweisbar sind, kommt es zu einer Wiederherstellung der Analgesie. Die gezeigten Studien zur positiven Beeinflussbarkeit des neuropathischen Schmerzes wurden jedoch in sehr frühen Stadien (sieben Tage) der Neuropathie durchgeführt. Zukünftige Studien sollten daher

zeigen, inwiefern neuropathischer Schmerz durch Calphostin C auch noch im weiteren Krankheitsverlauf beeinflusst werden kann.

5. Schlussfolgerungen

Die diabetische Neuropathie ist eine Erkrankung, die unter anderem mit Veränderungen des peripheren Nervensystems einhergeht. Die im Rahmen dieser Veränderungen häufig auftretenden Schmerzen lassen sich medikamentös oftmals nicht zufriedenstellend behandeln. Insbesondere die Behandlung mit Opioiden zeigt vielfach nur unzureichende Effekte.

Bisherige Untersuchungen zu der Thematik im Tiermodell waren hauptsächlich davon ausgegangen, dass Veränderungen - insbesondere solche der Opioidrezeptoren - im zentralen Nervensystem hierfür verantwortlich zeichnen. Da jedoch im Rahmen des Diabetes mellitus in erster Linie auch das periphere Nervensystem Veränderungen durchläuft, liegt die Vermutung nahe, dass auch die dort lokalisierten Opioidrezeptoren eine wesentliche Beteiligung an dem noch unzureichend geklärten Pathomechanismus haben.

Im Tiermodell einer mittels Streptozotocin-induzierten Diabetischen Neuropathie sollte daher der Einfluss des Diabetes auf die schmerzmodulierende Funktion des Nervs untersucht werden. Hierbei wurden mittels Immunhistochemie in einer späten Phase des Diabetes mellitus MOR und der Marker CGRP im zeitlichen Verlauf verfolgt. Außerdem wurde der Einfluss der Neurotrophine NGF und IGF1 auf die Expression von MOR und CGRP untersucht. Zusätzlich erfolgte der Nachweis von Protein Gene Product 9.5.

In einer frühen Phase des Diabetes mellitus lag der Fokus der Untersuchungen auf der Phosphorylierung der MOR und einer möglichen Beeinflussung dieses Vorgangs.

Zusammenfassend kann folgendes festgestellt werden: MOR und CGRP werden im peripheren Nerv co-exprimiert und sind auf diesem ubiquitär nachweisbar. Im Rahmen des experimentellen Diabetes mellitus konnte ein Rückgang von MOR und CGRP auf allen Ebenen des peripheren Nervs beobachtet werden. Der Rückgang von MOR liefert eine plausible Erklärung für die verminderte analgetische Wirksamkeit von Opioiden in Versuchstieren mit Diabetes mellitus. Gleichzeitig konnte durch den Nachweis des neuronalen Markers PGP-9.5 gezeigt werden, dass es nicht zu einem Verlust von Nervenfasern selbst kommt.

Durch den experimentellen Einsatz von Wachstumsfaktoren konnte demonstriert werden, dass NGF bzw. IGF1 die verminderte periphere analgetische Wirksamkeit der Opiode wieder herstellen können. Immunhistochemisch wurde gezeigt, dass der durch den Diabetes mellitus bedingte Rückgang der Rezeptoren durch beide Wachstumsfaktoren verhindert werden konnte.

Vor dem quantitativen Rückgang der MOR kommt es in einer frühen Phase der diabetischen Neuropathie zu einem Anstieg von PKC α . Diese Unterform der PKC ist an der Phosphorylierung und damit am Prozess der Inaktivierung der MOR beteiligt. Die Phosphorylierung und der damit

vergesellschaftete Wirkungsverlust der Opioide konnten durch den PKC-Inhibitor Calphostin C verhindert werden.

Die peripheren MOR tragen wie die zentralen MOR zu einer Analgesievermittlung durch Opioide bei. Somit scheinen die MOR und ihrer Regulation im peripheren Nerv hauptverantwortlich zu sein für die Beeinflussbarkeit neuropathischer Schmerzen durch lokal applizierte Opioide.

