
Aus der Klinik für Anaesthesiologie mit Schwerpunkt
operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Ursachen und mögliche Therapien einer verminderten
Ansprechbarkeit auf Opioidanalgetika bei der diabetischen
Neuropathie der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Laura Sophie Friederike Schaad

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. M. Schäfer
 2. Prof. Dr. med. T. Volk
 3. Prof. Dr. U. Dirnagl

Datum der Promotion: 24.02.2012

Abkürzungsverzeichnis

STZ	Streptozotocin
DSS	Druckschmerzschwelle, PTT, paw pressure test
NGF	Nerve-growth-factor
IGF	Insulin-like-growth-factor
Log	natürlicher Logarithmus
SEM	Standard error of the mean
RSA	Ratten Serum Albumin
NaCl	Natrium Chlorid / Kochsalzlösung
aCSF	artifizielle cerebrospinale Flüssigkeit
PKC	Proteinkinase C
AC	Adenylatcyclase
i.p.	intraperitoneal
i.th.	intrathekal
i.pl.	intraplantar
s.c.	subkutan
i.v.	intravenös
i.c.v.	intracerebroventrikulär
i.d.	intradermal
OR	Opioidrezeptor
ORen	Opioidrezeptoren
MOR	μ -Opioidrezeptor
pMOR	poshorylierter MOR
DOR	δ -Opioidrezeptor
KOR	κ -Opioid-rezeptor
DAG	Diacylglycerol
PNP	periphere Polyneuropathie
IGF1R	IGF1-Rezeptor
IGF2R	IGF2-Rezeptor
IGFBP	IGF-Bindungsprotein
IR	Insulinrezeptor
GDP	Guanidindiphosphat
GTP	Guanidintriphosphat

AC	Adenylatcyclase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
GRKinase	G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinase
DAMGO	(Ala ² ,N-MePhe ⁴ ,Gly-ol)-enkephalin
trkA	neurotropher Tyrosin-Kinase-Rezeptor-1
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
kg KG	Kilogramm Körpergewicht
ANOVA	Analysis of Variance
SEM	Standard error of the mean, Standardabweichung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Schmerzhaftes, peripheres, diabetisches Polyneuropathie (PNP) und verminderte Wirksamkeit von Opioiden	1
1.2. Opioidrezeptoren und Wirkmechanismen	4
1.3. Proteinkinase C und Calphostin C	7
1.4. Wachstumsfaktoren bei diabetischer Neuropathie	9
1.5. Fragestellung	12
2. Material und Methoden	13
2.1. Versuchstiere	13
2.2. Materialien	13
2.2.1. Chemikalien	13
2.2.2. Geräte und sonstige Materialien	14
2.2.3. Lösungen und Puffer	15
2.2.3.1. Herstellen der artifiziellen cerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF)	15
2.2.3.2. Natrium-Citrat-Puffer	15
2.2.3.3. Ratten Serum Albumin (RSA)	15
2.3. Methoden	16
2.3.1. Narkose der Versuchstiere	16
2.3.2. Injektionen	16
2.3.2.1. STZ-Injektion	16
2.3.2.2. Fentanylinjektion	17
2.3.2.3. NGF-Applikation	17
2.3.2.4. IGF1- und IGF2-Applikation	18

2.3.2.5.	Calphostin C-Injektionen	18
2.3.3.	Versuchsaufbau	18
2.3.3.1.	Algesiometrie	18
2.3.3.2.	Gewöhnung (Handling)	19
2.3.3.3.	Ausgangswerte	19
2.3.3.4.	Ablauf der Experimente	20
2.3.3.5.	Gewichtsmessung	20
2.3.3.6.	Messung der Blutglukosekonzentration	20
2.3.4.	Arbeitsprotokolle	21
2.3.5.	Statistik	23
2.3.6.	Software	23
3.	Ergebnisse	24
3.1.	Blutglukosekonzentration und Gewichtsverlauf bei diabetischen Ratten	24
3.2.	Analgetische Wirksamkeit von Fentanyl in diabetischen Tieren	25
3.3.	Zunehmend verminderte i.pl. Fentanylanalgesie im Verlauf des STZ-induzierten Diabetes	26
3.4.	Einfluss von Nerve-growth-factor (NGF) auf die verminderte i.pl. Fentanylanalgesie diabetischer Ratten	28
3.5.	Verbesserung der verminderten Ansprechbarkeit auf i.pl. Fentanyl durch Vorbehandlung mit NGF	29
3.6.	Wirkung von Insulin-like-growth-factor 1 (IGF1) auf die verminderte periphere Opioidanalgesie der diabetischen Ratten	32
3.7.	Veränderung der verminderten i.pl. Fentanylanalgesie durch Vorbehandlung mit IGF1	34

3.8. Beeinflussung der verminderten peripheren Opioidanalgesie durch die Gabe von insulin-like-growth-factor 2 (IGF2)	37
3.9. Veränderung der verminderten i.pl. Fentanylanalgesie durch Vorbehandlung mit IGF2	39
3.10. Beeinflussung der verminderten peripheren Opioidanalgesie durch die Gabe von Calphostin C.	42
3.11. Einfluss von Calphostin C auf die verminderte periphere i.pl. Fentanylanalgesie	43
4. Diskussion	45
4.1. Etablierung eines experimentellen Diabetes mellitus	46
4.2. Verlust der Ansprechbarkeit auf Opioide	47
4.3. Wirkung von NGF auf die verminderte Ansprechbarkeit auf Opioide beim Diabetes	49
4.4. Wirkung von IGFs bei der STZ-induzierten diabetischen Neuropathie	50
4.5. Wirkung von Calphostin C auf die verminderte periphere Opioidanalgesie in der frühen Phase des Diabetes	52
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	58
7. Eidesstattliche Erklärung	66
8. Danksagung	67
9. Lebenslauf	68

1. Einleitung

1.1. **Schmerzhafte, periphere, diabetische Polyneuropathie (PNP) und verminderte Wirksamkeit von Opioiden**

Die diabetische Polyneuropathie (PNP) ist eine häufige Langzeitkomplikation des Diabetes mellitus. Jeder dritte Patient mit Diabetes entwickelt im Laufe der Erkrankung eine diabetische Neuropathie. In der Literatur schwanken die Angaben über die Häufigkeit zwischen 10% und 60% [Courteix et al. 1993; Apfel et al. 1994; Sugimoto et al. 2000; Boulton et al. 2004; Chong and Hester 2007; Yagihashi et al. 2007; Ziegler and Bierhaus 2007; Hauner 2008]. Dieser große Unterschied kommt durch die individuelle Variabilität in der Ausprägung der typischen Symptome der diabetischen Neuropathie und den damit verbundenen Schwierigkeiten zustande, sie zu diagnostizieren. Hinzu kommt, dass mit der Dauer des Diabetes mellitus auch die Wahrscheinlichkeit zunimmt, eine diabetische Neuropathie zu entwickeln [Pirart 1977; Vinik et al. 1992; Sima 1994].

Patienten mit diabetischer PNP klagen häufig über Empfindungsstörungen (Parästhesien), Überempfindlichkeit gegenüber sensorischen Reizen (Hyperästhesien), Taubheitsgefühl, unangenehmes Brennen (burning feet) und über bohrende oder krampfartige bis hin zu stechenden, einschießenden Schmerzen [Gries and Ziegler 1996; Gimbel et al. 2003]. Die schmerzhafte periphere diabetische PNP gehört zur Gruppe der sensiblen, symmetrisch-distalen PNP, welche eine häufige Untergruppe der diabetischen Neuropathie darstellt. Von der schmerzhaften peripheren PNP sind, im Gegensatz zur gesamten diabetischen Neuropathie, bis zu 11% der Typ 1 Diabetiker und bis zu 32% der Typ 2 Diabetiker betroffen. Die schmerzhaften Symptome treten oft nachts im Bett auf und bessern sich beim Gehen (restless feet) [Gimbel et al. 2003; Boulton et al. 2004; Haslbeck et al. 2006; Dobretsov et al. 2007].

Die Pathogenese dieser diabetischen Schmerzen ist komplex und unvollständig geklärt [Yagihashi et al. 2007]. Beschriebene Faktoren sind z.B. die Hyperglykämie, welche Atherosklerose vor allem kleinster Gefäße verursacht, ein vermehrter Anfall von glyoxalierten Endprodukten und anderen. Über einen intrazellulären Anstieg von z.B. Diacylglycerol (DAG) kommt es zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) [Yagihashi et al. 2007]. Eine vermehrte PKC-Aktivität resultiert in einer Phosphorylierung membranständiger Rezeptoren bzw. Ionenkanäle [Shearman et al.

1989; Narita et al. 1995; Ohsawa and Kamei 1997, 1998]. Letztendlich steigert sich hierdurch die Erregbarkeit nozizeptiver C-Fasern und es kommt zu vermehrter Schmerzempfindlichkeit [Ahlgren and Levine 1994; Chen and Levine 2002]. Auch eine Verringerung von Wachstumsfaktoren wie NGF, ein wichtiger Faktor zum Erhalt der Integrität sensorischer und sympathischer Nervenfasern, kann eine Ursache sein [Neuendörfer and Reichel 1996; Sugimoto et al. 2000; Thrainsdottir et al. 2003; Boulton et al. 2004; Gooch and Podwall 2004; Malik et al. 2005; Dobretsov et al. 2007; Evcimen and King 2007; Yagihashi et al. 2007]. Pathophysiologisch ist der allmähliche Funktionsverlust von Nervenfasern charakteristisch, wobei myelinisierte Nervenfasern zuerst betroffen sind, was durch einen allmählichen Verlust der Druck- und Berührungsempfindungen und später auch des Vibrationsempfindens erkennbar wird [Khan et al. 2002; Boulton et al. 2004; Sorensen et al. 2006; Yagihashi et al. 2007].

Ein etabliertes experimentelles Modell zur Untersuchung von diabetisch neuropathischen Schmerzen ist das Streptozotozin-Modell. Streptozotozin (STZ) ist ein spezifisches Zellgift, welches an den β -Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas angreift. Dadurch werden die Zellen, die für die Insulinproduktion verantwortlich sind, zerstört. Es wird kein Insulin mehr produziert. Die Ratten entwickeln innerhalb von ein bis drei Tagen deutlich erhöhte Blutzuckerkonzentrationen im Sinne eines Diabetes mellitus [Aley and Levine 2001; Calcutt 2004]. In diesem diabetischen Tiermodell äußert sich eine beginnende Neuropathie v.a. durch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber mechanischen Reizen, z.B. Druck auf die Pfote [Ahlgren and Levine 1993; Courteix et al. 1993; Thye-Ronn et al. 1994]. Sie wird auch als mechanische Allodynie bei vermehrter Empfindlichkeit gegenüber nicht-schmerzhaften Reizen bzw. Hyperalgesie bei gesteigerter Schmerzhaftigkeit gegenüber schmerzhaften Reizen bezeichnet. [Khan et al. 2002]. Die mechanische Hyperalgesie kann durch Messen der Druckschmerzschwelle (DSS) mit Hilfe eines Algesiometers (Ugo Basile) bestimmt werden.

Aufgrund der komplexen Pathologie der diabetischen PNP stellt die Schmerzlinderung eine besondere Herausforderung dar. Es existieren bereits viele Medikamente, die zur Schmerzlinderung bei diabetischer Neuropathie eingesetzt werden (z.B. Trizyklische Antidepressiva, Antikonvulsiva, Capsaicin Salbe, Mexiletin). Diese Medikamente zeigen jedoch viele, teilweise beeinträchtigende Nebenwirkungen wie Somnolenz, Schwindel, Mundtrockenheit, Appetitzunahme und Herzrhythmusstörungen, weswegen ihr Einsatz oft stark eingeschränkt ist [Sugimoto et al. 2000; Gimbel et al. 2003; Boulton et al. 2004;

Chong and Hester 2007]. In einigen Studien konnte auch die Wirksamkeit von Opioiden bei Diabetespatienten mit neuropathischen Schmerzen nachgewiesen werden. Die für die Schmerzlinderung benötigten Dosierungen waren jedoch deutlich höher als normalerweise üblich (z.B. im Mittel 300 - 400mg Tramadol, statt üblicherweise 100 - 200mg), wodurch das Auftreten typischer opioidassoziierter Nebenwirkungen wie z.B. Müdigkeit, Übelkeit/Erbrechen oder Obstipation deutlich zunimmt [Harati et al. 1998; Gimbel et al. 2003; Watson et al. 2003; Boulton et al. 2004; Boulton et al. 2005; Wong et al. 2007].

Auch im STZ-Tiermodell zeigten diabetische Ratten eine signifikant geringere Ansprechbarkeit auf Opioide als nicht-diabetische Ratten bzw. waren bis zu doppelt so hohe Dosierungen des Opioids nötig, um den gleichen schmerzlindernden Effekt wie bei nicht-diabetischen Ratten zu erzielen [Simon et al. 1981; Simon and Dewey 1981; Arner and Meyerson 1988; Kamei et al. 1994; Courteix et al. 1998; Malcangio and Tomlinson 1998; Zurek et al. 2001; Chen and Pan 2003]. Wie es zu diesem Wirkungsverlust kommt und welche Mechanismen ihm zugrunde liegen, ist in der Literatur bisher nicht geklärt. Experimentelle Untersuchungen haben mögliche Erklärungsansätze im ganzen Organismus, in verschiedenen Gehirnregionen oder aber im Rückenmark gesucht. Nur drei Studien haben mögliche Veränderungen in der Opioidwirksamkeit im peripheren Nervensystem untersucht, dort wo die diabetische Neuropathie eigentlich vorliegt [Simon et al. 1981; Simon and Dewey 1981; Torres-Lopez et al. 2007]. Simon und Dewey haben in Experimenten das Schmerzverhalten nach s.c.-Gabe von Morphin mit dem Tail-Flick-Test untersucht. Torres-Lopez et al. untersuchten das Schmerzverhalten nach i.pl.-Gabe von Morphin mit dem Formalin-Test. Bei den genannten Studien wurden die Opioide zwar peripher gegeben, die Methoden geben aber bevorzugt Auskunft über zentrale Schmerzmechanismen und lassen keine Rückschlüsse auf das periphere Nervensystem zu [Simon et al. 1981; Simon and Dewey 1981; Torres-Lopez et al. 2007]. Ziel der vorliegenden Studie war es, in systematischer Art und Weise den allmählichen Wirkungsverlust des Opioids Fentanyl im peripheren Nervensystem, dessen Gabe am Entstehungsort der peripheren diabetischen PNP erfolgte, zu erfassen. Um die Wirksamkeit von Fentanyl im peripheren Nervensystem zu beurteilen, wurde das Schmerzverhalten der Ratten über die Bestimmung der mechanischen DSS getestet. Diese Methode hat schon in vielen Experimenten gezeigt, dass sie eine gute Aussagekraft bezüglich der peripheren Opioidwirkung auch in der Klinik hat.

1.2. Opioidrezeptoren und Wirkmechanismen

Opioide gehören zu den am stärksten wirkenden Schmerzmitteln im Klinikalltag. Die Wirkung der Opioide erfolgt über eine Bindung an einen Opioidrezeptor (OR). Es existieren drei verschiedene Opioidrezeptoren: MOR (μ -Opioidrezeptor), KOR (κ -Opioid-rezeptor), und DOR (δ -Opioidrezeptor), die über ihre Gene auf den humanen Chromosomen 6, 1 und 8 als Proteine synthetisiert werden [Schaefer 2010].

Die analgetische Wirkung der Opioide wurde lange Zeit ausschließlich den Opioidrezeptoren im zentralen Nervensystem zugeschrieben. Seit den 80er Jahren zeigten immer mehr Forschungsergebnisse, dass Opioidrezeptoren auch im peripheren Nervensystem vorkommen [Wood 1855; Fields et al. 1980; Stein et al. 1990; Stein 1993; Zhang et al. 1998; Stein et al. 2001a; Stein et al. 2001b]. Heutzutage gibt es zahlreiche Hinweise dafür, dass Opioidrezeptoren tatsächlich in peripheren sensorischen Nerven gebildet werden [Antonijevic et al. 1995; Likar et al. 2001; Stein et al. 2001a] und sich auf peripheren schmerzleitenden Nervenendigungen des subkutanen Gewebes befinden [Coggeshall et al. 1997; Zhang et al. 1998; Stein et al. 2003; Mousa et al. 2007b]. Die Opioidrezeptoren werden im Spinalganglion gebildet und durch axonalen Transport an die peripheren Nervenendigungen in der Haut transportiert [Mousa et al. 2001]. Bindungsstudien zeigten, dass die pharmakodynamischen Eigenschaften dieser peripheren Opioidrezeptoren denen im Gehirn gleich sind [Stein et al. 2001b; Zollner et al. 2003; Shaqura et al. 2004].

Opioidrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Diese Rezeptoren zeichnen sich durch ein extrazelluläres N-terminales Ende, ein intrazelluläres C-terminales Ende und sieben transmembranöse, helikale Domänen aus, die durch drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Domänen verbunden sind. Der Opioidrezeptor wird durch Anlagerung eines Liganden von außen aktiviert [Wang et al. 1993]. Daraus resultiert, dass sich am intrazellulären C-terminalen Ende ein G-Protein (G_i/o) anlagert. Das G-Protein besteht aus den drei Untereinheiten α , β und γ und ist an ein Guanidindiphosphat (GDP) gebunden. Nach Bindung eines Liganden führt eine Konformationsänderung zu einer erhöhten Affinität des Rezeptors zum G-Protein und dort zu einem Austausch von GDP gegen Guanidintriphosphat (GTP). Durch diesen Austausch spaltet sich die α -Untereinheit zusammen mit dem GTP von der β - und γ -Untereinheit ab. Die nun entstandene $G\alpha$ -GTP-Einheit bindet sich an nachgeschaltete, häufig membranständige Effektorproteine, wie z.B. der Adenylatcyclase (AC). Dies führt

zur Bildung bzw. Hemmung der Bildung von Botenstoffen, wie z.B. dem zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Im Falle des ORs, an den ein inhibitorisches G-Protein angelagert wird, führt die Aktivierung der $G_{i\alpha}$ -GTP-Einheit zu einer Hemmung der AC und damit zu einem Absinken von cAMP in der neuronalen Zelle (siehe Abb.1). Die Kopplung des G_i -Proteins an den OR kann direkt (z.B. durch die β -/ γ -Untereinheit) oder indirekt (z.B. über das Absenken des cAMP-Spiegels) zu einer Verringerung des Ca^{2+} - oder Na^{+} -Einstroms bzw. einer Steigerung des K^{+} -Ausstroms führen. Darauf folgend wird die Freisetzung schmerzauslösender oder –verstärkender Neurotransmitter (wie Substanz P) und/oder die neuronale Erregbarkeit verringert [Sharma et al. 1977; Blume et al. 1979; North et al. 1987; Gross et al. 1990; Wilding et al. 1995; Schneider et al. 1998; Stein et al. 2003; Zollner and Schafer 2008].

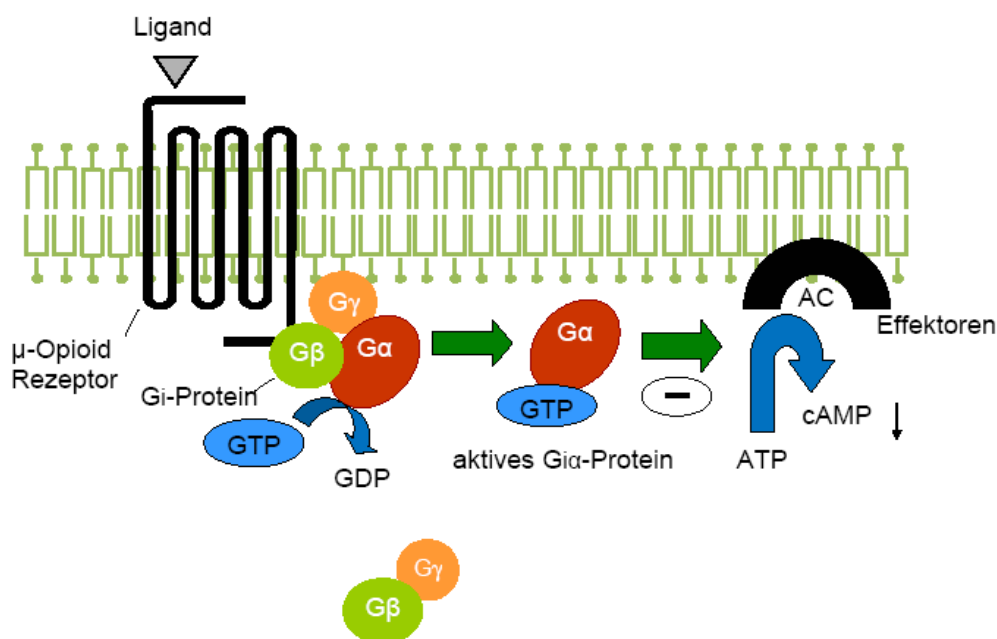


Abbildung 1: Gi-Proteinkopplung eines Opioidrezeptors.

Erkennbar ist die Kopplung des G_i -Proteins an einen OR. Das G_i -Protein lagert sich intrazellulär an den Opioidrezeptor an, durch Austausch von GDP gegen GTP wird die $G_{i\alpha}$ -Untereinheit von der $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit abgespalten. Den aktiven Teil des G-Proteins stellt nun die $G_{i\alpha}$ -GTP-Untereinheit dar. Da an den Opioidrezeptor ein inhibitorisches G-Protein gekoppelt ist, werden Effektoren wie hier die Adenylatzyklase (AC) durch die $G_{i\alpha}$ -GTP-Einheit gehemmt. Folglich wird weniger cAMP gebildet.

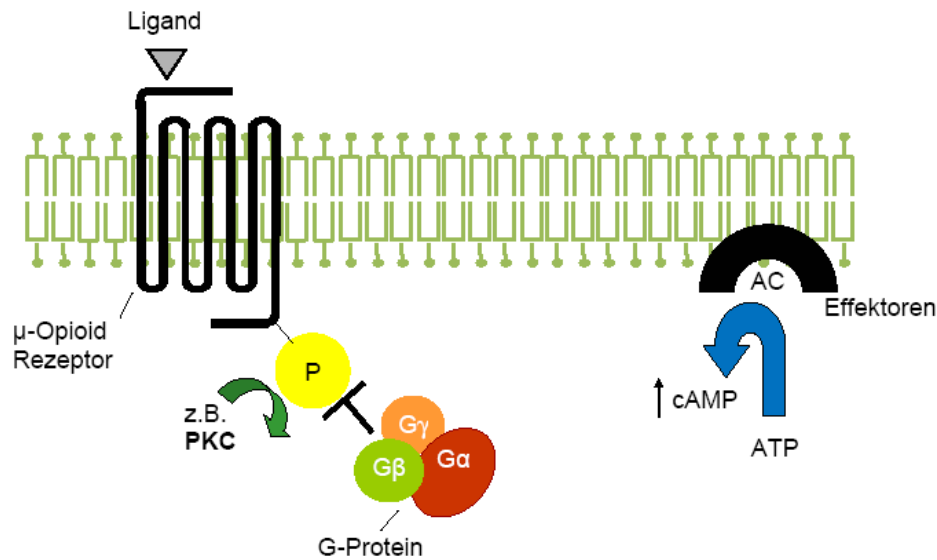


Abbildung 2: Behinderte Kopplung des G-Proteins an den OR durch Phosphorylierung. Durch die Phosphorylierung des OR können G-Protein und Rezeptor nicht mehr aneinander gekoppelt werden. Folglich bleibt die Signalkaskade, die durch das aktivierte G-Protein stattgefunden hätte, aus. Es können keine Effektorproteine wie die AC beeinflusst werden. Letztendlich kommt es dann u.a. zu einer Erhöhung des cAMP. Der OR wird auf Grund der Phosphorylierung internalisiert, abgebaut und ggf. nach Dephosphorylierung wieder zur Zellmembran rezirkuliert.

Im nicht phosphorylierten Zustand sind Oren biologisch aktiv und können G-Proteine intrazellulär koppeln. Durch Phosphorylierung am C-terminalen Ende nimmt die Affinität der Rezeptoren zu dem G-Protein jedoch beträchtlich ab und der Rezeptor wird internalisiert, um später wieder ohne Phosphorylierung zur Zelloberfläche zurückzukehren [Chavkin et al. 2001]. Diese Phosphorylierung kann u.a. durch second messenger (cAMP oder DAG) abhängige Proteinkinasen, wie der Proteinkinase C (PKC), oder durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptorkinasen (GRKinasen) erfolgen [Ferguson 2001]. Bindet ein Opioid nach der Phosphorylierung an den OR, so kann intrazellulär kein G-Protein mehr gekoppelt werden. Die Ansprechbarkeit der peripheren Nerven auf die Opiode nimmt ab [Narita et al. 1997; Ohsawa and Kamei 1997; Shangguan et al. 2003; Johnson et al. 2006].

