

6. Diskussion

Opioide vermitteln ihre analgetische Wirkung durch Aktivierung von μ -Opioidrezeptoren (MOR) nicht nur im zentralen (ZNS), sondern auch im peripheren Nervensystem (PNS). Zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien zeigten, daß auch die lokale Gabe von Opioiden eine analgetische Wirkung sowohl bei akuten als auch bei chronischen Schmerzen bewirkt. Peripher analgetische Wirkungen von Opioiden sind besonders in entzündetem, schmerzhaften Gewebe nachweisbar und nehmen mit der Dauer und der Ausprägung der Entzündung kontinuierlich zu (Schafer et al., 1995; Zhou et al., 1998). In der vorliegenden Studie wurde untersucht, welche Veränderungen der MOR-Expression bzw. der MOR-Signaltransduktionskaskade unter Entzündungsbedingungen die Zunahme der peripher analgetischen Wirkung von Opioiden erklären könnten.

Die Untersuchungen wurden an peripheren und zentralen Neuronen von Wistar Ratten durchgeführt, bei denen mit Hilfe von FCA eine Entzündung der Rattenhinterpfote induziert wurde. Mittels Autoradiographie mit radioaktiv markierten MOR-Agonisten ($[^3\text{H}]\text{DAMGO}$) wurde die anatomisch-histologische Lokalisation und die Verteilung der MOR in supraspinalen, spinalen und peripheren Gewebeschnitten analysiert. In Ligandenbindungsstudien wurde die Anzahl exprimierter MOR und die Affinität verschiedener Opioide zum MOR unter Entzündungsbedingungen gemessen. In funktionellen Untersuchungen konnte mit Hilfe des $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Assays die Bedeutung der Entzündung für die MOR-Signaltransduktion untersucht werden. Zusätzlich wurden die Effekte der Entzündung auf die Verteilung und die Intensität von MOR in Spinalganglien mittels Immunhistochemie bestimmt und in Verhaltensversuchen die peripher analgetischen Wirkungen eines partiellen MOR-Agonisten (Buprenorphin) in Tieren mit und ohne Pfotenentzündung untersucht.

Unsere Ergebnisse zeigten, dass MOR-spezifische Bindungsstellen in verschiedenen Gehirnarealen, vor allem in schmerzleitenden Regionen nachweisbar waren. Darüber hinaus konnten wir MOR-spezifische Bindungsstellen im Hinterhorn des Rückenmarks, in Spinalganglien und in subkutanem Pfotengewebe nachweisen. Tiere mit FCA-induzierter Entzündung der Hinterpfote zeigten im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren eine Zunahme der Dichte an MOR-Bindungsstellen. Diese Zunahme beschränkte sich hierbei auf die lumbalen Spinalganglien und das subkutane Pfotengewebe. Der axonale Transport von MOR vom Ort ihrer Synthese

(Spinalganglion) zur Peripherie lies sich durch eine Ligatur im N.ischiadicus nachweisen. Auch hier führte die FCA-induzierte Entzündung zu einer Zunahme der Akkumulation von MOR-Bindungsstellen proximal der Ligatur. Im Gegensatz hierzu führte die Entzündung zu keiner Zunahme an MOR-Bindungsstellen im Hinterhorn des Rückenmarks und in ausgewählten Regionen des Gehirns. Der untersuchte Opioidagonist DAMGO bindet mit hoher Affinität am MOR im ZNS und PNS. Interessanterweise führte die lokale Entzündung zu keiner Änderung der Bindung des Liganden an den Rezeptor. Die Menge an MOR-Bindungsstellen war im HT höher als im Rückenmark. In relativ geringer Menge konnten wir MOR-Bindungsstellen im Spinalganglion nachweisen. Während sich die Anzahl der MOR in Hypothalamus und Rückenmark unter Entzündungsbedingungen nicht verändert, zeigte sich unter Entzündungsbedingungen eine signifikante Zunahme der MOR in den Spinalganglien der entzündeten Seite der Pfote. Diese Zunahme konnten wir auch in immunhistochemischen Experimenten bestätigen.

