

Aus der Klinik für Anaesthesiologie und Operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Periphere antinozizeptive Effekte von Endomorphin-1 und Endomorphin-2 im
Entzündungsschmerz

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Stephan Berger
aus Berlin

Gutachter: 1.: Prof. Dr. H. Machelska-Stein
2.: Prof. Dr. med. A. R. Pries
3.: Prof. Dr. V. Höllt

Datum der Promotion: 30.01.2009

Veröffentlichungen, die auf dieser Arbeit basieren:

Labuz, D., **Berger, S.**, Mousa, S.A., Zöllner, C., Rittner, H.L., Shaqura, M.A., Segovia-Silvestre, T., Przewlocka, B., Stein, C. and Machelska, H.

Peripheral Antinociceptive Effects of Exogenous and Immune Cell-Derived Endomorphins in Prolonged Inflammatory Pain.

J Neuroscience 26, 4350-5358, 2006.

Machelska, H., **Berger, S.**, Zöllner, C., Mousa, S.A., Stein, C.

Peripheral endomorphin analgesia in inflammation.

International Narcotic Research Conference (INRC)

July 18-23, 2004, Kyoto, Japan

Abstract No. P-023

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Schmerz.....	7
1.2. Periphere Opioidrezeptoren.....	7
1.3. Periphere Opioidantinozizeption.....	8
1.4. Endomorphine.....	11
1.4.1. Aufbau, Isolierung und Expression.....	11
1.4.2. Antinozizeptive Effekte der Endomorphine.....	11
1.4.3. Die Rezeptorselektivität der durch Endomorphine induzierten Antinozizeption.....	12
2. Zielsetzung	13
3. Methodik	14
3.1. Tiere.....	14
3.2. Vorbereitung für die Versuche.....	14
3.3. Substanzen.....	15
3.4. Anästhesie.....	16
3.5. Injektionen.....	16
3.6. Entzündung.....	17
3.7. Messung der Hyperalgesie und der Antinozizeption	18
3.8. In vivo Versuchsprotokolle.....	19
3.9. Ex vivo Opioidrezeptorbindung.....	20
3.10. Statistische Analysen.....	22
3.11. Beschreibende Statistik.....	24

4. Ergebnisse.....	24
4.1. Beurteilung der Entzündung.....	24
4.2. Antinozizeptive Effekte von Endomorphin-1.....	26
4.2.1. Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem Endomorphin-1.....	26
4.2.2. Zeitwirkungsbeziehung der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem Endomorphin-1.....	26
4.2.3. Die periphere Wirkung von intraplantarer Endomorphin-1 induzierter Antinozizeption.....	27
4.2.4. Die Opiodrezeptorselektivität der Endomorphin-1 induzierten Antinozizeption.....	27
4.3. Antinozizeptive Effekte von Endomorphin-2.....	31
4.3.1. Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem Endomorphin-2.....	31
4.3.2. Zeitwirkungsbeziehung der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem Endomorphin-2.....	31
4.3.3. Die periphere Wirkung von intraplantarer Endomorphin-2 induzierter Antinozizeption.....	33
4.3.4. Die Opiodrezeptorselektivität der EM-2 induzierten Antinozizeption.....	34
4.3.5. Die Rolle der endogenen Opioidpeptide in der Endomorphin-2 induzierten Antinozizeption.....	38
4.4. Die Bindung von Endomorphin-1 und Endomorphin-2 zu μ - und δ -Rezeptoren im Hinterwurzelganglion.....	40
4.5. Zeitwirkungsbeziehung der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem Endomorphin-1 im Vergleich zu Endomorphin-2.....	40
4.6. Antinozizeptive Effekte von β -Endorphin.....	41
4.6.1. Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem β -Endorphin.....	41
4.6.2. Endomorphin-1, Endomorphin-2 und β -Endorphin im Vergleich.....	41

5. Diskussion.....	43
5.1. Entzündung.....	43
5.2. Antinozizeptive Effekte der Endomorphine.....	44
5.2.1. Dosisabhängigkeit, Wirkdauer und periphere Wirkung.....	44
5.2.2. Rezeptorselektivität.....	46
5.2.3. Endomorphin-1, Endomorphin-2 und β -Endorphin im Vergleich.....	48
6. Schlussfolgerung und Ausblick.....	49
7. Zusammenfassung.....	50
8. Abkürzungsverzeichnis.....	52
9. Literaturverzeichnis.....	54
10. Lebenslauf.....	63
11. Danksagung.....	64
12. Eidesstattliche Erklärung.....	65

1. Einleitung

1.1. Schmerz

Der Schmerz ist durch die *International Association for the Study of Pain* als unangenehme, sensorische (d.h. Nozizeption) und emotionale Erfahrung definiert, die mit bereits eingetretenen oder drohenden Verletzungen einhergeht oder als solche empfunden wird. Der Schmerz wird in verschiedene Formen unterteilt wie z.B. der entzündliche und der neuropathische Schmerz. Der Entzündungsschmerz (z.B. postoperativer und arthritischer Schmerz) gehört zu den häufigsten Formen der akuten und chronischen Schmerzen. Schmerzen sind von großer Bedeutung sowohl für die Gesundheit des Einzelnen, als auch für die Ökonomie, nicht nur aufgrund der direkten medizinischen Behandlungskosten, sondern auch wegen der Kosten, die durch Arbeitsausfall entstehen. Ein weiterer Grund sind Ausgleichszahlungen und Pensionen, die chronischen Schmerzpatienten bezahlt werden müssen.

Der erste Schritt in der Schmerzbehandlung ist üblicherweise pharmakologisch. Bei chronischen Schmerzen wird dieser unterstützt durch Verhaltensänderungen der Patienten [1]. Die Opioide (z.B. Morphin) sind die effektivsten Medikamente in der Behandlung des akuten und des chronischen Schmerzes, jedoch ist der breite Einsatz durch Nebenwirkungen wie Atemdepression, Übelkeit, Bewusstseinsstörungen, körperliche und psychische Abhängigkeit, die von dem Einfluss der Opioide auf das zentrale Nervensystem (Gehirn, Rückenmark) herrühren, eingeschränkt [2]. Eine neue Generation von Opioiden ist in der Entwicklung [1]. Diese neue Klasse aktiviert selektiv Opioidrezeptoren außerhalb des zentralen Nervensystems, wodurch die oben genannten Nebenwirkungen umgangen werden [1,3].

1.2. Periphere Opioidrezeptoren

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass die schmerzhemmende Wirkung (d.h. Analgesie) der Opioide durch Rezeptoren vermittelt wird, die ausschließlich im zentralen Nervensystem vorkommen [4]. Drei verschiedene Opioidrezeptoren sind bekannt: μ -, δ - und κ -Rezeptoren. Die cDNAs und ihre Gene, die für die drei Opioidrezeptoren kodieren, wurden bereits identifiziert [2]. Mittlerweile konnten alle drei Opioidrezeptoren neben dem zentralen Nervensystem auch im Hinterwurzelganglion und an peripheren sensorischen Nervenendigungen sowohl bei Tieren als auch bei Menschen nachgewiesen werden (Abb.1) [5,6]. Die Zellkerne dieser peripheren sensorischen Neurone liegen in den Hinterwurzelganglien und exprimieren die mRNA aller drei Opioidrezeptoren und deren

Rezeptorproteine [7]. Die Bindungscharakteristik der peripheren Opioidrezeptoren ist der der zentralen Opioidrezeptoren ähnlich [8]. Alle drei Rezeptoren gehören zu der Familie der sieben transmembranären G-Protein-gekoppelten Rezeptoren [9]. Nach Bindung von Opioidagonisten an den Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der inhibitorischen G-Proteine ($G_{i/o}$). Die Aktivierung führt zum Verschluss von Kalzium- und Natriumkanälen und zu einer Abnahme von cyclischem Adenosinmonophosphat [10,11]. Somit bewirken Opioide eine Abnahme der neuronalen Erregung, der Ausbreitung der Aktionspotentiale und der Freisetzung von nozizeptiven, inflammatorischen Neuropeptiden (z.B. Substanz P) an den peripheren Endigungen der Nozizeptoren [12,13]. Die Aktivierung von Opioidrezeptoren an den peripheren Endigungen von sensorischen Nerven durch Opioide führt beim Menschen zur Analgesie, bzw. beim Tier zur Antinozizeption. Es zeigte sich, dass die Opioidrezeptoren von dem Hinterwurzelganglion zu den peripheren Endigungen der sensorischen Nerven transportiert werden [14], und dass die Synthese und der axonale Transport durch Entzündung verstärkt wird [5,8]. Somit führt die Entzündung im peripheren Gewebe zu einer Hochregulierung der Opioidrezeptoren [5,8]. Aufgrund der vermehrten Anzahl von nozizeptiven Nervenendigungen und der unterbrochenen perineuralen Barriere im entzündeten Gewebe ist der Zugang der Opioidagonisten zu den Rezeptoren vereinfacht [15,16]. Diese Effekte münden in einer verstärkten analgetischen Effektivität von Opioiden an den peripheren Rezeptoren im entzündeten Gewebe. Im Gegensatz dazu ist im nicht entzündeten Gewebe höchstens eine geringe analgetische Wirkung der Opioide nachweisbar [1,16].

Die Bedeutung der Opioidrezeptoren an sympathischen Nervenfasern im Rahmen peripherer antinozizeptiver Effekte von Opioiden wird kontrovers dargestellt [1,17]. Inwieweit Opioidrezeptoren von Immunzellen exprimiert werden, wurde bisher nicht untersucht.

1.3. Periphere Opioidantinozizeption

Die periphere Opioidantinozizeption kann entweder mit Agonisten erreicht werden, die nach systemischer Applikation die Bluthirnschranke nicht passieren können und somit keinen Zugang zum zentralen Nervensystem haben oder durch Injektion von Opioidagonisten in geringen, systemisch inaktiven Dosierungen direkt in das periphere entzündete Gewebe (Abb.1).

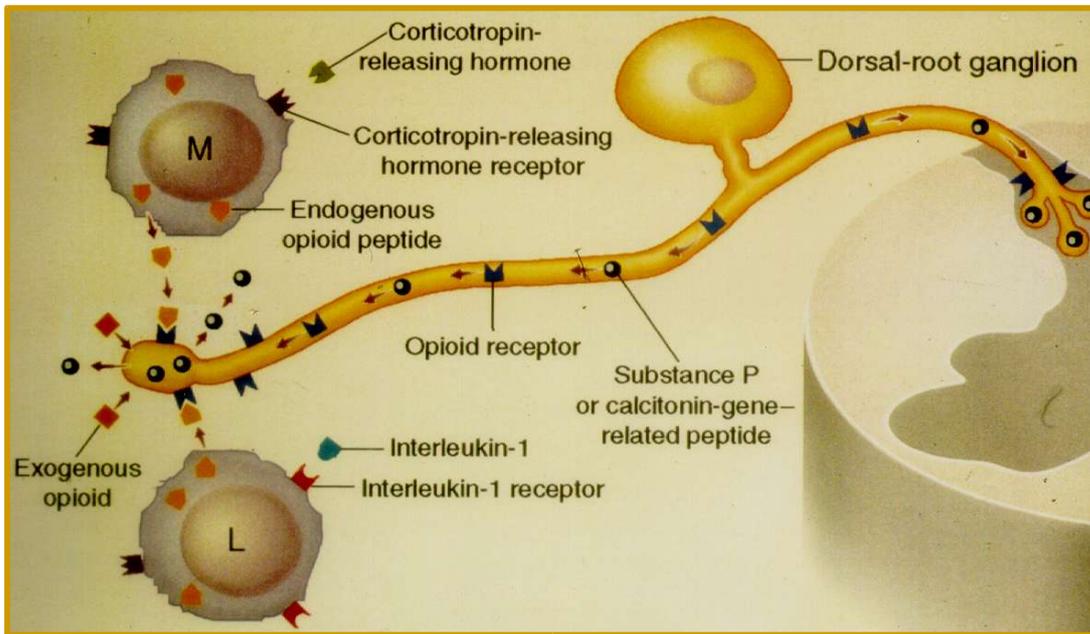


Abbildung 1. Die Interaktionen von Opioiden an peripheren Opioidrezeptoren im entzündeten Gewebe. Opioidrezeptoren und Neuropeptide (wie z.B. Substanz P oder das Calcitonin-geordnete Peptid) werden im Hinterwurzelganglion synthetisiert und zu zentralen und peripheren Prozessen entlang des primär afferenten Neurons transportiert. Exogene Opioiden binden an diese peripheren Opioidrezeptoren. Daraufhin kommt es zur Antinozizeption entweder durch Unterdrückung der Erregung des Nerven oder durch Verhinderung von erregenden, proinflammatorischen Neuropeptiden (wie z.B. Substanz P oder dem Calcitonin-geordneten Peptid). Bei Aktivierung durch Stress oder Releasingfaktoren (z.B. Corticotropin Releasing Hormone) sezernieren Immunzellen Opioidpeptide, die ebenfalls die peripheren Opioidrezeptoren aktivieren. L = Lymphozyten, M = Monozyten; modifiziert nach Stein [18]

Die periphere Antinozizeption konnte beim neuropathischen, viszeralen, Knochen- und Entzündungsschmerz bei Tieren bereits festgestellt werden [1,19-21]. Viele klinische Studien untersuchten die direkte Applikation von Opioiden in die verletzten Regionen [1,21,22]. Zum Beispiel kann lokal appliziertes Morphin die Schmerzen bei chronisch rheumatischer Arthritis und bei Osteoporose lindern. Zudem kann es im Rahmen diverser Operationen, wie z. B. Knie-, Zahn-, Harnblasen- oder laparoskopischen Operationen, sowie bei der Entnahme von Knochenmark eingesetzt werden [1]. Diese selektive Aktivierung von peripheren Opioidrezeptoren hat den entscheidenden Vorteil, dass eine effektive Analgesie gewährleistet werden kann, ohne dass die typischen Nebenwirkungen von zentral wirkenden Opioiden oder Zyklooxygenasehemmern auftreten.

Opioidrezeptoren können auch von endogenen Opioidpeptiden aktiviert werden (Abb.1). Mitte der 70er Jahre wurden drei Familien von Opioidpeptiden in Nerven und im neuroendokrinen System charakterisiert [23]. Die drei Familien entstehen aus den drei verschiedenen Vorstufenproteinen Proopiomelanocortin (POMC), Proenkephalin und

Prodynorphin [23]. Durch entsprechende Reaktionen entstehen aus den Vorstufenproteinen die jeweiligen Opioid-peptide β -Endorphin, Enkephaline und Dynorphin A [23] (Tabelle 1).

β -Endorphin besteht aus 31 Aminosäuren, Dynorphin A aus 17 und die Enkephaline sind aus 5 Aminosäuren aufgebaut. Diesen Opioidpeptiden ist die Grundstruktur von Tyr-Gly-Gly-Phe am N-terminalen Ende gemeinsam. Keines dieser Peptide zeigt eine Selektivität zu nur einem der Opioidrezeptoren. β -Endorphin bindet vor allem an μ - aber auch an δ -Rezeptoren, Enkephaline binden hauptsächlich an δ -, aber auch an μ -Rezeptoren und Dynorphin bindet überwiegend an κ -, jedoch auch an μ - und δ -Rezeptoren [23,24].

Innerhalb des Nervensystems ist die Verteilung der Opioidpeptide unterschiedlich. Im Gehirn kommen alle drei Peptide vor, im Rückenmark und in den Hinterwurzelganglien hingegen werden überwiegend Enkephaline und Dynorphine exprimiert. β -Endorphin wird darüber hinaus in der Hypophyse produziert, und in der Nebennierenrinde werden Enkephaline gebildet [23]. Außerdem wurde die Synthese aller drei Peptide durch Immunzellen nachgewiesen [25-27]. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass die Opioidpeptide, die von Immunzellen abstammen, die überwiegende Gruppe der endogenen Liganden stellen, die an periphere Opioidrezeptoren binden und somit der lokalen Unterdrückung des Entzündungsschmerzes dienen (Abb.1) [1,26].

Tabelle 1. Struktur und Rezeptorspezifität der endogenen Opioidpeptide

Opioidpeptide	Peptidstruktur	Opioidrezeptoren
β -Endorphin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln- Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile- Val-Lys-Asn-Ala-His-Lys-Lys-Gly-Gln-OH	μ , δ
Met-Enkephalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH	δ , μ
Leu-Enkephalin	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH	δ , μ
Dynorphin A	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys- Leu-Lys-Tyr-Asp-Asn-Gln-OH	κ , μ , δ
Endomorphin-1	Tyr-Pro-Trp-Phe-OH	μ
Endomorphin-2	Tyr-Pro-Phe-Phe-OH	μ

1.4. Endomorphine

1.4.1. Aufbau, Isolierung und Expression

Endomorphin-1 (EM-1) und Endomorphin-2 (EM-2) sind zwei neu entdeckte endogene Opiode mit einem Molekulargewicht von 665,7, bzw. von 626,7 kDa [28,29]. Sie sind sehr kurze Peptide, die nur aus 4 Aminosäuren bestehen (Tabelle 1). Diese Peptide unterscheiden sich in ihrer Aminosäuresequenz von den bereits bekannten endogenen Opioidpeptiden, denen die Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe gemeinsam ist [23,28]. Die Aminosäuresequenz der Endomorphine (EMs) Tyr-Pro ist identisch mit den bereits bekannten Opioiden β -Casomorphin, Morpiceptin und Hemorphin. Diese konnten jedoch nicht im Gehirn nachgewiesen werden [28].

Die EMs binden mit einer hohen Selektivität und Spezifität an μ -Opioid-Rezeptoren [28,30], den wichtigsten Opioidrezeptoren bei der Behandlung von akutem und chronischem Schmerz von Patienten. EM-1 zeigt am μ -Opioid-Rezeptor eine 4000 mal höhere Selektivität als am δ -Opioid-Rezeptor und eine 15000 mal höhere Selektivität als am κ -Opioidrezeptor. Für EM-2 ist eine dementsprechende 13000, bzw. 7500 höhere Selektivität bekannt [28]. Die EMs konnten in Studien mit Hilfe des Radioimmunoassays und der Immunzytochemie in den Nervensystemen von Rindern, Menschen, Ratten, Affen, Mäusen und Meerschweinchen nachgewiesen werden [28,29]. Im Rindergehirn ist die Konzentration dieser Peptide geringer als die Konzentration von den Enkephalinen, aber vergleichbar mit der von β -Endorphin und Dynorphin A [28]. In sehr viel höheren Dosierungen konnten die EMs im menschlichen Gehirn nachgewiesen werden [31]. Beide EMs wurden in Strukturen gefunden, die mit der Schmerzweiterleitung und mit der Expression von μ -Rezeptoren assoziiert werden. EM-1 ist im Vergleich zu EM-2 überwiegend im Gehirn vorzufinden, EM-2 ist hingegen im Rückenmark prävalenter [32]. Neben dem zentralen Nervensystem wurden die Endomorphine auch in peripheren Abschnitten von primär sensorischen Nerven und in Immunzellen gefunden [33,34].

1.4.2. Antinozizeptive Effekte der Endomorphine

Vorangegangene Studien haben sich auf die Evaluation der antinozizeptiven Effekte konzentriert, die durch die EMs im zentralen Nervensystem induziert wurden. Dabei wurden entweder Tiere mit einem akuten Schmerzereignis (ohne Gewebsverletzung) oder Tiere mit einer Entzündung untersucht, die erst seit kurzer Zeit bestand (1-3 Std.) [29,35]. Injektionen von EM-1 oder EM-2 in den lateralen Ventrikel des Gehirns (intraventrikulär)

fürten zu einer dosisabhängigen Anhebung der Schmerzschwelle. Die Schmerzschwelle wurde durch einen schmerzhaften Druck auf die Hinterpfote (Pfetendruck-Test) oder durch einen schmerzhaften thermischen Reiz auf den Schwanz (Schwanzschlag-Test) oder auf die Hinterpfoten (heiße Platte-Test) bestimmt. Dieses wurde an gesunden Tieren [28,35-41] oder an Tieren mit einer durch Formalin induzierten Entzündung der Hinterpfote [42] durchgeführt. Vergleichbare antinozizeptive Effekte wurden nach der Applikation von EMs in das Rückenmark (intrathekal) beobachtet. Dazu wurden schmerzhafte thermische und mechanische Reize auf die Hinterpfote von Tieren appliziert. Dieses erfolgte an Tieren ohne Gewebsverletzung [43-48], an Tieren mit einer Entzündung in nur einer Hinterpfote, die durch Formalin [43,49] oder durch Carrageenan [48,50,51] induziert wurde oder an Tieren bei denen der Nervus ischiadicus ligiert wurde [52]. Die Ligatur des Nervus ischiadicus diente dem Modell des neuropathischen Schmerzes.