1.3. Proteinkinase C und Calphostin C

Die Proteinkinase C (PKC) gehört zur Familie der intrazellulären Serine/Threonine-Kinasen und reguliert verschiedene zelluläre Funktionen durch Phosphorylierung von Proteinen einschließlich einiger Rezeptoren [Ohsawa and Kamei 1997]. Die inaktive Form der PKC befindet sich primär im Zytoplasma der Zelle, wohingegen die aktive Form an der Zellmembran lokalisiert ist. Dieser Vorgang wird auch als Translokation bezeichnet und ist ein Zeichen für die Aktivierung der PKC [Malmberg 2000]. Die PKC kann in 12 Isoenzyme (α bis μ) unterschieden werden. Diese 12 Isoenzyme werden drei Gruppen zugeordnet: cPKC (konventionell), nPKC (neu) und aPKC (atypisch). Die konventionellen PKC-Isoenzyme (α , β I, β II, γ) sind Ca^{2+} - und phospholipidabhängig, wohingegen nPKC und aPKC kein Calcium für Ihre Aktivierung benötigen. Weiterhin zeichnen sich die verschiedenen Gruppen durch die unterschiedlichen Substrate, die sie phosphorylieren, aus [Dekker and Parker 1994; Kanashiro and Khalil 1998]. In Bezug auf neuropathische Schmerzen scheinen v.a. die Isoenzyme α , β I, β II, γ und ϵ eine Rolle zu spielen.

Bei diabetischen Tieren wurden bisher kontroverse Ergebnisse gefunden, was die Aktivierung der PKC betrifft. So wurde eine Erhöhung der PKC-Aktivität in der Retina, dem Herzen, der Aorta und in den Glomeruli der Niere von STZ-induzierten Ratten gefunden [Craven and DeRubertis 1989; Inoguchi et al. 1992; Shiba et al. 1993]. Laut Kim et al. ist jedoch die PKC-Aktivität im Zytoplasma und in der Zellmembran in diabetischen Ratten verringert. Roberts & McLean führten detaillierte Experimente an diabetischen Ratten bezüglich der Aktivität der PKC durch. Im N. Ischiadikus findet eine Translokation der PKC α zur Zellmembran hin statt. PKC β II ist im Zytoplasma vermindert und zeigt keine erkennbare Translokation zur Zellmembran. Bei PKC β I und γ sind keine Unterschiede zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Ratten messbar. Im Rückenmark steigt die Immunreaktivität der PKC α im Zytoplasma um 100% und in der Zellmembran um 110% an [Roberts and McLean 1997]. Auch Honda et al. konnten an diabetischen Mäusen nachweisen, dass die Aktivität der membran-gebundenen Ca^{2+} -abhängigen Proteinkinasen (wie PKC γ) im Rückenmark deutlich ansteigt. Diese Erhöhung der PKC hat Einfluss auf das Schmerzverhalten von diabetischen Mäusen und bewirkt eine endogene Phosphorylierung von G-Proteinen im Spinalganglion [Honda et al. 2007]. Dieser Vorgang führt u.a. dazu, dass G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie der MOR desensibilisiert werden [Ferguson 2001;

Shangguan et al. 2003]. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass PKC-Isoenzyme in unterschiedlicher Art und Weise beim Diabetes verändert sind. Sicher scheint jedoch, dass die Aktivität einiger PKC-Isoenzyme (z.B. PKC α und γ) beim Diabetes deutlich erhöht ist.

Im neuropathischen Tiermodell mit Ligatur eines Nervs scheint die Rolle der PKC besser geklärt zu sein. Im Hinterhorn des Rückenmarks von Ratten mit Nervenverletzung steigt die membran-gebundene PKC γ an [Mao et al. 1992]. Malmberg et al. führten 1997 Experimente an PKC γ -knock-out-Mäusen durch. Diese Mäuse hatten eine Deletion des Gens, das die neuronenspezifische γ -Isoform der PKC kodiert. Die knock-out-Mäuse entwickeln im Gegensatz zu den Kontrolltieren nach der Nervligation keine neuropathischen Schmerzen. Die Ursache des vermehrten Schmerzempfindens liegt in der erhöhten Aktivität der PKC in sensorischen Neuronen. Bei niedriger Aktivität der PKC treten weniger Schmerzen auf [Malmberg et al. 1997].

Die Aktivierung der PKC scheint aber nicht nur eine Rolle bei der Entstehung von neuropathischen Schmerzen zu spielen, sondern auch bei der Desensibilisierung von MOR. Dies konnte in Experimenten mit spinaler Gabe von DAMGO und Morphin nachgewiesen werden. Die Aktivierung von PKC durch i.c.v. Gabe des PKC-Aktivators PDB (phorbol-12,13-dibutyrate) hat in normalen Mäusen eine abschwächende Wirkung auf den schmerzlindernden Effekt von i.c.v. gegebenem DAMGO. Durch die Gabe von Calphostin C und somit Hemmung der PKC konnte der schmerzstillende Effekt wieder hergestellt werden [Narita et al. 1997]. Daraus leitet sich die Hypothese ab, dass MOR durch die Aktivierung von PKC phosphoryliert werden und dass dies die verminderte Ansprechbarkeit auf Opioide beim Diabetes mitbedingt. Daher wurden Untersuchungen nach Vorbehandlung mit Calphostin C durchgeführt.

Calphostin C ist ein hochpotenter und spezifischer Hemmstoff aller cPKC- (α , β und γ) und nPKC-Isoenzyme. Es hemmt spezifisch die Bindung von DAG an die regulierende Domäne der PKC [Kobayashi et al. 1989; Kanashiro and Khalil 1998]. Durch die Hemmung der PKC wird auch die Phosphorylierung des ORs verhindert. Damit wird eine Kopplung des G-Proteins an den OR wieder ermöglicht und die normale Signaltransduktion nach Anlagerung eines Liganden wie Fentanyl ist wieder hergestellt. Der Einfluss bezüglich der verminderten Ansprechbarkeit auf die Opioide wurde bisher nur bei systemisch, spinal oder zentral verabreichten Opioiden überprüft. Die Bestimmung der Schmerzschwelle erfolgte über Messmethoden von zentralen Mechanismen wie dem Tail-Flick-Test. Wir untersuchten nun erstmals, ob dieser

positive Effekt von Calphostin C auch für peripher applizierte Opiode und die periphere Schmerzantwort gilt.

1.4. Wachstumsfaktoren bei diabetischer Neuropathie

NGF ist ein Wachstumsfaktor und gehört zur Gruppe der Neurotrophine. Die Funktionen von NGF sind vielseitig [Lewin and Barde 1996; Chiarelli et al. 2000; Reynolds et al. 2000; Sah et al. 2003]. NGF spielt im Erwachsenenalter eine Rolle für das Überleben, die Entwicklung und die Differenzierung von sensorischen Nerven [Barde 1989; Ebendal 1992; Apfel et al. 1994; Unger et al. 1998; Reynolds et al. 2000; Kimpinski and Mearow 2001]. Es fördert die Regeneration und das Wachstum von geschädigten Nerven [Terenghi 1999; Kimpinski and Mearow 2001; Jones et al. 2003]. Neurotrophine wie NGF werden postsynaptisch von neuronal innervierten Geweben (wie sympathisch oder sensorisch innervierten Zellen) synthetisiert und freigesetzt. Darauf folgt die Bindung von NGF an spezifische Rezeptoren wie trkA, die sich auf der präsynaptischen Zellmembran von Nervenendigungen befinden. Der Rezeptor wird zusammen mit NGF internalisiert. Vesikel, die den NGF-Rezeptor-Komplex enthalten, werden gezielt für den retrograd axonalen Transport vorbereitet. Die Vesikel werden entlang der Mikrotubuli mit Hilfe des Dynein-Motor-Proteins zum Perikaryon gebracht. Dort angekommen kann NGF Signale an den Zellkern weitergeben und so durch noch nicht vollständig geklärte Mechanismen seine zahlreichen genannten Funktionen durch Modulation der Expression verschiedenster Gene des Nervensystems ausüben [Raivich and Kreutzberg 1993; Unger et al. 1998; Reynolds et al. 2000; Boucher and McMahon 2001].

Im entzündeten Gewebe konnte bereits mehrfach nachgewiesen werden, dass NGF vermehrt zum Spinalganglion transportiert wird und durch Hochregulation von MOR im Spinalganglion die Ansprechbarkeit auf Opiode verbessert. In Ratten führt eine Entzündung der Pfote zu einer 45%igen Hochregulation der MOR-Immunreaktivität im zugehörigen Spinalganglion [Zhang et al. 1998]. Auch die G-Protein-Kopplung an den MOR ist bei Entzündung gesteigert und lokal injizierte Opiode zeigen eine verbesserte Wirkung [Zollner et al. 2003; Shaqura et al. 2004]. Mousa et al. wiesen nach, dass bei NGF-Gabe die MOR-positiven Neurone im Spinalganglion um 34% ansteigen, dass es zu einer Hochregulation von MOR-Bindungsstellen kommt und dass die DAMGO-

induzierte MOR G-Protein-Kopplung signifikant zunimmt. Die i.pl. Behandlung mit NGF führt zu einer Linksverschiebung der Dosis-Antwort-Kurve und damit zu einer Verbesserung des dosisabhängigen schmerzlindernden Effekts von i.pl. appliziertem Fentanyl [Mousa et al. 2007a]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Ursache für die Hochregulation von MOR im entzündeten Gewebe wahrscheinlich in einem Anstieg des retrograd transportierten bzw. exogen zugeführten NGFs liegt.

Im Gegensatz dazu ist bei diabetischer PNP bekannt, dass NGF in der innervierten Haut und in Nervenfasern verringert ist und dass die Ansprechbarkeit auf Opioide reduziert ist. [Simon et al. 1981; Simon and Dewey 1981; Apfel et al. 1994; Courteix et al. 1994; Hellweg et al. 1994; Fernyhough et al. 1995a; Fernyhough et al. 1995b; Tomlinson et al. 1997; Malcangio and Tomlinson 1998; Unger et al. 1998]. Die Anzahl des retrograd axonal transportierten NGF bei Diabetes nimmt um ca. 50% ab. Je höher die Glukosekonzentration ansteigt, desto niedriger ist auch der Transport von NGF [Hellweg et al. 1994]. Die exogene Gabe von NGF und Morphin zusammen wurde bisher nur am Modell der Nervenligatur untersucht. Hier zeigten Cahill et al., dass nach der kontinuierlichen i.th. Gabe von NGF die Wirkung von i.th. appliziertem Morphin wieder signifikant ansteigt [Cahill et al. 2003].

Nicht nur NGF ist unter diabetischen Bedingungen vermindert, auch Insulin-ähnliche Wachstumsfaktoren (IGF) spielen eine zentrale Rolle bei der diabetischen PNP.

Das IGF-System besteht aus IGF1, IGF2, Insulin, IGF-Rezeptoren (IGF1R und IGF2R), Insulinrezeptor (IR) und IGF-Bindungsproteinen (IGFBPs). IGF1 und 2 sind Polypeptide mit einer hohen Sequenzhomologie zu Insulin. Der IGF1R ist wie der IR ein Tyrosin-Kinase-Rezeptor, der seine Wirkung durch Phosphorylierung von bestimmten Tyrosinen vermittelt [Sima et al. 2003]. Der IGF2R ist ein einzelnes transmembranöses Protein mit Bindungsstellen für Mannose-6-Phosphat. Der Signalweg ist bisher nicht bekannt [Sima et al. 2003]. Das IGF-System spielt eine wesentliche Rolle bei der Unterstützung von Wachstum, der Entwicklung, dem Metabolismus und dem Überleben von vielen Geweben und Organen [Le Roith 2003; Sima et al. 2003]. In neuronalen Geweben zeigen IGFs ebenfalls eine Vielzahl an Wirkungen. So sind sie beispielsweise auch hier wichtig für die Entwicklung, den Metabolismus, die Regeneration, das Wachstum und das Überleben von Neuronen [Ishii and Lupien 2003; Le Roith 2003; Sima et al. 2003]. IGFs können die Nervenausprossung in gezüchteten sensiblen und sympathischen [Recio-Pinto et al. 1986] sowie Neuroblastomzellen [Recio-Pinto and Ishii 1984] fördern. Endogenes IGF kann die normale Nervenregeneration steigern und IGF2 hilft bei der

Regulierung und Entwicklung von Synapsen [Ishii 1995].

Die beim Diabetes betroffenen neuronalen Zellsysteme, wie motorische, sensorische und sympathische Nervenfasern, reagieren direkt auf IGFs [Recio-Pinto and Ishii 1984; Recio-Pinto et al. 1986; Ishii 1995]. Beim Diabetes sind jedoch die Aktivität und die Konzentration von IGFs im Serum und in neuronalem Gewebe reduziert [Ishii 1995; Bitar and Pilcher 1998; Thrailkill 2000; Sima et al. 2003]. Hinzu kommt, dass die Genexpression von IGF2 im Northern-Blot bei STZ-Ratten sowohl im peripheren Nerven [Wuarin et al. 1994] als auch im Rückenmark abfällt [Wuarin et al. 1996]. Für IGF1 konnte gezeigt werden, dass in den lumbalen Regionen des Rückenmarks mRNA-Transkripte für IGF1 und seinen Rezeptor exprimiert werden. Unter diabetischen Bedingungen sind sowohl die Transkripte für IGF1 als auch für seinen Rezeptor verringert [Bitar et al. 1996; Bitar and Pilcher 1998]. Auf klein- bis mittelgroßen nozizeptiven Neuronen des Spinalganglions befinden sich Rezeptoren für IGF1. Diese Rezeptoren und die Expression von IGF1 an sich sind beim Diabetes verringert, was ein Grund für die neuropathischen Schmerzen sein kann.

In Verhaltensexperimenten wurde bisher nur der direkte Effekt von IGFs auf das Schmerzverhalten untersucht. Diabetische STZ-Ratten entwickeln innerhalb einer Woche eine verstärkte Schmerzempfindlichkeit. Die Verstärkung dieser Schmerzempfindlichkeit konnte durch die kontinuierliche s.c. Gabe von IGF1 und 2 zwar zum Stillstand gebracht, aber nicht verbessert werden [Zhuang et al. 1996]. Zum Einfluss der IGFs auf die verminderte Ansprechbarkeit auf Opioide liegen zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Daten vor. Wir untersuchten also erstmals, welchen Einfluss eine Vorbehandlung mit IGFs auf die verminderte Wirksamkeit von peripher applizierten Opioiden bei diabetischer Polyneuropathie hat.

1.5. Fragestellung

Ziel dieser experimentellen Studie ist es, die genauen Mechanismen eines Wirkungsverlustes am Opioidrezeptor bei diabetischer Polyneuropathie zu untersuchen. Daraus abgeleitet sollen Möglichkeiten aufgezeigt werden, wie die verminderte periphere Opioidanalgesie wieder verbessert werden kann. Die Untersuchungen werden an männlichen Wistar Ratten durchgeführt, bei denen durch Injektion von STZ ein Diabetes induziert wurde. Nach der Applikation von Fentanyl wird die Druckschmerzschwelle und damit die analgetische Wirksamkeit von Fentanyl bestimmt.

Im Unterschied zu bisherigen Untersuchungen soll diese Arbeit im zeitlichen Verlauf die Veränderungen der DSS (als Parameter für periphere Mechanismen) nach der peripheren Applikation von Fentanyl untersuchen. Um die verschiedenen Mechanismen, die an der Abnahme der Ansprechbarkeit auf periphere Opioide beteiligt sind, besser beurteilen zu können, werden eine frühe Phase des Diabetes (zwei bis vier Wochen nach STZ-Injektion) und eine späte Phase (vier bis 12 Wochen nach STZ-Injektion) unterschieden.

Durch Messen des DSS vor und nach Applikation von Fentanyl soll festgestellt werden, ob und in wieweit die peripher analgetische Wirkung von Opioiden beim Diabetes eingeschränkt ist. Darauf aufbauend wird untersucht, ob ein Ausgleich eines vorhandenen NGF- bzw. IGF-Defizits durch die externe Vorbehandlung mit NGF bzw. IGF den Wirkverlust von Opioiden verhindern kann. Diese Untersuchungen sollen in der späten Phase des Diabetes durchgeführt werden. In der frühen Phase, wenn die Anzahl an MOR noch nicht verändert ist, soll der Wirkverlust der Opioide durch eine Hemmung der PKC mit Calphostin C untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Alle Tierexperimente wurden in Übereinstimmung mit den geltenden Richtlinien zur Pflege und Nutzung von Labortieren durchgeführt. Das Versuchsvorhaben wurde durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) genehmigt. Männliche Wistar Ratten mit einem Gewicht von 180 – 220 g wurden verwendet. Diese wurden in den Tierställen der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) gezüchtet und in einem separaten Raum in Käfigen gehalten. Die Tiere hatten ständigen Zugang zu Futter und Wasser. Die Raumtemperatur betrug ca. $22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-65%. Es wurde ein Hell-Dunkel- / Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils zwölf Stunden eingehalten. Die Verhaltensexperimente fanden im Zeitraum zwischen 10 Uhr und 15 Uhr statt. Es wurde maximal eine Testreihe pro Tag absolviert. Um den Einfluss möglicher Stressfaktoren auf die Verhaltensversuche zu minimieren, wurden die Tiere in der Woche vor den Experimenten mehrmals täglich an den Ablauf der späteren Experimente gewöhnt und mit den Messgeräten vertraut gemacht. Die gebildeten Gruppen bestanden jeweils aus fünf bis acht Ratten.

2.2. Materialien

2.2.1. Chemikalien

Streptozotocin	Sigma [®] Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fentanyl	Sigma [®] Aldrich
Isofluran	Forene [®] , Abbott GmbH&Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
NGF rat, recombinant	Sigma [®] Aldrich
ACSF	eigene Herstellung (siehe unten)

Ratten Serum Albumin (RSA)	Sigma [®] Aldrich
IGF1 human, recombinant	R&D Systems [®] , Minneapolis, USA
IGF2 human, recombinant	R&D Systems [®]
Calphostin C human, recombinant	Calbiochem.-Navabiochem. Int. La Jolla, CA, USA
Natrium-Citrat	Sigma [®] Aldrich
Kochsalzlösung (0,9% NaCl)	BRAUN [®] , Melsungen, Deutschland
destilliertes Wasser	BRAUN [®]

2.2.2. Geräte und sonstige Materialien

Algesiometer	Ugo Basile, Comerio, Italy
Minipumpen	Alzet Miniosmotic Pump Modell 2001, 1 µl pro Stunde, 7 Tage
Katheter	Portex Fine Bore Polythene Tubing, ID 0,28mm und ID 0,4mm; SIMS Portex Ltd.
Narkoseapparat	>Tiberius<, Drägerwerk [®] Lübeck, Deutschland
Isofluran-Vapor	Drägerwerk [®] Lübeck, Deutschland
Sartorius Digitalwaage	Typ 1501 MP8, Sartorius GmbH Göttingen, Deutschland
Kanülen (intraplantar & intrathekal)	BRAUN [®] Sterican 0,30 x 12 mm, 30G x ½ “
Kanülen (intravenös und Blutzuckerstix)	BRAUN [®] Sterican 0,45 x 12 mm, 26 G x ½ “
Glukoflex-R Glucoseteststreifen	National Diagnostic Products Sydney, Australien
Spritzen	BD Plastipak TM [®] , 1ml
Inkubator Function line (37°C)	Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland

2.2.3. Lösungen und Puffer

2.2.3.1. Herstellen der artifiziiellen cerebrospinalen Flüssigkeit (ACSF)

Die Herstellung der ACSF wurde nach den Vorgaben in der Literatur gemacht [Nagano et al. 2005; Narai et al. 2005].

122 mM NaCl (Sigma[®] Aldrich)

3,1 mM KCl (Sigma[®] Aldrich)

5 mM NaHCO₃ (Sigma[®] Aldrich)

0,4 mM KH₂PO₄ (Sigma[®] Aldrich)

1,3 mM CaCl₂ (Sigma[®] Aldrich)

1 mM MgSO₄ (Sigma[®] Aldrich)

10 mM D-Glucose (Sigma[®] Aldrich)

Mischung der o.g. Inhaltsstoffe mit destilliertem Wasser; pH 7,4.

2.2.3.2. Natrium-Citrat-Puffer

Zur Herstellung des Na⁺-Citrat-Puffers wurden 14,7g Natrium-Citrat der Firma Sigma[®] mit 500 ml destilliertem Wasser gemischt. Dadurch entstand eine 0,1 molare Lösung, die zum Herstellen der Streptozotocin-Lösung verwendet wurde.

2.2.3.3. Ratten Serum Albumin (RSA)

Das RSA hatte in den jeweiligen Lösungen eine Konzentration von 1 mg/ml. Es wurde den intrathekalen Lösungen zusammen mit ACSF zugegeben, um eine Adhäsion der Therapeutika (NGF, IGF1 und 2) an der Katheterwand zu verhindern.

2.3. Methoden

2.3.1. Narkose der Versuchstiere

Die Narkose wurde mittels des volatilen Narkotikums Isofluran durchgeführt. In den Narkosebehälter wurde mit Isofluran getränktes Zellulosepapier und darüber eine Keramikplatte mit Löchern gelegt. Diese diente als Liegefläche für die Ratten. Die Ratten wurden einzeln in den Behälter gesetzt, welcher dann mit einem Glasdeckel verschlossen wurde. Die Ratten blieben so lange im Narkosebehälter, bis sie eingeschlafen und die Atmung etwas abgeflacht war. Anschließend wurden die Versuchstiere aus dem Gefäß genommen und die jeweilige Injektion oder Behandlung vorgenommen. Die Tiere erholten sich innerhalb weniger Minuten von der Anästhesie. Für die länger dauernden Prozeduren wurde die Narkose mittels eines Narkosegeräts fortgeführt. Dabei bekam die Ratte einen durchsichtigen Kolben über Mund und Nase gestülpt, worüber 0,7 l Sauerstoff pro Minute mit Zugabe von 3 Vol % Isofluran verabreicht wurden. Nach der Injektion wurden die Versuchstiere zurück in ihre Käfige gesetzt. In den nachfolgenden Minuten wurde auf das Wiedererlangen des Bewusstseins und eine regelmäßige Atmung geachtet. Nach zwei bis drei Minuten erholten sich die Tiere rasch und standen für weitere Messungen zur Verfügung.

2.3.2. Injektionen

2.3.2.1. STZ-Injektion

Der Diabetes mellitus wurde durch eine einmalige intravenöse Injektion von STZ hervorgerufen. STZ wurde in Na⁺-Citrat-Puffer gelöst. Die Lösung hatte eine Konzentration von 1 mg/μl. Die Versuchstiere erhielten insgesamt 45 mg/kg KG STZ. Diese Lösung wurde dann unter Narkose intravenös in die Schwanzvene injiziert. Die nicht-diabetischen Versuchstiere bekamen die gleiche Menge des Vehikels (Na⁺-Citrat-Puffer) injiziert.

Streptozotocin (STZ) ist ein Zellgift, welches sich gegen die Beta-Zellen in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas richtet. Es stammt aus dem Bodenbakterium

Streptomyces achromogenes und wurde erstmals 1965 als antibiotische Substanz beschrieben. Erst im Laufe der 1960er Jahre wurde die toxische Wirkung auf die Pankreaszellen entdeckt. Kurz darauf wurde es zur Induktion eines Diabetes mellitus in Ratten genutzt [Vavra et al. 1959; Mansford and Opie 1968]. Durch Zerstörung der insulinproduzierenden Beta-Zellen kommt es zu einem absoluten Insulinmangel mit den Diabetes-typischen Folgen für den Organismus der Ratte, wie Polyurie, Polydipsie, Mikro- und Markoangiopathie. Der Tag der Injektion mit STZ bzw. Vehikel wurde als Tag 0 festgelegt.

2.3.2.2. Fentanylinjektion

Für die Experimente wurden die Ratten mittels Isofluran in einem Narkosebehälter narkotisiert. Darauf folgte die intraplantare Injektion mit unterschiedlichen Fentanyl Dosen in die rechte Hinterpfote. Die benötigte Fentanylmenge wurde von einer Stocklösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml entnommen, durch Zugabe von 0,9% NaCl-Lösung wurde eine Gesamtmenge von 100 µl in die Pfote injiziert. Die Kontrollratten bekamen entsprechend 100 µl 0,9% NaCl-Lösung injiziert. Jeweils drei bis fünf Minuten nach der Fentanylgabe wurden die Experimente durchgeführt, da das Wirkungsmaximum bei peripherer Gabe von Fentanyl in diesem Zeitraum erreicht wird. Nach 10 bis 15 Minuten zeigt Fentanyl peripher keine Wirkung mehr auf die Schmerzempfindung. Die Fentanyl Dosen variierten zwischen 0,5 µg als Minimaldosis und 1,25 µg als Maximaldosis.