6. Literatur

6.1 Referenzliste

- Adeghate E, Rashed H, Rajbandari S, Singh J. Pattern of distribution of calcitonin gene-related Peptide in the dorsal root ganglion of animal models of diabetes mellitus. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1084:296-303.
- Ahlgren SC, Levine JD. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. *Neuroscience* 1993;52[4]:1049-55.
- Akkina SK, Patterson CL, Wright DE. GDNF rescues nonpeptidergic unmyelinated primary afferents in streptozotocin-treated diabetic mice. *Exp Neurol* 2001;167[1]:173-82.
- Aley KO, Levine JD. Rapid onset pain induced by intravenous streptozotocin in the rat. *J Pain* 2001;2[3]:146-50.
- Apfel SC, Arezzo JC, Brownlee M, Federoff H, Kessler JA. Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy. *Brain Res* 1994;634[1]:7-12.
- Arner S, Meyerson BA. Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain. *Pain* 1988;33[1]:11-23.
- Back SK, Lee J, Hong SK, Na HS. Loss of spinal mu-opioid receptor is associated with mechanical allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. *Pain* 2006;123[1-2]:117-26.
- Bennett GJ, Xie YK. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 1988;33[1]:87-107.
- Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1990;1031[2]:163-224.
- Borghini I, nia-Lahuerta A, Regazzi Ret al. Alpha, beta I, beta II, delta, and epsilon protein kinase C isoforms and compound activity in the sciatic nerve of normal and diabetic rats. *J Neurochem* 1994;62[2]:686-96.
- Boucher TJ, McMahon SB. Neurotrophic factors and neuropathic pain. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1[1]:66-72.
- Boulton AJ, Vinik AI, Arezzo JC et al. Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 2005;28[4]:956-62.
- Brownlee M. Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care* 1992;15[12]:1835-43.
- Cahill CM, Dray A, Coderre TJ. Intrathecal nerve growth factor restores opioid effectiveness in an animal model of neuropathic pain. *Neuropharmacology* 2003;45[4]:543-52.

- Calcutt NA. Experimental models of painful diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 2004;220[1-2]:137-9.
- Carlton SM, McNeill DL, Chung K, Coggeshall RE. Organization of calcitonin gene-related peptide-immunoreactive terminals in the primate dorsal horn. *J Comp Neurol* 1988;276[4]:527-36.
- Chen SR, Pan HL. Antinociceptive effect of morphine, but not mu opioid receptor number, is attenuated in the spinal cord of diabetic rats. *Anesthesiology* 2003;99[6]:1409-14.
- Chen SR, Sweigart KL, Lakoski JM, Pan HL. Functional mu opioid receptors are reduced in the spinal cord dorsal horn of diabetic rats. *Anesthesiology* 2002;97[6]:1602-8.
- Chong MS, Hester J. Diabetic painful neuropathy: current and future treatment options. *Drugs* 2007;67[4]:569-85.
- Christianson JA, Riekhof JT, Wright DE. Restorative effects of neurotrophin treatment on diabetes-induced cutaneous axon loss in mice. *Exp Neurol* 2003;179[2]:188-99.
- Coggeshall RE, Zhou S, Carlton SM. Opioid receptors on peripheral sensory axons. *Brain Res* 1997;764[1-2]:126-32.
- Colleoni M, Sacerdote P. Murine models of human neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta* 2009.
- Craner MJ, Klein JP, Black JA, Waxman SG. Preferential expression of IGF-I in small DRG neurons and down-regulation following injury. *Neuroreport* 2002;13[13]:1649-52.
- Daousi C, MacFarlane IA, Woodward A et al. Chronic painful peripheral neuropathy in an urban community: a controlled comparison of people with and without diabetes. *Diabet Med* 2004;21[9]:976-82.
- Dobretsov M, Romanovsky D, Stimers JR. Early diabetic neuropathy: triggers and mechanisms. *World J Gastroenterol* 2007;13[2]:175-91.
- Doran JF, Jackson P, Kynoch PA, Thompson RJ. Isolation of PGP 9.5, a new human neurone-specific protein detected by high-resolution two-dimensional electrophoresis. *J Neurochem* 1983;40[6]:1542-7.
- Dworkin RH, O'Connor AB, Backonja M et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. *Pain* 2007;132[3]:237-51.
- Eichberg J. Protein kinase C changes in diabetes: is the concept relevant to neuropathy? *Int Rev Neurobiol* 2002;50:61-82.
- Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 2001;53[1]:1-24.
- Fox A, Eastwood C, Gentry C, Manning D, Urban L. Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat. *Pain* 1999;81[3]:307-16.

