

Aus der Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative  
Intensivmedizin  
Campus Virchow Klinikum  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Mechanismen reduzierter Ansprechbarkeit auf Opioid-  
Analgetika bei diabetischer Neuropathie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jens Ulf Winkler

aus Wittlich

Datum der Promotion: 09.09.2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b> .....	<b>4</b>
1.1	Einleitung .....	4
1.2	Methodik.....	4
1.3	Ergebnisse .....	4
1.4	Schlussfolgerung .....	5
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>6</b>
2.1	Introduction .....	6
2.2	Methods.....	6
2.3	Results .....	6
2.4	Conclusion .....	7
<b>3</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>8</b>
<b>4</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
4.1	Periphere diabetische Neuropathie .....	9
4.2	Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie.....	12
4.3	$\mu$ -Opioidrezeptoren und deren Phosphorylierung bzw. Desensitivierung	14
4.4	Advanced glycation end products und Proteinkinase C-Aktivierung.....	16
4.5	Aminoguanidin bei diabetischer Neuropathie .....	17
4.6	Fragestellung .....	19
<b>5</b>	<b>Materialien und Methoden</b> .....	<b>20</b>
<b>5.1</b>	<b>Materialien</b> .....	<b>20</b>
5.1.1	Substanzen .....	20
5.1.1.1	Antisera .....	20
5.1.1.2	Chemikalien.....	20
5.1.1.3	Medikamente.....	22
5.1.2	Lösungen .....	22
5.1.3	Geräte.....	23
5.1.4	Software.....	23
5.1.4.1	sonstige Materialien .....	25
<b>5.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>26</b>
5.2.1	Verhaltensversuche .....	26
5.2.1.1	Versuchstiere .....	26
5.2.1.2	Diabetes-Induktion mit Streptozotocin.....	26
5.2.1.3	Handling .....	27
5.2.1.4	Messung der Blutglukosekonzentration.....	27
5.2.1.5	Gewichtsmessung .....	28

5.2.1.6	Messung der Pfoten-Druckschmerzschwelle mit dem Algesiometer ...	28
5.2.1.7	Narkose und Fentanyl-Injektion .....	29
5.2.1.8	Messung der DSS-Ausgangswerte .....	29
5.2.1.9	Naloxon-Behandlung .....	29
5.2.1.10	Aminoguanidin-Behandlung.....	30
5.2.2	[ <sup>3</sup> H]DAMGO- und [ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien .....	31
5.2.2.1	Gewebeaufbereitung .....	31
5.2.2.2	Proteingehalt-Bestimmung der Membransuspension .....	31
5.2.2.3	[ <sup>3</sup> H]DAMGO-Ligandenbindungsstudie an $\mu$ -Opioidrezeptoren .....	31
5.2.2.4	[ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudie an $\mu$ -Opioidrezeptoren.....	32
5.2.3	Quantitative real time Polymerase-Kettenreaktion .....	33
5.2.3.1	Gewebeentnahme .....	33
5.2.3.2	Durchföhrung der Poymerase-Kettenreaktion .....	33
5.2.4	Western Blot .....	34
5.2.4.1	Gewebeentnahme .....	34
5.2.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	34
5.2.4.3	Western Blot-Durchföhrung .....	34
5.2.5	Immunhistochemie.....	35
5.2.5.1	Gewebeentnahme .....	35
5.2.5.2	Anfärbung der Schnitte mit spezifischen Antikörpern .....	35
5.2.5.3	Auswertung der immunhistologischen Schnitte .....	35
5.2.6	Statistik .....	37
<b>6</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
<b>6.1</b>	<b>Kennzeichen eines Diabetes mellitus</b> .....	<b>38</b>
6.1.1	Erhöhte Blutglukosekonzentration .....	38
6.1.2	Vermehrte mechanische Schmerzsensitivität .....	40
<b>6.2</b>	<b>Verminderte Ansprechbarkeit auf Opioidanalgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie</b> .....	<b>42</b>
6.2.1	Vergleich zwischen lokalem und systemischem Effekt nach subcutaner Injektion aufsteigender Fentanyl-Dosierungen .....	42
6.2.2	Antagonisierung der analgetischen Wirkung durch Naloxon.....	44
6.2.3	Vergleich der Opioid-bedingten Analgesie zwischen diabetischen Tieren und nicht-diabetischen Kontrolltieren .....	46
<b>6.3</b>	<b>Quantitative Messung der <math>\mu</math>-Opioidrezeptoren in der Frühphase</b> .....	<b>48</b>
6.3.1	Nachweis des $\mu$ -Opioidrezeptor-Proteins in Spinalganglien mittels Western Blot-Analyse .....	48
6.3.2	Nachweis der $\mu$ -Opioidrezeptoren in Spinalganglien .....	50
<b>6.4</b>	<b>Opioid-Bindung und Signalübertragung am <math>\mu</math>-Opioidrezeptor</b> .....	<b>52</b>

6.4.1	Nachweis der $\mu$ -Opioidrezeptor-Bindungsstellen .....	52
6.4.2	Analyse der G-Proteinkopplung an $\mu$ -Opioidrezeptoren.....	53
<b>6.5</b>	<b>Phosphorylierung der <math>\mu</math>-Opioidrezeptoren in der Frühphase .....</b>	<b>54</b>
6.5.1	Quantitativer Nachweis phosphorylierter $\mu$ -Opioidrezeptor-Proteine in der Western Blot-Analyse .....	54
6.5.2	Immunhistochemischer Nachweis phosphorylierter $\mu$ -Opioidrezeptoren ...	56
<b>6.6</b>	<b>Aktivierung der Proteinkinase C in der Frühphase .....</b>	<b>58</b>
6.6.1	Proteinkinase C-mRNA-Nachweis .....	58
6.6.2	Quantitativer Nachweis der Proteinkinase C-Proteine alpha und gamma..	60
6.6.3	Immunhistochemischer Nachweis von Proteinkinase C alpha in Spinalganglien .....	62
<b>6.7</b>	<b>Auswirkungen der Aminoguanidin-Behandlung .....</b>	<b>64</b>
6.7.1	Einfluss auf die Signalübertragung am $\mu$ -Opioid-Rezeptor .....	64
6.7.2	Einfluss auf die Anzahl phosphorylierter $\mu$ -Opioidrezeptoren .....	65
6.7.3	Einfluss auf die verminderte periphere Opioid-Ansprechbarkeit .....	67
<b>7</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>68</b>
7.1	Darstellung der Hauptergebnisse .....	68
7.2	Verlust der Ansprechbarkeit auf peripher wirksame Opioid-Analgetika ...	69
7.3	Verminderte Ansprechbarkeit peripher wirksamer Opioid-Analgetika .....	72
7.4	Verminderte G-Proteinkopplung am $\mu$ -Opioidrezeptor .....	74
7.5	Gesteigerte Anzahl phosphorylierter $\mu$ -Opioidrezeptoren.....	77
7.6	Vermehrte Expression der Proteinkinase C als mögliche Ursache der vermehrten Phosphorylierung von $\mu$ -Opioidrezeptoren.....	80
7.7	Einfluss der Aminoguanidin-Behandlung .....	85
7.8	Zusammenfassung.....	89
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>91</b>
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>99</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>101</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>102</b>

# **1 Abstrakt**

## **1.1 Einleitung**

Im Rahmen einer diabetischen Neuropathie kommt es zum Verlust der analgetischen Wirksamkeit von Opioid-Analgetika. Unklar sind bisher die genauen zugrunde liegenden Mechanismen. In der aktuellen Literatur ist unter anderem ein vermehrter lysosomaler Abbau von  $\mu$ -Opioidrezeptoren (MOR) bei der späten diabetischen Neuropathie beschrieben. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den Mechanismen der reduzierten Ansprechbarkeit von Opioiden in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, 4 Wochen nach Diabetes-Induktion, und untersucht eine mögliche Interventionsmöglichkeit mit Aminoguanidin als Synthese-Hemmer der advanced glycation end products (AGE).

## **1.2 Methodik**

Ein experimenteller Diabetes mellitus wurde durch die i.v.-Applikation von 45 mg/kg KG Streptozotocin in männlichen Wistar-Ratten erzeugt. Nach 4 Wochen wurden Verhaltensversuche zur Messung der Sensitivität auf mechanische Druckreize vor und nach Applikation des  $\mu$ -Agonisten Fentanyl durchgeführt. Zusätzlich wurden immunhistochemische Analysen von Neuronen der spinalen Hinterwurzelganglien mittels spezifischer Antikörper gegen den phosphorylierten und nicht-phosphorylierten Zustand von  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren durchgeführt, sowie Untersuchungen der Expression einzelner Isoformen der Proteinkinase C (PKC) in Western Blot-Analysen und real time Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Des Weiteren wurde der Einfluss einer gleichzeitigen Aminoguanidin-Behandlung diabetischer Tiere untersucht.

## **1.3 Ergebnisse**

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen den Verlust der analgetischen Wirksamkeit des  $\mu$ -Agonisten Fentanyl in der Frühphase (nach 4 Wochen) eines Streptozotocin (STZ)-induzierten Diabetes mellitus. In dieser Phase gibt es keine

quantitative Veränderung in der Anzahl an MOR auf peripher sensorischen Neuronen. Jedoch zeigt sich eine signifikante Zunahme im Ausmaß der Phosphorylierung und damit der Desensitivierung dieser MOR. Infolgedessen kommt es zu einer signifikant reduzierten G-Protein-Kopplung. Als mögliche Ursache der vermehrten MOR-Phosphorylierung zeigte sich eine erhöhte PKC-Expression und -Aktivität peripher sensorischer Neurone. Die Inhibition der PKC-Aktivität führte zu einer Verhinderung der MOR-Phosphorylierung mit konsekutiv gesteigerter G-Protein-Bindung am MOR sowie einer gesteigerten Ansprechbarkeit auf den  $\mu$ -Agonisten Fentanyl in Verhaltensversuchen. Eine mögliche Ursache für die Diabetes-induzierte, vermehrte PKC-Expression und -Aktivität könnte der vermehrte Anfall an AGE sein. Tatsächlich zeigten erste Ergebnisse, dass mit einer Aminoguanidinbehandlung, die bekanntermaßen die Bildung von AGE verhindert, die PKC-Aktivierung sowie letztendlich die MOR-Phosphorylierung aufgehoben werden konnte.

#### **1.4 Schlussfolgerung**

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verringerte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie vor allem durch eine vermehrte Anzahl phosphorylierter und daher desensitiverter MOR bedingt ist. Die erhöhte Expression der PKC-Isoformen als wahrscheinliche Ursache der MOR-Phosphorylierung, sowie deren Reversibilität mit konsekutiver Verbesserung der Opioidansprechbarkeit durch die gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin unterstreichen die These, dass eine mögliche Hauptursache in der vermehrten Akkumulation von AGE zu suchen ist.

## **2 Abstract**

### **2.1 Introduction**

Diabetic neuropathy commonly leads to a loss in analgesic efficacy of opioids. The mechanisms behind this phenomenon are still unclear. In the current literature on late-stage diabetic neuropathy an increased lysosomal degradation of  $\mu$ -opioid receptors is described as a possible cause. This project investigates the mechanisms behind the reduced responsiveness of opioids during the early phase of diabetic neuropathy, e.g. at four weeks after induction of diabetes. Additionally, it examines a possible intervention consisting of aminoguanidine as a synthesis inhibitor of advanced glycation end products.

### **2.2 Methods**

Diabetes mellitus was induced in male Wistar rats through the intravenous application of 45 mg/kg BW streptozotocin destroying pancreatic  $\beta$ -cells. After four weeks, behavioral experiments were carried out to measure sensitivity towards mechanical stimuli before and after application of the  $\mu$ -agonist fentanyl. Additionally, immunohistochemical analyses of neurons in spinal dorsal root ganglions were conducted by employing specific antibodies targeted at both the phosphorylated and non-phosphorylated forms of  $\mu$ -opioid receptors. In addition, the expression of individual isoforms of protein kinase C were studied by Western Blot and real time PCR. Furthermore, the influence of a concurrent aminoguanidine treatment on diabetes-induced alterations of the opioid system was investigated.

### **2.3 Results**

The main results of this doctoral thesis reveal the impaired analgesic efficacy of  $\mu$ -agonists, such as fentanyl, during the early phase (after four weeks) of STZ-induced Diabetes mellitus. During this phase, there are no quantitative changes in the number of  $\mu$ -opioid receptors (MOR) on peripheral sensory neurons. However, a significant increase in MOR phosphorylation became apparent, leading to a desensitization of

these MOR. As a result, there is a substantial reduction in G protein coupling. A possible cause of the observed increase in MOR phosphorylation may be the elevated expression and activity of protein kinase C (PKC) in peripheral sensory neurons. The inhibition of PKC activity led to a hindering of MOR phosphorylation alongside a consecutive increase in G protein coupling, as well as an increased responsiveness to  $\mu$ -agonists, such as fentanyl, during behavioral experiments. A possible explanation for the diabetes-induced increase in PKC expression and activity may be the augmented amount of advanced glycation end products (AGE). Indeed, preliminary results indicated that an aminoguanidine treatment - already known to hinder the production of AGE - could reverse PKC activity as well as MOR phosphorylation.

## **2.4 Conclusion**

These results suggest that the reduced responsiveness to opioid analgesics in the early phases of diabetic neuropathy is caused by an increased number of phosphorylated and, thus, desensitized MOR. The increased expression of PKC isoforms as a probable cause of enhanced MOR phosphorylation as well as its reversibility alongside subsequent improvement in opioid responsiveness through a simultaneous aminoguanidine treatment underlines the hypothesis the increased accumulation of AGE may be a possible leading cause of this phenomenon.



### 3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGE	advanced glycation end products
DOR	$\delta$ -Opioidrezeptoren
DRG	dorsal root ganglion (Hinterwurzelganglien)
DSS	(Pforten-) Druckschmerzschwelle
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (G protein coupled receptors)
MOR	$\mu$ -Opioidrezeptoren
pMOR	phosphorylierte $\mu$ -Opioidrezeptoren
MW	Mittelwert
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PKC	Proteinkinase C
RAGE	receptor for advanced glycation end products
SEM	standard error of the mean (Standardabweichung des Mittelwertes)
SNRI	Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
Stabw	Standardabweichung
STZ	Streptozotocin
TGF	transforming growth factor
VEGF	vascular endothelial growth factor

## 4 Einleitung

### 4.1 Periphere diabetische Neuropathie

Entsprechend der Nationalen Versorgungsleitlinie „Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter“ der Deutschen Diabetes Gesellschaft (Stand 01/2015) wird die diabetische Neuropathie wie folgt definiert:

„Die diabetische periphere Neuropathie umfasst heterogene Erkrankungen mit unterschiedlicher klinischer Manifestation, die verschiedene Regionen des peripheren und des autonomen Nervensystems betreffen können. Diabetische Neuropathien lassen sich in sensomotorische diabetische Polyneuropathien und autonome diabetische Neuropathien einteilen.“

Die Einteilung der Manifestationstypen der diabetischen Neuropathie erfolgt nach klinischen Kriterien. Die von Thomas und Tomlinson [1] vorgeschlagene Einteilung hat sich im klinischen Alltag bewährt. Nach Thomas und Tomlinson zählt die schmerzhafte periphere diabetische Neuropathie zu den symmetrischen Neuropathien, da meist zwar untere und obere Extremität in unterschiedlichem Ausmaß, jedoch in der Regel symmetrisch betroffen sind.

Die Prävalenzen der diabetischen Neuropathie schwanken hierbei zwischen 8–54% beim Typ-1-Diabetes und 13–46% beim Typ-2-Diabetes [Nationale Versorgungsleitlinie „Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter“ der Deutschen Diabetes Gesellschaft (Stand 01/2015)].

Die Symptome folgen einem zeitlichen Ablauf, nach dem die Einteilung in eine frühe Phase mit Positiv-Symptomatik (v. a. Schmerz, Hypersensitivität, Krämpfe) und eine späte Phase mit Minus-Symptomatik im Zuge eines Funktionsverlustes (v.a. Verlust der sensorischen Wahrnehmung, verzögerte Wundheilung) erfolgt [2]. Hierbei können die Symptome aber auch überlappend auftreten. Bis zu 50% der betroffenen Patienten leiden in der Frühphase der diabetischen Neuropathie unter schmerzhaften Symptomen, insbesondere brennenden, elektrisierenden, einschießenden Schmerzen, Parästhesien, Hyperästhesien sowie tiefen, dumpfen Schmerzen [3].

Auch wenn die Forschung in den vergangenen Jahren aufgrund der hohen Prävalenz von geschätzt 8,5% in der Europäischen Union [4] viele neue Aspekte bezüglich der Pathogenese aufgezeigt hat, (u. a. Veränderungen in Verteilung und Expression von

Natrium- und Calcium-Kanälen, reduzierte Neuropeptid-Expression, verminderter peripherer Blutfluss, axonale Atrophie und Blutglukose-Fluss) [5] ist die exakte Pathogenese bis heute nur unvollständig geklärt.

Eine zentrale Rolle in der Pathogenese scheint insbesondere die diabetische Mikroangiopathie zu spielen. Über den reduzierten nervalen Blutfluss kommt es zu einer reduzierten Versorgung der Vasa nervorum der spezifische Veränderungen bewirkt [6]. In Experimenten mit diabetischen Tieren konnte gezeigt werden, dass ähnliche metabolische Spätfolgen auf Neuronen des peripheren Nervensystems wie auch auf das Endothel der Vasa nervorum einwirken. Diese Mechanismen implizieren vor allem eine erhöhte Aktivität im Polyol-Signalweg, oxidativen Stress, die Formation von Advanced glycation- und lipoxidation end products sowie zahlreiche pro-inflammatorische Veränderungen wie eine erhöhte PKC-, NF- $\kappa$ B- und p38-mitogenaktivierte Proteinkinase-Aktivität [7].

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der endogen reaktive Metabolit Methylglyoxal bei diabetischer Neuropathie über post-translationale Modifikationen neuronaler Ionenkanäle, die am Chemosensing und der Generierung von Aktionspotentialen in nozizeptiven Nervenendigungen beteiligt sind, zu einer Überfunktion führen kann. Dicarbonyle sowie Methylglyoxal, deren Konzentration bei Diabetikern erhöht ist, können die DNA modifizieren und führen zur Formation von AGE, die zu zellulärem Stress, zellulärer Dysfunktion und Zelltod oder über Zelloberflächen-Rezeptoren wie den „receptor for advanced glycation end products“ (RAGE) zu einer vermehrten Zellaktivität und anhaltenden inflammatorischen Antwort führen [2].

Aufgrund der Komplexität, wie auch aufgrund der noch ungeklärten Pathogenese, ist auch die Therapie neuropathischer Schmerzen komplex und führt bislang in vielen Fällen nur zu einer unzureichenden Schmerzlinderung. Da der neuropathische Schmerz den gängigen Analgetika nach dem WHO-Stufenschema im Rahmen der Schmerztherapie oft schlecht zugänglich ist, sind in den vergangenen Jahren vor allem Co-Analgetika in den Vordergrund gerückt, insbesondere trizyklische Antidepressiva (u. a. Amitryptilin, Doxepin, Clomipramin) und Antikonvulsiva (u. a. Carbamazepin, Gabapentin, Pregabalin). Auch lokal-applizierte Substanzen wie Capsaicin oder Lokalanästhetika kommen zum Einsatz [8].

Mittel der Wahl sind hier insbesondere die trizyklischen Antidepressiva, Gabapentin, Pregabalin und Serotonin-Noradrenalin Reuptake-Inhibitoren (SNRIs). Oft ist aufgrund

der unzureichenden Schmerzlinderung in der Monotherapie jedoch eine Kombinationstherapie mit den daraus resultierenden und oft auch Therapie-limitierenden Nebenwirkungen erforderlich (abhängig von der verwendeten Substanzklasse v. a. Mundtrockenheit, Übelkeit, Obstipation, orthostatische Hypotension, Sedierung).

Opioid-Analgetika, als potenteste uns bekannte Analgetika, sind stärksten Schmerzen vorbehalten und in der Therapie neuropathischer Schmerzen second-line Therapie. Ein Grund hierfür ist sicherlich in der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei neuropathischen Schmerzen zu sehen. Die verminderte Ansprechbarkeit hat in der Praxis insbesondere hohe Dosierungen zur Folge, um den gewünschten Effekt zu erreichen. Die verminderte Wirksamkeit konnte in Tierexperimenten anhand des etablierten STZ-Modells zur Untersuchung von neuropathischen Schmerzen bei diabetischen Tieren mehrfach nachgewiesen werden. So konnten Malcangio und Tomlinson 1998 nachweisen, dass 8 Wochen nach Diabetes-Induktion, die doppelte Dosis Morphin verabreicht werden musste, um den gleichen antinozizeptiven Effekt, wie er in der nicht-diabetischen Kontrollgruppe auftrat, zu bewirken [[9]; s.a. 4.2.1.].

Aufgrund der hohen Dosierungen treten unerwünschte Nebenwirkungen, insbesondere in der Langzeittherapie, in den Vordergrund. Zu nennen sind hier Sedierung, eingeschränkte kognitive Leistungsfähigkeit, Übelkeit, Erbrechen, Obstipation, Harnverhalt und zentrale Atemdepression. Nicht selten sind diese Nebenwirkungen in der Therapie neuropathischer Schmerzen Therapie-limitierend.

Unter pharmakologischer Therapie kann trotz der Vielzahl der zur Verfügung stehenden Substanzen in therapeutischer Dosierung lediglich eine mittlere Schmerzreduktion von 20–30 % erreicht werden [10]. Um eine adäquate Schmerztherapie zu gewährleisten ist es daher essentiell, die molekularen Mechanismen zu erforschen, die die periphere diabetische Neuropathie der gängigen konservativen Schmerztherapie so schwer zugänglich machen. Insbesondere der zukünftige Einsatz stärkster Schmerzmittel in Dosierungen mit möglichst wenigen unerwünschten Wirkungen wäre wünschenswert.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen, die einer verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika zugrunde liegen könnten.

## 4.2 Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie

Die verminderte Ansprechbarkeit von Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie ist mit einer deutlichen Zunahme der Prävalenz, insbesondere des Typ-2-Diabetes, in den westlichen Industrieländern seit Beginn der 80er Jahre in den Vordergrund gerückt. Hierdurch haben sich natürlich auch neue Herausforderungen an eine suffiziente Schmerztherapie entwickelt.

Anhand von verschiedenen Verhaltenstests der Nozizeption konnte eine reduzierte analgetische Wirksamkeit von Opioid-Analgetika nach STZ-induziertem Diabetes mellitus festgestellt werden.

So wurde bereits 1981 von der Forschergruppe um Simon ein reduzierter Morphin-Effekt bei diabetischen Mäusen im Tail-flick-test beschrieben [11]. Es mussten deutlich höhere Morphin-Dosierungen verabreicht werden, um den gleichen analgetischen Effekt in der STZ-Gruppe im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe zu erreichen [12]. Man ging davon aus, dass die Reduktion der Morphin-Wirksamkeit direkt mit den erhöhten Blutglukose-Werten in Verbindung stand. 1992 zeigte die Forschergruppe um Kamei, dass ein STZ-induzierter Diabetes vor allem die Potenz der Agonisten am MOR, nicht jedoch am  $\delta$ - und  $\kappa$ -Rezeptor, verändert [13].

Die Ergebnisse konnte in den folgenden Jahren mehrfach reproduziert werden. So war auch der antinozizeptive Effekt des intrathekal applizierten, reinen  $\mu$ -Agonisten Fentanyl bei diabetischen Tieren im Vergleich zur nicht diabetischen Kontrollgruppe deutlich reduziert [14].

Im Zuge einer weiteren Studie zeigten Courteix et al. 1998, dass der antinozizeptive Effekt von intravenös appliziertem Morphin bei diabetischen Tieren deutlich reduziert war. Dies war nicht durch Veränderungen in der Bindungsaffinität von Morphin und dessen Metaboliten am MOR verursacht, sodass eine reduzierte Quantität membranständiger MOR im zentralen Nervensystem als eine mögliche Ursache des verminderten Effektes ausgeschlossen werden konnte [15].

Die Gruppe um Chen konnte ähnliche Ergebnisse 2003 auch für Neurone des peripheren Nervensystems zeigen. Auch hier konnte keine Veränderung in der Bindungsaffinität von Morphin am MOR und damit auch keine quantitative Veränderung von MOR bei diabetischen Tieren im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe festgestellt werden [16].

Da es sich bei der schmerzhaften diabetischen Neuropathie um eine Erkrankung des peripheren Nervensystems handelt, legten diese Forschungsergebnisse nahe, dass bei unveränderter Liganden-Bindung am MOR und unveränderter Anzahl an MOR die Ursachen für eine verminderte Wirksamkeit in der Frühphase der diabetischen Neuropathie in einer gestörten Signalübertragung am MOR oder weiterführenden intrazellulären Mechanismen zu suchen sind. Von Chen und Pan wurde der Verdacht auf eine verminderte G-Protein-Kopplung am MOR bereits 2003 geäußert [16].

### 4.3 $\mu$ -Opioidrezeptoren und deren Phosphorylierung bzw. Desensitivierung

Der MOR gehört biologisch zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (G protein-coupled receptor, GPCR). Sie sind im Wesentlichen in einer 7 Helices umfassenden Struktur, welche die Zellmembran durchzieht, aufgebaut. Dabei besteht der Rezeptor aus insgesamt 3 Domänen. Die extrazelluläre Domäne übernimmt die Funktion der Ligandenbindung am GPCR. Die Transmembrandomäne dient vor allem der Verankerung der Helix-Struktur in der Zellmembran. Die intrazelluläre Domäne ist letztlich für die Signalverarbeitung und -weiterleitung verantwortlich.

An der intrazellulären Domäne befindet sich beim MOR nach Ligandenbindung das aus 3 Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) bestehende G-Protein. Durch die Bindung von GDP an der  $\alpha$ -Untereinheit ist das G-Protein inaktiv.

Durch Ligandenbindung (z.B. Morphin) an der extrazellulären Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Durch diese Konformationsänderung wird der Rezeptor befähigt, als GTP-Austauschfaktor (GTP exchange factor, GEF) zu fungieren. Hierdurch kann sich freies GTP an die  $\alpha$ -Untereinheit anlagern im Austausch mit GDP. Der Austausch führt zu einer Abspaltung der nun an GTP-gebundenen  $\alpha$ -Untereinheit von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit. Sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit können nun an second messenger-Moleküle binden und die Signalübertragung ins Zellinnere fortsetzen.

Im Zuge einer Selbstregulierung wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit GTP in GDP und Pi gespalten. Die wieder an GDP-gebundene  $\alpha$ -Untereinheit kann somit wieder an die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit binden. Der Rezeptor wird wieder in den inaktiven Zustand versetzt [17].

Durch verschiedene Mechanismen kann die Aktivität des Rezeptors beeinflusst werden. Insbesondere die Mechanismen, die zu einer Inaktivierung/Desensibilisierung des Rezeptors führen, sind noch nicht gänzlich verstanden. Eine weit verbreitete Theorie ist die Desensibilisierung durch Phosphorylierung, u. a. durch Proteinkinasen. So können u. a. die Proteinkinasen A und C durch Phosphorylierung spezifischer Bereiche der intrazellulären Domäne zu einer reduzierten G-Protein-Interaktion führen und die Rezeptor-Aktivität blockieren [18].

Die Phosphorylierung spezifischer Anteile des MOR durch Proteinkinasen ist jedoch nicht spezifisch für exogene Opioide. So spielt die Tyrosin-Phosphorylierung eine

entscheidende Rolle in der Regulierung auch der Wirksamkeit intrinsischer MOR-Agonisten [19].

Das Wissen um eine mögliche Beteiligung der MOR-Phosphorylierung durch Proteinkinasen und konsekutiver Rezeptor-Inaktivität und damit verminderter Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie eröffnet somit auch die Möglichkeit diverser Interventionen in die ablaufenden Mechanismen.



#### 4.4 Advanced glycation end products und Proteinkinase C-Aktivierung

Die Formierung von Advanced glycation endproducts durch die hohen Blutglukose-Konzentrationen beim Diabetes mellitus als eine mögliche Ursache der Diabetes-induzierten mikrovaskulären Schäden ist seit Anfang der 1990er Jahre verstärkt Gegenstand der Diabetes-Forschung. Die in der Literatur auffindbaren Veränderungen sind vielfältig. So zeigten zunächst vor allem in vitro-Untersuchungen durch AGE induzierte quantitative Veränderungen der extrazellulären Matrix (u. a. Kollagen, Laminin und Vitronectin) als eine mögliche Ursache lokaler Vasokonstriktion und Thrombosen [20]. Auch werden pathophysiologische Modifikationen nicht nur von Proteinen, sondern auch von Lipiden und der DNA beschrieben [[21]; [22]]. Die AGE agieren über einen spezifischen Rezeptor, den RAGE. Hierüber kommt es unter anderem auch zu einer Aktivierung von Monozyten und Endothelzellen, die wiederum Zytokine produzieren und die Expression von Adhensionsmolekülen und tissue growth factor (TGF) begünstigen mit den entsprechenden mikrovaskulären Komplikationen [23].

Hierbei korrelieren die Serumlevel der AGEs mit den vaskulären Komplikationen [24]. So wird die vermehrte Formation von AGEs unter anderem für die Ausbildung der diabetischen Nephropathie verantwortlich gemacht [25].