2.3.2.3. NGF-Applikation

Jedes Versuchstier erhielt intrathekal über eine Minipumpe (1 µl/h) bei einer Laufzeit von sieben Tagen eine Gesamtdosis von 21 µg NGF (Vorgehen siehe Nakamura et al. 1997). NGF wurde in aCSF gelöst und RSA (1 mg/ml) hinzu gegeben. Die Lösung hatte eine Konzentration von 125 ng NGF pro µl. Am siebten Tag nach Pumpenimplantation wurden dann die Versuche durchgeführt. Der genaue Ablauf der Experimente wird im Arbeitsprotokoll der Zugabe von NGF beschrieben.

2.3.2.4. IGF1- und IGF2-Applikation

IGF1 und 2 wurden ebenfalls über eine Minipumpe mit einer Laufrate von 1µl/h intrathekal appliziert. Jedes Versuchstier erhielt so bei einer Laufzeit von sieben Tagen eine Gesamtdosis von 84 µg IGF1 bzw. 2. Die Lösungen wurden ebenfalls unter Zugabe von aCSF und RSA (1 mg/ml) hergestellt. Die Konzentration der IGF-Lösungen waren jeweils 0,5 µg IGF pro µl. Applikation und Verweildauer der Pumpen und Katheter entsprach denen der oben beschriebenen NGF-Pumpen. Der genaue Ablauf der Experimente wird im Arbeitsprotokoll der Zugabe von IGF1 und 2 beschrieben.

2.3.2.5. Calphostin C-Injektionen

Calphostin C wurde intraplantar und intrathekal zu jeweils 500 ng verabreicht. Die intrathekale Lösung wurde durch Zugabe von aCSF und die intraplantare Lösung durch Zugabe von 0,9%iger NaCl-Lösung hergestellt. Im Zeitraum von 15 bis 30 Minuten nach Calphostin C Injektion wurden die Versuche durchgeführt.

2.3.3. Versuchsaufbau

2.3.3.1. Algesiometrie

Zum Testen der Pfortendruckschwelle wurde ein Pfortendruck-Algesiometer (Ugo Basile, modifizierter Randall-Selitto-Test) verwendet. Bei diesem Gerät wurde die Hinterpfote der Ratte vorsichtig auf einer abgerundeten Erhebung abgelegt und es wurde von oben über einen stumpfen, keilförmigen Kolben zunehmender Druck auf die Oberseite der Hinterpfote ausgeübt. Der Druck wurde erhöht, indem ein Gewicht über einen Hebelarm geleitet wurde, dies konnte mit einem Fußpedal gesteuert werden. Sobald der ausgeübte Druck für die Ratte schmerzhaft wurde, zog sie die Hinterpfote weg und die Druckschmerzschwelle (DSS, paw pressure threshold, PTT) war erreicht und konnte am Messarm in Gramm abgelesen werden. Grundlage dieser Schmerzmessung ist die Vorstellung, dass sowohl schmerz- als auch druckempfindliche Nervenfasern aktiviert

werden [Zhuang et al. 1996]. Eine Zunahme der Druckschmerzschwelle wurde als Analgesie, eine Abnahme als erhöhte Schmerzempfindung gedeutet.

An diesem Gerät wurden sowohl die Ausgangswerte (Baselines) als auch die Werte nach der jeweiligen Injektion von Fentanyl gemessen. Dafür wurde die DSS dreimal im Abstand von 10 Sekunden gemessen und dann der Mittelwert gebildet. Die Abfolge der Messungen von linker und rechter Pfote wurde variiert, um eine mögliche Beeinflussung (Bias) zu verhindern. Wir haben uns für die Messung der DSS entschieden, da dies eine besonders gute Methode ist, um periphere Wirkungen von Opioiden zu beurteilen [Stein 1993].

2.3.3.2. Gewöhnung (Handling)

Um den Einfluss zusätzlicher Stressfaktoren zu minimieren, wurden die Ratten schrittweise über eine Woche an die Experimente gewöhnt. Dafür wurden sie aus den Käfigen genommen und täglich an die Vorgehensweise beim Testen der DSS gewöhnt; jedoch wurden keine aktuellen Testungen durchgeführt, um Lerneffekte zu vermeiden. Während der Gewöhnung und der Versuche wurde der Kopf der Ratte stets vorsichtig unter einer Lage Zellstoff gehalten, um Irritationen der Ratten durch äußere Einflüsse zu vermeiden. Durch das langsame Heranführen der Tiere an den Ablauf der Experimente ließen sich die Ratten zum Zeitpunkt des Experimentes per Hand aus dem Käfig nehmen, ihre hintere rechte Pfote unter das Messgerät legen und die DSS testen, ohne dass die Ratten unruhig oder nervös wurden.

2.3.3.3. Ausgangswerte

Als Ausgangswerte werden DSS-Werte bezeichnet, die zu Beginn des Experimentes und ohne Zugabe von analgetischen Substanzen gemessen werden. Sie geben die normale Schmerzschwelle der Ratte wieder. Bei jeder Ratte wurden beide Hinterpfoten dreimal im Abstand von 10 Sekunden gemessen, daraus wurde später der Mittelwert für die jeweilige Pfote errechnet. Die Ausgangswerte wurden zu Beginn jedes Experimentes gemessen, um eventuelle Veränderungen in der Schmerzempfindung

festzustellen und um die DSS-Werte nach der Gabe von Medikamenten besser vergleichen zu können.

2.3.3.4. Ablauf der Experimente

Zunächst wurden bei allen Ratten die Ausgangswerte bestimmt. In Narkose bekamen die Ratten eine bestimmte Fentanylkonzentration gelöst in 100 µl 0,9%iger NaCl-Lösung in die rechte hintere Pfote gespritzt. Danach wurden die Ratten wieder in ihre Käfige gesetzt und nach drei bis fünf Minuten die Druckschmerzschwelle erneut bestimmt. Dieser Ablauf wurde bei allen Ratten und bei jedem Experiment durchgeführt. Am Ende des Experimentes wurde noch die Blutglukosekonzentration bestimmt und die Ratten wurden gewogen. Eventuelle Vorbehandlungen der Versuchstiere sind in den jeweiligen Arbeitsprotokollen mit beschrieben.

2.3.3.5. Gewichtsmessung

Alle Tiere wurden vor STZ-Injektion und bei jedem Experiment gewogen. Als Waage wurde eine geeichte Digitalwaage benutzt, auf der ein spezieller Käfig mit Streu stand. In diesen Käfig wurden die Ratten einzeln gesetzt und das Gewicht digital abgelesen. Das Gewicht wurde ohne Kommastelle ab- bzw. aufgerundet. Vor jeder Messung wurde die digitale Waage wieder auf 0,00g mit Käfig zurückgestellt.

2.3.3.6. Messung der Blutglukosekonzentration

Zum Messen der Blutglukosekonzentration wurden die Versuchstiere zunächst mit Isofluran narkotisiert, dann wurde mit einer 26 G Kanüle eine Schwanzvene punktiert. Der erste Blutstropfen wurde verworfen, der zweite auf einen Glukose-Oxidase-Teststreifen (Glukoflex-R Glukoseteststreifen, National Diagnostic Products Sydney) getropft. Nach einer Minute wurde der Tropfen mit Zellstoff sorgfältig abgewischt und eine weitere Minute gewartet. Lag die Glukosekonzentration des Blutes unter 300 mg/dl, so konnte das Ergebnis gleich anhand einer beigefügten Farbtabelle abgelesen werden, lag die Konzentration über 300 mg/dl, musste noch eine weitere Minute

gewartet werden, bis auch dieses Ergebnis abgelesen werden konnte. Die minimale Blutung aus der Vene sistierte von alleine oder konnte mittels kurzer Kompression mit Zellstoff gestillt werden. Ab einer Konzentration von 300 mg/dl (17 mmol/l) wurden die Ratten als diabetisch angesehen. Die erste Blutzuckermessung wurde am dritten Tag nach STZ-Injektion durchgeführt und dann jeweils an den Tagen der Experimente.

2.3.4. Arbeitsprotokolle

Arbeitsprotokoll Vorversuche

Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen eingeteilt: diabetische und nicht-diabetische. Die diabetischen Tiere bekamen 45 mg/kg KG STZ in ihre Schwanzvene injiziert, die nicht-diabetischen Tiere erhielten das Vehikel. Nach drei Tagen wurde erstmalig der Blutzucker gemessen. An den ersten acht Tagen wurden täglich die Ausgangswerte und das Gewicht bestimmt, dann nur noch nach zwei, drei, vier, acht und 12 Wochen. An den gleichen Tagen bzw. Wochen wurden ebenfalls die Experimente nach Fentanylgabe durchgeführt. Hierzu wurden zunächst die Ausgangswerte bestimmt. Danach erhielten die Tiere in einer Kurznarkose eine bestimmte Dosis Fentanyl intraplantar in die rechte Hinterpfote gespritzt. Nach drei bis fünf Minuten wurde dann erneut die DSS gemessen. Jede Pfote wurde dreimal im Abstand von 10 Sekunden gemessen und später der Mittelwert daraus bestimmt. Anschließend wurden die Ratten gewogen.

Arbeitsprotokoll der Zugabe von NGF, IGF1 oder IGF2

Die Versuchstiere wurden in drei Gruppen eingeteilt: diabetische ohne Zugabe von Wachstumsfaktoren, diabetische mit Zugabe von Wachstumsfaktoren (NGF, IGF1 oder IGF2) und nicht-diabetische. Beide diabetischen Gruppen bekamen i.v. 45 mg/kg KG STZ injiziert. Nach drei, sieben bzw. 11 Wochen wurde der diabetischen Gruppe mit Wachstumsfaktoren die unter 2.3.2.3. und 2.3.2.4. beschriebene Pumpe implantiert. Die Experimente mit Fentanylgabe wurden vier, acht bzw. 12 Wochen nach STZ-Injektion durchgeführt. Zum jeweiligen Messzeitpunkt wurden zunächst wieder die Ausgangswerte bestimmt, anschließend wurden nach Gabe von bestimmten

Fentanylkonzentrationen die DSS erhoben und dann die Ratten gewogen und der Blutzucker bestimmt.

Arbeitsprotokoll Calphostin C-Zugabe

Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet: diabetische ohne Zugabe von Calphostin C, diabetische mit Zugabe von Calphostin C und nicht-diabetische Tiere. Die beiden diabetischen Gruppen bekamen i.v. 45 mg/kg KG STZ appliziert. Die Experimente fanden zwei und vier Wochen nach STZ-Injektion statt. Am Tag des Experimentes wurde den diabetischen Ratten über einen intrathekalen Katheter 10 µl (500 ng) Calphostin C Lösung injiziert und dann mit 5 µl Vehikel nachgespült. Zusätzlich wurden 100 µl (500 ng) Calphostin C Lösung in die rechte hintere Pfote gespritzt. Die Applikationen erfolgten in Kurznarkose. Nachdem die Tiere aus der Narkose aufgewacht waren, wurde der Ausgangswert bestimmt. Danach bekamen die Tiere wieder in einer Kurznarkose die entsprechende Dosis Fentanyl i.pl. injiziert. Nach drei bis fünf Minuten wurden die DSS gemessen. Bei der Messung wurde darauf geachtet, dass zwischen der Applikation von Calphostin C und dem Messen der DSS nach Fentanylgabe nicht mehr als 30 Minuten lagen. Die diabetischen Tiere ohne Calphostin C-Behandlung erhielten jeweils das Vehikel gespritzt, ansonsten war der Versuchsaufbau identisch.

2.3.5. Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit dem Software Programm SigmaStat 3.5 durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM: „standard error of the mean“) erfasst. Zum Vergleich von mehreren Gruppen und bei normal verteilten Werten wurde der Test One Way ANOVA oder RM (repeated reasurement) ANOVA verwendet, als post hoc Test wurden der Bonferroni t-test für wiederholte Messungen angewandt. Waren die Werte nicht normal verteilt, wurde ein Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks durchgeführt, als post hoc Test wurde die Dunn's Method verwendet. Zum Vergleich von mehreren Gruppen, einem zusätzlichen Einflußfaktor und bei normal verteilten Werten wurde der Test Two Way ANOVA und als post hoc Test die Student-Newman-Keuls Method angewendet. Die Abbildungen wurden mit Hilfe des Softwareprogramms SigmaPlot 10.0 erstellt.

2.3.6. Software

Statistik	Microsoft Excel 2003	Microsoft Corporation, USA
	SigmaStat Version 3.5	SPSS Inc., USA
Grafik	SigmaPlot Version 10.0	SPSS Inc., USA
Literaturverzeichnis	Endnote Plus 2.3.0.2	Niles & Associates Inc., USA
Textverarbeitung	Word 2003, 2007	Microsoft Corporation, USA

3. Ergebnisse

3.1. Blutglukosekonzentration und Gewichtsverlauf bei diabetischen Ratten

In die diabetische Versuchsgruppe wurden ausschließlich Ratten eingeschlossen, die einen Blutzuckerwert von über 300 mg/dl (17 mmol/l) hatten. Der Blutzuckerspiegel der STZ-behandelten Ratten stieg innerhalb von drei Tagen signifikant auf Werte über 300 mg/dl an (* $p < 0,05$, Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, post hoc Test: Dunn's Method). Während des gesamten Beobachtungszeitraumes blieben die Blutglukosewerte der diabetischen Ratten erhöht.

Des Weiteren zeigten die diabetischen Tiere eine verzögerte Gewichtszunahme gegenüber den nicht-diabetischen Tieren. Abbildung 3 stellt die zeitabhängige Gewichtsentwicklung beider Gruppen dar. Es ist deutlich zu sehen, dass die diabetischen Ratten zwar an Gewicht zunahmten, aber wesentlich langsamer und weniger als die nicht-diabetischen Ratten. Nach einer Woche waren die Unterschiede signifikant (* $p < 0,05$ One Way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni t-test). Typische Zeichen des Diabetes wie Polydipsie und Polyurie traten nach drei bis fünf Tagen auf.

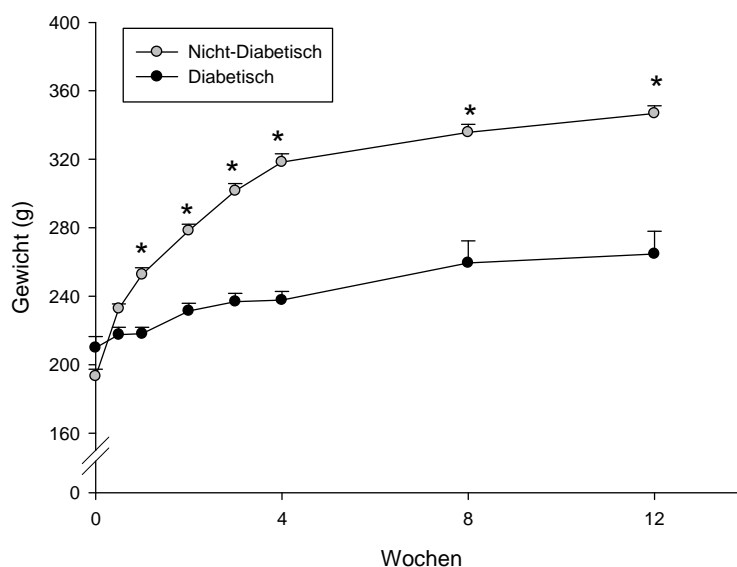


Abbildung 3: Zeitabhängige Gewichtsentwicklung von altersgleichen diabetischen und nicht-diabetischen Ratten. Die Ratten wurden vor und an den jeweiligen Tagen nach STZ-injektion gewogen. In der Grafik stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus allen Gewichtsmessungen zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Nach einer Woche unterscheiden sich die Gewichte der diabetischen Ratten signifikant von denen der nicht-diabetischen Ratten. * $p < 0,05$ Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, post hoc Test: Dunn's Method

3.2. Analgetische Wirksamkeit von Fentanyl in diabetischen Tieren

Bei nicht-diabetischen Ratten erzielte die Fentanylgabe eine dosisabhängige Anhebung der DSS [Antonijevic et al. 1995]. Wir konnten zeigen, dass mit Fortschreiten des Diabetes und damit auch der diabetischen Neuropathie die analgetische Wirksamkeit von peripher appliziertem Fentanyl abnahm (siehe Abbildung 4).

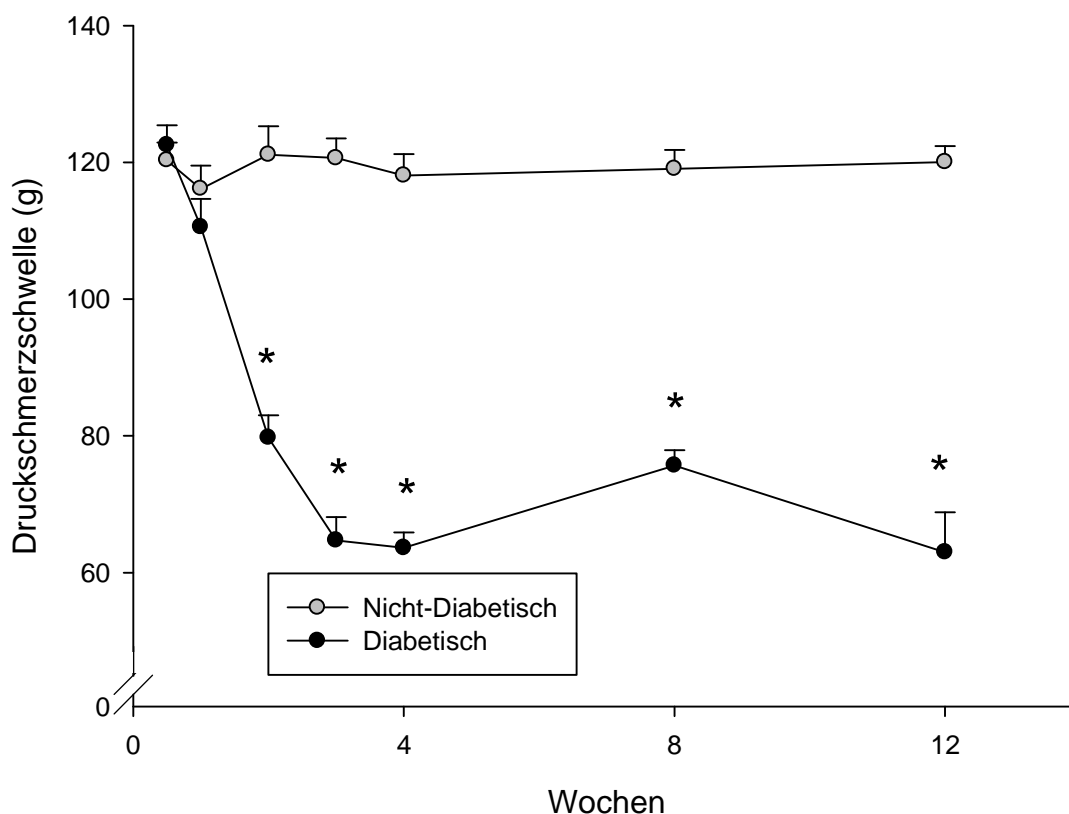


Abbildung 4: Verringerte analgetische Wirksamkeit von i.pl. Fentanyl infolge eines STZ-induzierten Diabetes. Gemessen wurde drei bis fünf Minuten nach i.pl. Fentanylgabe (1,125 µg). In der Grafik stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den Messungen der DSS der rechten hinteren Pfoten zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Nach zwei Wochen fallen die durch Fentanyl induzierten erhöhten DSS-Werte bei diabetischen Ratten signifikant unter die der nicht-diabetischen Ratten. * $p < 0,05$ One Way ANOVA post hoc Test: Bonferroni t-test.

Abbildung 4 zeigt das Schmerzverhalten im zeitlichen Verlauf nach der Injektion von 1,125 µg Fentanyl in die rechte hintere Pfote sowohl von nicht-diabetischen als auch von diabetischen Ratten. Es ist zu erkennen, dass die diabetischen Tiere ab dem 14. Tag eine signifikant verminderte Ansprechbarkeit auf das lokal applizierte Fentanyl

zeigten, dies wird als verminderte periphere Opioidanalgesie bzw. verminderte Ansprechbarkeit auf periphere Opioide bezeichnet. Die DSS der diabetischen Ratten nach Gabe von 1,125 µg Fentanyl sank im weiteren Verlauf von Maximalwerten um 122,5 g +/- 3 g auf Minimalwerte um 62,7 g +/- 3 g ab (* p<0,05, One Way ANOVA, post hoc Test: Bonferroni t-test).

3.3. Zunehmend verminderte i.pl. Fentanylanalgesie im Verlauf des STZ-induzierten Diabetes

Je länger der Diabetes anhält, desto weniger Wirkung zeigen lokal applizierte Opioide. Vergleicht man die Abbildungen 5 A und B miteinander, so ist zu sehen, dass sich nach zwei Wochen die erhöhte DSS bei Fentanylgabe bei den diabetischen Ratten deutlich verringert hat. Die Ansprechbarkeit auf periphere Opioide hat innerhalb von zwei Wochen rapide abgenommen.

Dieses Phänomen hält auch in den darauf folgenden Experimenten nach drei und vier Wochen an, wie die Abbildungen 6 A und B zeigen. Bereits zwei Wochen nach STZ-Induktion sind die Unterschiede zwischen der nicht diabetischen und der diabetischen Gruppe bei allen gegebenen Konzentrationen von Fentanyl signifikant unterschiedlich. Nach drei und vier Wochen scheint die Ansprechbarkeit sogar noch weiter abzusinken. Ebenfalls wurde deutlich, dass die Gabe von 1,125 µg Fentanyl die größten Unterschiede zu allen Messzeitpunkten zwischen diabetischen und nicht-diabetischen Tieren zeigte, weswegen die folgenden Experimente mit oben genannter Dosis durchgeführt wurden.

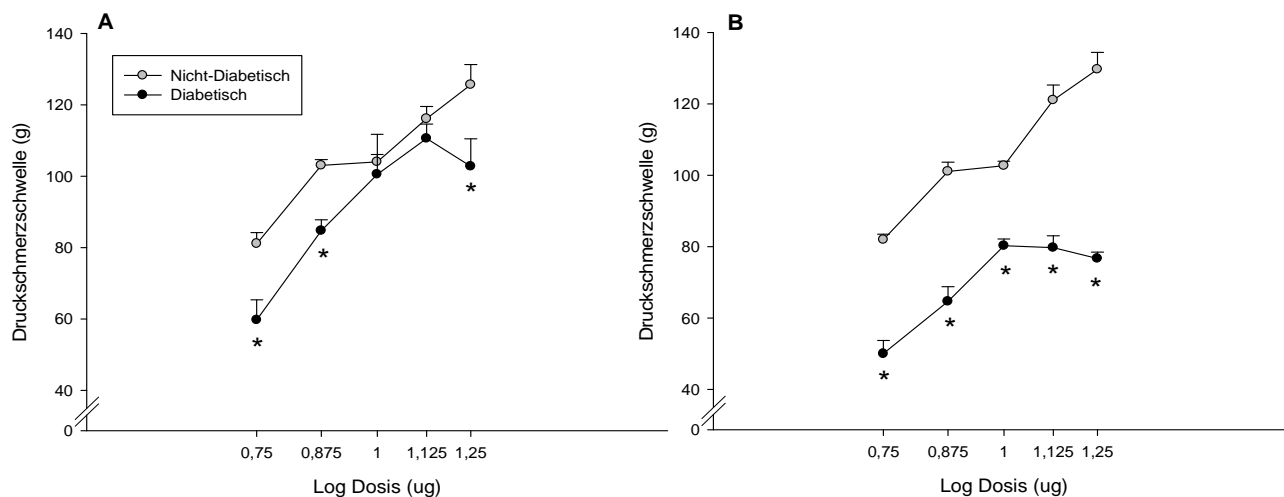


Abbildung 5 A und B: Wirkung verschiedener Fentanylkonzentrationen (0,75 µg bis 1,125 µg Fentanyl) auf die DSS der Ratten. A) Eine Woche nach STZ- / Vehikelinjektion, B) Zwei Wochen nach STZ- / Vehikelinjektion. In den Grafiken stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den DSS-Messungen der rechten hinteren Pfote dar. **A)** Die DSS von nicht-diabetischen und diabetischen Ratten unterscheiden sich bei drei der verwendeten Fentanyldosierungen signifikant voneinander (* $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc Test: Student-Newman-Keuls Method). **B)** Hier hingegen unterscheiden sich schon alle DSS der Tiere signifikant voneinander (* $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc test: Student-Newman-Keuls Method).