- Gucker S, Bidlack JM. Protein kinase C activation increases the rate and magnitude of agonist-induced delta-opioid receptor down-regulation in NG108-15 cells. *Mol Pharmacol* 1992;42[4]:656-65.
- Halawa MR, Karawagh A, Zeidan A et al. Prevalence of painful diabetic peripheral neuropathy among patients suffering from diabetes mellitus in Saudi Arabia. *Curr Med Res Opin* 2010;26[2]:337-43.
- Hall KE, Liu J, Sima AA, Wiley JW. Impaired inhibitory G-protein function contributes to increased calcium currents in rats with diabetic neuropathy. *J Neurophysiol* 2001;86[2]:760-70.
- 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[1]:185-95.
- Hellweg R, Hartung HD. Endogenous levels of nerve growth factor (NGF) are altered in experimental diabetes mellitus: a possible role for NGF in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *J Neurosci Res* 1990;26[2]:258-67.
- Hellweg R, Raivich G, Hartung HD, Hock C, Kreutzberg GW. Axonal transport of endogenous nerve growth factor (NGF) and NGF receptor in experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol* 1994;130[1]:24-30.
- Hellweg R, Wöhrle M, Hartung HD et al. Diabetes mellitus-associated decrease in nerve growth factor levels is reversed by allogeneic pancreatic islet transplantation. *Neurosci Lett* 1991;125[1]:1-4.
- Herzberg U, Eliav E, Dorsey JM, Gracely RH, Kopin IJ. NGF involvement in pain induced by chronic constriction injury of the rat sciatic nerve. *Neuroreport* 1997;8[7]:1613-8.
- Hirata A, Nakamura R, Kwak S, Nagata N, Kamakura K. AMPA receptor-mediated slow neuronal death in the rat spinal cord induced by long-term blockade of glutamate transporters with THA. *Brain Res* 1997;771[1]:37-44.
- Honda K, Koguchi M, Koga K et al. Contribution of Ca²⁺-dependent protein kinase C in the spinal cord to the development of mechanical allodynia in diabetic mice. *Biol Pharm Bull* 2007;30[5]:990-3.
- Ikeda T, Ishida Y, Naono R et al. Effects of intrathecal administration of newer antidepressants on mechanical allodynia in rat models of neuropathic pain. *Neurosci Res* 2009;63[1]:42-6.
- Ishii DN, Glazner GW, Pu SF. Role of insulin-like growth factors in peripheral nerve regeneration. *Pharmacol Ther* 1994;62[1-2]:125-44.
- Ji RR, Zhang Q, Law PY et al. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci* 1995;15[12]:8156-66.
- Kamei J, Mizoguchi H, Narita M, Tseng LF. Therapeutic potential of PKC inhibitors in painful diabetic neuropathy. *Expert Opin Investig Drugs* 2001;10[9]:1653-64.