1.4.3. Die Rezeptorselektivität der durch EMs induzierten Antinozizeption

Die antinozizeptiven Effekte der EMs konnten in sämtlichen Schmerzuntersuchungen durch unterschiedliche Antagonisten aufgehoben werden, z.B. durch Naloxon und durch Naltrexon, den klassischen Antagonisten aller Opioidrezeptoren [28,41,53,54] oder durch die selektiven Antagonisten an den μ -Opioidrezeptoren wie Naloxonazin [53,55], β -Funaltrexamin [28,53,55], Cyprodim [43,56] und durch CTOP [28,47]. CTOP ist ein μ -Opioidrezeptorantagonist mit der Struktur D -Phe-Cys-Tyr- D -Try-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂. In den μ -Rezeptor Knockout-Mäusen sind antinozizeptive Effekte der EMs nicht aufgetreten [39,40]. CXBK-Mäuse sind gegenüber EMs nicht sensitiv aufgrund eines Mangels an μ_1 -Bindungsstellen im Gehirn [53]. Folgende Studien gehen davon aus, dass die antinozizeptiven Effekte der EMs durch μ -Opioidrezeptoren im Gehirn [28,53,55], im Rückenmark [43,47,55] oder im peripheren Gewebe [52] vermittelt werden. Darüber hinaus wurde in einigen Studien berichtet, dass die EM-2 induzierte Antinozizeption durch selektive κ - oder δ -Rezeptorantagonisten aufgehoben werden konnte. Die Antagonisten wurden entweder in das Gehirn [36-38] oder in das Rückenmark [46,47] appliziert. Die Antagonisierung wurde durch eine EM-2 induzierte Freisetzung von Dynorphin A (1-17) und Met-Enkephalin [57,58] begründet. Dieses wiederum impliziert eine indirekte Wirkung von EM-2 durch die κ - und δ -Rezeptoren.

2. Zielsetzung

Der Entzündungsschmerz ist einer der häufigsten Formen des akuten und chronischen Schmerzes. Die meisten Medikamente zur Behandlung des Entzündungsschmerzes (z.B. nichtsteroidale Antiphlogistika und zentral wirkende Opiode) können zu ernsthaften Nebenwirkungen führen. Somit ist ein hoher Bedarf an neuen Mitteln und Applikationsformen vorhanden, die eine Linderung der Entzündungsschmerzen ohne Nebenwirkungen bewirken. Die EMs sind die endogenen Opiode, die zuletzt entdeckt wurden. Sie binden mit einer hohen Spezifität und Affinität an den μ -Opioidrezeptor [28], dem wichtigsten Opioidrezeptor für die Kontrolle des akuten und chronischen Schmerzes in der Klinik. Die Expression von EMs durch Immunzellen und primär sensorische Nerven [33,34] lässt vermuten, dass die EMs Liganden an peripheren Opioidrezeptoren sind. Im Gegensatz zu Studien bezüglich des neuropathischen Schmerzes [52] war es bisher nicht bekannt, ob die EMs einen seit längerem bestehenden entzündlichen Schmerz unterdrücken können. Des Weiteren steht ein direkter Vergleich zwischen den EMs und dem klassischen endogenen Opioid β -Endorphin unter oben genannten Bedingungen noch aus.

Der Schwerpunkt meiner Studie lag auf der Ermittlung der peripheren antinozizeptiven Effekte von EM-1 und EM-2 bei länger bestehenden entzündlichen Schmerzen. Das Modell für diese Bedingungen lieferte mir für meine Versuche eine durch komplettes Freundesches Adjuvanz (CFA) induzierte Entzündung in der rechten Hinterpfote von Ratten. Insbesondere zielte ich auf die Antworten folgender Fragen:

1. Wirken EM-1 und EM-2 im peripheren entzündeten Gewebe antinozizeptiv?
2. Wirken EM-1 und EM-2 im peripheren nicht entzündeten Gewebe antinozizeptiv?
3. Welche Opioidrezeptoren vermitteln die peripheren antinozizeptiven Effekte von EM-1 und EM-2?
4. Kommt es durch EM-1 und EM-2 indirekt über andere Opioidpeptide zu antinozizeptiven Effekten?
5. Binden EM-1 und EM-2 an periphere Opioidrezeptoren?

6. Wie wird die durch EM-1 und EM-2 induzierte periphere Antinozizeption im Vergleich zu den Effekten von β -Endorphin vermittelt?

3. Methodik

3.1. Tiere

In allen Experimenten wurden männliche Ratten vom Stamm *Wistar* mit einem Gewicht von 170 - 200 g eingesetzt, die in der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Deutschland, gezüchtet wurden.

Die Ratten waren in Räumen mit gleichbleibender Temperatur, $22 \pm 1^\circ\text{C}$, und einer Luftfeuchtigkeit zwischen 60% und 65% untergebracht. In den Räumen gab es keine Fenster, es herrschte ein strenger Hell-dunkel-Rhythmus. Von morgens 7:00 Uhr bis abends 19:00 Uhr war das Licht an, von 19:00 Uhr bis 7:00 Uhr das Licht aus. Diese standardisierten Rahmenbedingungen dienten dazu, durch möglichst gleichbleibende Umstände bei den Tieren so wenig Stress wie möglich auszulösen, und damit die Fehlerquote so gering wie möglich zu halten. Die Käfige waren mit 3 - 4 cm Kleintierstreu bedeckt und stets mit Standardnahrung für Nagetiere (Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Leitungswasser ausreichend gefüllt.

Die Experimente und die Pflege der Tiere entsprachen dem Standard der ethischen Richtlinien [59] und sind von den örtlichen Verantwortlichen (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheit und Technische Sicherheit, Berlin, Deutschland) genehmigt worden. Die Aktenzeichen und die Daten der behördlichen Genehmigungen für die Tierversuche sind G 0047/98 01.04.1999 und G 0200/03 08.12.2003.

3.2. Vorbereitung für die Versuche

Vor der Durchführung einer Versuchsreihe waren die Ratten in reinen Tierräumen untergebracht. Fünf Tage vor den Versuchen wurden die Tiere in die Untersuchungsräume gebracht und in Einzelkäfige gesetzt. Die Ratten wurden an 4 Tagen täglich von mir aus ihren Käfigen herausgeholt und einer dem Versuch ähnlichen Situation ausgesetzt. Dabei wurden sie jedoch nicht untersucht, sondern sollten lediglich an den Versuchsablauf und an mich gewöhnt werden. Dieses Verfahren diente zur Stressreduzierung bei den Ratten und somit ebenfalls zur Minimierung von Fehlerquellen. Für jede einzelne Behandlung, d.h. für jede unterschiedliche Dosierung einer Substanz wurde eine andere Gruppe von Ratten ($n = 6 - 8$ pro Gruppe) inklusive einer Kontrollgruppe

eingesetzt. Alle Experimente wurden in einem mir verblindeten Ablauf durchgeführt, d.h. ich habe nummerierte Gefäße erhalten ohne über deren Inhalt zu wissen.

3.3. Substanzen

Substanzen zur Inhalation

Halothan (Willy Rüscher Hospital Vertrieb, Böblingen, Deutschland)

Substanzen zur Injektion

Es wurden entweder Opioidrezeptoragonisten oder Opioidrezeptorantagonisten, bzw. CFA zur Entzündungsinduktion oder 0,9%-iges NaCl für die Kontrollgruppe injiziert. CFA (Calbiochem, San Diego, USA) besteht aus 0,1%-igem abgetöteten *Mycobacterium butyricum* in 85%-igem Marcol 52 und 15%-igem Aracel A mannide monooleate. Alle Agonisten und Antagonisten wurden zuvor in 0,9%-igem NaCl oder in sterilem Wasser gelöst.

Opioidrezeptoragonisten

EM-1, Opioidpeptid, selektiv gegenüber μ -Opioidrezeptoren

EM-2, Opioidpeptid, selektiv gegenüber μ -Opioidrezeptoren

β -Endorphin, Opioidpeptid, bindet an μ - und δ -Opioidrezeptoren

Alle drei Agonisten wurden von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Opioidrezeptorantagonisten

Naloxonhydrochlorid (NLX), ein unselektiver Opioidrezeptorantagonist

D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Pen-Thr-NH₂ (CTOP), ein selektiver μ -Opioidrezeptorantagonist

N,N-diallyl-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu (ICI 174,864) ein selektiver δ -Opioidrezeptorantagonist

Naltrindolhydrochlorid (NTI), ein selektiver δ -Opioidrezeptorantagonist

norBinaltorphimindihydrochlorid (norBNI), ein selektiver κ -Opioidrezeptorantagonist

Alle Antagonisten wurden von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

Monoklonale Antikörper gegen Opioidpeptide

anti- β -Endorphin (Peninsula Laboratories, Merseyside, UK)

anti-Met-Enkephalin (Peninsula Laboratories, Merseyside, UK)

anti-Leu-Enkephalin (Phoenix Pharmaceuticals, Inc., Belmont, CA)

3.4. Anästhesie

Alle Ratten erhielten stets vor einer Injektion eine kurze Halothannarkose, damit der Einstichschmerz der Nadel so weit wie möglich reduziert werden konnte und somit die Ratten so wenig Stress wie möglich ausgesetzt wurden. Für die Durchführung der Narkose wurden die Ratten vorsichtig aus ihren Käfigen entnommen und einzeln in einen Glastopf gesetzt. In diesem Topf befand sich unter einem mit Löchern versehenen Zwischenboden in Halothan getränkter Zellstoff. Nachdem die Ratten in den Topf gesetzt wurden, wurde das Gefäß, welches sich in einem verschließbaren Exhaustor befand, verschlossen. Während der Anschlagzeit wurden die Tiere konstant beobachtet und anschließend narkotisiert herausgeholt, um die Injektion zu erhalten.

3.5. Injektionen

Intraplantar

Intraplantare (i.pl.) Injektionen erfolgten nach oben genannter Sedierung entweder unilateral in die entzündete Pfote oder bilateral in beide Hinterpfoten. Die unilaterale Injektion erfolgte entweder zur Induktion der Entzündung mit CFA oder während der Versuche mit EMs in Kombination mit Antikörpern oder mit Antagonisten. Die bilaterale Injektion wurde bei der Beurteilung des zeitlichen Verlaufs und der Dosisabhängigkeit angewandt. Das Volumen für die i.pl. Injektion betrug bei der Verwendung von CFA 150 µl, bei allen anderen Substanzen jeweils 100 µl.

Subkutan

Für die subkutane (s.c.) Injektion erhielten die Ratten keine Sedierung. Sie wurden sanft unter Zellstoff gehalten und erhielten in eine Hautfalte am Nacken 200 µl injiziert.

Bei beiden Formen der Injektion wurden 1 ml Spritzen mit einer 26 Gauge Kanüle verwendet (Omnifix-F, B. Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland).

3.6. Entzündung

Induktion

Zur Induktion der Entzündung wurden den Ratten am ersten Versuchstag 150 µl CFA (siehe 3.3.) in die rechte Hinterpfote i.pl. injiziert (siehe 3.5.). Die Entzündung und der darauffolgende Schmerz in der geimpften Pfote entwickelte sich innerhalb von 6 bis 24 Stunden (Std.) und hielt bis über das Versuchsende hinaus an. Die Versuche erfolgten am 3.-6. Tag nach der Injektion. Diese Periode war sowohl notwendig, als auch hinreichend für einen validen Vergleich mit klinischem Schmerz. Zu diesem Zeitpunkt gab es keinen signifikanten Unterschied im Fressverhalten, Körpergewicht oder dem generellen Aktivitätslevel im Vergleich zu den nicht behandelten Tieren [60].

Beurteilung

Der Grad der Entzündung (siehe Abb.2) kann durch die Messung des Pfootenvolumens und der Pfootentemperatur ermittelt werden. In beiden Fällen wurden sowohl die Werte der entzündeten, als auch der nicht entzündeten Pfoten gemessen, so dass die nicht entzündeten Pfoten als Vergleichswerte dienten.

Pfootentemperatur

Die Oberflächentemperatur der Haut der Hinterpfote wurde mit einem Kontaktthermometer (Cooper Instrument Corporation, Middlefield, CT) gemessen. Die Ratten wurden dazu aus ihren Käfigen genommen und vorsichtig unter Zellstoff gehalten. Das Thermometer wurde auf dem Fußrücken plaziert und die Temperatur von einem digitalen Display abgelesen. Die Temperatur der einzelnen Pfote wurde aus dem Mittelwert von zwei aufeinander folgenden Messungen bestimmt.

Pfootenvolumen

Das Pfootenvolumen wurde mit Hilfe des Plethysmometers (Ugo Basile, Comerio, Italien) ermittelt. Dazu wurden die Tiere aus ihren Käfigen genommen und vorsichtig unter Zellstoff gehalten. Die Pfote wurde bis zu dem oberen Sprunggelenk in ein mit 0,9%-igem NaCl gefülltes Gefäß getaucht und das Verdrängungsvolumen, welches dem Pfootenvolumen entspricht, auf einem digitalen Display angezeigt. Das Volumen der einzelnen Pfote wurde aus dem Mittelwert von zwei aufeinander folgenden Messungen bestimmt.

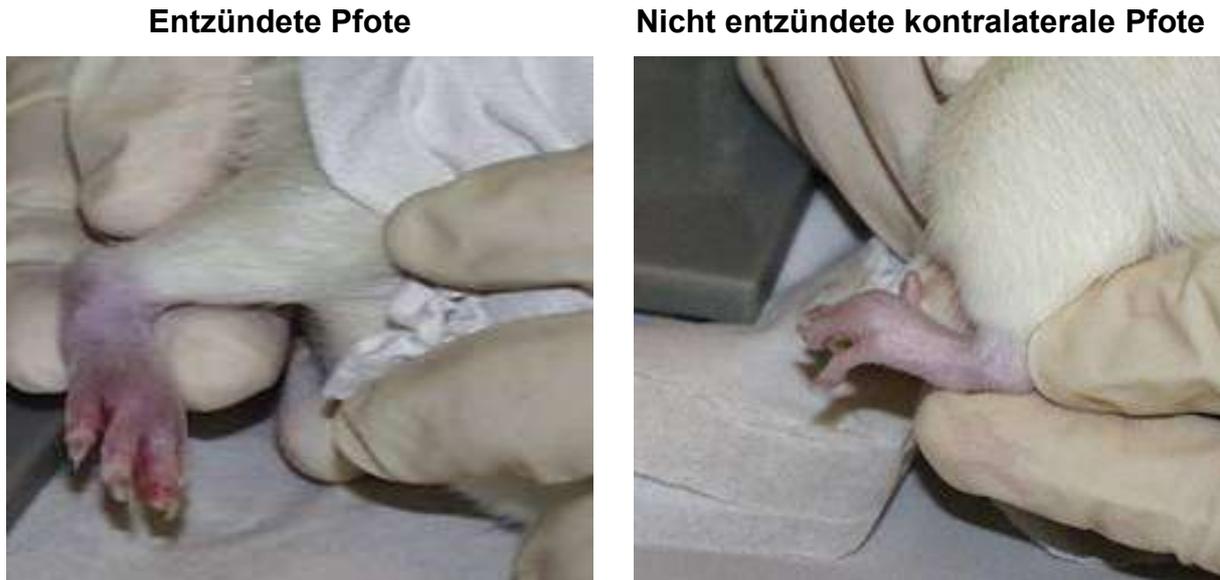


Abbildung 2. Induktion der CFA-Entzündung in Ratten vom Wistar-Typ

3.7. Messung der Hyperalgesie und der Antinozizeption

Hyperalgesie (d.h. verstärkte Schmerzantwort) nach der CFA-Injektion oder antinozizptive Effekte, die durch verschiedene Substanzen induziert werden, können in einem standardisierten Schmerztest nach Applikation von Druck gemessen werden [61]. Dafür wurden die Ratten vorsichtig aus ihren Käfigen genommen, unter Zellstoff gehalten und eine Hinterpfote auf ein Podest gehoben. Die Messung erfolgte mit Hilfe eines Standard-Analgesiometers (siehe Abb.3; Ugo Basile, Comerio, Italien). Dabei wurde ein langsam ansteigender Druck auf die Pfote einer Ratte ausgeübt und die Pfortendruckschmerzschwelle (PDS) ermittelt, bei der die Ratte ihre Pfote zurückzieht. Die maximale Belastung war bei 250 g limitiert, um Hautverletzungen, falls bei starker Analgesie keine Missempfindung auftrat, zu verhindern. Die PDS wurde durch drei einzelne aufeinander folgende Untersuchungen bestimmt, jeweils in einem Abstand von 10 Sekunden. Aus diesen drei Werten wurde der Mittelwert gebildet. Am Anfang eines jeden Versuches wurde der Ausgangs-Wert der PDS ermittelt. Anschließend wurden den Ratten die zu untersuchende Substanz injiziert und in ihre Käfige zurückgelegt, um zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion zur Ermittlung der PDS wieder herausgeholt zu werden. Die PDS wurde stets an beiden Pfoten bestimmt. Der Ablauf von der linken und der rechten Pfote wechselte zwischen jedem Tier, um einen „Reihenfolgeeffekt“ auszuschließen. In diesem Test ist die Hyperalgesie durch eine Verminderung der PDS, die Antinozizeption hingegen durch einen Anstieg der PDS charakterisiert.



Abbildung 3. Ermittlung der Pfortendruckschmerzschwelle

3.8. In vivo Versuchsprotokolle

Beurteilung der Entzündung

Die Pfortentemperatur, das Pfortenvolumen (siehe 3.6.) und die PDS (siehe 3.7.) wurden vor der CFA-Injektion (siehe 3.6.) und drei Tage danach bestimmt.

Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von EM-1, EM-2 und β -Endorphin

4 - 6 Tage nach der Entzündungsinduktion wurde der Ausgangswert der PDS ermittelt. Zunächst wurden den Ratten i.pl. EM-1 (0,3 - 1,25 μ g), EM-2 (0,3 - 1,25 μ g) oder β -Endorphin (0,125 - 2 μ g) appliziert und die PDS 5 min nach Injektion erneut bestimmt (d.h. zum Zeitpunkt der größten Amplitude der PDS). Die EMs wurden in beide Pforten gespritzt, um die Wirkung in der nicht entzündeten Pforte zu untersuchen.

Zeitwirkungsbeziehung der antinozizeptiven Effekte von EM-1 und EM-2

4 - 6 Tage nach der Entzündungsinduktion wurde der Ausgangswert der PDS ermittelt. Anschließend wurden den Ratten i.pl. EM-1 (0,625 μ g) oder EM-2 (0,625 μ g) appliziert und die PDS 5 - 40 min nach Injektion erneut bestimmt. Diese Dosierungen sind die effektivsten Dosierungen, die in den Dosisabhängigkeitsuntersuchungen festgestellt wurden. Da es sich im Verlauf zeigte, dass es nur in der entzündeten Pforte zu einem antinozizeptiven Effekt kam, wurden in den folgenden Untersuchungen sämtliche

Substanzen ausschließlich in die entzündete Pfote gespritzt. Eine Vielzahl von Studien zeigt ebenfalls, dass die Opiode im nicht entzündeten Gewebe keine antinozizeptiven Effekte haben [1,21,62,63].

Periphere Wirkung der durch EM-1 und EM-2 induzierten Antinozizeption

4 - 6 Tage nach der Entzündungsinduktion wurde der Ausgangswert der PDS ermittelt. Zur Bestätigung der peripheren Wirkung wurde den Tieren EM-1 oder EM-2 in einer Dosierung von 1,25 µg s.c. injiziert. In den vorangegangenen Experimenten zeigte sich, dass 0,625 µg i.pl. die effektivste Dosierung war. Um einen systemischen Effekt beurteilen zu können, wurde die gesamte Menge (1,25 µg) aus beiden Pfoten (je 0,625 µg) s.c. appliziert. Die PDS wurde 5 - 40 min später erneut gemessen. Die periphere Wirkung der Antinozizeption von i.pl. appliziertem β -Endorphin wurde bereits früher demonstriert [64].

Opiodrezeptor-Selektivität der durch EM-1 und EM-2 induzierten Antinozizeption

Die PDS wurde 4 - 6 Tage nach der Entzündungsinduktion bestimmt. Anschließend wurden den Ratten i.pl. EM-1 (0,625 µg) oder EM-2 (0,625 µg) zusammen mit CTOP (0,0625 - 0,5 µg), ICI 174,864 (0,075 - 2,5 µg) oder norBNI (0,1 - 100 µg) injiziert. Die durch EM-2 induzierte Antinozizeption ließ sich durch ICI 174,864 aufheben (siehe 4.3.4.). Um den Einfluss des δ -Rezeptors festzustellen, wurden ein weiterer selektiver δ -Antagonist (Naltrindole; 10 - 80 µg) sowie Antikörper gegen Met-Enkephalin (0,1 - 20 µg), gegen Leu-Enkephalin (0,1 - 8 µg) und gegen β -Endorphin (0,1 - 2 µg) eingesetzt. Der Antagonist, bzw. die Antikörper wurden jeweils zeitgleich mit EM-2 i.pl. appliziert. Zur Bestätigung der peripheren Wirkung wurde den Tieren unmittelbar vor der i.pl. Applikation der EMs die effektivste Dosierung des i.pl. applizierten Antagonisten s.c. injiziert. Die PDS wurde als Ausgangswert und 5 min nach den Injektionen gemessen.

Kontrollgruppen

Die Kontrollgruppen erhielten in allen in vivo Experimenten 0,9%-iges NaCl stets in der gleichen Menge und auf die gleiche Applikationsweise wie die Verumgruppe.

3.9. Ex vivo Opiodrezeptorbindung

Da die Antinozizeption, die durch EM-2 induziert wurde, sowohl durch μ - als auch durch δ -Opiodrezeptoren blockierbar war (siehe 4.3.4.), untersuchten wir, ob EM-2 direkt an μ - und δ -Opiodrezeptoren bindet. Als Vergleich betrachteten wir ebenfalls das

Bindungsverhalten von EM-1 zu diesen Rezeptoren. Da die peripheren Opioidrezeptoren in den Hinterwurzelganglien gebildet werden, benutzten wir dieses Gewebe für unsere Versuche. Diese Versuche wurden von Prof. Dr. C. Zöllner aus unserer Arbeitsgruppe durchgeführt.

