

1. Einleitung

Die Anwendung von Opium oder ähnlichen Extrakten vor allem zur Schmerzlinderung kann bis auf frühe Quellen in der assyrischen, ägyptischen und griechischen Geschichte zurückverfolgt werden und stellt damit eines der am längsten etablierten therapeutischen Prinzipien dar. Die Entdeckungsgeschichte der Opiode markiert in eindrucksvoller Weise die Fortschritte, welche die biologisch-medizinischen Wissenschaften im 19. und 20. Jahrhundert durchlaufen haben.

Erste Versuche, die analgetische Wirkungssubstanz des Opiums zu isolieren, gehen auf den französischen Chemiker *Derosne* und den deutschen Apotheker *Sertümer* zurück. Sertümer gelang 1804 die Isolierung des Alkaloids Morphin (Sertümer, 1805), welches sehr rasch neben Opium in die Schmerztherapie aufgenommen wurde und bis heute, insbesondere in Form von oralen Retardzubereitungen, den Therapiestandard bei akuten und chronischen schweren Schmerzen darstellt.

Lange wurde über die Wirkungsweise von Morphin und seiner Derivate spekuliert. 1973 konnten 3 Forschergruppen unabhängig voneinander spezifische Bindungsstellen für Morphin in Säugergehirnen nachweisen (Pert and Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973). Einige Jahre nach dieser Entdeckung gelang die weitere Charakterisierung und Differenzierung dieser Bindungsstellen. Bindungsstudien mit Morphinanaloga deckten die Existenz von mindestens 3 verschiedenen Opiatrezeptoren auf: den μ -Opiatrezeptor, benannt nach der hohen Affinität für Morphin, den κ -Rezeptor (hohe Affinität für Benzomorphinderivate wie z.B. Ketocyclazocine) und den δ -Rezeptor, der zunächst am *vas deferens* der Maus beschrieben wurde (Lord et al., 1977; Martin et al., 1976). Erst 20 Jahre später gelang der molekularbiologische Nachweis dieser Rezeptoren an Hand von Klonierungsexperimenten in bestimmten Zelllinien (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992; Minami et al., 1993; Wang et al., 1993). Wenig später wurden auch die humanen Opioidrezeptoren kloniert und die dazugehörigen Gene auf den menschlichen Chromosomen 1 (δ -Rezeptor), 6 (μ -Rezeptor) und 8 (κ -Rezeptor) lokalisiert (Befort et al., 1994; Wang et al., 1994; Yasuda et al., 1994). Damit gab es eine erste Erklärung für den möglichen Wirkmechanismus der Opiode im zentralen Nervensystem und eine Grundlage für ihre Charakterisierung als „zentrale Analgetika“. In nachfolgenden Bindungsstudien wurden Opioidrezeptoren nicht nur im Gehirn, sondern auch im Rückenmark identifiziert (Kuhar et al., 1973; Lamotte et al., 1976;

Woolf and Salter, 2000). Unter Verwendung radioaktiv markierter, selektiver Liganden für den μ -, δ -, und κ - Opioidrezeptor (DAMGO, DPDPE bzw. Bremazocine) wurde gezeigt, dass sich μ - und κ - Opioidrezeptoren hauptsächlich in der Substantia gelatinosa und δ - Opioidrezeptoren in der Lamina I (nach Rexed) des Hinterhorns des Rückenmarks befinden (Atweh and Kuhar, 1977; Morris and Herz, 1987). Durch die Einführung eines Katheters in den Spinalkanal konnten Yaksh und Mitarbeiter erstmals in experimentellen Untersuchungen Opioide in niedriger Dosierung in die Nähe des Rückenmarks applizieren und dadurch einen signifikanten analgetischen Effekt auslösen (Yaksh and Rudy, 1977). Zahlreiche weitere experimentelle Studien folgten, die diese Ergebnisse bestätigten (Yaksh and Yaksh, 1993), was letztlich in der weit verbreiteten klinischen Anwendung von Opioiden im Spinal- bzw. Epiduralraum zur intra- und postoperativen Analgesie resultierte.