2008 konnten Toth et al. an einem experimentellen STZ-Modell mit diabetischen Mäusen zeigen, dass die RAGE-Protein- und mRNA-Level in Hinterwurzelganglien, (dorsal root ganglia, DRG) wie auch in Schwann-Zellen und den Axonen des nervus suralis diabetischer Mäuse deutlich erhöht waren. Konsekutiv kam es auch zu einer vermehrten Expression von NF-kappaB und Aktivierung der PKC. Es resultierten elektrophysiologische und strukturelle Abnormalitäten in den untersuchten neuralen Geweben [26].

#### 4.5 Aminoguanidin bei diabetischer Neuropathie

Mit der vermehrten Erforschung der AGE-Wirkung traten auch spezifische Inhibitoren der AGE-Formation wie Aminoguanidin in den Fokus experimenteller und klinischer Versuche. Bereits 1992 wurde eine mögliche protektive Wirkung bei der Ausbildung der diabetischen Komplikationen wie der diabetischen Neuropathie, der diabetischen Nephropathie und der diabetischen Retinopathie beschrieben [20].

In vitro-Experimente wie auch experimentelle Studien mit STZ-induziertem Diabetes mit Aminoguanidin sind vornehmlich für die diabetische Nephropathie zu finden. So konnte eine gleichzeitige Aminoguanidin-Behandlung die nach Diabetes-Induktion aufgetretene Albuminurie und mesangiale Proliferation reduzieren [27]. Die renalen AGE-Level diabetischer Ratten konnten durch die Aminoguanidin-Behandlung signifikant gesenkt werden [28]. Die vermehrte Bildung von vascular endothelial growth factor (VEGF) im Nierenkortex bei diabetischen Tieren konnte durch eine Aminoguanidin-Behandlung ebenfalls reduziert werden [29].

Auch weitere experimentelle Studien konnten einen protektiven Effekt bei der Ausbildung der diabetischen Nephropathie zeigen [[30]; [31]].

Klinische Studien mit der Anwendung von Aminoguanidin in hohen Konzentrationen wurden wegen Sicherheitsbedenken und fehlender Wirksamkeit bereits frühzeitig abgebrochen [32]. Dies zeigt, dass der klinische Einsatz durchaus kritisch zu sehen ist, wenn auch die protektiven Wirkungen der Aminoguanidin-Behandlung in den bisherigen Studien vornehmlich in der Langzeitanwendung auftraten. 2015 konnte an embryonalen Nierenzellen in vitro durch die Behandlung mit Aminoguanidin eine Downregulation des RAGE und von TGF im Vergleich zur diabetischen Kontrollgruppe ohne Aminoguanidin-Behandlung erreicht werden [33].

Bezüglich der Entwicklung einer diabetischen Retinopathie konnten ebenfalls positive Ergebnisse durch die Behandlung diabetischer Ratten mit Aminoguanidin beobachtet werden. Es zeigte sich eine signifikant Reduktion azellulärer Kapillaren und Mikroaneurysmata [34]. Auch hier ist die klinische Anwendung bis dato noch nicht wirklich erprobt.

In Bezug auf die Ausbildung der diabetischen Neuropathie konnten bereits erste Wirkungen der Aminoguanidin-Behandlung festgestellt werden. So konnte die Behandlung mit Aminoguanidin bei diabetischen Ratten insbesondere den nervalen

Blutfluss im Vergleich zur diabetischen Kontrollgruppe ohne Aminoguanidin-Behandlung deutlich verbessern [[35]; [36]]. Die durch Diabetes-Induktion reduzierte Latenz somatosensorisch evozierter Potentiale konnte durch die Behandlung mit Aminoguanidin wiederhergestellt werden [37].

Eine Verbesserung der Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie ist bislang kaum beschrieben. Es konnten aber bereits positive Effekte auf die Toleranz-Entwicklung unter Opioid-Therapie bei Ratten gezeigt werden [38]. Da sowohl der Toleranz-Entwicklung wie auch den Mechanismen einer reduzierten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie möglicherweise ähnliche molekulare Mechanismen zugrunde liegen, ist hier dennoch ein möglicher protektiver Effekt wahrscheinlich.

Wie oben erwähnt, ist die klinische Anwendung bis dato noch nicht etabliert. Dies mag sicherlich auch an den wenigen Studien liegen, die letztlich keinen signifikanten Effekt durch eine Aminoguanidin-Behandlung zeigen konnten. So untersuchten Birrell et al. 2000 die Nervenleitgeschwindigkeit der nervus suralis diabetischer Paviane. Auch nach 3 Jahren Behandlung mit Aminoguanidin konnte kein signifikanter Effekt im Vergleich zur diabetischen Kontrollgruppe gefunden werden [39].

Der Weg zu einer klinischen Anwendung ist daher sicherlich noch nicht geebnet, trotz bislang vielversprechender Ergebnisse in der experimentellen Forschung.

## 4.6 Fragestellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Mechanismen der reduzierten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie zu untersuchen. Mit Hilfe des etablierten STZ-Modells zur Induktion eines Diabetes mellitus bei männlichen Wistar-Ratten (4 Wochen nach STZ-Injektion) soll anhand der Messung der Pfoten-Druckschmerzschwelle (DSS), zunächst die reduzierte Ansprechbarkeit des  $\mu$ -Agonisten Fentanyl aufgezeigt werden.

Außerdem wird in Neuronen des peripheren Nervensystems (Hinterwurzelganglien, DRGs) immunhistochemisch und in Western Blot-Analysen quantitativ die Anzahl der MOR in der Frühphase der diabetischen Neuropathie im Vergleich zu einer nicht-diabetischen Kontrollgruppe untersucht mit der Frage nach einem möglicherweise zugrunde liegenden Verlust an MOR.

Weiterhin sollen in einer [<sup>3</sup>H]DAMGO-Sättigungsbindungsstudie die MOR-Rezeptor-Bindungsstellen und in einer [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-G-Protein-Kopplungsstudie die G-Proteinaktivität am MOR untersucht werden und letztlich weiterführend quantitativ und in der Western Blot-Analyse die Anzahl phosphorylierter und damit inaktiver MOR im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe untersucht werden.

Mit einer quantitativen real time PCR wird das zeitliche Auftreten verschiedener PKC-Isoformen (PKC-mRNA-Messung) als eine mögliche Ursache für eine vermehrte MOR-Phosphorylierung untersucht. Außerdem erfolgt der quantitative Nachweis der PKC-Proteine in Spinalganglien mittels Western Blot-Analyse und im Speziellen der immunhistochemische Nachweis der Proteinkinase C alpha in den Spinalganglien diabetischer Tiere im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe.

Letztlich wird in einer Western Blot-Analyse untersucht, ob es durch die gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin, einem Inhibitor der Formation von advanced glycation end products, und konsekutiv verminderter PKC-Expression im Vergleich zur diabetischen Kontrollgruppe zu einer Reduktion phosphorylierter MOR in den Spinalganglien kommt und ob die Behandlung mit Aminoguanidin durch Messung der Pfoten-DSS einen Einfluss auf die reduzierte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie hat.

## 5 Materialien und Methoden

### 5.1 Materialien

#### 5.1.1 Substanzen

#### Herkunft

##### 5.1.1.1 Antisera

Kaninchen-anti-Ratte-MOR	Dres. Schulz und Höllt, Magdeburg, Deutschland
Kaninchen-anti-Ratte-Phospho MOR	Dres. Schulz und Höllt, Magdeburg, Deutschland
Maus-anti-Ratte-PKC (anti- PKC $\alpha$ , anti-PKC $\beta$ , anti-PKC $\gamma$ , anti- PKC $\epsilon$ )	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Ziegenserum (NGS)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Esenserum (NDS)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA

##### 5.1.1.2 Chemikalien

Bio- Rad- Reagens	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Blaugel	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland
Bromphenol blau	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
D-Ala <sub>2</sub> , N-MePhe <sub>4</sub> , Gly <sub>5</sub> -olemkaphalin (DAMGO) Aktivität: 56 Ci/mmol	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
D-Glucose	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland
D(+)-Saccharose	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe,

4-6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
First Strand cDNA Synthesis	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Gelatine aus Rinderhaut	Roche Deutschland Holding GmbH
Guanosin 5'-O-(3-thiotriphosphat) (GTP $\gamma$ S)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Guanosindiphosphat (GDP)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
High Pure RNA Isolation Kit (Nucleospin®)	Roche Deutschland Holding GmbH Mannheim, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Kaliumchromsulfat (CrK(SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Kittranscriptase	Roche, Mannheim, Deutschland
LightCycler® FastStart DNA Master SYBR® Green I	Roche, Mannheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH&Co., Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Methanol (CH <sub>3</sub> OH)	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Natrium-Citrat (HOC(COONa)(CH <sub>2</sub> COONa) <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Paraformaldehyde (PFA)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Pikrinsäure	Sigma Diagnostics, St. Louis, USA
Thimerosal	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Visualisierungslösung (Amersham™ ECL Plus)	GE Healthcare GmbH, München, Deutschland
X- ray Hyperfilm	GE Healthcare GmbH, München,

Deutschland

### 5.1.1.3 Medikamente

Isofluran (Forene®)	Abbot GmbH&Co.KG, Wiesbaden, Deutschland
Streptozotocin (Sigma®)	Sigma- Aldrich Inc., St. Louis, USA
Fentanyl- Citrat	Sigma- Aldrich Inc., St. Louis, USA
Natriumchlorid-Lösung 0,9%	B   Braun AG, Melsungen, Deutschland
Nadroparin- Calcium (Fraxiparin®)	1,0, 9.500 I.E./1ml Fertigspritze, GlaxoSmithKline GmbH & Co.KG, München, Deutschland
Aminoguanidin- hydrochlorid	Sigma- Aldrich Inc., St. Louis, USA

### 5.1.2 Lösungen

Bindungspuffer (50 mM Tris-HCL, 0,2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 4,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mMDTT), Blockierungslösung (15 ml PBS, 45 µl Triton X-100, 1 ml BSA, 1 ml NGS, 1 ml NDS), Fixierlösung (700 ml aqua bidest. 40 g PFA, 1 M Natriumhydroxidlösung 2 ml Pikrinsäure), PBS (700 ml aqua bidest., 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,28 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), RIPA- Pufferlösung (1x LysePuffer, 1x TBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% Natriumdeoxycholat, 0.1% SDS, 0.004% Natriumazid), Saccharoselösung (10 ml PBS, 1g Saccharose, 0,005 mg Thimerosal), Transferpufferlösung (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol), Tris/Glycine/SDS- Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin 0,04% SDS), Tris/HCl- Pufferlösung (50 mM Tris/HCl), Visualisierungslösung (ECL Plus™-Lösung, GE Healthcare GmbH, München, Deutschland), Waschpuffer (50 mM Tris-HCl)

### 5.1.3 Geräte

Algesiometer	Ugo Basile, Comerio, Italien
Flüssigkeitsszintillationszähler (1414)	PerkinElmer Wallac, Turku, Finnland
Gefrierschrank	GFL 6485 (-80°C) GFL mbH, Burgwedel, Deutschland
Gefrierschrank	Liebherr comfort (-18°C) Liebherr GmbH, Ochsenhausen, Deutschland
Heizplatte/Magnetrührer IKA RH basic	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Horizontalschüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland
Inkubator	Heraeus T12, Heraeus Instruments (37°C), Function line, Hanau, Deutschland
Isofluran-Vapor	Drägerwerk Lübeck
Konfokales Lasermikroskop	LSM 700, Carl- Zeiss MicroImaging GmbH, Jena, Deutschland
Kühlschrank Bosch economic cooler	Bosch AG, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Laborwasseraufbereiter Direct-Q™	Millipore, Eschborn, Deutschland
Microm HM 560	Microm GmbH, Walldorf, Deutschland
Mikroglasfilter (Whatman GF/C)	Whatman, Maidstone, England
pH-Meter Mettler Toledo MP 220	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Digitalwaage	Sartorius1501 MP8, Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Ultra-Turrax T8	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA

### 5.1.4 Software



Grafiken	Sigmaplot Version 12.5	SPSS Inc., USA
	GraphPad Prism, Version 4.03	GraphPad Software Inc., USA
	CorelDraw X3, Version 13.0.0.576	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Immunhistochemie	Zeiss LSM Image Browser 4.2.0.121	Carl-Zeiss MicroImaging, GmbH, Jena, Deutschland
Literaturverzeichnis	EndNote X7.4	Thomson Reuters, USA
Datenkatalogisierung	Microsoft Excel 2000	Microsoft Corporation, USA
Statistik	Sigmablot Version 12.5	SPSS Inc., USA
Textverarbeitung	Word 2000	Microsoft Corporation, USA
Western Blot	ImageJ 1.44	National Institutes of Health, Bethesda (Maryland), USA

#### 5.1.4.1 sonstige Materialien

Deckgläser 24x50mm	Menzel GmbH&Co. KG, Braunschweig, Deutschland
Einbettmedium Neg-50	Richard-Allan-Scientific, Kalamazoo, USA
Eppendorf - Pipetten	Eppendorf Reference®, Eppendorf- AG, Hamburg, Deutschland
Glukoflex- R Glucoseteststreifen	National Diagnostic Products Sydney, Australien
Käfigeinstreu (fein)	Jelu-Werk, Rosenberg, Deutschland
Kanülen	Sterican® 0,30 x 12 mm, 30G x ½ “ B   Braun AG, Melsungen, Deutschland
Kanülen	Sterican® Einmalkanülen 0,45 x 12 mm, 26 G x ½“, B   Braun AG, Melsungen, Deutschland
Makrolon-Käfig Typ IV	Tecniplast GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland
Objektträger 76x26mm	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Pippentenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen	BD Plastipak TM, 1ml
ssniff® Alleinfuttermittel	ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Vectashield Fixiermedium	Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA
Zellsieb 70µm Falcon™	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

## **5.2 Methoden**

### **5.2.1 Verhaltensversuche**

#### **5.2.1.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von 180-220 g aus eigener Zucht der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) verwendet. Die Haltung erfolgte in Käfigen mit ständigem Zugang zu Wasser und Futter (Sniff Alleinfutter). Über eine automatische Beleuchtungskontrolle wurde ein zirkadianer Tag-Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden eingehalten. Die Raumtemperatur betrug durchgehend  $22^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  bei einer Luftfeuchtigkeit von 60–65%. Aufgrund der Diabetes-bedingten Polyurie erfolgte täglich die Säuberung der Käfige mit Wechsel der Käfigeinstreu. Um den Einfluss von möglichen Stressfaktoren auf das Verhalten der Tiere zu minimieren, wurde jeweils über eine Woche vor Beginn einer Testreihe das Handling der Versuchstiere, wie in 4.2.1.3 beschrieben, durchgeführt. Alle Versuche erfolgten nach Genehmigung durch die lokale Tierschutzbehörde, dem Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo), Berlin (Reg.: G0005/06, G0165/11).

#### **5.2.1.2 Diabetes-Induktion mit Streptozotocin**

Die Induktion des Diabetes mellitus wurde mit STZ eingeleitet. STZ ist ein Zellgift aus dem Bodenbakterium *Streptomyces achromogenes*, dessen antibiotische Wirkung 1965 beschrieben wurde. Aufgrund seiner selektiv toxischen Wirkung auf die Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas wird es seit den 60er Jahren zur Diabetes-Induktion bei Ratten genutzt [[40]; [41]]. Somit wird ein Krankheitsbild induziert, das dem Diabetes mellitus Typ I beim Menschen entspricht. Die Behandlung erfolgte einmalig intravenös. STZ wurde in  $\text{Na}^+$ -Citrat-Puffer gelöst und 45mg/kg STZ unter Isoflurannarkose in die Schwanzvene der Ratte injiziert. Der Tag der STZ-Injektion wurde als Tag 0 jeder Versuchsreihe festgelegt. Im Verlauf traten die Diabetes-typischen Folgen auf (u. a. Polyurie, Polydypsie, Mikro- und Makroangiopathie). Die

Messung der Blutglukosekonzentration erfolgte nach dem in 5.2.1.4 beschriebenen Ablauf am 3., 14. und 21. Tag.

### **5.2.1.3 Handling**

Zur Gewöhnung der Versuchstiere an die Messung der DSS, gemessen an den Hinterpfoten mittels Algesiometer, wurde mit allen Tieren vor jedem Experiment ein Handling durchgeführt. Hierbei wurden die Tiere über 7 Tage nach und nach an die Versuchsabläufe, insbesondere an die Messungen mit dem Algesiometer, gewöhnt. Um mögliche Stressfaktoren zu vermeiden, wurden das Handling wie auch die späteren Experimente ohne äußere Einflüsse im geschlossenen Labor durchgeführt. Den Tieren wurde der Kopf stets mit Zellstoffpapier leicht abgedeckt. Der Erfolg des Handlings konnte am Ende jeweils durch die stressfreie Messung von Normwerten der DSS festgestellt werden.

### **5.2.1.4 Messung der Blutglukosekonzentration**

Die Messung der Blutglukosekonzentration erfolgte mit einem herkömmlichen Glukose-Teststreifen (Glukoflex-R Glocoseteststreifen). Die Blutentnahme erfolgte aus der Schwanzvene mit einer 26G-Kanüle (Sterican®-Einmalkanülen). Wie in der klinischen Praxis wurde der erste Tropfen verworfen und mit dem zweiten die Glukosekonzentration auf dem Teststreifen bestimmt. Die Ermittlung des Wertes wurde nach den Angaben des Teststreifen-Herstellers durchgeführt. Ab einer Blutglukosekonzentration von 300 mg/dL wurden die Tiere als diabetisch angesehen. Es wurden nur solche Tiere für die späteren Versuche verwendet, die dieses Kriterium erfüllten. Die erste Messung erfolgte 3 Tage nach STZ-Injektion, weitere Messungen erfolgten am 7., am 14., am 21., am 28. sowie an jedem weiteren Versuchstag.

### **5.2.1.5 Gewichtsmessung**

Um stets vergleichbare Versuchsbedingungen zu gewährleisten und den Einfluss eventueller Gewichtsveränderungen auf die Wirkungsweise der injizierten Medikamente zu minimieren, erfolgte grundsätzlich vor der STZ-Injektion sowie vor jedem Experiment eine Gewichtsmessung. Hierzu wurde eine geeichte Digitalwaage verwendet, auf der sich ein mit Streu ausgelegter Käfig befand. Das Gewicht dieses Käfigs wurde als Nullpunkt festgelegt, sodass das Gewicht der Ratte im Käfig als tatsächliches Gewicht des Tieres angezeigt wurde. Nach jeder Messung erfolgte erneut eine Eichung, um Gewichtsschwankungen durch den Verlust/Gewinn von Streu beim Hinein- und Heraussetzen der Tiere auszuschließen.

### **5.2.1.6 Messung der Pfoten-Druckschmerzschwelle mit dem Algesiometer**

Das Algesiometer wurde insbesondere für die Messung der DSS bei Ratten entwickelt. Zur Messung wurde dabei die Ratte nach vorangegangener Gewöhnung (Handling, siehe 5.2.1.3) aus dem Käfig genommen und zunächst mit durch Zellstoffpapier leicht abgedecktem Kopf neben das Algesiometer gesetzt. Nach exakt durchgeführtem Handling ließ sich nun die Hinterpfote ohne Widerstand auf ein kleines Podest legen, welches Bestandteil des Algesiometers war. Nun wurde von oben ein keilförmiger Kolben zunächst leicht auf der Pfote platziert, der über einen Hebelarm mit einem Gewicht verbunden war. Über ein Fußpedal konnte das Gewicht über den Arm bewegt werden und erzeugte so kontinuierlich zunehmenden Druck auf die Oberfläche der Hinterpfote. Sobald der Druck von der Ratte als unangenehm empfunden wurde, zog sie die Hinterpfote weg. Anhand der Position des Gewichtes konnte nun festgestellt werden, wie hoch die mechanische DSS, gemessen in Gramm, war. Wichtig war hierbei, dass die Hinterpfote lediglich zur leichten Fixierung mit zwei Fingern gehalten wurde, damit die Pfote jederzeit weggezogen werden konnte. Zur Ermittlung der Werte wurde jeweils der Mittelwert von 3 Messungen gebildet, die in 10-Sekunden-Abständen durchgeführt wurden.

### **5.2.1.7 Narkose und Fentanyl-Injektion**

Die Narkose der Versuchstiere erfolgte durch das volatile Anästhetikum Isofluran. Dabei wurden die Ratten jeweils für wenige Minuten in einen Glasbehälter gesetzt. Am Boden des Behälters befand sich in flüssigem Isofluran getränktes Zellulosepapier, darüber eine gelochte Keramikplatte, die den Tieren als Sitzfläche bis zum Eintritt der Narkose diente. Der Behälter wurde luftdicht verschlossen. Um die Narkosezeit möglichst kurz zu halten, wurden die Tiere bereits frühzeitig nach Einsetzen einer Atmungsabflachung aus dem Behälter genommen. Nun erfolgte die Injektion von Fentanyl intraplantar in der jeweils benötigten Dosierung. Grundlage der Fentanyl-Lösungen bildete eine Stammlösung mit 1mg/ml Fentanyl, die bis zum Erreichen der gewünschten Konzentration mit 0,9%iger NaCl-Lösung verdünnt wurde. Die Injektionsmenge betrug immer 100µl, sowohl bei den behandelten Tieren, als auch bei den Kontrolltieren, denen entsprechend 100µl 0,9%ige NaCl-Lösung injiziert wurde. Die Injektionen erfolgten stets intraplantar in die Subkutis der rechten Hinterpfote. Um intravaskuläre Injektionen zu vermeiden wurde vor jeder Injektion aspiriert. Bereits nach wenigen Minuten erholten sich die Tiere von der Anästhesie, so dass Messungen durchgeführt werden konnten. Nach Durchführung der Versuche wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgesetzt.

### **5.2.1.8 Messung der DSS-Ausgangswerte**

Als DSS-Ausgangswerte wurden diejenigen DSS bezeichnet, bei denen unbehandelte Tiere einen Pfotenrückzug bei der Messung mit dem Algesiometer zeigten. Sie diente als Kontrolle für die Wirkung der injizierten Medikamente. Die Messung erfolgte nach vorausgegangenem Handling (5.2.1.3) nach dem in 5.2.1.6 beschriebenen Ablauf vor jeder Testreihe. Die Normwerte lagen üblicherweise zwischen 75 und 100 g bei nicht-diabetischen Ratten, sowie bei 45-56 g bei diabetischen Ratten.

### **5.2.1.9 Naloxon-Behandlung**

Zum Beweis eines Opioidrezeptor-vermittelten Effektes wurde als indirekter Beweis die Fentanyl-Antagonisierung mit Naloxon durchgeführt. Zunächst erhielten alle Tiere

1,2µg/100µl Fentanyl i. pl., was einen maximalen Anstieg der DSS zur Folge hatte. An den folgenden Tagen wurde der Behandlungsgruppe die gleiche Menge Fentanyl jeweils zusammen mit 3, 5, 10 oder 15µg Naloxon (NLX) in aufsteigender Dosierung i.pl. injiziert und die Veränderungen der DSS gemessen. Die Kontrollgruppe wurde weiterhin mit 1,2µg/100µl Fentanyl i. pl. behandelt, jedoch ohne gleichzeitige Gabe von Naloxon.

#### **5.2.1.10 Aminoguanidin-Behandlung**

Aminoguanidin hat direkten Einfluss auf die Bildung von AGE, welche für die vermehrte Expression und Aktivierung von PKC und konsekutiver, vermehrter MOR-Phosphorylierung verantwortlich gemacht werden. Durch die Möglichkeit der oralen Applikation von Aminoguanidin konnte die Behandlung nicht-invasiv durchgeführt werden. Den Versuchstieren wurde das Medikament p. o. über das Trinkwasser verabreicht. Es ist bekannt, dass die tägliche Trinkmenge von Ratten mit STZ-induziertem Diabetes ca. 250 ml beträgt [42]. Demzufolge wurde das Medikament in einer Dosierung von 250mg/250ml/d über einen Zeitraum von 4 Wochen ab dem ersten Tag der STZ-Injektion verabreicht. Die Trinklösung war grundsätzlich ad libitum. Um mögliche Veränderungen im Trinkverhalten auszuschließen, wurden die Ratten in Käfigen einzeln gehalten. Die Messungen erfolgten nach 7 Tagen Behandlung. Die Verhaltensversuche erfolgten nach dem in 5.2.1.6 beschriebenen Ablauf.

## **5.2.2 [<sup>3</sup>H]DAMGO- und [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindungsstudien**

### **5.2.2.1 Gewebeaufbereitung**

Die Gewebeentnahme erfolgte zunächst auf die gleiche Weise wie zur immunhistochemischen Analyse (siehe 5.2.5.1). Diabetische- und nicht-diabetische Kontrolltiere wurden in tiefer Isoflurannarkose getötet, die lumbalen Spinalganglien L3-L5 beidseitig entnommen und in eisgekühlter Pufferlösung (50mM Tris/HCL, pH 7,4) 3 mal 15 Sekunden mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenisat wurde bei 4°C mit 48,000 G für 20 Minuten zentrifugiert. Es folgte die Resuspension mit anschließender Präinkubation in einem Schüttelwasserbad bei 37°C für 10 Minuten, um die noch vorhandenen endogenen Peptide auszuwaschen. Die Gewebesuspension wurde nach Präinkubation erneut zentrifugiert, resuspendiert und bei -80°C gelagert.

### **5.2.2.2 Proteingehalt-Bestimmung der Membransuspension**

Angewendet wurde die Bestimmung nach Bradford [43]. Hierbei wurden 200 µl BIO-RAD-Reagens, 790 µl Aqua bidest. und 10 µl Membransuspension für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Messung des Proteingehaltes erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gegenüber einem Leerwert (800 µl Aqua bidest. und 200 µl BIO-RAD-Reagens). Rinderserumalbumin (BSA) diente als Standard. Mit Hilfe einer Standardkurve [Absorption (A) versus BSA-Proteinmenge (µg) Standard] wurde letztlich die Proteinmenge bestimmt, die der Berechnung der Bindungsstellen in fmol/mg diente.

### **5.2.2.3 [<sup>3</sup>H]DAMGO-Ligandenbindungsstudie an µ-Opioidrezeptoren**

Mit Hilfe von Ligandenbindungsstudien kann die Radioaktivität des radioaktiv-markierten, MOR-selektiven Liganden DAMGO bestimmt werden und es können so Rückschlüsse auf die Anzahl der membranständigen MOR-Bindungsstellen bzw. deren Rezeptorenanzahl gezogen werden. Prinzip der Bindungsstudie war eine Sättigungsbindungsstudie, bei der zunächst nach entsprechender Gewebeaufbereitung (5.2.2.1), das aufbereitete Gewebepreparat mit der zu testenden Substanz und einem



radioaktiv-markierten Liganden in einem Puffermedium inkubiert wurde. Nach Erreichen eines Sättigungsgleichgewichtes, welches sich durch Konkurrenz beider Substanzen um die Rezeptor-Bindungsstellen einstellte, wurde der gebundene radioaktiv-markierte Ligand vom nicht-gebundenen Ligand mittels Filtration im Vakuum getrennt und mit dem Flüssigszintillationszähler gemessen.

Nach Gewebeentnahme und Durchführung der Proteinbestimmung wurden im Sinne einer Sättigungsbindungsstudie die Membransuspensionen aufgetaut, bei 4°C und 48,000 G für 20 Minuten zentrifugiert und mit Tris/HCl-Puffer (50 Mm) resuspendiert. Es folgte die Inkubation von 800µl Membransuspension (70-100µg Protein) mit 100µl [<sup>3</sup>H]DAMGO und 100µl Tris/HCl-Puffer (50Mm) bei 24°C für eine Stunde.

#### **5.2.2.4 [<sup>35</sup>S]GTP<sub>γ</sub>S-Bindungsstudie an µ-Opioidrezeptoren**

Zur Messung der MOR-G-Proteinkopplung an den membrangebundenen MOR wurden [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S-Bindungsstudien durchgeführt. [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S ist radioaktiv markiertes GTP, das nicht hydrolysiert werden kann. Nach Rezeptor-Aktivierung durch einen MOR-selektiven Agonisten (DAMGO) bindet [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S irreversibel an das G-Protein. Durch die quantitative Analyse des radioaktiv gebundenen GTP konnte indirekt eine Aussage über das Ausmaß der MOR-G-Proteinkopplung getroffen werden. Um eine Agonistenspezifische Stimulation zu gewährleisten, erfolgte der Einsatz von relativ hohen GDP-Konzentrationen, welche alle Proteine in einen Ruhezustand versetzten.

Vorgefertigte Membransuspensionen (5.2.2.1) wurden bei 4°C und 48,000 G für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Zentrifugierung wurde das Pellet mit einer finalen Proteinmenge von 25-50µg/200µl Lösung in GTP<sub>γ</sub>S-Bindungspuffer (50M Tris-HCL, 0,2mM EDTA, 100mM NaCl, 4,5mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT) resuspendiert. Es folgte die Inkubation von 200µl 50µM GDP, 200µl 0,05nM [<sup>35</sup>S]-GTP<sub>γ</sub>S und 200µl verschiedener DAMGO-Konzentrationen. Die Bindungsreaktion begann durch Zugabe von 200µl der Membransuspension. Es folgte die Inkubation für 2 Stunden bei 30°C im Wasserbad. Mit Eiswasser-gekühltem Waschpuffer (50mM Tris-HCl) wurde die Bindungsreaktion gestoppt. Um nicht-gebundenes radioaktives Protein zu entfernen, erfolgte die Filtration durch Mikroglassfilter. Nach dreimaligem Waschen mit kaltem Waschpuffer wurde dieser trockengesaugt, in ein Szintillationsgefäß überführt, mit Szintillationsflüssigkeit bedeckt und über Nacht inkubiert. Zur Auszählung diente ein Flüssigszintillationsspektrometer.

