

5. Ergebnisse

5.1. Autoradiographie:

In den autoradiographischen Untersuchungen ließen sich MOR-spezifische Bindungsstellen in dafür bekannten Gehirnregionen mittels des radioaktiv markierten Liganden [³H]DAMGO darstellen. Bevorzugt sind Gehirnregionen, die an der Schmerztransmission beteiligt sind. Exemplarisch dargestellt ist ein [³H]DAMGO-Autoradiogramm in verschiedenen Frontalschnitten des Gehirns (Abb. 9). Eine intensive Anreicherung [³H]DAMGO-spezifischer Bindungsstellen zeigten folgende Gehirnbereiche: acb, nucleus accumbens; acg, anterior cingulate cortex; amg, amygdala; cp, caudate putamen; frp, frontal–parietal cortex; hpc, hippocampus; hyp, hypothalamus; mg, medial geniculate; sc, superior colliculus; thl, thalamus. Die [³H]DAMGO-Bindung wurde durch einen Opioidrezeptor-spezifischen Antagonisten (Naloxon) verdrängt (Abb 9; D, E und F). Dies zeigt, dass die [³H]DAMGO Bindungsstellen MOR-spezifisch sind.

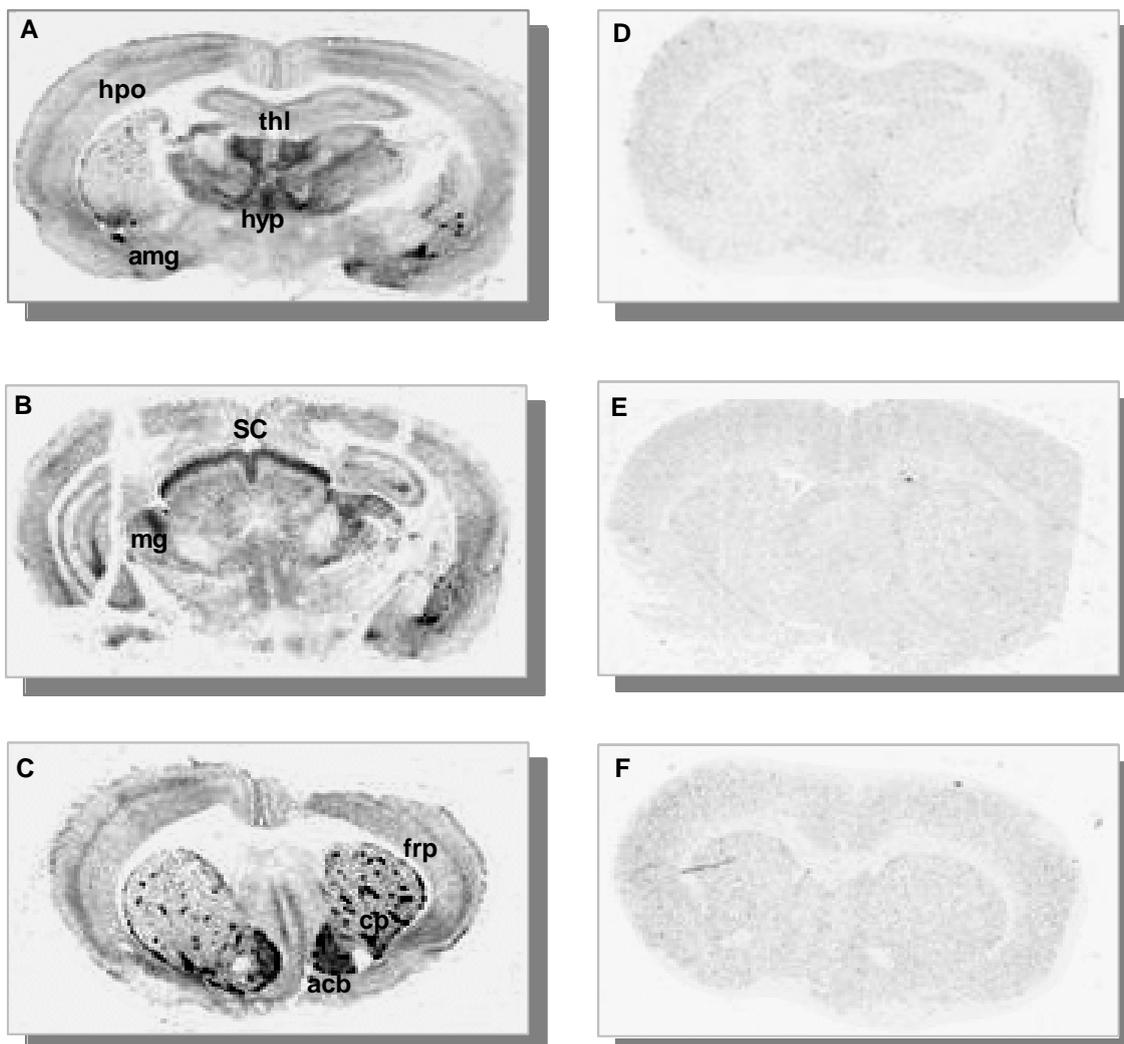


Abbildung 9. Autoradiographische Identifizierung von $[^3\text{H}]$ DAMGO-Bindungsstellen in verschiedenen Frontalschnitten eines Rattenhirns auf der Ebene der thalamischen Nuclei und des Hippocampus (A), des Hirnstamms (B), und des frontoparietalen somatosensorischen Kortex (C). Aus dem Gehirn der Ratte wurden Gefrierschnitte angefertigt, die nach Präinkubation mit $[^3\text{H}]$ DAMGO [2 nM] für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Schnitte wurde auf einen $[^3\text{H}]$ -sensitiven Film (^3H -Hyperfilm) belichtet. Nach 6-8 Wochen Exposition wurden die Filme mit einer GBX-Lösung entwickelt und fixiert. Die schwarzen Färbungen (A, B und C) deuten auf positive $[^3\text{H}]$ -DAMGO-Bindungsstellen hin. Die spezifische $[^3\text{H}]$ DAMGO-Bindung konnte durch den MOR-Antagonisten Naloxon geblockt werden (D, E und F).

(acb, nucleus accumbens; acg, anterior cingulate cortex; amg, amygdala; cp, caudate putamen; frp, frontal-parietal cortex; hpc, hippocampus; hyp, hypothalamus; mg, medial geniculate; sc, superior colliculus; thl, thalamus)

Die autoradiographischen Untersuchungen im Hinterhorn des Rückenmarks zeigten ebenfalls MOR-spezifische Bindungsstellen mittels des radioaktiv markierten Liganden

[³H]DAMGO. [³H]DAMGO-Bindungsstellen konnten in vergleichbarer Dichte beidseits im Hinterhorn des Rückenmarks nachgewiesen werden. Die Dichte [³H]DAMGO-spezifischer Bindungsstellen änderte sich im Verlauf einer unilateralen Hinterpfotenentzündung nicht (Abb 10).

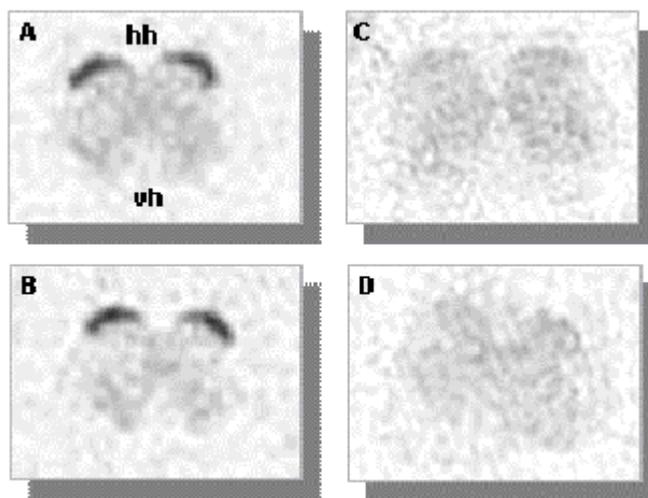


Abbildung 10. Autoradiographische Darstellung von [³H]DAMGO-Bindungsstellen in Querschnitten des Rückenmarks in Höhe der lumbalen Ebene (L3-L5) von Ratten ohne (A,C) und mit (B,D) einer FCA Hinterpfotenentzündung. Aus dem Rückenmark der Ratte wurden Gefrierschnitte angefertigt, die nach Präinkubation mit [³H]DAMGO (2 nM) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die schwarzen Färbungen (A und B) zeigen positive [³H]-DAMGO-Bindungsstellen. Das Ausmaß einer möglichen unspezifischen Bindung von [³H]DAMGO (C und D) wurde mit Naloxon (10 µM) bestimmt und war vernachlässigbar klein. (hh, Hinterhorn; vh, Vorderhorn)

Die autoradiographischen Untersuchungen in den lumbalen Spinalganglien zeigten MOR-spezifische Bindungsstellen mittels des radioaktiv markierten Liganden [³H]DAMGO. Interessanterweise zeigte sich in den Spinalganglien ipsilateral zu einer FCA-entzündeten Hinterpfote eine deutliche Zunahme der Dichte der [³H]DAMGO-Bindungsstellen im Vergleich zu Kontrolltieren, die keine Entzündung hatten (Abb. 11).