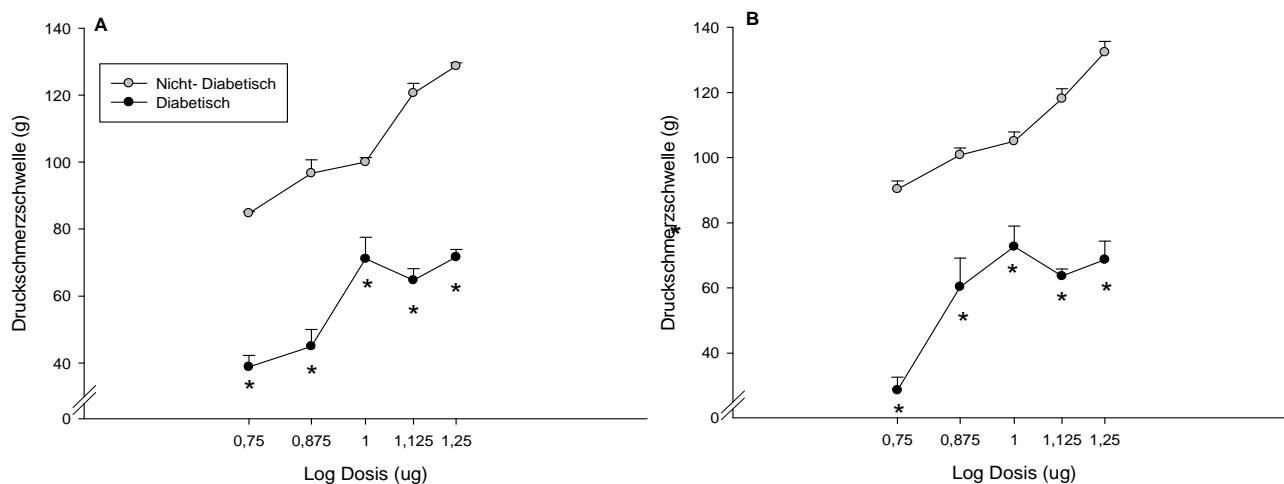


Abbildung 6 A und B: Wirkung verschiedener Fentanylkonzentrationen (0,75 µg bis 1,25 µg Fentanyl) auf die DSS der Ratten. A) Drei Wochen nach STZ- / Vehikelinjektion, B) Vier Wochen nach STZ- / Vehikelinjektion. In den Grafiken stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den DSS-Messungen der rechten hinteren Pfote dar. **A)** Nach drei Wochen unterscheidet sich die DSS der diabetischen Gruppe bei allen Fentanyldosierungen signifikant von denen der nicht-diabetischen Gruppe (* $p < 0,05$ Two Way ANOVA, post hoc Test: Student-Newman-Keuls Method). **B)** Hier unterscheiden sich die DSS der beiden Gruppen bei allen Fentanylkonzentrationen noch etwas deutlicher voneinander (* $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc test: Student-Newman-Keuls Method).

3.4. Einfluss von Nerve-growth-factor (NGF) auf die verminderte i.pl. Fentanyl-analgesie diabetischer Ratten

Die Gabe von NGF bewirkt bei den meisten Tieren einen akuten Schmerzreiz mit anhaltender Schmerzhaftigkeit, der nach zwei bis drei Tagen vergeht. Die Gabe von NGF hatte auf die Ausgangswerte diabetischer Ratten keinen zusätzlichen signifikanten Einfluss im Vergleich zu denen ohne NGF-Pumpe. Sowohl die diabetischen Tiere ohne NGF-Gabe als auch die mit NGF-Gabe hatten verringerte Messwerte im Vergleich zu den nicht-diabetischen Tieren (* $p < 0,05$, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks, post hoc Test: Dunn's Method). Abbildung 7 zeigt, dass die Gabe von NGF einen signifikanten Einfluss auf die periphere Opioidanalgesie hat. Die DSS der diabetischen Ratten mit NGF Gabe unterschieden sich nach der Gabe von $1,125 \mu\text{g}$ Fentanyl deutlich von der DSS der diabetischen Tiere ohne NGF Gabe (* $p < 0,05$; Two Way ANOVA, post hoc Test: Student-Newman-Keuls Method).

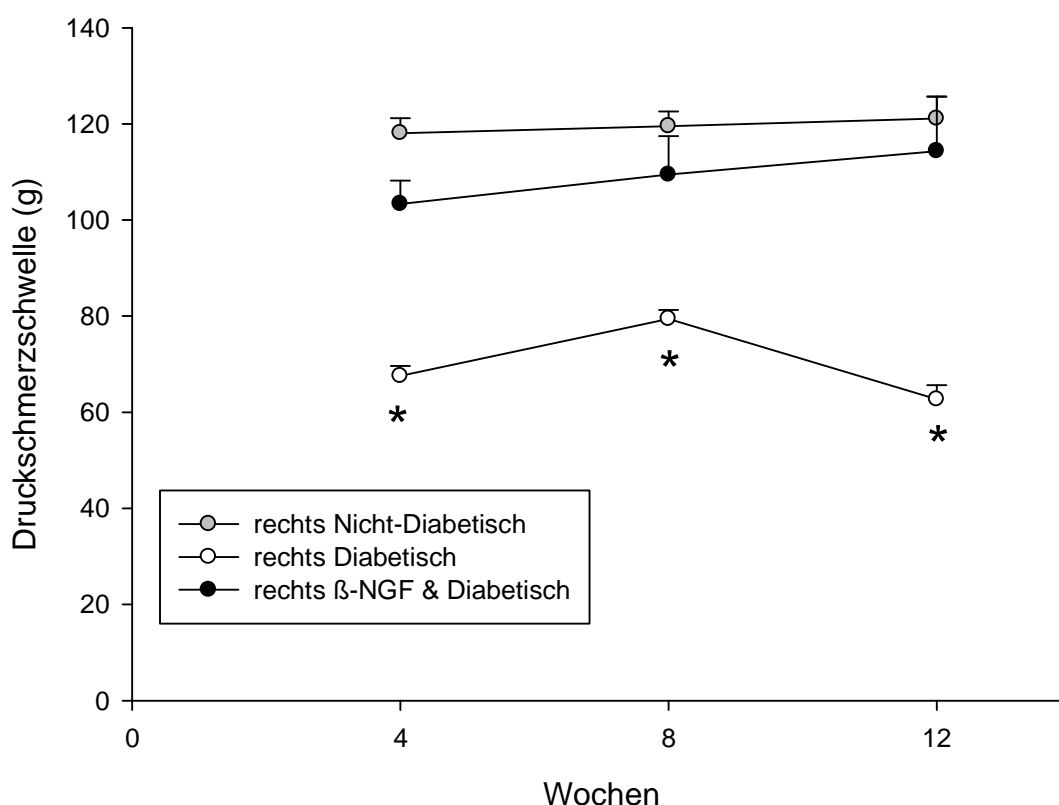


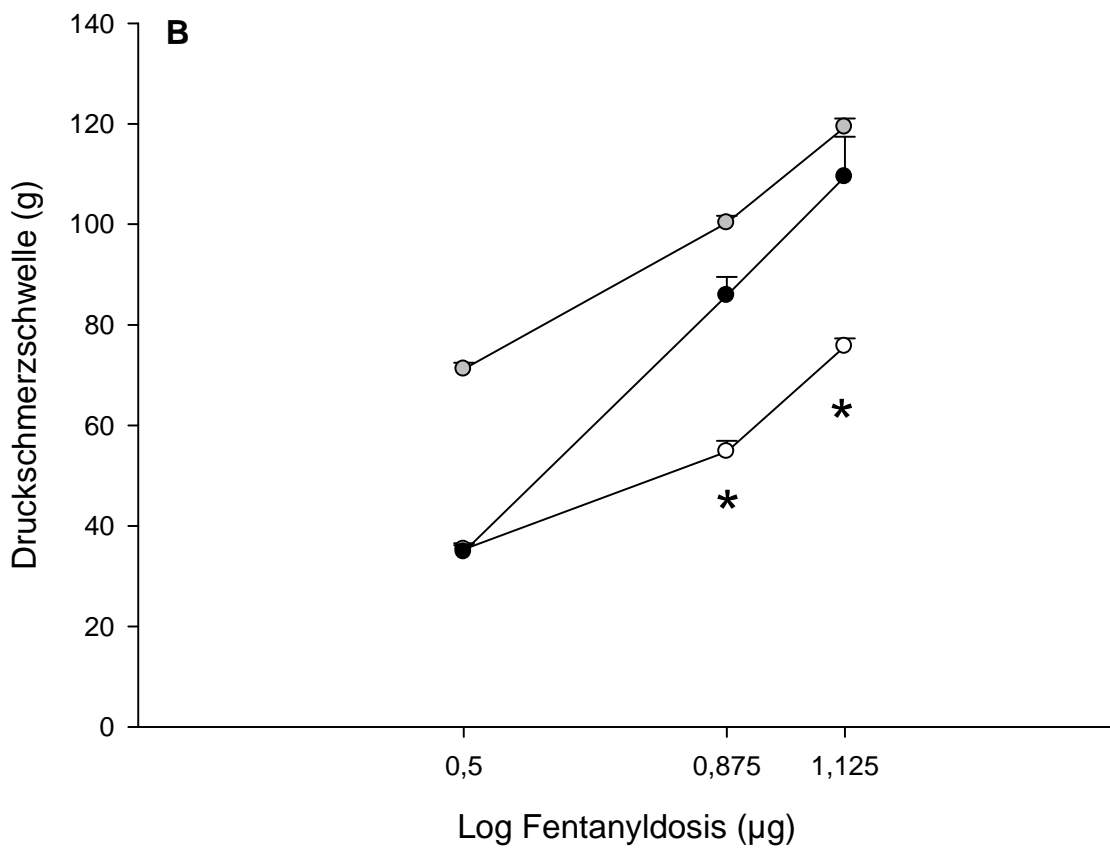
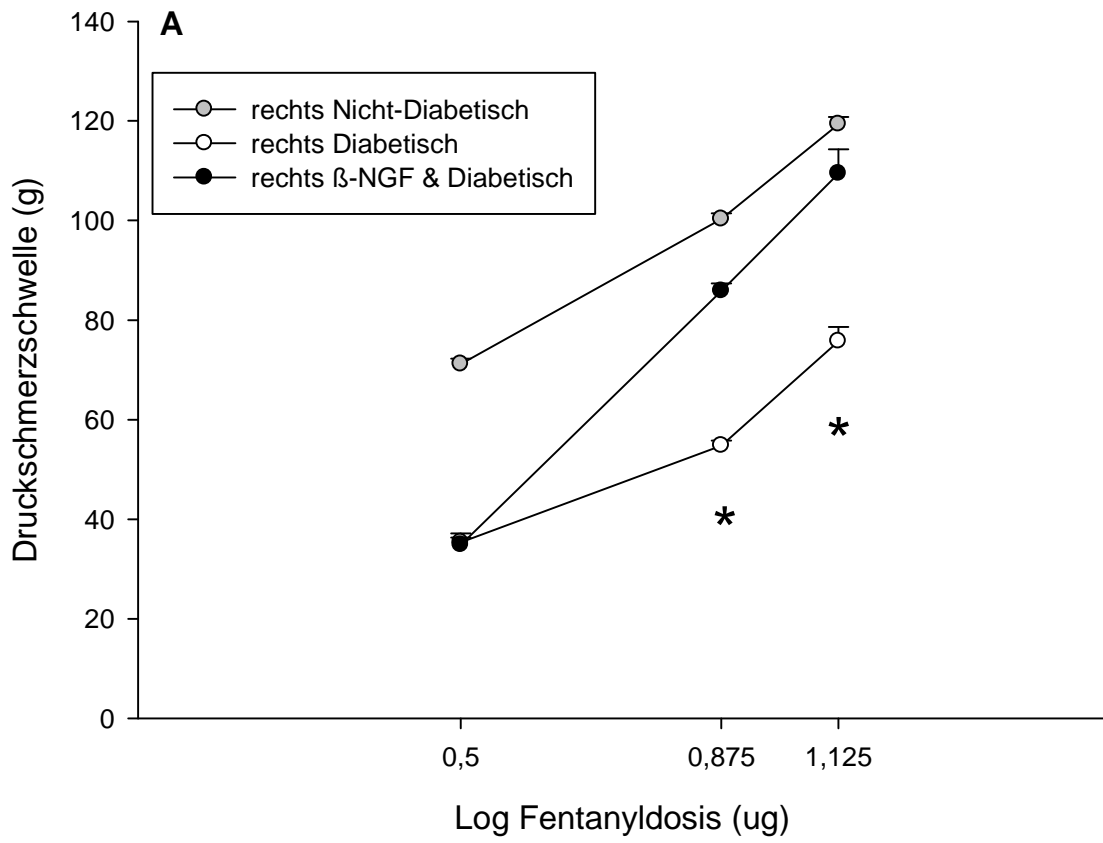
Abbildung 7: Vergleich der DSS nach Applikation von $1,125 \mu\text{g}$ Fentanyl bei nicht-diabetischen Ratten sowie diabetischen Ratten mit und ohne NGF-Vorbehandlung.

In der Grafik stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den DSS-Messungen der rechten hinteren Pfote dar. Die DSS-Werte der mit NGF behandelten Tiere unterscheiden sich signifikant von denen ohne NGF-Behandlung. * $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc test: Student-Newman-Keuls Method.

3.5. Verbesserung der verminderten Ansprechbarkeit auf i.pl. Fentanyl durch Vorbehandlung mit NGF

Die Abbildungen 8 A bis C zeigen die Wirkungen von unterschiedlichen Fentanyldosierungen zu unterschiedlichen Messzeitpunkten. Die Gabe von 0,5 µg Fentanyl hatte zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluss auf die DSS. Bei Verwendung anderer Fentanyldosierungen unterschieden sich die DSS der nicht-diabetischen und der diabetischen Ratten ohne NGF-Gabe jedoch signifikant voneinander (* $p < 0,05$; Two Way ANOVA, posthoc Test: Student-Newman-Keuls Method).

Sowohl bei einer Dosierung von 0,875 µg also auch bei 1,125 µg Fentanyl unterschieden sich die DSS signifikant zwischen den diabetischen Ratten mit und ohne NGF-Gabe. Des Weiteren ist beim Vergleich der Abbildungen zu sehen, dass je weiter der Diabetes fortschreitet, desto mehr Wirkung scheint NGF auf die Verbesserung der peripheren Opioidanalgesie zu haben. Schon ab acht Wochen nach STZ-Injektion gibt es bei der Gabe von 1,125 µg Fentanyl keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen dem Schmerzniveau der nicht-diabetischen Ratten und dem der diabetischen Ratten mit NGF-Pumpen. So steigt beispielsweise die DSS der NGF-Tiere von 103 g \pm 5 g nach vier Wochen auf 113 g \pm 8 g nach 12 Wochen an. Am deutlichsten ist dieser Unterschied nach einer Gabe von 1,125 µg Fentanyl zu sehen (* $p < 0,05$; Two Way ANOVA, post hoc Test: Student-Newman-Keuls Method). Demzufolge hat NGF in der späten Phase des Diabetesmodells eine verbessernde Wirkung auf die verminderte periphere Opioidanalgesie.



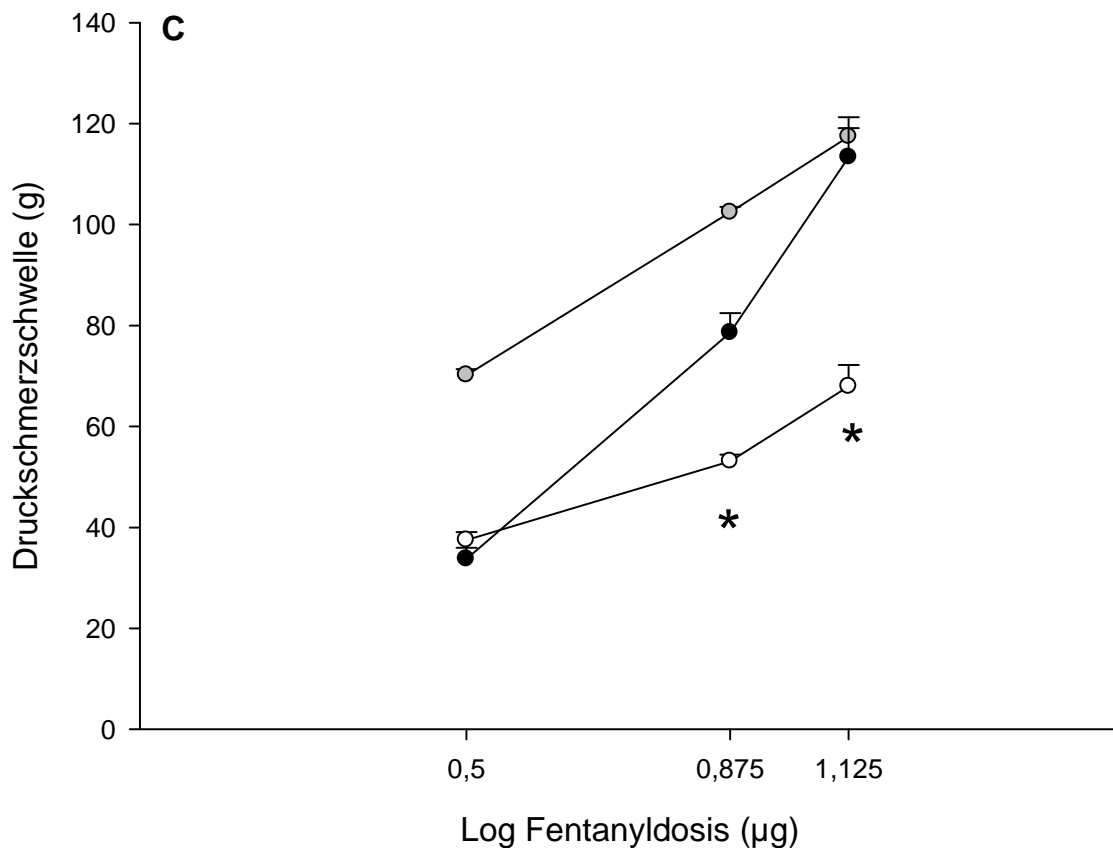


Abbildung 8: Vergleich der DSS von nicht-diabetischen Ratten, sowie diabetischen Ratten mit und ohne NGF-Pumpe nach der Gabe von unterschiedlichen Fentanyl dosierungen (0,5 μg , 0,875 μg und 1,125 μg) In den Grafiken stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den DSS-Messungen der rechten hinteren Pfote dar. Zu den Messzeitpunkten A) vier, B) acht und C) 12 Wochen gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den diabetischen Gruppen bei der Gabe von 0,875 μg und 1,125 μg Fentanyl. Die DSS der Ratten mit NGF-Gabe sind signifikant höher. * $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc test: Student-Newman-Keuls Method.

3.6. Wirkung von Insulin-like-growth-factor 1 (IGF1) auf die verminderte periphere Opioidanalgesie der diabetischen Ratten

Die Gabe von IGF1 hatte eine ähnliche Wirkung wie NGF in Bezug auf die anfänglichen Schmerzen, die jedoch nach zwei bis drei Tagen vergingen. Die Ausgangswerte konnten durch IGF1 vier Wochen nach STZ-Gabe signifikant beeinflusst werden. In Abbildung 9 ist dieser Unterschied deutlich zu sehen. Die anfängliche Erhöhung der Ausgangswerte ist jedoch nach acht und 12 Wochen nicht mehr zu erkennen (* $p < 0,05$, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks, post hoc Test: Dunn's Method).

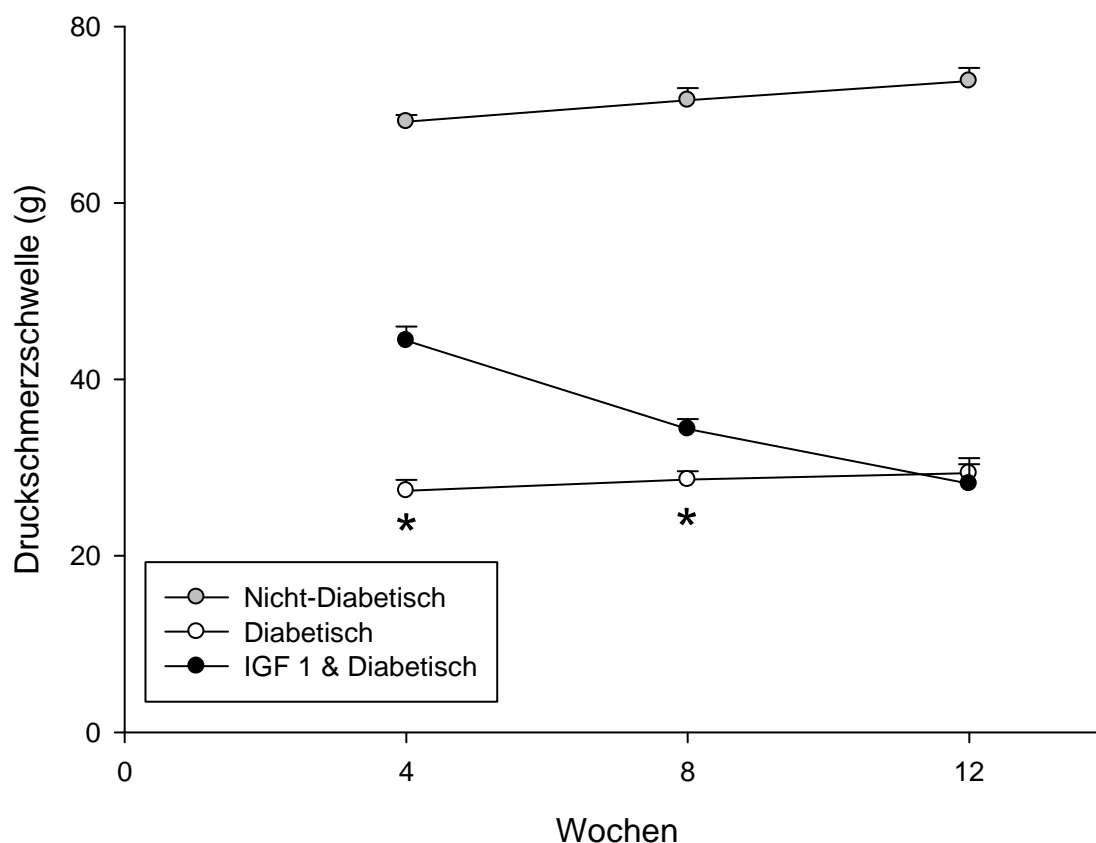


Abbildung 9: Wirkung von IGF1 auf die STZ-induzierten erniedrigten DSS.