## **5.2.3 Quantitative real time Polymerase-Kettenreaktion**

### **5.2.3.1 Gewebeentnahme**

Zur Quantifizierung der Expression einzelner Subtypen der PKC wurde eine quantitative real time PCR durchgeführt. Die zuvor behandelten Tiere wurden getötet und die Spinalganglien entnommen. Die entnommenen Ganglien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **5.2.3.2 Durchführung der Polymerase-Kettenreaktion**

Zur Isolation der totalen RNA wurde Nucleospin® verwendet. Anschließend wurde hieraus cDNA synthetisiert (First Strand cDNA Synthesis Kit/transcriptase). Mit dem Doppelstrang-bindenden Fluoreszenz-Farbstoff SYBR green I (LightCycler® FastStart DNA Master SYBR Green) wurde der PKC-mRNA-Gehalt quantifiziert. Spezifische Primer dienten der Amplifikation selektiv kurzer PKC-RNA-Segmente. Jede Probe wurde in dreifacher Ausfertigung durchgeführt, um eine möglichst hohe statistische Signifikanz zu erzielen. Die Bedingungen wurden so gewählt, dass eine lineare Standardkurve durch die fortlaufende Lösung der cDNA erhalten wurde. Aufgrund möglicher Expressionsunterschiede der mRNA-Menge wurde die PKC-mRNA-Expression für jeden Durchlauf unter Berücksichtigung des ribosomalen Protein 19 (RPL-19) normiert. RPL-19 diente hierbei jeweils als Standard. So konnten die besagten Expressionsunterschiede kompensiert werden. Es wurden folgende spezifische Primer verwendet: für MOR: vorwärts 5'-TTACGGCCTGATGATCTTACGA-3', rückwärts 5'-GGTGATCCTGCGCAGATTC-3' für PKC: vorwärts 52-AGTGCCAAGTTTGCTGTTTTGT-32, rückwärts AGAAGGTAGGGCTTCCATAGGT. Auswertung und grafische Darstellung erfolgten mit gängiger Computersoftware (Microsoft Excel, SigmaPlot).

## **5.2.4 Western Blot**

### **5.2.4.1 Gewebeentnahme**

Die Quantifizierung der MOR-, pMOR- und PKC-Proteine geschah mittels Western Blot. Den Ratten wurden zunächst in tiefer Isofluran-Narkose die Spinalganglien L3-L5 entnommen und in Ripa-Pufferlösung homogenisiert.

### **5.2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde nach Anweisung des Herstellers mittels Bio-Rad DC Protein Assay und Rinderserumalbumin (BSA) als Standard kolorimetrisch bestimmt. Für den Versuch wurden je Probe gleiche Mengen (20µg Protein/Bahn) eingesetzt. Die Proteine wurden nach Zugabe von Dithiothreitol (5Mm) und Bromphenol blau (0,1% w/v) bei 95°C denaturiert.

### **5.2.4.3 Western Blot-Durchführung**

Die Auftrennung der Proteine wurde mittels einer 10%igen Polyacrylamidgel-Elektrophorese in einem Tris/Glycine/SDS-Puffersystem für 150 Minuten, 120 Volt und bei ca. 25°C Raumtemperatur durchgeführt. Nach Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran in einer Standard-Tris/Glycin/Methanol-Transferpufferlösung, erfolgte die Inkubation des spezifischen primären Antikörpers (PKC-alpha Mouse monoclonal, Konzentration 1:1000) für 24 Stunden bei 4°C. Anschließend folgte nach 3-4-maligem Waschen der Membran mit PBST (Phosphat gepufferte Salzlösung) die Inkubation des sekundären Antikörpers für 1-2 Stunden. Nach erneutem, mehrmaligen Waschen mit PBST erfolgte die Zugabe einer Visualisierungslösung (ECL-plus solution, Amersham Pharmacia Biotech) und die damit verbundene Detektion der spezifischen Banden über einen X-ray Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech). Nach Einscannen der Filme konnten die Banden mit Hilfe von ImageJ application densitometrisch quantifiziert werden.

## **5.2.5 Immunhistochemie**

### **5.2.5.1 Gewebeentnahme**

Auch die Gewebeaufbereitung zur immunhistologischen Untersuchung wurde nach einer in unserem Labor etablierten Methode durchgeführt [44]. Die Versuchstiere wurden zunächst in tiefer Isofluran-Narkose transcardial mit 20 ml 0.1 M PBS-Lösung (pH 7,4) und anschließend mit 100 ml kalter PBS-Lösung, die 4% Paraformaldehyd und 14 % Pikrinsäure (pH 7,4) enthielt, als Fixierungslösung perfundiert. Rückenmark, Spinalganglien und Hautgewebe der Hinterpfote (Haut mit Subkutangewebe) wurden entnommen und für 3 Stunden bei 4°C in der Fixierungslösung fixiert. Anschließend erfolgte die Kühlung über Nacht in 10% Saccharose-enhaltender PBS-Lösung.

### **5.2.5.2 Anfärbung der Schnitte mit spezifischen Antikörpern**

Die Färbung wurde ebenfalls nach einer etablierten Methode durchgeführt [44]. Als Antikörper dienten Kaninchen-anti-MOR, Kaninchen-anti-Phospho-MOR und Maus-anti-PKC. Die Kontrollgruppe wurde durch Vor-Absorption der Antikörper mit korrespondierenden Antigen-Peptiden und Verzicht auf den primären oder sekundären Antikörper behandelt. Die Analyse und Quantifizierung der gefärbten Schnitte erfolgte unter dem konfokalen Lasermikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) durch einen verblindeten Untersucher, der jeweils 4 Schnitte pro Tier analysierte [44].

### **5.2.5.3 Auswertung der immunhistologischen Schnitte**

Die Auswertung der Schnitte wurde mit Hilfe der Computersoftware LSM Image Browser (Carl-Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland) durchgeführt. Die Schnitte waren zum Untersuchungszeitpunkt mit den jeweils spezifischen Antikörpern angefärbt und eingescannt. Im Speziellen erfolgte je nach Fragestellung eine Untersuchung hinsichtlich der Anzahl an MOR-positiven, pMOR-positiven bzw. PKC-positiven Neuronen in den Spinalganglien, jeweils im Vergleich zwischen nicht-diabetischen Kontrolltieren, Tieren mit STZ-induziertem Diabetes und mit Aminoguanidin

behandelten Tieren. Zunächst wurde für jedes Bild die erkennbare Gesamtneuronenzahl festgelegt. Hierfür wurde eine hohe Bildhelligkeit (brightness) mit einem Kontrastlevel (contrast) im mittleren Bereich gewählt. Nach Ermittlung der Gesamtneuronenzahl wurden die jeweils durch spezifische Antikörper als positiv erkennbaren Neuronen identifiziert. Die Abgrenzung (cut-off) zwischen positiven und negativen Neuronen legte der Untersucher selbst fest, wurde jedoch bei sämtlichen Schnitten gleich gewählt. Zur Ermittlung des cut-off wurde jeweils eine niedrige Bildhelligkeit in Verbindung mit einem hohen Kontrastlevel verwendet, um positive Neuronen eindeutig identifizieren zu können. Die hierdurch ermittelte Anzahl positiver Neuronen wurde letztlich ins Verhältnis zur Gesamtneuronenzahl gesetzt, sodass die Ergebnisse als prozentualer Anteil positiver Neuronen an der Gesamtneuronenzahl eines jeden Schnittes dargestellt werden konnten.

## 5.2.6 Statistik

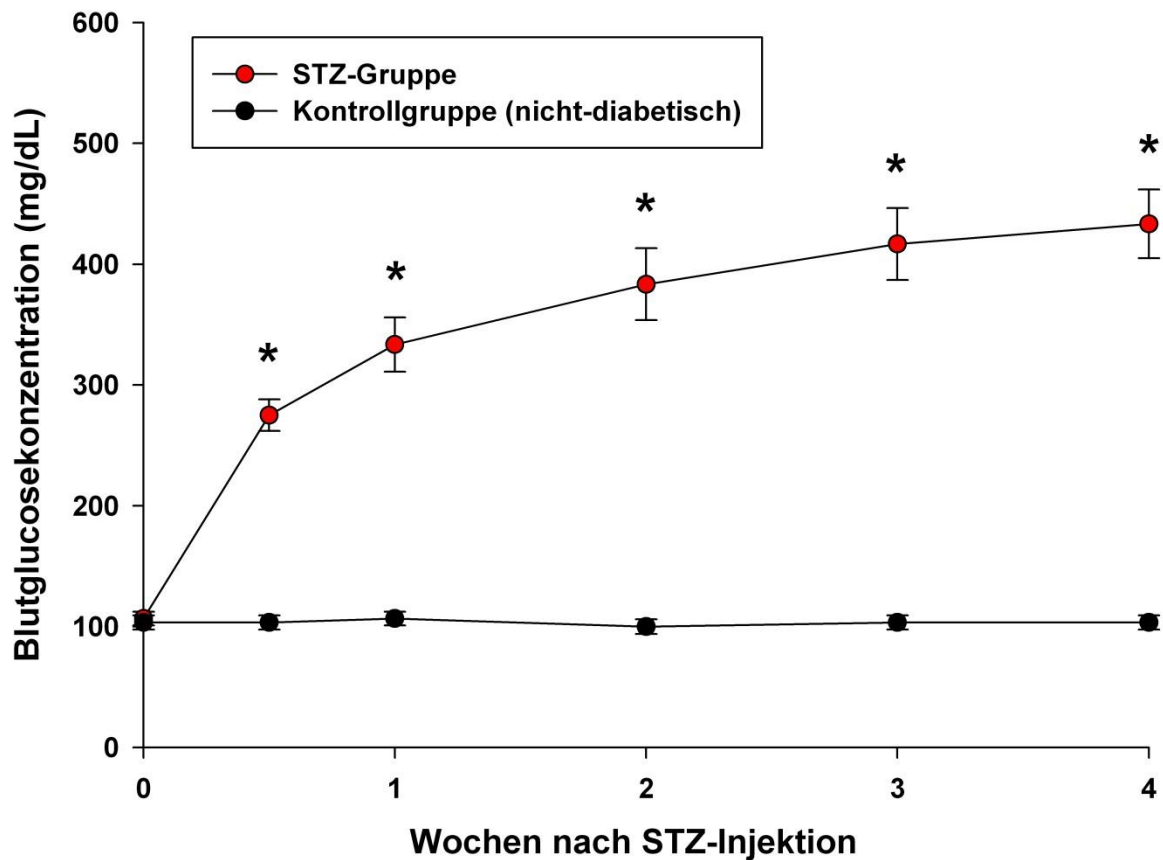
Die statistische Analyse wurde mit Sigmaplot 12.5 durchgeführt. Einfache Vergleiche zweier Gruppen einer Bedingung wurden mit dem two-tailed Student t-test oder dem Mann-Whitney U-test durchgeführt. Zum Vergleich zwischen zwei und mehr Gruppen mit unterschiedlichen Versuchszeitpunkten oder unterschiedlicher Medikamentendosierungen, wurde bei normal verteilten Werten in der Regel ein One-Way-ANOVA-Test durchgeführt. Als post-hoc-Test diente in der Regel der Student-Newman-Keuls-Test. Bei nicht normal verteilten Werten wurde ein One-Way-ANOVA on Ranks-Test durchgeführt, ebenfalls in Verbindung mit einem Student-Newman-Keuls-Test. Im Falle einer zusätzlichen Kondition (z. B. Vergleich der Werte innerhalb einer Gruppe sowie zwischen den einzelnen Gruppen bei unterschiedlichen Medikamentendosierungen) wurde als Standard ein Two-Way-ANOVA-Test mit dem post-hoc-Bonferroni-t-Test durchgeführt.

## **6 Ergebnisse**

### **6.1 Kennzeichen eines Diabetes mellitus**

#### **6.1.1 Erhöhte Blutglukosekonzentration**

Die Messung der Blutglukosekonzentration erfolgte ab dem 3. Tag nach i.v. STZ-Injektion wie in 5.2.1.4. beschrieben. Bereits 3 Tage nach STZ-Injektion stiegen die Blutglukosewerte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an (Abb.1). Zu den folgenden Messzeitpunkten, zwischen 1 und 3 Wochen nach STZ-Injektion, stiegen die Blutglukosewerte weiter kontinuierlich an, weiterhin signifikant erhöht im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Abb.1). Zum Zeitpunkt der Verhaltensversuche, 4 Wochen nach STZ-Injektion, lagen die Tiere der STZ-Gruppe durchweg signifikant oberhalb der 300 mg/dl-Grenze. Im Vergleich hierzu blieben die Blutzuckerwerte der Kontrolltiere durchweg nach 4 Wochen im Normbereich (Abb.1).

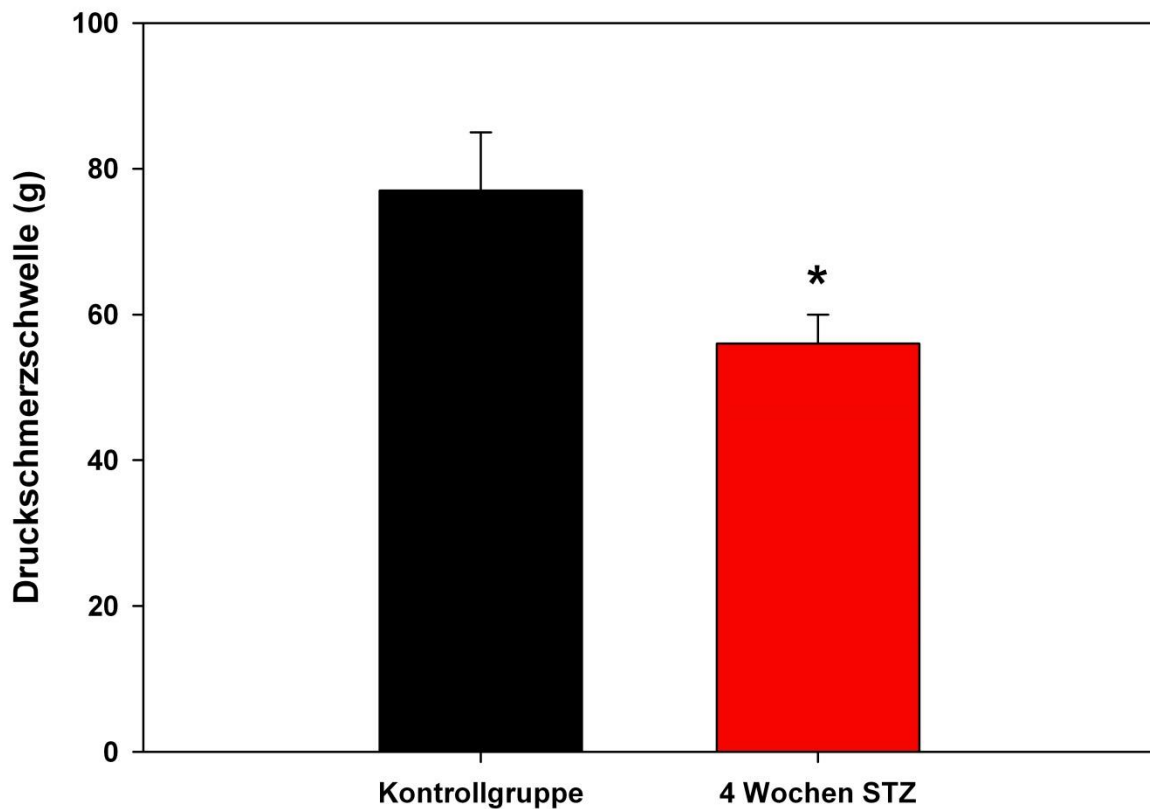


**Abb.1: Blutglukosekonzentration im Verlauf der ersten 4 Wochen nach STZ-Injektion - Vergleich zwischen Wistar-Ratten mit und ohne i.v. STZ-Behandlung (45 mg/kg):** Es zeigt sich bereits eine halbe Woche nach STZ-Injektion eine signifikante Zunahme der Blutglukosekonzentrationen. Nach einer Woche liegen die Werte deutlich über 300 mg/dl und steigen weiter kontinuierlich an. Die Kontrollgruppe hingegen zeigt bei intaktem Glucose-Stoffwechsel keine signifikanten Veränderungen. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM): \*  $p < 0,05$  (Two Way ANOVA, post-hoc-Bonferroni t-Test,  $n=10$  je Gruppe).



### **6.1.2 Vermehrte mechanische Schmerzsensitivität**

Um aussagekräftige Ergebnisse bei den weiterführenden Experimenten zu erhalten, war es zunächst notwendig, die Ausgangswerte der DSS (in g), im Vergleich zwischen der Diabetes-Gruppe und der nicht-diabetischen Kontrollgruppe zu bestimmen. Wie bereits in 5.2.1.8 erwähnt, bezeichnen die DDS-Ausgangswerte diejenigen DSS-Werte, bei denen es bei unbehandelten Tieren zu einem Zurückziehen der Hinterpfote kommt, auf die zunehmender mechanischer Druck mit dem Algesiometer ausgeübt wird. Zur Quantifizierung der Diabetes-bedingten gesteigerten nozizeptiven Antwort auf mechanischen Druck in der Frühphase der diabetischen Neuropathie wurde die Messung der DSS-Ausgangswerte im Vergleich zwischen der Diabetes-Gruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion und der nicht-diabetischen Kontrollgruppe gleichen Alters, wie in 5.2.1.6 und 5.2.1.7 beschrieben, vor jedem Experiment durchgeführt. Die Kontrollgruppe zeigte DSS-Werte um 77 Gramm (Abb.2). Im Vergleich hierzu, waren die Werte der Diabetes-Gruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion bereits signifikant erniedrigt und erreichten im Mittel lediglich eine Höhe von rund 56 Gramm (Abb.2).

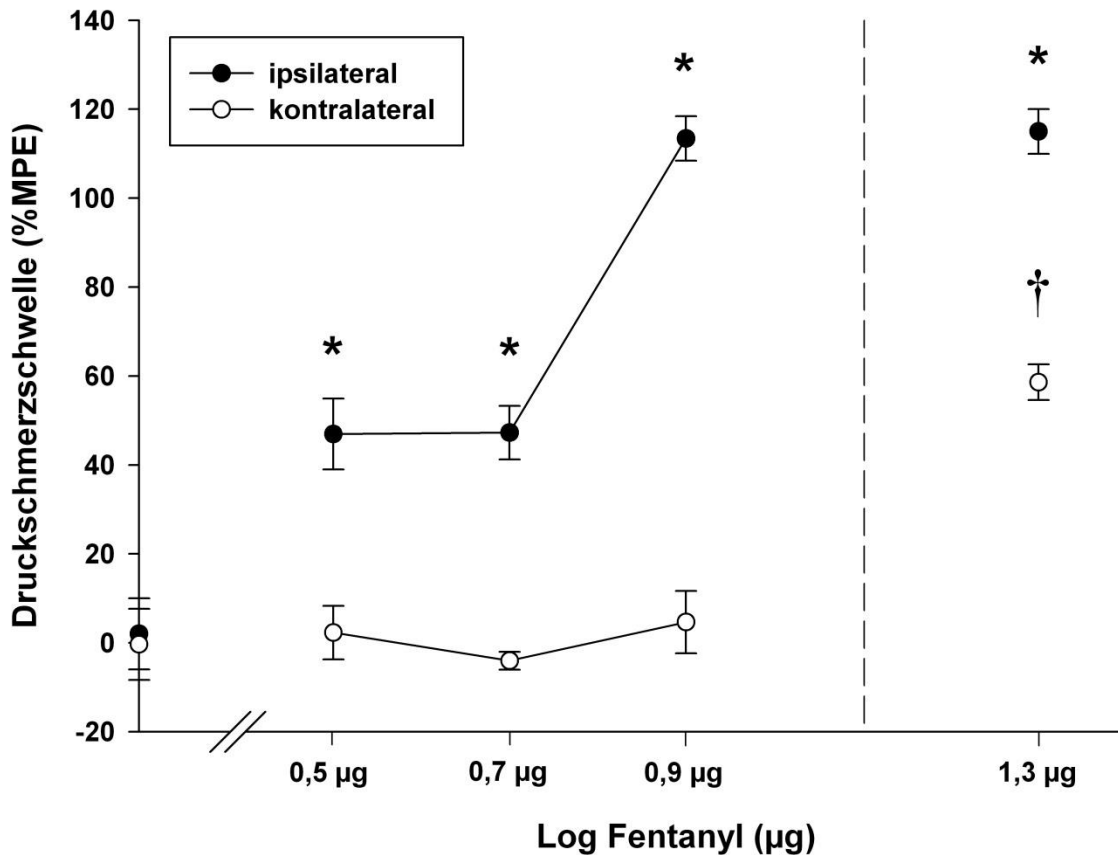


**Abb.2: Druckschmerzschwelle (DSS): Vergleich zwischen den DSS-Ausgangswerten nicht-diabetischer Kontrolltiere und 4 Wochen nach STZ-Injektion:** 4 Wochen nach der STZ-vermittelten Induktion eines Diabetes mellitus ist der DSS-Ausgangswert (DSS un behandelter Tiere) signifikant niedriger im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Standardabweichung (Stabw): \*  $p < 0,05$  (two-tailed Student t-test,  $n=12$  je Gruppe).

## **6.2 Verminderte Ansprechbarkeit auf Opioidanalgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie**

### **6.2.1 Vergleich zwischen lokalem und systemischem Effekt nach subcutaner Injektion aufsteigender Fentanyl-Dosierungen**

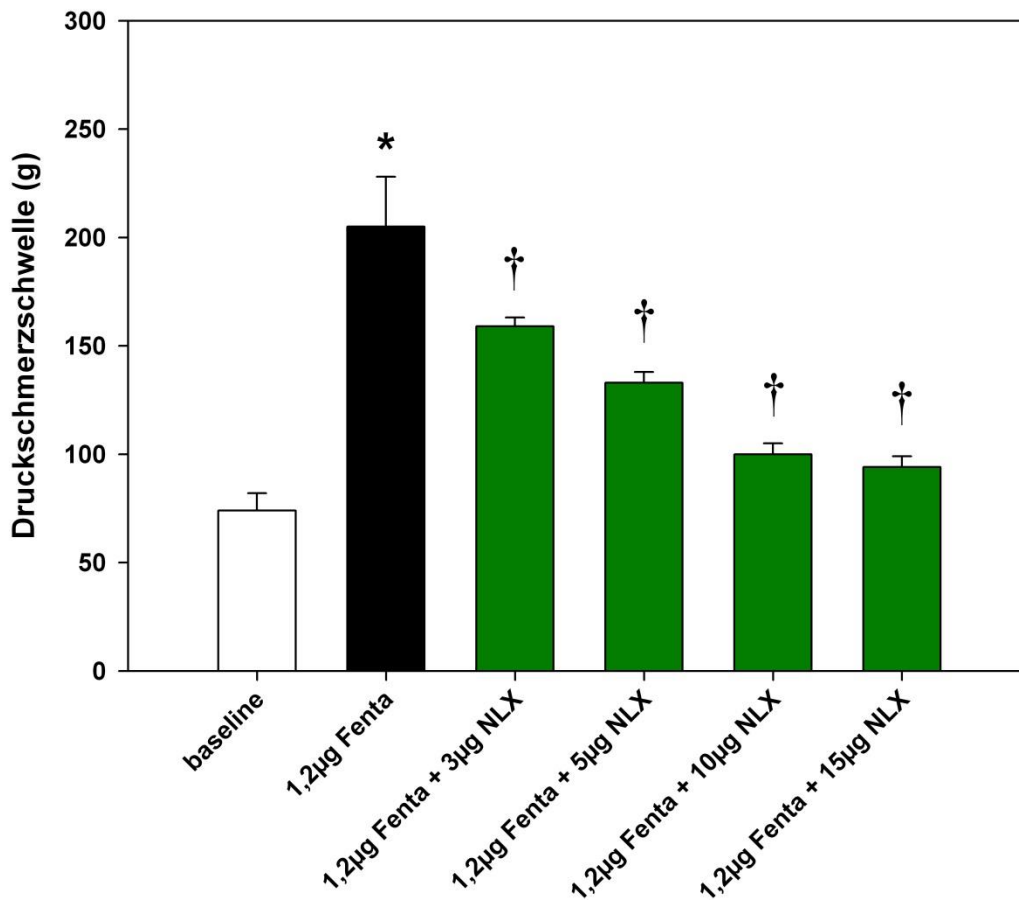
Vor Beginn der Arbeit mit diabetischen Tieren wurde zunächst mit Hilfe der DSS der antinozizeptive Effekt eines kontinuierlich zunehmenden mechanischen Drucks nach subcutaner intraplantarer Injektion aufsteigender Fentanyl-Dosierungen bei gesunden nicht-diabetischen Tieren gemessen. Bereits die Injektion von  $0,5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  Fentanyl zeigte auf der ipsilateralen Seite einen signifikanten DSS-Anstieg im Vergleich zum DDS-Ausgangswert (Abb.3). Auf der kontralateralen Seite waren bei dieser Konzentration keine signifikanten DSS-Veränderungen erkennbar (Abb.3). Die Konzentration von  $0,7\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  Fentanyl zeigte ipsilateral ebenfalls einen signifikanten DSS-Anstieg im Vergleich zum DSS-Ausgangswert (Abb.3). Im Vergleich zum Ergebnis der  $0,5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ -Messung konnte jedoch keine weitere Steigerung festgestellt werden (Abb.3). Kontralateral wurde, wie zuvor bei der  $0,5\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ -Messung, keine DSS-Veränderung im Vergleich zum DSS-Ausgangswert festgestellt (Abb.3). Die Injektion von  $0,9\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  Fentanyl führte auf der ipsilateralen Seite zu einem signifikanten maximalen DSS-Anstieg, sowohl im Vergleich zu den DSS-Ausgangswerten als auch im Vergleich zu den vorherigen niedrigeren Fentanyl-Dosierungen (Abb.3). Die DSS konnte auch im Verlauf der Messungen mit höheren Dosierungen nicht weiter gesteigert werden. Die DSS-Werte der kontralateralen Seite blieben bis zu einer Konzentration von  $1,1\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  Fentanyl im Vergleich zum DSS-Ausgangswert nicht signifikant verändert (Abb.3). Erst die Injektion von  $1,3\mu\text{g}/100\mu\text{l}$  Fentanyl erbrachte hier einen signifikanten DSS-Anstieg im Vergleich zu den DSS-Ausgangswerten, der jedoch noch signifikant unterhalb der DSS-Werte der ipsilateralen Messung lag (Abb.3). Aufgrund der alleinigen Messung der ipsilateralen DSS in den folgenden Verhaltensexperimenten wurden hieraus die Versuchsdosierungen für die folgenden Verhaltensexperimente abgeleitet, nämlich  $0,5$ ,  $0,7$  und  $0,9\mu\text{g}$  Fentanyl. Der DSS-Anstieg auf der kontralateralen Seite bei  $1,3\mu\text{g}$  Fentanyl kann als Beginn der systemischen Opioid-Wirkung angesehen werden.



**Abb.3: DSS gemessen mit dem Algesiometer - Vergleich zwischen ipsilateraler und kontralateraler Messung nach intraplantarer Injektion aufsteigender Fentanyl-Konzentrationen in gesunden Wistar-Ratten:** Die Grafik zeigt in gesunden Kontrolltieren, dass bereits bei einer Dosis von 0,5 µg Fentanyl i.pl., ipsilateral ein signifikanter Anstieg der DSS auftritt. Kontralateral kommt es zu keiner signifikanten DSS-Veränderung. Zwischen 0,7 und 0,9 µg Fentanyl zeigt sich ipsilateral ein signifikanter Anstieg der DSS bei noch immer fehlender kontralateraler DSS-Veränderung. Erst ab einer Dosis von 1,3µg Fentanyl erfolgt auch auf der kontralateralen Seite ein signifikanter DSS-Anstieg. Die Daten sind dargestellt als MW ± Stabw: \*† p<0,05 (One Way ANOVA, post-hoc-Student-Newman-Keuls-Test, n=5 je Gruppe).