Neue wissenschaftliche Erkenntnisse zeigen, dass eine analgetische Wirkung auch durch eine lokale Gabe von Opioiden, also außerhalb des zentralen Nervensystems, hervorgerufen werden kann (Stein et al., 2003). Während einzelne anekdotische Berichte schon Anfang der achtziger Jahre einen ersten Hinweis gaben (Bentley et al., 1981; Ferreira and Nakamura, 1979; Rios and Jacob, 1982; Smith et al., 1982), wurden sie jedoch angezweifelt, da sie nicht eindeutig einen Opioidrezeptor-vermittelten Effekt nachgewiesen hatten. Insbesondere fehlte der Nachweis einer Aufhebbarkeit der analgetischen Wirkung durch den Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon. Ebenso wurde diskutiert, ob die analgetische Wirkung tatsächlich auf einem peripheren oder nicht doch auf einem zentralen Wirkungsmechanismus durch Aufnahme der Opioide in den Kreislauf und Transport in das zentrale Nervensystem beruhte. Erst die Erfüllung bestimmter pharmakologischer Kriterien, die für den Nachweis einer Opioidrezeptor-spezifischen Wirkung notwendig sind, sollte zur Anerkennung des Wirkungsprinzips peripherer Opioidanalgesie führen (Stein, 1993).

1.1. Liganden-Opioidrezeptor-Interaktionen

Die Kriterien, ob eine Wirkung spezifisch durch Opioidrezeptoren vermittelt ist, basieren auf zahlreichen Untersuchungen verschiedener selektiver Liganden sowohl in Bindungsstudien als auch in biologischen Assays (Leslie, 1987). Bindungsstudien mit radioaktiv markierten Liganden werden typischerweise unter nicht-physiologischen

Bedingungen durchgeführt und bestimmten die Anzahl von Rezeptoren in einem bestimmten Gewebe (B_{max}) und die Affinität zwischen Rezeptor und Ligand (K_d). Im Gegensatz dazu werden Bioassays unter physiologischen Bedingungen durchgeführt, so dass die Rezeptoren in ihrem natürlichen, funktionellen Zustand untersucht werden. Messgrößen sind das Ausmaß der biologischen Antwort und ihre Antagonisierbarkeit, welche durch die Affinität zwischen Rezeptor und Ligand und durch die Wirksamkeit der Kopplung zwischen Rezeptor und intrazellulären Effektoren bestimmt werden. Sowohl Bindungs- als auch funktionelle Studien haben zur Identifizierung von Agonisten, gemischten Agonist/Antagonisten und reinen Antagonisten geführt, die mit unterschiedlicher Selektivität und Affinität an die drei Opioidrezeptoren μ , δ , und κ binden (Tab. 1) (Goldstein and Naidu, 1989). Ein typischer Agonist für den μ -Opioidrezeptor ist zum Beispiel Morphin (Tab. 1). Da Morphin in hohen Dosierungen auch auf δ - und/oder κ -Opioidrezeptoren einwirken kann, ist die Rezeptorselektivität nicht sehr groß.

Neuere Opioidagonisten mit sehr viel größerer Selektivität und auch Wirksamkeit sind in letzter Zeit hergestellt worden, so z.B. DAMGO als selektiver Ligand für den μ -Opioidrezeptor, DPDPE als selektiver Ligand für den δ -Opioidrezeptor und U50,488H als selektiver Ligand für den κ -Opioidrezeptor (Tab. 1). Diese Agonisten sind jedoch nur experimentell in Gebrauch.