Die funktionellen Untersuchungen mittels [³⁵S]GTPγS-Assays zeigten, dass die lokale Entzündung keine Veränderung der DAMGO-induzierten G-Proteinkopplung von MOR im Hypothalamus und im Hinterhorn des Rückenmarks aufwies. Im Gegensatz hierzu war in den Spinalganglien eine signifikante Zunahme der DAMGO-induzierten G-Protein Kopplung (E_{max}) nachweisbar. Diese Zunahme stand in direktem Zusammenhang mit der Zunahme der maximalen Anzahl der MOR-Bindungsstellen, die unter Entzündungsbedingungen zu einer vermehrten G-Protein Aktivierung führten. Obwohl der partielle Agonist Buprenorphin (BUP) mit einer höheren Affinität am MOR bindet, konnte nur unter Entzündungsbedingungen BUP eine effiziente G-Protein Kopplung induziert werden. Die i.pl. Injektion von BUP zeigte einen wirksamen und dauerhaften antinozizeptiven Effekt in der entzündeten Pfote, jedoch nicht in der gesunden Pfote.

6.1. Autoradiografische Untersuchungen im ZNS und PNS

Untersuchungen in neuronalem Gewebe haben gezeigt, dass sich MOR nicht nur im ZNS, sondern auch auf peripheren Nervenfasern befinden (Besse et al., 1992; Fields et al., 1980; Ninkovic et al., 1982; Stein et al., 1988). Unsere autoradiografischen Untersuchungen von Hirnschnitten haben gezeigt, dass bestimmte Areale eine erhöhte Dichte an MOR aufweisen. Wir konnten MOR-Bindungsstellen vorzugsweise in der

Amygdala, dem Hippocampus, dem Hypothalamus, dem Colliculus superior und dem Thalamus identifizieren. Es ist bekannt, dass diese Areale bei der zentralen Verarbeitung der nozizeptiven Information beteiligt sind (Diaz et al., 2000). Die vermehrte Dichte von Opioidrezeptoren in den zentralen nozizeptiven Bahnen kann in vielfältiger Weise schmerzhaft Impulse aus der Peripherie und der spinalen Ebene hemmen. Ähnliche Befunde finden sich auch in autoradiographischen Untersuchungen von Kitchen und Diaz (Diaz et al., 2000; Kitchen et al., 1997).

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass die zentrale Verarbeitung nozizeptiver Informationen bereits auf spinaler Ebene stattfindet. Insbesondere endogene und exogene Opioide haben hierbei eine hemmende Wirkung. In der Klinik wird aus diesem Grunde die direkte intrathekale Applikation von Opioiden bei zahlreichen schmerzhaften Erkrankungen oder operativen Eingriffen angewandt. Erste tierexperimentelle Untersuchungen erfolgten hierzu durch Yaksh et al. (Yaksh and Rudy, 1977) und werden seither erfolgreich bei Patienten eingesetzt. Untersuchungen haben gezeigt, dass alle drei Typen von Opioidrezeptoren (μ , δ und κ) im Hinterhorn des Rückenmarks exprimiert werden (Atweh and Kuhar, 1977; Besse et al., 1992; Mansour et al., 1988; Stevens et al., 1991). In Autoradiographischen Untersuchungen konnten wir MOR-Bindungsstellen in lumbalen Rückenmarksschnitten nachweisen. Tieren, bei denen eine Entzündung der Rattenhinterpfote induziert wurde, zeigten keine Veränderungen der MOR-Bindungsstellen in lumbalen Rückenmarksabschnitten. Dies ist in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Millan et al., 1989). Autoradiografische Untersuchungen in Spinalganglien wurden nach unserer Erkenntnis bis heute nicht durchgeführt. In den Spinalganglien sitzt der Zellkörper der peripheren sensorischen Nerven. Opioidrezeptoren werden dort synthetisiert und dann axonal in Richtung ZNS und Peripherie transportiert (Laduron and Janssen, 1985). Autoradiographisch konnten wir erstmals zeigen, dass Opioidrezeptoren auf Spinalganglien exprimiert werden. Im weiteren zeigten Tiere mit einer lokalen Pfotenentzündung im Vergleich zu unbehandelten Kontrolltieren eine deutlich höhere Dichte der MOR-Bindungsstellen im ipsilateralen Spinalganglion. Dies deutet darauf hin, dass eine lokale Pfotenentzündung zu einer Zunahme der Opioidrezeptorexpression im Spinalganglion und nachfolgend vermutlich zu einem erhöhten axonalen Transport in die Peripherie und das ZNS führt. Den Transport zum peripheren Nervenende konnten wir durch eine Ligatur des N.