## 6.2.2 Antagonisierung der analgetischen Wirkung durch Naloxon

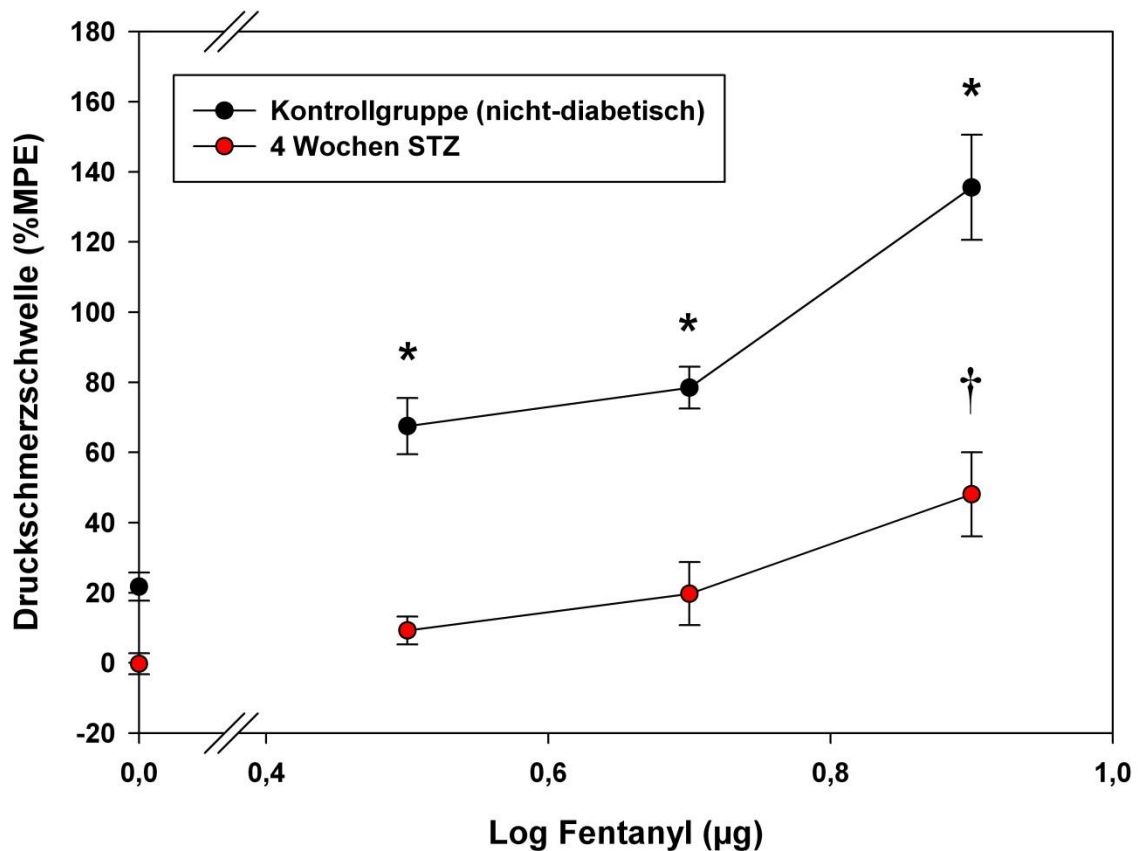
Naloxon ist als Antagonist geeignet, die Wirkung von Fentanyl am MOR aufzuheben. Die Versuche wurden wie in 5.2.1.6 und 5.2.1.9 beschrieben durchgeführt. Nach der alleinigen Injektion von 1,2µg/100µl Fentanyl zeigte sich in Einklang mit den in 5.2.1 gemessenen Werten ein maximaler DSS-Anstieg auf 200g und damit im Vergleich zum DSS-Ausgangswert, der als Referenz diente, signifikant erhöht (Abb.4). Die Naloxon-Gruppe erhielt zur Fentanyl-Gabe zusätzlich Naloxon in aufsteigender Dosierung. Bereits ab einer Menge von 3µg Naloxon zeigte sich eine signifikante Erniedrigung der DSS (Abb.4). Weitere Steigerungen der Naloxon-Dosierung auf 5µg bzw. 10µg führten zu weiteren signifikanten DSS-Erniedrigungen, sowohl im Vergleich zur alleinigen Injektion von 1,2µg/100µl Fentanyl als auch zu den jeweils zuvor injizierten Naloxon-Dosierungen (Abb.4). Dosissteigerungen über 10 µg zeigten keine weiteren DSS-Veränderungen im Vergleich zu den vorherigen Naloxon-Dosierungen.



**Abb.4: Antagonisierung der analgetischen Wirkung von intraplantar appliziertem Fentanyl (Fenta) durch Naloxon (NLX):** Die alleinige Injektion von 1,2 µg Fentanyl führte bei gesunden Kontrolltieren nach 5 Minuten ipsilateral zu einem maximalen Anstieg der Druckschmerzschwelle. Bereits geringe Dosen (3µg) von zusätzlich injiziertem Naloxon zeigten einen signifikanten Abfall der DSS. Dosissteigerungen über 10µg führten zu keiner weiteren DSS-Senkung. Die Daten sind dargestellt als MW ± Stabw: \*† p<0,05 (One Way ANOVA, post-hoc-Student-Newman-Keuls-Test, n=4 je Gruppe).

### **6.2.3 Vergleich der Opioid-bedingten Analgesie zwischen diabetischen Tieren und nicht-diabetischen Kontrolltieren**

Verglichen wurden die DSS-Werte zwischen diabetischen Tieren 4 Wochen nach STZ-Injektion und nicht-diabetischen Kontrolltieren, nach Applikation aufsteigender Fentanyl-Dosierungen. Die Versuche wurden nach dem in 5.2.1.6 und 5.2.1.7 beschriebenen Ablauf durchgeführt. Aufgrund der Diabetes-bedingten verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika zeigten sich bereits die DSS-Ausgangswerte der Diabetes-Gruppe signifikant erniedrigt im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (vgl. 6.1.2). Die Injektion von 0,5 und 0,7µg/100µl Fentanyl erbrachte in Einklang mit den in 6.2.1 erzielten Ergebnissen signifikante DSS-Anstiege im Vergleich zum DSS-Ausgangswert (Abb. 5). Die DSS-Werte der Diabetes-Gruppe hingegen blieben sowohl bei 0,5µg als auch bei 0,7µg nicht signifikant verringert im Vergleich zum DSS-Ausgangswert (Abb.5). Die Injektion von 0,9µg/100µl Fentanyl, die bei der Kontrollgruppe einen signifikanten maximalen DSS- Anstieg im Vergleich zum DSS-Ausgangswert zur Folge hatte (Abb. 5), erbrachte bei der Diabetes-Gruppe ebenfalls einen signifikanten DSS-Anstieg im Vergleich zum DSS-Ausgangswert, der sich jedoch im Vergleich zum DSS-Wert der Kontrollgruppe signifikant niedriger zeigte (Abb. 5).



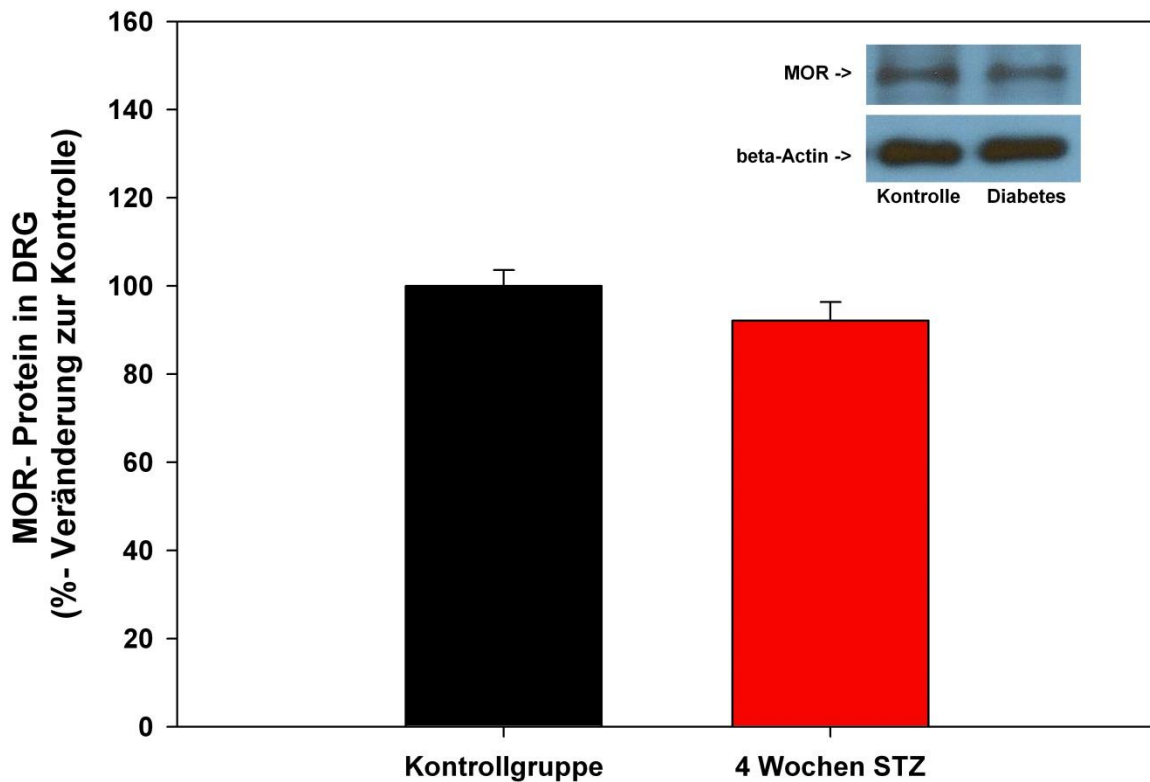
**Abb.5: Vergleich der Druckschmerzschwelle (DSS) zwischen Tieren mit STZ-induziertem Diabetes und Kontrolltieren bei ipsilateraler Messung nach Fentanyl-Injektion:** Es ist zu erkennen, dass die DSS-Werte der Kontrollgruppe durchgehend signifikant über denen der STZ-Gruppe liegen. Die Kontrollgruppe zeigt bei allen injizierten Fentanyl-Dosierungen einen signifikanten DSS-Anstieg im Vergleich zu den DSS-Ausgangswerten, die STZ-Gruppe erst bei 0,9 µg. Beide Gruppen zeigen einen signifikanten Anstieg der DSS zwischen 0,7 und 0,9 µg Fentanyl i. pl., der jedoch bei der STZ-Gruppe deutlich schwächer ausgeprägt ist. Die Daten sind dargestellt als MW ± Stabw: \*† p<0,05 (One Way ANOVA, post-hoc-Student-Newman-Keuls-Test, n=5 je Gruppe).



## **6.3 Quantitative Messung der $\mu$ -Opioidrezeptoren in der Frühphase**

### **6.3.1 Nachweis des $\mu$ -Opioidrezeptor-Proteins in Spinalganglien mittels Western Blot-Analyse**

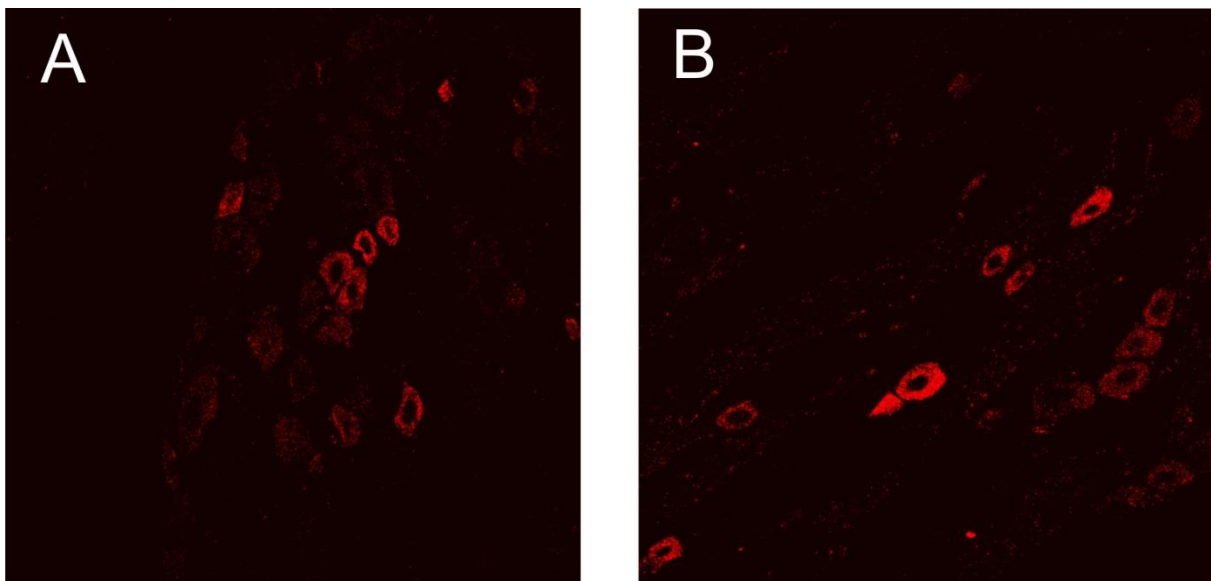
Bereits bei alleiniger Betrachtung der Western Blot-Banden zeigten sich keine erkennbaren Unterschiede in der integrierten optischen Banden-Intensität im Vergleich zwischen Diabetesgruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion und nicht-diabetischer Kontrollgruppe (Abb.6). Die Auswertung der Banden durch Messung der integrated optical density ergab 4 Wochen nach STZ-Injektion im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe lediglich eine minimale Reduktion der MOR-Proteinmenge, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb.6).



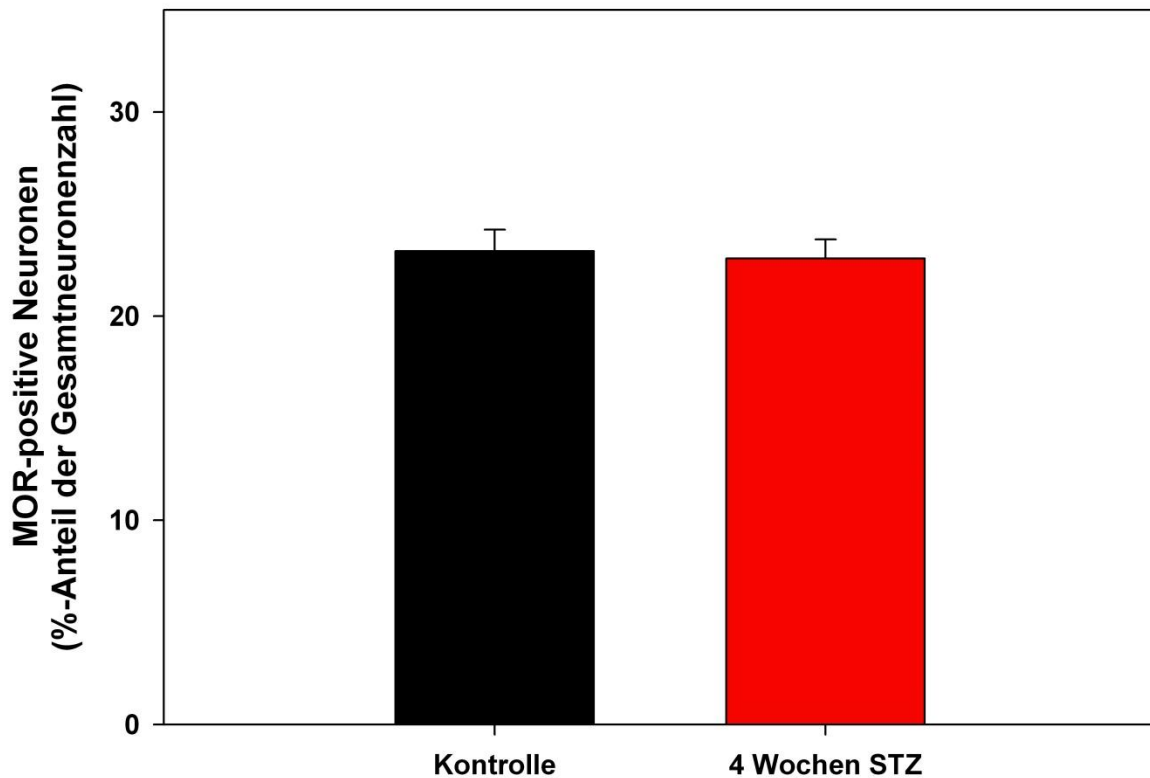
**Abb.6:  $\mu$ -Opioid-Rezeptor (MOR)-Protein-Nachweis in den Spinalganglien nach Westernblot-Auswertung: Vergleich zwischen nicht-diabetischer Kontrollgruppe und Diabetesgruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion:** Ausgewertet wurden die Blots durch Analyse der integrated optical density, welche Rückschlüsse auf die vorhandene Proteinmenge der einzelnen Banden gibt. 4 Wochen nach STZ-Injektion zeigt sich keine signifikante Veränderung der MOR-Proteinmenge im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Banden bei 55 kDa. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM:  $p > 0,05$  (Mann-Whitney U-test,  $n=6$  je Gruppe).

### 6.3.2 Nachweis der $\mu$ -Opioidrezeptoren in Spinalganglien

Nach der Western Blot-Analyse des MOR-Protein erfolgte der immunhistochemische Nachweis MOR-positiver Zellen in Neuronen der Spinalganglien diabetischer Tiere im Vergleich zu nicht-diabetischen Tieren. Es wurden nach dem in 5.2.5.2 und 5.2.5.3 beschriebenen Ablauf Gewebeschnitte der Spinalganglien diabetischer Tiere 4 Wochen nach STZ-Injektion und nicht-diabetischer Kontrolltiere angefertigt, mit spezifischen Anti-MOR-Antikörpern angefärbt und miteinander verglichen. Bereits optisch zeigte sich 4 Wochen nach STZ-Injektion keine sichtbare Veränderung der Anzahl an MOR-positiven Zellen im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Abb.7). Die Auszählung der MOR-positiven Neuronen ergab im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion keine signifikante Veränderung der MOR-positiven Neuronenzahl im Verhältnis zur erkennbaren Gesamtneuronenzahl (Abb.8).



**Abb.7: MOR in Spinalganglien nicht-diabetischer Tiere (A) und diabetischer Tiere 4 Wochen nach STZ-Injektion (B):** Die Abbildung zeigt Neurone aus immunhistochemischen Schnitten der Spinalganglien diabetischer und nicht-diabetischer Ratten, welche mit Anti-MOR-Antikörper angefärbt wurden. Die deutlich fluoreszierenden Neuronen können als MOR-positiv angesehen werden und wurden im Verhältnis zur erkennbaren Gesamtneuronenzahl prozentual berechnet. Es zeigt sich rein optisch 4 Wochen nach STZ-Injektion (B) keine Veränderung der MOR-Anzahl im Vergleich zur Kontrollgruppe (A). Beide Aufnahmen sind mit dem identischen Helligkeits- und Kontrastlevel dargestellt.

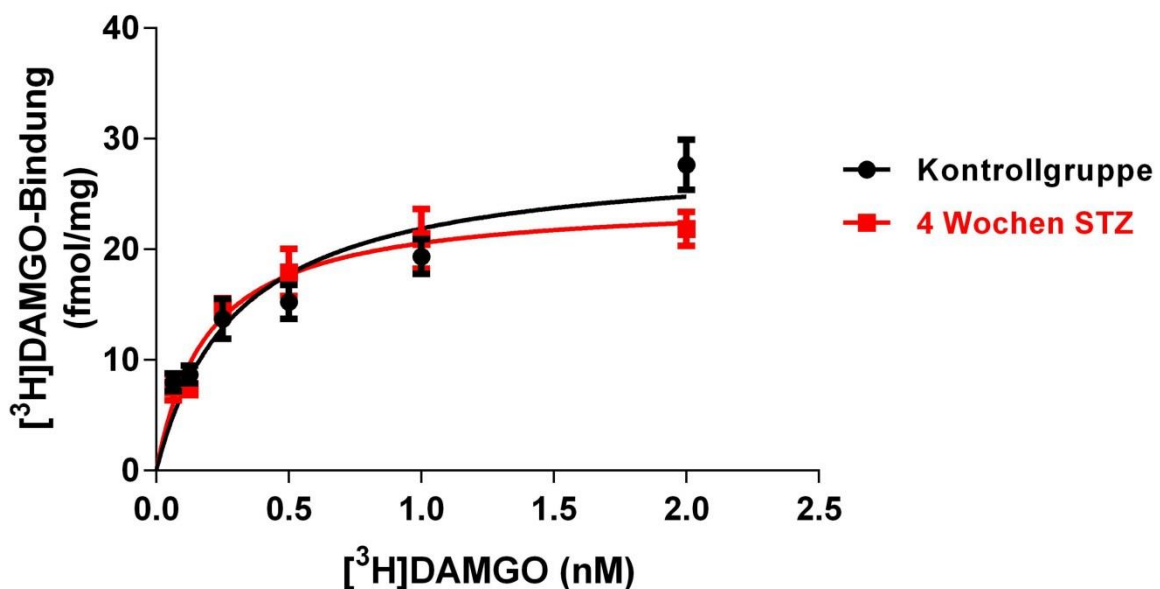


**Abb.8: MOR-positive Neuronen in Spinalganglien: Vergleich zwischen nicht-diabetischer Kontrollgruppe und Diabetesgruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion:** Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil MOR-positiver Neurone an der Gesamtneuronenzahl in Spinalganglien. Es ist zu erkennen, dass sich die Anzahl der MOR-positiven Neurone 4 Wochen nach STZ-Injektion nicht signifikant verändert hat. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Stabw:  $p > 0,05$  (Mann-Whitney U-test,  $n = 5$  je Gruppe).

## 6.4 Opioid-Bindung und Signalübertragung am $\mu$ -Opioidrezeptor

### 6.4.1 Nachweis der $\mu$ -Opioidrezeptor-Bindungsstellen

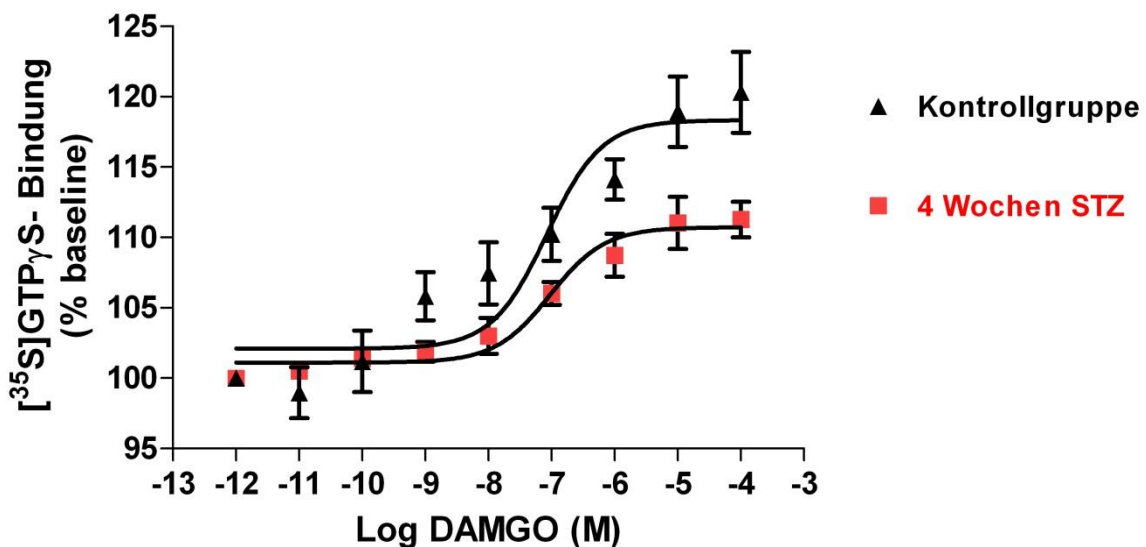
Da sich sowohl in der MOR-Proteinanalyse (vgl. 6.3.1), als auch in der immunhistochemischen Analyse (vgl. 6.3.2) keine signifikanten Veränderungen der MOR-Anzahl nachweisen ließ, folgte die Bestimmung der Rezeptor-Bindungsstellen am MOR mittels [ $^3$ H]DAMGO-Sättigungsbindungsstudie. Die Bindung des für MOR hochspezifischen Agonisten DAMGO sollte Aufschluss über die Anzahl der Rezeptor-Bindungsstellen diabetischer Tiere im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe geben, da eine verminderte Anzahl an MOR-Bindungsstellen eine mögliche Ursache der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei diabetischen Tieren darstellt. Die Bindungsstudie wurde nach entsprechender Gewebeaufbereitung (4.2.2.1) und Proteingehaltbestimmung (5.2.2.2), wie in 5.2.2.3 und 5.2.2.4 beschrieben, durchgeführt. Es zeigte sich bei der Diabetesgruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion keine signifikante Veränderung der DAMGO-Rezeptorbindung im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Abb.9).



**Abb.9: [ $^3$ H]DAMGO-Bindung an MOR - Vergleich zwischen nicht-diabetischer Kontrollgruppe und STZ-Gruppe 4 Wochen nach Diabetes-Induktion:** Die Abbildung zeigt eine Sättigungskurve der DAMGO-Bindung an MOR mit zunehmender [ $^3$ H]DAMGO-Konzentration. Es findet sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Stabw:  $p < 0,05$  (Two Way ANOVA, post-hoc-Bonferroni t-Test,  $n=5$  je Gruppe).

## 6.4.2 Analyse der G-Proteinkopplung an $\mu$ -Opioidrezeptoren

Zur Untersuchung der G-Proteinaktivität am MOR wurde eine [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S-Bindungsstudie durchgeführt. [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S bindet an die G-Proteine membrangebundener MOR. Die Versuche wurden nach vorheriger Gewebeaufbereitung (5.2.2.1), wie in 5.2.2.6 dargestellt, durchgeführt. Es zeigte sich im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe bei der Diabetesgruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion nach Gabe hoher DAMGO-Konzentrationen, durch die alle Rezeptoren besetzt wurden, eine signifikant erniedrigte G-Proteinbindung von [ $^{35}$ S]-GTP $\gamma$ S am MOR (Abb.10). Demzufolge waren die in den Verhaltensversuchen festgestellten Veränderungen der Pfoten-Druckschmerzschwelle (Vgl. 6.1.2.) möglicherweise auf eine verminderte G-Proteinaktivität und konsekutiv reduzierter Signalübertragung am MOR zurückzuführen.

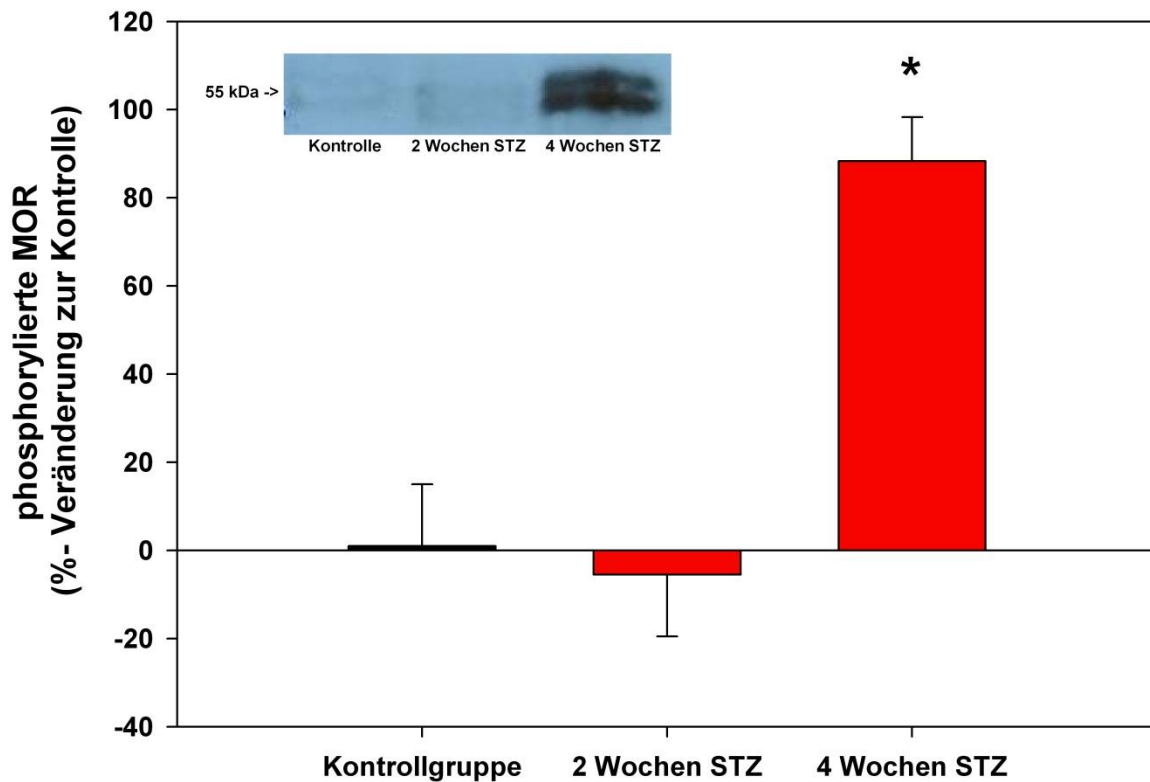


**Abb.10: [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudie an membrangebundenen MOR - Vergleich zwischen nicht-diabetischer Kontrollgruppe und STZ-Gruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion:** Die Grafik zeigt deutlich, dass die Bindung von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S an das G-Protein von MOR 4 Wochen nach STZ-Injektion im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant abgenommen hat bei hohen DAMGO-Konzentrationen durch die alle MOR besetzt sind. Im Vergleich zur DAMGO-Bindungsstudie, welche keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen zeigte (vgl. 6.4.1.) lässt die erniedrigte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung auf eine Diabetes-bedingte Störung der Signalübertragung am MOR schließen, bei unveränderter Rezeptorenzahl und Opioid-Bindung am Rezeptor. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Stabw:  $p < 0,05$  (Two Way ANOVA, post-hoc-Bonferroni t-Test,  $n = 5$  je Gruppe).

## **6.5 Phosphorylierung der $\mu$ -Opioidrezeptoren in der Frühphase**

### **6.5.1 Quantitativer Nachweis phosphorylierter $\mu$ -Opioidrezeptor-Proteine in der Western Blot-Analyse**

Aufgrund des Nachweises einer verminderten Kopplung von radioaktiv markiertem GTP in der [<sup>35</sup>S]-GTP $\gamma$ S-Bindungsstudie (vgl. 6.4.2) wurde eine quantitative Analyse der phosphorylierten MOR-Proteine mit Hilfe einer Western Blot-Analyse in den Spinalganglien durchgeführt. Der Versuchsablauf ist in 5.2.3.4 beschrieben. Als Einheit diente die integrated optical density, gemessen mit ImageJ application. Bereits optisch waren insbesondere 4 Wochen nach STZ-Injektion deutlich stärkere Banden im Bereich des pMOR-Proteins zu sehen (Abb.11). Die Auswertung ergab 2 Wochen nach STZ-Injektion einen leichten Abfall der Proteinmenge ohne statistische Signifikanz (Abb.11). 4 Wochen nach STZ-Injektion zeigte sich hingegen eine signifikante Zunahme des pMOR-Proteins um mehr als 80 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.11).