Tabelle 1. Klassifikation der Opioidrezeptoren und ihrer Liganden

Opioidrezeptor	Gen (humanes Genom)	Exogener Ligand (selektiver L.)	Antagonist (selektiver A.)	Funktion
μ	6q24-25	Morphin (DAMGO)	Naloxon (CTOP)	Analgesie Abhängigkeit
δ	1p34.3-36.1	Morphin (DPDPE)	Naloxon (ICI 174,864)	Analgesie Atemdepression
κ	8q11-11	Morphin (U-50,488H)	Naloxon (nor-BNI)	Analgesie Miosis

1.2. Struktur und Signaltransduktion der Opioidrezeptoren

Die kürzliche Klonierung und der Nachweis der cDNS Nukleotidsequenz des δ - (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992), und nachfolgend des κ - (Meng et al., 1993) und μ - Opioidrezeptors (Chen et al., 1993; Wang et al., 1993) (Abb. 1) haben die Opioidrezeptoren in ihrer Aminosäuresequenz eindeutig identifiziert. Opioidrezeptoren gehören zur Superfamilie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Gudermann et al., 1996), die als Charakteristika ein extrazelluläres Nterminales Ende, ein intrazelluläres C-terminales Ende und sieben hydrophobe, transmembranäre Domänen haben (Abb. 1). Im menschlichen Genom befinden sich drei Gene, die für den μ -, δ - und κ - Opioidrezeptor codieren und auf drei verschiedenen Chromosomen 6q24-25 (Wang et al., 1994), 1p34.3-p36.1 (Befort et al., 1994) bzw. 8q11-12 (Simonin et al., 1995) lokalisiert sind (Tab. 1). Detaillierte Bindungsstudien in μ -, δ - und κ -Opioidrezeptor „knock-out“-Mäusen mit radioaktiv markierten Liganden zeigen eindeutig, dass es keinen Anhalt für weitere Gene im Genom gibt, die noch andere Opioidrezeptoren codieren (Kitchen et al., 1995). Die einzelnen Rezeptorproteine bestehen aus einer Aminosäuresequenz von ca. 370-400 Aminosäuren und weisen untereinander eine große Homologie (60-70 %) auf. Regionen mit vermehrter Variabilität sind besonders das N-terminale Ende, welches für die Bindung von Agonisten und Antagonisten von Bedeutung ist (Raynor et al., 1994), sowie die dritte intrazelluläre Schleife und das C terminale Ende, welche wesentlich an der Kopplung intrazellulärer second Messenger-Moleküle beteiligt sind (Abb. 1) (Gudermann et al., 1996).