- Karanth SS, Springall DR, Francavilla S, Mirrlees DJ, Polak JM. Early increase in. *Histochemistry* 1990;94[6]:659-66.
- Kashihara Y, Sakaguchi M, Kuno M. Axonal transport and distribution of endogenous calcitonin gene-related peptide in rat peripheral nerve. *J Neurosci* 1989;9[11]:3796-802.
- Kawada J. [New hypotheses for the mechanisms of streptozotocin and alloxan inducing diabetes mellitus]. *Yakugaku Zasshi* 1992;112[11]:773-91.
- Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;159[2]:548-53.
- Kohno T, Ji RR, Ito Net al. Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord. *Pain* 2005;117[1-2]:77-87.
- Lewin GR, Rueff A, Mendell LM. Peripheral and central mechanisms of NGF-induced hyperalgesia. *Eur J Neurosci* 1994;6[12]:1903-12.
- Li JL, Ding YQ, Li YQ et al. Immunocytochemical localization of mu-opioid receptor in primary afferent neurons containing substance P or calcitonin gene-related peptide. A light and electron microscope study in the rat. *Brain Res* 1998;794[2]:347-52.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . *Science* 1997;278[5336]:279-83.
- Mao J, Price DD, Phillips LL, Lu J, Mayer DJ. Increases in protein kinase C gamma immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. *Neurosci Lett* 1995;198[2]:75-8.
- Migdalis IN, Kalogeropoulou K, Kalantzis Let al. Insulin-like growth factor-I and IGF-I receptors in diabetic patients with neuropathy. *Diabet Med* 1995;12[9]:823-7.
- Miletic V, Bowen KK, Miletic G. Loose ligation of the rat sciatic nerve is accompanied by changes in the subcellular content of protein kinase C beta II and gamma in the spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 2000;288[3]:199-202.
- Molliver DC, Lindsay J, Albers KM, Davis BM. Overexpression of NGF or GDNF alters transcriptional plasticity evoked by inflammation. *Pain* 2005;113[3]:277-84.
- Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura Met al. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain* 2007;130[Pt 2]:502-13.
- 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[1-2]:71-8.
- Naik AK, Tandan SK, Dudhgaonkar SP et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *Eur J Pain* 2006;10[7]:573-9.

- Narita M, Kuzumaki N, Suzuki Met al. Increased phosphorylated-mu-opioid receptor immunoreactivity in the mouse spinal cord following sciatic nerve ligation. *Neurosci Lett* 2004;354[2]:148-52.
- Narita M, Miyoshi K, Narita M, Suzuki T. Functional reduction in mu-opioidergic system in the spinal cord under a neuropathic pain-like state following chronic ethanol consumption in the rat. *Neuroscience* 2007;144[3]:777-82.
- Ninkovic M, Hunt SP, Gleave JR. Localization of opiate and histamine H1-receptors in the primate sensory ganglia and spinal cord. *Brain Res* 1982;241[2]:197-206.
- Obara I, Parkitna JR, Korostynski Met al. Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain. *Pain* 2009;141[3]:283-91.
- Ohsawa M, Narita M, Mizoguchi H, Suzuki T, Tseng LF. Involvement of spinal protein kinase C in thermal hyperalgesia evoked by partial sciatic nerve ligation, but not by inflammation in the mouse. *Eur J Pharmacol* 2000;403[1-2]:81-5.
- Okajima K, Harada N. Promotion of insulin-like growth factor-I production by sensory neuron stimulation; molecular mechanism(s) and therapeutic implications. *Curr Med Chem* 2008;15[29]:3095-112.
- Pittenger GL, Ray M, Burcus N et al. Intraepidermal nerve fibers are indicators of small-fiber neuropathy in both diabetic and nondiabetic patients. *Diabetes Care* 2004;27[8]:1974-9.
- Properzi G, Francavilla S, Poccia G et al. Early increase precedes a depletion of VIP and PGP-9.5 in the skin of insulin-dependent diabetics--correlation between quantitative immunohistochemistry and clinical assessment of peripheral neuropathy. *J Pathol* 1993;169[2]:269-77.
- Rashid MH, Inoue M, Toda K, Ueda H. Loss of peripheral morphine analgesia contributes to the reduced effectiveness of systemic morphine in neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;309[1]:380-7.
- Ren K, Thomas DA, Dubner R. Nerve growth factor alleviates a painful peripheral neuropathy in rats. *Brain Res* 1995;699[2]:286-92.
- Roberts RE, McLean WG. Protein kinase C isozyme expression in sciatic nerves and spinal cords of experimentally diabetic rats. *Brain Res* 1997;754[1-2]:147-56.
- Romanovsky D, Hastings SL, Stimers JR, Dobretsov M. Relevance of hyperglycemia to early mechanical hyperalgesia in streptozotocin-induced diabetes. *J Peripher Nerv Syst* 2004;9[2]:62-9.
- Sango K, Verdes JM, Hikawa N et al. Nerve growth factor (NGF) restores depletions of calcitonin gene-related peptide and substance P in sensory neurons from diabetic mice in vitro. *J Neurol Sci* 1994;126[1]:1-5.
- Schmitt TK, Mousa SA, Brack A et al. Modulation of peripheral endogenous opioid analgesia by central afferent blockade. *Anesthesiology* 2003;98[1]:195-202.