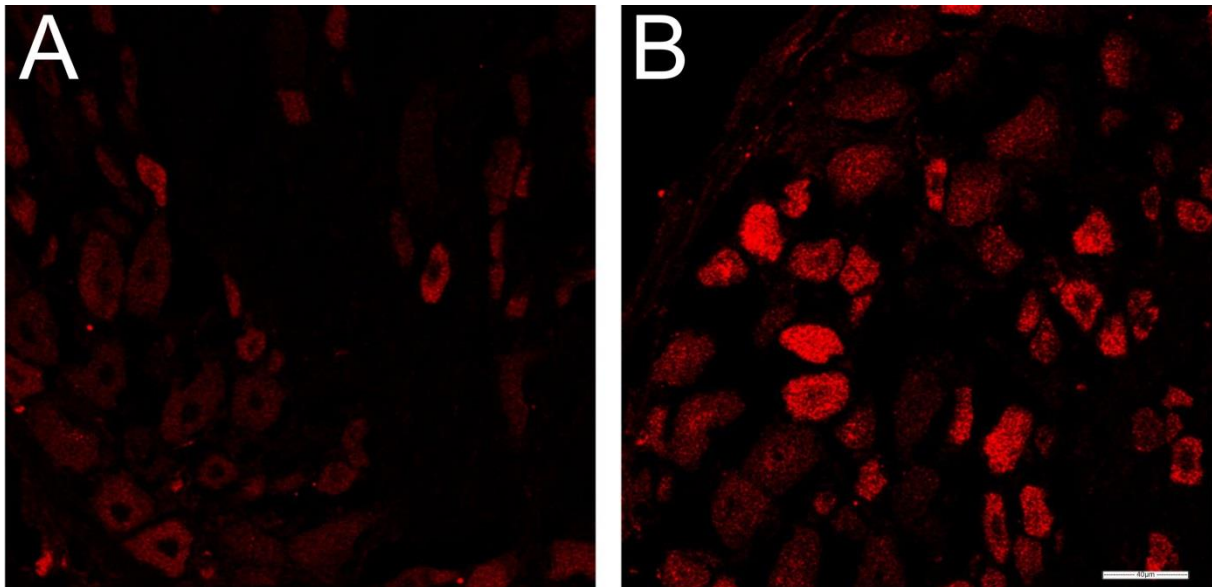


**Abb.11: Anteil der phosphorylierten  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren (pMOR) in den Spinalganglien nach Western Blot-Auswertung - Verlauf nach STZ-induziertem Diabetes im Vergleich zur Kontrollgruppe:** Ausgewertet wurden die Blots durch Analyse der integrated optical density. 2 Wochen nach STZ-Injektion besteht eine geringe MOR-Protein-Abnahme, die jedoch statistisch nicht signifikant ist. 4 Wochen nach STZ-Injektion zeigt sich hingegen eine signifikante Vermehrung der pMOR von mehr als 80% im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Banden bei 55 kDa. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM: \*  $p < 0,05$  (One Way ANOVA, post-hoc-Student-Newman-Keuls-Test,  $n=6$  je Gruppe).

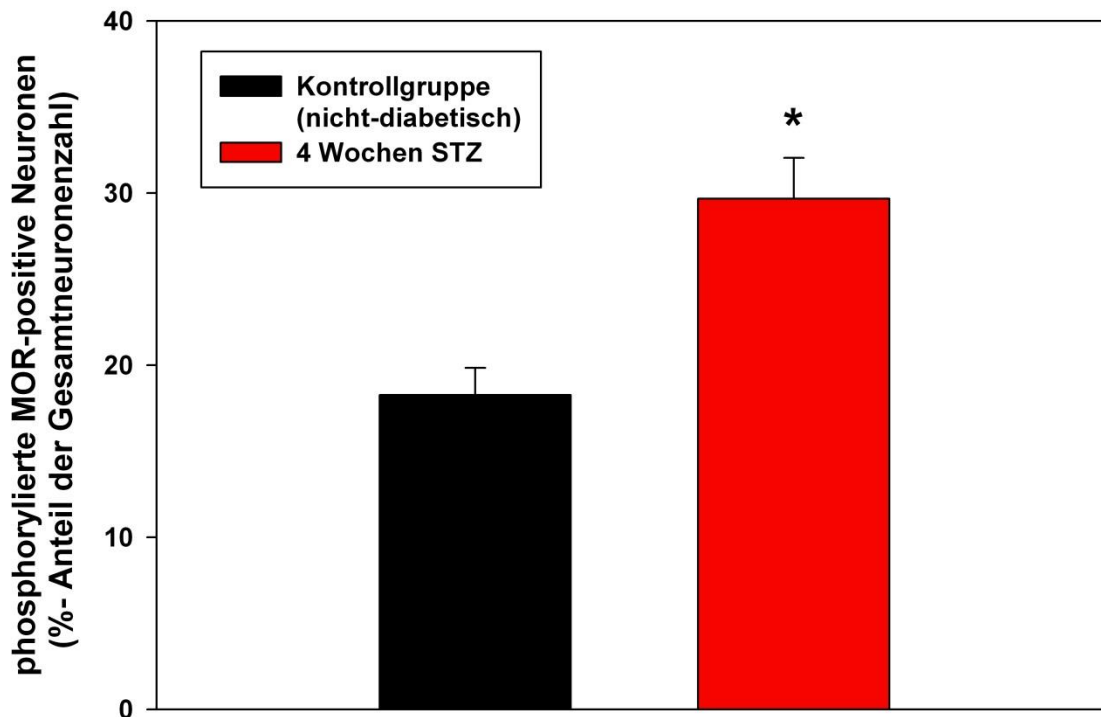


## 6.5.2 Immunhistochemischer Nachweis phosphorylierter $\mu$ -Opioidrezeptoren

Zum mikroskopischen Nachweis der pMOR wurden Gewebeschnitte aus den Spinalganglien, wie in 5.2.5.3 beschrieben, ausgewertet. Bereits die optische Begutachtung der Schnitte zeigte eine deutlich erhöhte Anzahl pMOR-positiver Neurone bei der Diabetes-Gruppe im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Abb. 12). Die Auswertung der Schnitte ergab eine signifikant erhöhte Anzahl pMOR-positiver Neurone in der Diabetesgruppe auf mehr als 30 %, bezogen auf die Gesamtzahl der Neurone im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.13).



**Abb.12: pMOR in Spinalganglien nicht-diabetischer Kontrolltiere (A) und diabetischer Tiere 4 Wochen nach STZ-Behandlung (B):** Die Abbildung zeigt Neuronen aus immunhistochemischen Schnitten der Spinalganglien diabetischer und nicht-diabetischer Ratten, welche mit Anti-pMOR-Antikörper gegen phosphorylierte  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren (pMOR) angefärbt sind. Die deutlich fluoreszierenden Neuronen können als pMOR-positiv angesehen werden und wurden im Verhältnis zur erkennbaren Gesamtneuronenzahl prozentual berechnet. (B) zeigt 4 Wochen nach STZ-Injektion eine deutlich erhöhte Anzahl der pMOR im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (A). Beide Aufnahmen sind mit identischem Helligkeits- und Kontrastlevel dargestellt.

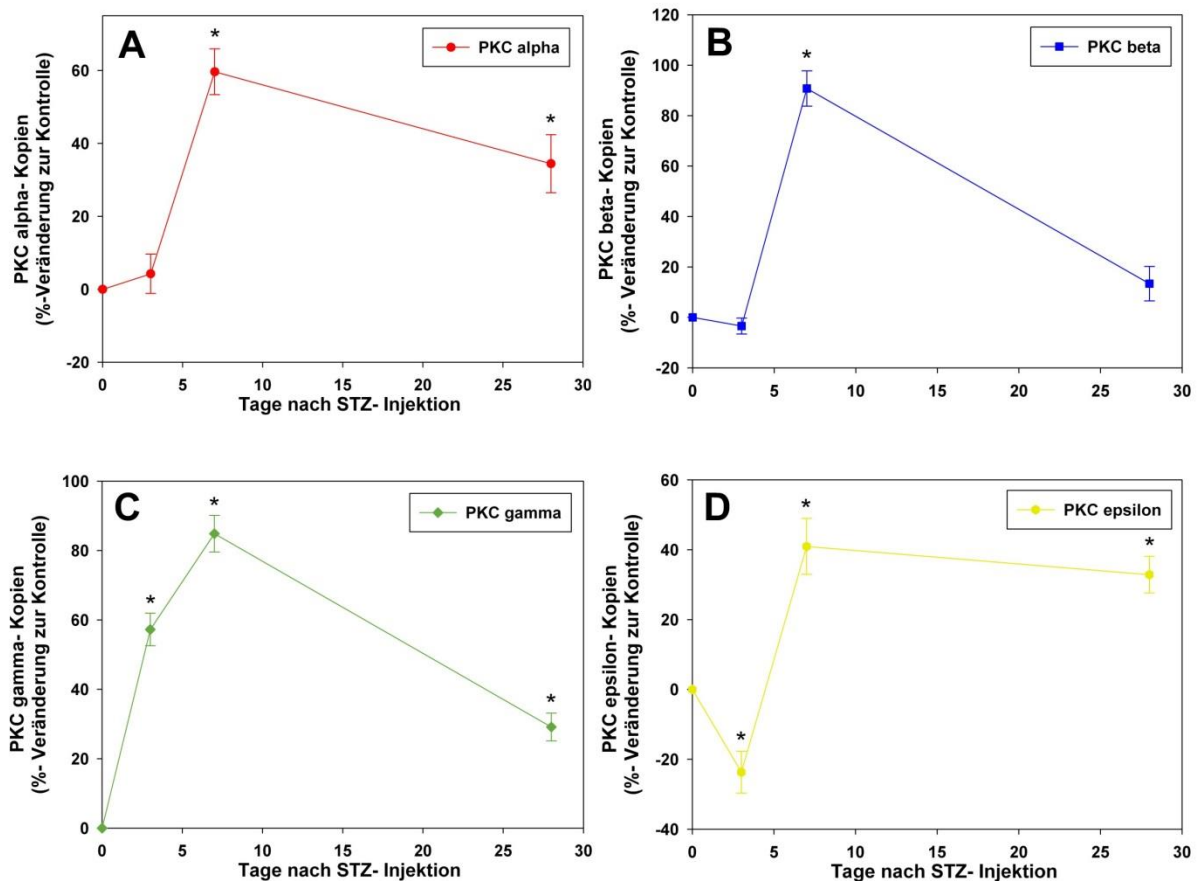


**Abb.13: Anteil der pMOR an der Gesamtzellzahl in Spinalganglien - Vergleich zwischen nicht-diabetischer Kontrollgruppe und Diabetesgruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion:** Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der Neuronen mit deutlich positiver Antikörperfärbung gegen pMOR. Dargestellt ist der prozentuale Anteil im Vergleich zur Gesamtneuronenzahl. Die Anzahl der pMOR liegt in der Kontrollgruppe bei 18 %. Im Vergleich hierzu zeigt die Diabetesgruppe einen signifikanten Anstieg auf 30%. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Stabw: \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U test,  $n=5$  je Gruppe).

## **6.6 Aktivierung der Proteinkinase C in der Frühphase**

### **6.6.1 Proteinkinase C-mRNA-Nachweis**

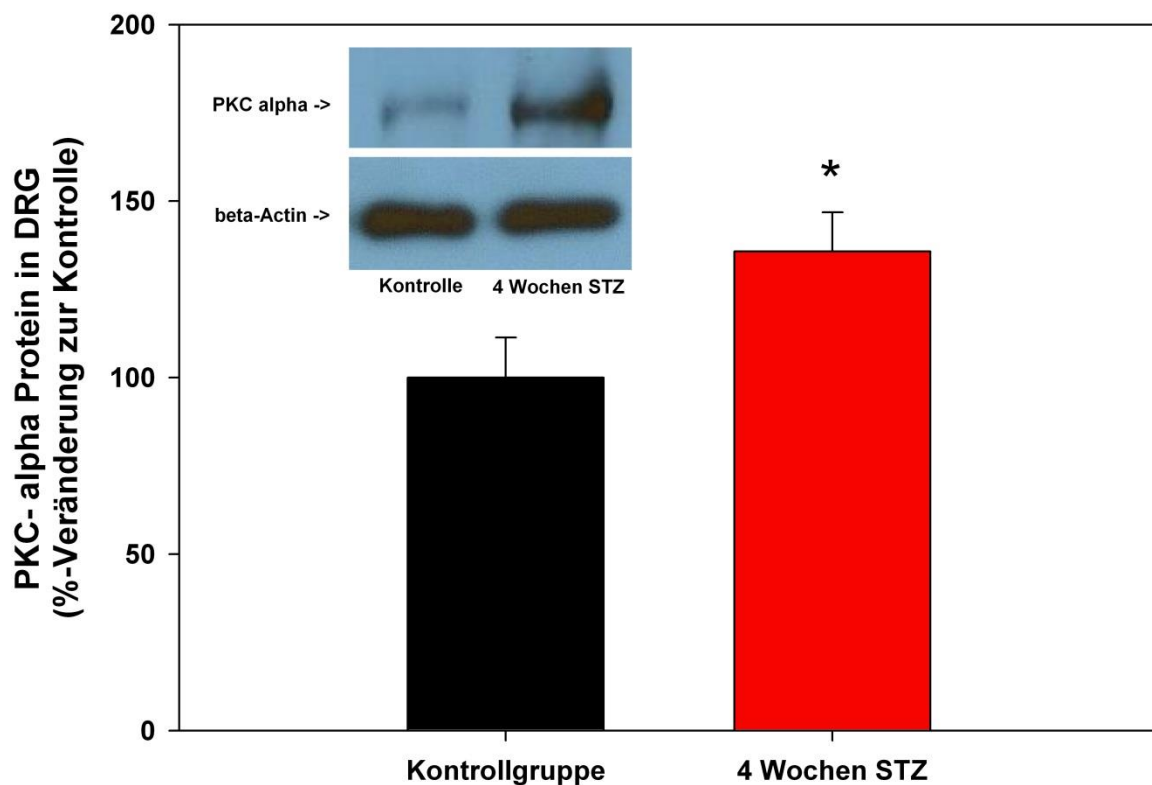
Die Analyse des mRNA-Gehaltes der PKC-Isoformen in den Spinalganglien wurde, wie in 5.2.3.2. beschrieben, 3, 7 und 28 Tage nach STZ-Injektion durchgeführt. Während 3 Tage nach STZ-Injektion sowohl bei PKC alpha, als auch bei PKC beta keine signifikante Vermehrung der mRNA-Kopien nachweisbar war (Abb.14), konnte bei PKC gamma ein signifikanter Anstieg um fast 60 % gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb.14). Die PKC epsilon-mRNA-Kopien hingegen zeigten sogar einen signifikanten Abfall um mehr als 20 % im Vergleich zur Kontrolle (Abb.14). 7 Tage nach STZ-Injektion zeigte sich bei allen gemessenen PKC ein signifikanter Anstieg der Kopienzahl, am stärksten bei PKC beta und PKC gamma, deren Kopienzahl sich zu diesem Zeitpunkt auf mehr als 80 % im Vergleich zur Kontrolle gesteigert hatte (Abb.14). PKC epsilon zeigte hierbei den geringsten Anstieg. 28 Tage nach STZ-Injektion zeigten sich bei PKC alpha sowie PKC gamma wieder signifikant niedrigere Kopienzahlen, jedoch noch immer signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Abb.14). Die Kopienzahl der PKC beta lag nach 28 Tagen bereits wieder im Normbereich. Einzig die PKC epsilon, welche nach 7 Tagen den geringsten Kopienanstieg verzeichnet hatte, zeigte nach 28 Tagen keinen signifikanten Abfall und war dementsprechend noch immer signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle (Abb.14).



**Abb.14: PKC-mRNA-Kopien nach quantitativer real time PCR in diabetischen Wistar-Ratten von PKC alpha (A), PKC beta (B), PKC gamma (C) und PKC epsilon (D) - Verlauf der ersten 4 Wochen nach STZ-Injektion:** Die Grafik zeigt die prozentuale Veränderung der mRNA-Kopien im Vergleich zum Kontrollprotein RPL-19 zu den Messzeitpunkten nach 3, 7 und 28 Tagen. 3 Tage nach STZ-Injektion zeigt PKC gamma (C) einen signifikanten Anstieg der mRNA-Kopien im Vergleich zur Kontrolle, PKC epsilon (D) einen signifikanten Abfall der Kopienzahl. PKC alpha (A) und PKC beta (B) zeigen nach 3 Tagen keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Kopien. 7 Tage nach STZ-Injektion ist bei allen gemessenen PKC-Isoformen (A-D) die mRNA-Kopienzahl signifikant erhöht. Den höchsten Anstieg im Vergleich zur Kontrolle zeigt hierbei PKC beta (B), den geringsten PKC epsilon (D). 4 Wochen nach STZ-Injektion ist die Kopienzahl von PKC alpha (A), PKC beta (B) und PKC gamma (C) wieder signifikant abgefallen im Vergleich zur Messung nach 7 Tagen. Die Kopien von PKC alpha (A) sowie PKC gamma (C) sind jedoch noch immer signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrolle. PKC beta (B) hingegen zeigt eine Kopienzahl, die sich von der Kontrolle nicht signifikant unterscheidet. Die PKC epsilon-Kopienzahl (D) zeigte in der Vergleichsmessung nach 7 Tagen keinen signifikanten Abfall. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Stabw: \*  $p < 0,05$  (Two Way ANOVA, post-hoc-Bonferroni t-Test, n=12 je Gruppe).

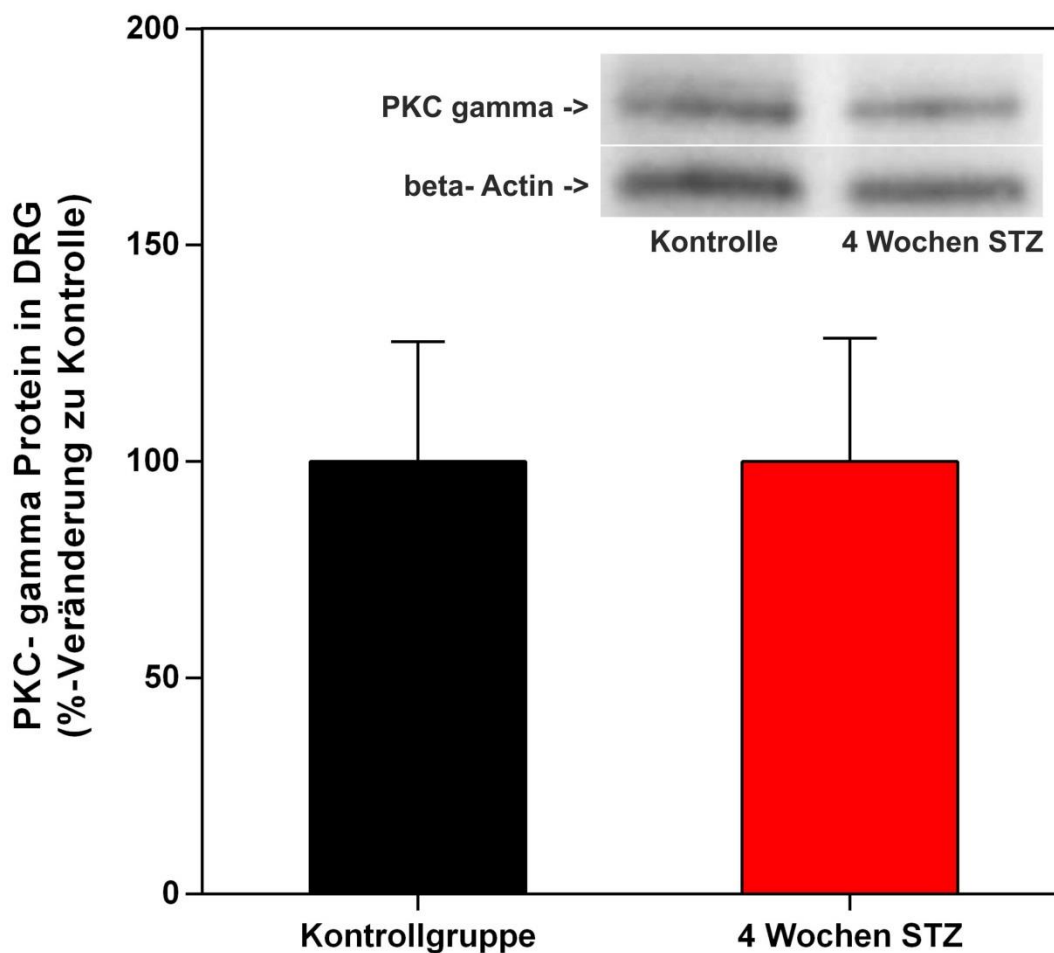
## 6.6.2 Quantitativer Nachweis der Proteinkinase C-Proteine alpha und gamma

Bereits bei Betrachtung der Western Blot-Banden konnten bei diabetischen Tieren, 4 Wochen nach STZ-Injektion, im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe deutlich verdickte Banden festgestellt werden (Abb.15). Die densitometrische Auswertung der Banden mit ImageJ application ergab in Bezug auf das PKC alpha-Protein 4 Wochen nach STZ-Injektion eine signifikante Intensitätszunahme der integrated optical density im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Abb.15).



**Abb.15: PKC-alpha-Proteinnachweis in den Spinalganglien nach Western Blot-Auswertung - Prozentuale Veränderung 4 Wochen STZ-Induktion eines Diabetes mellitus im Vergleich zur Kontrollgruppe:** Ausgewertet wurden die Western Blots durch Analyse der integrated optical density. 4 Wochen nach STZ-Injektion zeigt sich eine signifikante Intensitätszunahme des PKC-alpha-Proteins (bei 72 kDa) um mehr als 30 % im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Banden bei 72 kDa. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  SEM: \* p<0,05 (Mann-Whitney U test, n=7 je Gruppe).

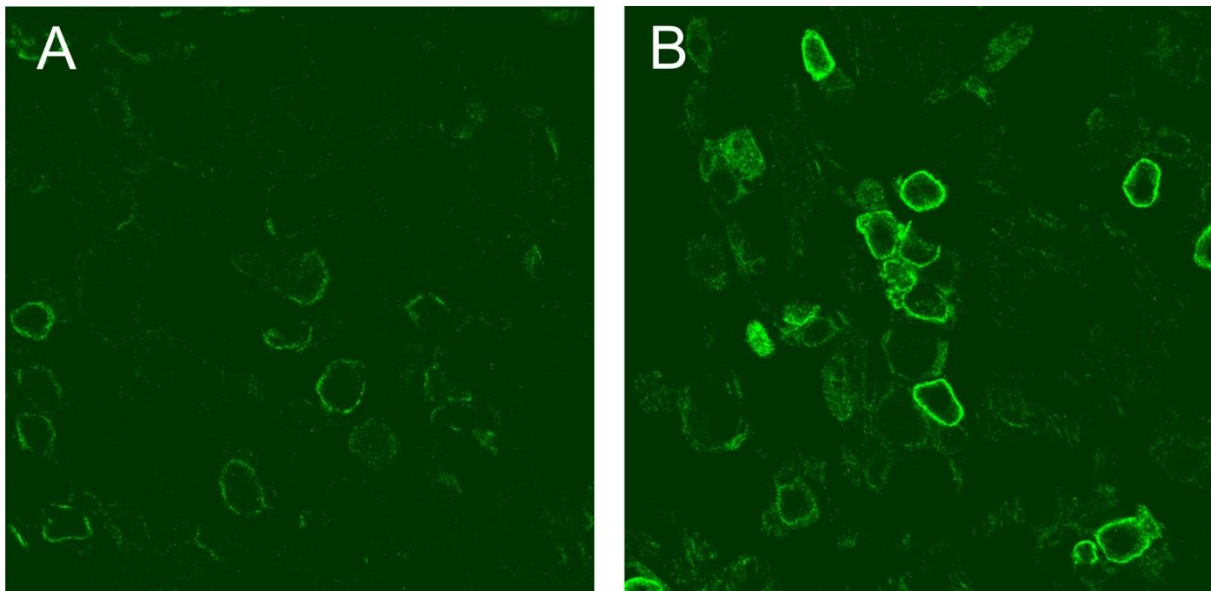
Im Gegensatz zu der signifikanten Intensitätszunahme in der densitometrischen Untersuchung des PKC-alpha-Protein (Abb. 15), zeigt sich bei selbiger Messung des PKC-gamma-Protein keine signifikante Veränderung der Intensität im Vergleich zur nicht diabetischen Kontrollgruppe (Abb.16). Die Ergebnisse sind mit den Ergebnissen der quantitativen real time PCR vereinbar, die bezüglich der PKC-gamma nach initialem Anstieg der Kopien nach 7 Tagen, einen erneuten Abfall der Kopienzahl auf die Ausgangswerte zeigen konnte (Abb.14).



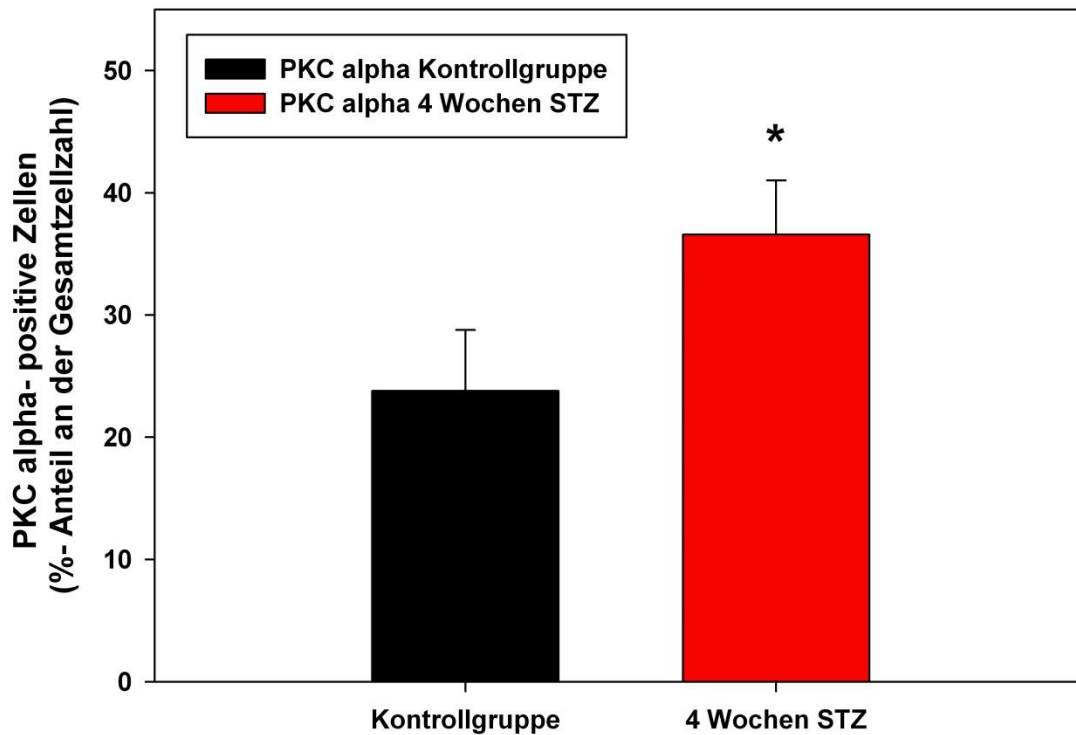
**Abb.16: PKC-gamma-Proteinnachweis in den Spinalganglien nach Western Blot-Auswertung - Prozentuale Veränderung 4 Wochen STZ-Induktion eines Diabetes mellitus im Vergleich zur Kontrollgruppe:** Ausgewertet wurden die Westernblots durch Analyse der integrated optical density. 4 Wochen nach STZ-Injektion zeigt sich im Gegensatz zu PKC-alpha (vgl. Abb. 15) keine signifikante Intensitätszunahme des PKC-gamma-Proteins im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Banden bei 72 kDa. Die Daten sind dargestellt als MW ± SEM: \* p<0,05 (Mann-Whitney U -test, n=8 je Gruppe).

### 6.6.3 Immunhistochemischer Nachweis von Proteinkinase C alpha in Spinalganglien

Der Nachweis PKC alpha-positiver Neuronen in den Spinalganglien erfolgte nach dem in 5.2.5.3 beschriebenen Verfahren. Bereits die optische Begutachtung der Schnitte zeigte eine deutlich erhöhte Anzahl PKC-alpha-positiver Neurone bei der Diabetes-Gruppe im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Abb. 17). Die Auswertung der Schnitte ergab eine im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe signifikant erhöhte Anzahl an PKC-alpha-positiven Neuronen 4 Wochen nach STZ-Injektion um mehr als 50 % (Abb.18).



**Abb.17: PKC-alpha-aktive Neuronen in Spinalganglien nicht-diabetischer Tiere (A) und diabetischer Tiere 4 Wochen nach STZ-Injektion (B):** Die Abbildung zeigt Neuronen aus immunhistochemischen Schnitten der Spinalganglien diabetischer und nicht-diabetischer Ratten, welche mit Anti-PKC-alpha-Antikörpern angefärbt sind. Die deutlich fluoreszierenden Neuronen können als PKC-alpha-positiv angesehen werden und wurden im Verhältnis zur erkennbaren Gesamtneuronenzahl prozentual berechnet. Es ist deutlich zu erkennen, dass die PKC-alpha-Aktivität 4 Wochen nach STZ-Injektion (B) stark zugenommen hat im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (A). Beide Aufnahmen sind mit identischem Helligkeits- und Kontrastlevel dargestellt.