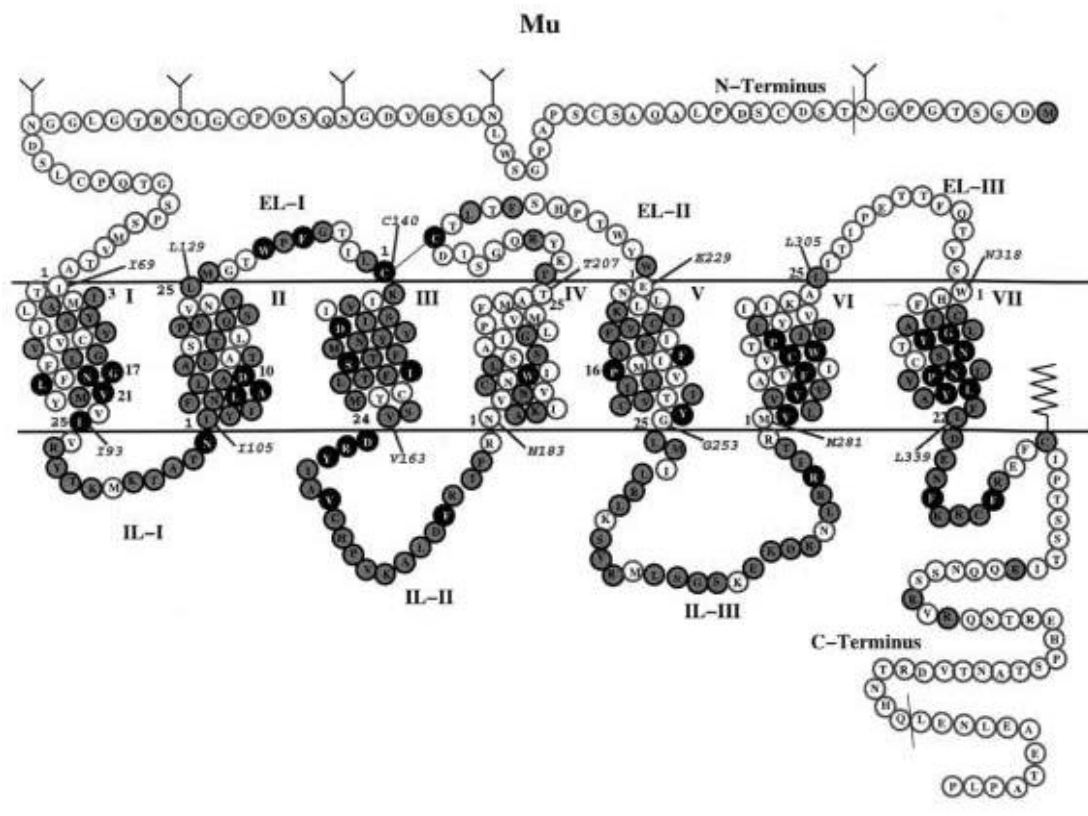


Abbildung 1. Aminosäuresequenz und transmembranöse Struktur des klonierten μ -Opioidrezeptors. Erkennbar ist die von der Nukleotidsequenz des klonierten μ -Opioidrezeptors abgeleitete Aminosäuresequenz und ihre transmembranöse Struktur mit sieben hydrophoben, membranspannenden Domänen, einem extrazellulären N-terminalen Ende (oberer Teil der Aminosäuresequenz) und einem intrazellulären C-terminalen Ende (unterer Teil der Aminosäuresequenz). Die Aminosäuresequenzen der μ , δ - und κ -Opioidrezeptoren weisen vor allem im Bereich der membranspannenden Domänen und intrazellulären Schleifen eine ca. 65 % Homologie auf. Die Bereiche häufigster Unterschiede zwischen den drei Rezeptoren sind Teile der extrazellulären Schleifen sowie des N-terminalen und C-terminalen Endes. Das N-terminale Ende ist der Ort potentieller Rezeptorglykosylierung, während die dritte intrazelluläre Schleife und das C-terminale Ende Orte der G-Protein-Kopplung und Rezeptorphosphorylierung sind (aus: Wang et al., 1993).

Opioid-Liganden können als Agonisten, Antagonisten oder partielle Agonisten wirken. Agonisten aktivieren den Opioidrezeptor, was konsekutiv zu einer Hemmung der Schmerzweiterleitung führt. Antagonisten verdrängen den Agonisten vom Opioidrezeptor, aktivieren den Rezeptor jedoch nicht, so dass die Wirkung des Agonisten dadurch wieder aufgehoben wird. Aufgrund der verschiedenen Struktur und Funktion dieser Liganden binden sie auf unterschiedliche Weise am Rezeptor; so z. B. an einem extrazellulären Loop des membrangebundenen Proteins oder direkt in einer Bindungstasche, welche von den sieben Helices gebildet wird. Es folgen

Konformationsänderungen im Rezeptor, die wahrscheinlich durch Phosphorylierungen am C-Terminus oder Öffnung einer Salzbrücke ausgelöst werden (Oliveira et al., 1994). Dadurch wird intrazellulär ein G-Protein aktiviert, welches aus drei Untereinheiten (α , β , γ) besteht. Dies hat zur Folge, daß Guanosindiphosphat (GDP) abgespalten wird und anschließend Guanosintriphosphat (GTP) bindet, wobei sich die α -Untereinheit mit dem GTP von der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins abspaltet. Die α -Untereinheit bindet nun an ein Effektorprotein, z. B. Adenylatcyclase oder Phospholipase C, welches über die Bildung von Botenstoffen, wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), die Funktionen verschiedener zellulärer Effektoren reguliert. Als Folge kommt es zu einer Inhibition der Adenylyl-Zyklase und damit zu einer Senkung der intrazellulären cAMP Konzentration (Blume et al., 1979; Sharma et al., 1977), einer Reduktion des Ca^{2+} - Einstroms (Gross et al., 1990) und einer Vermehrung des K^+ -Ausstroms (North et al., 1987). Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP lagern sich die Untereinheiten des G-Proteins wieder zusammen (Abb. 2).