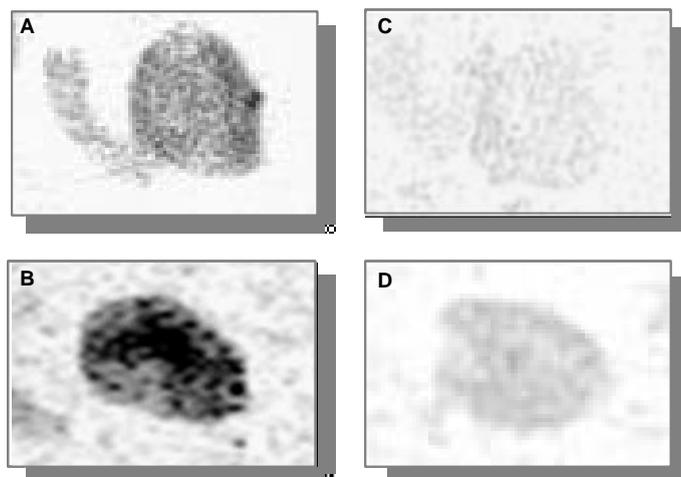


Abbildung 11. Autoradiographische Darstellung von $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ -Bindungsstellen in lumbalen Spinalganglien (L3-L5) von Ratten ohne (A, C) und mit (B, D) vier Tagen FCA Hinterpfotenentzündung. Aus den Spinalganglien (L3–L5) der Ratte wurden Gefrierschnitte angefertigt, die nach Präinkubation mit $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ (2 nM) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die schwarzen Färbungen (A und B) weisen positive $[^3\text{H}]\text{-DAMGO}$ -Bindungsstellen nach. Das Ausmaß einer möglichen unspezifischen Bindung von $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ (C und D) wurde mit Naloxon (10 μM) bestimmt und war vernachlässigbar klein.

Die autoradiographische Darstellung von μ -Opioidrezeptoren mit radioaktiv markiertem $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ im ligierten N. ischiadicus zeigte, dass es in Tieren mit einer Pfotenentzündung zu einer deutlichen Anreicherung von $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ -Bindungsstellen proximal der Ligatur des N. ischiadicus kam. Diese Akkumulation von $[^3\text{H}]\text{DAMGO}$ -Bindungsstellen proximal der Ligatur war in Kontrolltieren nicht eindeutig nachweisbar (Abb. 12).

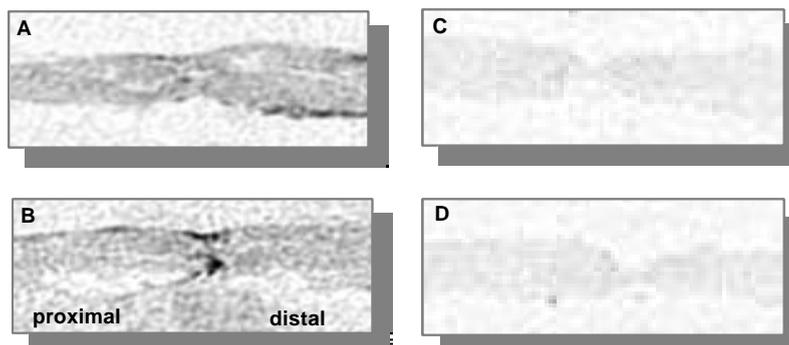


Abbildung 12. Autoradiographische Darstellung von $[^3\text{H}]$ DAMGO-Bindungsstellen in N. ischiadicus mit 48 Stunden Ligatur von Ratten ohne (A, C) und mit (B, D) viertägiger FCA Hinterpfotenentzündung. Aus dem N. ischiadicus der Ratte wurden Gefrierschnitte angefertigt, die nach Präinkubation mit $[^3\text{H}]$ DAMGO (2 nM) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die schwarzen Färbungen (A und B) zeigen positive $[^3\text{H}]$ -DAMGO-Bindungsstellen. Die unspezifische Bindung (C und D) wurde mit Naloxon (10 μM) bestimmt. Nach 48 Stunden Nervenligatur kam es zu einer Akkumulation von $[^3\text{H}]$ DAMGO-Bindungsstellen proximal der Ligatur des N. ischiadicus von Tieren mit 96 Stunden Pfortenentzündung (B). Bei den Tieren ohne Entzündung zeigte sich dieses jedoch nicht in gleichem Maße

Die autoradiographische Visualisierung von MOR-Bindungsstellen gelang auch in subkutanem Pfortengewebe. Es zeigte sich eine $[^3\text{H}]$ DAMGO-Bindungsstellen spezifische Schwarzfärbung in longitudinaler Ausdehnung im Sagittalschnitt. Dies ist am ehesten mit MOR-spezifischen Bindungsstellen entlang von subkutanen Nervenfasern vereinbar. Vier Tage nach einer FCA Hinterpfotenentzündung nahmen die positiven $[^3\text{H}]$ DAMGO-Bindungsstellen in der entzündeten Hinterpfote zu (Abb. 13).

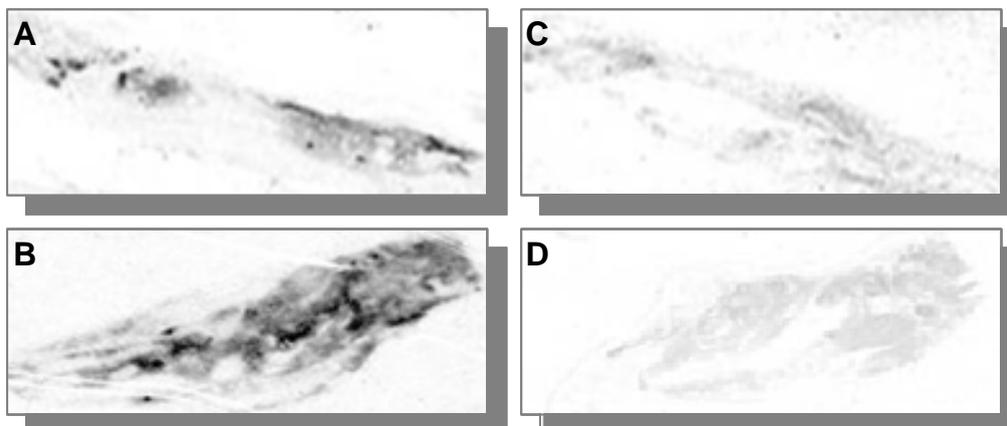


Abbildung 13. Autoradiographische Visualisierung von $[^3\text{H}]$ DAMGO-Bindungsstellen in subkutanem Pfortengewebe von Ratten mit (A, C) und ohne (B, D) FCA Hinterpfotenentzündung. Aus dem subkutanen Pfortengewebe der Ratte wurden Gefrierschnitte angefertigt, die nach Präinkubation mit $[^3\text{H}]$ DAMGO (2 nM) für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die longitudinalen schwarzen Färbungen (A und B) deuten am ehesten auf positive $[^3\text{H}]$ -DAMGO-Bindungsstellen entlang subkutaner Nervenfasern hin. Die spezifische Bindung konnte mit Hilfe des MOR Antagonisten geblockt werden (C und D). Vier Tage nach FCA-induzierter Entzündung der Hinterpfote nahm die Dichte der MOR in der entzündeten Pfote (A) im Vergleich zur nichtentzündeten Pfote (B) deutlich zu.

5.2. Bindungsstudien:

5.2.1. Bestimmung von Ligandenbindungsaffinität (K_d) und MOR-Anzahl (B_{max}) in Hypothalamus, Rückenmark und Spinalganglien