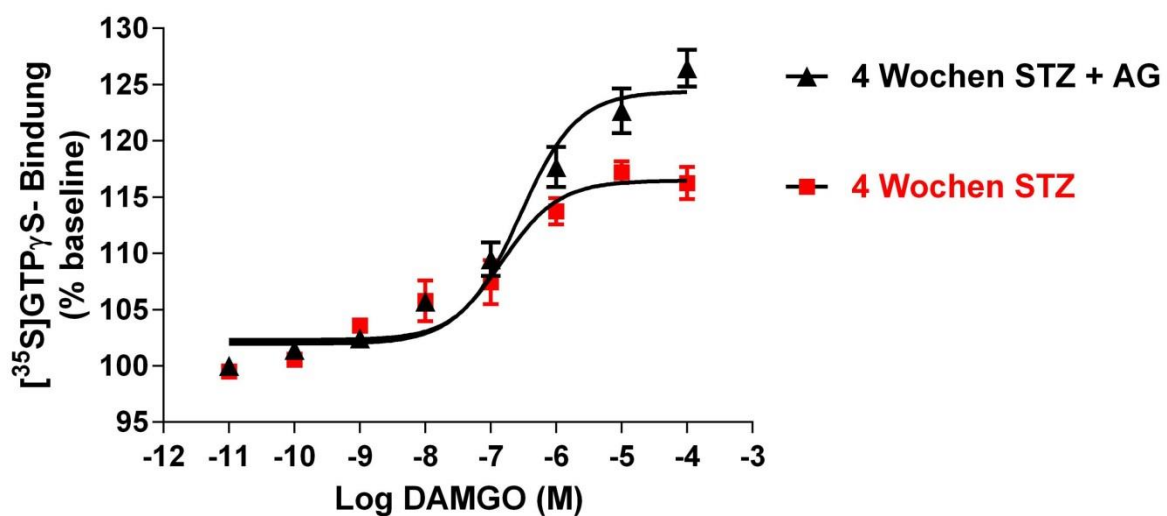
**Abb.18: PKC-alpha-positive Neuronen in Spinalganglien - Vergleich zwischen nicht-diabetischen Kontrolltieren und diabetischen Tieren 4 Wochen nach STZ-Injektion:** Die Auswertung erfolgte anhand einer Auszählung der deutlich PKC alpha-positiven Neurone als prozentualer Anteil der Gesamtzellzahl. Im Vergleich zur Kontrollgruppe findet sich bei den diabetischen Tieren 4 Wochen nach STZ-Injektion eine signifikant erhöhte Anzahl PKC alpha-positiver Neurone. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Stabw: \*  $p < 0,05$  (Mann-Whitney U test,  $n=5$  je Gruppe).



## 6.7 Auswirkungen der Aminoguanidin-Behandlung

### 6.7.1 Einfluss auf die Signalübertragung am $\mu$ -Opioid-Rezeptor

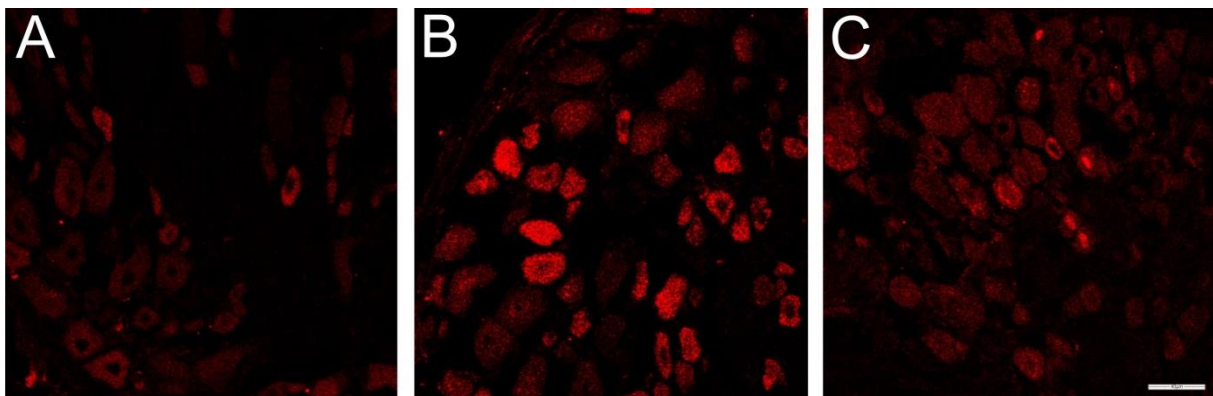
In 6.4.2 konnte gezeigt werden, dass die [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung 4 Wochen nach STZ-Induktion signifikant reduziert ist im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (vgl. Abb.10). Durch die gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin konnte die [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung signifikant gesteigert werden im Vergleich zur Diabetesgruppe ohne Aminoguanidin-Therapie (Abb.19).



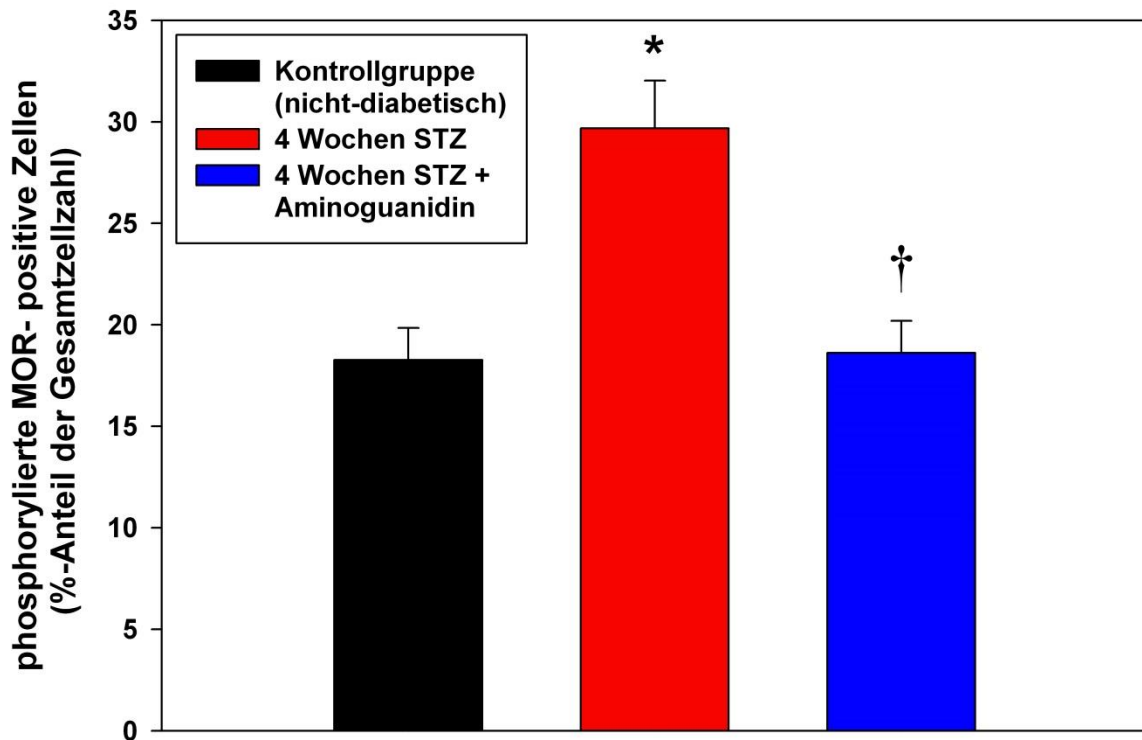
**Abb.19: [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudie an membrangebundenen MOR) - Vergleich zwischen STZ-Gruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion und STZ-Gruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion mit gleichzeitiger Aminoguanidin-Behandlung (AG):** Die Grafik zeigt deutlich, dass die Bindung von [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S an das G-Protein von MOR 4 Wochen nach STZ-Injektion mit gleichzeitiger Aminoguanidin-Behandlung im Vergleich zur diabetischen Kontrollgruppe ohne Aminoguanidin-Behandlung signifikant zugenommen hat bei hohen DAMGO-Konzentrationen durch die alle MOR besetzt sind. Die durch die gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin erreichte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S das Niveau der nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Vgl. Abb. 10) Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Stabw:  $p < 0,05$  (One Way ANOVA, post-hoc-Student-Newman-Keuls-Test,  $n=5$  je Gruppe).

## 6.7.2 Einfluss auf die Anzahl phosphorylierter $\mu$ -Opioidrezeptoren

Verglichen wurden Gewebeschnitte aus den Spinalganglien nicht-diabetischer Tiere mit denen diabetischer Tiere, 4 Wochen nach STZ-Injektion, sowie diabetischer Tiere mit gleichzeitiger Aminoguanidin-Behandlung. Die Auswertung erfolgte wie in 5.2.5.3 beschrieben. Bereits die optische Betrachtung der Gewebeschnitte zeigte 4 Wochen nach STZ-Injektion eine im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe erhöhte Anzahl von pMOR (vgl. 6.5.2). Bei gleichzeitiger Aminoguanidin-Behandlung war im Vergleich zur Diabetesgruppe ohne Aminoguanidin-Behandlung eine deutliche Reduktion der pMOR zu erkennen, welche eine ähnliche Anzahl an pMOR zeigte, wie sie auch bei der Kontrollgruppe zu sehen war (Abb.20). Die Auswertung der immunhistologischen Schnitte ergab 4 Wochen nach STZ-Injektion eine signifikant erhöhte Anzahl von pMOR auf mehr als 30 % der Gesamtneuronenzahl im Vergleich zu den rund 19 % der nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Abb.21). Bei gleichzeitiger Aminoguanidin-Behandlung diabetischer Tiere, konnte die Anzahl pMOR-positiver Neurone im Vergleich zur Diabetesgruppe ohne Aminoguanidin-Behandlung signifikant reduziert werden und erreichte Werte der nicht-diabetischen Kontrollgruppe (Abb.21).



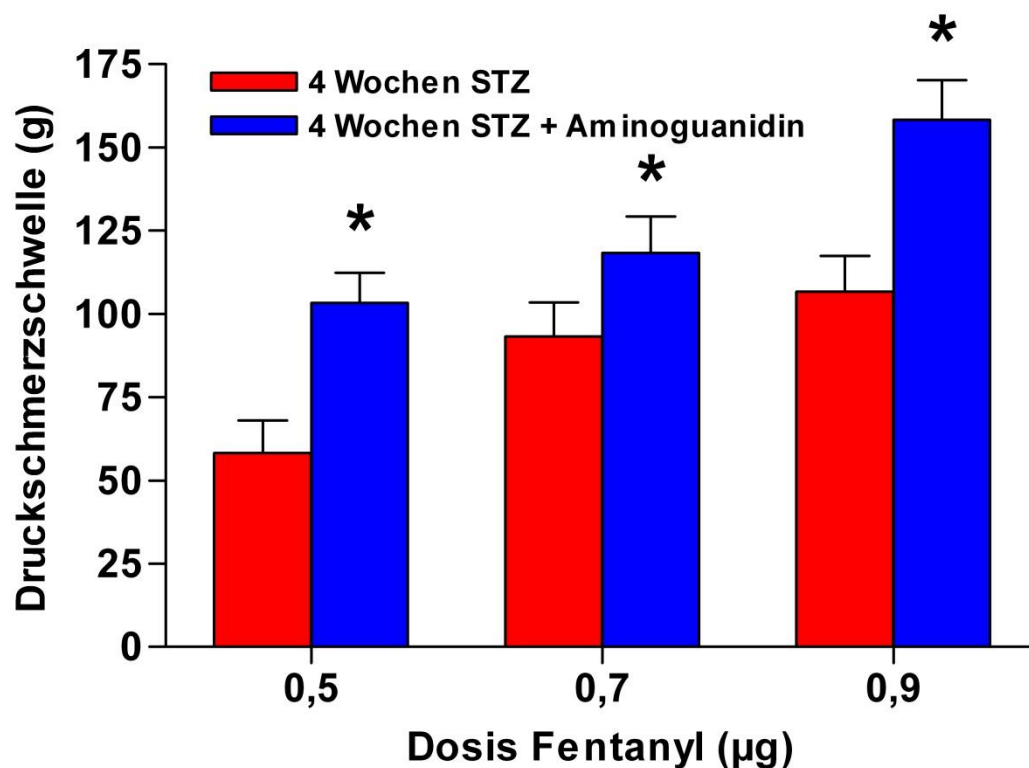
**Abb.20: pMOR in Spinalganglien nicht-diabetischer Tiere (A), diabetischer Tiere 4 Wochen nach STZ-Injektion (B) und diabetischer Tiere nach Behandlung mit Aminoguanidin (C):** Die Abbildungen zeigen Neuronen aus immunhistochemischen Schnitten der Spinalganglien nicht-diabetischer Ratten, diabetischer Ratten und diabetischer Ratten nach Aminoguanidin-Behandlung, welche mit Anti-pMOR-Antikörper gegen phosphorylierte  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren (pMOR) angefärbt sind. Die deutlich fluoreszierenden Neuronen können als pMOR-positiv angesehen werden und wurden im Verhältnis zur erkennbaren Gesamtneuronenzahl prozentual berechnet. 4 Wochen nach STZ-Injektion (B) zeigt sich eine deutliche Zunahme der phosphorylierten MOR im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (A). Die Behandlung diabetischer Tiere mit Aminoguanidin (C) führt zu einer deutlichen Reduktion der phosphorylierten MOR. Alle Aufnahmen wurden mit identischem Helligkeits- und Kontrastlevel dargestellt.



**Abb.21: Anteil der pMOR an der Gesamtzellzahl in Spinalganglien - Vergleich zwischen nicht-diabetischer Kontrollgruppe, Diabetesgruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion und Aminoguanidin-behandelter Diabetesgruppe, ebenfalls 4 Wochen nach STZ-Injektion:** Die Auswertung erfolgte durch Auszählung der Neuronen mit deutlich positiver Antikörperfärbung gegen pMOR. Dargestellt ist der prozentuale Anteil im Vergleich zur Gesamtneuronenzahl. Die Anzahl der pMOR liegt in der Kontrollgruppe bei 18 %. Im Vergleich hierzu zeigt die Diabetesgruppe einen signifikanten Anstieg auf 30 %. Durch die Behandlung mit Aminoguanidin konnte die Anzahl der pMOR im Vergleich zur STZ-Gruppe signifikant reduziert werden und erreichte Werte der nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Die Daten sind dargestellt als MW  $\pm$  Stabw: \* † p<0,05 (One Way ANOVA, post-hoc-Student-Newman-Keuls-Test, n=5 je Gruppe).

### 6.7.3 Einfluss auf die verminderte periphere Opioid-Ansprechbarkeit

Die Messung der DSS wurde, wie in 5.2.1.6 beschrieben, im Vergleich zwischen diabetischen Tieren 4 Wochen nach STZ-Injektion und diabetischen Tieren mit gleichzeitiger Aminoguanidin-Behandlung durchgeführt. Es zeigte sich bei allen untersuchten Fentanyl-Konzentrationen ein signifikanter Anstieg der DSS in der Aminoguanidin-Gruppe im Vergleich zur diabetischen Kontrollgruppe als Zeichen einer erhöhten peripheren Ansprechbarkeit auf Opioidanalgetika durch die gleichzeitige Behandlung diabetischer Tiere mit Aminoguanidin (Abb.22).



**Abb.22: DSS gemessen mit dem Algesiometer - Vergleich zwischen Diabetesgruppe 4 Wochen nach STZ-Injektion und Diabetesgruppe nach Behandlung mit Aminoguanidin:** Die Tiere wurden mit 0,25g/250ml/d Aminoguanidin p.o. über 7 Tage behandelt. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe zeigte sich bei allen applizierten Fentanyl-Konzentrationen eine signifikant erhöhte DSS. Die Daten sind dargestellt als MW ± Stabw: \* p<0,05 (Two Way ANOVA, post-hoc-Bonferroni t-Test, n=6 je Gruppe).

## 7 Diskussion

### 7.1 Darstellung der Hauptergebnisse

Die wesentlichen Ergebnisse dieser Doktorarbeit zeigen den Verlust der analgetischen Wirksamkeit des  $\mu$ -Agonisten Fentanyl in der Frühphase (nach 4 Wochen) eines STZ-induzierten Diabetes mellitus. In dieser Phase gibt es keine quantitative Veränderung in der Anzahl an MOR auf peripher sensorischen Neuronen. Jedoch zeigen die Ergebnisse eine signifikante Zunahme in dem Ausmaß der Phosphorylierung und damit der Desensitivierung der MOR peripher sensorischer Neurone. Infolgedessen kommt es zu einer signifikant reduzierten G-Protein-Kopplung. Als mögliche Ursache der vermehrten MOR-Phosphorylierung zeigte sich eine erhöhte PKC-Expression und -Aktivität peripher sensorischer Neurone. Die Inhibition der PKC-Aktivität führte zu einer Verhinderung der MOR-Phosphorylierung mit konsekutiv gesteigerter G-Protein-Bindung am MOR sowie einer gesteigerten Ansprechbarkeit auf den  $\mu$ -Agonisten Fentanyl in den Verhaltensversuchen. Eine mögliche Ursache für die Diabetes-induzierte, vermehrte PKC-Expression und -Aktivität könnte der vermehrte Anfall an AGE sein. Tatsächlich zeigten erste Ergebnisse, dass mit einer Aminoguanidin-Behandlung, die bekanntermaßen die Bildung von AGE verhindert, die PKC-Aktivierung, sowie letztendlich die MOR-Phosphorylierung aufgehoben werden konnte.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die verringerte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika, in der Frühphase der diabetischen Neuropathie vor allem durch eine vermehrte Anzahl phosphorylierter MOR, bei gleichbleibender Anzahl an Gesamt-MOR, bedingt ist. Die erhöhte Expression der PKC-Isoformen als wahrscheinliche Ursache der MOR-Phosphorylierung sowie deren Reversibilität mit konsekutiver Verbesserung der Folgen durch die gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin, unterstreicht die These, dass eine Hauptursache in der vermehrten peripheren Akkumulation von AGE zu suchen ist.

## 7.2 Verlust der Ansprechbarkeit auf peripher wirksame Opioid-Analgetika

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Frühphase der diabetischen Neuropathie 4 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus der Wirksamkeitsverlust des  $\mu$ -Agonisten Fentanyl in ausschließlich peripher wirksamen Dosierungen festgestellt werden (vgl. 6.2.3). Es ist bereits mehrfach durch Studien belegt, dass in der Frühphase der diabetischen Neuropathie eine verstärkte Antwort der Diabetesgruppe auf Druck-induzierte, nozizeptive Stimuli im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe festgestellt wurde [[45]; [46]].

Die verminderte Ansprechbarkeit auf peripher wirksame Opioidanalgetika ist vornehmlich in der Spätphase der diabetischen Neuropathie belegt, die in einem Zeitraum von 8-12 Wochen nach STZ-Injektion angesiedelt wird. So konnten Malcangio und Tomlinson 1998 nachweisen, dass 8 Wochen nach Diabetes-Induktion die doppelte Dosis Morphin verabreicht werden musste, um den gleichen antinozizeptiven Effekt zu bewirken, wie er in der nicht-diabetischen Kontrollgruppe auftrat [9].

In der Frühphase der diabetischen Neuropathie, bis zu 4 Wochen nach STZ-Injektion, liegen jedoch offenbar andere Mechanismen der verminderten Opioid-Ansprechbarkeit zugrunde. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in rein peripher wirksamen Konzentrationen eine signifikant verminderte Ansprechbarkeit auf lokal injizierte  $\mu$ -Rezeptor-Agonisten vorhanden ist.

Auch die Frühphase war bereits in der Vergangenheit mehrfach Gegenstand experimenteller Studien. Die Forschungsgruppe um Simon konnte bereits 1981 nachweisen, dass die Sensitivität gegenüber Morphin bei diabetischen Mäusen signifikant reduziert ist. Dies wurde anhand von Verhaltensversuchen durch die Messung der ED 50 des injizierten Morphins nach subcutaner Applikation festgestellt. Es zeigte sich bei der diabetischen Gruppe eine signifikant erhöhte ED 50 im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe im tail-flick-Test und dementsprechend gesteigerter Morphin-Bedarf diabetischer Tiere. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die erhöhten Blutglukosespiegel für den gesteigerten Morphin-Bedarf verantwortlich sind [11]. Ähnliche Ergebnisse mit subcutan appliziertem Morphin lieferten 1992 Kamei et al. [13]. In der gleichen Veröffentlichung ist auch eine verminderte Morphin-Ansprechbarkeit diabetischer Tiere im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe im tail-flick-Test nach intra-cerebro-ventrikulärer

Applikation von Morphin beschrieben [13]. Ähnliche Ergebnisse lieferte die intraperitoneale Dihydroetorphine-Applikation im tail-flick-Test, die ebenfalls den zentralen Opioid-Effekt zum Forschungsgegenstand hatte [47]. Courteix et al. zeigten 1994 nach i.v.-Applikation aufsteigender Morphin-Konzentrationen eine signifikant reduzierte Druckschmerzschwelle diabetischer Ratten im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe [48].

Erstmals unter Verwendung von Fentanyl konnte 2001 von Zurek et al. nach intraperitonealer Applikation im tail-flick-Test sowie unter elektrischer Auslösung nozizeptiver Stimuli eine signifikant reduzierte DSS der Diabetesgruppe im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe festgestellt werden [14]. Die Messungen der genannten Arbeiten erfolgten in der Regel anhand chemisch-thermal-induzierter Stimuli.

Messungen der mechanischen Nozizeption durch Ermittlung der DSS erfolgten vornehmlich durch die Forschungsgruppe um Chen. Diese zeigte 2002 nach intravenöser Morphin-Applikation eine signifikant reduzierte Druckschmerzschwelle der Diabetesgruppe im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe [49]. Auch eine weitere Arbeit der Chen-Gruppe zeigte den verminderten antinozizeptiven Morphin-Effekt in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, ebenfalls gemessen anhand der DSS [16].

Allen bisher erwähnten Arbeiten gemein ist, dass sie zwar eine reduzierte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie nahelegen, jedoch lagen die verwendeten Morphinkonzentrationen im systemisch-wirksamen Bereich, sodass hier zusätzliche Mechanismen im zentralen Nervensystem nicht ausgeschlossen werden können. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich  $\mu$ -Agonisten in peripher-wirksamen Dosierungen verwendet zur Untersuchung der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie, einer Erkrankung des peripheren Nervensystems.

Zusammenfassend kann also festgestellt werden, dass es bereits einige Veröffentlichungen hinsichtlich der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie gab. Die späte Phase der diabetischen Neuropathie, 8-12 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus war in der Vergangenheit häufig Gegenstand der Forschung. Demgegenüber beschäftigt sich die vorliegende Arbeit mit dem genannten Phänomen in der Frühphase bis zu 4 Wochen nach STZ-Injektion. In

der Spätphase liegen der verminderten Ansprechbarkeit andere Mechanismen zugrunde als in der Frühphase, wie eine verminderte Expression und ein vermehrter Abbau von MOR [50]. In 6.3.1. und 6.3.2. konnte gezeigt werden, dass diese Mechanismen in der frühen Phase offenbar keine Rolle spielen, da die Quantität peripherer MOR 4 Wochen nach STZ-Injektion unverändert ist im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. In den bisherigen Veröffentlichungen zur verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der besagten Frühphase wurde in der Regel die Wirkung von Opioiden in Dosierungen mit zentral-wirksamem Effekt getestet, meist in Verbindung mit Messungen chemisch-induzierter, nozizeptiver Stimuli. Hier können jedoch zusätzliche Effekte auf spinaler und supraspinaler Ebene nicht ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit konnte der Effekt einer verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie nun ausschließlich im Bereich des peripheren Nervensystems gezeigt werden, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die auslösenden Mechanismen vor allem auf der Ebene der peripheren Neurone, deren Signalübertragung und Enzymexpression zu suchen sind.



### **7.3 Verminderte Ansprechbarkeit peripher wirksamer Opioid-Analgetika**

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die verminderte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie offensichtlich nicht durch eine Reduktion der MOR bedingt ist. Dies konnte sowohl anhand der MOR-Western Blot-Analysen (vgl. 6.3.1) als auch anhand der immunhistochemischen MOR-Färbung mit quantitativer Auswertung MOR-positiver Neuronen (vgl. 6.3.2) in den Spinalganglien diabetischer Tiere im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe belegt werden. Der Forschungsgruppe um Courteix gelang es 1998 nachzuweisen, dass 4 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus, trotz vorhandener gesteigerter mechanischer nozizeptiver Effekte mit verminderter Ansprechbarkeit auf intravenös appliziertes Morphin, keine signifikante MOR-Reduktion im Gehirn diabetischer Ratten festzustellen war [15]. Grundlage dieser Studie bildeten DAMGO-Bindungsstudien an MOR. Hier zeigte sich keine signifikante Veränderung im DAMGO-Bindungsverhalten an den Rezeptoren. So konnten indirekt Rückschlüsse auf die Anzahl der Rezeptoren gezogen werden, welche eng mit dem DAMGO-Bindungsverhalten verbunden ist. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, welche die verminderte periphere Opioid-Ansprechbarkeit behandelt, die anhand quantitativer MOR-Messungen in den Spinalganglien durchgeführt wurde, handelte es sich hierbei um zentrale MOR, die direkt cerebral entnommen wurden. In der gleichen Studie stellte Courteix fest, dass bei gleichbleibender MOR-Anzahl sowohl Morphin-clearance, als auch Verteilungsvolumen der Diabetesgruppe im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe signifikant gesteigert waren [15]. Daher wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen veränderter Morphin-Pharmakokinetik und verminderter Ansprechbarkeit bei gleichzeitig quantitativ unveränderten MOR gesehen.

Der erste Nachweis quantitativ unveränderter MOR in der Frühphase der diabetischen Neuropathie auf spinaler Ebene gelang Chen et Pan 2003. Ausgangspunkt war die vorherige Arbeit der Autoren von 2002, in der ein Zusammenhang zwischen einer Hypersensitivität der Neuronen des tractus spinothalamicus diabetischer Tiere und der diabetischen Neuropathie mit verminderter Ansprechbarkeit auf Morphin hergestellt werden konnte [49]. Allerdings beschränkte sich die Arbeit auf die Analyse elektrophysiologischer Potentiale. 2003 konnte dann nach intrathekaler und somit zentraler Applikation von Morphin zunächst durch Messung der mechanischen Druckschmerzschwelle, eine verminderte Morphin-Ansprechbarkeit erneut belegt

werden [16]. Die durchgeführten DAMGO-Bindungsstudien an MOR zeigten keinen signifikanten, quantitativen Unterschied zwischen Diabetesgruppe und nicht-diabetischer Kontrollgruppe. Auch hier konnten somit Rückschlüsse auf die Rezeptorenanzahl gezogen werden, welche keine signifikanten Unterschiede zeigte [16]. Erstmals wurden in der gleichen Arbeit auch immunhistochemische MOR-Analysen durchgeführt. Diese zeigten ebenfalls keine signifikanten quantitativen MOR-Veränderungen der Diabetesgruppe im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe [16]. Trotz des Nachweises einer unveränderten MOR-Anzahl auf spinaler Ebene, handelte es sich aufgrund der Analyse von Neuronen des tractus spinothalamicus auch hier um Rezeptoren des zentralen Nervensystems.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die reduzierte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika auf die MOR des peripheren Nervensystems untersucht, da die Mechanismen in der Frühphase der diabetischen Neuropathie als einer Erkrankung vornehmlich des peripheren Nervensystems vor allem hier zu suchen sind. Wie in den zitierten Studien konnten in der vorliegenden Arbeit keine signifikant erniedrigten MOR gezeigt werden (vgl. 6.3.1 und 6.3.2), allerdings auf Ebene der peripheren Neurone, da vor allem Neurone in den Spinalganglien diabetischer Ratten untersucht wurden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine möglicherweise verringerte Anzahl an MOR auch in der frühen Phase, 4 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus, erst in jüngerer Zeit in den Fokus der Diabetesforschung gerückt ist. Die bereits veröffentlichten Arbeiten von Courteix et al. 1998 und Chen und Pan 2003 konnten zeigen, dass es in der Frühphase der diabetischen Neuropathie zu keiner signifikanten quantitativen Veränderung der MOR im zentralen Nervensystem weder auf cerebraler noch auf spinaler Ebene kommt. Die vorliegende Arbeit konnte nun ähnliche Ergebnisse für die MOR des peripheren Nervensystems darstellen. Dementsprechend scheinen die Mechanismen der reduzierten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie weder auf eine Reduktion zentraler MOR noch auf eine Reduktion peripherer MOR zurückzuführen zu sein.

#### 7.4 Verminderte G-Proteinkopplung am $\mu$ -Opioidrezeptor

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, 4 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus, zu keiner eingeschränkten Bindung von Agonisten am MOR kommt (vgl. 6.4.1). Demzufolge ist, wie auch durch Western Blot-Analyse (vgl. 6.3.1) und Immunhistochemie (vgl. 6.3.2) bestätigt, in dieser Phase der diabetischen Neuropathie keine signifikante Reduktion der MOR in peripher sensorischen Neuronen erkennbar. Festgestellt wurde jedoch eine deutlich reduzierte GTP $\gamma$ S-Bindung am MOR (vgl. 6.4.2). Die Ergebnisse legen nahe, dass der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie eine gestörte Signalübertragung am MOR zugrunde liegt.