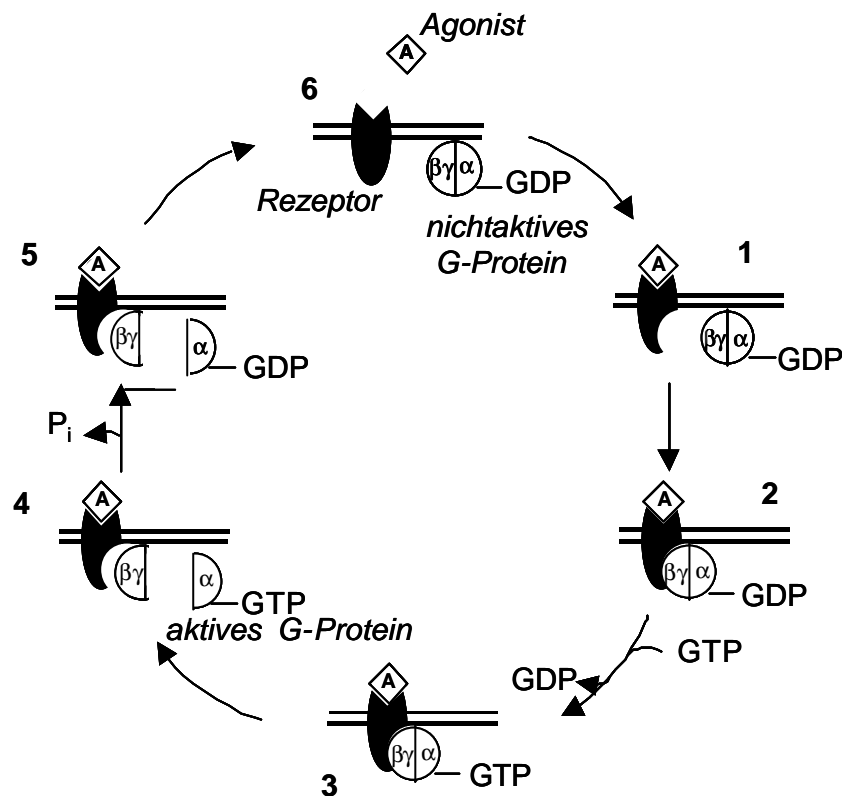


Abbildung 2. Der Mechanismus der G-Protein-Kopplung an Rezeptor: Die sechs Schritte der G-Protein Kopplung des Opioidrezeptors sind im Text genauer beschrieben. Ein Agonist bindet an einen Rezeptor (1). Die nachfolgende Konformationsänderung des Rezeptors begünstigt die Kopplung an ein G-Protein. Es kommt zum Austausch des an das $\text{G}\alpha$ gebundene GDP durch GTP und konsekutiv zur Bindung der α -Untereinheit (2-3). Die aktivierte α -Untereinheit des G-Proteins wirkt auf nachgeschaltete Effektoren, z.B. im Falle des Opioidrezeptors kommt es durch Aktivierung einer $\text{G}\alpha_i$ -Untereinheit zur Hemmung der membrangebundenen Adenylzyklase. Die β - und γ -Untereinheiten dissoziieren von α (4). Das an $\text{G}\alpha$ gebundene GTP wird durch eine GTPase hydrolysiert (5). Die inaktivierte α - Untereinheit dissoziiert letztlich vom Rezeptor und verbindet sich erneut mit der β - und γ -Untereinheit (6).

In primär afferenten Neuronen resultiert dies letztlich in einer Hemmung der Erregungsbildung und -ausbreitung schmerzhafter Impulse (Akins and McCleskey, 1993; Taddese et al., 1995) und einer Inhibition der Ca^{2+} -abhängigen Freisetzung exzitatorischer, pro-inflammatorischer Neuropeptide, wie z.B. Substanz P und CGRP (Yaksh, 1988; Yaksh et al., 1980). Durch diese Wirkungsmechanismen in sensorischen Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems erklärt sich höchstwahrscheinlich der analgetische Effekt der Opiode.