In der Grafik stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den Messungen der Ausgangswerte der rechten hinteren Pfote zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Die Messwerte der diabetischen Ratten mit und ohne Pumpe unterscheiden sich zu jedem Zeitpunkt signifikant von denen der nicht-diabetischen Ratten. Nur nach vier Wochen unterscheiden sich die Ausgangswerte der diabetischen Ratten mit IGF1-Gabe signifikant von denen der diabetischen Ratten ohne IGF1 in ihrer Pumpe. * $p < 0,05$, Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks, post hoc Test: Dunn's Method

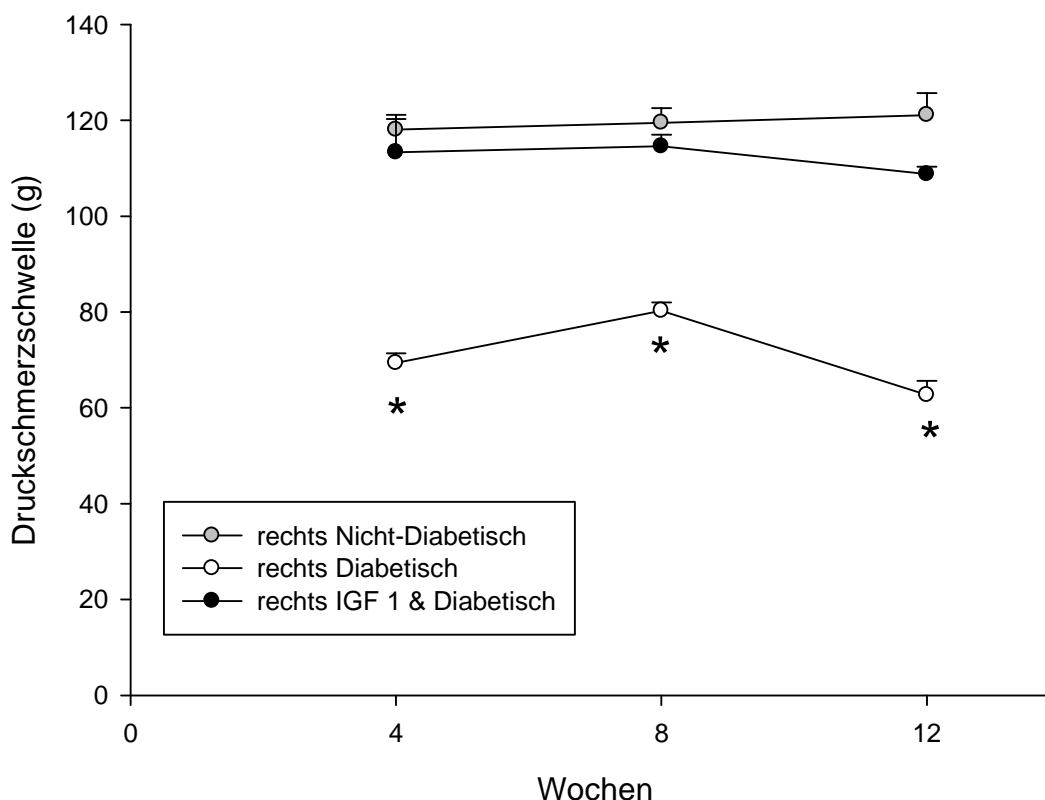
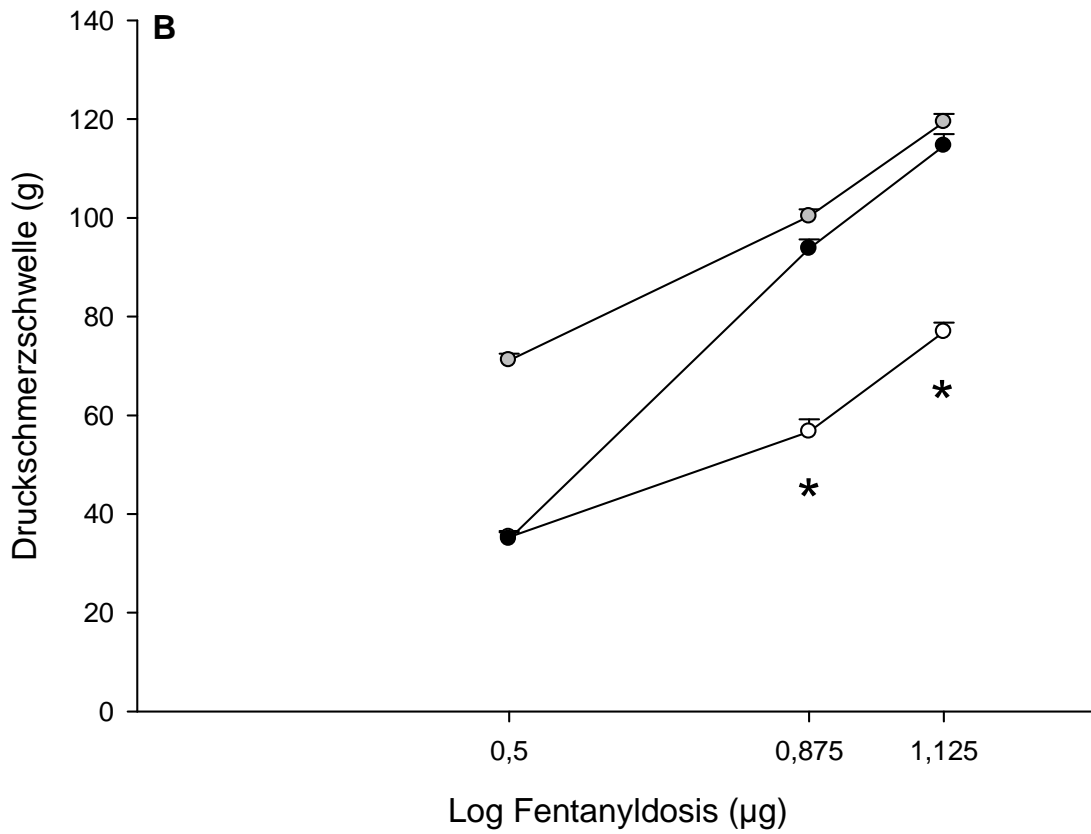
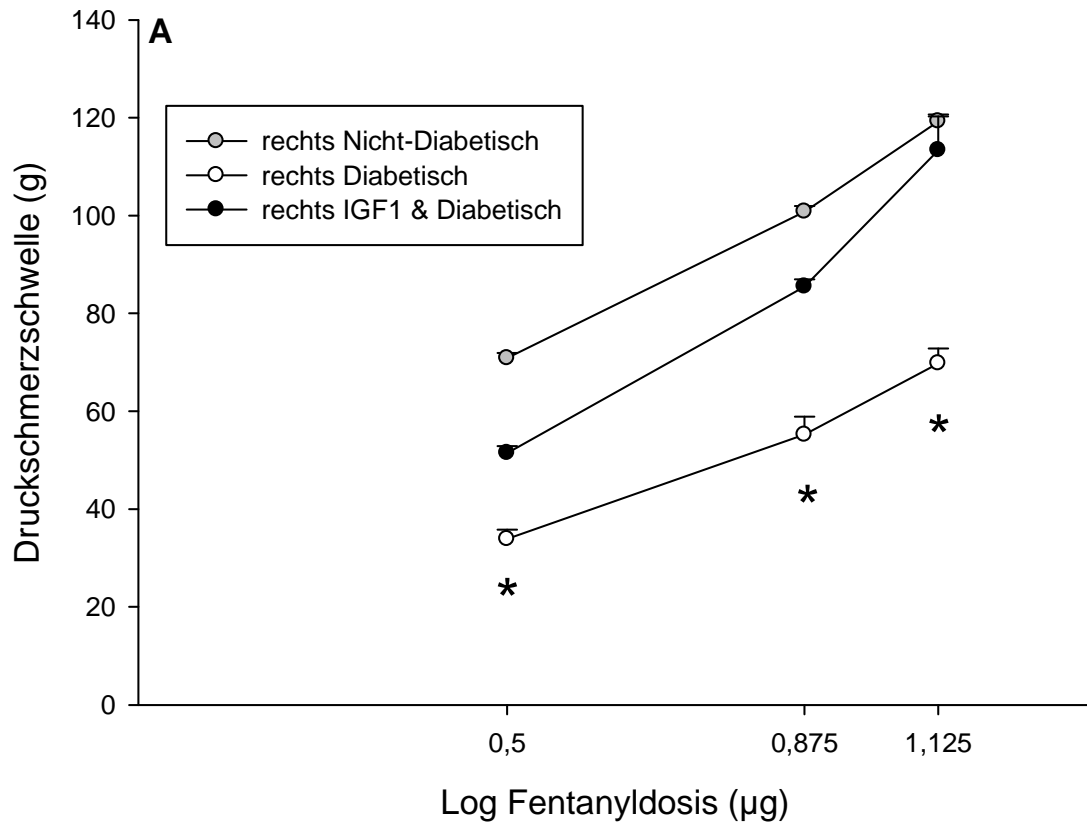


Abbildung 10: Vergleich der DSS fünf Minuten nach Applikation von 1,125 µg Fentanyl in die rechte Hinterpfote bei nicht-diabetischen Ratten, sowie diabetischen Ratten mit und ohne IGF1 Gabe. In der Grafik stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den Messungen der DSS der rechten hinteren Pfote zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Die diabetischen Ratten mit IGF1 Pumpe haben zu jedem Zeitpunkt eine signifikant höhere DSS als die diabetischen Ratten ohne IGF1. Die nicht-diabetische und die diabetische Gruppe mit IGF1 zeigten bezüglich der DSS keinen signifikanten Unterschied. * $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc Test: Student-Newman-Keuls Method.

Die verminderte i.pl. Fentanylanalgesie der diabetischen Ratten wird durch die Gabe von IGF1 signifikant verbessert. Zu allen drei Messzeitpunkten lagen die DSS-Werte der diabetischen Ratten mit IGF1 nach der Gabe von 1,125 µg Fentanyl deutlich über denen der diabetischen Ratten ohne IGF1 (* $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc Test: Student-Newman-Keuls Methode).

3.7. Veränderung der verminderten i.pl. Fentanylanalgesie durch Vorbehandlung mit IGF1

Die Abbildungen 11 A bis C zeigen im zeitlichen Verlauf die Wirkung von unterschiedlichen Fentanyl dosierungen (0,5 µg, 0,875 µg und 1,125 µg) auf die periphere Opioidanalgesie. Nach vier Wochen unterschieden sich die DSS der diabetischen Ratten mit IGF1 Gabe bei Injektion von 0,5 µg Fentanyl signifikant von den beiden anderen Gruppen. Dies lag an den in Abbildung 9 gezeigten höheren Ausgangswerten, welche dann auch eine höhere DSS nach Fentanylgabe nach sich ziehen. Nach acht Wochen scheint IGF1 die größte Wirkung zu haben, da sich hier die DSS der diabetischen IGF1 Ratten und der nicht-diabetischen Ratten sowohl bei 0,875 µg als auch 1,125 µg nicht mehr signifikant voneinander unterscheiden. Im Gegensatz zu NGF bewirkt IGF1 sowohl eine Verbesserung der Ausgangswerte nach vier Wochen als auch der peripheren Opioidanalgesie in beiden Phasen. Die beste Wirkung auf die periphere Opioidanalgesie scheint es nach acht bis 12 Wochen zu haben.



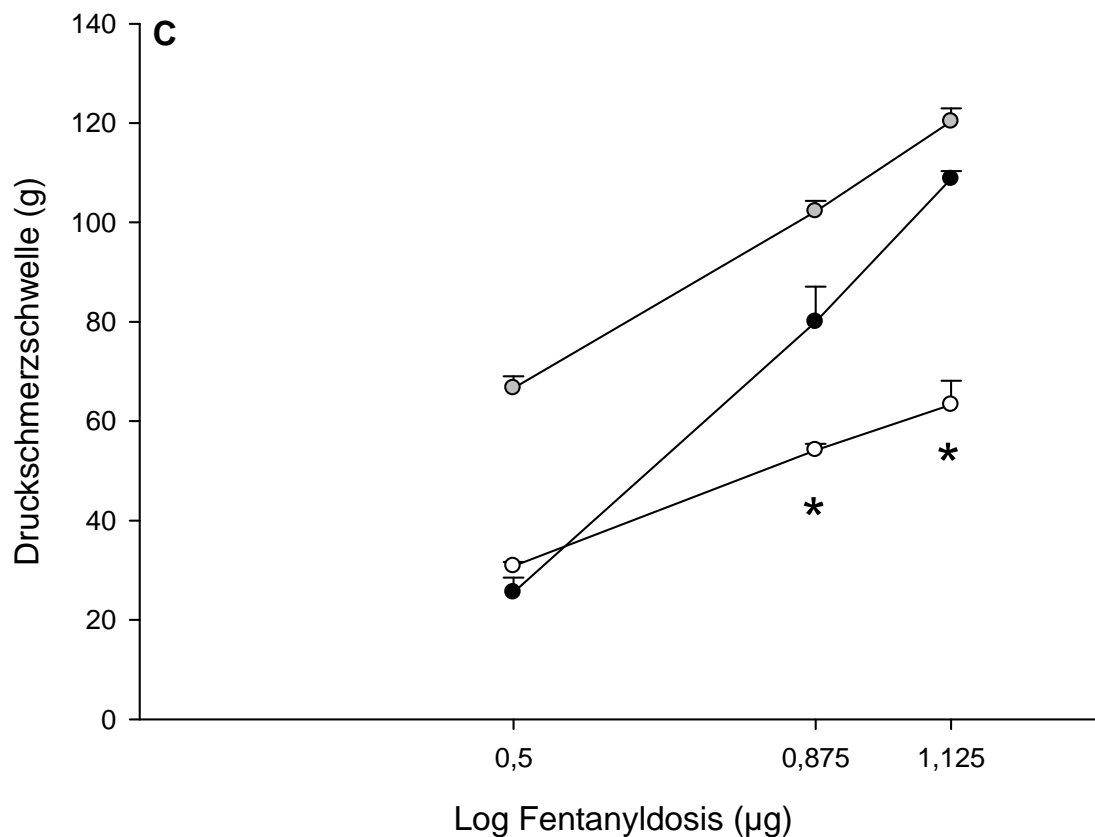


Abbildung 11: Vergleich der DSS von nicht-diabetischen Ratten, sowie diabetischen Ratten mit und ohne IGF1-Pumpe nach der Gabe von unterschiedlichen Fentanylkonzentrationen (0,5 µg, 0,875 µg und 1,125 µg). In den Grafiken stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den DSS-Messungen der rechten hinteren Pfote dar. A) Die DSS der Tiere mit vier Wochen Diabetes unterscheiden sich nach IGF1 Gabe bei jeder Konzentration von denen der diabetischen Tiere ohne IGF1 in den Pumpen. B) und C) Tiere mit acht bzw. 12 Wochen Diabetes unterscheiden sich bezüglich der Fentanyl (0,875 µg und 1,125 µg)-induzierten Analgesie nach IGF1 Vorbehandlung signifikant von der diabetischen Gruppe ohne IGF1 Behandlung. * $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc test: Student-Newman-Keuls Method.

3.8. Beeinflussung der verminderten peripheren Opioidanalgesie durch die Gabe von Insulin-like-growth-factor 2 (IGF2)

Die Gabe von IGF2 hatte eine ähnliche Wirkung wie NGF und IGF1 in Bezug auf die anfänglich ausgelösten Schmerzen, die jedoch nach zwei bis drei Tagen vergingen. Die Ausgangswerte wurden unter der Gabe von IGF2 zu allen drei Messpunkten signifikant beeinflusst (siehe Abbildung 12). Während des gesamten Beobachtungszeitraums hatten die diabetischen Tiere mit IGF2 Vorbehandlung einen signifikant höheren Ausgangswert als die diabetischen Tieren ohne IGF2 Behandlung (* $p < 0,05$ Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks, post hoc Test: Dunn's Method). Es gab keinen Unterschied zwischen den Beobachtungszeitpunkten, IGF2 bewirkte also in der gesamten späten Phase des Diabetesmodells eine Verringerung des erhöhten Schmerzempfindens.

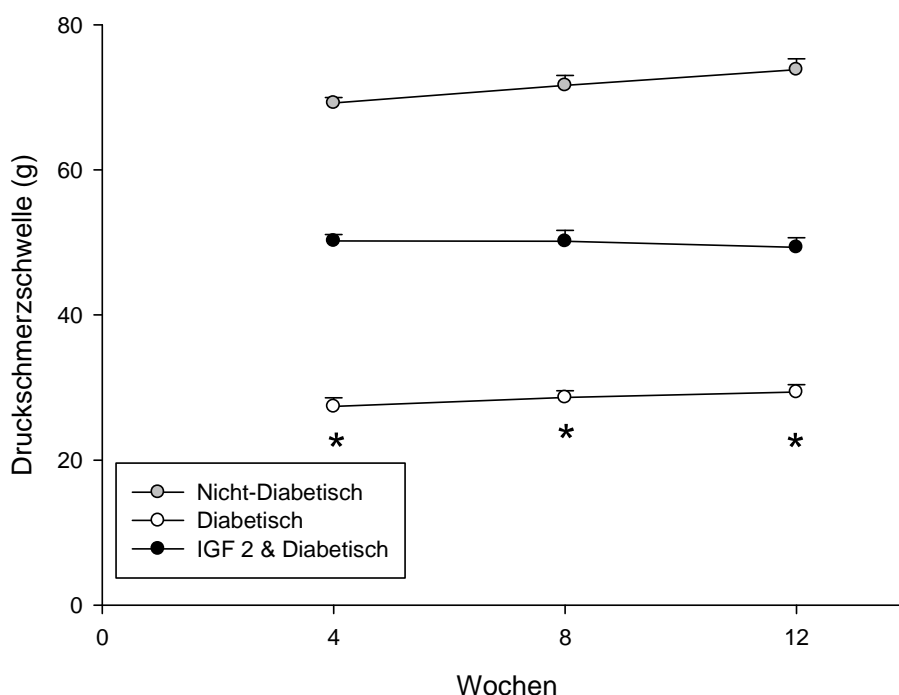


Abbildung 12: Vergleich der Ausgangswerte von nicht-diabetischen Ratten, sowie diabetischen Ratten mit und ohne IGF2 Gabe. In der Grafik stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den DSS-Messungen der rechten hinteren Pfote dar. Die Ausgangswerte der diabetischen Ratten mit IGF2 unterscheiden sich zu jedem Zeitpunkt signifikant von denen der diabetischen Ratten ohne IGF2. Innerhalb der diabetischen IGF2-Gruppe besteht zwischen den Messzeitpunkten kein signifikanter Unterschied. * $p < 0,05$ Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks, post hoc Test: Dunn's Method.

Die DSS der diabetischen IGF2 Tiere nach der Gabe von 1,125 μg Fentanyl sind nach vier und acht Wochen denen der nicht-diabetischen Tiere fast gleich. Diese Verminderung der peripheren Opioidanalgesie scheint nach 12 Wochen nicht mehr so stark, aber immer noch signifikant unterschiedlich von denen der diabetischen Ratten ohne IGF2 Vorbehandlung zu sein (siehe Abbildung 13). Die Werte der diabetischen Ratten mit IGF2 fallen von 121 g \pm 3 g zum Zeitpunkt von acht Wochen auf 85 g \pm 5 g nach Ablauf von 12 Wochen ab. Die Signifikanz wurde durch Berechnung der %MPE-Werte nachgeprüft (Daten nicht aufgeföhrt). Es konnte gezeigt werden, dass auch unter Berücksichtigung der ohnehin erhöhten Ausgangswerte die Verbesserung der DSS durch Fentanyl nach IGF2 Vorbehandlung zum Zeitpunkt von vier und acht Wochen signifikant ist. (* $p < 0,05$ Two Way ANOVA, post hoc Test: Student-Newman-Keuls Method)

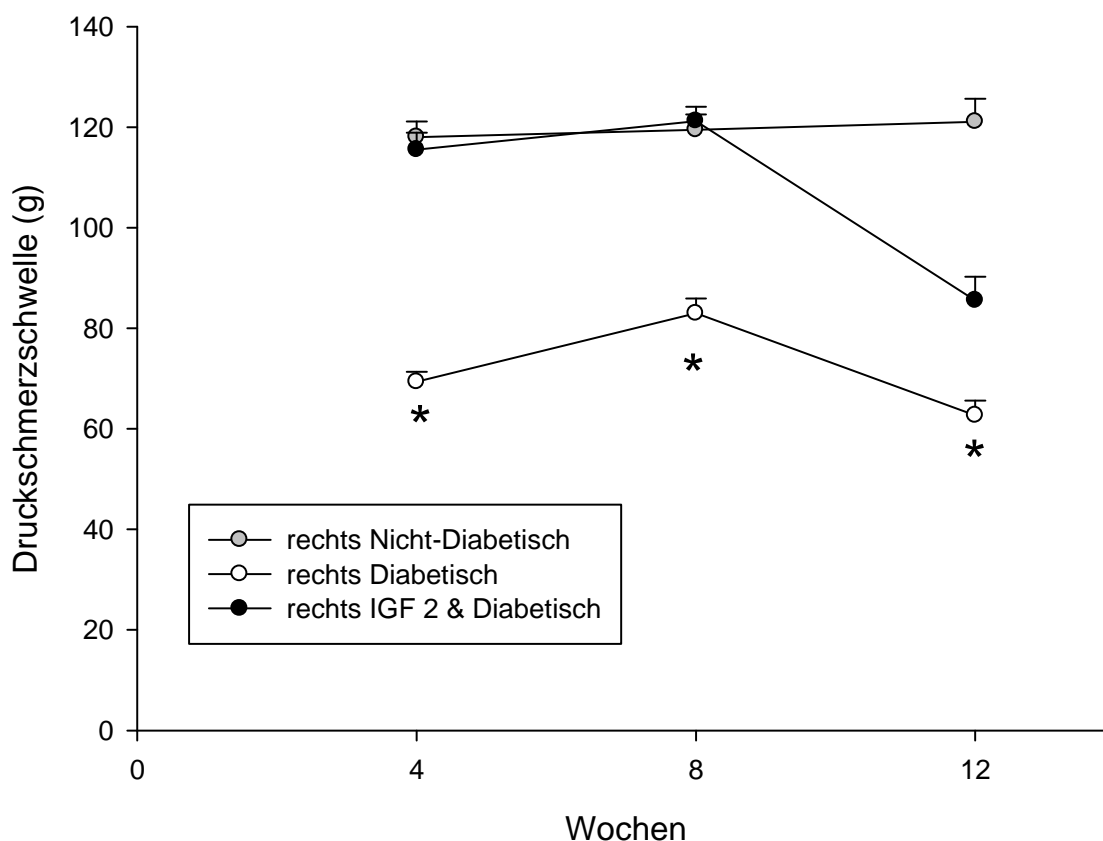
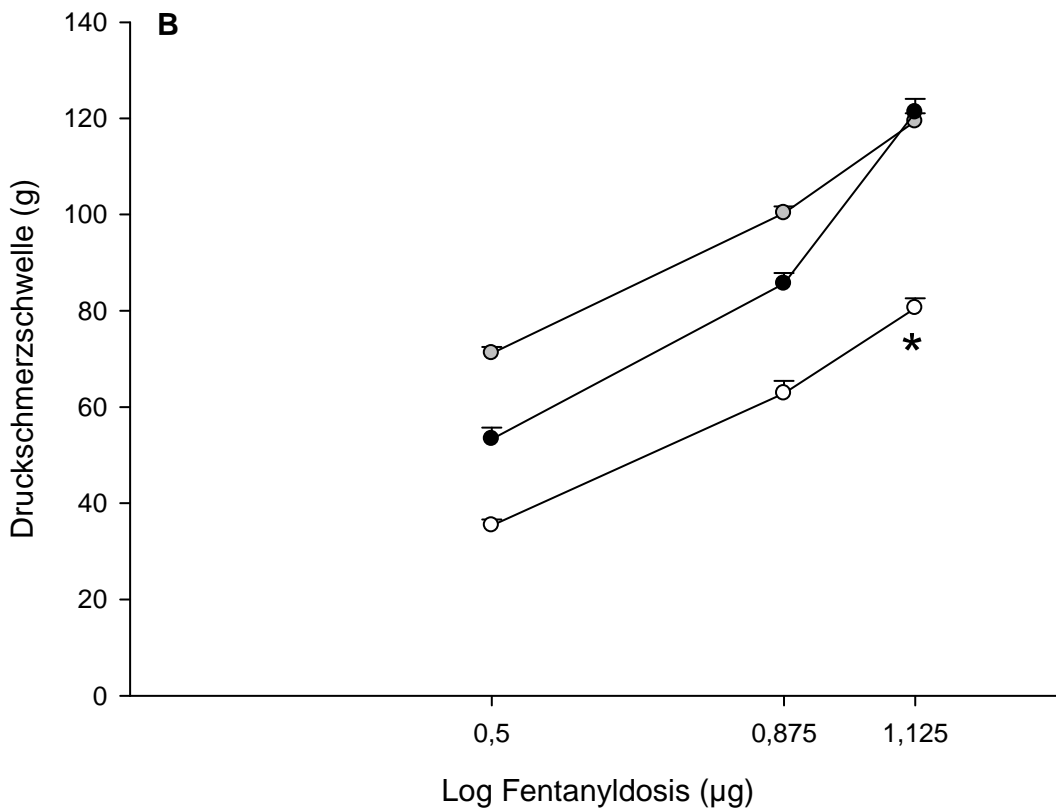
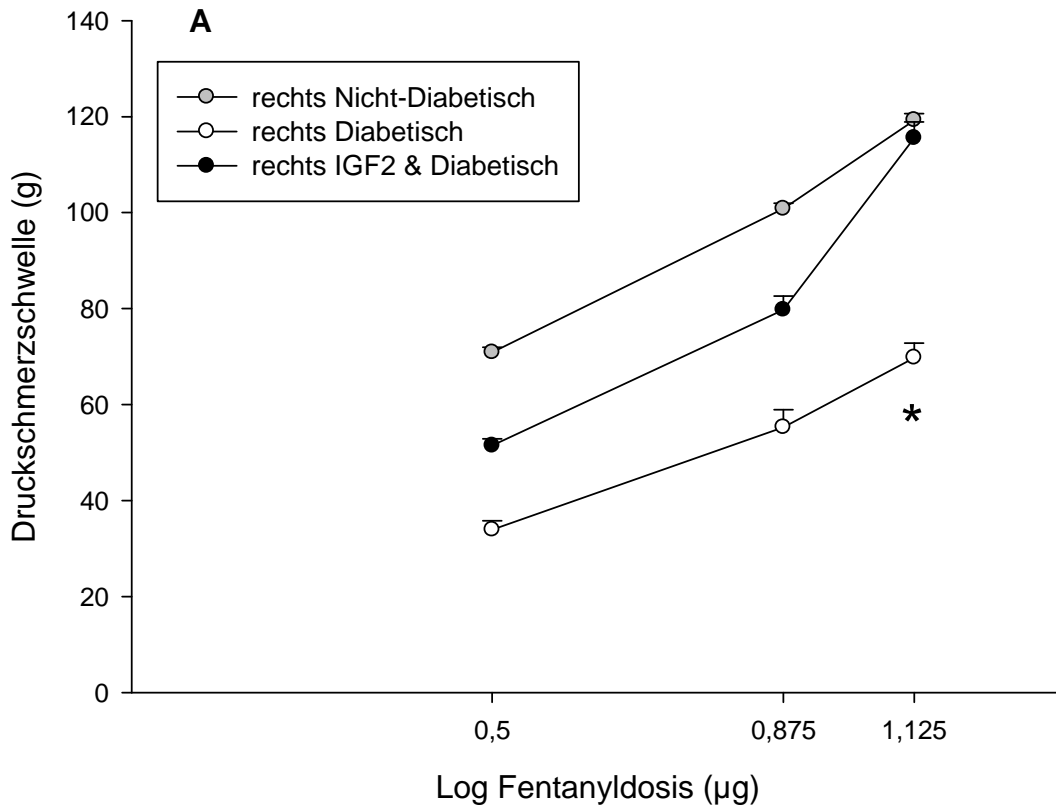


Abbildung 13: Vergleich der DSS nach Applikation von i.pl. 1,125 μg Fentanyl bei nicht-diabetischen Ratten, sowie diabetischen Ratten mit und ohne IGF2 Gabe. In der Grafik stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den DSS-Messungen der rechten hinteren Pfote zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Nach vier, acht und 12 Wochen unterscheiden sich die diabetischen Gruppen signifikant voneinander. (* $p < 0,05$ Two Way ANOVA, posthoc Test: Student-Newman-Keuls Method).

