

# 1. Einleitung

## 1.1. Stand der Forschung

Opioide haben als stark wirksame Analgetika eine zentrale Bedeutung in der Therapie von postoperativen Schmerzen und Tumorschmerzen. Die systemische Gabe von Opioiden führt jedoch zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Übelkeit, Sedierung und Atemdepression sowie zur Toleranzentwicklung. Lange wurde die analgetische Wirkung endogener und exogener Opioiden allein auf eine Aktivierung von Opioidrezeptoren im Zentralnervensystem zurückgeführt. In den 80er Jahren wurden darüber hinaus erstmals Opioidpeptid-haltige Immunzellen in der Milz beschrieben <sup>1</sup> und die antinozizeptive Wirkung von Opioidpeptiden im entzündeten Gewebe nachgewiesen <sup>2</sup>.

### 1.1.1. Opioidpeptid-haltige Leukozyten in entzündetem Gewebe

In immunhistochemischen und proteinbiochemischen Arbeiten gelang es, nahezu alle Opioidpeptide (i.e.  $\beta$ -Endorphin, Enkephalin, Dynorphin und Endomorphin-1 und -2) in mononukleären Zellen (Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Mastzellen) und in Granulozyten nachzuweisen <sup>3-7</sup>. Während im nicht-entzündeten Gewebe nahezu keine Opioidpeptid-haltigen Leukozyten nachweisbar sind, werden diese Zellen unter Entzündungsbedingungen vermehrt rekrutiert. Gleichzeitig wird die  $\beta$ -Endorphin-Produktion von Leukozyten hochreguliert <sup>8</sup>. Die Leukozyteneinwanderung in das entzündete Gewebe läuft in mehreren Schritten ab - Rolling, Sticking und Transmigration – und wird durch Adhäsionsmoleküle vermittelt. Werden *in vivo* Adhäsionsmoleküle blockiert, so kommt es zu einer verminderten Rekrutierung Opioidpeptid-haltiger Leukozyten, zu einer Abnahme des  $\beta$ -Endorphin-Gehaltes im Gewebe und zu einer Reduktion der endogenen Schmerzkontrolle <sup>9-11</sup>. Die Leukozyteneinwanderung ins Gewebe dient somit nicht allein der Abwehr von Antigenen, sondern spielt darüber hinaus höchstwahrscheinlich eine wichtige Rolle in der peripheren Schmerzkontrolle.

### 1.1.2. Periphere, Stress-induzierte, Opioid-vermittelte Antinozizeption

An dieser Stelle sind die im folgenden häufig verwendeten Begriffe Schmerz, Analgesie und Antinozizeption zu differenzieren. Schmerz ist nach der IASP (International Association for

the study of pain)-Definition auch subjektiv und ein unangenehmes sensorisches und emotionales Erlebnis, das wir mit einer Gewebsschädigung in Verbindung setzen oder als eine solche beschreiben. Der Begriff Schmerz wird auch verwendet, um den verschiedenen Ebenen der Schmerzwahrnehmung und –verarbeitung des Menschen, der neuronalen, kognitiven und emotionalen, Rechnung zu tragen. Mit Hyperalgesie bezeichnet man eine verstärkte Antwort auf einen normalerweise schmerzhaften Reiz. Da man im Tiermodell eine subjektive Empfindung nicht messen kann, zieht man hier den Begriff Hyperalgesie heran und misst ein Schmerzverhalten, z.B. das Wegziehen der Pfote. Der Begriff Analgesie ist definiert als die Abwesenheit von Schmerz nach einem normalerweise schmerzhaften Stimulus. In dieser Arbeit wird der Begriff Analgesie verwendet, wenn es sich um Daten aus klinischen Studien handelt. Nozizeption ist definiert als die Weiterleitung eines schmerzhaften Stimulus über das Nervensystem <sup>17</sup>. Entsprechend wird der Begriff Antinozizeption verwendet, um das Fehlen dieser Fortleitung zu beschreiben. Im Text wird der Begriff Antinozizeption verwendet, wenn es sich um Daten aus Tierversuchen handelt.

Die Freisetzung von Opioidpeptiden aus Leukozyten und die periphere Opioid-vermittelte Antinozizeption lässt sich unter Stress nachweisen: Corticotropin Releasing Hormone (CRH), ein Stress vermittelndes Hormon, führt *in vitro* dosisabhängig zur  $Ca^{2+}$ -abhängigen Freisetzung von Opioidpeptiden aus Leukozyten <sup>12, 13</sup>. Im Gewebe (entzündete Pfote und Lymphknoten der Ratte, Milz der Maus) sind CRH-Rezeptoren auf Lymphozyten und Makrophagen nachweisbar und werden unter Entzündungsbedingungen hochreguliert <sup>14, 15</sup>. *In vivo* führt die lokale CRH-Injektion zu einer dosisabhängigen Antinozizeption in der Ratte. Die periphere Opioid-vermittelte Antinozizeption kann durch eine generalisierte Immunsuppression mittels Cyclosporin A oder durch die lokale Injektion von CRH-Antagonisten oder von Anti- $\beta$ -Endorphin-Antikörper aufgehoben werden. Neben der lokalen CRH-Injektion führt auch Stress durch einminütiges Schwimmen in 4° C kaltem Wasser (CWS = Cold water swim) zur peripheren Opioid-vermittelten Antinozizeption <sup>16</sup>. Periphere Opioidrezeptoren werden in den Hinterwurzelganglien exprimiert und durch axonalen Transport in die sensorischen Nervenendigungen von afferenten, nozizeptiven Nervenfasern transportiert. Die peripheren MOR ( $\mu$ -Opioidrezeptoren) entsprechen in ihrem Molekulargewicht und ihrer Funktion denjenigen im Zentralnervensystem <sup>18, 19</sup>. *In vivo* Studien zeigten, dass peripher injizierte Opioidrezeptoragonisten wie Fentanyl antinozizeptiv

wirksam sind<sup>2</sup>. Auch auf Leukozyten lassen sich Opioidrezeptoren nachweisen. Allerdings ist deren Bedeutung für die Schmerzkontrolle ungeklärt<sup>20</sup>.