1.3. Periphere Opioidanalgesie

Zu Beginn der achtziger Jahre zeigten erste tierexperimentelle Untersuchungen, dass die Injektion einer niedrigen Dosis eines Opioidagonisten in entzündetes Gewebe eine analgetische Wirkung hervorruft (Bentley et al., 1981; Ferreira and Nakamura, 1979; Rios and Jacob, 1982; Smith et al., 1982). Ob es sich dabei um eine Opioidrezeptor-spezifische Wirkung handelte, wurde an Hand pharmakologischer Kriterien nur sporadisch und größtenteils unvollständig untersucht. Erst in späteren Studien wurde auf die Erfüllung der pharmakologischen Kriterien der Opioidrezeptorspezifität größerer Wert gelegt (Stein, 1993; Stein et al., 1989).

Zum sicheren Nachweis, dass diese Opioidanalgesie auf peripheren und nicht auf zentralen Mechanismen beruhte, wurden verschiedene Strategien verfolgt. In einigen Studien wurden polare, hydrophile Agonisten oder Antagonisten verwendet, die zum größten Teil die Blut-Hirnschranke nicht passieren konnten. Beispiele solcher Substanzen sind quaternäre Opioidalkaloide (z.B. N-Methyl-Morphin, N-Methyl-Naloxon) (Abbott, 1988; Kayser et al., 1995; Rios and Jacob, 1982). Andererseits wurde ein peripherer Mechanismus durch die lokale versus der systemischen Gabe äquivalenter Dosierungen eines Opioidagonisten nachgewiesen (Bentley et al., 1981; Craft et al., 1995; Diop et al., 1994; Joris et al., 1987; Kayser et al., 1991; Stein et al., 1988; Stein et al., 1989). Wiederum in anderen Untersuchungen wurden die peripheren Wirkungen systemischer Agonisten durch die Blockade mit einem lokalen Antagonisten demonstriert (Kayser et al., 1991; Kayser et al., 1995). Aktuelle Studien [(Diop et al., 1994; Nozaki-Taguchi and Yaksh, 1999; Sengupta et al., 1999) haben neu entwickelte, peripher selektive Opioidagonisten (z.B. Asimadolin, Fedotozin, Loperamid), die aufgrund ihrer besonderen chemischen Struktur die Blut-Hirnschranke nicht passieren können und daher selektiv nur auf periphere Opioidrezeptoren einwirken, angewandt (Barber and Gottschlich, 1992). Zum Nachweis einer Dosis-Wirkungsbeziehung wurden steigende Dosierungen eines lokalen Opioids getestet, die jedoch noch nicht systemisch wirksam waren. In der Mehrzahl der Untersuchungen nahm die peripher analgetische Wirkung von Opioiden dosisabhängig zu (Bentley et al., 1981; Joris et al., 1987; Rios and Jacob, 1982; Stein et al., 1988; Stein et al., 1989). Durch die lokale Gabe von Naloxon oder anderer selektiver Opioidantagonisten konnte der analgetische Effekt

antagonisiert werden (Bentley et al., 1981; Joris et al., 1987; Rios and Jacob, 1982; Stein et al., 1988; Stein et al., 1989). Nur in wenigen Untersuchungen wurde die Stereoselektivität peripherer Opioidanalgesie mittels der Enantiomere von Naloxon demonstriert (Stein et al., 1988; Stein et al., 1989). Der Nachweis eines peripheren Mechanismus, einer Dosis-Wirkungsbeziehung und eines Naloxon-Antagonismus weisen auf eine spezifische Aktivierung peripherer Opioidrezeptoren durch lokale Opioide hin.