ischiadicus nachweisen. Bei Tieren ohne FCA induzierter Entzündung führte die Ligatur zu keiner Akkumulation von MOR im proximalen Teil des Nerven. Dies deutet darauf hin, dass unter physiologischen Bedingungen nur ein geringer axonaler Transport stattfindet. Bei Tieren mit FCA-induzierter Entzündung und Ligatur hingegen konnten wir eine deutliche Akkumulation von MOR nachweisen. Diese Ergebnisse unterstützen die Befunde im Spinalganglion. Eine periphere Entzündung führt zur Rezeptorneusynthese im Spinalganglion und nachfolgend zum Transport von MOR in die Peripherie. Auch am peripheren Nervenende konnten wir in autoradiografischen Untersuchungen MOR-Bindungsstellen in longitudinaler Ausdehnung in subkutanem Pfortengewebe nachweisen. Auch hier zeigte sich quantitativ, dass die Dichte an MOR in entzündetem Pfortengewebe höher ist als in nicht-entzündetem subkutanem Pfortengewebe. In einer Vielzahl tierexperimenteller Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Zunahme der MOR-Bindungsstellen unter Entzündungsbedingungen zu einer Zunahme der Analgesie peripherer Opioiden führt. Die vorliegenden pharmakologischen Untersuchungen an Gewebepreparaten erfasste erstmals quantitativ die Zunahme der Opioidrezeptorbindungsstellen in der pathophysiologischen Situation einer Entzündung. Dies könnte ein möglicher Erklärungsmechanismus für die beobachtete verbesserte Analgesie unter Entzündungsbedingungen sein. Auch Verhaltensuntersuchungen mit i.p.l. applizierten, irreversiblen MOR-Antagonisten zeigen, dass signifikant höhere Dosierungen in entzündetem Pfortengewebe notwendig sind. Dies deutet auf eine vermehrte Anzahl funktionell aktiver MOR hin (Schafer et al., 1995; Zhou et al., 1998).

Um die durch die autoradiografischen Untersuchungen beobachteten Veränderungen der MOR in peripheren sensorischen Neuronen unter Entzündungsbedingungen genauer quantifizieren zu können, führten wir eine Reihe von [³H]DAMGO-Bindungsstudien in Membranpräparationen sowohl des zentralen als auch des peripheren Nervensystems durch.