Vier Tage nach i.pl. Injektion von CFA oder 0,9%-igem NaCl (0,15 ml) wurden die Tiere durch eine Halothanüberdosierung eingeschlafert und die lumbalen (L₃-L₅) Hinterwurzelganglien ipsilateral der i.pl. Injektion entfernt. Es konnten Membranen von den Hinterwurzelganglien gewonnen werden, wie es von Zöllner et al. beschrieben wurde [65]. Das Gewebe wurde unmittelbar anschließend auf Eis in eine kalte Pufferlösung gegeben (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7,4), mit einem Polytron Homogenisator (Kinematica AG, Littau, Schweiz) homogenisiert und mit 48000 g bei 4°C für 20 min zentrifugiert. Die Pellets wurden in einer Pufferlösung resuspendiert und anschließend für 10 min bei 37°C zur Entfernung der endogenen Liganden inkubiert. Das Homogenisat wurde erneut mit 48000 g zentrifugiert und in einer Pufferlösung resuspendiert. Die Membranen wurden aliquotiert und für 30 min bei -80°C gelagert.

Die Bindungsstudien, bei denen wir [³H]-Liganden verwendeten, wurden laut Zöllner et al. durchgeführt [65]. Die μ - und δ -Rezeptorbindungsstellen wurden untersucht, indem 100 μ g Membranprotein mit 2 nM [³H]-[D-Ala², N-ME-Phe⁴, Gly⁵-ol]enkephalin ([³H] DAMGO, 65 Ci/mmol; selektiver μ -Ligand) (Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK) oder mit 1 nM [³H]-naltrindol (35 Ci/mmol; selektiver δ -Ligand) (Amersham Biosciences) sowie mit festgelegten Konzentrationen von EM-1 (10 μ M) und EM-2 (10 μ M) inkubiert wurde. Unspezifische Bindungen wurden mit 10 μ M Naloxon Hydrochlorid (unselektiver Opioidrezeptorantagonist; Sigma) identifiziert. Die Membranen wurden für 1 Std. bei 30°C in dem endgültigen Volumen von 1 ml in Pufferlösung inkubiert.

Die Bindungsstudien, in denen der [¹²⁵I]-Ligand benutzt wurde, wurden laut Knapp et al. durchgeführt [66]. Die maximale Anzahl der δ -Bindungsstellen (B_{\max}) in den DRG-Neuronen wurde in kompetitiven Bindungsexperimenten bestimmt. Dazu wurden 20 μ g des Membranproteins mit [¹²⁵I]-[D-Pen^{2,5}]-enkephalin([¹²⁵I]-DPDPE; 3.7 Mbq, 100 μ Ci; selektiver δ -Ligand) (Amersham Biosciences) in sechs verschiedenen Konzentrationen (0,001 - 2 nM) inkubiert. Dieses geschah als verblindeter Doppelversuch, entweder in der Gegenwart oder in der Abwesenheit von Naloxon Hydrochlorid (10 μ M). Die Membranen wurden für 1 Std. bei 30°C in dem endgültigen Volumen von 800 μ l Pufferlösung inkubiert. In diesen Versuchen untersuchten wir B_{\max} , da die [¹²⁵I]-Liganden sensitiver als [³H]-Liganden sind. Zur Durchführung von kompetitiven Bindungsexperimenten mit den anderen Liganden wäre eine Ansammlung von vielen Hinterwurzelganglien einer großen

Anzahl weiterer Tiere notwendig.

In beiden Fällen wurden die Reaktionen durch eine schnelle Filtration im Vakuum durch den Whatman GF/B Glasfiberfilter beendet. Es folgten vier Waschvorgänge in kalter Pufferlösung (50 mM Tris-HCl, pH 7,4). Nach der Extraktion der Filter über Nacht, die entweder in 3 ml Szintillationsflüssigkeit (EG&G Wallax, Turku, Finland) im Falle der (³H)-Liganden stattfand oder mit Hilfe des Packard Auto-Gamma 5650-Szintillationszählers im Falle der (¹²⁵I)-Liganden erfolgte, konnte die gebundene Radioaktivität durch eine flüssige Szintillations-Spektrophotometrie determiniert werden. Die Daten der Ligandenbindungen repräsentieren Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Versuchen. Jeder Versuch wurde doppelt ausgeführt. Um die B_{max} Werte zu determinieren, wurden die (¹²⁵I)-DPDPE Sättigungsbindungsexperimente in einer einseitigen Bindungshyperbel unter Benutzung des GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA) dargestellt.

3.10. Statistische Analysen

Da in allen Experimenten die Werte gewöhnlich die gleiche Variationsbreite aufwiesen, konnten parametrische Tests angewandt werden. In allen Analysen wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5% (p-Wert < 0,05) als statistisch signifikant betrachtet. Die gewünschte Aussagekraft der durchgeführten Tests entsprach $\alpha < 0,800$.

A) Für unabhängige Daten, die beim Vergleich von Gruppen mit unterschiedlichen Individuen auftraten, wurde folgender Test verwendet:

A1) One Way Analysis of Variance (ANOVA) wurde zur Bestimmung von Unterschieden der Mittelwerte zwischen mehr als zwei untersuchten Gruppen angewandt. In unseren Experimenten wurde die PDS von vielen Gruppen untereinander verglichen, die unterschiedliche Dosierungen eines Medikaments erhalten hatten, unter der Nullhypothese, dass es keinen Unterschied zwischen den Gruppen gibt.

B) Abhängige Daten traten auf, wenn Veränderungen einer Gruppe vor und nach der Gabe von einem oder mehreren Medikamenten betrachtet wurden. Dazu wurden folgende Tests verwendet:

B1) Der paired t-Test wurde durchgeführt, um den Effekt einer Behandlung zu einem oder zwischen zwei Zeitpunkten miteinander zu vergleichen. In einem Versuchsablauf wurden die entzündeten und die nicht entzündeten Pfoten der selben Tiere miteinander verglichen, unter der Nullhypothese, dass es keinen

Unterschied in der PT, PV und PDS der Gruppen gibt. In einem anderen Versuchsablauf wurden die Veränderungen vor und nach der Injektion eines Medikaments untersucht, unter der Nullhypothese, dass es keine Veränderungen in der PDS gibt.

B2) One Way repeated Measures ANOVA wurde durchgeführt, um die Veränderungen an mehr als zwei Zeitpunkten für das selbe Tier festzustellen. In unseren Experimenten wurde die selbe Gruppe von Ratten an bis zu fünf verschiedenen Zeitpunkten untersucht (einmal vor und bis zu viermal nach der Injektion von EM-1 und/oder EM-2, alleine oder zusammen mit Antagonisten, bzw. nach der Injektion von 0,9% NaCl) mit der Nullhypothese, dass es in der PDS keinen Unterschied während des Ablaufes gibt.

B3) Two Way repeated Measures ANOVA wurde angewandt, um die Unterschiede von zwei Gruppen zu mehr als zwei Zeitpunkten zu beschreiben. In unseren Versuchen wurden zwei Gruppen von Ratten an bis zu fünf verschiedenen Zeitpunkten miteinander verglichen (d.h. als Ausgangswert vor der Medikamentengabe und zu vier verschiedenen Zeitpunkten nach der Medikamentengabe) unter der Nullhypothese, dass es keinen Unterschied in der PDS im Zeitverlauf gibt.

C) Der Dunnett's Test, bzw. der Bonferroni Test wurden benutzt, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen und das Level der Signifikanz bei einem Vergleich von multiplen Faktoren (post-hoc-test) exakt zu bestimmen. Diese Tests beinhalteten den Vergleich von multiplen Faktoren gegenüber der Kontrollgruppe. Der Dunnett's Test wurde im Anschluss an den One Way ANOVA Test oder den One Way repeated Measures ANOVA Test durchgeführt, der Bonferroni Test im Anschluss an den Two Way repeated Measures ANOVA Test. In einem Versuchsablauf wurden Ratten, die unterschiedliche Dosierungen eines Medikaments erhalten hatten, mit ihrer Kontrollgruppe verglichen. In einem weiteren Versuchsablauf wurden die Veränderungen einer Gruppe von Ratten über einen Zeitraum mit den PDS-Ausgangswerten verglichen.

D) Der Linear Regression Test wurde angewandt, um die Dosisabhängigkeit von verschiedenen Dosierungen von Substanzen zu untersuchen und damit die Nullkurvenhypothese zu überprüfen. Dieser Test folgte dem One Way ANOVA, sofern dieser signifikante Effekte darstellte.

E) Für die Analyse der Opioidrezeptorbindungen verwendeten wir den GraphPad Prism (GraphPad, San Diego, USA).

Für alle statistischen Erhebungen wurde das Computerprogramm SigmaStat Version 2.0 verwendet. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Softwareprogramms Excel Version 7.0 durchgeführt.

3.11. Beschreibende Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes („standard error of the mean“; SEM) erfasst. Die PT-, PV- und PDS-Ergebnisse wurden als absolute Werte angegeben; für die statistischen Auswertungen wurden ebenfalls nur absolute Werte verwendet.

Die jeweiligen Veränderung der PT-, PV- und PDS-Werte in Abhängigkeit von der Zeit wurden in Form von Säulendiagrammen dargestellt.

Das Dosis-Antwort-Verhalten verschiedener Agonisten, bzw. der Antagonisten und Antikörper und die Darstellung eines Effekts zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde in Kurvendiagrammen wiedergegeben. Auf der y-Achse wurde jeweils die PDS in [g] dargestellt, auf der x-Achse entweder die Menge der zugeführten Substanz in [μ g] oder die Zeit in [min]. Der Nullwert auf der x-Achse entsprach bei den Kurven des Dosis-Antwort-Verhaltens der Kontrollgruppe. In den Darstellungen des zeitlichen Ablaufs entsprach der Nullwert dem Ausgangswert, d.h. bevor die zu untersuchende Substanz injiziert wurde.

4. Ergebnisse

4.1. Beurteilung der Entzündung

Drei Tage nach der i.pl. CFA-Injektion zeigte sich eine deutliche Überwärmung (Zunahme der PT) und Ödementwicklung (Zunahme des PV) in der entzündeten Pfote. Ebenfalls kam es zu einer erheblichen Hyperalgesie, die sich in einer signifikanten PDS-Abnahme in der entzündeten Pfote gegenüber der nicht entzündeten Pfote darstellte (Abb.4). Da Stein et al. [60] bereits beschrieben haben, dass der Entzündungsgrad mindestens 6 Tage nach der Injektion von CFA unverändert ist, wurden die Veränderungen der Temperatur und des Volumens der Pfoten nur einmalig untersucht.

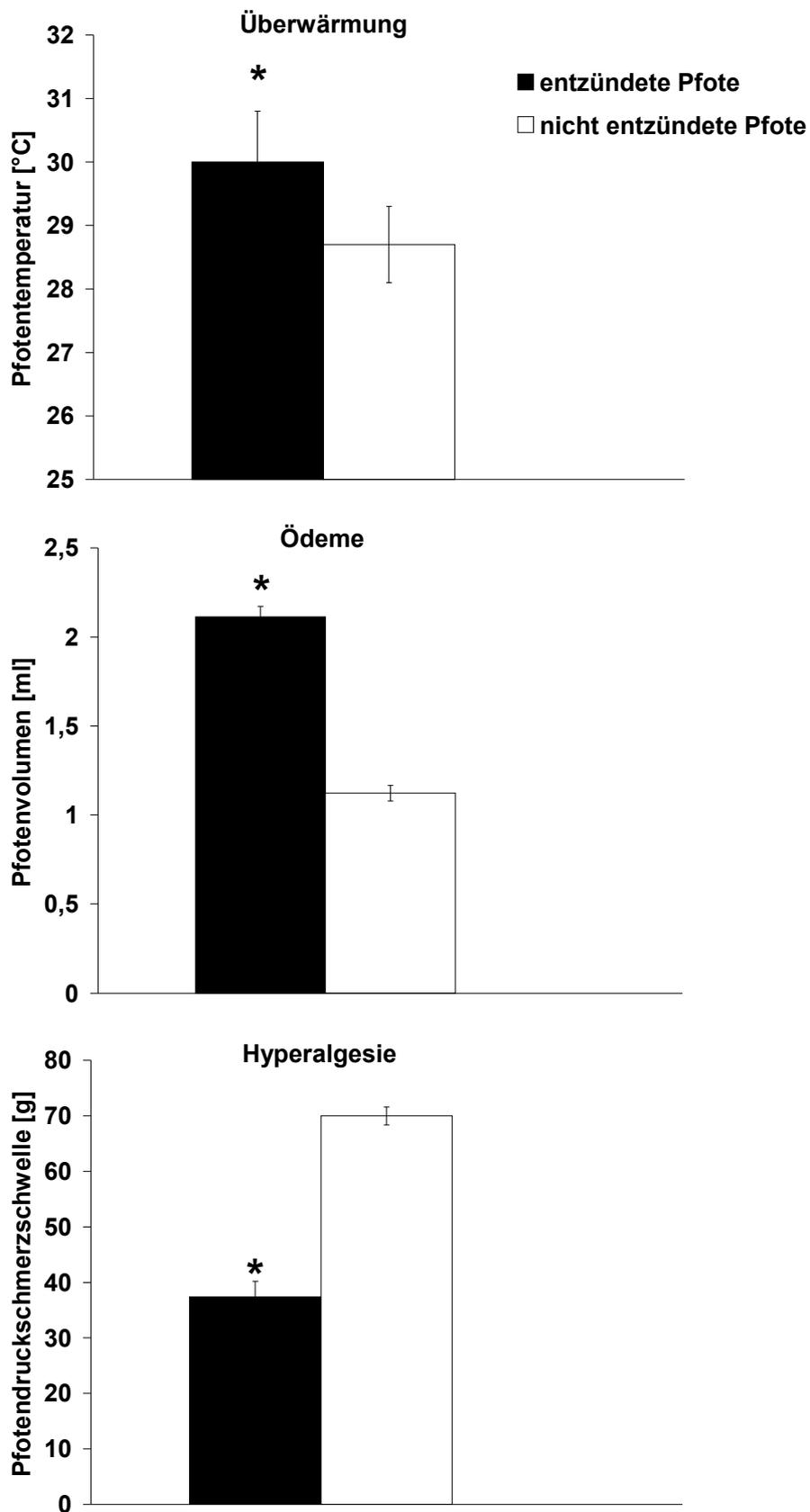


Abbildung 4. Ausmaß der Entzündung drei Tage nach CFA-Injektion in die infizierte Hinterpfote. * stellt einen statistisch signifikanten Unterschied zu der nicht entzündeten Pfote dar (Überwärmung $p = 0,015$; Ödeme $p < 0,001$; Hyperalgesie $p < 0,001$; paired t-Test). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.2. Antinozizeptive Effekte von EM-1

4.2.1. Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem EM-1

EM-1 (0,3 - 1,25 μg) bewirkte 5 min nach der i.pl. Applikation in beide hintere Pfoten eine dosisabhängige Antinozizeption in der entzündeten ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression), nicht jedoch in der nicht entzündeten Pfote ($p = 0,226$; One Way ANOVA). Der stärkste antinozizeptive Effekt wurde nach der Applikation von EM-1 in einer Dosierung von 0,625 μg gemessen (Abb.5). Daher wurde diese Konzentration in den nachfolgenden Experimenten untersucht.

4.2.2. Zeitwirkungsbeziehung der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem EM-1

Der antinozizeptive Effekt von EM-1 (0,625 μg) hat den Haupteffekt 5 min nach i.pl. Applikation, 10 min nach Applikation ist weiterhin eine signifikante Veränderung vorhanden. Die Ausgangswerte sind 20 min und 40 min nach der Applikation wieder erreicht (5 und 10 min $p < 0,001$; 20 min $p = 0,513$; 40 min $p = 0,777$; Two Way repeated Measures ANOVA, Bonferroni Test; Abb.6). Die nicht entzündete Pfote zeigt zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der Schmerzschwelle ($p > 0,05$; Two Way repeated Measures ANOVA; nicht in der Abbildung dargestellt).

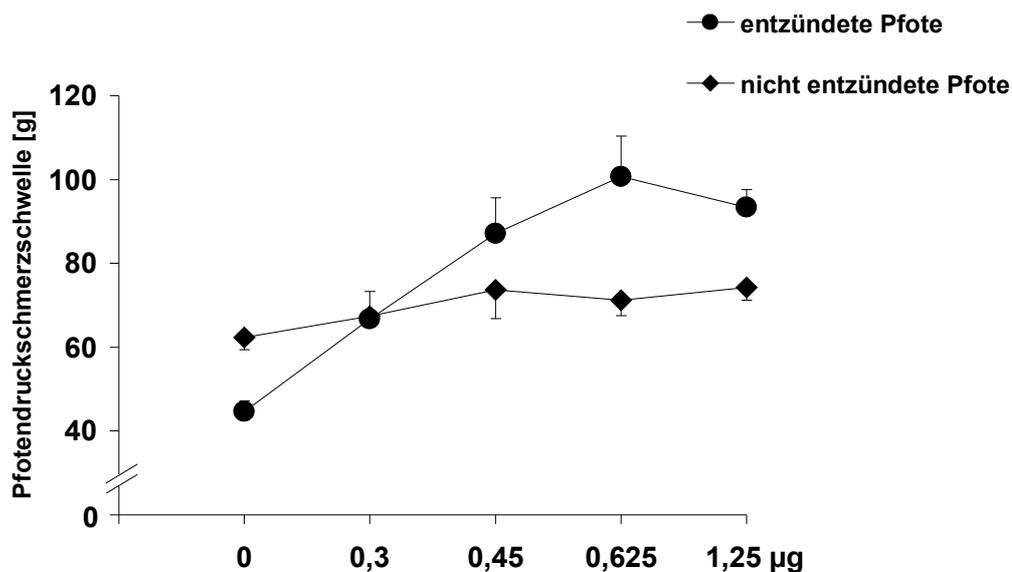


Abbildung 5. Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von i.pl. injiziertem EM-1 (0,3 - 1,25 μg) 5 min nach Injektion (entzündete Pfote $p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression; nicht entzündete Pfote $p = 0,173$; One Way ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.2.3. Die periphere Wirkung von intraplantarer EM-1 induzierter Antinozizeption

Die periphere Wirkung von i.pl. appliziertem EM-1 wurde dadurch bestätigt, dass bei systemischer Applikation von EM-1 keine antinozizeptiven Effekte auftraten. Die systemische s.c. Injektion von EM-1 in einer Dosis von 1,25 µg (dieses entspricht der Gesamtmenge von i.pl. injiziertem EM-1 in der effektivsten Dosierung, d.h. 0,625 µg pro Pfote) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Schmerzschwelle, weder in der entzündeten noch in der nicht entzündeten Pfote ($p = 0,057$, bzw. $p = 0,192$; Two Way repeated Measures ANOVA; Abb.7; die nicht entzündete Pfote ist in der Abbildung nicht dargestellt).

4.2.4. Die Opioidrezeptorselektivität der EM-1 induzierten Antinozizeption

Die Antinozizeption, die durch EM-1 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, ließ sich dosisabhängig durch den selektiven μ -Opioidrezeptorantagonisten CTOP (0,125 - 0,5 µg; i.pl.) 5 min und 10 min nach der Injektion aufheben ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression; Abb.8).

Die systemische Applikation (s.c.) der effektivsten i.pl. Dosierung von CTOP (0,5 µg) führte zu keiner signifikanten Veränderung der EM-1 (0,625 µg; i.pl.) induzierten Antinozizeption ($p = 0,980$; Two Way repeated Measures ANOVA; Abb.9).

Die Antinozizeption, die durch EM-1 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, ließ sich ebenfalls signifikant durch den selektiven δ -Opioidrezeptorantagonisten ICI 174,864 (1,25 µg; i.pl.) 5 min nach Applikation reduzieren ($p = 0,041$; One Way ANOVA, Dunnett's Test). Dieser Effekt war jedoch gering und weder von der Dosierung von ICI 174,864 (0,625 - 2,5 µg) nach 5 min noch nach 10 min abhängig ($p = 0,051$, bzw. $p = 0,422$; One Way ANOVA; Abb.10).

Die Antinozizeption, die durch EM-1 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, konnte durch den selektiven κ -Opioidrezeptorantagonisten norBNI (0,1 - 100 µg; i.pl.) weder 5 min ($p = 0,945$) noch 10 min ($p = 0,899$; One Way ANOVA) nach Applikation signifikant aufgehoben werden (Abb.11).