Die unveränderte Bindung des reinen MOR-Agonisten DAMGO konnte bereits in der Frühphase der diabetischen Neuropathie in verschiedenen Kompartimenten des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden (vgl. 6.4.1). Hier sind aus der bestehenden Literatur vor allem zwei Arbeiten zu nennen: Zum einen konnte die Gruppe um Courteix 1998 zeigen, dass es in dieser Phase zu keiner signifikant erniedrigten DAMGO-Bindung an MOR aus entnommenem Hirngewebe kommt [15]. Des Weiteren gelang der Gruppe um Chen 2003 selbiger Nachweis in Neuronen des tractus spinothalamicus im spinalen Hinterhorn [16]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen die bisher veröffentlichten Arbeiten auch für peripher sensorische Neuronen aus den Spinalganglien (vgl. 6.4.1.).

Bei offensichtlich identischer quantitativer Anzahl von MOR in der Frühphase der diabetischen Neuropathie kann demnach eine mögliche Ursache der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in einer gestörten Signalübertragung am MOR gesehen werden. In der Literatur sind auch hier bereits einige Arbeiten zu finden. 2000 zeigte die Gruppe um Ohsawa, dass es 2 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus nach DAMGO-Stimulation zu keiner signifikanten Verringerung der GTP $\gamma$ S-Bindung am MOR diabetischer Mäuse kommt [51]. Untersucht wurden in dieser Arbeit Neuronen aus Gewebeextrakten von Pons und Medulla. Im gleichen Jahr veröffentlichten Pieper et al. eine Arbeit, in der ebenfalls Neuronen aus Pons und Medulla von NOD (non-obese-diabetic)-Mäusen mit gentechnisch-induziertem Diabetes

mellitus, untersucht wurden. Auch hier handelte es sich um eine GTP $\gamma$ S-Bindungsstudie nach DAMGO-Stimulation der MOR, die 2 Wochen nach Eintreten einer Hyperglykämie durchgeführt wurde. Es zeigte sich wie in der zuvor erwähnten Arbeit [51] keine eingeschränkte GTP $\gamma$ S-Bindung am MOR [52]. Beide Arbeiten zeigten somit keine eingeschränkte GTP $\gamma$ S-Bindung am MOR in der Frühphase der diabetischen Neuropathie. In beiden Arbeiten wurden Neuronen des zentralen Nervensystems (in Pons/Medulla) untersucht. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit peripher sensorische Neuronen aus den Spinalganglien diabetischer Tiere und somit auf Ebene des peripheren Nervensystems untersucht. Auch wurden die Untersuchungen bislang fast ausschließlich autoradiographisch durchgeführt wodurch im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit eine deutlich schlechtere quantitative Aussage getroffen werden kann.

Ein weiterer, vielleicht entscheidender Unterschied ist die unterschiedliche Phase des STZ-induzierten Diabetes. In den zitierten Arbeiten wurden die Versuche bereits 2 Wochen nach STZ-Induktion durchgeführt. Dies könnte möglicherweise ein Hinweis darauf sein, dass die Signalübertragung am MOR in der Phase bis 2 Wochen nach der STZ-Injektion noch ungestört ist und hier andere Mechanismen für die verminderte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika zugrunde liegen. Eine weitere Möglichkeit ist in der unterschiedlichen Beeinflussung von supraspinalen Neuronen und peripherer sensiblen Neuronen durch die Diabetes-bedingten Stoffwechselveränderungen zu sehen. Dies mag in Zukunft weiterhin Gegenstand der Forschung sein.

Im Jahr 2002 veröffentlichte die Gruppe um Chen eine Arbeit, die 4 Wochen nach STZ-Injektion eine signifikant verminderte GTP $\gamma$ S-Bindung am MOR in Neuronen der Rückenmarks-Hinterhörner darstellte [53]. Dies zeigte zum ersten Mal eine Reduktion funktioneller zentraler MOR (bei unveränderter Gesamtanzahl) in der Frühphase der diabetischen Neuropathie.

Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit handelte es sich auch hier um zentrale MOR. Jedoch verstärkt die Arbeit von Chen im Vergleich zu den anderen bereits zitierten Publikationen die These, dass der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase supraspinal andere Ursachen zugrunde liegen als in peripher sensorischen Neuronen. Der Untersuchungszeitraum umfasste bei Chen, wie auch in der vorliegenden Arbeit, die Effekte 4 Wochen nach STZ-Injektion. So stützt die vorliegende Arbeit die These der gestörten Signalübertragung am MOR in peripher-

sensorischen wie auch spinalen Neuronen als eine mögliche Ursache der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnisse der GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien waren bereits 2001 von Hall et al. im Fokus der Forschung. In einer GTP $\gamma$ S-Bindungsstudie wurde in Spinalganglien diabetischer Tiere 4 Wochen nach STZ-Injektion eine signifikant erniedrigte GTPase-Aktivität nachgewiesen, wodurch Rückschlüsse auf eine mögliche Störung der Signalübertragung am MOR gezogen werden konnten [54]. Inhalt dieser Publikation war vor allem die Störung von Calciumkanälen durch verminderte G-Protein-Aktivität als mögliche Ursache für den verstärkten Calcium-Einstrom bei Diabetikern [54].

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es bereits einige Publikationen zur gestörten Signalübertragung am MOR gibt. Die Ergebnisse waren für die bekannten MOR-Lokalisationen unterschiedlich. So scheint auf supraspinaler Ebene eine gestörte MOR-Signalübertragung nicht die Ursache der reduzierten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika zu sein. Ursächlich könnten hier jedoch auch die Studien-Designs sein, die auf supraspinaler Ebene in der Regel bereits die Experimente 2 Wochen nach STZ-Injektion vorsahen. Zu diesem Zeitpunkt könnten auch andere Mechanismen als ursächlich für die verminderte Opioid-Analgetika-Ansprechbarkeit angenommen werden. Auf spinaler Ebene konnte eine verminderte GTP $\gamma$ S-Bindung am MOR nachgewiesen werden, jedoch handelte es sich auf spinaler Ebene ebenfalls um MOR in Neuronen des zentralen Nervensystems. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen die Ansprechbarkeit in MOR des peripheren Nervensystems untersucht. Ihre Ergebnisse zeigen, wie auch die Studien der Literatur, in Bezug auf die DAMGO-Bindungsstudien erneut keine Veränderungen im DAMGO-Bindungsverhalten am MOR und somit keine quantitative MOR-Veränderung und gestörte Opioid-Bindung am MOR. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Ursachen der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie in der weiteren Signalübertragung und Enzym-Expression nach der Bindung am MOR zu suchen sind.

Die von Hall et al. 2001 festgestellte reduzierte GTPase-Aktivität unterstreicht in Verbindung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit die These einer gestörten Signalübertragung am MOR durch Rezeptor-Inaktivierung bzw. -Phosphorylierung.

## 7.5 Gesteigerte Anzahl phosphorylierter $\mu$ -Opioidrezeptoren

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, 4 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus, eine signifikant erhöhte Anzahl an pMOR in den Spinalganglien diabetischer Tiere zu finden ist. Dies konnte sowohl anhand einer signifikanten pMOR-Erhöhung in der Western Blot-Analyse (vgl. 6.5.1) als auch immunhistochemisch durch die Anfärbung von pMOR mit spezifischen Antikörpern (vgl. 6.5.2) belegt werden.

In der Literatur gibt es mehrere Hinweise, dass eine vermehrte Phosphorylierung von MOR zu deren Inaktivierung führt. Dies ist aus zahlreichen Studien zur Toleranzentwicklung gegen Agonisten an MOR [55] bekannt. Aus diesem Grund ist es naheliegend, dass auch in der Entwicklung der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie eine Rezeptor-Inaktivierung, möglicherweise durch vermehrte Phosphorylierung, eine zugrunde liegende Ursache ist.

1990 zeigten Harada et al., dass eine MOR-Phosphorylierung experimentell die  $\mu$ -Agonisten-vermittelte Erhöhung der G-Protein-Kopplung signifikant reduziert [56]. Die Versuche wurden an Gewebeextrakten von Ratten durchgeführt, jedoch nicht unter diabetischen Bedingungen.

McLaughlin und Chavkin konnten 2001 erstmals einen möglichen protektiven Effekt von Insulin auf eine reduzierte Ansprechbarkeit von  $\mu$ -Agonisten am MOR aufzeigen sowie hierfür verantwortliche MOR-Domänen. Insulin konnte die DAMGO-vermittelte, gesteigerte G-Protein-Kopplung signifikant steigern, möglicherweise durch Dephosphorylierung. Da die untersuchten Domänen am MOR nach Ersatz von Tyrosin durch Phenylalanin ihre Insulin-vermittelte DAMGO-Potenzierung verloren, wurde eine Tyrosin-Phosphorylierung am MOR als wahrscheinliche Ursache der verminderten  $\mu$ -Agonisten-Wirkung vermutet [19].

Die erwähnten Arbeiten beschäftigten sich mit den grundlegenden Mechanismen der MOR-Phosphorylierung unter nicht-diabetischen Bedingungen, unterstreichen aber die These einer verminderten G-Protein-Kopplung an phosphorylierten MOR. Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die eine vermehrte Phosphorylierung von MOR im Zuge des STZ-induzierten Diabetes als eine mögliche Ursache der reduzierten

Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie gezeigt hat, kann somit auch von einer reduzierten G-Protein-Kopplung ausgegangen werden (vgl. 6.4.2).

2002 zeigten Chen et al. in der bereits in 6.4 erwähnten Arbeit, dass es in den spinalen Hinterhörnern diabetischer Ratten 4 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus zu einem Verlust funktioneller, jedoch nicht der Gesamt-MOR kommt [53]. Aufgrund der vorherigen Arbeiten wurde eine vermehrte MOR-Phosphorylierung mit konsekutivem Funktionsverlust vermutet, eine quantitative Messung von pMOR wie in der vorliegenden Arbeit (vgl. 6.5.1 und 6.5.2) wurde jedoch nicht durchgeführt.

2004 konnte durch die Gruppe um Narita erstmals eine vermehrte pMOR-Expression in spinalen Hinterhörnern von Mäusen mit induzierten neuropathischen Schmerzen durch partielle Ligatur des nervus ischiadicus nachgewiesen werden. Auch hier konnte eine signifikant reduzierte Opioid-vermittelte Antinozizeption festgestellt werden [57]. 3 Jahre später wurde von Petraschka et al. die C-terminale MOR-Domäne als Phosphorylierungs-Terminus identifiziert [58]. Beide genannten Studien zeigen in Addition eine vermehrte MOR-Phosphorylierung als wahrscheinliche Ursache für die verminderte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei chronischer Neuropathie. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit handelt es sich in beiden Fällen um eine durch Nerven-Ligatur induzierte Neuropathie, ohne diabetische Stoffwechsellage. Auch wurden Neuronen des zentralen Nervensystems untersucht. Da die diabetische Neuropathie eine Erkrankung des peripheren Nervensystems ist, zeigt die vorliegende Arbeit ähnliche Ergebnisse nun auch auf peripher-sensorischer Ebene. Interessant ist, dass aufgrund der in der Literatur beschriebenen Versuchsreihen durch chirurgisch induzierte Neuropathie offenbar ähnliche Veränderungen in der Signalübertragung am MOR induziert werden, wie dies bei der STZ-induzierten diabetischen Neuropathie der Fall ist.

2003 wurde von Shangguan et al. eine quantitative Bestimmung der  $G_{0\alpha}$ -Phosphorylierung am MOR in Spinalganglien diabetischer Ratten 4-8 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus durchgeführt. Es zeigte sich in der Western Blot-Analyse eine signifikant gesteigerte Phosphorylierung der  $G_{0\alpha}$ -Untereinheit am MOR in der Diabetesgruppe im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe bei gleichzeitig signifikant erhöhter einzelner PKC-Subtypen [59]. Die vorliegende Arbeit zeigt nun, im Vergleich zur Arbeit von Shangguan, die quantitative Phosphorylierung des gesamten

MOR-Proteins in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, nicht nur die der  $G_{0\alpha}$ -Untereinheit. Zudem wurde die Phosphorylierung durch Ermittlung der pMOR-positiven Neuronen in peripher sensorischen Neuronen auch auf mikroskopischer Ebene belegt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich bereits einige Arbeiten mit einer vermehrten MOR-Phosphorylierung als mögliche Ursachen einer verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in der Frühphase der diabetischen Neuropathie beschäftigt hatten. Die meisten bislang veröffentlichten Arbeiten zeigten zwar eine MOR-Phosphorylierung als eine mögliche Ursache auf, jedoch wurde keine quantitative Analyse von pMOR durchgeführt. Narita et al. erbrachten 2004 den Nachweis einer gesteigerten pMOR-Expression, allerdings durch Nerven-Ligatur-induzierte Neuropathie unter nicht-diabetischen Bedingungen. Die einzige Arbeit, welche auch nach STZ-induziertem Diabetes mellitus eine gesteigerte MOR-Expression in Spinalganglien nachweisen konnte, stammt von Shangguan et al. aus dem Jahre 2003. Hier beschränkte man sich auf die Analyse der Phosphorylierung der  $G_{0\alpha}$ -Untereinheit am MOR. Die vorliegende Arbeit ergänzt die bereits publizierten Arbeiten durch den quantitativen Nachweis des pMOR-Proteins in der Western Blot-Analyse sowie den quantitativen Nachweis pMOR-positiver Neuronen in den Spinalganglien diabetischer Tiere.



## 7.6 Vermehrte Expression der Proteinkinase C als mögliche Ursache der vermehrten Phosphorylierung von $\mu$ -Opioidrezeptoren

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, 4 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus, zu einer signifikant erhöhten Expression einiger Subtypen der PKC kommt. Dies konnte sowohl anhand der mRNA-Expression (vgl. 6.6.1), welche bezüglich der untersuchten Subtypen bereits eine Woche nach STZ-Injektion ihr Maximum aufwies, nachgewiesen werden. Durch den quantitativen Nachweis der verschiedenen PKC-Proteine in der Western Blot-Analyse (vgl. 6.6.2) konnte 4 Wochen nach STZ-Injektion eine signifikante Erhöhung der PKC alpha-Proteine nachgewiesen werden. Bezüglich der PKC gamma zeigte sich keine signifikante Veränderung im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe (vgl. 6.6.2). Zudem zeigten die immunhistochemischen Untersuchungen (vgl. 6.6.3) aus den Spinalganglien eine quantitativ erhöhte Anzahl PKC-positiver Neuronen, ebenfalls 4 Wochen nach STZ-Injektion.

Die Inaktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren durch vermehrte, PKC-vermittelte Rezeptor-Phosphorylierung wird nicht alleine für MOR angenommen. So wurde dies unter anderem bereits an  $\delta$ -Opioidrezeptoren (DOR) [[60]], wie auch an D<sub>2</sub>-Rezeptoren [61] demonstriert.

Bezüglich des PKC-Einflusses auf MOR und konsekutiv verringerter Opioid-Ansprechbarkeit bzw. Toleranzentwicklung existieren bereits zahlreiche Studien. So wurde schon 1990 eine Suppression der Opioid-vermittelten Antinozizeption durch PKC-Aktivatoren im tail-flick-Test bei Mäusen festgestellt [62]. Unter gleichen Bedingungen zeigte die Gruppe um Narita 1997 die Reversibilität der PKC-Aktivator-vermittelten verminderten Antinozizeption durch gleichzeitige Injektion des PKC-Inhibitors Calphostin C [63]. Die gleiche Gruppe konnte 2001 durch die intrathekale Applikation des PKC-Inhibitors Ro-32-0432 auch die Reversibilität des DAMGO-induzierten GTP $\gamma$ S-Bindungsverlustes an MOR aufzeigen. Zudem wurde in Western Blot-Analysen eine verstärkte Expression von PKC $\gamma$  in spinalen Neuronen festgestellt, jedoch nicht der ebenfalls untersuchten Isoformen PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ I und PKC $\beta$ II [64]. PKC $\gamma$ -knockout-Mäuse wiesen in der DAMGO-stimulierten GTP $\gamma$ S-Bindungsstudie eine erhöhte GTP $\gamma$ S-Bindung in Neuronen aus Pons und Medulla im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Die untersuchten spinalen Neuronen zeigten hingegen eine verminderte Bindung [65]. Ebenfalls unter Verwendung von PKC $\gamma$ -knockout-Mäusen

konnte im tail-flick-Test nach subcutaner Morphin-Injektion eine Reduktion der Opioid-Toleranz im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden [66]. 2007 führte die Gruppe um Smith erstmals Untersuchungen an Mäusen mit intracerebrovaskulär-applizierten, spezifischen Antikörpern gegen verschiedene PKC-Isoformen nach subcutaner Morphininjektion durch. Im tail-immersion- und hot-plate-Test konnte die Opioid-Toleranz durch die Gabe spezifischer Antikörper gegen PKC $\alpha$ , PKC $\gamma$  und PKC $\epsilon$  vollständig rückgängig gemacht werden. Die übrigen untersuchten PKC-Antikörper hatten keinen Effekt [67].

Erste Untersuchungen mit Tieren, die an nicht-diabetischer Neuropathie bzw. Neuropathie-ähnlichen Zuständen litten, zeigten beispielsweise bei Ratten mit verstärkten nozizeptiven Effekten auf thermische Stimuli infolge Verletzung des nervus ischiadicus eine erhöhte PKC $\gamma$ -Immunreaktivität in den spinalen Hinterhörnern [68].

PKC $\gamma$ -knockout-Mäuse zeigten nach partieller nervus ischiadicus-Sektion im Gegensatz zur Kontrollgruppe kein neuropathisches Schmerzsyndrom [69]. Bei Ratten in Neuropathie-ähnlichem Zustand nach chronischer Ethanol-Gabe konnte in Immunblotting-Analysen des Rückenmarks eine vermehrte Expression phosphorylierter und damit aktiver PKC festgestellt werden, jedoch ohne Subtypisierung [70].

Verhaltensversuche mit PKC-wirksamen Substanzen an Tieren mit diabetischer Neuropathie wurden vor allem von Ohsawa und Kamei durchgeführt. So zeigten Mäuse im tail-flick-Test 2 Wochen nach STZ-Injektion und intracerebrovaskulärer DAMGO-Applikation einen signifikant niedrigeren DAMGO-Effekt im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Die Gabe von PKC-Aktivatoren erzeugte den gleichen Effekt bei der nicht-diabetischen Kontrollgruppe, jedoch nicht in der Diabetesgruppe. Calphostin C konnte als PKC-Inhibitor den DAMGO-Effekt in der Diabetesgruppe signifikant steigern [71]. Die Entzugssymptomatik Morphin-abhängiger Mäuse konnte durch die Gabe von Calphostin C ebenfalls vermieden werden, allerdings nur in der nicht-diabetischen Kontrollgruppe [72]. Honda et al. zeigten 2007 bereits eine Woche nach STZ-Injektion eine Reduktion der mechanischen, nozizeptiven Effekte bei Mäusen durch die intrathekale Applikation von PKC-Inhibitoren im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe. In spinalen Neuronen der Diabetesgruppe konnte eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesteigerte Expression membrangebundener und damit aktivierter PKC festgestellt werden [73]. Allerdings wurden hier zentrale Neuronen im Rückenmark untersucht und es fand keine PKC-Subtypisierung statt.

Die Frage, ob es bei der Entwicklung einer diabetischen Neuropathie zu einer vermehrten PKC-Expression und -Aktivierung als einer möglichen Ursache der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika durch vermehrte Phosphorylierung der MOR auch in peripheren Neuronen kommt, ist in der bisherigen Forschung nicht unumstritten.

1995 konnten Bareggi et al. nachweisen, dass aus der großen PKC-Familie vor allem die Isoformen PKC $\zeta$  und PKC $\eta$  in den Spinalganglien und damit in Neuronen des peripheren Nervensystems vorhanden sind [74].

1994 konnten Borghini et al. bei diabetischen Ratten 6-12 Wochen nach STZ-Injektion im nervus ischiadicus keinen Unterschied in Verteilung und Immunreaktivität der Gesamt-PKC feststellen [75]. Eine weitere Studie zeigte 2 Monate nach STZ-Injektion sogar eine leicht erniedrigte PKC-Aktivität im nervus ischiadicus [76]. Beide Studien beschränkten sich im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit auf die Messung der Gesamt-PKC in peripheren Neuronen diabetischer Tiere. Zudem können beide Studien aufgrund der Dauer der diabetischen Stoffwechsellage nicht in der Frühphase der diabetischen Neuropathie angesiedelt werden.

Andere Studien der Spätphase erbrachten hingegen kontroverse Ergebnisse. So wurde in Neuronen des nervus ischiadicus diabetischer Ratten 6 Wochen nach STZ-Injektion eine signifikant erhöhte Expression der membran-gebundenen, aktivierten PKC $\alpha$  im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe festgestellt, jedoch nicht von PKC $\beta$  und PKC $\gamma$  [77]. Auch die bereits in 6.5 zitierte Studie von Shangguan et al. konnte zwar 4-8 Wochen nach STZ-Injektion in den Spinalganglien diabetischer Tiere eine signifikant gesteigerte Aktivität von PKC $\alpha$  feststellen, die Aktivität von PKC $\beta$  blieb jedoch unverändert [59]. 2002 konnte Cotter 8 Wochen nach STZ-Injektion durch Behandlung mit PKC $\beta$ -Inhibitoren eine Verbesserung der sensorischen Defizite im nervus saphenus, des Motordefizits im nervus ischiadicus, der thermalen Hyperalgesie sowie des Blutflusses im nervus ischiadicus feststellen, jedoch keine Verbesserung der gesteigerten mechanischen nozizeptiven Effekte [78].

In der Frühphase 3-4 Wochen nach STZ-Injektion konnte die C-Faser- Hyperexcitabilität im nervus saphenus diabetischer Tiere durch die Gabe von PKC-Inhibitoren signifikant reduziert werden [79]. Auch wurde 2 Wochen nach STZ-Injektion eine vermehrte Expression der Untereinheiten spannungsabhängiger Calcium-Kanäle in den Spinalganglien diabetischer Tiere festgestellt, deren Aktivierung als ein möglicher Mechanismus der vermehrten PKC-Aktivität angesehen werden [80].

Bisher bleibt die Literatur allerdings Studien in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, bis zu 4 Wochen nach STZ-Injektion mit quantitativer Messung der Expression von PKC-Isoformen, schuldig. Die bisherigen Studien haben vornehmlich Neuronen des zentralen Nervensystems zum Forschungsgegenstand. Die vorliegende Arbeit zeigt nun deutlich den Verlauf der mRNA-Expression einzelner PKC-Isoformen (PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\gamma$  und PKC $\epsilon$ ) mit einem Maximum 7 Tage nach STZ-Injektion (vgl. 6.6.1). Der Zeitpunkt der maximalen Expression scheint in der bisherigen Literatur noch nicht erfasst. Die Ergebnisse 4 Wochen nach STZ-Induktion decken sich mit den Ergebnissen von Roberts und McLean 1997 wie auch von Shangguan et al. 2003. Der Abfall der PKC $\beta$ - und PKC $\gamma$ -Aktivität bis 4 Wochen nach STZ-Injektion erklärt möglicherweise, warum in bisherigen Studien keine gesteigerte Aktivität dieser PKC-Isoformen festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass es bereits unzählige Studien bezüglich einer möglichen Beteiligung von PKC-Isoformen an der verminderten Wirksamkeit von Opioid-Analgetika am MOR gibt, sowohl in Verbindung mit der Ausbildung einer Opioid-induzierten Toleranz, der verminderten Opioid-Wirkung bei nicht-diabetischen neuropathischen und Neuropathie-ähnlichen Zuständen als auch in Verbindung mit der diabetischen Neuropathie. Einzig die auch in der vorliegenden Arbeit untersuchte Beteiligung einzelner PKC-Isoformen an der MOR-Phosphorylierung und damit MOR-Inaktivierung in peripheren Neuronen diabetischer Tiere, ist bislang nicht eindeutig geklärt. Die meisten bereits veröffentlichten Arbeiten beschäftigen sich vor allem mit der Spätphase der diabetischen Neuropathie, 8-12 Wochen nach STZ-Injektion, und liefern in der Zusammenschau keine eindeutigen Ergebnisse. Möglicherweise spielen in der späten Phase andere Mechanismen bei der Ausbildung der verminderten Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika, wie beispielsweise der Verlust von MOR durch vermehrten Abbau, eine vorrangige Rolle. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit jedenfalls legen eine Beteiligung der PKC durch vermehrte MOR-Phosphorylierung nahe. Insbesondere die signifikant erhöhte mRNA-Expression der untersuchten Isoformen PKC $\alpha$ , PKC $\beta$ , PKC $\gamma$  und PKC $\epsilon$  geben eindeutige Hinweise auf eine Beteiligung. Einzig PKC $\alpha$  und PKC $\gamma$  wurden in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer gesteigerten Proteinexpression in der Western Blot-Analyse 4 Wochen nach STZ-Injektion untersucht.

Die Frage nach der genauen PKC-Beteiligung (d.h. der Beteiligung einzelner Isoformen und deren zeitlichen Auftreten und Expression) wird auch in Zukunft im Fokus der Forschung stehen und auch Analysen der PKC-Aktivität in peripher sensorischen Neuronen phasenübergreifend, zwischen Früh- und Spätphase, nach sich ziehen müssen.

## 7.7 Einfluss der Aminoguanidin-Behandlung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine interventionelle Behandlung diabetischer Ratten mit Aminoguanidin, einem selektiven Inhibitor der Formation von AGE, in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, 4 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus, zu einer signifikanten Zunahme der [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung am MOR (vgl. 6.7.1) sowie zu einer signifikanten Reduktion der Anzahl an pMOR (vgl. 6.7.2) in den Spinalganglien diabetischer Tiere führt. 4 Wochen nach STZ-Induktion erreichten die Ergebnisse sogar das Niveau der nicht-diabetischen Kontrollgruppe. Dieser Mechanismus ist möglicherweise durch eine über den RAGE vermittelte verminderte PKC-Expression zu erklären. Es ist bereits bekannt, dass Aminoguanidin über Interaktion mit Enzymen, die an der Formation von AGE beteiligt sind, interagiert und damit die Bildung von AGE hemmt [32].

Die verminderte Anzahl von pMOR und damit Reduktion nicht-funktioneller MOR wirkte sich signifikant auf die gemessene DSS der Versuchstiere aus. Es konnte eine signifikant erhöhte Ansprechbarkeit auf den MOR-Agonisten Fentanyl nach Aminoguanidin-Behandlung über 7 Tage festgestellt werden (vgl. 6.7.3).

In Bezug auf die typischen diabetischen Komplikationen ist bereits für einige Organsysteme der positive Einfluss von Aminoguanidin untersucht worden. So konnte bezüglich der diabetischen Retinopathie bereits 1991 durch gleichzeitige Aminoguanidin-Behandlung diabetischer Ratten über mehr als 26 Wochen eine signifikant erniedrigte Anzahl retinaler azellulärer Kapillaren und Microaneurysmata im Vergleich zur diabetischen Kontrollgruppe ohne Intervention festgestellt werden [34]. Im gleichen Jahr konnte auch der positive Einfluss einer gleichzeitigen Aminoguanidin-Behandlung auf die diabetische Nephropathie gezeigt werden. Hier kam es nach 32 Wochen Aminoguanidin-Behandlung diabetischer Ratten zu einer signifikanten Reduktion der mesangialen Proliferation und Albuminurie, die bei der Diabetesgruppe ohne Aminoguanidin-Intervention im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe aufgetreten waren [27].

Der Einfluss einer interventionellen Aminoguanidin-Behandlung auf die diabetische Neuropathie und insbesondere auf die periphere diabetische Neuropathie wurde ebenfalls in mehreren Studien untersucht. So konnte ebenfalls 1991 ein positiver Einfluss gleichzeitiger Aminoguanidin-Behandlung auf den Nervenblutfluss und die Nervenleitgeschwindigkeit im nervus ischiadicus diabetischer Tiere festgestellt werden

[35]. Allerdings betrug in der genannten Studie die Aminoguanidin-Behandlung bis zu 24 Wochen und beschreibt somit nicht die Frühphase der diabetischen Neuropathie. Ebenfalls in der Spätphase, 8 Wochen nach STZ-Induktion eines Diabetes mellitus, zeigten Cameron und Cotter 1996 bei gleichzeitiger Aminoguanidin-Behandlung eine Verbesserung der Nervenleitgeschwindigkeit und des endoneuronalen Blutflusses im nervus ischiadicus, welche ohne Aminoguanidin-Intervention beide signifikant im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe erniedrigt waren [36].

Auch in Motoneuronen des peripheren Nervensystems konnte die gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin die Nervenleitgeschwindigkeit im Gegensatz zur Diabetesgruppe ohne Intervention in der Spätphase der diabetischen Neuropathie signifikant verbessern. In der gleichen Studie zeigte sich ebenfalls ein positiver Effekt auf die axonale Atrophie im nervus suralis und eine deutliche Reduktion an AGE [81]. Gleiche Ergebnisse lieferten 1999 Messungen der Nervenleitgeschwindigkeit im nervus tibialis, jedoch ebenfalls in der Spätphase der diabetischen Neuropathie, 8 Wochen nach Diabetes-Induktion [82]. Erstmals an Primaten durchgeführte Aminoguanidin-Interventionen konnten im nervus suralis diabetischer Paviane nach 3-jähriger Aminoguanidin-Behandlung keine Verbesserung der in der Diabetesgruppe ohne gleichzeitige Aminoguanidin-Behandlung festgestellten Axondegeneration und verminderten Nervenleitgeschwindigkeit aufzeigen [39]. Möglicherweise spielten hier nach sehr langer Entwicklung der diabetischen Neuropathie auch andere Mechanismen, welche nicht auf eine vermehrte AGE-Akkumulation zurückzuführen sind, eine entscheidende Rolle. In der Frühphase der diabetischen Neuropathie konnte eine signifikante Steigerung somatosensorisch-evozierter Potentiale (SEP) in kaudalen Nerven diabetischer Ratten durch gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin festgestellt werden [37].