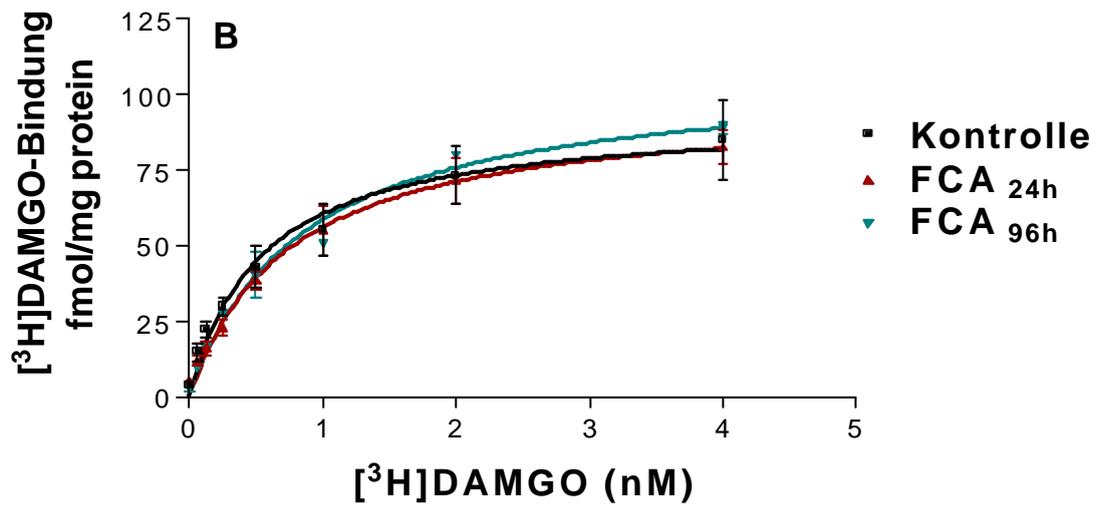
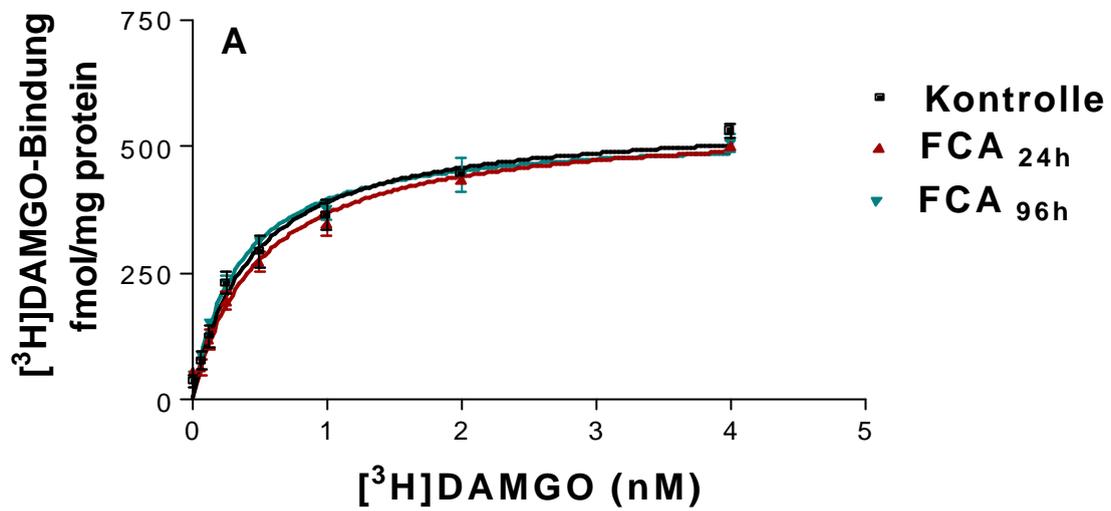
In Sättigungsexperimenten zeigte sich, dass $[^3\text{H}]$ DAMGO μ -Opioidrezeptoren (MOR) mit hoher Affinität (K_d) in HT-, RM-, und in DRG-Membranpräparationen bindet. Die Affinität des Agonisten zum Liganden lag für HT bei 0,4 nM, für RM bei 0,5 nM und im DRG bei 0,2 nM und war in allen untersuchten Geweben vergleichbar. Unter entzündlichen Bedingungen veränderte sich die Affinität nicht signifikant (Tab. 2). Die maximale Anzahl an $[^3\text{H}]$ DAMGO-Bindungsstellen (B_{max}) nahm von HT>RM>DRG ab. Die lokale Entzündung der Hinterpfote hatte keinen Einfluss auf die Anzahl der $[^3\text{H}]$ DAMGO-Bindungsstellen im HT und RM (Abb. 14 A und B, Tab. 2).

Tabelle 2. Die maximale Anzahl (B_{max}) und die Affinität (K_d) von [3 H]DAMGO an MOR in HT, RM und DRG Membranpräparationen von Ratten mit (24 und 96 Stunden) und ohne (Kontrolle) Pfotenentzündung. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert \pm SD aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente).

	Kontrolle		FCA _{24h}		FCA _{96h}	
	K_d nM	B_{max} fmol/mg	K_d nM	B_{max} fmol/mg	K_d nM	B_{max} fmol/mg
HT	0.4 \pm 0.1	556 \pm 72	0.5 \pm 0.2	550 \pm 23	0.3 \pm 0.1	529 \pm 16
RM	0.5 \pm 0.1	93 \pm 14	0.7 \pm 0.01	97 \pm 7.3	0.9 \pm 0.2	109 \pm 6.5
DRG	0.2 \pm 0.1	25 \pm 8	0.5 \pm 0.3	82 \pm 12 *	0.3 \pm 0.1	47 \pm 12 *

* $p < 0.05$; signifikant unterschiedlich zur Kontrolle

Im Gegensatz hierzu zeigte sich unter Entzündungsbedingungen eine signifikante Zunahme der Anzahl an [3 H]DAMGO-Bindungsstellen in DRG-Membranpräparationen. Zu den Zeitpunkten 24 und 96 Stunden nach einer FCA-induzierten Hinterpfotenentzündung nahm die Anzahl der [3 H]DAMGO-Bindungsstellen (B_{max}) im Vergleich zu denen bei Kontrolltieren (keine FCA Entzündung) signifikant zu (Abb. 14C.Tab. 2) ($p < 0.05$, ANOVA). Dabei zeigte sich ein maximaler Anstieg zum Zeitpunkt 24 Stunden nach FCA Entzündung. Auf der kontralateralen Seite der Entzündung wurde keine signifikante Zunahme der [3 H]DAMGO-Bindungsstellen festgestellt (29 \pm 3 fmol/mg Protein).



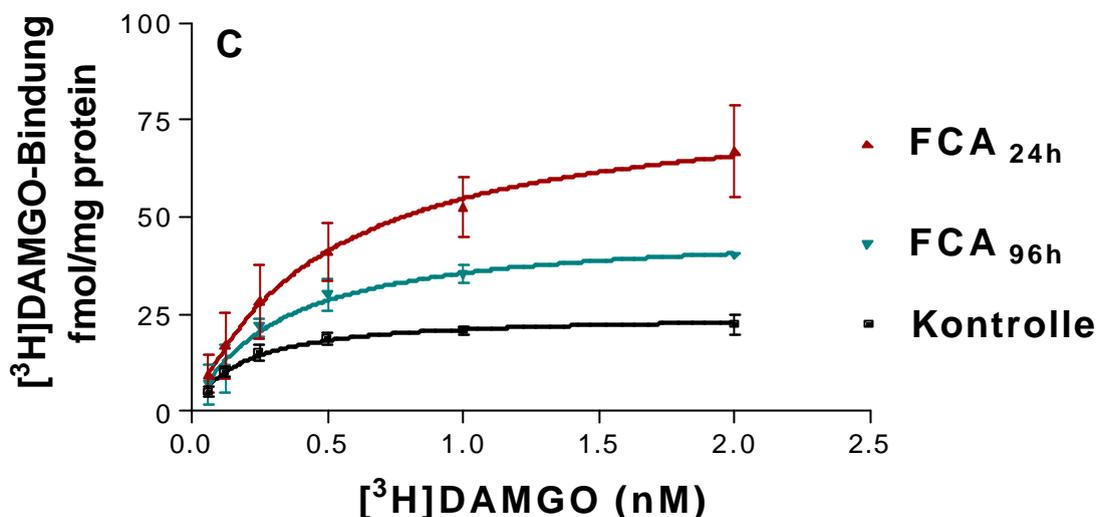


Abbildung 14. Einfluss einer lokalen Entzündung auf die [³H]DAMGO-spezifische Sättigungsbindung in Membranpräparationen aus dem Hypothalamus (A), dem lumbalen Rückenmark (B) und den lumbalen Spinalganglien(C) von Kontrolltieren, und Tieren mit Pfotenentzündung zu den Zeitpunkten 24h und 96h nach FCA-Inokulation. Die Membransuspensionen aus dem jeweils untersuchten Gewebe wurden mit [³H]DAMGO (4 - 0.03nM) in 50mM Tris-Puffer (pH 7,4) bei 24°C für 1 Stunde inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit (10 µM) Naloxon bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert ± SD von [³H]DAMGO-spezifischen Bindungsstellen aus sechs ermittelten Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente). In DRG, jedoch nicht in HT und RM kommt es zu einer signifikanten Zunahme an [³H]DAMGO-Bindungsstellen zu 24 und 96 Stunden nach FCA-Inokulation.

5.2.2. Bestimmung von [³H]DAMGO-Bindungsstellen in DRG nach einer Ligatur des N. ischiadicus unter entzündlichen Bedingungen

Um den Einfluss der FCA-Pfotenentzündung auf die Änderung der Anzahl der [³H]DAMGO-Bindungsstellen in DRG zu studieren, wurde der N. Ischiadicus der Ratte unmittelbar nach Inokulation der Pfote mit FCA ligiert. Zu den Zeitpunkten 24h und 96 Stunden nach FCA-Inokulation wurde die Anzahl der MOR-Bindungsstellen in DRG von FCA-behandelten Tieren mit und ohne Ligatur des N. ischiadicus bestimmt. Im Vergleich zu nicht-entzündeten Kontrolltieren zeigte sich eine signifikante Zunahme der Anzahl von MOR in DRG von FCA-behandelten Tieren ($P < 0,05$, Studentent-Test). Bei Tieren mit Ligatur des N. ischiadicus blieb diese signifikante Zunahme aus ($P > 0,05$, Studentent-Test), d.h. die durch FCA-induzierte Zunahme an MOR spezifischen Bindungsstellen in DRG konnte verhindert werden (Abb. 15). Zusätzlich führte die Immunneutralisation

durch i.pl. injiziertes anti-NGF-Antiserum (8 µg anti-NGF-Antiserum zu den Zeitpunkten 0 und 12 Stunden nach FCA-Inokulation) zu einer gleichen Aufhebung der Zunahme an [³H]DAMGO-Bindungsstellen in DRG 24 Stunden nach FCA-Inokulation ([³H]DAMGO-Bindungsstellen: DRG_{FCA24h}: 61,3 ± 4,1 fmol/mg vs. DRG_{Anti-NGF}: 30,3 ± 1,6 fmol/mg Protein P<0,05, Studentent t-test).