6.2. Bindungsstudien und Entzündung

Liganden-Bindungsstudien wurden für alle bisher beschriebenen Areale durchgeführt, um eine quantitative Aussage über MOR während eines entzündlichen Gewebeprozesses zu erhalten. Für die Bestimmung der zentralen MOR wurde ein repräsentatives Areal (Hypothalamus) im Gehirn von Ratten gewählt. (Sim et al., 1995). Wie wir zeigen konnten, war die maximale Anzahl der μ -Opioidrezeptoren in den sensorischen Spinalganglien um das 22-fache niedriger als im Hypothalamus und um das 4-fache niedriger als im Hinterhorn (Shaqura et al., 2004; Zollner et al., 2003). In vergleichbaren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass sich die Affinität des Liganden zum Rezeptor in verschiedenen Arealen des ZNS nicht ändert (Maher et al., 2000; Zhao et al., 2003). In unseren Untersuchungen kamen wir zu ähnlichen Ergebnissen. Darüber hinaus konnten wir zeigen, dass sich auch die Affinität im PNS (Spinalganglion) im Vergleich zum ZNS nicht ändert. Dies könnte ein Hinweis sein, dass sich keine unterschiedlichen Splice-Varianten von MOR in den untersuchten Abschnitten des ZNS und PNS befinden. Auch unter entzündlichen Bedingungen änderte sich die Affinität des Opioidpeptids DAMGO zum MOR in den einzelnen Gewebeabschnitten nicht. Dies ist ein erster Hinweis, dass die tierexperimentell erhobene, verbesserte analgetische Wirksamkeit unter Entzündungsbedingungen nicht auf eine Zunahme der Affinität des Liganden zum MOR beruht. Neben der Affinität konnte in den Membranpräparationen die maximale Anzahl an MOR bestimmt werden. Hierbei konnten wir zeigen, dass 22-fach mehr MOR im Hypothalamus und 4-fach mehr MOR im Rückenmark als im Spinalganglion exprimiert werden. Im Hypothalamus und Rückenmark kam es unter Entzündungsbedingungen zu keiner signifikanten Zunahme an MOR-Bindungsstellen. Dies wurde in einer anderen Studie (Spetea et al., 2002) unterstützt, in der gezeigt wurde, dass sich die Affinität (K_d) und die Anzahl (B_{max}) der MOR in Striatum, Hypothalamus, Hippocampus, frontalem Kortex und lumbalem Rückenmark unter Entzündungsbedingungen nicht änderte. Andere Untersuchungen konnten ebenfalls zeigen, dass sich die Immunoreaktivität, Intensität oder die Affinität der Opioidrezeptoren im spinalen Hinterhorn von Ratten bei verschiedenen Entzündungsmodellen nicht ändert (Atweh and Kuhar, 1977; Besse et al., 1990; Cesselin et al., 1980; Ji et al., 1995; Millan et al., 1989; Zhang et al., 1998). Zwei

immunhistochemische Untersuchungen hingegen fanden eine signifikante Zunahme von MOR in lumbalen Schnitten des Rückenmarks nach FCA-induzierter Entzündung (Goff et al., 1998; Mousa et al., 2001). Eine mögliche Erklärung der Diskrepanz zwischen den immunhistochemischen und den von uns und anderen durchgeführten Ligandenbindungsstudien liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Sensitivität beider Verfahren begründet.

Die MOR sind in Spinalganglien exprimiert (Ji et al., 1995; Li et al., 1998; Maekawa et al., 1994; Minami et al., 1995; Zajac et al., 1989; Zhang et al., 1998), wo sich die Zellkörper primär afferenter Neurone befinden. In den lumbalen L3-L5 Spinalganglien, wo 98-99% der neuronalen Zellkörper des N. ischiadicus lokalisiert sind (Swett et al., 1991), nahm bei einer FCA-Pfotenentzündung die Anzahl der MOR ipsilateral jedoch nicht kontralateral zur Pfotenentzündung zu (siehe oben). Diese Zunahme war zeitabhängig und erreichte ihr Maximum nach 24 Stunden. Auch nach 96 Stunden war diese Zunahme immer noch signifikant. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die plastischen Veränderungen auf den Spinalganglien beschränkt bleibt, die auch die entzündete Pfote innervieren. Der Anstieg der MOR-Expression in Spinalganglien war auf die entzündete Seite beschränkt (Shaqura et al., 2004). In einer kürzlich publizierten Veröffentlichung konnte mit Hilfe eines semiquantitativen Verfahrens gezeigt werden, dass die Zunahme der MOR-Bindungsstellen auch vier Wochen nach Beginn der Entzündung fortbesteht und auch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen eine bedeutende Rolle spielt (Ballet et al., 2003) Erste Hinweise in vorangegangenen Publikationen zeigen auch einen diskreten Anstieg der mRNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Entzündung (Schafer et al., 1995). Diese Anstiege waren jedoch statistisch nicht signifikant. Gegenwärtig laufen Versuche in unserer Arbeitsgruppe, die frühere Zeitpunkte der Entzündung und mögliche Veränderungen in der mRNS untersuchen. Präliminere Experimente zeigten, dass die mRNS, im Gegensatz zum exprimierten MOR-Protein, deutlich früher ansteigt und im weiteren Verlauf wieder abnimmt (persönliche Kommunikation mit Dr. W. Janson). In einer anderen Studie, in der mRNS für MOR im Verlauf einer FCA-Entzündung semiquantitativ mittels in-situ Hybridisierung bestimmt wurden (Maekawa et al., 1996), zeigte sich ebenfalls eine moderate Zunahme der MOR-spezifischen mRNS.