3.9. Veränderung der verminderten i.pl. Fentanylanalgesie durch Vorbehandlung mit IGF2

Wie in Abbildung 14 A bis C zu sehen ist, gibt es geringe Unterschiede zwischen den Fentanylkurven zu verschiedenen Zeitpunkten. Bei allen drei Abbildungen unterscheiden sich die DSS der diabetischen IGF2 Gruppe nur bei einer Dosis von 1,125 µg Fentanyl von denen der diabetischen Gruppe ohne IGF2. Die Abbildungen scheinen zwar einen Unterschied zwischen den diabetischen Gruppen bei fast allen Dosierungen aufzuweisen, dieser war jedoch nicht signifikant. Aufgrund der höheren Ausgangswerte nach Verabreichung von IGF2 liegen auch die DSS-Werte bei der Gabe von 0,5 µg Fentanyl über denen der diabetischen Gruppe ohne IGF2.

Nach Ablauf von vier und acht Wochen ist am deutlichsten bei der Gabe von 1,125 µg Fentanyl zu sehen, dass die periphere Opioidanalgesie durch IGF2 Vorbehandlung verbessert wird. Hier sind die DSS der diabetischen IGF2 Gruppe fast gleich den DSS der nicht-diabetischen Gruppe. Demzufolge hat IGF2 sowohl Einfluss auf die Verbesserung der mechanischen Hyperalgesie als auch auf die periphere Opioidanalgesie. Jedoch scheint die Wirkung auf die periphere Opioidanalgesie zum späteren Zeitpunkt des Diabetesmodells nachzulassen.



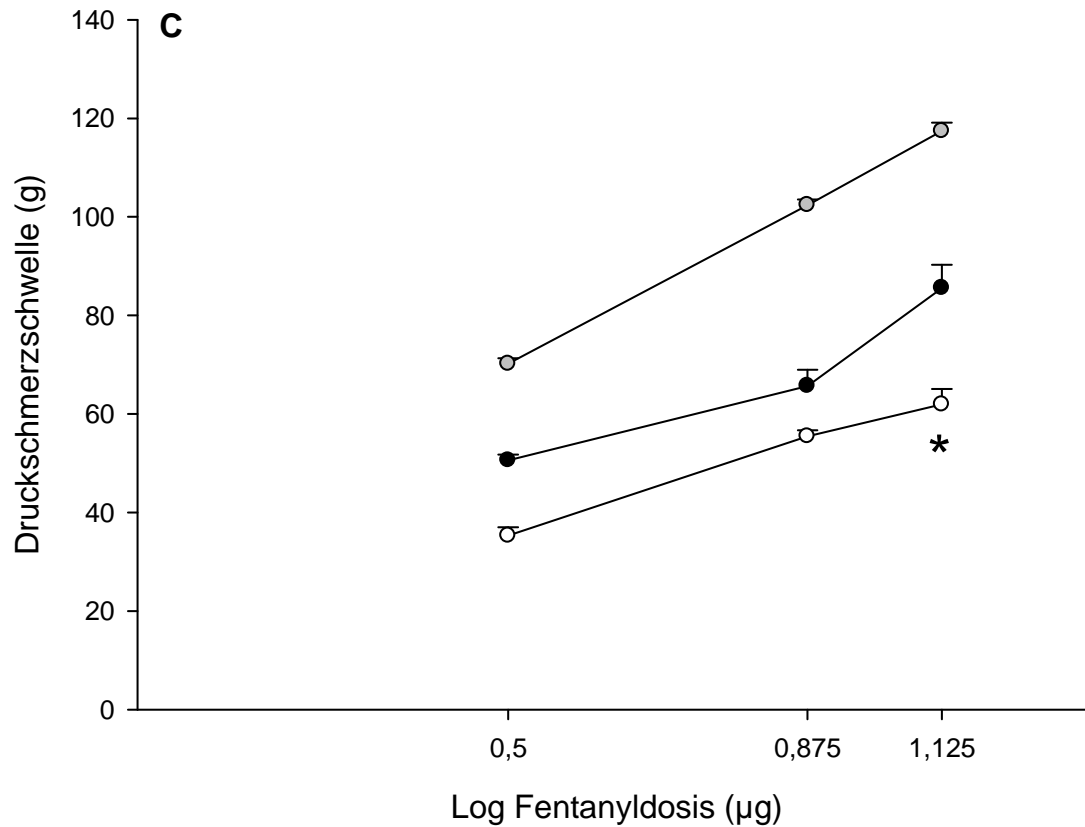


Abbildung 14: Vergleich der DSS von nicht-diabetischen Ratten, sowie diabetischen Ratten mit und ohne IGF2 Pumpe nach der Gabe von unterschiedlichen Fentanylkonzentrationen (0,5 µg, 0,875 µg und 1,125 µg). In der Grafik stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den DSS-Messungen der rechten hinteren Pfoten dar. Zu den Messzeitpunkten A) vier, B) acht und C) 12 Wochen gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen den diabetischen Gruppen nach Gabe von 1,125 µg Fentanyl. Nach vier A) und acht B) Wochen sind die DSS der nicht-diabetischen Gruppe und die der diabetischen Gruppe mit IGF2 fast identisch. * $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc test: Student-Newman-Keuls Method.

3.10. Beeinflussung der verminderten peripheren Opioidanalgesie durch die Gabe von Calphostin C.

Im Gegensatz zu den Wachstumsfaktoren traten bei der Behandlung mit dem PKC-Inhibitor Calphostin C keine einschließenden Schmerzen auf, so dass die Messungen innerhalb von 15 bis 30 Minuten nach Injektion vorgenommen werden konnten. Die Ausgangswerte wurden durch die Calphostin C Vorbehandlung nicht signifikant verändert (* $p < 0,05$ Kruskal-Wallis One Way ANOVA on Ranks, post hoc Test: Dunn's Method). Die periphere Opioidanalgesie wurde jedoch deutlich durch die Gabe von Calphostin C verbessert. Wie in Abbildung 15 zu sehen ist unterscheidet sich die diabetische Gruppe mit Calphostin C-Behandlung signifikant von der diabetischen Gruppe ohne Calphostin C-Gabe. Die Werte der DSS der diabetischen Calphostin C-Gruppe unterscheiden sich nur sehr gering von denen der nicht-diabetischen Gruppe (* $p < 0,05$ Two Way ANOVA, post hoc Test: Student-Newman-Keuls Method).

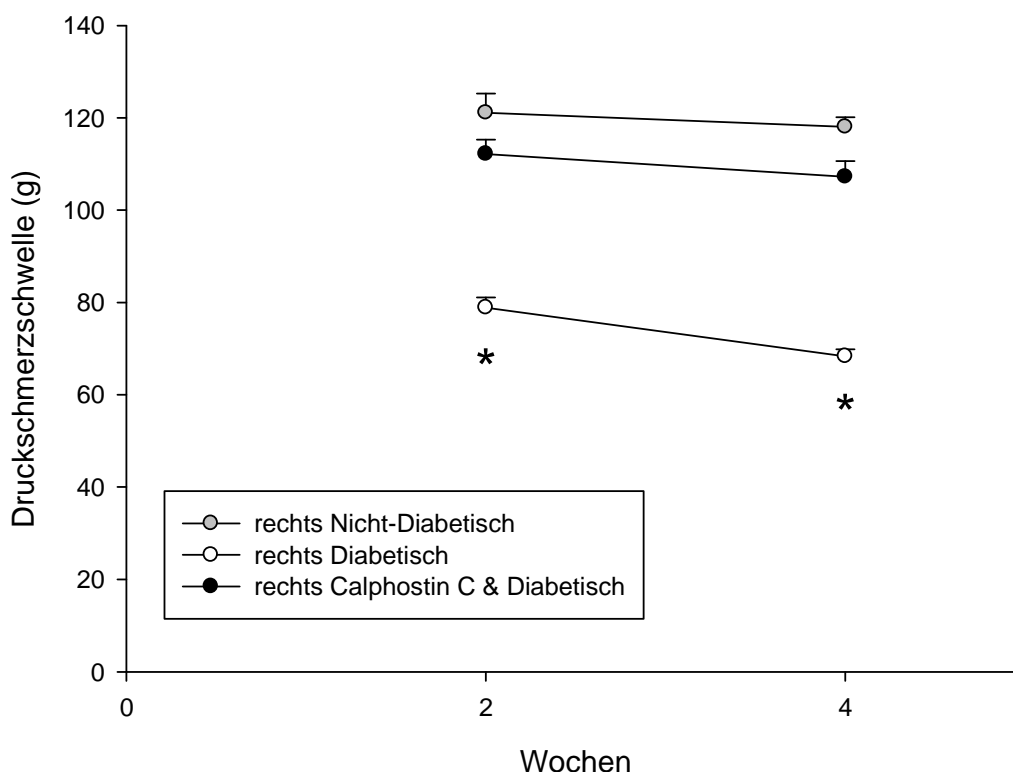


Abbildung 15: Vergleich der DSS nach i.pl. Applikation von 1,125 µg Fentanyl bei nicht-diabetischen Ratten, sowie diabetischen Ratten mit und ohne Calphostin C-Gabe. In der Grafik stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den Messungen der rechten hinteren Pfote zum jeweiligen Zeitpunkt dar. Die DSS der diabetischen Tiere mit Calphostin C liegen signifikant höher als die der diabetischen Tiere ohne Calphostin C Vorbehandlung. * $p < 0,05$ Two Way ANOVA, post hoc Test: Student-Newman-Keuls Method.

3.11. Einfluss von Calphostin C auf die verminderte periphere i.pl. Fentanyl-analgesie

Die Wirkung unterschiedlicher Dosierungen von Fentanyl auf die periphere Opioidanalgesie nach Calphostin C-Vorbehandlung ist in den Abbildungen 16 A und B dargestellt. Hier ist sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen bei der Gabe von 0,875 µg oder 1,125 µg Fentanyl ein signifikanter Unterschied zwischen den diabetischen Gruppen zu sehen. Bei einer Konzentration von 0,5 µg Fentanyl besteht immer ein signifikanter Unterschied zwischen der nicht-diabetischen und den diabetischen Gruppen. Die diabetischen Gruppen unterscheiden sich bei dieser Konzentration nicht voneinander (* $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc test: Student-Newman-Keuls Method). Calphostin C verbessert somit die verminderte periphere Opioidanalgesie in einer sehr frühen Phase des Diabetesmodells.

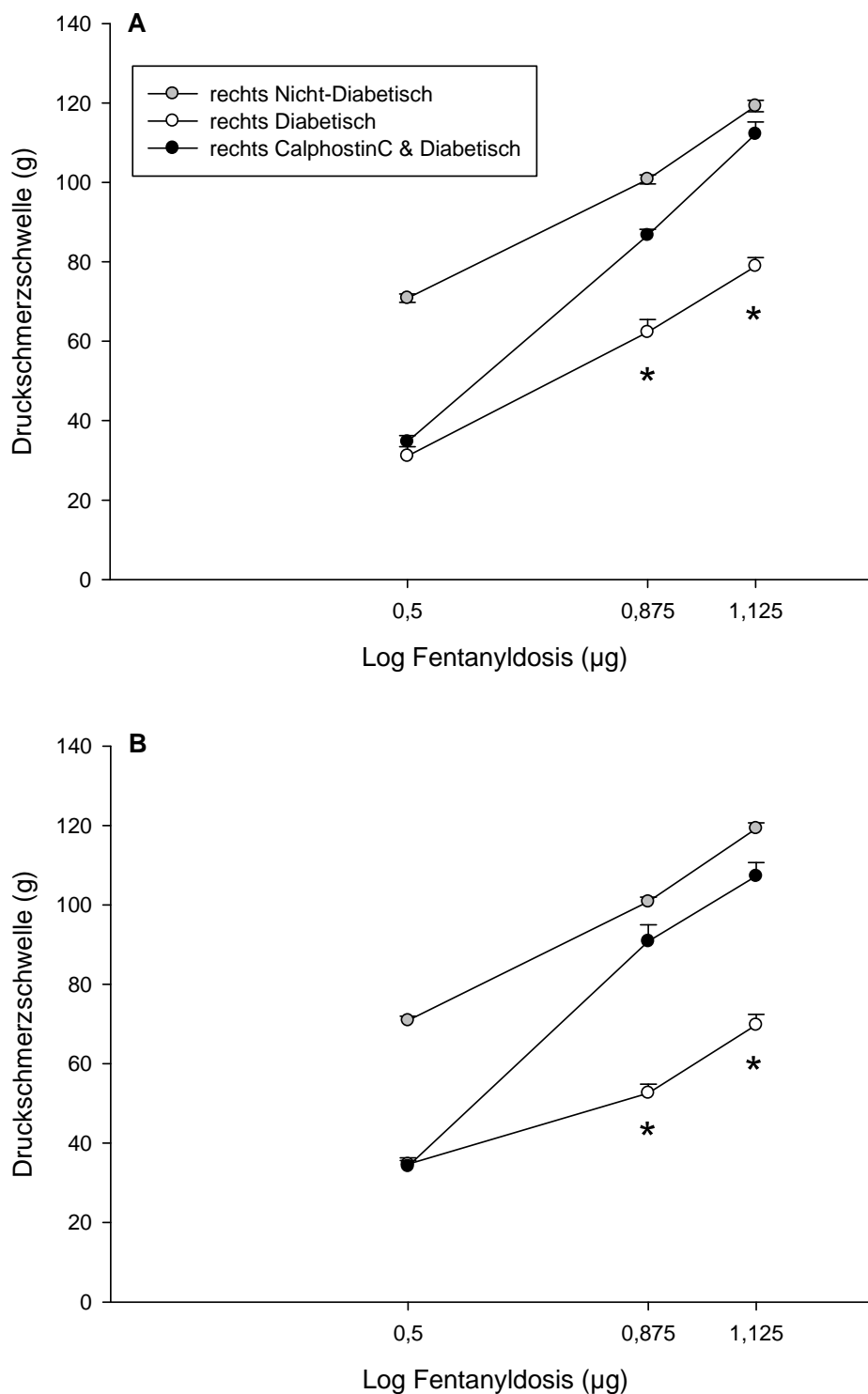


Abbildung 16: Vergleich der DSS bei nicht-diabetischen Ratten, diabetischen Ratten ohne und mit Calphostin C Vorbehandlung nach der Gabe von unterschiedlichen Fentanylkonzentrationen (0,5 µg, 0,875 µg und 1,125 µg). A) Nach zwei Wochen, B) Nach vier Wochen In den Grafiken stellt jeder Datenpunkt den errechneten Mittelwert \pm SEM aus den DSS-Messungen der rechten hinteren Pfote dar. A) und B) zum Zeitpunkt von zwei und vier Wochen unterscheiden sich bei der Gabe von 0,875 µg und 1,125 µg Fentanyl die beiden diabetischen Gruppen signifikant voneinander. * $p < 0,05$ Two Way ANOVA post hoc test: Student-Newman-Keuls Method.

4. Diskussion

Opioide sind bis in die heutige Zeit die wirksamsten Analgetika. Schmerzen infolge diabetischer Neuropathie lassen sich jedoch nur ungenügend durch die systemische Gabe von Opioiden beeinflussen, weswegen die Behandlung dieser Schmerzen eine besondere Herausforderung darstellt. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Studie zeigen erstmals, dass die Wirksamkeit lokal verabreichten Fentanyl durch eine Vorbehandlung mit Wachstumsfaktoren (NGF und IGFs) bzw. durch die frühe Gabe eines PKC-Inhibitors (Calphostin C) signifikant gesteigert werden kann. Im Einzelnen zeigen die Ergebnisse meiner experimentellen Arbeiten folgendes:

Die Induktion eines Diabetes mellitus durch i.v. STZ-Injektion konnte bereits nach drei Tagen durch einen Anstieg des Blutzuckerspiegels auf diabetische Werte (>300mg/dl) nachgewiesen werden. Typische Zeichen des Diabetes wie Polydipsie, Polyurie und Gewichtsverlust traten ab dem dritten Tag auf und waren ab dem siebten Tag signifikant. Sie verstärkten sich noch im weiteren Verlauf des Diabetes.

Die intraplantare Injektion geringer, systemisch unwirksamer Dosierungen von Fentanyl bewirkte eine signifikant dosisabhängige Schmerzlinderung in Kontrolltieren. Diese war bei diabetischen Tieren signifikant vermindert, d.h. die Ansprechbarkeit auf lokal verabreichte Opioide war deutlich reduziert. Für die gleiche analgetische Wirksamkeit waren höhere Fentanyldosen notwendig. Dies wird durch die Rechtsverschiebung der Dosis-Antwort-Kurve der Fentanylanalgesie bei diabetischen Tieren verdeutlicht.

Eine Reduktion der durch den Diabetes hervorgerufenen, verminderten Ansprechbarkeit auf Opioide konnte durch vorherige NGF Behandlung verhindert werden. Auch IGF1 und 2 verhinderten die Abnahme der Ansprechbarkeit auf Opioide im Sinne einer ausbleibenden Rechtsverschiebung in der Dosis-Antwort-Kurve diabetischer Tiere.

Die frühzeitige Inhibition einer erhöhten PKC-Aktivität durch Gabe von Calphostin C bei diabetischen Tieren verbesserte signifikant die Ansprechbarkeit peripher applizierter Opioide.

Die hier ausgeführten Untersuchungen zeigen unterschiedliche Möglichkeiten auf, um eine verminderte Ansprechbarkeit auf Opioide beim Diabetes mellitus zu verbessern.

4.1. Etablierung eines experimentellen Diabetes mellitus

Männliche WISTAR Ratten erhielten eine intravenöse Injektion von 45 mg/kg KG Streptozotocin in die Schwanzvene. Innerhalb von drei Tagen nach dieser Behandlung entwickelten alle STZ-injizierten Ratten eine signifikante Hyperglykämie, welche sich innerhalb dieses Zeitraums sehr schnell entwickelte und danach während des gesamten Beobachtungszeitraums konstant zwischen 350 - 800 mg/dl lag. Die Injektion von STZ in die Schwanzvene ist eine etablierte Methode, um mit wenigen Nebenwirkungen effektiv einen Diabetes mellitus zu induzieren [Yagihashi et al. 1990; Schmidt et al. 1999; Aley and Levine 2001]. Nebenwirkungen, die durch die intraperitoneale Injektion entstehen können (wie Peritonitis, Organläsionen oder Darmadhäsion) werden hierdurch vermieden. Die i.v. Injektion führte in 100% der Fälle zu einer Hyperglykämie.

Das STZ-Diabetes-Modell ist ein schon seit langer Zeit verwendetes und gut evaluiertes Modell, um die Pathophysiologie von diabetischen Komplikationen, wie der schmerzhaften peripheren Neuropathie, und deren Behandlung an Nagetieren zu testen [Wuarin-Bierman et al. 1987; Fox et al. 1999; Aley and Levine 2001, 2002; Calcutt 2004]. Zusätzlich zur oben genannten Hyperglykämie zeigten – in Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur - alle Ratten nach drei Tagen eine beginnende Polyurie, eine Polydypsie und einen Gewichtsverlust.

Das STZ-Modell wurde schon vielfach benutzt, um die Wirksamkeit von Medikamenten beim Diabetes zu untersuchen. Es konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass der schmerzstillende Effekt systemisch gegebener Opioide beim STZ-Modell vermindert ist, wohingegen andere Medikamente in ihrer Wirksamkeit nicht beeinflusst wurden (Clonidin, Lidocain) [Courteix et al. 1994; Malcangio and Tomlinson 1998].

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse unserer Untersuchungen, dass die Einführung des Tiermodells mit STZ-induziertem Diabetes mellitus der Ratte durch den Nachweis erhöhter Blutzuckerwerte, das Erkennen typischer Zeichen des Diabetes wie Polyurie, Polydypsie und Gewichtsverlust, sowie einer vermehrten Schmerzhaftigkeit gegenüber mechanischen Reizen validiert werden konnte.

4.2. Verlust der Ansprechbarkeit auf Opioide

Fentanyl ist ein hochpotentes, lipophiles Opioid, welches auch bei peripherer Gabe eine gute Wirksamkeit zeigt. In Verhaltensversuchen bewirkte Fentanyl eine dosisabhängige Anhebung der DSS in der injizierten Pfote. Da die DSS der kontralateralen Pfote nicht anstieg, konnte davon ausgegangen werden, dass die analgetische Wirkung nicht systemisch, sondern peripher bedingt war. Unter entzündlichen Bedingungen zeigte Fentanyl sogar eine gesteigerte Wirkung. Dies wurde auf eine Hochregulation von OR der peripher sensorischen Nerven zurückgeführt [Antonijevic et al. 1995]. In Übereinstimmung damit zeigten auch die eigenen Ergebnisse in gesunden Kontrolltieren eine dosisabhängige Zunahme der analgetischen Wirksamkeit von Fentanyl. Im Gegensatz dazu konnte bei den diabetischen Ratten innerhalb von zwei Wochen nach STZ-Gabe eine signifikant verminderte analgetische Wirksamkeit des peripher applizierten Fentanyls festgestellt werden. Im weiteren Verlauf des Diabetes nahm die analgetische Wirkung von Fentanyl weiter ab, die Dosis-Antwort-Kurve verschob sich signifikant nach rechts.

Bisher wurde diese verminderte Ansprechbarkeit auf Opioide v.a. für die systemische (i.v. und i.p.), spinale (i.th.) und supraspinale (i.c.v.) Anwendung von Opioiden beschrieben. Dabei konnte die Arbeitsgruppe um Courteix erstmals zeigen, dass diabetische Ratten im Vergleich zu nicht-diabetischen Ratten für den gleichen schmerzlindernden Effekt die doppelte Dosis des i.v. gegebenen Morphins benötigen [Courteix et al. 1994; Courteix et al. 1998]. Bei i.p. Gabe von Morphin benötigten Ratten mit STZ-induziertem Diabetes ebenfalls doppelt so hohe Dosen, um die gleiche Schmerzlinderung wie bei nicht-diabetischen Ratten zu erzielen [Malcangio and Tomlinson 1998]. Die gesamte Dosis-Antwort-Kurve für die i.p. Gabe von Morphin war bei diabetischen Ratten nach rechts verschoben [Zurek et al. 2001]. In der gleichen Studie wurde auch nach i.th.-Gabe von Morphin eine verminderte Analgesie nachgewiesen. Dies wurde von Chen und Pan nochmals bestätigt [Zurek et al. 2001; Chen and Pan 2003]. Interessanterweise wurde auch untersucht, ob der Diabetes auf die Wirksamkeit von Opioiden in bestimmten Hirnarealen Einfluss hat. Supraspinal wurden Morphin und der selektive μ -Rezeptorligand DAMGO an Mäusen getestet. Dabei konnten sowohl eine verminderte analgetische Wirksamkeit als auch eine mehrfache Rechtsverschiebung der Dosis-Antwort-Kurve von i.c.v. gegebenem Morphin bzw. DAMGO nachgewiesen werden [Kamei et al. 1992; Kamei et al. 1994; Ohsawa et al. 2000].