Unter Entzündungsbedingungen nimmt die Zahl der peripheren Opioidrezeptoren zu<sup>18, 19, 21, 22</sup>. Zudem bildet das Perineurium eine Diffusionsbarriere für Opioidpeptide. Diese Barriere ist unter Entzündungsbedingungen gestört, so dass Opioide und Opioidpeptide an die peripheren Opioidrezeptoren binden können<sup>23</sup>.

Die periphere Opioid-vermittelte Analgesie lässt sich auch in Untersuchungen am Menschen nachweisen: Nach Kniegelenksarthroskopen führt die intraartikuläre Gabe von Morphin zu einer signifikant verbesserten Analgesie<sup>24</sup> und zu einer Abnahme der Schmerzen von Patienten mit chronischer Arthritis<sup>25</sup>. Auch endogene Opioidpeptide tragen zur Hemmung postoperativer Schmerzen bei. Die intraartikuläre, nicht aber die systemische Injektion des Opioidrezeptorantagonisten Naloxon in niedriger Dosierung führt zu einer Blockade von peripheren Opioidrezeptoren und zu einer signifikanten Zunahme der postoperativen Schmerzen und des Analgetikaverbrauches. In Gewebeschnitten des Synovialgewebes der Patienten lassen sich Endorphin-haltige Leukozyten nachweisen, so dass die Naloxon-induzierte Schmerzzunahme wahrscheinlich durch Stress-induzierte Sekretion von Opioidpeptiden vermittelt ist<sup>26</sup>.

### 1.1.3. Monozyten/Makrophagen

Im zirkulierenden Blut der Wistar-Ratte sind 5 - 10 % der Leukozyten Monozyten/Makrophagen<sup>27</sup>. Unter physiologischen Bedingungen verlässt etwa die Hälfte der zirkulierenden Monozyten jeden Tag die Blutbahn und migriert ins Gewebe, wo sie sich zu Makrophagen differenzieren. Makrophagen finden sich als alveoläre Makrophagen in der Lunge, als peritoneale Makrophagen in der Bauchhöhle, als Kupffer-Sternzellen in der Leber und als Gewebemakrophagen im Subkutangewebe<sup>28</sup>. Im Rahmen einer Entzündung werden Monozyten in das betroffene Gewebe rekrutiert. Gleichzeitig ist der Zellzyklus der Promonozyten im Vergleich zu physiologischen Bedingungen verkürzt, so dass in den ersten 48 h etwa 60 % mehr Monozyten zur Verfügung gestellt werden als unter Kontrollbedingungen<sup>29</sup>. Die Monozytenmigration wird von verschiedenen Chemokinen gesteuert<sup>30, 31</sup>. Um die Rolle der Monozyten/Makrophagen in der peripheren Opioid-

vermittelten Antinozizeption zu charakterisieren, sollte diese Zellpopulation depletiert werden. Depletionsstrategien wie die Anwendung von Silicatelchen, Carrageenan oder Antisera, wie sie zur Depletion von Granulozyten üblich sind, haben sich zur Depletion von Monozyten/Makrophagen als nicht ausreichend effizient und/oder als unselektiv erwiesen <sup>32</sup>. Die Depletion mittels Clodronat-haltiger Liposomen hat sich in verschiedenen Modellen und Spezies als effizient und selektiv erwiesen <sup>33</sup>.

## **1.2. Problemstellung**

In einer vorangegangenen Arbeit wurde gezeigt, dass mit zunehmender Zeitdauer einer durch Freund's Complete Adjuvant (FCA)-induzierten lokalen Entzündung sowohl die Anzahl Opioidpeptid-haltiger Leukozyten als auch die periphere, Stress-induzierte, Opioid-vermittelte Antinozizeption parallel ansteigen. Während in der frühen Entzündung (2 h nach FCA-Injektion) die polymorphnukleären Granulozyten die größte Leukozytensubpopulation darstellten, waren dies zu späten Zeitpunkten (96 h nach FCA-Injektion) die Monozyten/Makrophagen <sup>8</sup>. Die kausale Bedeutung der jeweiligen Leukozytensubpopulation für die periphere, Stress-induzierte, Opioid-vermittelte Antinozizeption wurde jedoch nicht untersucht.

Hieraus leitet sich die Hypothese dieser Dissertation ab:

Monozyten/Makrophagen sind für die periphere Opioid-vermittelte Antinozizeption in der späten Phase einer FCA-induzierten Entzündung verantwortlich.

Zur Verifizierung der Hypothese wurden folgende Fragen untersucht:

Zu welchem Zeitpunkt sind Monozyten/Makrophagen im entzündeten Gewebe vorhanden?

Welcher Anteil der Monozyten/Makrophagen enthält Opioidpeptide?

Lassen sich Monozyten/Makrophagen und Opioidpeptid-haltige Leukozyten im Gewebe selektiv und effizient depletieren?

Welchen Einfluss hat die Depletion von Monozyten/Makrophagen auf die periphere Opioid-vermittelte Antinozizeption?