Unsere immunhistochemischen Untersuchungen zeigten MOR-positiven Neurone in sensorischen Spinalganglien von Tieren mit und ohne FCA-induzierten Pfotenentzündung. Vier Tage nach der Entzündung konnte eine Zunahme der Anzahl und der Dichte MOR-positiver Neurone nachgewiesen werden. MOR-positive Spinalganglien waren bevorzugt auf den klein- mittelgrossen (23-51 μm) Neuronen lokalisiert. Wie in anderen Studien gezeigt wurde, sind bevorzugt die klein-mittelgrossen Neuronen an der nozizeptiven Signalweiterleitung beteiligt. Diese Neurone sind darüber hinaus in der Lage, Neuropeptide (z.B. Substanz P) zu exprimieren (Mansour et al., 1994; Minami et al., 1995). Andere Arbeitsgruppen wiesen immunhistochemisch eine Erhöhung der MOR positiven Spinalganglien vom kleinzelligen Typ in anderen Entzündungsmodellen nach (Ballet et al., 2003; Ji et al., 1995). Die immunhistochemischen Ergebnisse haben einen 43-fachen Anstieg in der Zahl der MOR-positiven Neurone ergeben. Die Quantifizierung mit Liganden-Bindungsstudien zeigte hingegen einen 90-fachen Anstieg an MOR. Aus diesen Untersuchungen kann deshalb geschlossen werden, dass es unter Entzündungsbedingungen sowohl zu einer Zunahme der MOR-positiven Neurone, als auch eine Zunahme der Anzahl an MOR-Bindungsstellen pro Neuron kommen muss.

Eine Zunahme an MOR unter Entzündungsbedingungen könnte verschiedene Ursachen haben. In-vitro Untersuchungen an Neuroblastomzellen (SHSY5Y) haben gezeigt, dass die Inkubation mit Mediatoren der Entzündung (IL-4, $\text{TNF}\alpha$) zu einer vermehrten Expression von MOR führen kann (Kraus et al., 2001). In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass es in einem neuropathischen Modell zu einer Zunahme des retrograden, axonalen Transports von neuroaktiven Cytokinen (z.B. NGF, $\text{TNF}\alpha$ und BDNF) kommt (Curtis et al., 1998; DiStefano and Curtis, 1994; Leitner et al., 1999; Mufson et al., 1999). Es ist bekannt, dass unter Entzündungsbedingungen der Nervenwachstumsfaktor NGF vermehrt in entzündetem Gewebe synthetisiert und retrograd zum Spinalganglion transportiert wird. NGF führt in Spinalganglien zu einer Hochregulation verschiedener neuronaler Faktoren (z.B. SP, CGRP) (Alvares and Fitzgerald, 1999; Lindsay et al., 1990). Erste präliminäre Ergebnisse zeigen, dass eine gleichzeitige Ligatur des N. ischiadicus 24 bzw. 96 Stunden nach Induktion der FCA-Entzündung die beobachtete vermehrte MOR-Expression verhindert wird. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass der vermehrte retrograde Transport von Mediatoren

zum Spinalganglion zu der Hochregulation von MOR beiträgt. Die Immunneutralisation von NGF in der entzündeten Pfote durch einen i.pl. applizierten NGF-spezifischen Antikörper bewirkte auch eine Aufhebung des FCA-induzierten MOR-Anstiegs im Spinalganglien. Dies unterstreicht die wichtige Rolle von NGF. Weitere zukünftige Ergebnisse müssen jedoch folgen, um diese präliminären Daten zu untermauern.