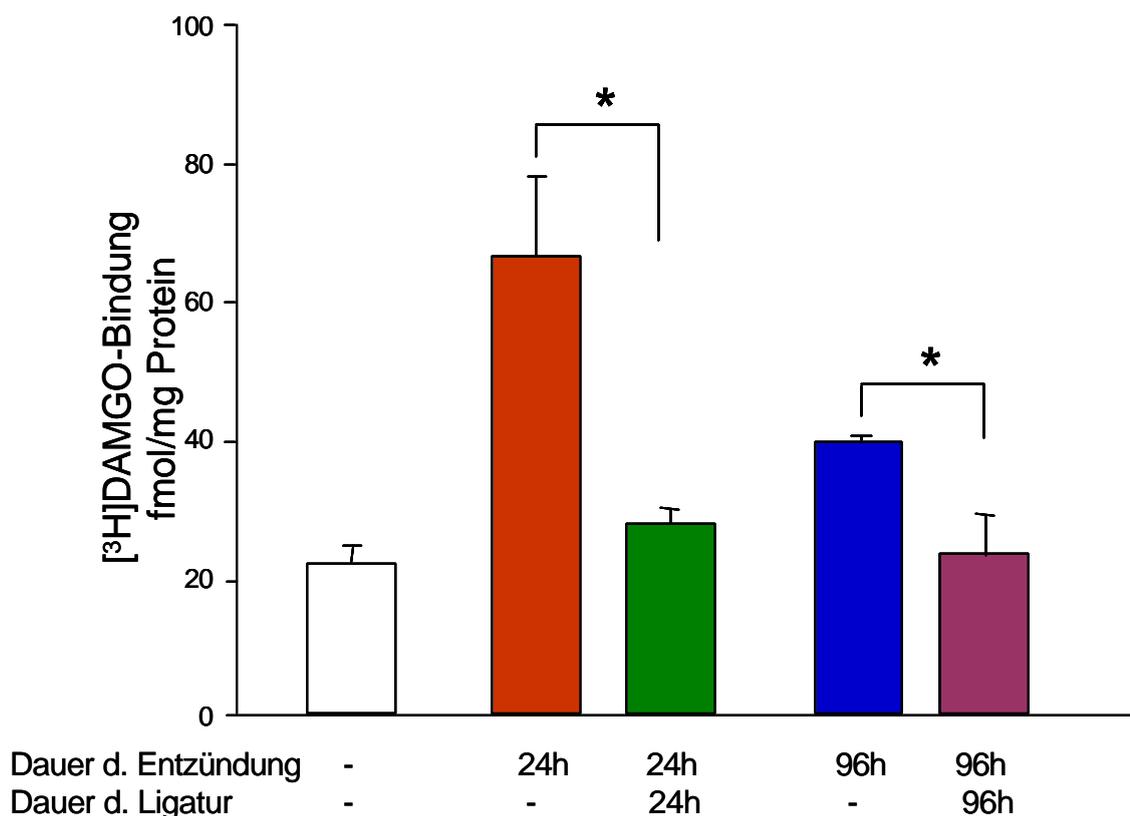


Abbildung 15. [³H]DAMGO-spezifische Sättigungsbindung in Membran-Präparationen aus lumbalen (L3-L5) Spinalganglien (DRG). Unmittelbar nach FCA-Inokulation wurde auf der Seite der Entzündung der N. ischiadicus ligiert. 24 und 96 Stunden nach FCA Entzündung bzw. Ligatur des N. ischiadicus wurden die (L3-L5) Spinalganglien entnommen, und in 50mM Tris-Puffer (pH 7,4) suspendiert. Die Membransuspension wurde mit (2nM) [³H]DAMGO in 50mM Tris-Puffer (pH 7,4) bei 24°C für 1 Stunde inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit (10 µM) Naloxon bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert ± SD von [³H]DAMGO-spezifischen Bindungsstellen aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente; *P<0,05, Studentent T-test). Eine gleichzeitige Ligatur des innervierenden N. ischiadicus verhinderte die FCA-induzierte Zunahme an [³H]DAMGO-Bindungsstellen.

5.2.3. Bestimmung von [³H]DAMGO-Bindungsstellen in Membranpräparationen des N. ischiadicus unter entzündlichen Bedingungen

Mittels [³H]DAMGO-Sättigungsexperimenten in Membranpräparationen des ligierten N. ischiadicus wurde der axonale Transport von Opioidrezeptoren aus den Spinalganglien zu den peripheren Nervenendigungen im Verlauf einer lokalen Entzündung untersucht. Eine Ligatur des N. ischiadicus wurde sowohl in unbehandelten Kontrolltieren als auch in Ratten unmittelbar nach FCA-Injektion sowie nach 4 bzw. 24 Stunden FCA-Entzündung vorgenommen. Die zeitversetzte Ligatur, d.h. 4 bzw. 24 Stunden nach FCA-Inokulation, führte zu einer signifikanten Zunahme an [³H]DAMGO-Bindungsstellen proximal der Ligatur des innervierenden N. ischiadicus (Abb.16). Die im Verhältnis zur FCA-Inokulation zeitgleiche Ligatur verhinderte diese Zunahme an [³H]DAMGO-Bindungsstellen proximal der Ligatur des innervierenden N. ischiadicus (Abb. 16). Zusätzlich führte die Immunneutralisation durch i.pl. injiziertes anti-NGF-Antiserum (8 µg anti-NGF-Antiserum zu den Zeitpunkten 0, 12 und 24 Stunden nach FCA-Inokulation) zu einer gleichen Aufhebung der Zunahme an [³H]DAMGO-Bindungsstellen proximal der Ligatur. (N. ischiadicus_{FCA48h}: 18,3 ± 1,7 fmol/mg vs. N. ischiadicus_{Anti-NGF}: 11,8 ± 1,5 fmol/mg Protein; *P<0,05, Studenten t-test).

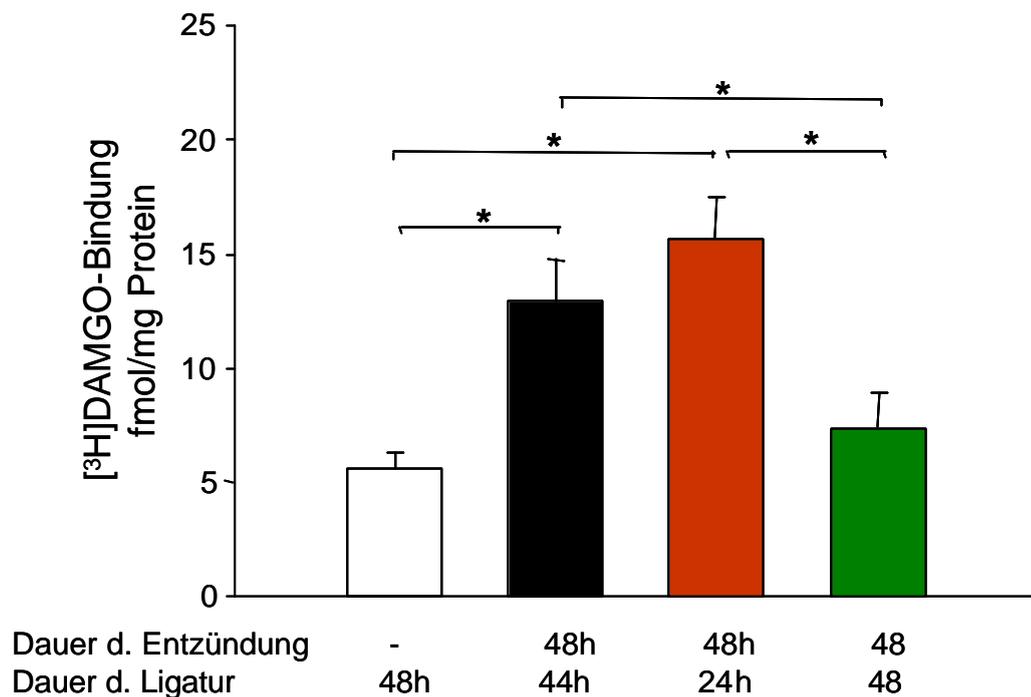


Abbildung 16. [³H]DAMGO-spezifische Bindungsstellen in Membran-Präparationen aus dem proximalen Anteil des ligierten N. ischiadicus von Kontroll- und FCA-behandelten. 48 Stunden nach FCA-Entzündung bzw. 24, 44 und 48 Stunden nach der Ligatur des N. ischiadicus wurde Tieren der proximale Teil des N. ischiadicus entnommen, und in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4) suspendiert. Die Membransuspensionen wurden mit (2 nM) [³H]DAMGO in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,4) bei 24°C für 1 Stunde inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde mit (10 µM) Naloxon bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert ± SD von [³H]DAMGO-spezifischen Bindungsstellen aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente; *P<0,05, Student t-Test). Die gleichzeitige, nicht jedoch die zeitversetzte Ligatur des innervierenden N. ischiadicus verhinderte eine vermehrte, durch FCA-induzierte Akkumulation von [³H]DAMGO-Bindungsstellen proximal der Ligatur.