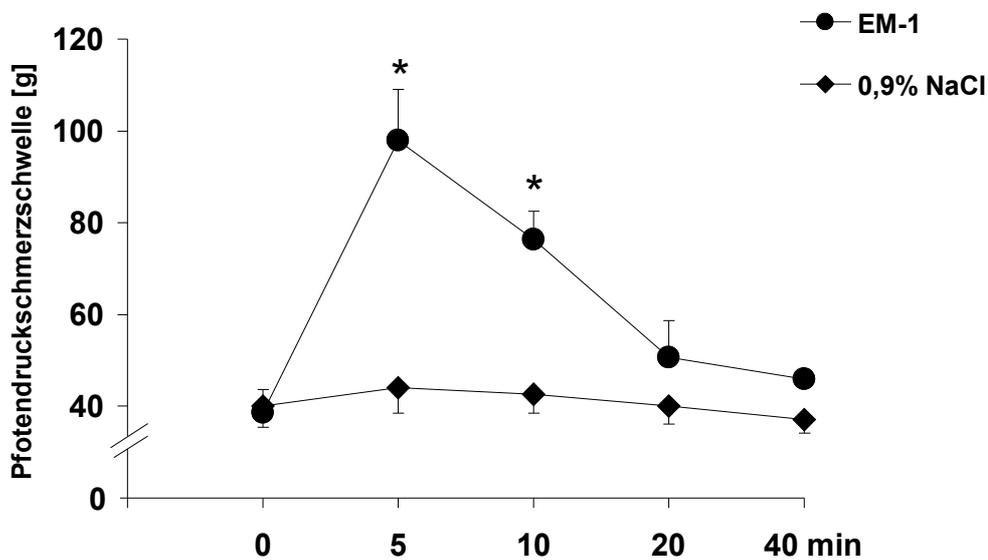


Abbildung 6. Zeitwirkungsbeziehung der antinozizeptiven Effekte von i.pl. injiziertem EM-1 (0,625 µg) in der entzündeten Pfote. * stellt einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe dar ($p < 0,001$; Two Way repeated Measures ANOVA, Bonferroni Test). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

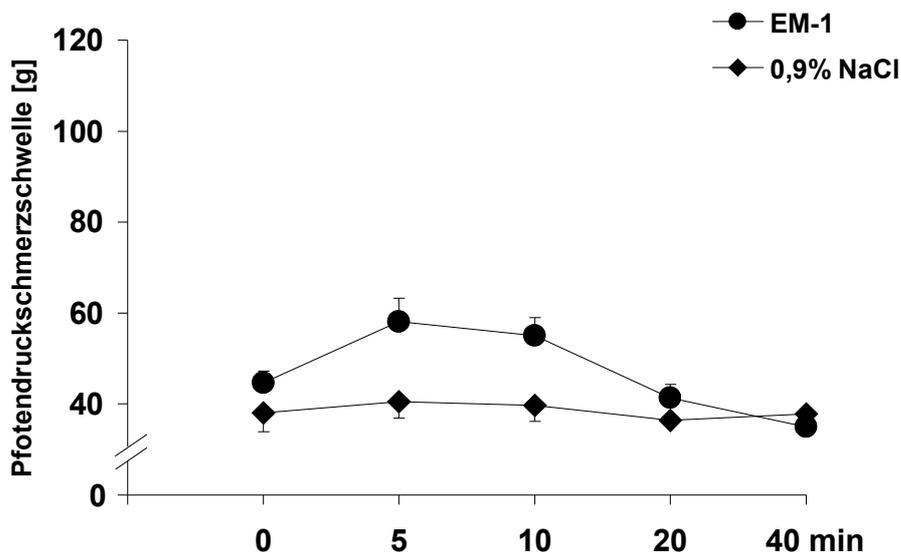


Abbildung 7. Zeitwirkungsbeziehung von systemisch (subkutan) appliziertem EM-1 (0,625 µg) in der entzündeten Pfote. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Werten von EM-1 im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($p = 0,057$; Two Way repeated Measures ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

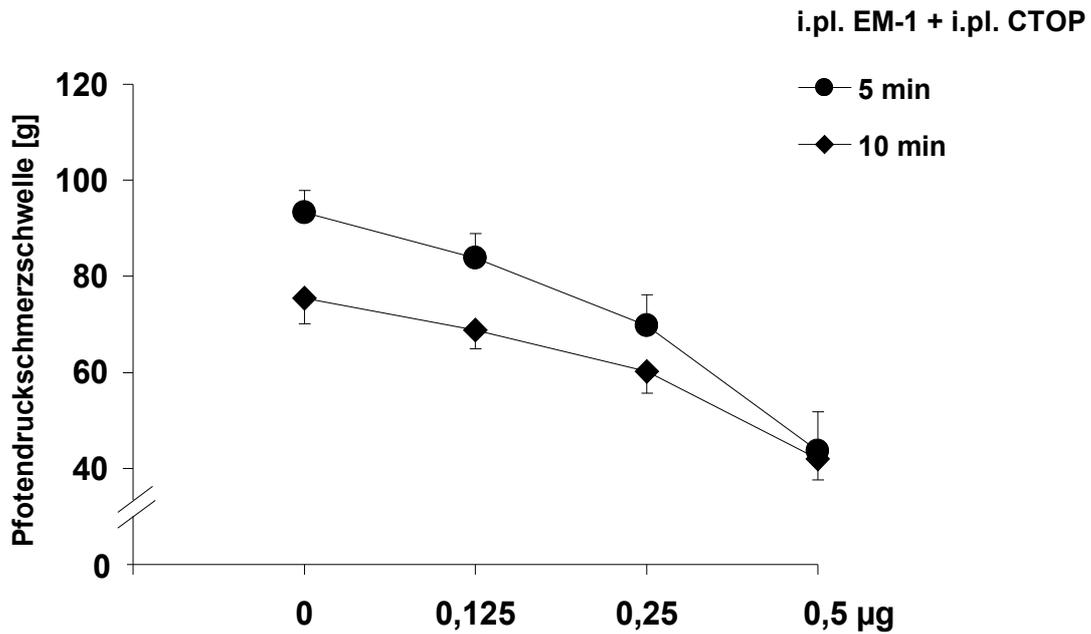


Abbildung 8. Dosisabhängige Blockierung der EM-1 (0,625 µg) induzierten Antinozizeption durch den μ -Opioidrezeptorantagonisten CTOP (0,125 - 0,5 µg) 5 und 10 min nach der i.pl. Injektion in die entzündete Pfote ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

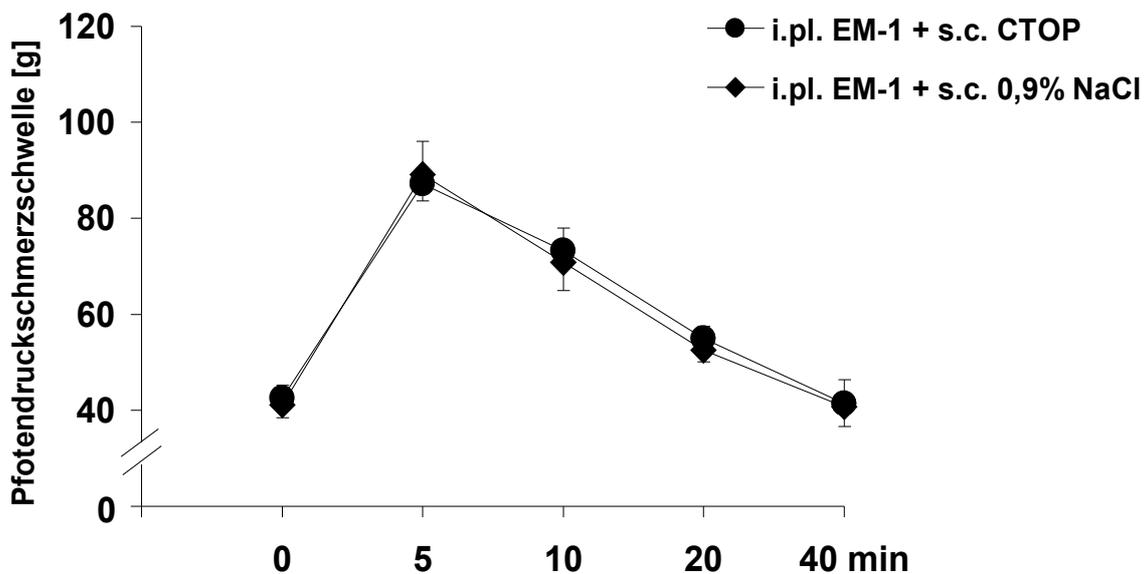


Abbildung 9. Der Effekt des systemisch (subkutan) applizierten μ -Opioidrezeptorantagonisten CTOP (0,5 µg) auf die Antinozizeption, die durch EM-1 (0,625 µg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote induziert wurde ($p = 0,980$; Two Way repeated Measures ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

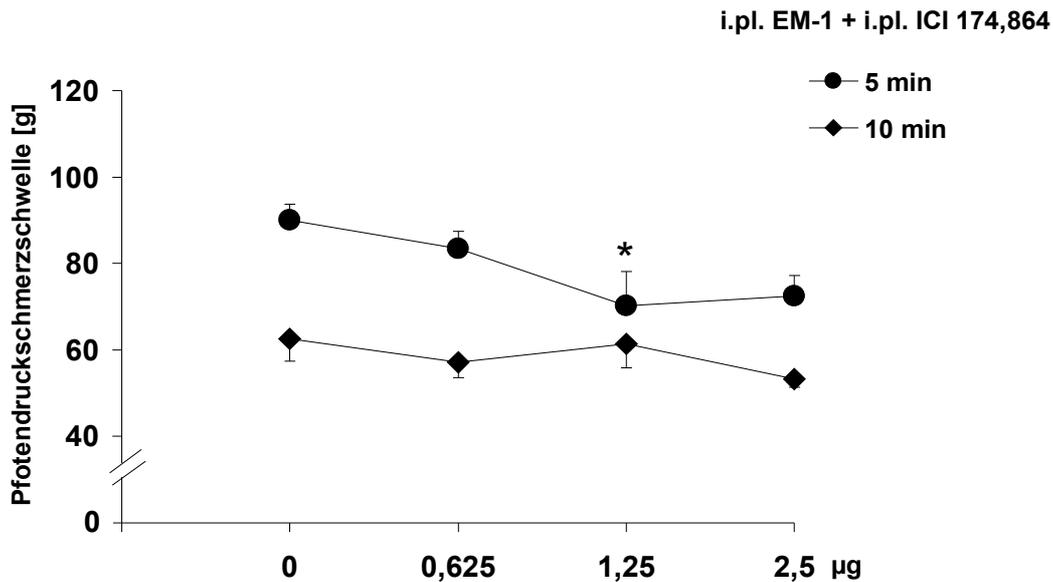


Abbildung 10. Der Effekt des selektiven δ -Opioidrezeptorantagonisten ICI 174,864 (0,625 - 2,5 μg) auf die Antinozizeption, die durch EM-1 (0,625 μg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote induziert wurde. * zeigt einen statistisch signifikanten Effekt von ICI 174,864 (1,25 μg) 5 min nach Applikation gegenüber der Kontrollgruppe, die als 0 μg auf der x-Achse dargestellt ist, an ($p = 0,041$; One Way ANOVA, Dunnett's Test). Diese Effekte waren jedoch nicht dosisabhängig, weder nach 5 min noch nach 10 min ($p = 0,051$, bzw. $p = 0,422$; One Way ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

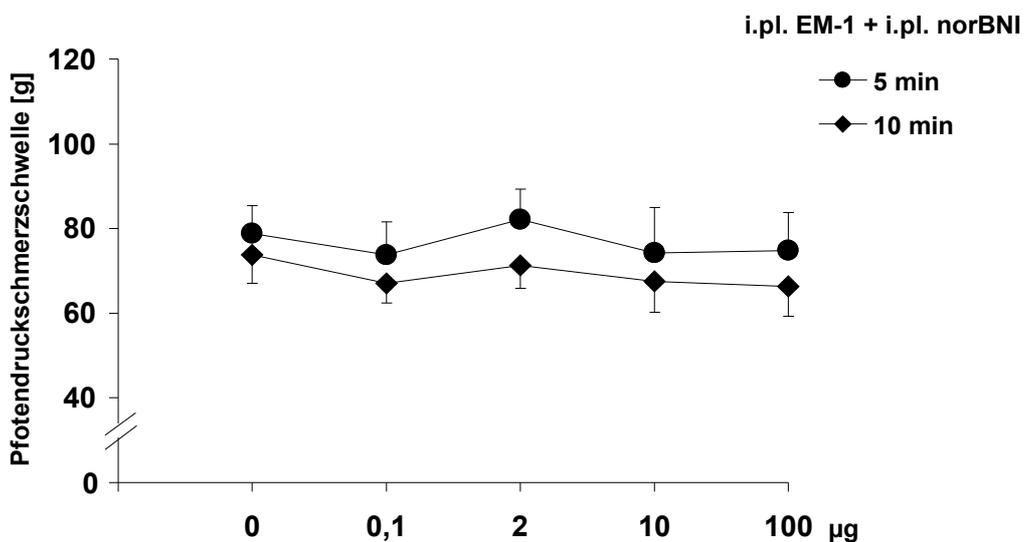


Abbildung 11. Der Effekt des selektiven κ -Opioidrezeptorantagonisten norBNI (0,1 - 100 μg) auf die Antinozizeption, die durch EM-1 (0,625 μg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote induziert wurde. NorBNI konnte weder nach 5 min noch nach 10 min ($p = 0,945$, bzw. $p = 0,899$; One Way ANOVA) einen signifikanten Effekt produzieren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.3. Antinozizeptive Effekte von EM-2

4.3.1. Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem EM-2

5 min nach der i.pl. Applikation in beide hintere Pfoten bewirkte EM-2 (0,3 - 1,25 µg) eine dosisabhängige Antinozizeption in der entzündeten ($p = 0,002$; One Way ANOVA, Linear Regression), nicht jedoch in der nicht entzündeten Pfote ($p = 0,121$; One Way ANOVA). Der stärkste antinozizeptive Effekt wurde nach der Applikation von EM-2 in einer Dosierung von 0,625 µg gemessen (Abb.12). Daher wurde diese Konzentration in den nachfolgenden Experimenten untersucht.

4.3.2. Zeitwirkungsbeziehung der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem EM-2

Der antinozizeptive Effekt von EM-2 (0,625 µg) hat den Haupteffekt 5 min nach i.pl. Applikation, 10 min nach Applikation ist weiterhin eine signifikante Veränderung vorhanden. Die Ausgangswerte sind 20 min und 40 min nach der Applikation wieder erreicht (5 min $p < 0,001$; 10 min $p = 0,009$; 20 min $p = 0,434$; 40 min $p = 1,000$; Two Way repeated Measures ANOVA, Bonferroni Test; Abb.13). Die nicht entzündete Pfote zeigt zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied in der Schmerzschwelle ($p > 0,05$, Two Way repeated Measures ANOVA; nicht in der Abbildung dargestellt).

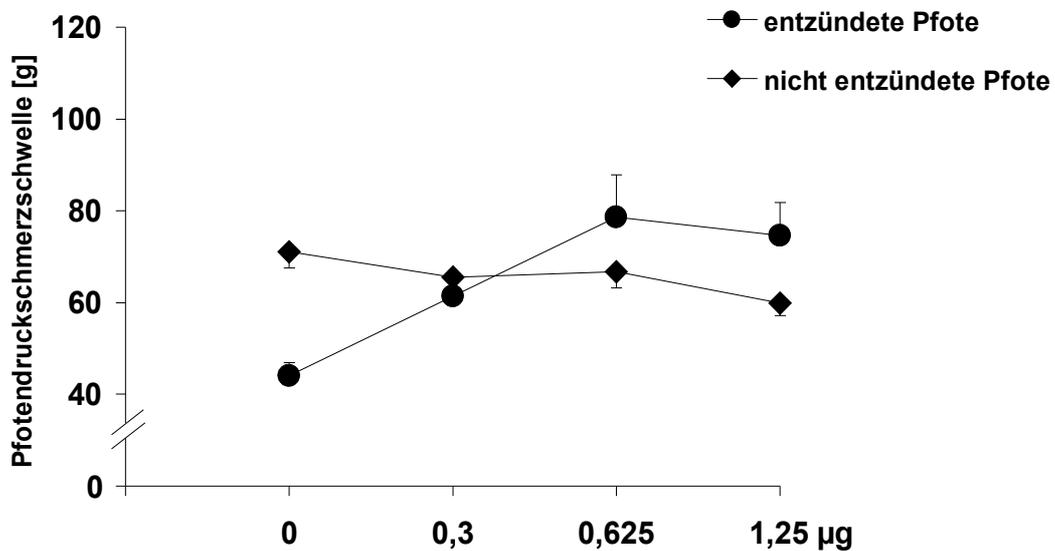


Abbildung 12. Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von i.p.l. injiziertem EM-2 (0,3 - 1,25 µg) 5 min nach Injektion (entzündete Pfote $p = 0,002$; One Way ANOVA, Linear Regression; nicht entzündete Pfote $p = 0,121$; One Way ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

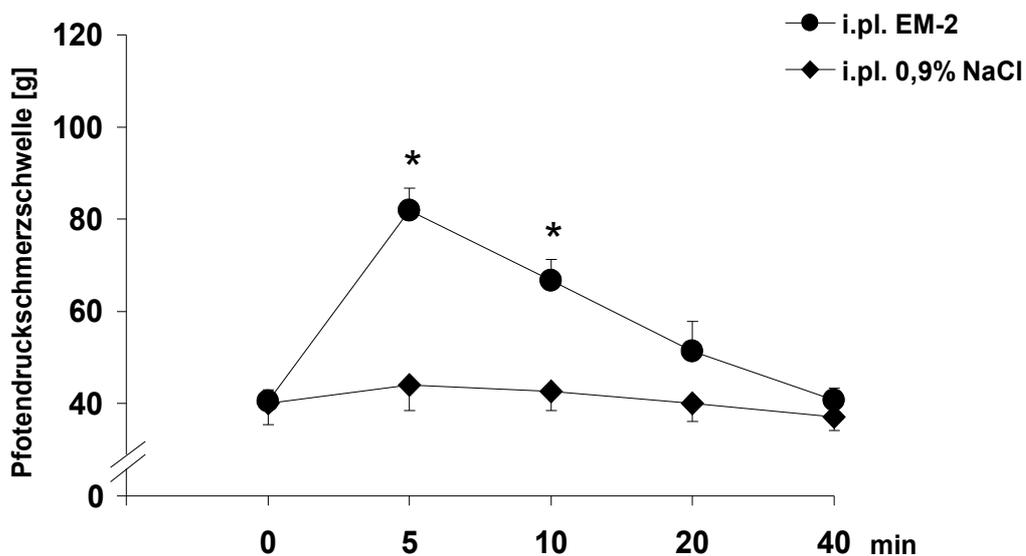


Abbildung 13. Zeitwirkungsbeziehung der antinozizeptiven Effekte von i.p.l. injiziertem EM-2 (0,625 µg). * stellt einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Kontrollgruppe dar (5 min $p < 0,001$; 10 min $p = 0,009$; Two Way repeated Measures ANOVA, Bonferroni Test). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.3.3. Die periphere Wirkung von intraplantarer EM-2 induzierter Antinozizeption

Die periphere Wirkung von i.pl. appliziertem EM-2 wurde dadurch bestätigt, dass bei systemischer Applikation von EM-2 keine antinozizeptiven Effekte auftraten. Die systemische s.c. Injektion von EM-2 in einer Dosis von 1,25 µg (dieses entspricht der Gesamtmenge von i.pl. injiziertem EM-2 in der effektivsten Dosierung, d.h. 0,625 µg pro Pfote) führte zu keiner signifikanten Veränderung der Schmerzschwelle, weder in der entzündeten noch in der nicht entzündeten Pfote ($p = 0,057$, bzw. $p = 0,192$; Two Way repeated Measures ANOVA; Abb.14; die nicht entzündete Pfote ist in der Abbildung nicht dargestellt).

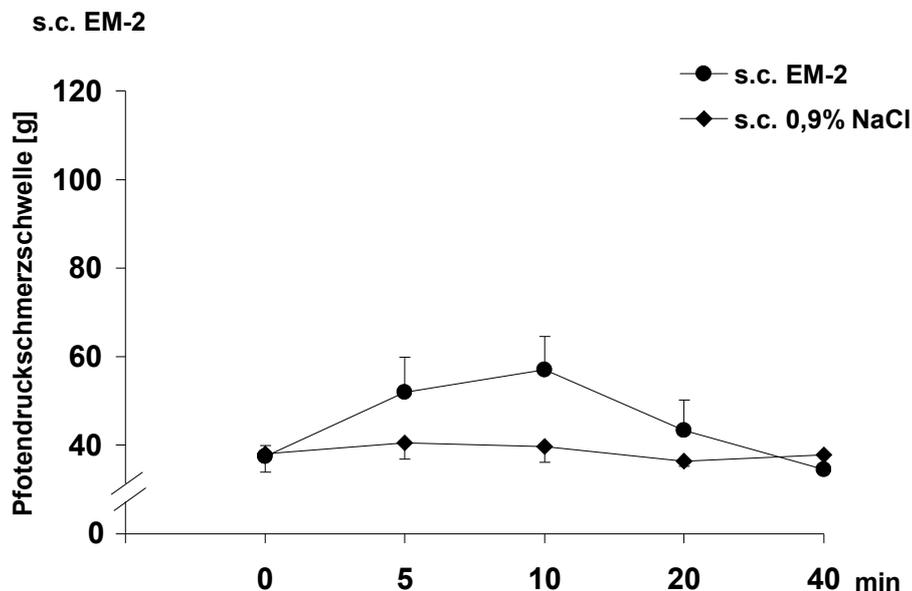


Abbildung 14. Zeitwirkungsbeziehung von systemisch (subkutan) appliziertem EM-2 (0,625 µg) in die entzündete Pfote. Es zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Werten von EM-1 im Vergleich zu der Kontrollgruppe ($p = 0,057$; Two Way repeated Measures ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.3.4. Die Opioidrezeptorselektivität der EM-2 induzierten Antinozizeption

Die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, ließ sich dosisabhängig durch den selektiven µ-Opioidrezeptorantagonisten CTOP (0,0625 - 0,25 µg; i.pl.) 5 min und 10 min nach der Injektion aufheben ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression; Abb.15).

Die systemische Applikation (s.c.) der effektivsten i.pl. Dosierung von CTOP (0,25 µg) führte zu keiner signifikanten Veränderung der EM-2 (0,625 µg; i.pl.) induzierten Antinozizeption ($p = 0,895$; Two Way repeated Measures ANOVA; Abb.16).

Die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, ließ sich dosisabhängig durch den selektiven δ-Opioidrezeptorantagonisten ICI 174,864 (0,075 - 0,325 µg; i.pl.) 5 min ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression) nach der Injektion aufheben. 10 min nach der Injektion war weiterhin ein signifikanter Unterschied nachweisbar ($p = 0,048$; One Way ANOVA; Abb.17).