Ein Verlust der analgetischen Wirkung nach lokaler Gabe von Opioiden wurde bisher in nur wenigen Studien, meist nach s.c. oder i.d. Injektion von Morphin getestet [Simon et al. 1981; Simon and Dewey 1981; Aley and Levine 2002]. Torres-López et al. injizierten Morphin s.c. in die Pfote. Die Schmerzreaktion wurde dann mit Hilfe einer chemischen Reizung, nämlich des Formalin Testes, erhoben. Beim Formalin Test unterscheidet man zwei Phasen. Die Schmerzantwort in der ersten, frühen Phase (erste fünf Minuten) geht auf eine periphere Nervenstimulation zurück. Die Schmerzen in der zweiten, späteren Phase (11. – 50. Minute) werden überwiegend durch zentrale Mechanismen im Rückenmark erklärt [Randolph and Peters 1997]. Interessanterweise konnten Torres-Lopez et al. lediglich eine Veränderung der lokalen Morphinanalgesie in der zweiten Phase feststellen, was jedoch keine Rückschlüsse auf die periphere Wirkung von Morphin zulässt [Torres-Lopez et al. 2007]. In der Studie von Simon et al. wurde Morphin s.c. verabreicht. Die Schmerzmessungen wurden anhand des Tail-Flick-Testes durchgeführt. Hierbei handelt es sich um einen Schmerzschwellentest, bei dem zentrale Schmerzantworten getestet werden. Der Schwanz der Ratte wird einem Reiz wie z.B. Hitze ausgesetzt. Wird der Reiz als schmerzhaft empfunden, zieht die Ratte ihren Schwanz weg. Die Zeit zwischen Beginn des Schmerzreizes und der Reaktion kann gemessen werden und wird als Tail-Flick-Latenz bezeichnet. Bei den diabetischen Ratten zeigte das s.c. gegebene Morphin eine verminderte Wirksamkeit [Simon et al. 1981; Simon and Dewey 1981].

Da die diabetische Neuropathie vornehmlich eine Erkrankung der peripher sensorischen Neurone ist, war es Ziel der eigenen Untersuchungen, mögliche Veränderungen der ausschließlich peripheren Opioidanalgesie zu untersuchen.

Unsere Injektion von Fentanyl erfolgte s.c. bzw i.pl. direkt in die Pfote in einer systemisch nicht wirksamen Dosis. So wurde sichergestellt, dass die antinozizeptiven Effekte von Fentanyl auf eine rein periphere Wirkung zurückzuführen sind. Um einen systemischen Effekt auszuschließen, wurde immer die DSS der kontralateralen Pfote mitbestimmt. Im Gegensatz zu gesunden Tieren zeigten Tiere mit STZ-induziertem Diabetes mellitus eine signifikant reduzierte analgetische Wirksamkeit i.pl. applizierten Fentanyls. Es kam auch hierbei zu einer Rechtsverschiebung der analgetischen Dosis-Antwort-Kurve, so dass nur signifikant höhere Dosierungen des Fentanyls den gleichen Effekt bewirkten.

Eine signifikant reduzierte Ansprechbarkeit auf Opiode infolge eines Diabetes beruht zumindest teilweise auf einer Down-Regulation der MOR in den Zellkörpern

sensorischer Neurone (in den Spinalganglien) und deren peripherer Nervenendigungen im subkutanen Gewebe [unveröffentlichte Daten eigener Arbeitsgruppe][Lee et al. 1995; Courteix et al. 1998; Chen et al. 2002]. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe haben immunhistochemisch nachgewiesen, dass die Anzahl von MOR sowohl im Spinalganglion als auch im peripheren Nervengewebe sinkt. In einem neuropathischen Modell mit Nervenligatur wurde Ähnliches gezeigt. Der Anteil an MOR in der RPA (RNA Protection Assay) und in der Immunhistochemie war im Gegensatz zu den Kontrolltieren in kleinen und mittleren Neuronen der Spinalganglien von Ratten mit Nervenligatur deutlich verringert. Auch die MOR-immunreaktionsfähigen Areale der Spinalganglien waren stark vermindert [Kohno et al. 2005].

Aufgrund von veröffentlichten Studien, die eine Abhängigkeit der neuronalen OR Expression von der Versorgung sensorischer Nerven mit NGF gezeigt haben, untersuchten wir die Hypothese, ob unter diabetischen Bedingungen eine Behandlung mit NGF die verlorene schmerzlindernde Wirksamkeit der Opiode wieder herstellt.

4.3. Wirkung von NGF auf die verminderte Ansprechbarkeit auf Opiode beim Diabetes

NGF spielt eine wichtige Rolle für die Entwicklung und den Erhalt des peripheren Nervensystems. Vor allem die Integrität peripherer sensorischer und sympathischer Nervenfasern ist NGF-abhängig. Bisher wurde in mehreren Studien festgestellt, dass beim Diabetes NGF in vielen Zielgeweben wie Haut, Bindegewebe und Muskeln stark vermindert ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der axonale Transport von NGF vom peripheren Gewebe zum Spinalganglion abnimmt [Hellweg and Hartung 1990; Hellweg et al. 1991; Fernyhough et al. 1994; Hellweg et al. 1994; Fernyhough et al. 1995a; Fernyhough et al. 1995b; Tomlinson et al. 1997]. Somit liegt die Vermutung nahe, dass unter diabetischen Bedingungen die Produktion und der axonale Transport von endogenem NGF gestört sind und dadurch eine Ursache für die funktionellen Defizite bei der diabetischen Polyneuropathie darstellen.

Bisher wurde der Einfluss von NGF auf die Rekrutierung von Opioidrezeptoren bei diabetischen Ratten nur unter Entzündung oder bei verletzten Nerven erforscht. Bei Cahill et al. hatte Morphin (20µg i.th.) nach Nervenligatur keinen Einfluss auf die neuropathischen Schmerzen. Durch die kontinuierliche intrathekale Gabe von NGF

konnte jedoch die analgetische Wirkung von Morphin wieder verbessert werden [Cahill et al. 2003]. In einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass erhöhte NGF-Konzentrationen infolge einer lokalisierten Entzündung die Ansprechbarkeit auf lokale Opiode erhöht [Yamdeu et al. 2011]. Dies geschah durch eine Steigerung der Anzahl und Effektivität von MOR auf primär afferenten Neuronen. Die Hochregulation der MOR fand vor allem in trkA positiven Neuronen statt. Der periphere Transport der MOR entlang des N. Ischiadikus nach NGF-Gabe war erhöht. Die Anzahl der MOR-positiven sensorischen Nervenenden in NGF-behandelter Haut stieg deutlich an und der schmerzlindernde Effekt von Fentanyl nach NGF-Gabe war verstärkt [Mousa et al. 2007a]. Transgene Mäuse, die NGF überexprimieren, haben eine MOR-Expression, die um das 3,2fache erhöht ist [Molliver et al. 2005].

Unsere Ergebnisse zeigen bei diabetischen Ratten, dass die Gabe von NGF die Ansprechbarkeit auf Opiode wieder herstellt. Durch Vorbehandlung der diabetischen Ratten mit NGF nahm die analgetische Wirkung von Fentanyl wieder deutlich zu. Auch die nach rechts verschobene Dosis-Antwort-Kurve nach Fentanylgabe konnte durch die Vorbehandlung mit NGF wieder nach links verschoben werden. In gleichzeitig zu unserer Verhaltensstudie durchgeführten immunhistochemischen Experimenten konnte gezeigt werden, dass unter NGF-Behandlung die Anzahl der MOR in der Peripherie, im N. Ischiadikus, im DRG und im Spinalganglion zunimmt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass eine Vorbehandlung mit NGF die analgetische Wirkung von Fentanyl wieder herstellen kann.

4.4. Wirkung von IGFs bei der STZ-induzierten diabetischen Neuropathie

IGFs haben ein breit gefächertes Wirkungsspektrum auf Systeme, die beim Diabetes angegriffen und in ihrer Funktion gestört werden. Da IGF ebenso wie NGF ein Wachstumsfaktor ist, der beim Diabetes nur vermindert vorhanden ist, lag die Vermutung nahe, dass auch die Gabe von IGF, ähnlich wie NGF, einen positiven Einfluss auf die verminderte Ansprechbarkeit auf Opiode hat. Erst kürzlich konnte mittels PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) und Western-Blot nachgewiesen werden, dass die Gabe von IGF1 einen Einfluss auf MOR in neuronalen Zellen hat. In Zellen bei denen REST (repressor element 1 slicing transkription factor) reduziert vorhanden ist, kann durch die Gabe von IGF1 die Expression der humanen MOR hochreguliert werden

[Bedini et al. 2008].

Untersuchungen über die Wirkung von IGFs auf die verminderte periphere Opioidanalgesie bei diabetischen Ratten wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die Ergebnisse der hier aufgeführten Experimente wiesen nach, dass sowohl die vorherige Gabe von IGF1 als auch IGF2 zu einer signifikanten Zunahme der analgetischen Wirkung von Fentanyl führte. Vergleicht man den Effekt von unterschiedlichen Fentanylkonzentrationen auf die DSS nach der Vorbehandlung mit IGFs, so zeigte sich, dass die bei diabetischen Ratten nach rechts verschobene Dosis-Antwort-Kurve nach Fentanylgabe durch die Vorbehandlung mit IGF wieder nach links und somit in Richtung der nicht-diabetischen Werte verschoben wurde. Die gleichzeitig zu den Verhaltensversuchen durchgeführten immunhistochemischen Versuche unserer Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass unter IGF1 Gabe die Anzahl der MOR sowohl im Spinalganglion als auch im Rückenmark und in den peripheren Nerven deutlich ansteigt. Die verbesserte Wirkung von Fentanyl nach IGF1 und 2 Gabe scheint demnach ihren Ursprung v.a. in der Zunahme der MOR zu haben. IGF steigert also ähnlich wie NGF die Rekrutierung von MOR und wirkt so dem Verlust der Ansprechbarkeit auf periphere Opioide entgegen. Somit eröffnet sich durch die Vorbehandlung mit IGFs eine weitere therapeutische Möglichkeit, um die Schmerzen beim Diabetes wieder mit Opioiden behandeln zu können.

Zusätzlich konnte die vermehrte Sensibilisierung der diabetischen Ratten gegenüber Schmerzreizen durch IGF1 vier Wochen nach STZ-Injektion gemindert werden. IGF2 bewirkte zu allen drei Messzeitpunkten eine Minderung der vermehrten Schmerzempfindlichkeit. Ein möglicher Mechanismus, der dem zu Grunde liegt, ist z.B. die Fähigkeit von IGF, die Regeneration von Nervenfasern zu verbessern [Glazner et al. 1993; Ishii and Lupien 1995] und somit auch die Entwicklung der Schmerzempfindlichkeit teilweise zu verhindern bzw. die Empfindlichkeit wieder zu verringern.

In einigen Studien konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass IGFs einen Einfluss auf die Entwicklung der Schmerzempfindlichkeit haben, sie jedoch nicht vollständig mindern können. So zeigten Zhuang et al., dass eine Weiterentwicklung der erhöhten Schmerzempfindlichkeit bei diabetischen Ratten zum Stillstand gebracht, aber nicht verbessert werden konnte. Gemessen wurde die DSS vor und nach der Implantation von IGF-Minipumpen. Bis zum siebten Tag nach STZ-Injektion nahm die Schmerzempfindlichkeit der diabetischen Ratten konstant zu. Am siebten Tag wurden

Minipumpen mit IGF1 oder 2 in die Unterhaut des Rückens implantiert. Vom Zeitpunkt der Implantation an wurde kein weiteres Absinken der DSS mehr festgestellt [Zhuang et al. 1996]. In Versuchen mit einmalig verabreichtem IGF und einer Messung des Schmerzempfindens kurz danach konnte bei diabetischen Ratten keine Veränderung der Schmerzschwelle festgestellt werden [Bitar et al. 1996; Bitar and Pilcher 1998]. Die gemessenen Ausgangswerte der Ratten mit IGF-Vorbehandlung lagen aber weiterhin deutlich unter denen der normalen Ratten, so dass auch nach der alleinigen Vorbehandlung die erhöhte Schmerzempfindlichkeit nicht ausreichend therapiert war.

4.5. Wirkung von Calphostin C auf die verminderte periphere Opioidanalgesie in der frühen Phase des Diabetes

Da ein Nachlassen der Opioidwirkung nicht nur durch eine Abnahme der Rezeptoranzahl, sondern auch durch eine Phosphorylierung, eine behinderte G-Proteinkopplung und einer nachfolgenden Desensibilisierung entstehen kann, haben wir die Möglichkeit untersucht, ob OREN durch vermehrte PKC-abhängige Phosphorylierung ihre Ansprechbarkeit auf peripher appliziertes Fentanyl verlieren. Durch Blockade der PKC-getriggerten Phosphorylierung mit dem PKC-Hemmstoff Calphostin C konnten wir durch Messung der DSS bestimmen, inwieweit sich die analgetische Wirksamkeit der Opioide ändert.

In unseren Experimenten konnten wir zeigen, dass Calphostin C die verminderte Ansprechbarkeit auf Opioide wieder verbessert. Die Versuche dazu wurden in der frühen Phase des Diabetes durchgeführt, nämlich in der zweiten und vierten Woche nach STZ-Injektion.

In Verhaltensversuchen konnte bisher gezeigt werden, dass Calphostin C lediglich einen positiven Einfluss auf die Tail-Flick-Latenz (unter 4.2. näher beschrieben) und damit auf die zentralen Mechanismen der Schmerzreaktion hat. [Honda et al. 2007]. Auswirkungen auf peripheres Schmerzverhalten, wie die Messung der DSS, wurden bisher nicht untersucht. Unsere Untersuchungen zeigten keinen direkten, unmittelbar nach Applikation eintretenden Einfluss von Calphostin C auf die erhöhte Schmerzempfindlichkeit.

Die Aktivität einiger PKC-Isoenzyme ist bei diabetischen Tieren höher als bei nicht-diabetischen Tieren. Weiterhin ist bekannt, dass die Aktivierung der PKC zu einer

Phosphorylierung der MOR führt. Auf Grund dieser Phosphorylierung wird der MOR desensibilisiert. Dies bedeutet, dass der OR und das G-Protein entkoppelt werden. Die Signaltransduktion in die Zelle wird verhindert und am OR angelagerte Opiode können keine Schmerzlinderung mehr hervorrufen. Dies führt zu einem Verlust der MOR-vermittelten Schmerzlinderung durch MOR-Agonisten [Shearman et al. 1989; Narita et al. 1995; Narita et al. 1997; Ohsawa and Kamei 1997; Narita et al. 2000; Belcheva et al. 2005; Johnson et al.]. McLaughlin und Chavkin unterstützen diese Theorie indem sie zeigten, dass die Wirkung von DAMGO durch eine Dephosphorylierung von MOR verbessert wird. In dieser Studie wurden MOR-besetzte Oozyten verwendet. Um eine Phosphorylierung des MOR zu verhindern wurde Insulin verwendet. Die analgetische Wirksamkeit von DAMGO wurde durch die Dephosphorylierung verbessert [McLaughlin and Chavkin 2001].

Die verminderte Ansprechbarkeit auf peripher applizierte Opiode, besonders zu Beginn des Diabetes, kann möglicherweise durch eine Inaktivierung der MOR bedingt sein. Diese Inaktivierung ist auf eine verstärkte Phosphorylierung durch die erhöhte Aktivität der PKC zurückzuführen. Dies lassen auch die Ergebnisse der Immunhistochemie unserer Arbeitsgruppe vermuten, in denen nachgewiesen werden konnte, dass zwei und vier Wochen nach STZ-Injektion die Anzahl der phosphorylierten MOR (pMOR) in sensiblen Spinalganglien und die Expression/Aktivität der PKC α im DRG signifikant gesteigert sind. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die Anzahl der MOR-positiven Neurone nicht abgesunken ist. Zusammengenommen bedeutet dies, dass die Ursache der verminderten Opioidanalgesie zu Beginn des Diabetes in einer erhöhten Phosphorylierungsrate der MOR aufgrund von erhöhter PKC-Aktivität liegt.

Die Gabe von Calphostin C verhinderte in unseren Experimenten eindeutig den Verlust der peripheren Opioidanalgesie. Verhaltensversuche in dieser Form wurden bisher noch nicht durchgeführt bzw. in der Literatur noch nicht beschrieben, weswegen ein direkter Vergleich mit anderen Arbeiten nicht möglich ist. Es wurde lediglich von Narita et al. nachgewiesen, dass die Gabe von Calphostin C dosisabhängig den schmerzlindernden Effekt eines DOR-Agonisten steigert. Hierbei wurde diabetischen Ratten Calphostin C (20 bis 500 ng) bzw. ein Vehikel verabreicht und die Dosis-Antwort-Kurve nach i.th. DOR-Agonist Gabe miteinander verglichen [Narita et al. 2000]. Diabetische Mäuse, die eine abgeschwächte Straub'sche Schwanzreaktion auf i.c.v. gegebenes Morphin zeigen, wiesen durch Calphostin C-Gabe wieder eine normale Reaktion auf. Bei der Straub'schen Schwanzreaktion heben Kontrollmäuse bei

Morphingabe ihren Schwanz. Diabetische Mäuse zeigen diese Reaktion auf Morphin nicht mehr [Ohsawa and Kamei 1998]. Auf spinaler und supraspinaler Ebene hat die Hemmung der PKC durch Calphostin C zu einem Wiederanstieg der zentralen Opioidanalgesie geführt. Dies lässt vermuten, dass auch bei peripherer Gabe von Opioiden die Analgesie durch Hemmung der PKC wiederhergestellt werden kann. Die hier vorgestellten Ergebnisse konnten erstmals zeigen, dass peripher appliziertes Fentanyl bei diabetischen Ratten unter Vorbehandlung mit Calphostin C wieder eine gute analgetische Wirkung auslöst. Somit stellt auch Calphostin C – zumindest in der Frühphase des Diabetes mellitus - eine Option dar, um diabetische Schmerzen wieder erfolgreich mit Opioiden behandeln zu können.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass zwei Wochen nach i.v. STZ-Injektion sich eine deutlich verminderte Ansprechbarkeit auf peripher appliziertes Fentanyl zeigt. Die Dosis-Antwort-Kurve ist nach rechts verschoben. Bei einer Gesamtbewertung aller Ergebnisse und der dazugehörige Literatur scheint es mehrere Gründe für diese Rechtsverschiebung zu geben und damit verbunden auch mehrere therapeutische Ansätze, um dem entgegen zu wirken.

Zum einen spielen in der späteren Phase des Diabetes die Verminderung von NGF, IGF1 und 2 eine große Rolle. Der Abfall dieser Wachstumsfaktoren bedingt u.a. eine Down-Regulation der peripheren MOR, was eine mögliche Ursache für das verminderte Ansprechen auf peripher applizierte Opioide darstellt. Durch die Vorbehandlung mit NGF und auch IGF1 und 2 konnte die Ansprechbarkeit auf Fentanyl wieder hergestellt werden.

Zum anderen scheint die Ursache in der frühen Phase des Diabetes überwiegend in einer erhöhten Phosphorylierungsrate der MOR zu liegen. Diese Phosphorylierung, die zu einer Desensibilisierung des MOR führt, hat ihren Ursprung vermutlich in der erhöhten Aktivität der PKC. Durch die Hemmung der PKC mit Calphostin C konnte die Ansprechbarkeit auf Fentanyl wieder signifikant gesteigert werden. Dies ist ein weiterer Beweis für die Beteiligung der erhöhten PKC-Aktivität an der reduzierten Wirkung von peripher applizierten Opioiden unter diabetischen Stoffwechselbedingungen im Gegensatz zur normalen Stoffwechsellage.

Bei Menschen mit Diabetes mellitus scheinen Opioide ebenfalls eine verminderte analgetische Potenz zu haben [Benedetti et al. 1998]. Dies äußert sich zumeist darin, dass diabetische Patienten weitaus höhere Dosen der Opiate benötigen, um den

leichen schmerzlindernden Effekt wie nicht-diabetische Patienten zu erreichen. Diabetische Patienten reagieren zwar auf Opioide, jedoch erst bei wesentlich höheren Dosen. Müssen die Dosierungen der Opioide angehoben werden, steigt auch die Häufigkeit der Nebenwirkungen an [Harati et al. 1998; Gimbel et al. 2003; Watson et al. 2003].

5. Zusammenfassung

Die analgetische Wirkung von Opioiden wird nicht nur durch die Aktivierung von μ -Opioidrezeptoren (MOR) im zentralen, sondern auch im peripheren Nervensystem hervorgerufen. Bei diabetischer Stoffwechsellaage zeigen sowohl zentrale, als auch periphere Opioide eine verminderte Wirksamkeit. Dies wurde in zahlreichen klinischen und tierexperimentellen Studien nachgewiesen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welche Vorbehandlungen bei diabetischen Ratten die verminderte Ansprechbarkeit auf periphere Opioide wieder verbessern. Im speziellen wurde dabei der Effekt der Vorbehandlung mit NGF, IGF1 bzw. 2 oder Calphostin C getestet.

Die Versuche wurden an Wistar Ratten, die durch die Gabe von STZ in eine diabetische Stoffwechsellaage gebracht wurden, durchgeführt. Über die Ermittlung der Druckschmerzschwelle (DSS) mittels eines Pfotendruckmessgerätes (Paw Pressure Test) wurden die Effekte des peripher applizierten Opioids Fentanyl auf das Schmerzverhalten der Ratten ermittelt. Dabei wurden unterschiedliche Dosen von Fentanyl untersucht. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die Vorbehandlung mit Calphostin C in der frühen Phase des Diabetes eine Verbesserung der Druckschmerzschwelle und damit eine verbesserte Opioidanalgesie bei diabetischen Ratten bewirkt. Dies scheint ihren Ursprung möglicherweise in der Hemmung der PKC und der damit in Verbindung stehenden geminderten Phosphorylierung bzw. Desensibilisierung von μ -Opioidrezeptoren zu haben. Die Vorbehandlung von diabetischen Ratten mit NGF führte in den Verhaltensexperimenten ebenfalls zu einer verbesserten Ansprechbarkeit auf periphere Opioide, dies eher in der späten Phase des Diabetes. IGF1 bzw. 2 verbesserten die Ansprechbarkeit auf periphere Opioide in gleicher Weise wie NGF auch. Bei den drei Wachstumsfaktoren scheint der Grund für die verbesserte Wirksamkeit der peripheren Opioide in einer verminderten Down-Regulation der μ -Opioidrezeptoren zu liegen.

In Bezug auf die Behandlung der diabetischen Neuropathie bedeutet dies, dass durch eine Vorbehandlung mit den genannten Neuromodulatoren die Ansprechbarkeit auf Opioide verbessert und ihre ausgezeichnete schmerzstillende Wirkung auch beim menschlichen Diabetiker wieder entfalten können. Angesichts des immer häufiger werdenden Gebrauchs peripher selektiver Opioide, die nicht ins zentrale Nervensystem gelangen, können die vorliegenden Ergebnisse zum gezielten Einsatz dieser

Medikamente und dem Verständnis der molekularen Mechanismen der verminderten Wirksamkeit von peripheren Opioiden in diabetischem Gewebe beitragen.

6. Literaturverzeichnis

- Ahlgren SC and Levine JD (1993). "Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats." Neuroscience **52**(4): 1049-55.
- Ahlgren SC and Levine JD (1994). "Protein Kinase C Inhibitors Decrease Hyperalgesia and C-Fiber Hyperexcitability in the Streptozotocin-Diabetic Rat." Journal of Neurophysiology **72**(2): 684-92.
- Aley KO and Levine JD (2001). "Rapid Onset Pain Induced by Intravenous Streptozotocin in the Rat." The Journal of Pain **2**(3): 146-50.
- Aley KO and Levine JD (2002). "Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat." Neuroscience **111**(2): 389-97.
- Antonijevic I, Mousa SA, Schäfer M, et al. (1995). "Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation." The Journal of Neuroscience **15**(1): 165-72.
- Apfel SC, Arezzo JC, Brownlee M, et al. (1994). "Nerve growth factor administration protects against experimental diabetic sensory neuropathy." Brain Res **634**(1): 7-12.
- Arner S and Meyerson BA (1988). "Lack of analgesic effect of opioids on neuropathic and idiopathic forms of pain." Pain **33**(1): 11-23.
- Barde YA (1989). "Trophic factors and neuronal survival." Neuron **2**(6): 1525-34.
- Bedini A, Baiula M and Spampinato S (2008). "Transcriptional activation of human mu-opioid receptor gene by insulin-like growth factor-I in neuronal cells is modulated by the transcription factor REST." J Neurochem **105**(6): 2166-78.
- Belcheva MM, Clark AL, Haas PD, et al. (2005). "μ and κ Opioid Peceptors Activate ERK/MAPK via Different Protein Kinase C Isoforms and Secondary Messengers in Astrocytes." The Journal of Biological Chemistry **280**(July 29): 27662-69.
- Benedetti F, Vighetti S, Amanzio M, et al. (1998). "Dose-response relationship of opioids in nociceptive and neuropathic postoperative pain." Pain **74**(2-3): 205-11.
- Bitar MS, Al-Bustan M, Nehme CL, et al. (1996). "Antinociceptive action of intrathecally administered IGF-I and the expression of its receptor in rat spinal cord." Brain Res **737**(1-2): 292-4.
- Bitar MS and Pilcher CW (1998). "Attenuation of IGF-1 antinociceptive action and a reduction in spinal cord gene expression of its receptor in experimental diabetes." Pain **75**(1): 69-74.
- Blume AJ, Lichtshtein D and Boone G (1979). "Coupling of opiate receptors to adenylatecyclase: requirement for Na⁺ and GTP." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **76**(11): 5626-30.
- Boucher TJ and McMahon SB (2001). "Neurotrophic factors and neuropathic pain." Curr Opin Pharmacol **1**(1): 66-72.
- Boulton AJM, Malik RA, Arezzo JC, et al. (2004). "Diabetic Somatic Neuropathies." Diabetes Care **27**(6): 1458-86.
- Boulton AJM, Vinik AI, Arezzo JC, et al. (2005). "Diabetic neuropathies, a statement by the American Diabetes association." Diabetes Care **28**(4): 956-62.
- Cahill CM, Dray A and Coderre TJ (2003). "Intrathecal nerve growth factor restores opioid effectiveness in an animal model of neuropathic pain." Neuropharmacology **45**(4): 543-52.
- Calcutt NA (2004). "Experimental models of painful diabetic neuropathy." Journal of Neurological Sciences **220**: 137-39.