Eine Reversibilität microvaskulärer Veränderungen in peripheren Nerven, welche als eine mögliche Ursache des Funktionsverlustes peripherer Nerven gilt, konnte 1997 im Tierversuch nachgewiesen werden [83]. Jedoch erneut in der Spätphase der diabetischen Neuropathie, 16 Wochen nach Diabetes-Induktion.

Eine sehr junge Arbeit von 2011 zeigte bei gleichzeitiger Aminoguanidin-Behandlung bereits in der Frühphase der diabetischen Neuropathie eine signifikante Reduktion der AGE in peripherem Hautgewebe im Vergleich zur Diabetesgruppe ohne Aminoguanidin-Intervention [84].

Der Effekt einer Aminoguanidin-Intervention auf die Wirkung von Opioid-Analgetika wurde bereits unter diabetischen Bedingungen belegt. So konnte bei diabetischen Mäusen im tail-flick-Test in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, 4 Wochen nach STZ-Injektion, durch gleichzeitige Aminoguanidin-Behandlung ein Anstieg des antinozizeptiven Morphin-Effekts im Gegensatz zur Diabetesgruppe, ohne gleichzeitige Aminoguanidin-Intervention, festgestellt werden [85]. Die Morphin-Injektionen erfolgten in dieser Studie jedoch intracerebrovaskulär und beschreiben somit im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit einen zentralen Morphin-Effekt.

Nach Alloxan-induziertem Diabetes konnte durch gleichzeitige Aminoguanidin-Behandlung ebenfalls eine Reduktion der Morphin-Toleranz im hot-plate-Test festgestellt werden [38]. Allerdings wurde in besagter Studie bereits in der Diabetesgruppe ohne Intervention eine Reduktion der Morphin-Toleranz im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe festgestellt, was im Gegensatz zu den meisten bisher veröffentlichten Studien steht, die wie auch in der vorliegenden Arbeit eine signifikant verminderte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika unter diabetischen Bedingungen aufzeigten.

Ebenfalls eine signifikant erhöhte Morphin-Analgesie in der Diabetesgruppe ohne Intervention im Vergleich zur nicht-diabetischen Kontrollgruppe zeigt eine sehr junge Studie aus dem Jahr 2011. Gemessen wurde hier bei diabetischen Mäusen mit Hilfe des tail-flick-Tests in der Frühphase der diabetischen Neuropathie, 15 Tage nach STZ-Injektion nach subcutaner Morphin-Applikation. Die gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin hatte keinen positiven Effekt auf die Morphin-Analgesie [86]. Allerdings konnte auch in dieser Studie zuvor ohne Morphin-Intervention kein Unterschied in der Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika zwischen STZ-Gruppe und nicht-diabetischer Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies widerspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und ist möglicherweise auf die Analgesie-Messung bereits 15 Tage nach Diabetes-Induktion zurückzuführen.

Unabhängig von der Aminoguanidin-Wirkung unter diabetischen Bedingungen, konnte eine gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin auch bei nicht-diabetischen Tieren mehrfach einen positiven Effekt auf die Opioid-vermittelte Analgesie aufzeigen. So hatte beispielsweise die gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin bei Mäusen im tail-flick-Test eine signifikante Steigerung der Morphin-Analgesie im Vergleich zur Kontrollgruppe zur Folge [87]. Die nach experimenteller Verletzung des nervus



ischiadicus aufgetretene mechanische, thermische und Kälte-Allodynie konnte durch gleichzeitige Applikation von Aminoguanidin ebenfalls signifikant reduziert werden [88]. Im gleichen Jahr wurde unter nicht-diabetischen Bedingungen erneut eine deutliche Reduktion der Morphin-vermittelten Toleranz durch gleichzeitige Behandlung mit Aminoguanidin bei Mäusen im hot-plate-Test festgestellt [89].

Zusammenfassend gibt die bisherige Forschung bereits deutliche Hinweise auf einen positiven Effekt von Aminoguanidin auf die Diabetes-vermittelten Komplikationen wie Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie. Bezüglich der peripheren Neuropathie konnten bereits mehrere Studien einen protektiven Effekt auf AGE-Akkumulation, Nervenleitgeschwindigkeit und Nervenblutfluss im peripheren Nervensystem zeigen. Die Auswirkung einer Aminoguanidin-Intervention auf die Diabetes-bedingte, verminderte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika ist hingegen bislang kaum erforscht. Die bisherigen Ergebnisse sind diesbezüglich kontrovers und zeigen in der Frühphase teilweise keinen Effekt. Die Tatsache, dass Aminoguanidin jedoch auch ohne gleichzeitiges Vorliegen eines Diabetes mellitus einen positiven Effekt auf die Morphin-Analgesie besitzt, legt die Vermutung nahe, dass möglicherweise nicht alleine eine Reduktion der AGE durch die Aminoguanidin-Intervention hierfür verantwortlich ist.

## 7.8 Zusammenfassung

In der Diskussion der vorliegenden Arbeit im Vergleich mit der bestehenden Literatur hat sich gezeigt, dass die verminderte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bereits seit geraumer Zeit Gegenstand der Forschung ist. Es gibt einige Studien, die sowohl in der Spätphase als auch in der Frühphase der diabetischen Neuropathie einen verminderten antinozizeptiven Effekt von Opioid-Analgetika aufzeigen konnten. Die Versuche in der Frühphase wurden jedoch in der Regel mit zentral wirksamen Opioid-Dosierungen durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt nun für rein peripher wirksame Dosierungen in der Frühphase der diabetischen Neuropathie gezeigt werden. Da es sich bei der diabetischen Neuropathie um eine Erkrankung des peripheren Nervensystems handelt, konnte durch das Studiendesign zentral-vermittelte Opioid-Effekte weitestgehend ausgeschlossen werden.

Eine Reduktion an MOR im zentralen Nervensystem, als mögliche Ursache der verminderten Ansprechbarkeit, konnte in den bisherigen Studien nicht festgestellt werden. Die vorliegende Arbeit konnte dies nun auch für Neuronen des peripheren Nervensystems bestätigen.

Die wahrscheinliche Ursache der verminderten Ansprechbarkeit ist somit nicht in einer reduzierten Anzahl an MOR zu sehen, sondern vielmehr in einer gestörten Signalübertragung am Rezeptor. Dies konnte in der Vergangenheit anhand von Rezeptor-Bindungsstudien bereits mehrfach an Neuronen des zentralen Nervensystems nachgewiesen werden, jedoch aufgrund unterschiedlicher Studiendesigns nicht immer mit identischen Ergebnissen. Die vorliegende Arbeit konnte jetzt auch in peripheren Neuronen eine gestörte G-Proteinkopplung bei unveränderter Ligandenbindung am MOR nachweisen.

Es kann als sehr wahrscheinlich angesehen werden, dass die gestörte G-Proteinkopplung am MOR durch eine vermehrte MOR-Phosphorylierung bei diabetischen Tieren bedingt ist. Auch hierfür liefert die bestehende Literatur einige Hinweise. Bislang wurde jedoch im peripheren Nervensystem noch keine quantitative Analyse an pMOR durchgeführt. Bisher konnte lediglich in einer Studie eine vermehrte Phosphorylierung der G $\alpha$ -Untereinheit des MOR nachgewiesen werden [59]. Die vorliegende Arbeit erbringt nun den Nachweis, dass in der Frühphase der diabetischen Neuropathie in peripheren Neuronen eine signifikante Vermehrung von pMOR sowohl in

der Western Blot-Analyse als auch in der immunhistochemischen quantitativen Messung zu finden ist. Somit werden die bisherigen Ergebnisse erweitert und machen die MOR-Phosphorylierung als Ursache der verminderten G-Proteinkopplung am Rezeptor sehr wahrscheinlich.

Die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene signifikant gesteigerte Expression einzelner PKC-Isoformen in peripheren Neuronen diabetischer Ratten scheint eine wichtige Ursache der vermehrten MOR-Phosphorylierung in der Frühphase der diabetischen Neuropathie zu sein. Hinweise hierauf geben bereits mehrere veröffentlichte Studien in der Spätphase der diabetischen Neuropathie, 8-12 Wochen nach Diabetes-Induktion. Allerdings sind die Ergebnisse in dieser Phase nicht eindeutig. Möglicherweise spielen mit fortlaufender Dauer der diabetischen Stoffwechsellage vermehrt auch andere Mechanismen eine entscheidende Rolle. Die vorliegende Arbeit konnte zumindest in der Frühphase eine vermehrte PKC-Expression als wahrscheinlichste Ursache der vermehrten MOR-Phosphorylierung mit konsekutiver verminderter Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in peripheren Neuronen nachweisen.

Die interventionelle Behandlung mit Aminoguanidin führte in der vorliegenden Arbeit zu einer signifikanten Reduktion der PKC-Expression, einer signifikant gesteigerten [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindung am MOR, einer signifikanten Reduktion der Anzahl von pMOR sowie zu einem signifikanten Anstieg der DSS im Vergleich zu diabetischen Tieren gleichen Alters ohne Aminoguanidin-Intervention. In den bisher veröffentlichten Studien ist die Wirksamkeit von Aminoguanidin auf den verminderten antinozizeptiven Effekt von Opioid-Analgetika unter diabetischen Bedingungen nicht eindeutig belegt. Die Literatur liefert hier kontroverse Ergebnisse. Die vorliegende Arbeit zeigt in jedem Fall einen quantitativ feststellbaren signifikant positiven Effekt der Aminoguanidin-Intervention auf die verminderte Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika in peripheren Neuronen der Frühphase der diabetischen Neuropathie.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Thomas PK, T.D.D.a.H.N.I., Dyck PJ, Thomas PK, editors. *Peripheral Neuropathy.* , 1993. 3rd ed. (Philadelphia: Saunders): p. p. 1219-50.
2. Hidmark, A., et al., A new paradigm to understand and treat diabetic neuropathy. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2014. 122(4): p. 201-7.
3. Boulton, A.J., et al., Diabetic neuropathies: a statement by the American Diabetes Association. *Diabetes Care*, 2005. 28(4): p. 956-62.
4. Tamayo, T., et al., Diabetes in Europe: an update. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014. 103(2): p. 206-17.
5. Tesfaye, S. and D. Selvarajah, Advances in the epidemiology, pathogenesis and management of diabetic peripheral neuropathy. *Diabetes Metab Res Rev*, 2012. 28 Suppl 1: p. 8-14.
6. Albers, J.W. and R. Pop-Busui, Diabetic neuropathy: mechanisms, emerging treatments, and subtypes. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2014. 14(8): p. 473.
7. Sytze Van Dam, P., et al., Pathogenesis of diabetic neuropathy: focus on neurovascular mechanisms. *Eur J Pharmacol*, 2013. 719(1-3): p. 180-6.
8. Chong, M.S. and J. Hester, Diabetic painful neuropathy: current and future treatment options. *Drugs*, 2007. 67(4): p. 569-85.
9. Malcangio, M. and D.R. Tomlinson, A pharmacologic analysis of mechanical hyperalgesia in streptozotocin/diabetic rats. *Pain*, 1998. 76(1-2): p. 151-7.
10. Brix Finnerup, N., S. Hein Sindrup, and T. Staehelin Jensen, Management of painful neuropathies. *Handb Clin Neurol*, 2013. 115: p. 279-90.
11. Simon, G.S. and W.L. Dewey, Narcotics and diabetes. I. The effects of streptozotocin-induced diabetes on the antinociceptive potency of morphine. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981. 218(2): p. 318-23.
12. Simon, G.S., J. Borzelleca, and W.L. Dewey, Narcotics and diabetes. II. Streptozotocin-induced diabetes selectively alters the potency of certain narcotic analgesics. Mechanism of diabetes: morphine interaction. *J Pharmacol Exp Ther*, 1981. 218(2): p. 324-9.
13. Kamei, J., et al., Streptozotocin-induced diabetes selectively alters the potency of analgesia produced by mu-opioid agonists, but not by delta- and kappa-opioid agonists. *Brain Res*, 1992. 571(2): p. 199-203.

14. Zurek, J.R., R. Nadeson, and C.S. Goodchild, Spinal and supraspinal components of opioid antinociception in streptozotocin induced diabetic neuropathy in rats. *Pain*, 2001. 90(1-2): p. 57-63.
15. Courteix, C., et al., Is the reduced efficacy of morphine in diabetic rats caused by alterations of opiate receptors or of morphine pharmacokinetics? *J Pharmacol Exp Ther*, 1998. 285(1): p. 63-70.
16. Chen, S.R. and H.L. Pan, Antinociceptive effect of morphine, but not mu opioid receptor number, is attenuated in the spinal cord of diabetic rats. *Anesthesiology*, 2003. 99(6): p. 1409-14.
17. Traynor, J.R. and S.R. Nahorski, Modulation by mu-opioid agonists of guanosine-5'-O-(3-[35S]thio)triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Pharmacol*, 1995. 47(4): p. 848-54.
18. Williams, J.T., et al., Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacol Rev*, 2013. 65(1): p. 223-54.
19. McLaughlin, J.P. and C. Chavkin, Tyrosine phosphorylation of the mu-opioid receptor regulates agonist intrinsic efficacy. *Mol Pharmacol*, 2001. 59(6): p. 1360-8.
20. Brownlee, M., Glycation products and the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Care*, 1992. 15(12): p. 1835-43.
21. Breyer, V., et al., Analysis and biological relevance of advanced glycation end-products of DNA in eukaryotic cells. *Febs j*, 2008. 275(5): p. 914-25.
22. Ahmed, N., Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res Clin Pract*, 2005. 67(1): p. 3-21.
23. Wautier, J.L. and P.J. Guillausseau, Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab*, 2001. 27(5 Pt 1): p. 535-42.
24. Jakus, V. and N. Rietbrock, Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications. *Physiol Res*, 2004. 53(2): p. 131-42.
25. Thomas, M.C., J.M. Forbes, and M.E. Cooper, Advanced glycation end products and diabetic nephropathy. *Am J Ther*, 2005. 12(6): p. 562-72.
26. Toth, C., et al., Receptor for advanced glycation end products (RAGEs) and experimental diabetic neuropathy. *Diabetes*, 2008. 57(4): p. 1002-17.

27. Soulis-Liparota, T., et al., Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozocin-induced diabetic rat. *Diabetes*, 1991. 40(10): p. 1328-34.
28. Youssef, S., et al., Effect of diabetes and aminoguanidine therapy on renal advanced glycation end-product binding. *Kidney Int*, 1999. 55(3): p. 907-16.
29. Huang, Y., et al., [Effect of tetromethylpyrazine and aminoguanidine on expression of vascular endothelial growth factor in kidney of diabetic rats]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2004. 2(1): p. 39-41.
30. Miyata, T., M. Yamamoto, and Y. Izuhara, From molecular footprints of disease to new therapeutic interventions in diabetic nephropathy. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1043: p. 740-9.
31. Li, Q., et al., Effects of aminoguanidine and vitamin C on collagen type IV in diabetic nephropathy rats. *Endocrine*, 2011. 39(3): p. 251-8.
32. Thornalley, P.J., Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. *Arch Biochem Biophys*, 2003. 419(1): p. 31-40.
33. Serban, A.I., et al., Extracellular matrix is modulated in advanced glycation end products milieu via a RAGE receptor dependent pathway boosted by transforming growth factor-beta1 RAGE. *J Diabetes*, 2015. 7(1): p. 114-24.
34. Hammes, H.P., et al., Aminoguanidine treatment inhibits the development of experimental diabetic retinopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(24): p. 11555-8.
35. Kihara, M., et al., Aminoguanidine effects on nerve blood flow, vascular permeability, electrophysiology, and oxygen free radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(14): p. 6107-11.
36. Cameron, N.E. and M.A. Cotter, Rapid reversal by aminoguanidine of the neurovascular effects of diabetes in rats: modulation by nitric oxide synthase inhibition. *Metabolism*, 1996. 45(9): p. 1147-52.
37. Yildiz, O., et al., Comparison of the effects of aminoguanidine and L-carnitine treatments on somatosensorial evoked potentials in alloxan-diabetic rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 1996. 354(4): p. 526-31.
38. Joharchi, K. and M. Jorjani, The role of nitric oxide in diabetes-induced changes of morphine tolerance in rats. *Eur J Pharmacol*, 2007. 570(1-3): p. 66-71.

39. Birrell, A.M., et al., Functional and structural abnormalities in the nerves of type I diabetic baboons: aminoguanidine treatment does not improve nerve function. *Diabetologia*, 2000. 43(1): p. 110-6.
40. Vavra, J.J., et al., Streptozotocin, a new antibacterial antibiotic. *Antibiot Annu*, 1959. 7: p. 230-5.
41. Mansford, K.R. and L. Opie, Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. *Lancet*, 1968. 1(7544): p. 670-1.
42. Cameron, N.E., et al., Effects of aminoguanidine on peripheral nerve function and polyol pathway metabolites in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia*, 1992. 35(10): p. 946-50.
43. Bradford, M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976. 72: p. 248-54.
44. Mousa, S.A., et al., Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain*, 2007. 130(Pt 2): p. 502-13.
45. Wuarin-Bierman, L., et al., Hyperalgesia in spontaneous and experimental animal models of diabetic neuropathy. *Diabetologia*, 1987. 30(8): p. 653-8.
46. Ahlgren, S.C. and J.D. Levine, Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. *Neuroscience*, 1993. 52(4): p. 1049-55.
47. Kamei, J., et al., Antinociceptive effect of dihydroetorphine in diabetic mice. *Eur J Pharmacol*, 1995. 275(1): p. 109-13.
48. Courteix, C., et al., Study of the sensitivity of the diabetes-induced pain model in rats to a range of analgesics. *Pain*, 1994. 57(2): p. 153-60.
49. Chen, S.R. and H.L. Pan, Hypersensitivity of spinothalamic tract neurons associated with diabetic neuropathic pain in rats. *J Neurophysiol*, 2002. 87(6): p. 2726-33.
50. Mousa, S.A., et al., Rab7 silencing prevents mu-opioid receptor lysosomal targeting and rescues opioid responsiveness to strengthen diabetic neuropathic pain therapy. *Diabetes*, 2013. 62(4): p. 1308-19.
51. Ohsawa, M., et al., Effects of a mu-opioid receptor agonist on G-protein activation in streptozotocin-induced diabetic mice. *Eur J Pharmacol*, 2000. 401(1): p. 55-8.

52. Pieper, G.M., et al., Decreased opioid-induced antinociception but unaltered G-protein activation in the genetic-diabetic NOD mouse. *Eur J Pharmacol*, 2000. 401(3): p. 375-9.
53. Chen, S.R., et al., Functional mu opioid receptors are reduced in the spinal cord dorsal horn of diabetic rats. *Anesthesiology*, 2002. 97(6): p. 1602-8.
54. Hall, K.E., et al., Impaired inhibitory G-protein function contributes to increased calcium currents in rats with diabetic neuropathy. *J Neurophysiol*, 2001. 86(2): p. 760-70.
55. Wang, L., et al., Relevance of phosphorylation state to opioid responsiveness in opiate naive and tolerant/dependent tissue. *Brain Res*, 1996. 723(1-2): p. 61-9.
56. Harada, H., et al., Phosphorylated mu-opioid receptor purified from rat brains lacks functional coupling with Gi1, a GTP-binding protein in reconstituted lipid vesicles. *Neurosci Lett*, 1990. 113(1): p. 47-9.
57. Narita, M., et al., Increased phosphorylated-mu-opioid receptor immunoreactivity in the mouse spinal cord following sciatic nerve ligation. *Neurosci Lett*, 2004. 354(2): p. 148-52.
58. Petraschka, M., et al., The absence of endogenous beta-endorphin selectively blocks phosphorylation and desensitization of mu opioid receptors following partial sciatic nerve ligation. *Neuroscience*, 2007. 146(4): p. 1795-807.
59. Shangguan, Y., et al., Diabetic neuropathy: inhibitory G protein dysfunction involves PKC-dependent phosphorylation of G $\alpha$ . *J Neurochem*, 2003. 86(4): p. 1006-14.
60. Xiang, B., et al., Heterologous activation of protein kinase C stimulates phosphorylation of delta-opioid receptor at serine 344, resulting in beta-arrestin- and clathrin-mediated receptor internalization. *J Biol Chem*, 2001. 276(7): p. 4709-16.
61. Morris, S.J., et al., Differential desensitization of dopamine D2 receptor isoforms by protein kinase C: the importance of receptor phosphorylation and pseudosubstrate sites. *Eur J Pharmacol*, 2007. 577(1-3): p. 44-53.
62. Zhang, L.J., X.J. Wang, and J.S. Han, Phorbol ester suppression of opioid analgesia in rats. *Life Sci*, 1990. 47(19): p. 1775-82.
63. Narita, M., et al., 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*, 1997. 76(1): p. 291-8.



64. Narita, M., et al., Involvement of spinal protein kinase C $\gamma$  in the attenuation of opioid  $\mu$ -receptor-mediated G-protein activation after chronic intrathecal administration of [D-Ala<sup>2</sup>,N-MePhe<sup>4</sup>,Gly-OI<sup>(5)</sup>]enkephalin. *J Neurosci*, 2001. 21(11): p. 3715-20.
65. Narita, M., et al., Influence of a deletion of protein kinase C  $\gamma$  isoform in the G-protein activation mediated through opioid receptor-like-1 and  $\mu$ -opioid receptors in the mouse pons/medulla. *Neurosci Lett*, 2002. 331(1): p. 5-8.
66. Zeitz, K.P., et al., Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC  $\gamma$  mutant mice. *Pain*, 2001. 94(3): p. 245-53.
67. Smith, F.L., et al., Determination of the role of conventional, novel and atypical PKC isoforms in the expression of morphine tolerance in mice. *Pain*, 2007. 127(1-2): p. 129-39.
68. Mao, J., et al., Increases in protein kinase C  $\gamma$  immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. *Neurosci Lett*, 1995. 198(2): p. 75-8.
69. Malmberg, A.B., et al., Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC $\gamma$ . *Science*, 1997. 278(5336): p. 279-83.
70. Narita, M., et al., Functional reduction in  $\mu$ -opioidergic system in the spinal cord under a neuropathic pain-like state following chronic ethanol consumption in the rat. *Neuroscience*, 2007. 144(3): p. 777-82.
71. Ohsawa, M. and J. Kamei, Possible involvement of protein kinase C in the attenuation of [D-Ala<sup>2</sup>, NMePhe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>]enkephalin-induced antinociception in diabetic mice. *Eur J Pharmacol*, 1997. 339(1): p. 27-31.
72. Ohsawa, M. and J. Kamei, Modification of the expression of naloxone-precipitated withdrawal signs in morphine-dependent mice by diabetes: possible involvement of protein kinase C. *Jpn J Pharmacol*, 1999. 79(3): p. 303-11.
73. Honda, K., et al., Contribution of Ca<sup>(2+)</sup>-dependent protein kinase C in the spinal cord to the development of mechanical allodynia in diabetic mice. *Biol Pharm Bull*, 2007. 30(5): p. 990-3.
74. Bareggi, R., et al., Distribution of the extended family of protein kinase C isoenzymes in fetal organs of mice: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res*, 1995. 280(3): p. 617-25.

75. Borghini, I., et al., Alpha, beta I, beta II, delta, and epsilon protein kinase C isoforms and compound activity in the sciatic nerve of normal and diabetic rats. *J Neurochem*, 1994. 62(2): p. 686-96.
76. Kowluru, R.A., et al., Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia: V. Relationship between protein kinase C and ATPases. *Diabetes*, 1998. 47(3): p. 464-9.
77. Roberts, R.E. and W.G. McLean, Protein kinase C isozyme expression in sciatic nerves and spinal cords of experimentally diabetic rats. *Brain Res*, 1997. 754(1-2): p. 147-56.
78. Cotter, M.A., A.M. Jack, and N.E. Cameron, Effects of the protein kinase C beta inhibitor LY333531 on neural and vascular function in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci (Lond)*, 2002. 103(3): p. 311-21.
79. Ahlgren, S.C. and J.D. Levine, Protein kinase C inhibitors decrease hyperalgesia and C-fiber hyperexcitability in the streptozotocin-diabetic rat. *J Neurophysiol*, 1994. 72(2): p. 684-92.
80. Umeda, M., et al., Molecular and immunohistochemical studies in expression of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in dorsal root ganglia from streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sci*, 2006. 79(21): p. 1995-2000.
81. Yagihashi, S., et al., Effect of aminoguanidine on functional and structural abnormalities in peripheral nerve of STZ-induced diabetic rats. *Diabetes*, 1992. 41(1): p. 47-52.
82. Wada, R., et al., Only limited effects of aminoguanidine treatment on peripheral nerve function, (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase activity and thrombomodulin expression in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetologia*, 1999. 42(6): p. 743-7.
83. Sugimoto, K. and S. Yagihashi, Effects of aminoguanidine on structural alterations of microvessels in peripheral nerve of streptozotocin diabetic rats. *Microvasc Res*, 1997. 53(2): p. 105-12.
84. Chen, B., et al., [Relationship between cutaneous glycometabolic disorders and cutaneous neuropathy in diabetic rats]. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*, 2011. 27(2): p. 139-44.
85. Grover, V.S., A. Sharma, and M. Singh, Role of nitric oxide in diabetes-induced attenuation of antinociceptive effect of morphine in mice. *Eur J Pharmacol*, 2000. 399(2-3): p. 161-4.

86. Nawa, A., et al., Decreased expression of intestinal P-glycoprotein increases the analgesic effects of oral morphine in a streptozotocin-induced diabetic mouse model. *Drug Metab Pharmacokinet*, 2011. 26(6): p. 584-91.
87. Lu, G., et al., Modulation by alpha-difluoromethyl-ornithine and aminoguanidine of pain threshold, morphine analgesia and tolerance. *Eur J Pharmacol*, 2003. 478(2-3): p. 139-44.
88. Naik, A.K., et al., Nitric oxide and its modulators in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol*, 2006. 530(1-2): p. 59-69.
89. Abdel-Zaher, A.O., et al., Attenuation of morphine tolerance and dependence by aminoguanidine in mice. *Eur J Pharmacol*, 2006. 540(1-3): p. 60-6.

## 9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jens Ulf Winkler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Mechanismen reduzierter Ansprechbarkeit auf Opioid-Analgetika bei diabetischer Neuropathie selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

17.12.2015

Datum

Unterschrift

### Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Jens Ulf Winkler hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Shaqura M, Khalefa BI, Shakibaei M, **Winkler J**, Al-Khrasani M, Fürst S, Mousa SA, Schäfer M., Reduced number, G protein coupling, and antinociceptive efficacy of spinal mu-opioid receptors in diabetic rats are reversed by nerve growth

factorTitel, Journal of Pain, 2013, 14(7):720-30, Impact Faktor 4,010

Beitrag im Einzelnen: Unter Anleitung Durchführung der zum Teil im Kapitel Methoden beschriebenen Experimente, gemeinsame Auswertung der Daten, gemeinsame Erstellung der Publikationen.

Publikation 2: Mousa SA, Shaqura M, **Winkler J**, Khalefa BI, Shakibaei M, Schulz S , Schäfer M, Al-Madol MA, Protein kinase C-mediated mu-opioid receptor phosphorylation and desensitization in rats and its prevention during early diabetes, Pain, 2016 (im Druck), Impact Faktor 5,213

Beitrag im Einzelnen: Unter Anleitung Durchführung der zum Teil im Kapitel Methoden beschriebenen Experimente, gemeinsame Auswertung der Daten, gemeinsame Erstellung der Publikationen.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## **10 Lebenslauf**

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

## 11 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken die mir diese Arbeit ermöglicht haben.

Im Besonderen Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schäfer für die Bereitstellung des hochinteressanten Themas und die außerordentlich gute Betreuung während der gesamten Zeit bedanken. Sie waren stets auch privat ansprechbar und hilfsbereit und ich konnte immer auf Ihren fachmännischen Rat bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Arbeit zurückgreifen.

Herrn Dr. Mohammed Shaqura, meinem direkten Ansprechpartner, gebührt ebenfalls mein besonderer Dank. Danke für die Geduld, die Einführung in die Verhaltensversuche, die Hilfe bei der Auswertung und Planung der Versuchsreihen, ebenso wie für die Unterstützung bei der graphischen Darstellung und statistischen Auswertung. Ich halte deinen besonderen Einsatz nicht für selbstverständlich.

Bei Herrn Dr. Shaaban Mousa möchte ich mir vor allem für die Unterstützung und die Einführung in Auswertung und Anfertigung in die Immunhistologie bedanken.

Ebenso möchte ich mit bei Petra von Kwiatkowski bedanken für die tolle Unterstützung insbesondere im Umgang mit den labortechnischen Anforderungen an diese Arbeit. Hier sind insbesondere die Western Blot- und PCR-Analysen zu nennen.

Ein besonderer Dank geht auch an meine Mitdoktoranden sowie alle Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen des Instituts für die außerordentlich gute Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und mich zu jeder Zeit auf jede erdenkliche Weise während des Studiums wie auch bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zu guter Letzt sind meine drei Geschwister, meine lieben Freunde und natürlich meine Lebensgefährtin Frau Ivana Oppold zu nennen, die mir stets die nötige Ruhe, das Durchhaltevermögen und den notwendigen Ausgleich in meiner Freizeit gegeben haben und damit keinen geringen Anteil am Abschluss der Arbeit haben.