Die systemische Applikation (s.c.) der effektivsten i.pl. Dosierung von ICI 174,864 (0,15 µg) führte zu keiner signifikanten Veränderung der EM-2 (0,625 µg; i.pl.) induzierten Antinozizeption ($p = 0,587$; Two Way repeated Measures ANOVA; Abb.18).

Um den Einfluss des δ-Rezeptors festzustellen, wurden ein weiterer selektiver δ-Antagonist (Naltrindole) sowie Antikörper gegen endogene Opioidpeptide (siehe 4.3.5.) eingesetzt.

Die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, ließ sich dosisabhängig durch den selektiven δ-Opioidrezeptorantagonisten Naltrindole (10 - 40 µg; i.pl.) 5 min nach der Injektion aufheben ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression). Der stärkste Effekt wurde nach der Applikation von Naltrindole in einer Dosierung von 40 µg gemessen. Die höhere Dosierung von Naltrindole (80 µg) zeigte keine stärkere Aufhebung der Antinozizeption. 10 min nach der Injektion war keine signifikante Veränderung nachweisbar ($p = 0,416$; One Way ANOVA; Abb.19).

Die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, konnte durch den selektiven κ-Opioidrezeptorantagonisten norBNI (0,1 - 100 µg; i.pl.) weder 5 min noch 10 min ($p = 0,745$, bzw. $p = 0,735$; One Way ANOVA) nach Applikation signifikant aufgehoben werden (Abb.20).

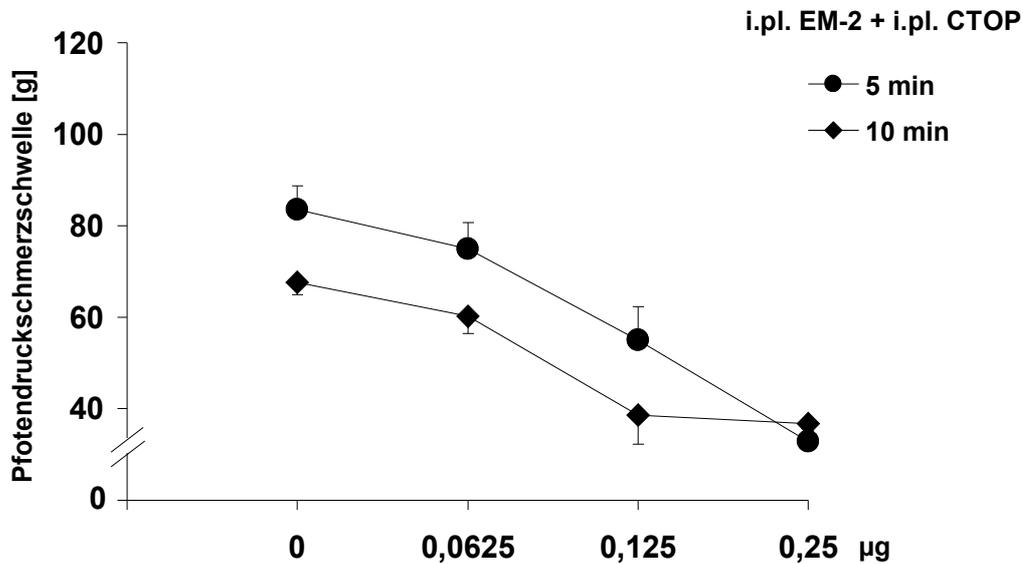


Abbildung 15. Dosisabhängige Blockierung der EM-2 (0,625 µg) induzierten Antinozizeption durch den µ-Opioidrezeptorantagonisten CTOP (0,0625 - 0,25 µg) 5 und 10 min nach der i.pl. Injektion in die entzündete Pfote ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

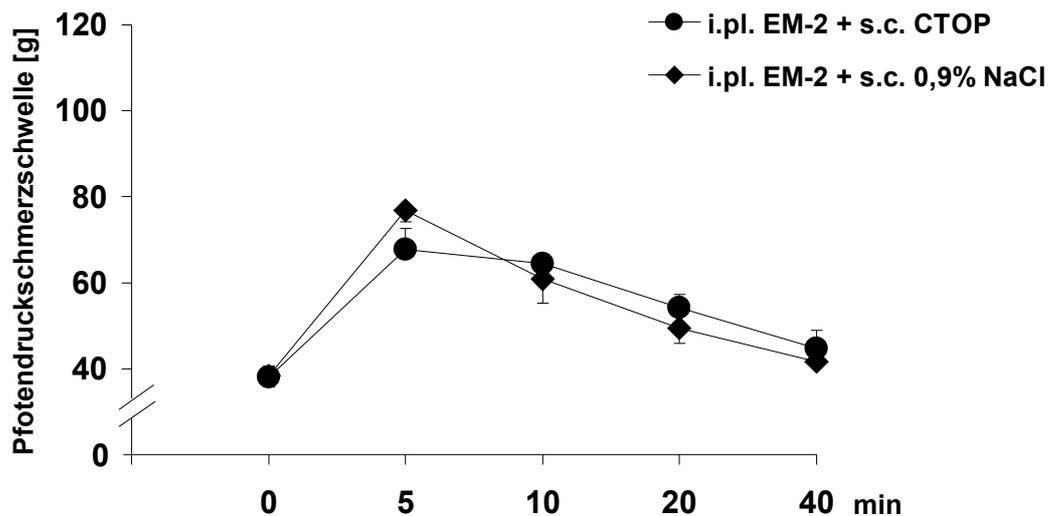


Abbildung 16. Der Effekt des systemisch (subkutan) applizierten µ-Opioidrezeptorantagonisten CTOP (0,25 µg) auf die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote induziert wurde ($p = 0,895$; Two Way repeated Measures ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

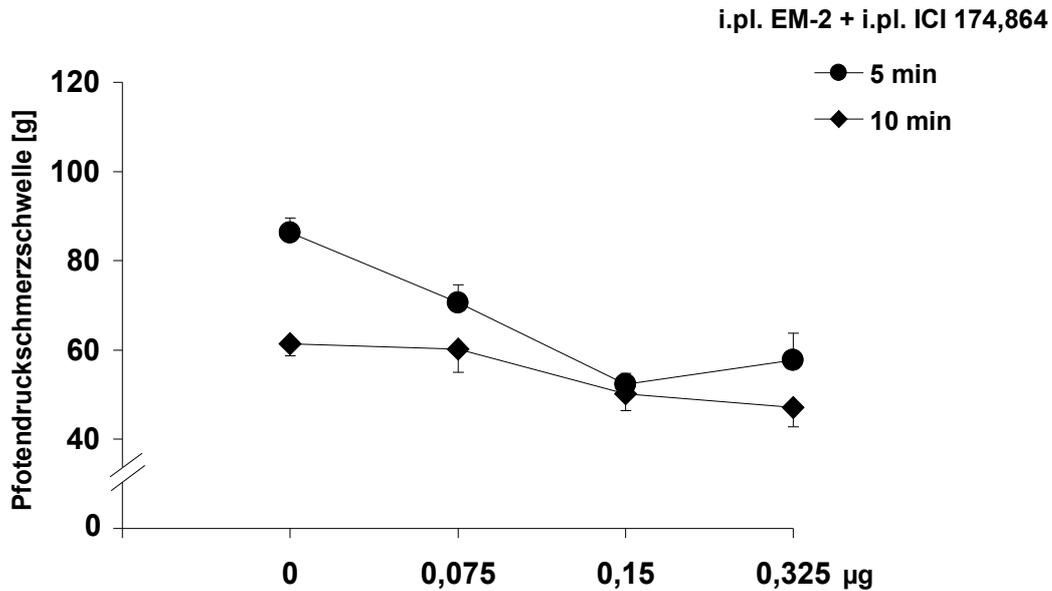


Abbildung 17. Dosisabhängige Blockierung der EM-2 (0,625 µg) induzierten Antinozizeption durch den selektiven δ -Opioidrezeptorantagonisten ICI 174,864 (0,075 - 0,325 µg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote. 0,075 - 0,325 µg ICI 174,864 führten 5 min nach Applikation zu einem statistisch signifikanten Effekt ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression). 10 min nach der Injektion war weiterhin ein statistisch signifikanter Effekt von ICI 174,864 nachweisbar ($p = 0,048$; One Way ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

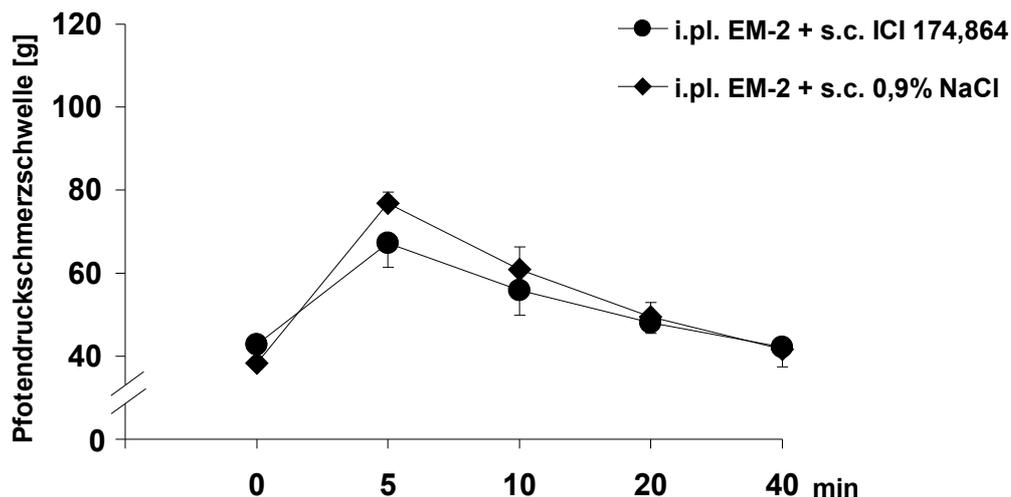


Abbildung 18. Der Effekt des systemisch (subkutan) applizierten selektiven δ -Opioidrezeptorantagonisten ICI 174,864 (0,15 µg) auf die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote induziert wurde ($p = 0,587$; Two Way repeated Measures ANOVA, Bonferroni Test). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

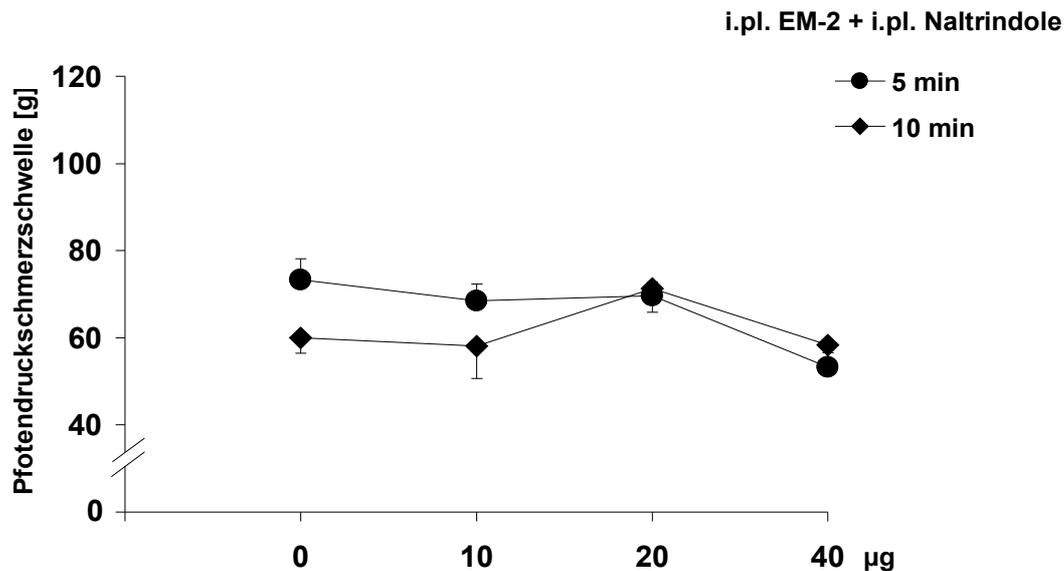


Abbildung 19. Dosisabhängige Blockierung der EM-2 (0,625 µg) induzierten Antinozizeption durch den selektiven δ -Opioidrezeptorantagonisten Naltrindole (10 - 40 µg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression). 10 min nach der Injektion konnte kein statistisch signifikanter Effekt von Naltrindole festgestellt werden ($p = 0,416$; One Way ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

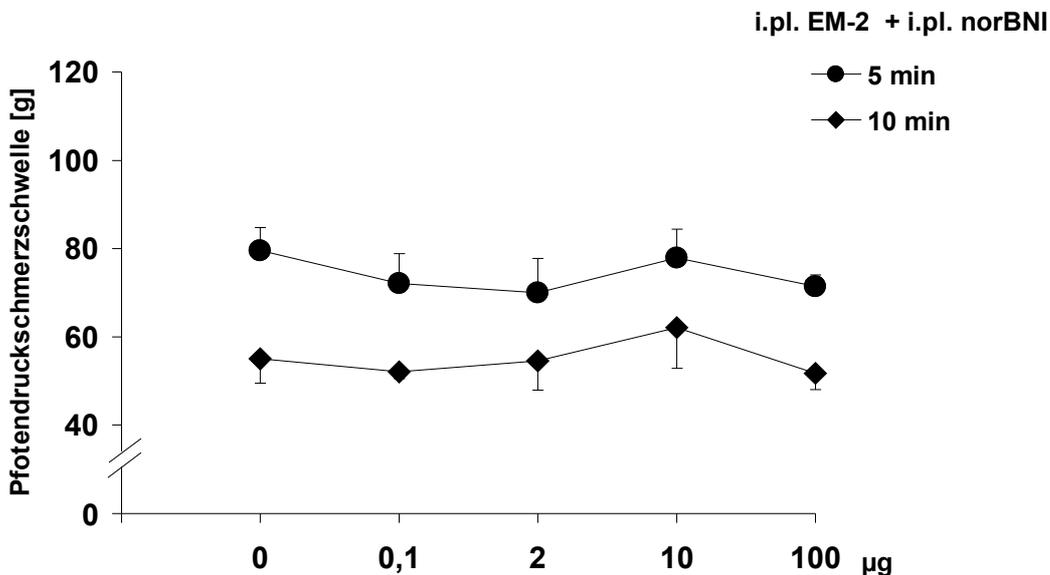


Abbildung 20. Der Effekt des selektiven κ -Opioidrezeptorantagonisten norBinaltorphimindihydrochlorid (0 - 100µg) auf die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote induziert wurde. NorBinaltorphimindihydrochlorid konnte weder nach 5 min noch nach 10 min ($p = 0,745$, bzw. $p = 0,735$; One Way ANOVA) einen signifikanten Effekt produzieren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.3.5. Die Rolle der endogenen Opioidpeptide in der EM-2 induzierten Antinozizeption

Die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, konnte durch den Antikörper gegen Met-Enkephalin (0,02 - 20 µg; i.pl.) weder 5 min noch 10 min ($p = 0,728$, bzw. $p = 0,964$; One Way ANOVA) nach Applikation signifikant aufgehoben werden (Abb.21).

Die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, konnte durch den Antikörper gegen Leu-Enkephalin (0,02 - 8 µg; i.pl.) weder 5 min noch 10 min ($p = 0,895$, bzw. $p = 0,875$; One Way ANOVA) nach Applikation signifikant aufgehoben werden (Abb.22).

Die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg; i.pl.) induziert wurde, konnte durch den Antikörper gegen β -Endorphin (0,0625 - 2 µg; i.pl.) weder 5 min noch 10 min ($p = 0,587$, bzw. $p = 0,192$; One Way ANOVA) nach Applikation signifikant aufgehoben werden (Abb.23).

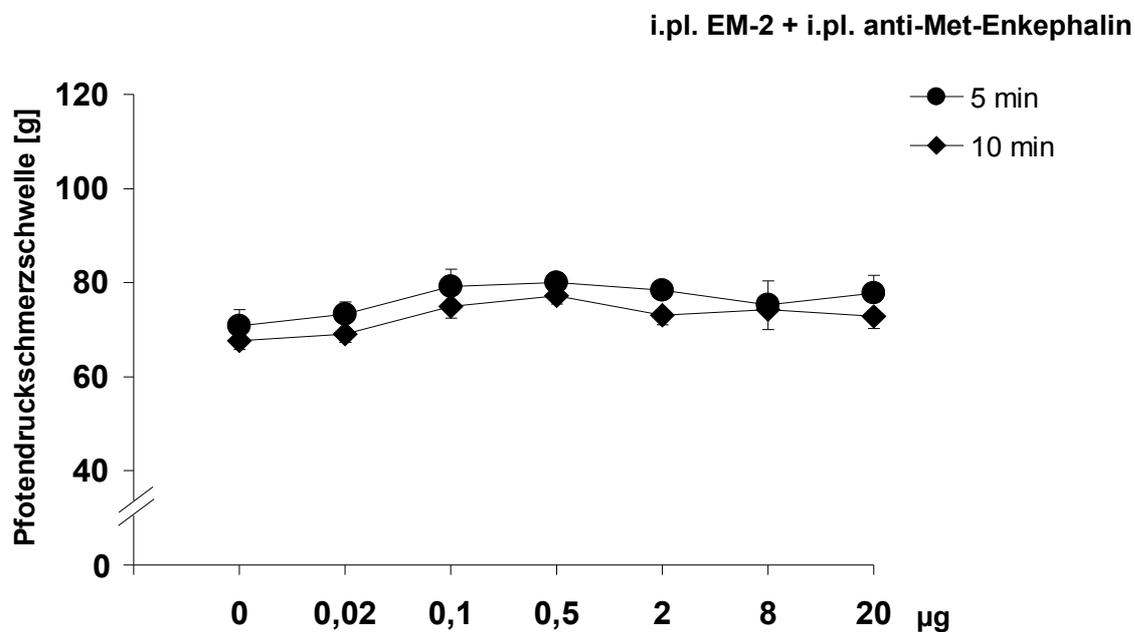


Abbildung 21. Der Effekt des Antikörpers anti-Met-Enkephalin (0,02 - 20 µg) auf die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 µg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote induziert wurde. Anti-Met-Enkephalin konnte weder nach 5 min noch nach 10 min ($p = 0,728$, bzw. $p = 0,964$; One Way ANOVA) einen signifikanten Effekt produzieren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

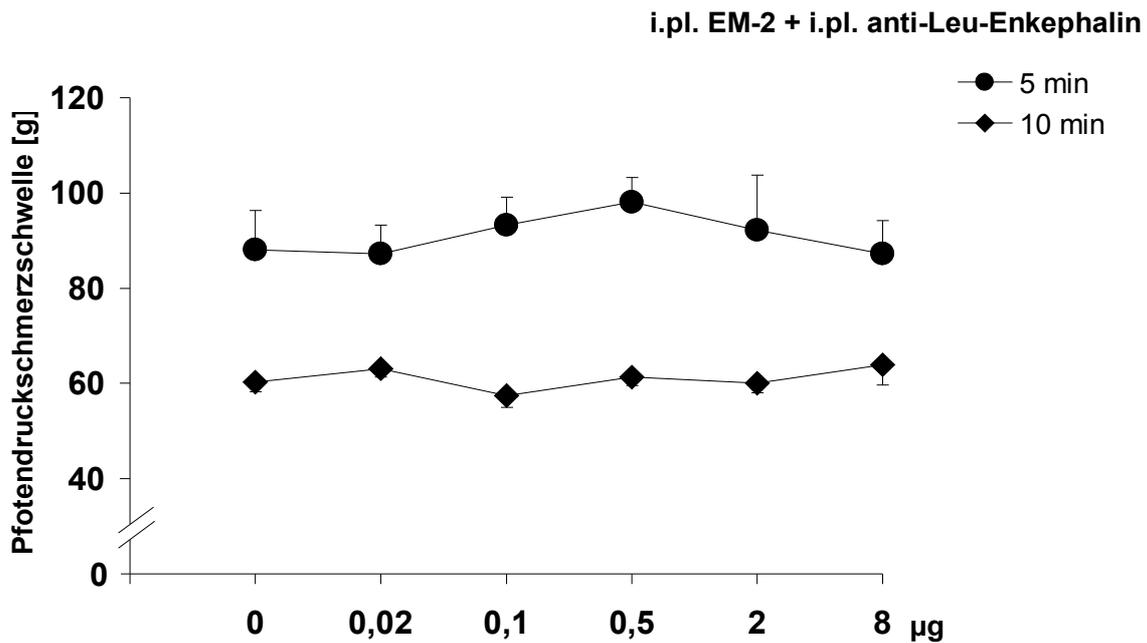


Abbildung 22. Der Effekt des Antikörpers anti-Leu-Enkephalin (0,02 - 8 μg) auf die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 μg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote induziert wurde. Anti-Leu-Enkephalin konnte weder nach 5 min noch nach 10 min ($p = 0,745$, bzw. $p = 0,735$; One Way ANOVA) einen signifikanten Effekt produzieren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

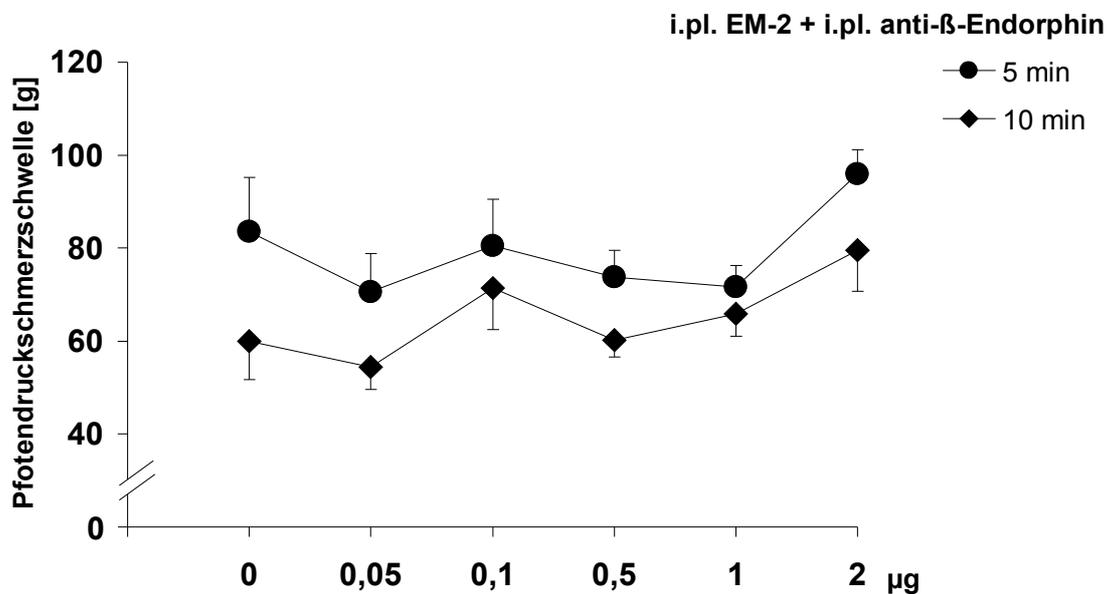


Abbildung 23. Der Effekt des Antikörpers anti- β -Endorphin (0,05 - 2 μg) auf die Antinozizeption, die durch EM-2 (0,625 μg) nach i.pl. Injektion in die entzündete Pfote induziert wurde. Anti- β -Endorphin konnte weder nach 5 min noch nach 10 min ($p = 0,587$, bzw. $p = 0,192$; One Way ANOVA) einen signifikanten Effekt produzieren. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.4. Die Bindung von EM-1 und EM-2 zu μ - und δ -Rezeptoren im Hinterwurzelganglion

In den Zellmembranen der Hinterwurzelganglien konnte eine spezifische Bindung von [3 H] DAMGO an μ -Rezeptoren nachgewiesen werden, mit einer signifikanten Zunahme der Bindungsstellen in den ipsilateralen Hinterwurzelganglien bei entzündeten Tieren ($42,5 \pm 2,3$ fmol/mg Protein) im Vergleich zu den Hinterwurzelganglien von nicht entzündeten Tieren ($23,4 \pm 2,4$ fmol/mg Protein) ($p < 0,001$, T-test). Die Verdrängung von [3 H] DAMGO durch EM-1 und EM-2 aus den Bindungen in den DRG von nicht entzündeten Tieren (EM-1: $92 \pm 1,9\%$; EM-2: $94,3 \pm 1,6\%$) und von entzündeten Tieren (EM-1: $92,7 \pm 2,9\%$; EM-2: $95,8 \pm 1,5\%$) wurde mit der Verdrängung durch Naloxon verglichen (100%).