Der axonale Transport verschiedener neuronaler Rezeptoren wurde von Laduron und Castel untersucht (Laduron and Janssen, 1985). In diesen Untersuchungen konnte nach einer Ligatur des N. ischiadicus eine Akkumulation von Opioidrezeptoren sowohl proximal als auch distal der Ligatur gezeigt werden. In der vorliegenden Studie untersuchten wir erstmals quantitativ den Transport von MOR am N. ischiadicus zu unterschiedlichen Zeitpunkten im Verlauf einer Pfotenentzündung. Nach einer Ligatur des N. ischiadicus wurde bei Kontrolltieren und bei FCA-behandelten Tieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Menge an MOR an der proximalen Ligatur untersucht. 4 und 24 Stunden nach Induktion der Entzündung wurde eine Ligatur des N. ischiadicus durchgeführt. 48 Stunden nach Beginn der FCA-Entzündung wurde in allen Gruppen die Menge an MOR im proximalen Nervenabschnitt gemessen. Zu beiden Zeitpunkten konnten wir in den proximalen Abschnitten der Ligatur des N. ischiadicus eine Akkumulation von MOR nachweisen, die deutlich über der Akkumulation bei Kontrolltieren lag. Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise Entzündungsmediatoren bereits innerhalb der ersten 4 Stunden nach Beginn der FCA-Entzündung retrograd ins Spinalganglion wandern und plastische Veränderungen der MOR-Expression induzieren. In einer Untersuchung von Shubayev et al. (Shubayev and Myers, 2001) konnte in einem Modell der chronischen konstriktiven Nervenverletzung für TNF- α eine retrograde Transportgeschwindigkeit von 200 mm/Tag bestimmt werden. Der retrograde Transport nach Verletzung findet möglicherweise innerhalb weniger Stunden nach dem schädigen Ereignis statt. Unsere Untersuchungen zeigen, dass eine FCA-induzierte Entzündung zu einer deutlichen Zunahme der MOR-Neusynthese in Spinalganglien und anschliessend zu einem anterograden Transport in die Peripherie führen. Unter pathophysiologischen Bedingungen stehen am peripheren Nervenende die neusynthetisierten und axonal transportierten MOR zur Verfügung.

6.3. G-Protein Kopplung und Entzündung

Die Bindung von Opioiden an den MOR führt zur G-Protein-Kopplung (Chen et al., 1993; Evans et al., 1992; Gudermann et al., 1996; Kieffer et al., 1992; Thompson et al., 1993; Wang et al., 1994). Die Dissoziation des G-Proteins in die aktiven $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ Untereinheit führt zur Modulation des Gehaltes an cAMP, zur Aktivierung von K^+ -Kanälen und zur Inhibition von Ca^{2+} -Kanälen. Die zellulären Veränderungen führen zur Inhibition schmerzleitender Impulse und vermitteln die analgetischen Effekte der Opiode.

Die Einführung eines radioaktiv markierten GTP-Analogons erlaubte die Bestimmung der G-Protein-Kopplung (Lorenzen et al., 1993). Hierbei wurde ein Hydrolyse-resistentes GTP mit Sulfur-35 radioaktiv markiert. Die α -Untereinheit des G-Proteins besitzt die Bindungsstelle für Guanin-Nucleotide (Guanosin-di-phosphat (GDP) bzw.-triphosphat (GTP)), die hydrophobe β,γ -Untereinheit verankert das G-Protein in der Membran. In Abwesenheit eines Liganden ist das G-Protein, in dem GDP an die α -Untereinheit gebunden ist, nicht mit dem Rezeptor verbunden. Nach Stimulation wird GDP gegen GTP an der α -Untereinheit ausgetauscht. Das radioaktiv markierte [^{35}S]GTP kann nach Einbau in die $G\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins mit einem Szintillationszähler gemessen werden. In zellkultur- und tierexperimentellen Untersuchungen wurden für verschiedene MOR-Liganden die Konzentrations-Wirkungskurven erstellt (Audinot et al., 2002; Traynor and Nahorski, 1995). Wir führten eine Reihe von Experimenten durch, um mögliche Veränderungen der MOR vermittelten G-Protein-Kopplung in HT, RM und DRG von Tieren mit und ohne FCA-induzierter Entzündung zu untersuchen. Nach der klassischen Rezeptortheorie (Selley et al., 1998) führt eine höhere Anzahl von Rezeptoren an der Zelloberfläche zur Zunahme der nachgeschalteten G-Protein Kopplung. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der erreichbare Maximaleffekt der G-Protein Kopplung am höchsten in Membranen mit hoher Rezeptordichte war. Die maximalen Effekte wurden kleiner in Membranpräparaten mit niedriger Rezeptorzahl. Unter Einfluss einer lokalen Pfotenentzündung waren in HT- und RM-Membranpräparationen keine signifikanten Unterschiede in der durch DAMGO-stimulierten G-Proteinkopplung nachweisbar. Eine wichtige Erkenntnis in dieser Untersuchung war die Beobachtung, daß es zeitabhängig und selektiv in Spinalganglien