5.3. Immunhistochemie

Bei unbehandelten Tieren wiesen vereinzelte DRG-Neurone MOR-spezifische Immunreaktivität (MOR-IR) auf ($17,2 \pm 0,9$ % aller DRG Neurone)(Abb. 17). Diese Neurone waren überwiegend von kleinem Durchmesser. Der mittlere Durchmesser MOR- positiver Neurone betrug $37,4 \pm 1,1$ µm (Range: 23 – 51 µm). Vier Tage nach FCA-Inokulation ließ sich eine deutliche Zunahme der MOR-spezifischen Immunoreaktivität in DRG Neuronen ipsilateral zur Pfotenentzündung nachweisen. Dies beruhte zum einen auf einer vermehrten Intensität MOR-spezifischer Anfärbung als auch auf einer Zunahme MOR-immunoreaktiver DRG Neurone (Abb. 17B). Nach

Entzündung waren $25 \pm 1,3\%$ aller DRG Neurone MOR-positiv ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Rang-Summen-Test). Dies bedeutet eine relative Zunahme um 45,3 %.

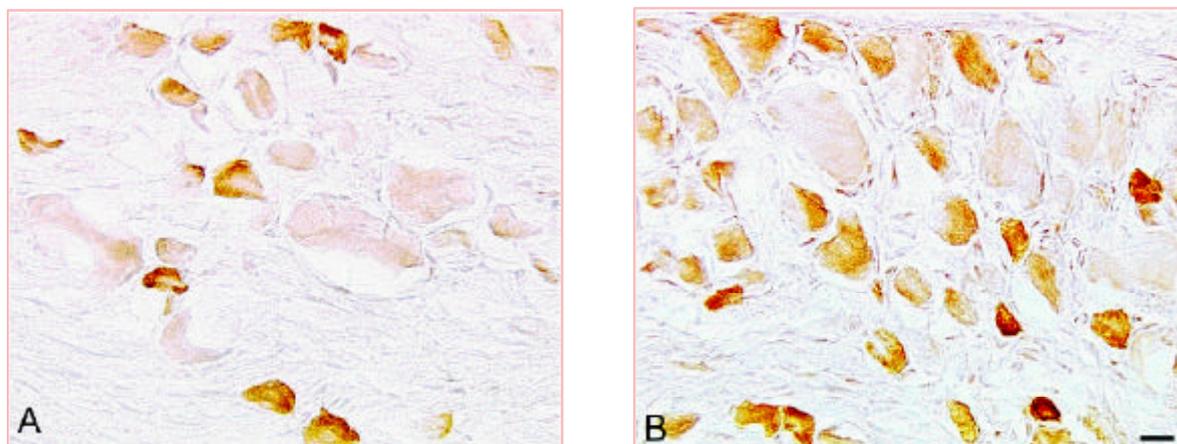


Abbildung 17. Immunhistochemische Anfärbung von MOR-immunoreaktiven Neuronen in sensorischen Spinalganglien. Mittels Antikörper gegen den μ -Opioidrezeptor (MOR) konnten MOR-immunoreaktive Neurone in sensorischen Spinalganglien von Tieren ohne (A) und mit (B) einer entzündeten Hinterpfote identifiziert werden. Bevorzugt die kleinzelligen Neurone der sensorischen Spinalganglien waren MOR-positiv. Eine FCA-induzierte Entzündung der Hinterpfote bewirkte eine Zunahme der Anzahl MOR positiver Neurone (B). (Skala= 20 μ m)

5.4. Bestimmung von (E_{max}) und (EC_{50}) der DAMGO-stimulierten [35 S]GTP γ S-Bindung

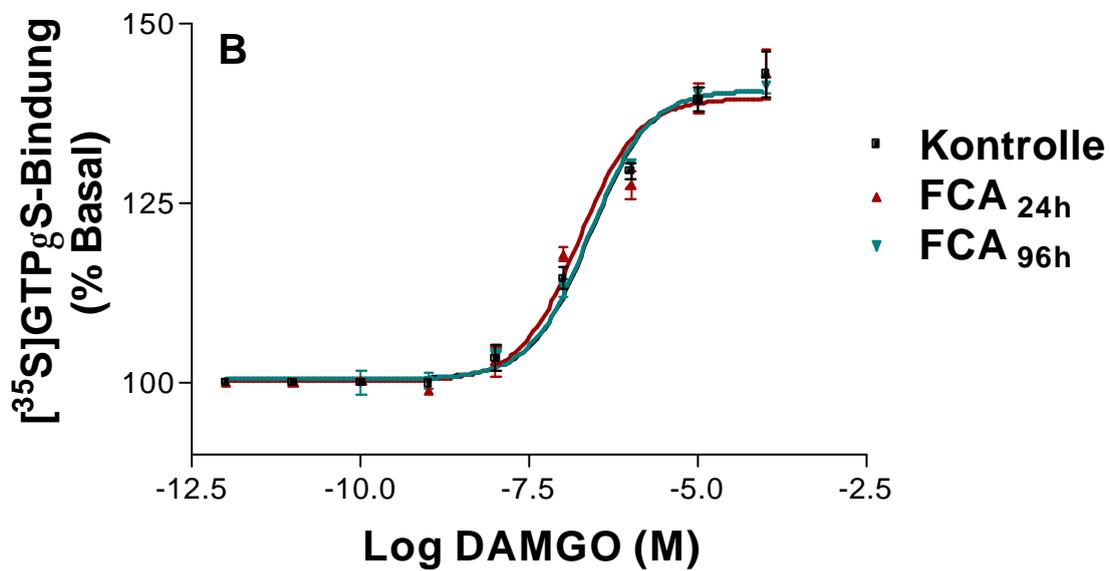
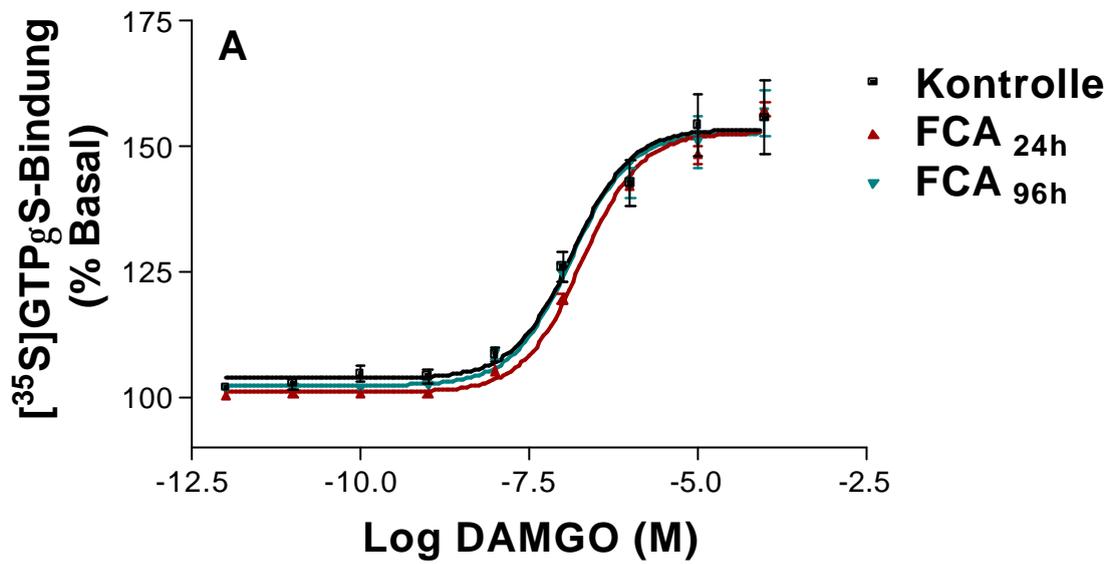
[35 S]GTP γ S-Assay wurde in HT, RM und (DRG) zu verschiedenen Zeitpunkten einer Pfotenentzündung durchgeführt, um den Effekt auf die G-Proteinkopplung von MOR zu untersuchen. Die basale [35 S]GTP γ S-Bindung, d.h. in Abwesenheit des MOR-Agonisten DAMGO, war im HT (1490 ± 95 fmol/mg Protein) und RM (961 ± 95 fmol/mg Protein) signifikant größer als im DRG (227 ± 19 fmol/mg Protein) ($P < 0,05$ Studenten t-Test). Die maximale Stimulation der G-Proteinkopplung nach Inkubation mit dem MOR-Liganden DAMGO ($10^{-5} - 10^{-12}$ M) war in Membranpräparaten von DRG signifikant niedriger als im HT oder RM [DRG $E_{max} = 121 \pm 2$ (%); RM $E_{max} = 141 \pm 2$ (%); HT $E_{max} = 154 \pm 2$ (%)].

Tabelle 3: Die maximalen Antworten (E_{max}) und effektiven Konzentrationen 50 (EC_{50}) für DAMGO-induzierte [35 S]GTP γ S-Bindung in Membranpräparationen von HT, RM und DRG von Kontrolltieren und Tieren mit einer FCA-Entzündung. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert \pm SD aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente).