Da nur EM-2, nicht jedoch EM-1 eine Antinozizeption durch δ -Rezeptoren bedingt, untersuchten wir, ob diese Peptide unterschiedlich an periphere δ -Rezeptoren binden. Unter Zuhilfenahme von [3 H] Naltrindole konnten wir weder in den Hinterwurzelganglien der nicht entzündeten Tiere noch in denen der entzündeten Tiere ein Bindungsverhalten nachweisen. Anhand von [125 J]-DPDPE konnten wir eine geringe Bindung in den Hinterwurzelganglien nicht entzündeter Tiere nachweisen (B_{\max} von spezifischer [125 J]-DPDPE-Bindung = $7 \pm 2,4$ fmol/mg Protein), jedoch keine Bindung in den Hinterwurzelganglien entzündeter Tiere. Diese sehr geringe oder nicht vorhandene δ -Bindung machte es unmöglich die Bindung von den EMs an den δ -Rezeptoren zu untersuchen.

4.5. Zeitwirkungsbeziehung der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem EM-1 im Vergleich zu EM-2

Der antinozizeptive Effekt von EM-1 in der effektivsten Dosierung ($0,625$ μ g) im Vergleich zu dem antinozizeptiven Effekt von EM-2 in der effektivsten Dosierung ($0,625$ μ g) wurde untersucht. EM-1 hat die Tendenz effektiver als EM-2 zu sein, es zeigt sich jedoch zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden EMs ($p > 0,05$; Two Way repeated Measures ANOVA; Abb.24).

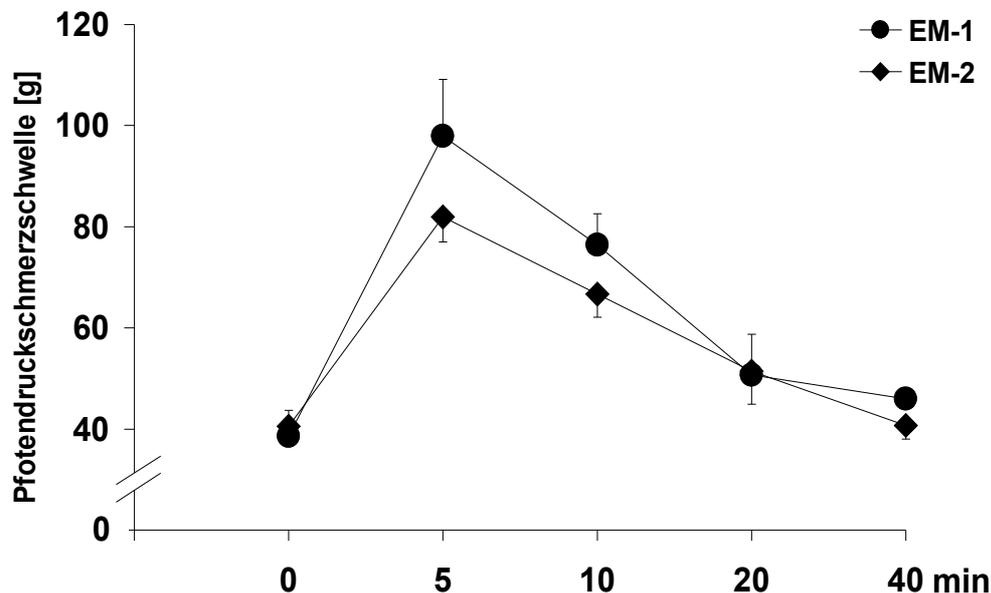


Abbildung 24. Zeitwirkungsbeziehung von i.pl. injiziertem EM-1 (0,625 μ g) und i.pl. injiziertem EM-2 (0,625 μ g). Es zeigt sich zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden EMs ($p > 0,05$; Two Way repeated Measures ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.6. Antinozizeptive Effekte von β -Endorphin

4.6.1. Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von intraplantar injiziertem β -Endorphin

β -Endorphin (0,125 - 2 μ g) bewirkte 5 min nach der i.pl. Applikation in beide hintere Pfoten eine dosisabhängige Antinozizeption in der entzündeten ($p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression), nicht jedoch in der nicht entzündeten Pfote ($p = 0,253$; One Way ANOVA). Der stärkste antinozizeptive Effekt wurde nach der Applikation von β -Endorphin in einer Dosierung von 1 μ g gemessen (Abb.25).

4.6.2. EM-1, EM-2 und β -Endorphin im Vergleich

Der antinozizeptive Effekt der untersuchten Opioidpeptide wurde in der jeweiligen effektivsten Dosierung (EM-1 0,625 μ g; EM-2 0,625 μ g; β -Endorphin 1 μ g) miteinander verglichen. Es zeigt sich 5 min nach Injektion in die entzündete Pfote kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Opioidpeptiden ($p = 0,369$; One Way ANOVA; Abb.26).

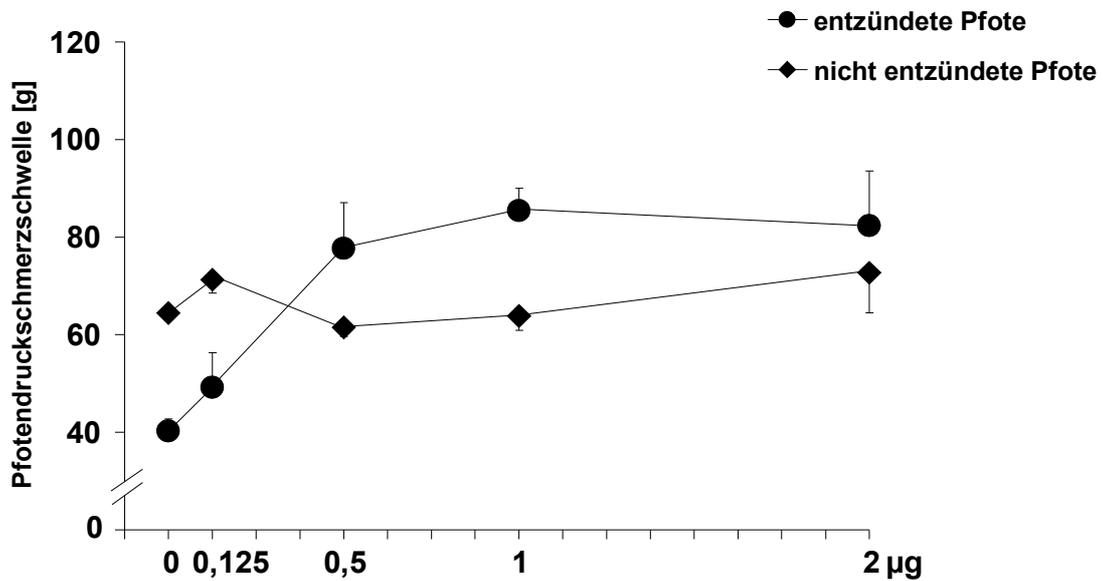


Abbildung 25. Dosisabhängigkeit der antinozizeptiven Effekte von i.pl. injiziertem β -Endorphin (0,125 - 2 μ g) 5 min nach Injektion (entzündete Pfote $p < 0,001$; One Way ANOVA, Linear Regression; nicht entzündete Pfote $p = 0,253$; One Way ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

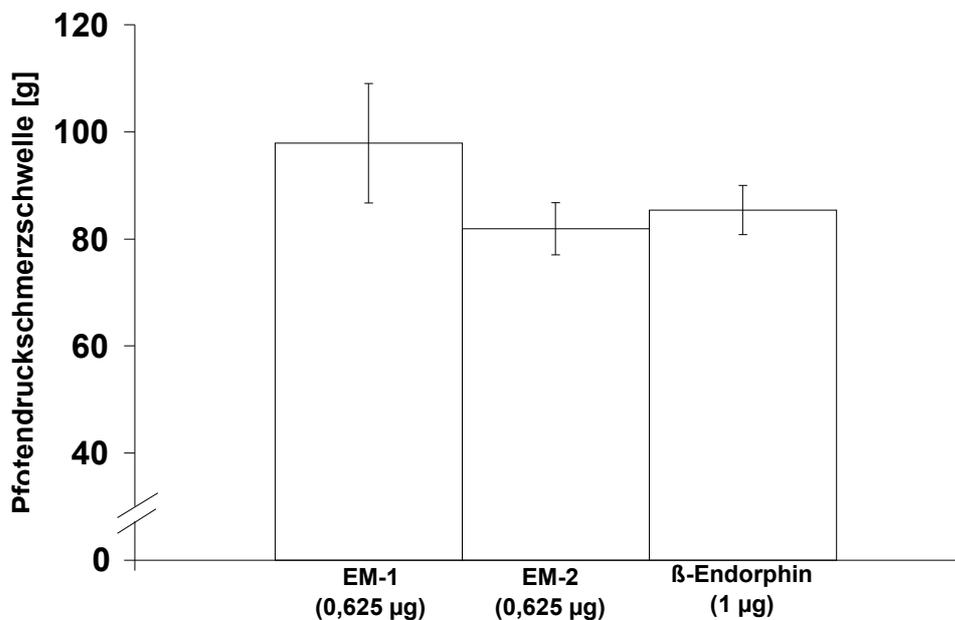


Abbildung 26. Die antinozizeptiven Effekte von i.pl. injiziertem EM-1, EM-2 und β -Endorphin 5 min nach Injektion in der jeweils effektivsten Dosierung in die entzündete Pfote ($p = 0,304$; One Way ANOVA). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

5. Diskussion

Die wesentlichen neuen Erkenntnisse meiner Studie sind: 1) EM-1 und EM-2 können einen seit längerem bestehenden entzündlichen Schmerz durch selektive Aktivierung peripherer Opioidrezeptoren unterdrücken. 2) Beide Peptide binden selektiv an periphere μ -Rezeptoren im Hinterwurzelganglion; dieses führt zur Antinozizeption. 3) Dabei sind keine κ -Rezeptoren involviert. EM-2 induziert im Gegensatz zu EM-1 auch über periphere δ -Rezeptoren eine Antinozizeption. Dieses wird nicht indirekt durch andere Opioidpeptide vermittelt, wie z.B. durch Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin oder β -Endorphin. Da bisher keine Bindung von radioaktiv markierten δ -Liganden bestimmt werden konnte, war es nicht möglich die direkte Bindung von EM-2 an δ -Rezeptoren im Hinterwurzelganglion zu untersuchen.

5.1. Entzündung

3 - 6 Tage nach der CFA-Applikation entwickelten die Ratten eine Entzündung, die auf die geimpfte Pfote beschränkt war. Die Entzündung zeigte die klassischen Entzündungsmerkmale, wie Hyperalgesie (Reduktion der Schmerzschwelle), Schwellung (Zunahme des Pfootenvolumens) und Überwärmung (Zunahme der Pfootemperatur). Dieses steht im Einklang mit vorangegangenen Studien [16,60,64,67-69]. Darüber hinaus wurde die Entwicklung der CFA-Entzündung auf zellulärem Niveau untersucht. Es zeigte sich eine verstärkte Migration von Leukozyten, die Opioidpeptide produzieren, in das entzündete Gewebe [5,15,27,34,64,67,70,71]. 4 - 6 Tage nach der Applikation von CFA konnte im entzündeten Gewebe die mRNA der Vorstufen der Opioidpeptide und die dazugehörigen Opioidpeptide nachgewiesen werden [15,71,72]. In den frühen Stadien der Entzündung (2 - 6 Std.) werden die Opioidpeptide hauptsächlich von Granulozyten produziert, in späteren Stadien (4 Tage) wird die größte Anzahl opioidhaltiger Zellen durch Makrophagen und Monozyten bestimmt [70]. Dieses entspricht der Kinetik anderer Entzündungen, wie z.B. der Infektion durch pathogene Keime oder der Wundheilung [73]. Zu späteren Stadien der Entzündung ist das Pfootengewebe von Lymphozyten infiltriert. Dabei handelt es sich hauptsächlich um aktivierte Gedächtniszellen, undifferenzierte T-Zellen treten weniger auf [5,74]. Dieses stimmt mit der allgemein verbreiteten Auffassung überein, dass aktivierte Gedächtniszellen in das periphere entzündete Gewebe immigrieren, während undifferenzierte Zellen typischerweise in das lymphatische Gewebe eindringen [5,75]. Im Verlauf einer Entzündung steigt sowohl die Anzahl der opioidhaltigen Leukozyten, als auch die Konzentration der Opioidpeptide in den

Leukozyten [70]. Parallel dazu führt die CFA-induzierte Entzündung zu einem gesteigerten Transport, einer Akkumulation von Opioidrezeptoren und einer Zunahme der G-Proteingekoppelten Rezeptoren an den peripheren Enden sensorischer Neurone [5,8,65,76,77]. Somit ist das Modell der CFA-induzierten Entzündung ein progressiv entwickelnder Prozess, der zur Hochregulation von Opioidrezeptoren in der Peripherie und zur vermehrten Präsenz von Opioidpeptiden in zirkulierenden und ortsständigen Entzündungszellen am Ort der Verletzung führt.

5.2. Antinozizeptive Effekte der Endomorphine

5.2.1. Dosisabhängigkeit, Wirkdauer und periphere Wirkung

Vorausgegangene Studien untersuchten den antinozizeptiven Effekt der EMs nach spinaler oder supraspinaler Applikation beim akuten Schmerz (ohne Gewebsverletzung) und bei kurz andauernder Entzündung (1 - 4 Std.) [29,35,78]. Meine gegenwärtige Studie erweitert diese Beobachtungen, indem gezeigt wird, dass EMs bei einem seit längerem (4 - 6 Tage) bestehenden entzündlichen Schmerz zur Antinozizeption führen. Dieses geschieht durch die Applikation von EMs direkt in das entzündete Gewebe in systemisch unwirksamen Dosierungen.

Die Wirkdauer der EMs wird in den verschiedenen Publikationen kontrovers beschrieben [29]. Es liegen einige Studien über eine Wirkdauer von 1 Std. und länger vor. Zadina et al. demonstrierten antinozizeptive Effekte (Mäuse, intrazerebroventrikulär [i.z.v]) bis 1 Std. nach der Applikation von EM-1 [28]. Przewlocka et al. beschrieben nach intrathekaler (i.t.) Applikation von EM-1 bei Ratten eine für 1 Std. andauernde Antinozizeption bei mechanischen Stimuli und eine 2 Std. anhaltende Antinozizeption bei thermischen Stimuli [43]. Ähnlich lang andauernde Effekte wurden von Wang et al. geschildert: Nach i.z.v. oder i.t. Applikationen von EM-1 bei Ratten traten beim Schwanzschlag-Test auch nach 100 min antinozizeptive Effekte auf [79]. Lee et al. beobachteten die bisher am längsten beschriebene Antinozizeption. Nach simultaner i.pl. Applikation von Carrageenan und EM-1 zeigte sich eine 8 Std. andauernde Antinozizeption in der entzündeten Pfote. In der gleichen Studie wurden die antinozizeptive Effekte von EM-1 bei einer 3 bis 4 Std. vorangegangenen Entzündungsinduktion durch Carrageenan untersucht. Die i.pl. Applikation von EM-1 führte zu einer 4 Std., die i.t. Applikation zu einer 1 Std. andauernden Antinozizeption [78].

Diesen Untersuchungen mit den Erkenntnissen der langen Wirkdauer von EMs stehen eine Vielzahl von Studien mit einer kürzeren Wirkdauer von maximal 30 min gegenüber. Tseng et al. beschrieben nach i.z.v. und nach i.t. Applikation von EM-1 und EM-2 ein Wirkmaximum nach 5 min im Schwanzschlag-Test, nach 20 min waren keine antinozizeptiven Effekte mehr nachweisbar [36]. Sakurada et al. beschrieben den stärksten antinozizeptiven Effekt der EMs beim Pfotendruck-Test bereits 1 min nach i.t. Applikation, 15 min später konnte kein Unterschied zu den Ausgangswerten festgestellt werden [46]. Weitere Studien, ebenfalls an Ratten und Mäusen, weisen nach i.z.v. oder i.t. Applikation von EM-1 und/oder EM-2 eine maximale Wirkdauer von 30 min nach Injektion auf [37-41,44-48,51,52,80].

Meine Versuche erbrachten ebenfalls eine kurze Wirkdauer der EMs. In den Abbildungen 6 und 13 wird die Dauer der peripheren antinozizeptiven Effekte der EMs dargestellt. Es zeigte sich bei beiden EMs nach 5 min der stärkste antinozizeptive Effekt. Nach 10 min war weiterhin ein signifikanter Unterschied zu den Ausgangswerten nachweisbar, nach 20 min war keine Signifikanz mehr vorhanden.

Die Ursache der unterschiedlichen Wirkdauer ist bisher nicht bekannt. Es lassen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Studien mit der langen Wirkdauer und den Studien der kurzen Wirkdauer feststellen. Beide Gruppen von Studien untersuchten die antinozizeptiven Effekte der EMs sowohl nach zentraler, als auch nach peripherer Applikation. Es wurden vergleichbare Schmerztests verwendet, beide Gruppen untersuchten entzündete und nicht entzündete Tiere.

Da sich die antinozizeptiven Effekte beider EMs dosisabhängig durch i.pl. applizierte Opioidrezeptorantagonisten in systemisch unwirksamen Dosierungen aufheben lassen, ist davon auszugehen, dass die Antinozizeption, die durch i.pl. EMs induziert wird, über periphere Opioidrezeptoren vermittelt wird. Kürzlich sind ähnliche periphere Effekte an Tieren mit neuropathischen Schmerzen beschrieben worden [52]. Die systemische s.c. Injektion von einem EM-1 Analogon führte zum Teil über periphere Opioidrezeptoren ebenfalls zur Antinozizeption. Dieses wurde in zwei verschiedenen Modellen des akuten Schmerzes untersucht, im Schwanzschlag-Test und in einem durch Essigsäure induzierten Bauchkrampf test [81]. Ich konnte feststellen, dass i.pl. applizierte EMs zu einer Veränderung in der PDS nur an der entzündeten Pfote führten, welches dem gesteigerten antinozizeptiven Effekt der Opiode unter entzündeten Bedingungen entspricht. Dieses könnte bedingt sein durch eine Hochregulierung und Vermehrung der G-Protein-gekoppelten peripheren Opioid-Rezeptoren, eine Unterbrechung der

perineuralen Barriere und/oder einer Zunahme der sensorischen Nervenendigungen im entzündeten Gewebe [1,5,8,16,65,76,77]. In der nicht entzündeten Pfote konnte ich keine antinozizeptiven Effekte der EMs feststellen. Das Ausbleiben dieser Effekte in dem nicht entzündeten Gewebe könnten die in meiner Studie festgestellten fehlenden antinozizeptiven Effekte der EMs im nicht entzündeten Gewebe erklären.