- Chavkin C, McLaughlin JP and Celver JP (2001). "Regulation of Opioid Receptor Function by Chronic Agonist Exposure: Constitutive Activity and Desensitization." Molecular Pharmacology **60**(1): 20-25.
- Chen SR and Pan HL (2003). "Antinociceptive effect of morphine, but not mu opioid receptor number, is attenuated in the spinal cord of diabetic rats." Anesthesiology **99**(6): 1409-14.
- Chen SR, Sweigart KL, Lakoski JM, et al. (2002). "Functional μ opioid receptors are reduced in the spinal cord dorsal horn of diabetic rats." Anesthesiology **97**(6): 1602-08.
- Chen X and Levine JD (2002). "Hyper-Responsivity in a subset of C-Fiber nociceptors in a model of painful diabetic neuropathy in the rat." Neuroscience **102**(1): 185-92.
- Chiarelli F, Santilli F and Mohn A (2000). "Role of growth factors in the development of diabetic complications." Horm Res **53**(2): 53-67.
- Chong MS and Hester J (2007). "Diabetic painful neuropathy, Current and futur treatment options." Drugs **67**(4): 569-85.
- Coggeshall RE, Zhou S and Carlton SM (1997). "Opioid receptors on peripheral sensory axons." Brain Research **764**: 126-32.
- Courteix C, Bardin M, Chantelauze C, et al. (1994). "Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics." Pain **57**(2): 153-60.
- Courteix C, Bourget P, Caussade F, et al. (1998). "Is the reduced efficacy of morphine in diabetic rats caused by alterations of opiate receptors or of morphine pharmacokinetics?" The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics **285**(1): 63-70.
- Courteix C, Eschalier A and Lavarenne J (1993). "Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioural evidence for a model of chronic pain. ." Pain **53**(1): 81-88.
- Craven PA and DeRubertis FR (1989). "Protein Kinase C Is Activated in Glomeruli from Streptozotocin Diabetic Rats." The Journal of Clinical Investigation **83**: 1667-75.
- Dekker LV and Parker PJ (1994). "Protein kinase C - a question of specificity." Trends Biochem Sci **19**(2): 73-7.
- Dobretsov M, Romanovsky D and Stimers JR (2007). "Early diabetic neuropathy: Triggers and mechanisms." World Journal of Gastroenterology **13**(2): 175-91.
- Ebendal T (1992). "Function and evolution in the NGF family and its receptors." J Neurosci Res **32**(4): 461-70.
- Evcimen N and King GL (2007). "The role of protein kinase C activation and the vascular complications of diabetes." Pharmacological research **55**(6): 498-510.
- Ferguson SS (2001). "Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling." Pharmacol Rev **53**(1): 1-24.
- Fernyhough P, Diemel LT, Brewster WJ, et al. (1994). "Deficits in sciatic nerve neuropeptide content coincide with a reduction in target tissue nerve growth factor messenger RNA in streptozotocin-diabetic rats: effects of insulin treatment." Neuroscience **62**(2): 337-44.
- Fernyhough P, Diemel LT, Brewster WJ, et al. (1995a). "Altered neurotrophin mRNA levels in peripheral nerve and skeletal muscle of experimentally diabetic rats." J Neurochem **64**(3): 1231-7.
- Fernyhough P, Diemel LT, Hardy J, et al. (1995b). "Human recombinant nerve growth factor replaces deficient neurotrophic support in the diabetic rat." Eur J Neurosci **7**(5): 1107-10.
- Fields HL, Emson PC, Leigh BK, et al. (1980). "Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres." Nature **284**(5754): 351-3.

- Fox A, Eastwood C, Gentry C, et al. (1999). "Critical evaluation of the streptozotocin model of painful diabetic neuropathy in the rat." Pain **81**(3): 307-16.
- Gimbel JS, Richards P and Portenoy RK (2003). "Controlled-release oxycodone for pain in diabetic neuropathy: a randomized controlled trial." Neurology **60**(6): 927-34.
- Glazner GW, Lupien S, Miller JA, et al. (1993). "Insulin-like growth factor II increases the rate of sciatic nerve regeneration in rats." Neuroscience **54**(3): 791-7.
- Gooch C and Podwall D (2004). "The diabetic neuropathies." Neurologist **10**(6): 311-22.
- Gries A and Ziegler D (1996). "Serie – Diabetische Neuropathie: Klassifikation, Epidemiologie, Prognose und sozialmedizinische Bedeutung. ." Deutsches Ärzteblatt **93**(11): A 680-84.
- Gross RA, Moises HC, Uhler MD, et al. (1990). "Dynorphin A and cAMP-dependent protein kinase independently regulate neuronal calcium currents." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18): 7025-9.
- Harati Y, Gooch C, Swenson M, et al. (1998). "Double-blind randomized trial of tramadol for the treatment of the pain of diabetic neuropathy." Neurology **50**(6): 1842-46.
- Haslbeck M, Luft D, Neundörfer B, et al. (2006). "Diabetische Neuropathie." Diabetologie **1**(2): 181-87.
- Hauner H (2008). Diabetesepidemie und Dunkelziffer. Deutscher Gesundheitsbericht Diabetes 2008. Standl, E. München, Deutsche Diabetes Union.
- Hellweg R and Hartung HD (1990). "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 **26**(2): 258-67.
- Hellweg R, Raivich G, Hartung HD, et al. (1994). "Axonal transport of endogenous nerve growth factor (NGF) and NGF receptor in experimental diabetic neuropathy." Exp Neurol **130**(1): 24-30.
- Hellweg R, Wohrle M, Hartung HD, et al. (1991). "Diabetes mellitus-associated decrease in nerve growth factor levels is reversed by allogeneic pancreatic islet transplantation." Neurosci Lett **125**(1): 1-4.
- Honda K, Koguchi M, Koga K, et al. (2007). "Contribution of Ca²⁺-Dependent Protein Kinase C in the Spinal Cord to the Development of Mechanical Allodynia in Diabetic Mice." Biol. Pharm. Bull. **30**(5): 990-93.
- Inoguchi T, Battan R, Handler E., et al. (1992). "Preferential elevation of protein kinase C isoform β 11 and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: Differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation." Proc. Natl. Acad. Sci USA **89**: 11059-63.
- Ishii DN (1995). "Implication of insulin-like growth factors in the pathogenesis of diabetic neuropathy." Brain Res Brain Res Rev **20**(1): 47-67.
- Ishii DN and Lupien SB (1995). "Insulin-like growth factors protect against diabetic neuropathy: effects on sensory nerve regeneration in rats." J Neurosci Res **40**(1): 138-44.
- Ishii DN and Lupien SB (2003). "Insulin-like growth factor replacement therapy for diabetic neuropathy: experimental Basis." Experimental Diabetes Research **4**: 257-69.
- Johnson EA, Oldfield S, Braksator E, et al. (2006). "Agonist-selective mechanisms of mu-opioid receptor desensitization in human embryonic kidney 293 cells." Mol Pharmacol **70**(2): 676-85.
- Jones DM, Tucker BA, Rahimtula M, et al. (2003). "The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI 3-kinase signaling pathway." J Neurochem **86**(5): 1116-28.

- Kamei J, Iwamoto Y, Hitosugi H, et al. (1994). "Streptozotocin-induced diabetes selectively reduces antinociception mediated by μ 1-opioid receptors, but not that mediated by μ 2-opioid receptors." Neuroscience Letters **165**: 141-43.
- Kamei J, Ohhashi Y, Aoki T, et al. (1992). "Streptozotocin-induced diabetes selectively alters the potency of analgesia produced by mu-opioid agonists, but not by delta- and kappa-opioid agonists." Brain Res **571**(2): 199-203.
- Kanashiro CA and Khalil RA (1998). "Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells." Clin Exp Pharmacol Physiol **25**(12): 974-85.
- Khan GM, Chen SR and Pan HL (2002). "Role of primary afferent nerves in allodynia caused by diabetic neuropathy in rats." Neuroscience **114**(2): 291-9.
- Kimpinski K and Mearow K (2001). "Neurite growth promotion by nerve growth factor and insulin-like growth factor-1 in cultured adult sensory neurons: role of phosphoinositide 3-kinase and mitogen activated protein kinase." J Neurosci Res **63**(6): 486-99.
- Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, et al. (1989). "Calphostin C (UCN-1028c), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of Protein Kinase C." Biochemical and Biophysical Research Communications **159**(2): 548-53.
- Kohno T, Ji RR, Ito N, et al. (2005). "Peripheral axonal injury results in reduced mu opioid receptor pre- and post-synaptic action in the spinal cord." Pain **117**(1-2): 77-87.
- Le Roith D (2003). "The Insulin-like growth factor system." Experimental Diabetes Research **4**: 205-12.
- Lee YW, Chaplan SR and Yaksh TL (1995). "Systemic and supraspinal, but not spinal, opiates suppress allodynia in a rat neuropathic pain model." Neurosci Lett **199**(2): 111-4.
- Lewin GR and Barde YA (1996). "Physiology of the neurotrophins." Annu Rev Neurosci **19**: 289-317.
- Likar R, Schäfer M and Stein C (2001). "Neue wissenschaftliche Kenntnisse zu peripheren Opioidrezeptoren." Anästhesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS **36**: 177-78.
- Malcangio M and Tomlinson DR (1998). "A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats." Pain **76**(1-2): 151-7.
- Malik RA, Tesfaye S, Newrick PG, et al. (2005). "Sural nerve pathology in diabetic patients with minimal but progressive neuropathy." Diabetologia **48**(3): 578-85.
- Malmberg AB (2000). "Protein kinase subtypes involved in injury-induced nociception." Prog Brain Res **129**: 51-9.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, et al. (1997). "Preserved Acute Pain and Reduced Neuropathic Pain in Mice Lacking PKC γ ." Science **278**: 279-83.
- Mansford KR and Opie L (1968). "Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan." Lancet **1**(7544): 670-1.
- Mao J, Price DD, Mayer DJ, et al. (1992). "Pain-related increases in spinal cord membrane-bound protein kinase C following peripheral nerve injury." Brain Res **588**(1): 144-9.
- McLaughlin JP and Chavkin C (2001). "Tyrosine phosphorylation of the mu-opioid receptor regulates agonist intrinsic efficacy." Mol Pharmacol **59**(6): 1360-8.
- Molliver DC, Lindsay J, Albers KM, et al. (2005). "Overexpression of NGF or GDNF alters transcriptional plasticity evoked by inflammation." Pain **113**(3): 277-84.
- Mousa SA, Cheppudira BP, Shaqura M, et al. (2007a). "Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain." Brain **130**(Pt 2): 502-13.

- Mousa SA, Straub RH, Schafer M, et al. (2007b). "Beta-endorphin, Met-enkephalin and corresponding opioid receptors within synovium of patients with joint trauma, osteoarthritis and rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis **66**(7): 871-9.
- Mousa SA, Zhang Q, Sitte N, et al. (2001). "Beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue." J Neuroimmunol **115**(1-2): 71-78.
- Nagano I, Ilieva H, Shiote M, et al. (2005). "Therapeutic benefit of intrathecal injection of insulin-like growth factor-1 in a mouse model of Amyotrophic Lateral Sclerosis." J Neurol Sci **235**(1-2): 61-8.
- Narai H, Nagano I, Ilieva H, et al. (2005). "Prevention of spinal motor neuron death by insulin-like growth factor-1 associating with the signal transduction systems in SODG93A transgenic mice." J Neurosci Res **82**(4): 452-7.
- Narita M, Narita M, Mizoguchi H, et al. (1995). "Inhibition of protein kinase C, but not of protein kinase A, blocks the development of acute antinociceptive tolerance to an intrathecally administered μ -opioid receptor agonist in the mouse." European Journal of Pharmacology **280**: R1-R3.
- Narita M, Ohsawa M, Mizoguchi H, et al. (2000). "Role of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C pathway in δ -opioid receptor-mediated antinociception in the mouse spinal cord." Neuroscience **99**(2): 327-31.
- Narita M, Ohsawa M, Mizoguchi H, et al. (1997). "Pretreatment with protein kinase C activator phorbol 12,13-dibutyrate attenuates the antinociception induced by mu- but not epsilon-opioid receptor agonist in the mouse." Neuroscience **76**(1): 291-8.
- Neuendörfer B and Reichel G (1996). "Serie: Diabetische Neuropathie – Pathogenese und Therapie der peripheren diabetischen Polyneuropathien." Deutsches Ärzteblatt **93**(15): A 963-68.
- North RA, Williams JT, Surprenant A, et al. (1987). "Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5487-91.
- Ohsawa M and Kamei J (1997). "Possible involvement of protein kinase C in the attenuation of [D-Ala², NMePhe⁴, Gly-ol⁵]enkephalin-induced antinociception in diabetic mice." European Journal of Pharmacology **339**: 27-31.
- Ohsawa M and Kamei J (1998). "Possible involvement of protein kinase C in the attenuation of the morphine-induced Straub tail reaction in diabetic mice." European Journal of Pharmacology **362**: 47-51.
- Ohsawa M, Mizoguchi H, Narita M, et al. (2000). "Effects of a mu-opioid receptor agonist on G-protein activation in streptozotocin-induced diabetic mice." Eur J Pharmacol **401**(1): 55-8.
- Pirart J (1977). "Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prostective study of 4,400 patients observed between 1947 and 1973 " Diabète & Métabolisme **3**(2): 97-107.
- Raivich G and Kreutzberg GW (1993). "Peripheral nerve regeneration: role of growth factors and their receptors." Int J Dev Neurosci **11**(3): 311-24.
- Randolph BC and Peters MA (1997). "Analgesic Effectiveness of Ketorolac Compared to Meperidine in the Rat Formalin Test." Anesth Prog **44**: 11-16.
- Recio-Pinto E and Ishii DN (1984). "Effects of insulin, insulin-like growth factor-II and nerve growth factor on neurite outgrowth in cultured human neuroblastoma cells." Brain Res **302**(2): 323-34.

- Recio-Pinto E, Rechler MM and Ishii DN (1986). "Effects of insulin, insulin-like growth factor-II, and nerve growth factor on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons." J Neurosci **6**(5): 1211-9.
- Reynolds AJ, Bartlett SE and Hendry IA (2000). "Molecular mechanisms regulating the retrograde axonal transport of neurotrophins." Brain Res Brain Res Rev **33**(2-3): 169-78.
- Roberts RE and McLean WG (1997). "Protein kinase C isozyme expression in sciatic nerves and spinal cords of experimentally diabetic rats." Brain Research **754**: 147-56.
- Sah DW, Ossipo MH and Porreca F (2003). "Neurotrophic factors as novel therapeutics for neuropathic pain." Nat Rev Drug Discov **2**(6): 460-72.
- Schaefer M (2010). Mechanisms of action of opioids. Physiologic Principles and clinical Practice. Maze M, E.A., Kharash E, Livingston Ch., Philadelphia, Anesthetic Pharmacology.
- Schmidt RE, Dorsey DA, Beaudet LN, et al. (1999). "Insulin-like growth factor I reverses experimental diabetic autonomic neuropathy." American Journal of Pathology **155**(5): 1651-60.
- Schneider SP, Eckert WAR and Light AR (1998). "Opioid-activated postsynaptic, inward rectifying potassium currents in whole cell recordings in substantia gelatinosa neurons." J Neurophysiol **80**(6): 2954-62.
- Shangguan Y, Hall KE, Neubig RR, et al. (2003). "Diabetic neuropathy: inhibitory G protein dysfunction involves PKC-dependent phosphorylation of Goa." Journal of Neurochemistry **86**: 1006-14.
- Shaqura MA, Zollner C, Mousa SA, et al. (2004). "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 **308**(2): 712-8.
- Sharma SK, Klee WA and Nirenberg M (1977). "Opiate-dependent modulation of adenylatecyclase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA **74**(8): 3365-69.
- Shearman MS, Sekiguchi K and Nishizuka Y (1989). "Modulation of ion channel activity: a key function of the protein kinase C enzyme family." Pharmacol Rev **41**(2): 211-37.
- Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, et al. (1993). "Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation." the American Physiological Society: E783-E93.
- Sima AAF (1994). "Pathological definition and evaluation of diabetic neuropathy and clinical correlations." The Canadian journal of neurological sciences **21**(4): S13-17.
- Sima AAF, Li ZG and Zhang W (2003). "The insulin-like growth factor system and neurological complications in diabetes." Experimental Diabetes Research **4**: 235-56.
- Simon GS, Borzelleca J and Dewey WL (1981). "Narcotics and diabetes. II. Streptozotocin-induced diabetes selectively alters the potency of certain narcotic analgesics. Mechanism of diabetes: morphine interaction." J Pharmacol Exp Ther **218**(2): 324-9.
- Simon GS and Dewey WL (1981). "Narcotics and diabetes. I. The effects of streptozotocin-induced diabetes on the antinociceptive potency of morphine." J Pharmacol Exp Ther **218**(2): 318-23.
- Sorensen L, Molyneaux L and Yue DK (2006). "The Relationship Among Pain, Sensory Loss, and Small Nerve Fibers in Diabetes." Diabetes Care **29**(4): 883-87.
- Stein C (1993). "Peripheral mechanisms of opioid analgesia." Anesthesia and Analgesia **76**: 182-91.

- Stein C, Hassan AH, Przewlocki R, et al. (1990). "Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(15): 5935-9.
- Stein C, Machelska H, Binder W, et al. (2001a). "Peripheral opioid analgesia." Current Opinion in Pharmacology **1**: 62-65.
- Stein C, Machelska H and Schäfer M (2001b). "Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids." Zeitschrift für Rheumatologie **60**(6): 416-24.
- Stein C, Schäfer M and Machelska H (2003). "Attacking pain at its source: new perspectives on opioids." Nature medicine **9**(8): 1003-08.
- Sugimoto K, Murakawa Y and Sima AAF (2000). "Diabetic neuropathy - a continuing enigma." Diabetes / Metabolism Research and Reviews **16**: 408-33.
- Terenghi G (1999). "Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors." J Anat **194 (Pt 1)**: 1-14.
- Thraillkill KM (2000). "Insulin-like growth factor I in diabetes mellitus: Its physiology, metabolic effects, and potential clinical utility." Diabetes Technology & Therapeutics **2**(1): 69-81.
- Thrainsdottir S, Malik RA, Dahlin LB, et al. (2003). "Endoneurial capillary abnormalities presage deterioration of glucose tolerance and accompany peripheral neuropathy in man." Diabetes **52**(10): 2615-22.
- Thye-Ronn P, Sindrup SH, Arendt-Nielsen L, et al. (1994). "Effect of short-term hyperglycemia per se on nociceptive and non-nociceptive thresholds." Pain **56**(1): 43-9.
- Tomlinson DR, Fernyhough P and Diemel LT (1997). "Role of neurotrophins in diabetic neuropathy and treatment with nerve growth factors." Diabetes **46 Suppl 2**: S43-9.
- Torres-Lopez JE, Juarez-Rojop IE, Granados-Soto V, et al. (2007). "Peripheral participation of cholecystikinin in the morphine-induced peripheral antinociceptive effect in non-diabetic and diabetic rats." Neuropharmacology **52**(3): 788-95.
- Unger JW, Klitzsch T, Pera S, et al. (1998). "Nerve growth factor (NGF) and diabetic neuropathy in the rat: morphological investigations of the sural nerve, dorsal root ganglion, and spinal cord." Exp Neurol **153**(1): 23-34.
- Vavra JJ, Deboer C, Dietz A, et al. (1959). "Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic." Antibiot Annu **7**: 230-5.
- Vinik AI, Holland MT, Le Beau JM, et al. (1992). "Diabetic neuropathies." Diabetes Care **15**(12): 1926-75.
- Wang JB, Imai Y, Eppler CM, et al. (1993). "mu opiate receptor: cDNA cloning and expression." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10230-4.
- Watson CP, Moulin D, Watt-Watson J, et al. (2003). "Controlled-release oxycodone relieves neuropathic pain: a randomized controlled trial in painful diabetic neuropathy. ." Pain **105**(1-2): 71-78.
- Wilding TJ, Womack MD and McCleskey EW (1995). "Fast, local signal transduction between the mu opioid receptor and Ca²⁺ channels." J Neurosci **15**(5 Pt 2): 4124-32.
- Wong MC, Chung JW and Wong TK (2007). "Effects of treatments for symptoms of painful diabetic neuropathy: systematic review." BMJ **335**(7610): 87.
- Wood A (1855). "A new method of treating neuralgia by the direct application of opiates to the painful points." Edinburgh Med Surg J **82**: 265-81.
- Wuarin-Bierman L, Zahnd GR, Kaufmann F, et al. (1987). "Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy." Diabetologia **30**(8): 653-8.

- Wuarin L, Guertin DM and Ishii DN (1994). "Early reduction in insulin-like growth factor gene expression in diabetic nerve." Exp Neurol **130**(1): 106-14.
- Wuarin L, Namdev R, Burns JG, et al. (1996). "Brain insulin-like growth factor-II mRNA content is reduced in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes mellitus." J Neurochem **67**(2): 742-51.
- Yagihashi S, Kamijo M and Watanabe K (1990). "Reduced myelinated fiber size correlation with loss of axonal neurofilaments in peripheral nerve of chronically streptozotocin diabetic rats." American Journal of Pathology **136**(6): 1365-73.
- Yagihashi S, Yamagishi SI and Wada R (2007). "Pathology and pathogenetic mechanisms of diabetic neuropathy: Correlation with clinical signs and symptoms." Diabetes Research and Clinical Practice **77**(1): 184-89.
- Yamdeu RS, Shaqura M, Mousa SA, et al. (2011). "p38 Mitogen-activated protein kinase activation by nerve growth factor in primary sensory neurons upregulates mu-opioid receptors to enhance opioid responsiveness toward better pain control." Anesthesiology **114**(1): 150-61.
- Zhang Q, Schaffer M, Elde R, et al. (1998). "Effects of neurotoxins and hindpaw inflammation on opioid receptor immunoreactivities in dorsal root ganglia." Neuroscience **85**(1): 281-91.
- Zhuang HX, Snyder CK, Pu SF, et al. (1996). "Insulin-like growth factors reverse or arrest diabetic neuropathy: effects on hyperalgesia and impaired nerve regeneration in rats." Exp Neurol **140**(2): 198-205.
- Ziegler D and Bierhaus A (2007). "Therapie der diabetischen Neuropathie." Deutsche Medizinische Wochenschau **132**: 1043-47.
- Zollner C and Schafer M (2008). "[Opioids in anesthesia]." Anaesthesist **57**(7): 729-40; quiz 41-2.
- Zollner C, Shaqura MA, Bopaiah CP, et al. (2003). "Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons." Mol Pharmacol **64**(2): 202-10.
- Zurek JR, Nadeson R and Goodchild CS (2001). "Spinal and supraspinal components of opioid antinociception in streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats." Pain **90**(1-2): 57-63.

7. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Laura Schaad, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Ursachen und mögliche Therapien einer verminderten Ansprechbarkeit auf Opioidanalgetika bei der diabetischen Neuropathie der Ratte“ 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

8. Danksagung

Ich möchte mich besonders bei meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. M. Schäfer bedanken, ohne den die Durchführung und Vollendung meiner Dissertation nicht möglich gewesen wäre. Er hat mich durch konstruktive Kritik und fachliche Beratung stets unterstützt.

Einen großen Dank auch an Mohammed Shaqura, Reine Solange Yamdeu und Shaaban Mousa, die mir viel beigebracht haben.

Vielen herzlichen Dank an meine Mutter, die mir mit Geduld und Liebe immer zur Seite stand, und an meinen Mann für seinen unermüdlichen Rückhalt.

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