1.4. Periphere Opioidanalgesie und Entzündung

Eine lokale Entzündung scheint eine wichtige Voraussetzung für das Auftreten peripher analgetischer Opioidwirkungen zu sein. Sie wird durch eine intraplantare Injektion eines entzündlichen Agens (z.B. Prostglandine, Essigsäure, Carrageenan, Bradykinin, Freund's complete Adjuvans) ausgelöst, wodurch eine erhöhte Schmerzempfindlichkeit (Hyperalgesie) entsteht. Mit verschiedenen Meßmethoden wird eine Veränderung des Schmerzverhaltens auf mechanische (z.B. Pfortendruck, Blasendehnung), chemische (z.B. Essigsäure) oder thermische (Hitzestrahl) Reize nach lokaler Gabe eines Opioids gemessen. Das am besten untersuchte Entzündungsmodell ist die Injektion von Freund's (complete) adjuvans (FCA), einer Suspension aus Hitze-inaktivierten *Mycobacterium butyricum*, in die Hinterpfote einer Ratte (Stein et al., 1988). Nach Inokulation entwickelt sich eine lokale Entzündung der Hinterpfote mit den typischen Zeichen von Calor, Rubor, Dolor, Tumor (ödematöse Schwellung) und Functio laesa (Schonhaltung). Diese bleibt einseitig auf die betroffene Hinterpfote begrenzt, so dass in demselben Versuchstier die lokale Wirkung von Opioiden in der entzündeten versus nicht-entzündeten Hinterpfote verglichen werden kann. Die Entzündungszeichen (Zunahme der Pfortentemperatur, des Pfortenvolumens und der Schmerzempfindlichkeit) entwickeln sich innerhalb von 6 bis 12 Stunden, nehmen bis zu einem Maximum nach 24 Stunden zu und halten bis zu 6 Tagen nach Inokulation gleichbleibend an (Antonijevic et al., 1995; Schafer et al., 1995; Stein et al., 1988).

Analgetische Wirkungen werden in diesem Tiermodell mit Hilfe eines modifizierten Pfortendrucktestes nach Randall und Selitto gemessen (Greindl and Preat, 1971). Dazu wird ein kontinuierlich zunehmender Druck auf die Hinterpfote einer Ratte ausgeübt und der Schwellenwert bestimmt, bei dem die Ratte die Pfote zurückzieht

(Pfortendruckschwelle). Diese Pfortendruckschwelle wird vor und nach i.pl. Gabe eines Opioidagonisten gemessen. Eine signifikante Zunahme der Schmerzschwelle entspricht einer analgetischen Wirkung. Die ersten Untersuchungen in diesem Tiermodell zeigten, dass lokal gegebene Opioidagonisten eine Analgesie in der entzündeten, nicht jedoch in der kontralateralen nicht-entzündeten Pfote bewirkten (Stein et al., 1988).

Eine i.pl. Gabe des μ -Agonisten DAMGO bewirkte in nicht-entzündetem Pfortengewebe keine signifikanten Veränderungen der Pfortendruckschwelle. Nach 6 Stunden FCA-Entzündung führte die i.pl. Gabe von DAMGO in der entzündeten Pfote zu einer Zunahme der Pfortendruckschwelle (Schafer et al., 1995; Zhou et al., 1998). Dieser analgetische Effekt war dosisabhängig (Schafer et al., 1995; Zhou et al., 1998). Ähnliche analgetische Wirkungen zeigten sich auch nach i.pl. Gabe des δ -Agonisten DPDPE und des κ -Agonisten U-50,488H (Zhou et al., 1998). Im weiteren Verlauf der FCA-Entzündung nahmen die analgetischen Wirkungen aller drei Opioidagonisten parallel zur Entzündungsdauer bis zu 24 Stunden FCA-Entzündung linear zu (Schafer et al., 1995; Zhou et al., 1998).

Das erste Auftreten einer lokal analgetischen Opioidwirkung bereits nach 6 Stunden FCA-Entzündung spricht für das Vorhandensein von Opioidrezeptoren in gesundem Pfortengewebe. Übereinstimmend konnten μ -, δ -, und κ -Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Nervenendigungen in gesundem subkutanen Gewebe demonstriert werden (Hassan et al., 1993; Stein et al., 1990). Die lineare Zunahme der analgetischen Wirksamkeit peripherer Opioide im Verlauf der weiteren Entzündung könnte durch unterschiedliche Mechanismen verursacht sein. Es könnten mehr Opioidrezeptoren synthetisiert, an das periphere Nervenende transportiert und/oder funktionell an intrazelluläre Signalmoleküle gekoppelt sein.