- Schneider SP, Eckert WA, III, Light AR. Opioid-activated postsynaptic, inward rectifying potassium currents in whole cell recordings in substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol* 1998;80[6]:2954-62.
- Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 1990;43[2]:205-18.
- Shaqura MA, Zollner C, Mousa SA, Stein C, Schafer M. Characterization of mu opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;308[2]:712-8.
- Simon GS, Dewey WL. Narcotics and diabetes. I. The effects of streptozotocin-induced diabetes on the antinociceptive potency of morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;218[2]:318-23.
- Smith RG. Painful diabetic peripheral neuropathy. *J Am Podiatr Med Assoc* 2007;97[5]:394-401.
- Stein C, Hassan AH, Przewlocki R et al. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87[15]:5935-9.
- Stein C, Schafer M, Machelska H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 2003;9[8]:1003-8.
- Tamaoki T, Nakano H. Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Biotechnology (N Y)* 1990;8[8]:732-5.
- Thompson RJ, Doran JF, Jackson P, Dhillon AP, Rode J. PGP 9.5--a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. *Brain Res* 1983;278[1-2]:224-8.
- Toth C, Brussee V, Zochodne DW. Remote neurotrophic support of epidermal nerve fibres in experimental diabetes. *Diabetologia* 2006;49[5]:1081-8.
- Traub RJ, Allen B, Humphrey E, Ruda MA. Analysis of calcitonin gene-related peptide-like immunoreactivity in the cat dorsal spinal cord and dorsal root ganglia provide evidence for a multisegmental projection of nociceptive C-fiber primary afferents. *J Comp Neurol* 1990;302[3]:562-74.
- Treede RD, Jensen TS, Campbell J et al. Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. *Neurology* 2008;70[18]:1630-5.
- Ueda H, Inoue M, Matsumoto T. Protein kinase C-mediated inhibition of mu-opioid receptor internalization and its involvement in the development of acute tolerance to peripheral mu-agonist analgesia. *J Neurosci* 2001;21[9]:2967-73.
- Unger JW, Klitzsch T, Pera S, Reiter R. Nerve growth factor (NGF) and diabetic neuropathy in the rat: morphological investigations of the sural nerve, dorsal root ganglion, and spinal cord. *Exp Neurol* 1998;153[1]:23-34.
- Wada A, Yokoo H, Yanagita T, Kobayashi H. New twist on neuronal insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics. *J Pharmacol Sci* 2005;99[2]:128-43.