5.2.2. Rezeptorselektivität

Beide EMs vermitteln antinozizeptive Effekte über periphere μ -Rezeptoren. Diese Effekte konnten aufgrund eines vollständigen und dosisabhängigen Aufhebens durch den selektiven μ -Rezeptorantagonisten CTOP in meinen Versuchen nachgewiesen werden. Zum ersten Mal konnten wir durch eine 92 - 96%-ige Verdrängung der [3 H]-DAMGO-Bindung zeigen, dass beide EMs stark an periphere μ -Rezeptoren binden. Meine Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien, die die antinozizeptiven Effekte der EMs beschrieben haben. Es liegen Untersuchungen mit radioaktiv markierten Liganden an nicht μ -Rezeptor-Knockout-Tieren und an μ -Rezeptor-Knockout-Tieren in dem zentralen Nervensystem oder in Zellkulturen vor [28-30,35,52,53]. In meiner Studie konnte der antinozizeptive Effekt von EM-1 zwar durch δ -Rezeptorantagonisten reduziert werden, dieses gelang jedoch nur zum Teil und war nicht dosisabhängig. Der κ -Antagonist zeigte gegenüber EM-1 keinen Effekt. Diese Daten indizieren, dass peripher appliziertes EM-1 einen seit 4 - 6 Tagen bestehenden entzündlichen Schmerz lindern kann, indem es ausschließlich am μ -Rezeptor wirkt. Dieses stimmt mit anderen Studien, die die antinozizeptiven Effekte von EM-1 nach spinaler oder supraspinaler Applikation untersucht haben, überein [29,35,37,47].

Die Rezeptorselektivität von EM-2 ist nicht so eindeutig, wie die von EM-1. Neben Studien, die von einer reinen μ -Rezeptorselektivität ausgehen [28,30,56], gibt es Untersuchungen, die eine Mitbeteiligung des κ -Rezeptors [36,38,47,58] beschreiben. Weitere Studien gehen davon aus, dass die antinozizeptiven Effekte von EM-2 neben dem μ -Rezeptor auch durch den δ - und den κ -Rezeptor vermittelt werden [37,45,46,57]. Meine Versuche zeigen eine durch EM-2 induzierte periphere Antinozizeption, die nicht durch κ -Rezeptoren vermittelt ist. Des Weiteren konnte ich feststellen, dass sich der periphere antinozizeptive Effekt von EM-2 signifikant und dosisabhängig durch zwei δ -Rezeptor-Antagonisten (Naltrindole und ICI 174,864) abschwächen lässt. Die Studien, die eine Mitbeteiligung durch den δ -Rezeptor beschreiben, gehen von der Freisetzung endogener Opioidpeptide wie Met-Enkephalin aus, die nachfolgend am δ -Rezeptor binden [37,45,46,57]. Diese These konnte unterstützt werden durch die direkte Bestimmung von

Met-Enkephalin im Rückenmark von Ratten nach EM-2-Applikation [57]. Ohsawa et al. [37] und Sakurada et al. [46] beschreiben, dass sich der antinozizeptive Effekt von EM-2 durch die Gabe von Antikörpern gegen Met-Enkephalin reduzieren lässt. Obwohl Opioidpeptide mit einer Affinität gegenüber δ -Rezeptoren in Entzündungszellen [67,82] und in sensorischen Nerven [83] exprimiert werden, konnte in meiner Studie keine signifikante Reduktion der EM-2 induzierten Antinozizeption durch i.pl. applizierte Antikörper (in einem weiten Dosisbereich) gegen Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin oder gegen β -Endorphin erreicht werden. Dieses steht mit anderen Studien im Einklang [36,47]. Somit scheint in unserem Modell des entzündeten peripheren Gewebes die Freisetzung von anderen endogenen Opioidpeptiden durch EM-2 keine Rolle zu spielen.

Gaveriaux-Ruff et al. [84] berichteten über immunsuppressive Effekte von Naltrindole bei δ - und auch bei den Tripel $\mu/\delta/\kappa$ -Rezeptor-Knockout-Mäusen. Deswegen gehen sie von einem weiteren Wirkmechanismus neben dem des Opioidrezeptors aus. Ob dieser weitere Wirkmechanismus den antagonisierenden Effekt der δ -Antagonisten erklären kann, muss in nachfolgenden Studien weiter untersucht werden. Es gibt jedoch bereits Hinweise, dass diese unspezifische Wirkungsweise von Naltrindole auf immunsuppressive Effekte limitiert ist. Matthes et al. [85] und Fillol et al. [86], die die Antinozizeption und das Opioidrezeptor-Bindungsverhalten bei μ - und δ -Rezeptor Knockout-Mäusen untersuchten, beschreiben Naltrindole als einen selektiven Liganden gegenüber dem δ -Rezeptor.

Schließlich überprüften wir die Hypothese, ob EM-2 direkt an δ -Rezeptoren peripherer sensorischer Neurone bindet. In vorangegangenen Studien konnte weder eine Bindung von EM-2 noch eine Aktivierung des δ -Rezeptors nachgewiesen werden. Dabei wurden unterschiedliche Homogenate untersucht; Membrankulturen von Zellen, die stabile δ -Rezeptoren exprimieren, das Gehirn von μ -Rezeptor Knockout-Mäusen und von nicht μ -Rezeptor Knockout-Mäusen, jeweils ohne Entzündung [30,53]. Kürzlich konnte unsere Gruppe zeigen, dass es bei einer entzündeten Pfote zu einer Zunahme der Anzahl und der Effektivität der G-Protein gekoppelten Opioidrezeptoren in den Hinterwurzelganglien kommt [65]. Aufgrund dessen untersuchten wir das Bindungsverhalten bei Tieren mit und ohne periphere Entzündung. Wir konnten bei den entzündeten Tieren keine und bei den nicht entzündeten Tieren nur eine kleine Anzahl von δ -Bindungsstellen in den Hinterwurzelganglien feststellen. Möglicherweise liegt dieses an der niedrigen Expression von δ -Rezeptor-mRNA oder einer durch die Entzündung induzierten Herunterregulierung entweder des δ -Rezeptors oder dessen bevorzugten zytoplasmatischen Bestimmungsortes in Hinterwurzelganglien [87-90]. Dieses schließt jedoch das Vorhandensein des δ -Rezeptors am peripheren Ende primär afferenter Neurone nicht

aus, besonders unter dem Gesichtspunkt des verstärkten axonalen Transports von Opioidrezeptoren zu peripheren Nervenendigungen im Rahmen subkutaner Entzündungen [5,8,90]. Tatsächlich konnte im CFA-Modell gezeigt werden, dass die Injektion von selektiven δ -Rezeptor-Agonisten direkt in entzündetes Gewebe zur peripheren Antinozizeption führte [91]. Des Weiteren sind δ -Rezeptoren am peripheren Ende sensorischer Neurone mehrfach immunhistochemisch nachgewiesen worden [17,92]. Leider ist es aufgrund der stark ausgeprägten Heterogenität nicht möglich, ein quantitatives Bindungsexperiment an einem entzündeten subkutanen Gewebe durchzuführen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass EM-1 und EM-2 den Schmerz im entzündeten Gewebe reduzieren können. Beide Peptide binden an periphere μ -Rezeptoren. EM-1 führt in der Peripherie ausschließlich über μ -Rezeptoren zur Antinozizeption, während EM-2 außerdem periphere δ -Rezeptoren involviert, welches jedoch nicht durch die Freisetzung anderer Peptide vermittelt wird.

5.2.3. EM-1, EM-2 und β -Endorphin im Vergleich

In meiner Studie wurden die beiden EMs miteinander verglichen (siehe 4.5.). Es zeigte sich bei der Betrachtung folgender Gesichtspunkte eine große Übereinstimmung: Effektivität, Potenz und Wirkdauer. EM-1 zeigte zwar die Tendenz eines größeren antinozizeptiven Effekts, es lag jedoch kein signifikanter Unterschied gegenüber EM-2 vor. Die Potenz beschreibt die Effektivität eines Wirkstoffes in Bezug auf dessen absolute Menge. Die Dosierung mit der höchsten Effektivität von EM-1 entsprach der Dosierung von EM-2 mit der höchsten Effektivität (jeweils 0,625 μ g). EM-1 hat ein Molekulargewicht von 665,7, EM-2 von 626,7 kDa [28,29]. Somit konnte ich keinen nennenswerten Unterschied in der Potenz der beiden EMs feststellen. Die Wirkdauer der EMs erwies sich in meiner Arbeit ebenfalls als identisch (siehe 4.2.2. und 4.3.2.).

Mittlerweile liegen viele Studien vor, die die beiden EMs miteinander verglichen haben. Es wird überwiegend von einer gleichen Wirkdauer der beiden EMs gesprochen. Die Effektivität und Potenz der EMs wird entweder als identisch [42,44,46,48,55,93] oder als etwas größer bei EM-1 beschrieben [28,35-37,40,43,47,52,53,56,94]. Der Unterschied zwischen den beiden EMs war jedoch häufig nur eine Tendenz. Es liegen keine Studien vor, die EM-2 eine größere Effektivität oder Potenz bescheinigen.

Diese Studien lassen keine eindeutige Erklärung der unterschiedlichen Erkenntnisse erkennen. Es liegen keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Studien, die von einer gleichen Potenz der EMs und den Studien, die von einer größeren Potenz von EM-1

ausgehen, vor. Die antinozizeptiven Effekte der EMs wurden in beiden Studiengruppen sowohl nach zentraler, als auch nach peripherer Applikation untersucht. In den beiden Gruppen von Studien wurden entzündete und nicht entzündete Tiere anhand der gleichen Schmerztests untersucht.

Des Weiteren wurde in meiner Studie der antinozizeptive Effekt der EMs gegenüber dem des β -Endorphins verglichen (siehe 4.6.2.). Ausschließlich im entzündeten Gewebe konnte ich einen antinozizeptiven Effekt von β -Endorphin feststellen. Im direkten Vergleich zeigen die EMs und β -Endorphin einen ähnlichen antinozizeptiven Effekt, es ließ sich kein signifikanter Unterschied darstellen. Die Effekte von β -Endorphin in meiner Studie sind mit den Ergebnissen von Stein et al. [64] vergleichbar. Auch Stein et al. haben bei der Untersuchung der peripheren antinozizeptiven Wirkung von β -Endorphin ausschließlich im entzündeten Gewebe einen antinozizeptiven Effekt festgestellt. Die effektivste Dosierung wurde ebenfalls mit 1 μ g beschrieben.

Somit scheinen beide EMs einen mit dem klassischen Opioid β -Endorphin vergleichbaren peripheren antinozizeptiven Effekt zu produzieren.

6. Schlussfolgerung und Ausblick

Die Identifikation der Endomorphinbiosynthese ist weiterhin schwierig. Dennoch gibt es überzeugende Beweise bezüglich der antinozizeptiven Eigenschaften von exogen applizierten EMs [29,56]. Über diese Erkenntnisse hinaus und neben dem Bericht über das neuropathische Schmerzmodell [52] belegt meine Arbeit den peripheren antinozizeptiven Effekt von EMs bei Entzündungsschmerzen, die seit 4 - 6 Tagen bestehen. Beide EMs bewirken nach Injektion in das entzündete Gewebe eine lokale und dosisabhängige Antinozizeption. Beide Peptide binden an periphere μ -Opioidrezeptoren. Die Effekte von EM-1 werden ausschließlich durch den μ -Rezeptor vermittelt. Im Gegensatz dazu aktiviert EM-2 zusätzlich den δ -Rezeptor. Diese Aktivierung des δ -Rezeptors wird nicht indirekt durch andere Peptide, wie z.B. Met- und Leu-Enkephalin oder β -Endorphin, vermittelt. Weitere mögliche Mechanismen dieser Aktivierung sind zu untersuchen. Nichtsdestotrotz sind die Effekte der peripheren Opioidrezeptoren von großer Bedeutung bei der Linderung entzündlicher Schmerzen ohne dabei zu zentral vermittelten Nebenwirkungen wie Atemdepression, Übelkeit und Sucht zu führen [1,3,19,21,22].

Der Wirkmechanismus der EMs entspricht dem Wirkmechanismus anderer Agonisten der Opioidrezeptoren (Inhibierung der Kalziumkanäle, Aktivierung der Kaliumkanäle und Inhibierung der Adenylatzyklase) [29]. Neben diesen Ähnlichkeiten besitzen die EMs einige funktionale Unterschiede im Vergleich zu anderen μ -Opioidrezeptoragonisten. Die antinozizeptive Wirkung der EMs ist selbst nach systemischer (intravenöser) Applikation frei von den unerwünschten Nebenwirkungen des Morphins, wie z.B. Abhängigkeit, Atem- und Kreislaufdepression und ist darüber hinaus beim neuropathischen Schmerz effektiv [35,95-97]. Aufgrund dessen ist es besonders bestrebenswert die Mechanismen dieser Unterschiede zu erforschen, da sich die EMs als ein sicheres Medikament darstellen. Einer der wesentlichen Gründe könnte die relative Unfähigkeit der EMs zur Durchdringung der Blut-Hirn-Schranke sein [98,99]. Darüber hinaus basiert ein interessanter neuer Ansatz auf der Verknüpfung einer Nichtprotein-Aminosäure mit EM-2. Dieses bedingt eine höhere Stabilität der EM-2-Struktur. Solche EM-2 Analoga (beinhalten Homophenylalanin und Phenylglycin) zeigen bei Mäusen eine längere Halbwertszeit, eine größere Effektivität und eine längere anhaltende Antinozizeption im Vergleich zu dem ursprünglichen EM-2 [100]. Die Effektivität der EMs und der Stellenwert als sicheres Medikament (Ausbleiben von Nebenwirkungen) müssen in randomisierten klinischen Studien validiert werden.

7. Zusammenfassung

Zu den häufigsten Formen akuter und chronischer Schmerzen gehört der Entzündungsschmerz (z.B. postoperativer oder arthritischer Schmerz). Sowohl für die Gesundheit des Einzelnen als auch für die Ökonomie sind Schmerzen von großer Bedeutung. Opioide bilden zwar die Haupttherapie für starken akuten und chronischen Schmerz, sie verursachen jedoch eine Reihe von Nebeneffekten wie z.B. körperliche und psychische Abhängigkeit, Sedierung und Atemdepression, die von dem Einfluss der Opiate auf das zentrale Nervensystem (Gehirn, Rückenmark) herrühren. Daher besteht ein Bedarf für Wirkmittel und Applikationsformen, die bei chronischen Schmerzen Erleichterung ohne Nebeneffekte schaffen. Opiate üben eine Analgesie durch Aktivierung verschiedener Typen von Opioidrezeptoren (μ , δ , κ) aus.

Endomorphine (EMs) sind endogene selektive Agonisten des μ -Opioidrezeptors [28]. Ihr Stellenwert in der Behandlung des entzündlichen Schmerzes ist bisher nicht vollständig geklärt. In meiner Arbeit habe ich anhand von Ratten den antinozizeptiven Effekt der EMs im peripheren entzündeten und nicht entzündeten Gewebe untersucht.

Den Ratten wurde eine einseitige Entzündung der Hinterpfote mit Hilfe abgetöteter Mykobakterien induziert. 4 - 6 Tage nach der Entzündungsinduktion wurde ihre Schmerzschwelle anhand eines mechanischen Hyperalgesietests bestimmt. Die EMs wurden direkt in beide Hinterpfoten appliziert, es zeigten sich jedoch ausschließlich in der entzündeten Pfote antinozizeptive Effekte. Diese Effekte konnten durch die lokale Applikation eines selektiven μ -Rezeptor-Antagonisten (CTOP), nicht jedoch durch einen κ -Rezeptor-Antagonisten (norBNI) geblockt werden. Die δ -Rezeptor-Antagonisten (ICI 174,864 und Naltrindolhydrochlorid) konnten die antinozizeptiven Effekte von EM-1 nicht beeinflussen. EM-2 hingegen konnte durch die beiden δ -Rezeptor-Antagonisten dosisabhängig gemindert werden. Antikörper gegen β -Endorphin, Met-Enkephalin oder gegen Leu-Enkephalin konnten die EM-2 induzierte Antinozizeption nicht signifikant beeinflussen. Somit ist nicht von einer indirekten Vermittlung durch andere Opioidpeptide auszugehen.

Schließlich haben wir das Bindungsverhalten von EM-2 am δ -Opioidrezeptor untersucht. Es ließ sich keine verlässliche Bindung von radioaktiv markierten δ -Liganden in den Hinterwurzelganglien nachweisen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass EM-2 direkt an den δ -Rezeptoren der peripheren primär afferenten Neuronenenden bindet, zum einen aufgrund des verstärkten axonalen Transports von Opioidrezeptoren zu peripheren Nervenendigungen im Rahmen einer subkutanen Entzündung [5,8,90], zum anderen aufgrund vom mehrfachen immunhistochemischen Nachweisen von δ -Rezeptoren am peripheren Ende sensorischer Neurone [17,92]. Dieses muss jedoch in nachfolgenden Studien weiter untersucht werden.

8. Abkürzungsverzeichnis

[³ H]	Tritium
[¹²⁵ J]	Jod 125
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgemeinschaft
ANOVA	Analysis of Variance
B _{max}	maximale Anzahl der δ-Bindungsstellen
bzw.	beziehungsweise
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CFA	Complete Freund's Adjuvant = komplettes Freundsches Adjuvanz
Ci/mmol	Curies pro Millimol
CTOP	ein μ-Opioidrezeptorantagonist mit der Struktur D-Phe -Cys-Tyr-D-Try-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂
DAMGO	D-Ala ² , N- MePhe ⁴ , Gly ⁵ -ol-enkephalin
DPDPE	[D-Pen(2), d-Pen(5)]-Enkephalin
DRG	Dorsal root ganglion = Hinterwurzelganglion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EM-1	Endomorphin-1
EM-2	Endomorphin-2
EMs	Endomorphin-1 und Endomorphin-2
e.V.	eingetragener Verein
f	femto (10 ⁻¹⁵)
g	Gramm
G _{i/s}	inhibitorische/stimulatorische G-Proteine
GmbH	Gemeinschaft mit beschränkter Haftung
G-Protein	Guaninnucleotide-bindendes Protein
ICI	N,N-diallyl-Tyr-Aib-Aib-Phe-Leu
i.pl.	intraplantar
i.t.	Intrathekal
i.z.v.	Intrazerebroventrikulär
kDa	Kilo Dalton
Leu	Leucin
Met	Methionin
Mbq	Megabecquerel

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	Anzahl
N	Stickstoff
NaCl	Natriumchlorid
NLX	Naloxonhydrochlorid
norBNI	norBinaltorphimindihydrochlorid
nM	Nanomol
NTI	Naltrindolhydrochlorid
pH	pondus oder potentia Hydrogenii = Gewicht bzw. Kraft des Wasserstoffs
POMC	Proopiomelanocortin
PPT	paw pressure threshold = Pfortendrucktest
PT	Pfortentemperatur
PV	Pfortenvolumen
s.c.	subkutan
SEM	Standard error of the mean = Standardfehler des Mittelwertes
Std.	Stunde
Tris	Trishydroxymethyl-aminomethan

9. Literaturverzeichnis

- 1 Stein, C., Schäfer, M., Machelska, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 9, 1003-1008, 2003.
- 2 Kieffer, B.L. & Gavériaux-Ruff, C. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog. Neurobiol.* 66, 285-306, 2002.
- 3 Brower, V. New paths to pain relief. *Nat. Biotechnol.* 18, 387-391, 2000.
- 4 Dubner, R. and Bennett, G. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu. Rev. Neurosci.* 6, 381-418, 1983.
- 5 Mousa, S.A., Zhang, Q., Sitte, N., Ji, R. & Stein, C. Beta-endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. *J Neuroimmunol.* 115, 71-78, 2001.
- 6 Stein, C., Pflüger, M., Yassouridis, A., Hoelzl, J., Lehrberger, K., Welte, C., Hassan, A.H.S. No tolerance to peripheral morphine analgesia in presence of opioid expression in inflamed synovia. *J. Clin. Invest.* 98, 793-799, 1996.
- 7 Stein, C., Machelska, H. & Schäfer, M. Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z. Rheumatol.* 60, 416-424, 2001.
- 8 Hassan, A.H., Ableitner, A., Stein, C., Herz, A. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* 55, 185-95, 1993.
- 9 Law, P.Y., Wong, Y.H., Loh, H.H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40, 389-430, 2000.
- 10 Ingram, S. L. & Williams, J. T. Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. *Neuron* 13, 179-186, 1994.
- 11 Gold, M. S. & Levine, J. D. DAMGO inhibits prostaglandin E₂-induced potentiation of a TTX-resistant Na current in rat sensory neurons in vitro. *Neurosci. Lett* 212, 83-86, 1996.
- 12 Russell N. J. W., Schaible H.-G. and Schmidt R. F. Opiates inhibit the discharges of fine afferent units from inflamed knee joint of the cat. *Neurosci. Lett.* 76, 107-112, 1987.