entzündeter Tiere zu einer Zunahme der G-Protein Kopplung kommt. Die maximale DAMGO-Stimulation der [^{35}S]GTP γ S Bindung (E_{max}) stieg in DRG 24h (+245%) und 96h (+131%) nach Induktion einer Entzündung an. Dieser Anstieg der maximalen Stimulation der [^{35}S]GTP γ S-Bindung war lediglich auf die ipsilaterale Seite der Entzündung beschränkt. In Membranpräparaten aus HT und lumbalem RM konnten wir keine Zunahme der G-Protein Kopplung unter Entzündungsbedingungen nachweisen. Die Zunahme der G-Protein Kopplung könnte eine mögliche Erklärung für die in tierexperimentellen Studien beobachtete verbesserte Analgesie unter Entzündungsbedingungen sein. Die Applikation exogener Opiode führt zur vermehrten G-Protein Aktivierung und vermehrten Aktivierung nachgeschalteter Effektorsysteme.

Durch Titration des [^{35}S]GTP Analogons kann, bei maximaler Aktivierung des MOR durch einen Liganden, die Affinität und die maximale Anzahl an [^{35}S] gebundenen aktivierten α - Untereinheiten bestimmt werden. Die Untersuchungen wurden in Anwesenheit hoher Konzentrationen von GDP durchgeführt. Da es sich hierbei um einen kompetitiven Agonisten zum [^{35}S]-GTP handelt, sind die ermittelten Werte der Affinität und die maximale Anzahl an aktivierten α - Untereinheiten nur relative Größen. Dennoch eignet sich die Methode zum relativen Vergleich zwischen einzelnen Geweben. Die Affinität des [^{35}S]-markierten GTP zur aktivierten α - Untereinheit war in HT, RM und DRG gleich. Die maximale Anzahl der aktivierten α - Untereinheit war in Analogie zu den MOR am höchsten im ZNS. Bedingt durch eine geringere Rezeptorexpression wurden in Spinalganglien signifikant weniger α - Untereinheit nach DAMGO Stimulation aktiviert. Allerdings konnten wir auch in diesen Untersuchungen zeigen, dass eine FCA-induzierte Entzündung zu einer Zunahme der α aktivierten Untereinheiten in Spinalganglien führt, während keine Veränderungen in den untersuchten Arealen des ZNS nachweisbar waren.

Die maximale Anzahl der aktivierten G-Proteine und die maximale Anzahl an aktivierbaren MOR erlaubt die Bestimmung des Amplifikationsfaktors. Hierbei wird das Verhältnis von maximaler Anzahl von aktivierten G-Proteinen in Relation zur Anzahl der MOR berechnet. Nach dieser Berechnung zeigte sich, dass der Amplifikationsfaktor im HT (3) signifikant niedriger ist als im RM (13) oder DRG (9). Die relativen Amplifikationsfaktoren ändern sich unter Entzündungsbedingungen nicht. Dies bedeutet,

dass pro MOR weniger G-Proteine im HT aktiviert werden als im RM oder DRG. Trotz diesen Berechnungen ist die G-Protein Kopplung am größten im HT. Hierfür können eine Reihe verschiedener Faktoren verantwortlich sein: 1. MOR werden in höherer Dichte im HT als im RM oder DRG exprimiert. 2. Der Pool an aktivierbaren G-Proteinen ist im HT größer als im RM oder DRG. 3. Die Rezeptorreserve ist im HT größer als im RM oder DRG. Bei der Rezeptorreserve muss nur ein Teil der verfügbaren Rezeptoren aktiviert werden, um das Effektorsystem maximal zu stimulieren (Mutschler, 1997). Ähnliche Untersuchungen in verschiedenen Arealen des ZNS haben ebenfalls regionale Unterschiede bei den Amplifikationsfaktoren ergeben (Maher et al., 2000) Die Ergebnisse wurden hier vor dem Hintergrund zellulärer Kompartimente, die mit einer unterschiedlichen G-Protein Ausstattung versehen sind, diskutiert.