- Wilding TJ, Womack MD, McCleskey EW. Fast, local signal transduction between the mu opioid receptor and Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 1995;15[5 Pt 2]:4124-32.
- Yagihashi S, Yamagishi S, Wada R. Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: correlation with clinical signs and symptoms. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77 Suppl 1:S184-S189.
- Yamamoto J, Kawamata T, Niiyama Y, Omote K, Namiki A. Down-regulation of mu opioid receptor expression within distinct subpopulations of dorsal root ganglion neurons in a murine model of bone cancer pain. *Neuroscience* 2008;151[3]:843-53.
- Young WS, III, Wamsley JK, Zarbin MA, Kuhar MJ. Opioid receptors undergo axonal flow. *Science* 1980;210[4465]:76-8.
- Zhang L, Schmidt RE, Yan Q, Snider WD. NGF and NT-3 have differing effects on the growth of dorsal root axons in developing mammalian spinal cord. *J Neurosci* 1994;14[9]:5187-201.
- Zhang L, Yu Y, Mackin Set al. Differential mu opiate receptor phosphorylation and desensitization induced by agonists and phorbol esters. *J Biol Chem* 1996;271[19]:11449-54.
- Zhang X, Bao L, Shi TJet al. Down-regulation of mu-opioid receptors in rat and monkey dorsal root ganglion neurons and spinal cord after peripheral axotomy. *Neuroscience* 1998;82[1]:223-40.
- Zhuang HX, Snyder CK, Pu SF, Ishii DN. Insulin-like growth factors reverse or arrest diabetic neuropathy: effects on hyperalgesia and impaired nerve regeneration in rats. *Exp Neurol* 1996;140[2]:198-205.
- Ziegler D. Painful diabetic neuropathy: treatment and future aspects. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24 Suppl 1:S52-S57.
- Zollner C, Shaqura MA, Bopaiah CPet al. Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol* 2003;64[2]:202-10.
- Zurek JR, Nadeson R, Goodchild CS. Spinal and supraspinal components of opioid antinociception in streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. *Pain* 2001;90[1-2]:57-63.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

aCSF	artificial cerebrospinal fluid
ALU	arbitrary light units
ANOVA	Analysis of Variance
BSA	bovine serum albumine
CalC	Calphostin C
cAMP	cyclical Adenosinmonophosphat
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
DAMGO	[D-Ala ² ,N-Me-Phe ⁴ ,Gly ⁵ -ol]enkephalin
DAPI	4-6-Diamidino-2-phenylindole
DRG	dorsal root ganglion
DSP	distal-symmetrische Polyneuropathie
FCA	Freund's complete adjuvans
FEM	Forschungseinrichtung experimentelle Medizin
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GDP	Guanosindiphosphat
GH	Growth hormone
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen
GTP	Guanosintriphosphat
i.p.	intraperitoneal
i.t.	intrathekal
i.v.	intravenös
IB-4	Isolektin B4
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IgG	Immunglobulin G
ir	immunoreaktiv
LAGetSi	Landesamt für Gesundheit und technische Sicherheit
MOR	μ-Opioid-Rezeptor
mRNA	messenger Ribonucleic Acid

N.	Nervus
n=	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDS	normal donkey serum
NGF	Nerve growth factor
NGS	normal goat serum
NO	Stickstoffmonoxyd
PBS	Phosphate buffered saline
PGP-9.5	Protein Gene Product 9.5
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
pMOR	phosphorylierter μ -Opioid-Rezeptor
SNRI	Serotonin-Noradrenalin-Reuptake Inhibitor
STZ	Streptozotocin
trkA	Rezeptortyrosinkinase A
vs.	versus

7.2 Erklärung der Selbständigkeit

„Ich, Jonas Christoph Schneider, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Regulation der Opioidrezeptor Expression sensorischer Neurone bei diabetischer Neuropathie 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

7.3 Lebenslauf

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

7.4 Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Michael Schäfer für die Überlassung des spannenden Themas dieser Promotionsarbeit. Seine ausgezeichnete Betreuung hat es mir ermöglicht, in einem professionellen Umfeld viele wertvolle Erfahrungen zu sammeln.

Herrn Associate Professor Dr. Shaaban-Abd-El-Wahab Mousa danke ich für seine kontinuierliche, freundliche und stets zielführende Unterstützung während der gesamten Dauer meiner Experimente.

Mein Dank gilt außerdem Anna-Sophia Habel, Piet Habel und Uli Irmer, deren konstruktive Kritik und deren freundschaftliche Unterstützung jederzeit eine große Hilfe waren.

Ich danke nicht zuletzt meinen Eltern und meiner Familie für die fortdauernde Unterstützung über viele Jahre hinweg und die herzliche Begleitung entlang meines Lebenswegs.