	Kontrolle		FCA _{24h}		FCA _{96h}	
	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)	EC ₅₀ (nM)	E _{max} (%)
HT	131 \pm 21	154 \pm 6	196 \pm 17	153 \pm 8	133 \pm 9	152 \pm 4.5
RM	251 \pm 10	140 \pm 2.4	185 \pm 24	139 \pm 2.8	261 \pm 53	140 \pm 2
DRG	88 \pm 25	121 \pm 2	39 \pm 12	154 \pm 5 *	112 \pm 28	129 \pm 1.5 *

* $p < 0.05$; signifikant unterschiedlich zur Kontrolle

24 und 96h nach FCA-Entzündung konnte eine signifikante Zunahme der [35 S]GTP γ S-Bindung in DRG gezeigt werden ($p < 0,05$, ANOVA)(Abb. 18, Tab. 3). Diese Zunahme war auf die ipsilateralen DRG beschränkt und konnte nicht im HT und RM nachgewiesen werden.



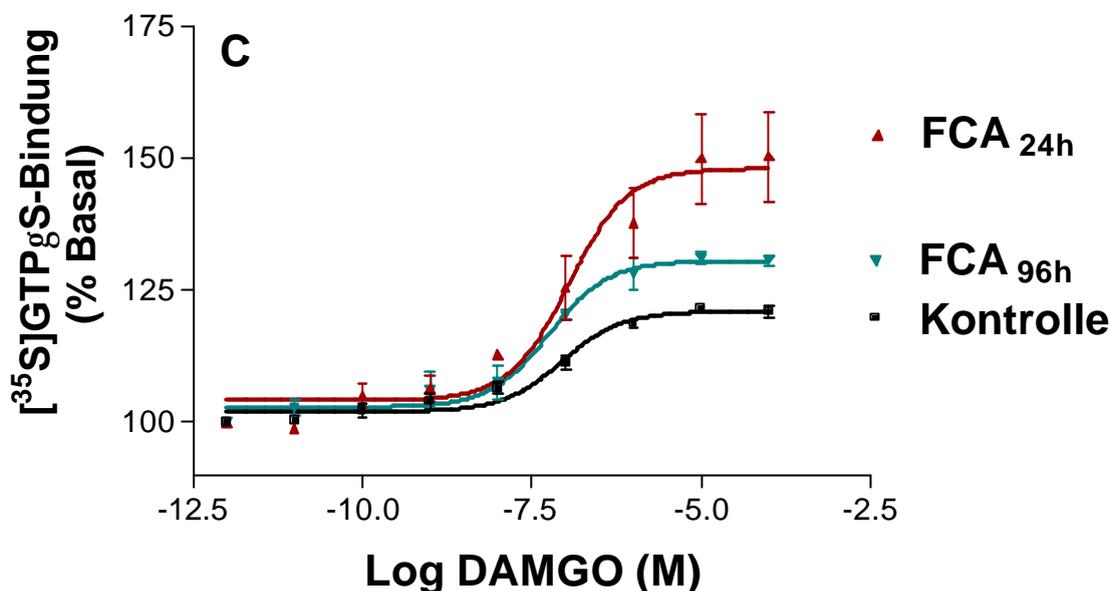


Abbildung 18. Einfluss einer lokalen Entzündung auf DAMGO-stimulierte [35 S] GTP γ S-Bindung in Membranpräparationen aus dem Hypothalamus (A), dem lumbalen Rückenmark (B) und den lumbalen (L3-L5) Spinalganglien (C) von Kontrolltieren, und Tieren mit Pfotenentzündung zu den Zeitpunkten 24 und 96 Stunden nach FCA-Inokulation. Die Membransuspensionen wurden mit (0.05nM) [35 S] GTP γ S in der Anwesenheit von 50 μ M GDP und verschiedenen Konzentrationen von DAMGO in einem Assay-Puffer (pH 7,4) für 2 Stunde bei 30°C inkubiert. Die nichtspezifische Bindung wurde mit (10 μ M) GTP γ S bestimmt, die basale Bindung wurde in der Abwesenheit von DAMGO ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert \pm SD aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente). Eine signifikante Zunahme der [35 S]GTP γ S-Bindung war unter Entzündungsbedingungen nur im DRG nachweisbar.

5.5. Bestimmung der Affinität (K_d G-Protein) und der maximalen Anzahl (B_{max} G-Protein) von G-Protein

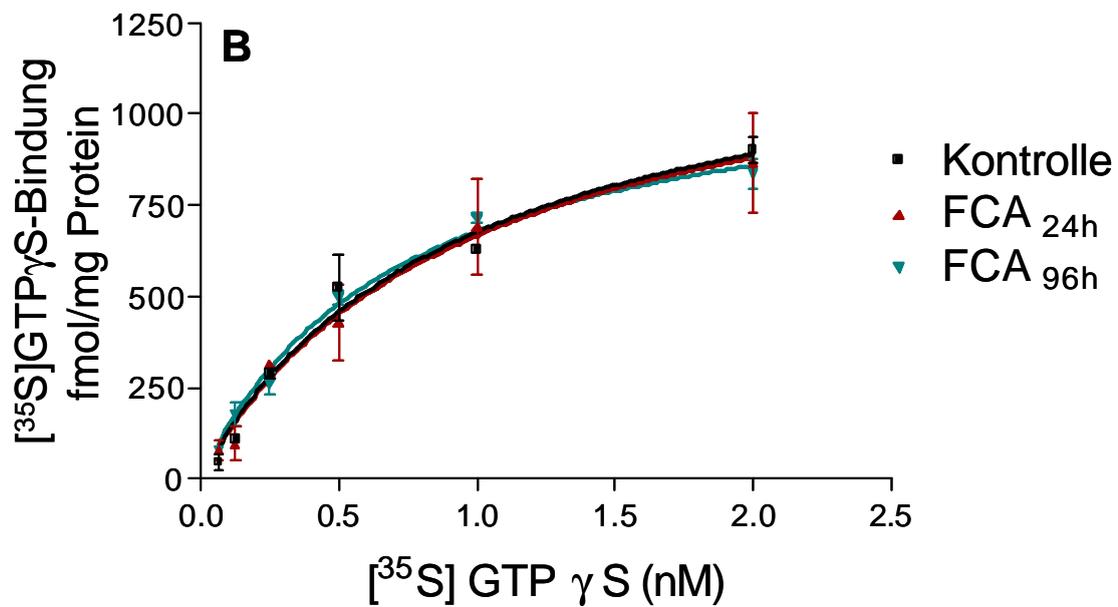
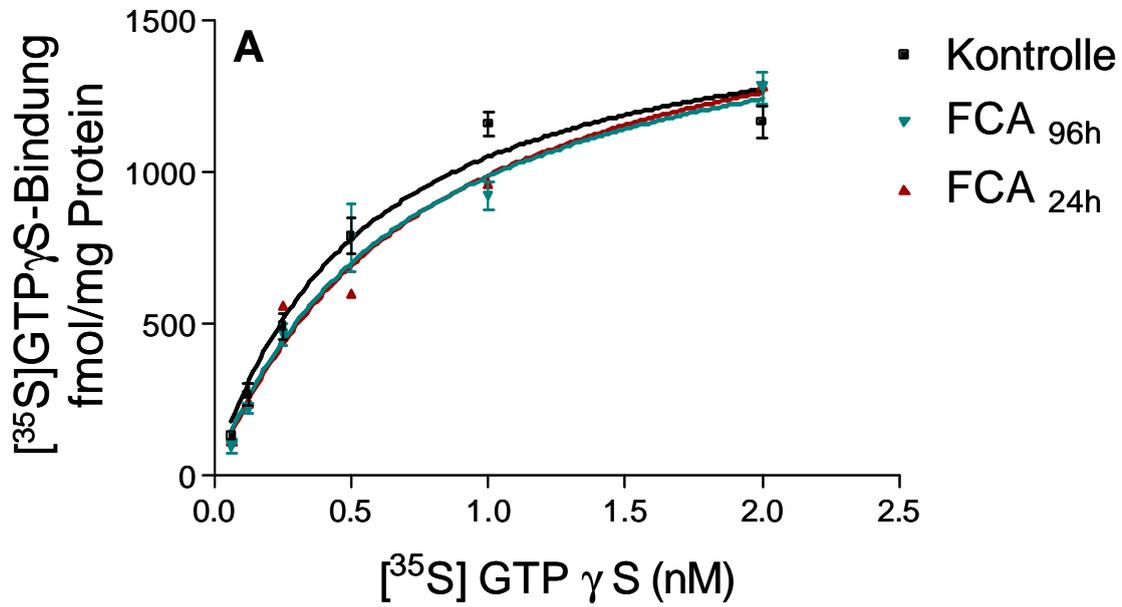
Durch Titration von GTP γ S (10^{-4} - 10^{-12} M), bei konstanten Konzentrationen von GDP (50 μ M) und DAMGO (10 μ M), konnte eine Sättigungskurve erstellt werden. Hierdurch wird die Affinität des G-Proteins (K_d G-Protein) zum Opioidrezeptor nach Stimulation mit einem MOR-Liganden und die maximale Anzahl an aktivierten G-Proteinen (B_{max} G-Protein) bestimmt. Wir konnten zeigen, dass sich die Affinität des G-Proteins zum MOR zwischen HT ($0,6 \pm 0,1$ nM), RM ($1,0 \pm 0,2$ nM) und DRG ($0,8 \pm 0,1$ nM), sowohl unter entzündlichen als auch nicht entzündlichen Bedingungen, nicht unterscheidet (Tab. 4).