Für den Cannabinoidrezeptor 1 (CB1) zum Beispiel wurde gezeigt, dass die Aktivierung des Rezeptors in verschiedenen Regionen unterschiedliche Subtypen von Gi/o Proteinen aktivieren kann. Dies könnte regionale Unterschiede bei der G-Protein Kopplung erklären (Breivogel et al., 1997; Chakrabarti et al., 1995).

6.4. Buprenorphin vermittelte Analgesie unter Entzündungsbedingungen

Buprenorphin ist ein lipophiler Thebainabkömmling und ist in seiner analgetischen Wirkung etwa 33 mal stärker als Morphin. BUP ist ein gemischter Agonist-Antagonist und bindet an μ und κ -OR, wobei BUP am MOR partiell agonistische und am KOR antagonistische Wirkungen entfaltet. Charakteristisch für BUP ist seine langsame Bindung und Dissoziation vom MOR (Zwissler et al., 2003). Die Bestimmung der Inhibitionskonstante K_i in Spinalganglien von Tieren mit und ohne FCA-induzierter Entzündung hat gezeigt, dass BUP mit sehr hoher Affinität am MOR bindet. Dies könnte die langsame Dissoziation und die lang anhaltende Wirkung des Medikaments erklären. In gleicher Weise wie beim vollen MOR-Agonisten DAMGO führte eine Entzündung zu keiner Veränderung der Affinität des Liganden. Unter entzündlichen Bedingungen verhielt sich BUP, verglichen mit dem Peptidagonisten DAMGO, wie ein partieller Agonist. Die Zahl der aktivierten G- α Untereinheit lag unter entzündlichen Bedingungen mit BUP bei 145 ± 4.7 fmol/mg und mit DAMGO bei 425 ± 54 fmol/mg Protein. Interessanterweise konnten wir unter nicht entzündlichen Veränderungen keine G-Protein Kopplung detektieren. Dies könnte auf eine zu geringe Sensitivität des Assays

zurückzuführen sein. In früheren Untersuchungen wurde aber auch diskutiert, dass ein biologischer Effekt erst dann wirksam wird, wenn eine kritische Menge an Effektmolekülen aktiviert werden kann (Chavkin and Goldstein, 1984)

Es wäre vorstellbar, dass BUP unter nicht-entzündlichen Bedingungen als partieller Agonist nicht in der Lage ist, diesen Schwellenwert zur Aktivierung von G-Proteinen zu überschreiten. Unter Entzündungsbedingungen kann eine G-Protein Kopplung stattfinden, da die kritische Menge an Rezeptoren und G-Protein vorhanden sind. In Verhaltensuntersuchungen konnten wir zeigen, dass eine i.pl. Injektion des partiellen Agonist BUP im Vergleich zu NaCl-injizierten Tieren keine peripher antinozizeptiven Effekte entfaltet. Im Gegensatz hierzu konnten wir ausgeprägte, periphere antinozizeptive Effekte durch BUP bei Tieren mit FCA-induzierter Entzündung demonstrieren. Dieses klinisch relevante Ergebnis deutet darauf hin, dass i.pl. Buprenorphin nur unter pathophysiologisch veränderten Bedingungen seine Wirkung entfalten kann. Die peripher analgetische Wirkung in unseren Verhaltensuntersuchungen war dosisabhängig und konnte durch OR-selektive Antagonisten (Naloxon und CTOP) antagonisiert werden. Die Verhaltensuntersuchungen sind in Übereinstimmung mit den biochemischen Daten, wonach eine G-Protein Kopplung nur unter pathophysiologischen Bedingungen nachweisbar war. Darüber hinaus müssen zukünftige Untersuchungen zeigen, welche anderen Parameter der Signaltransduktion unter Entzündungsbedingungen beeinflusst werden.