- 13 Yaksh, T. L. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. *Brain Res.* 458, 319-324, 1988.
- 14 Fields, H. L., Emson, P. C., Leigh, B. K., Gilbert, R. F. T. & Iversen, L. L. Multiple opiate receptor sites on primary afferent fibres. *Nature* 284, 351-353, 1980.
- 15 Hassan, A. H., Przewlocki, R., Herz, A., Stein, C. Dynorphin, a preferential ligand for kappa-opioid receptors, is present in nerve fibers and immune cells within inflamed tissue of the rat. *Neurosci. Lett.* 140, 85-88, 1992.
- 16 Antonijevic, I., Mousa, S.A., Schäfer, M. & Stein, C. Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J. Neurosci.* 15, 165-172, 1995.
- 17 Wenk, H. N. & Honda, C. N. Immunohistochemical localization of delta opioid receptors in peripheral tissues. *J. Comp. Neurol.* 408, 567-579, 1999.
- 18 Stein, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N. Engl. J. Med.* 332, 1685-1690, 1995.
- 19 Ferreira SH. Peripheral analgesia: mechanism of the analgesic action of aspirin-like drugs and opiate-antagonists. *Br J Clin Pharmacol Suppl* 2, 237S-245S, 1980.
- 20 Barber, A., Gottschild, R. Opioid agonists and antagonists: an evaluation of their peripheral actions in inflammation. *Med Res Rev* 12, 525-562, 1992.
- 21 Stein, C. Peripheral mechanisms of analgesia. *Anesth Analg* 76, 182-191, 1993.
- 22 Kalso, E., Smith, L., McQuay, H.J., Moore, R.A. No pain, no gain: clinical excellence and scientific rigour - lessons learned from IA morphine. *Pain* 98, 269-275, 2002.
- 23 Akil H., Owens C., Gutstein H., Taylor L., Curran E., Watson S. Endogenous opioids: overview and current issues. 51, 127-140, 1998.
- 24 Zhang, S., Tong, Y., Tian, M., Dehaven, R.N., Cortesburgos, L., Mansson, E., Simonin, F., Kieffer, B., Yu, L. Dynorphin A as a potential endogenous ligand for four members of the opioid receptor family. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 136-141, 1998.
- 25 Smith EM Opioid peptides in immune cells. *Adv Exp Med Biol* 521, 51-68, 2003.
- 26 Machelska, H., Stein, C. Leukocyte-derived opioid peptides and inhibition of pain. *J Neuroimmune Pharmacol* 1, 90-97, 2006.

- 27 Sitte, N., Busch, M., Mousa, S.A., Labuz, D., Rittner, H., Gore, C., Krause, H., Stein, C., Schäfer, M. Lymphocytes upregulate signal sequence-encoding proopiomelanocortin mRNA and beta-endorphin during painful inflammation in vivo. *J Neuroimmunol.* 183, 133-145, 2007.
- 28 Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.-J. and Kastin, A.J. A potent and selective endogenous agonist for the μ -opioid receptor. *Nature* 386, 499-502, 1997.
- 29 Horvath, G. Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous μ -opioid receptor agonists. *Pharmacol Ther* 88, 437-463, 2000.
- 30 Monory, K., Bourin, M.C., Spetea, M., Tomboly, C., Toth, G., Matthes, H.W., Kieffer, B.L., Hanoune, J., Borsodi, A. Specific activation of the mu opioid receptor (MOR) by endomorphin 1 and endomorphin 2. *Eur J Neurosci* 12, 577-584, 2000.
- 31 Hackler, L., Zadina, J. E., Ge, L.-J. & Kastin, A. J. Isolation of relatively large amounts of endomorphin-1 and endomorphin-2 from human brain cortex. *Peptides* , 1635-1639, 1997.
- 32 Martin-Schild, S., Gerall, A.A., Kastin, A.J., Zadina, J.E. Differential distribution of endomorphin 1- and endomorphin 2-like immunoreactivities in the CNS of the rodent. *J. Comp. Neurol.* 22, 450-471, 1999.
- 33 Jessop, D.S., Richards, L.J., Harbuz, M.S. Opioid peptides endomorphin-1 and endomorphin-2 in the immune system in humans and in a rodent model of inflammation. *Ann NY Acad Sci* , 456-463, 2002.
- 34 Mousa S.A., Machelska, H., Schäfer, M., Stein C. Immunohistochemical localization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in immune cells and spinal cord in a model of inflammatory pain. *J Neuroimmunol* , 5-15, 2002.
- 35 Przewlocki, R., Przewlocka, B. Opioids in chronic pain. *Eur J Pharmacol* 429, 79-91, 2001.
- 36 Tseng, L.-F., Narita, M., Suganuma, C., Mizoguchi, H., Ohsawa, M., Nagase, H., & Kampine, J.P. Differential antinociceptive effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 292, 576-583, 2000.
- 37 Ohsawa, M., Mizoguchi, H., Narita, M., Nagase, H., Chu, M., Nagase, H. & Tseng, L.F. Differential mechanisms mediating descending pain controls for antinociception induced by supraspinally administered endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 294, 1106-1111, 2000.

- 38 Makulska-Nowak, H.E., Gumulka, S.W., Lipkowski, A.W. & Rawa M.A. Effects of endomorphin-2 on arterial blood pressure and pain threshold in spontaneously hypertensive rats and modification of these effects by beta-funaltrexamine and nor-binaltorphimine. *Life Sci* 69, 581-589, 2001.
- 39 Loh, H. H., Liu, H.-C., Cavalli, A., Yang, W., Chen, Y.-F. & Wei, L.-N. μ Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Mol Brain Res* 54, 321-326, 1998.
- 40 Mizoguchi, H., Narita, M., Oji, D. E., Suganuma, C., Nagase, H., Sora, I., Uhl, G. R., Cheng, E. Y., & Tseng, L.-F. The μ -opioid receptor gene-dose dependent reductions In G-protein activation in the pons/medulla and antinociception induced by endomorphins in μ -opioid receptor knockout mice. *Neuroscience* , 203-207, 1999.
- 41 Shane, R., Wilk, S. & Bodnar, R. J. Modulation of endomorphin-2 induced analgesia by dipeptidyl peptidase IV. *Brain Res* 815, 278-286, 1999.
- 42 Soignier, R.D., Vaccarino, A.L., Brennan, A.M., Kastin, A.J., Zadina, J.E. Analgesic effects of endomorphin-1 and endomorphin-2 in the formalin test in mice. *Life Sciences* 67, 907-912, 2000.
- 43 Przewlocka, B., Mika, J., Labuz, D., Toth, G., & Przewlocki, R. Spinal analgesic action of endomorphins in acute, inflammatory and neuropathic pain in rats. *Eur J Pharmacol* , 189-196, 1999b.
- 44 Stone, L. S., Fairbanks, C. A., Laughlin, T. M., Nguyen, H. O., Bushy, T. M., Wesendorf, M. W., & Wilcox, G. L. Spinal analgesic actions of the new endogenous opioid peptides endomorphin-1 and -2. *Neuroreport* 8, 3131-3135, 1997.
- 45 Tseng L.F. Recent Advances in the Search for the μ -Opioidergic System. The Antinociceptive Properties of Endomorphin-1 and Endomorphin-2 in the Mouse. *Jpn. J. Pharmacol.* 89, 216-220, 2002.
- 46 Sakurada, S., Hayashi, T., Yuhki, M., Orito, T., Zadina, J.E., Kastin, A.J., Fujimura, T., Murayama, K., Sakurada, C., Sakurada, T., Narita, M., Suzuki, T., Tan-no, K., Tseng, L.F. Differential antinociceptive effects induced by intrathecally administered endomorphin-1 and endomorphin-2 in the mouse. *European Journal of Pharmacology* 427, 203-210, 2001.
- 47 Ohsawa, M., Mizoguchi, H., Narita, M., Nagase, H., Kampine, J. P. & Tseng, L. F. Differential Antinociception Induced by Spinal Administered Endomorphin-1 and Endomorphin-2 in the Mouse. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 592-597, 2001.

- 48 Horvath, G., Szikszay, M., Tomboly, C., & Benedek, G. Antinociceptive effects of intrathecal endomorphin-1 and -2 in rats. *Life Sci* , 2635-2641, 1999.
- 49 Hao, S., Takahata, O., Iwasaki, H. Isobolographic analysis of interaction between spinal endomorphin-1, a newly isolated endogenous opioid peptide, and lidocaine in the rat formalin test. *Neurosci Lett*. 276, 177-180, 1999.
- 50 Kekesi, G., Dobos, I., Benedek, G., Horvath, G. The Antinociceptive Potencies and Interactions of Endogenous Ligands During Continuous Intrathecal Administration: Adenosine, Agmatine, and Endomorphin-1. *Anesth Analg* 98, 420-426, 2004.
- 51 Grass, S., Wiesenfeld-Hallin, Z., Xu, X.-J. The effect of intrathecal endomorphin-2 on the flexor reflex in normal, inflamed and axotomized rats: reduced effect in rats with autotomy. *Neuroscience* 98, 339-344, 2000.
- 52 Obara, I., Przewlocki, R., Przewlocka B Local peripheral effect of mu-opioid receptor agonists in neuropathic pain in rats. *Neurosci Lett* 360, 85-89, 2004.
- 53 Goldberg, I. E., Rossi, G. C., Letchworth, S. R., Mathis, J. P., Ryan-Moro, L., Leventhal, L., Su, W., Emmel, D., Bolan, E. A., & Pasternak, G. W. Pharmacological characterization of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* 286, 1007-1013, 1998.
- 54 Chapman, V., Diaz, A. & Dickenson, A. H. Distinct inhibitory effects of spinal endomorphin-1 and endomorphin-2 on evoked dorsal horn neuronal responses in the rat. *Br J Pharmacol* 122, 1537-1539, 1997.
- 55 Sakurada, S., Zadina, J. E., Kastin, A. J., Katsuyama, S., Fujimura, T., Murayama, K., Masayuki, Y., Ueda, H. & Sakurada, T. Differential involvement of μ -opioid receptor subtypes in endomorphin-1 and -2 induced antinociception. *Eur J Pharmacol* 372, 25-30, 1999.
- 56 Przewlocki, R., Labuz, D., Mika, J., Przewlocka, B., Tomboly, Cs., Toth, G. Pain Inhibition by Endomorphins *Ann. NY Acad Sci* 897, 154-164, 1999.
- 57 Ohsawa, M., Shiraki M., Mizoguchi H., Narita, M., Kawai, K., Nagase, H., Cheng, E.Y., Narita, M. & Tseng, L.F. Release of [Met⁵]enkephalin from the spinal cord by intraventricularly administered endomorphin-2, but not endomorphin-1 in the anesthetized rat. *Neurosci Lett* 316, 1-4, 2001b.
- 58 Leitermann, R.J., Terashvili, M., Mizoguchi, H., Wu, H.E., Chen, F., Clithero, A. & Tseng, L.F. Increased release of immunoreactive dynorphin A1-17 from the spinal cord after intrathecal treatment with endomorphin-2 in anesthetized rats. *Eur J Pharmacol* 504, 177-183, 2004.

- 59 Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110, 1983.
- 60 Stein C., Miller, M.J., Herz, A. Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation, alterations in behaviour and nociceptive thresholds. *Pharmacol Biochem Behav* 31, 445-451, 1988.
- 61 Randall, L.O., Selitto, J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 111(4), 409-419, 1957.
- 62 Picard, P.R., Tramer, M.R., McQuay, H.J. & Moore, R.A. Analgesic efficacy of peripheral opioids (all except intra-articular): a qualitative systematic review of randomised controlled trials. *Pain* 72, 309-318, 1997.
- 63 Murphy, D.B., Mc Cartney, C.J. & Chan, V.W. Novel analgesic adjuncts for brachial plexus block: a systematic review. *Anesth. Analg.* 90, 1122-1128, 2000.
- 64 Stein, C., Gramsch, C. & Herz, A. Intrinsic mechanisms of antinociception in inflammation: local opioid receptors and beta-endorphin. *J Neurosci* 10, 1292-1298, 1990a.
- 65 Zöllner, C., Shaqura, M.A., Bopaiah, C.P., Mousa, S., Stein, C. & Schäfer, M. Painful inflammation-induced increase in μ -opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons. *Mol Pharmacol* 64, 202-210, 2003.
- 66 Knapp, R.J., Sharma, S.D., Toth, G., Duong, M.T., Fang, L., Bogert, C.L., Weber, S.J., Hunt, M., Davis, T.P., Wamsley, J.K., et al. D-Pen²,4'-125I-Phe⁴,D-Pen⁵]enkephalin: a selective high affinity radioligand for delta opioid receptors with exceptional specific activity. *J Pharmacol Exp Ther* 258, 1077-1083, 1991.
- 67 Machelska, H., Schopohl, J.K., Mousa, S.A., Labuz, D., Schäfer, M. & Stein, C. Different mechanisms of intrinsic pain inhibition in early and late inflammation. *J Neuroimmunol* 141, 30-39, 2003.
- 68 Millan, M.J., Czlonkowski, A., Morris, B., Stein, C., Arendt, R., Huber, A., Hollt, V., Herz, A. Inflammation of the hind limb as a model of unilateral, localized pain: influence on multiple opioid systems in the spinal cord of the rat. *Pain* 25, 299-312, 1988.
- 69 Machelska, H., Cabot, P.J., Mousa, S.A., Zhang, Q., Stein, C. Pain control in inflammation governed by selectins. *Nat Med* 4, 1425-1428, 1998.

- 70 Rittner, H.L., Brack, A., Machelska, H., Mousa, S.A., Bauer, M., Schäfer, M., Stein, C. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* 95, 500-508, 2001.
- 71 Mousa S.A., Shakibaei, M., Sitte, N., Schäfer, M., Stein, C. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. *Endocrinology* 145, 1331-1341, 2004.
- 72 Przewlocki, R., Hassan, A.H., Lason, W., Epplen, C., Herz, A., Stein, C. Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception. *Neuroscience* 48, 491-500, 1992.
- 73 Singer, A.J., Clark, R.A. Cutaneous wound healing. *N Eng J Med* 341, 738-746, 1999.
- 74 Cabot, P.J., Carter, L., Gaiddon, C., Zhang, Q., Schäfer, M., Loeffler, J. P., Stein, C. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. *J Clin Invest* 100, 142-148, 1997.
- 75 Westermann, J., Papst, R. How organ-specific is the migration of 'naive' and 'memory' T cells? *Immunol Today* 17, 278-282, 1996.
- 76 Puehler, W., Rittner, H.L., Mousa, S.A., Brack, A., Krause, H., Stein, C., Schäfer, M. Interleukin-1 beta contributes to the upregulation of kappa opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation. *Neuroscience* 141, 989-998, 2006.
- 77 Mousa, S.A., Cheppudira, B.P., Shaqura, M., Fischer, O., Hofmann, J., Hellweg, R., Schäfer, M. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. *Brain* 130, 502-513, 2007a.
- 78 Lee, S.E., Shin, H.K. Carrageenan-induced hyperalgesia is partially alleviated by endomorphin-1 locally delivered into inflamed paws in rat. *Korean J Physiol Pharmacol* 7, 369-373, 2003.
- 79 Wang, Y.-Q., Zhu, C.-B., Wu, G.-C., Cao, X.-D., Wang, Y., & Cui, D.-F. Effects of orphanin FQ on endomorphin-1 induced analgesia. *Brain Res* 835, 241-246, 1999.
- 80 Bhatia, A. R., Narita, M., Mizoguchi, H., & Tseng, L. F. Spinal antinociceptive effects and G-protein activation induced by endomorphin-1 in the rat. *Anesth Analg* 90, 302, 2000.
- 81 Spampinato S., Qasem, A.R., Calienni, M., Murari, G., Gentilucci, L., Tolomelli, A., Cardillo, G. Antinociception by a peripherally administered novel endomorphin-1 analogue containing beta-proline. *Eur J Pharmacol* 469, 89-95, 2003.

- 82 Stein, C., Hassan, A.H., Przewlocki, R., Gramsch, C., Peter, K. & Herz, A. Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5935-5939, 1990.
- 83 Antunes Bras, J., Becker, C., Bourgoin, S., Lombard, M., Cesselin, F., Hamon, M. & Pohl, M. Met-enkephalin is preferentially transported into the peripheral processes of primary afferent fibres in both control and HSV 1-driven proenkephalin A overexpressing rats. *Neuroscience* 103, 1073-1083, 2001.
- 84 Gaveriaux-Ruff, C., Filliol, D., Simonin, F., Matthes, H.W., & Kieffer B.L. Immunosuppression by delta-opioid antagonist naltrindole: delta- and triple mu/delta/kappa-opioid receptor knockout mice reveal a nonopioid activity. *J Pharmacol Exp Ther* 298, 1193-1198, 2001.
- 85 Matthes, H.W., Smadja, C., Valverde, O., Vonesch, J.L., Foutz, A.S., Boudinot, E., Denavit-Saubie, M., Severini, C., Negri, L., Roques, B.P., Maldonado, R. & Kieffer, B.L. Activity of the delta-opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the kappa-receptor is maintained in mice lacking the mu-receptor. *J Neurosci* 18, 7285-7295, 1998.
- 86 Filliol, D., Ghozland, S., Chluba, J., Martin, M., Matthes, H.W., Simonin, F., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., Dierich, A., LeMeur, M., Valverde O., Maldonado, R. & Kieffer, B.L. Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat Genet* 25, 195-200, 2000.
- 87 Buzas, B. & Cox, B.M. Quantitative analysis of mu and delta opioid receptor gene expression in rat brain and peripheral ganglia using competitive polymerase chain reaction. *Neuroscience* 76, 479-489, 1997.
- 88 Zhang Q., Schäfer, M., Elde, R. & Stein, C. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386, 499-502, 1998.
- 89 Bao, L., Jin, S.X., Zhang, C., Wang, L.H., Xu, Z.Z., Zhang, F.X., Wang, L.C., Ning, F.S., Cai, H.J., Guan, J.S., Xiao, H.S., Xu, Z.Q., He, C., Hökfelt, T., Zhou, Z. & Zhang, X. Activation of delta opioid receptors induces receptor insertion and neuropeptide secretion. *Neuron* 37, 121-133, 2003.
- 90 Pühler, W., Zöllner, C., Brack, A., Shaqura, M.A., Krause, H., Schäfer, M. & Stein, C. Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction. *Neuroscience* 129, 473-479, 2004.
- 91 Stein, C., Millan, M.J., Shippenberg, T.S., Peter, K., & Herz, A. Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 248, 1269-1275, 1989.

- 92 Brack, A., Rittner, H.L., Machelska, H., Shaqura, MA., Mousa, S.A., Labuz, D., Zöllner, C., Schäfer, M. & Stein, C. Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. *Pain* 108, 67-75, 2004.
- 93 Sugimoto-Watanabe, A., Kubota, K., Fujibayashi, K., & Saito, K. Antinociceptive effect and enzymatic degradation of endomorphin-1 in newborn rat spinal cord. *Jpn J Pharmacol* 81, 264-270, 1999.
- 94 Yamaguchi, T., Kitagawa, E., & Kuraishi, Y. Itch-associated response and antinociception induced by intracisternal endomorphins in mice. *Jpn J Pharmacol* 78, 337-343, 1998.
- 95 Wilson, A.M., Soignier, R.D., Zadina, J.E., Kastin, A.J., Nores, W.L., Olson, R.D., Olson, G.A. Dissociation of analgesic and rewarding effects of endomorphin-1 in rats. *Peptides* 21, 1871-1874, 2000.
- 96 Czapla, M.A., Gozal, D., Alea, O.A., Beckermann, R.C., and Zadina, J.E. Differential cardiorespiratory effects of endomorphin 1, endomorphin 2, DAMGO, and morphine. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 994-999, 2000.
- 97 Wang, Q.-P., Zadina, J.E., Guan, J.-L., Shioda, S. Recent advances in the search for the μ -opioidergic system morphological studies of the endomorphinergic neurons in the central nervous system. *Jpn. J. Pharmacol.* 89, 209-215, 2002.
- 98 Egleton, R.D., Davis, T.P. Bioavailability and transport of peptides and peptide drugs into the brain. *Peptides* 18, 1431-1439, 1997.
- 99 Tömböly, C., Péter, A., Tóth, G. In vitro quantitative study of the degradation of endomorphins. *Peptides* 23, 1573-1580, 2002.
- 100 Gao, Y., Liu, X., Liu, W., Qi, Y., Liu, X., Zhou, Y. and Wang, R. Opioid receptor binding and antinociceptive activity of the analogues of endomorphin-2 and morphiceptin with phenylalanine mimics in the position 3 of 4. *Bioorg Med Chem Lett.* 16, 3688-3692, 2006.

10. Lebenslauf

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

11. Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. C. Stein für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. H. Machelska für ihre fachliche Betreuung, die wissenschaftliche Anleitung, die beständige Diskussionsbereitschaft und die freundliche Überlassung des Themas bedanken.

Auch für die hervorragende Unterstützung in der statistischen Auswertung der Daten sowie für ihre konstante Hilfsbereitschaft bei der Verfassung dieser Arbeit möchte ich mich bei ihr bedanken.

Herrn Prof. Dr. M. Schäfer danke ich für die Einführung in das Thema und für die zahlreichen fachlichen Anregungen.

Des Weiteren gilt Herrn Prof. Dr. C. Zöllner mein Dank für die Untersuchung der Bindung von EM-1 und EM-2 zu μ - und δ -Rezeptoren im Hinterwurzelganglion.

Den Tierpflegern danke ich für die Bereitstellung und Versorgung der Tiere.

Herrn Dr. B. Düring danke ich für die unermüdliche Bereitschaft mir bei Computerproblemen zur Seite zu stehen.

Meiner Familie danke ich für ihre liebe Unterstützung in jeglicher Hinsicht.

12. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Stephan Berger, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **Periphere antinozizeptive Effekte von Endomorphin-1 und Endomorphin-2 im Entzündungsschmerz** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

17.09.2008

Stephan Berger