Tabelle 4: Die maximale Anzahl ($B_{\max \text{ G-Protein}}$) und die Affinität ($K_d \text{ G-Protein}$) von G-Protein bei DAMGO induzierte [^{35}S]GTP γ S-Bindung in Membranpräparation von HT, RM und DRG von Kontrolltieren und Tieren mit einer FCA-Pfotenentzündung. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert \pm SD aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente).

	Kontrolle		FCA _{24h}		FCA _{96h}	
	$K_d \text{ G-Protein}$ (nM)	$B_{\max \text{ G-Protein}}$ (fmol/mg)	$K_d \text{ G-Protein}$ (nM)	$B_{\max \text{ G-Protein}}$ (fmol/mg)	$K_d \text{ G-Protein}$ (nM)	$B_{\max \text{ G-Protein}}$ (fmol/mg)
HT	0.6 \pm 0.1	1706 \pm 98	0.8 \pm 0.1	1649 \pm 96	0.9 \pm 0.2	1815 \pm 161
RM	1.0 \pm 0.2	1340 \pm 130	0.9 \pm 0.03	1291 \pm 192	0.7 \pm 0.08	1188 \pm 136
DRG	0.8 \pm 0.1	266 \pm 16.4	0.9 \pm 0.3	602 \pm 78 *	0.8 \pm 0.2	448 \pm 54 *

* $p < 0.05$; signifikant unterschiedlich zur Kontrolle

Im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigten die Tieren mit FCA-Entzündung in DRG-Membranpräparationen eine signifikante Zunahme der maximalen Anzahl des aktivierten GProteins (Kontrolle $B_{\max \text{ G-Protein}}$ 266 \pm 16,4 fmol/mg; FCA_{24h} 602 \pm 78 fmol/mg und FCA_{96h} 448 \pm 54 fmol/mg Protein $P < 0,05$, ANOVA on Ranks)(Tab. 4; Abb. 19 C). Im Gegensatz hierzu veränderte sich die Menge an aktiviertem GProtein in HT und RM unter Entzündungsbedingungen nicht. (siehe Tab. 4; Abb. A und B, $P > 0,05$, ANOVA on Ranks). Wie bei Selley et al. beschrieben, kann rein rechnerisch der relative Amplifikationsfaktor bestimmt werden. Hierbei wird das Verhältnis von aktiviertem G-Protein zur Anzahl der verfügbaren Opioidrezeptoren festgelegt (Selley et al., 1998). Die Amplifikationsfaktoren lagen für HT bei 3, für RM bei 13 und für das DRG bei 9. Da unter Entzündungsbedingungen im DRG sowohl die MOR als auch die Menge an aktiviertem G-Protein im gleichen Verhältnis zunahm, bleibt der Amplifikationsfaktor konstant.



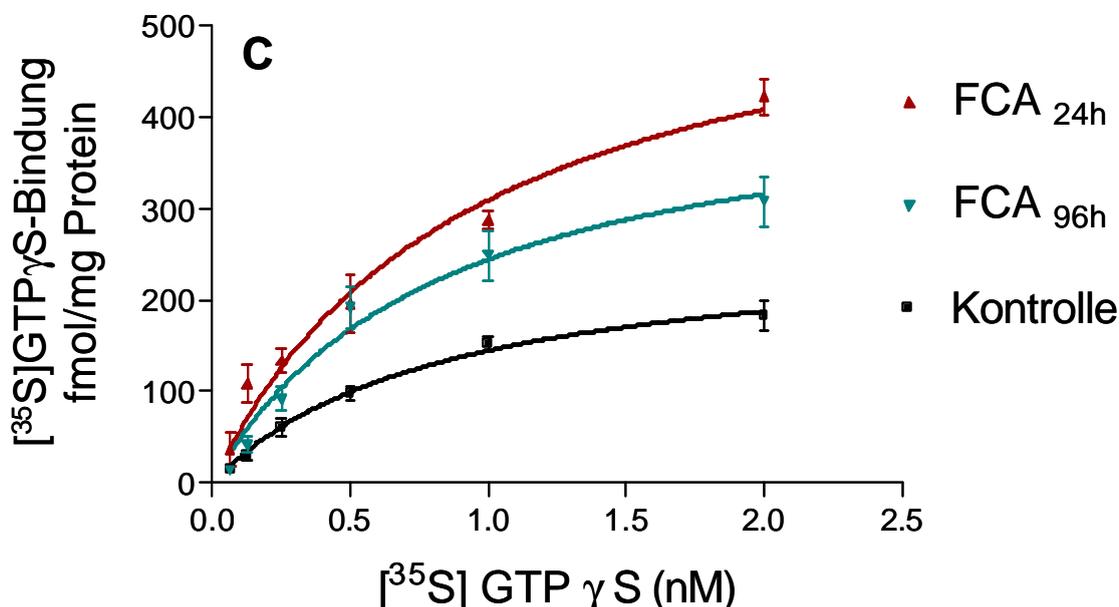


Abbildung 19. DAMGO-stimulierte [³⁵S]GTP_γS-Sättigungsbindung in Membranpreparationen aus dem Hypothalamus (A), dem lumbalen Rückenmark (B) und den lumbalen (L3-L5) Spinalganglien (C) von Kontrolltieren, und Tieren mit einer Pfotenentzündung zu den Zeitpunkten 24h und 96h nach FCA-Inokulation. Die Membransuspensionen wurden mit (2-0.03 nM) [³⁵S] GTP_γS in der Anwesenheit von 50 μM GDP und 10 μM DAMGO bzw. H₂O in einem Assay-Puffer (pH 7,4) für 2 Stunde bei 30°C inkubiert. Die nichtstimulierte [³⁵S]GTP_γS-Bindung wurde von der DAMGO-stimulierten [³⁵S] GTP_γS-Bindung zu jedem Datenpunkt abgezogen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert ± SD aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente). Die meisten G-Proteine konnten im HT aktiviert werden, gefolgt von RM und DRG. Unter Entzündungsbedingungen kommt es zeitabhängig zu einer signifikanten Zunahme der G-Protein Kopplung im DRG.

5.6. Vergleich der maximalen Antwort (E_{max}) und effektiven Konzentration 50 (EC_{50}) der [³⁵S]GTP_γS-Bindung des partiellen Opioidrezeptoragonisten Buprenorphin zum vollen Opioidrezeptor-agonisten DAMGO unter entzündlichen Bedingungen

Unsere Ergebnisse zeigten, dass der volle Agonist DAMGO eine signifikante Zunahme an E_{max} in DRG von Tieren mit 96 Stunden Pfotenentzündung im Vergleich zu den Kontrolltieren induzierten konnte (DRG_{Kontrolle} E_{max} $120 \pm 0,9$ %, DRG_{96h FCA} E_{max} $131 \pm 1,9$ %; $P < 0,05$, ANOVA)(Abb. 20 A). Die effektive Konzentration 50 (EC_{50}) von DAMGO änderte sich im Verlauf der Pfotenentzündung jedoch nicht signifikant

(DRG_{Kontrolle} EC₅₀ 56 ± 18 nM; DRG_{96h FCA} EC₅₀ 29 ± 12 nM, P > 0,05, ANOVA on Ranks). Die relative Zunahme an E_{max} betrug 148 % der DAMGO-induzierten Stimulation in DRG von Kontrolltieren (Abb. 20 A). Der partielle Agonist BUP konnte keine nachweisbare [³⁵S]GTPγS-Bindung in DRG von Kontrolltieren induzieren. Dies änderte sich unter Entzündungsbedingungen. Hier konnten wir durch BUP eine effektive [³⁵S]GTPγS-Bindung nachweisen (E_{max} 82 ± 1,4% ; EC₅₀ 1,6 ± 0,4 nM)(Abb. 20 B).

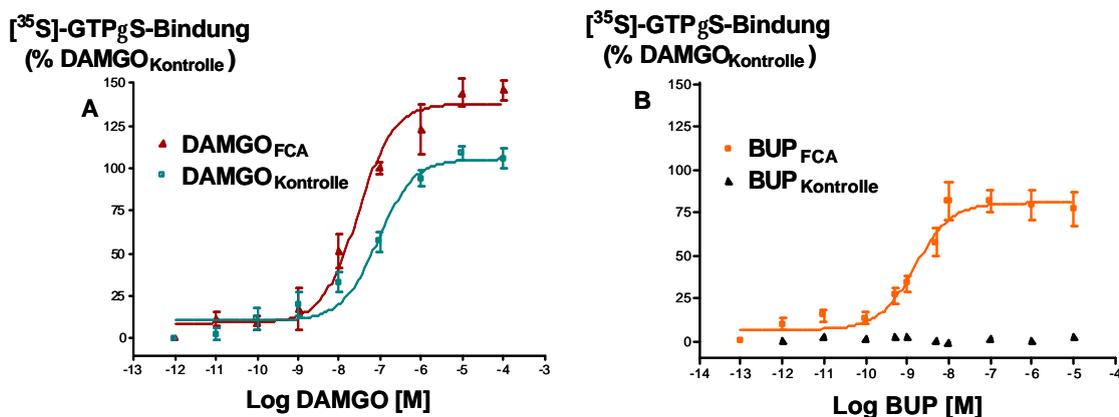


Abbildung 20. Einfluss einer lokalen Entzündung auf die DAMGO (A) oder BUP (B)-induzierte [³⁵S] GTPγS-Bindung an MOR in Membranpreparationen aus lumbalen (L3-L5) Spinalganglien (DRG) von Kontrolltieren und Tieren mit 96 Stunden FCA Pfotenentzündung. Die Membransuspensionen wurden mit (0.05 nM) [³⁵S] GTPγS in der Anwesenheit von 50 μM GDP und verschiedenen Konzentrationen von DAMGO bzw. BUP in einem Assay-Puffer (pH 7,4) für 2 Stunde bei 30°C inkubiert. Die nichtspezifische Bindung wurde mit (10 μM) GTPγS bestimmt, und die basale Bindung wurde in der Abwesenheit von DAMGO ermittelt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert ± SD aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente). [³⁵S] GTPγS-Bindung ist als Prozent der maximalen Stimulation von DAMGO (100%) in DRG von Kontrolltieren dargestellt. Unter Entzündungsbedingungen führt die DAMGO induzierte Stimulation zu einer signifikanten Zunahme der [³⁵S]GTPγS Bindung (A). Der partielle MOR Agonist BUP induzierte eine einer Zunahme der [³⁵S]GTPγS Bindung nur unter entzündlichen Bedingungen (B).

5.7. Affinität (K_D G-Protein) und maximale Anzahl (B_{\max} G-Protein) der BUP und DAMGO-stimulierten G-Protein Kopplung

Die Sättigungsanalyse der [35 S]GTP γ S-Bindungs-Experimente für BUP zeigte unter Entzündungsbedingungen eine K_D G-Protein von 1.8 nM und eine maximale Anzahl von G Protein Bindungsstellen (B_{\max} G-Protein) von 145 fmol/mg Protein. Unter nicht-entzündlichen Bedingungen konnte keine [35 S] GTP γ S Bindung detektiert werden. Verglichen mit den Ergebnissen der DAMGO-induzierten [35 S] GTP γ S Bindung unter Entzündungsbedingungen (s. Abschnitt 5.5) war die Menge an aktiviertem G-Protein signifikant geringer [145 (34%) vs. 425 (100%) fmol/mg Protein]. Dies spricht dafür, dass sich BUP im Vergleich zu DAMGO in unseren Untersuchungen wie ein partieller Agonist verhält.

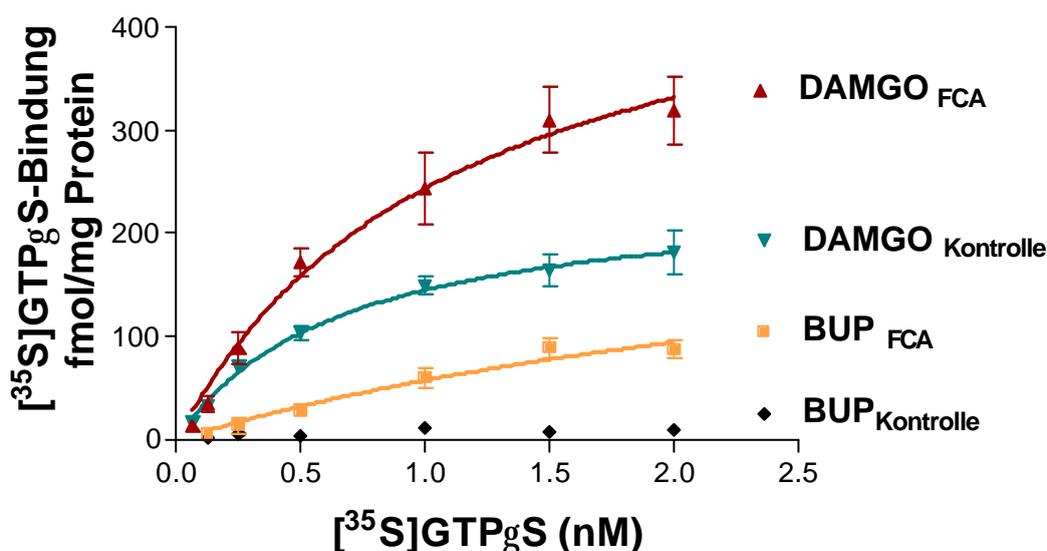


Abbildung 21. DAMGO bzw. BUP-stimulierte [35 S] GTP γ S-Sättigungsbindung in Membranpreparationen aus lumbalen (L3-L5) Spinalganglien von Kontrolltieren, und Tieren mit einer 96 Stunden FCA-Pfotenentzündung. Die Membransuspensionen wurden mit (2-0.03 nM) [35 S] GTP γ S in der Anwesenheit von 50 μ M GDP und DAMGO (10 μ M) bzw. H $_2$ O in einem Assay-Puffer (pH 7,4) für 2 Stunde bei 30°C inkubiert. Die nichtstimulierte [35 S]GTP γ S-Bindung wurde von der DAMGO-stimulierten [35 S] GTP γ S-Bindung zu jedem Datenpunkt abgezogen. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert \pm SD aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente). Die maximal stimulierte [35 S] GTP γ S Bindung (B_{\max} G-Protein) von BUP ist signifikant geringer als die von DAMGO (ANOVA) und war nur unter FCA-Entzündungsbedingungen detektierbar.

5.8. Bestimmung von K_i (Inhibitionskonstanten) von BUP im Vergleich zu DAMGO in DRG-Membransuspensionen

Mit Hilfe von [3 H]DAMGO Verdrängungsexperimenten in DRG wurde die Inhibitionskonstante K_i vom partialen Agonisten (BUP) im Vergleich zum vollen Agonisten (DAMGO) während der FCA-Entzündung bestimmt. Die Inhibitionskonstante K_i von DAMGO und BUP ergab keine signifikanten Unterschiede in DRG von Tieren mit und ohne Entzündung (DRG von Tieren ohne Entzündung: K_i DAMGO, $5 \pm 0,4$ nM, K_i BUP, $0,18 \pm 0,01$ nM; DRG von Tieren mit Entzündung: K_i DAMGO, $8 \pm 1,4$ nM, K_i BUP, $0,17 \pm 0,02$ nM) (Mann-Whitney U-Test $P_{\text{DAMGO/BUP}} > 0,05$) (Abb. 22).

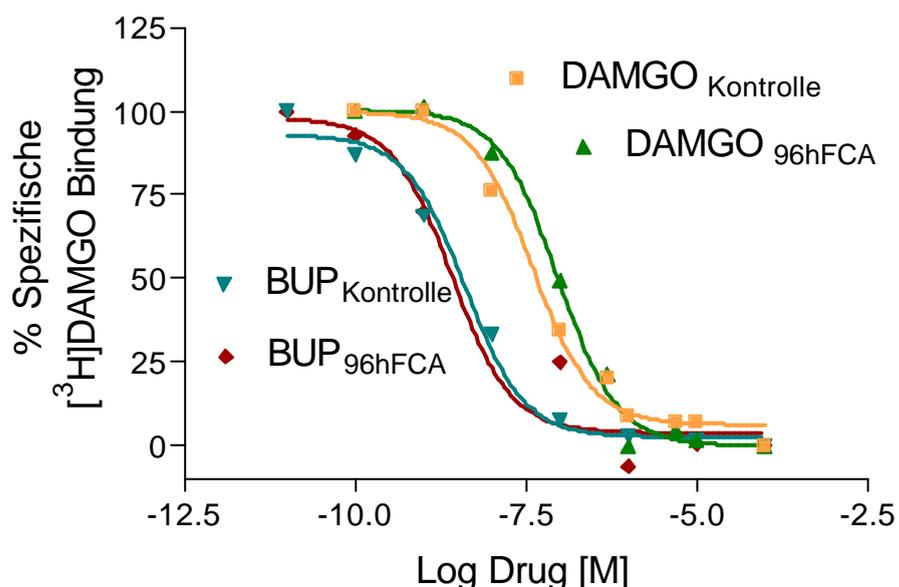


Abbildung 22. Einfluss einer lokalen Entzündung auf [3 H]DAMGO-Inhibitionsexperimente in Membranpräparationen aus lumbalen (L3-L5) Spinalganglien (DRG) von Kontrolltieren, und Tieren mit einer 96 Stunden FCA-Pfotenentzündung Die Membransuspensionen ($50\mu\text{g}$ Protein) wurden mit 2 nM [3 H]DAMGO in 50mM Tris-Puffer (pH 7,4) eingesetzt, und durch 10^{-11} - 10^{-4} M nicht-radioaktivmarkierten DAMGO (Agonist), bzw. Buprenorphin (Partialagonist) für eine Stunde bei 24°C verdrängt. Die nicht-spezifische Bindung wurde mit ($10\mu\text{M}$) Naloxon bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den errechneten Mittelwert \pm SD aus sechs Messpunkten (jeweils eine Doppelbestimmung dreier separater Experimente). BUP hat eine signifikant niedrigere IC_{50} als DAMGO. Die IC_{50} verändert sich weder für BUP noch für DAMGO unter FCA-Entzündungsbedingungen.

5.9. In-vivo Untersuchungen der analgetischen Wirksamkeit von i.pl. appliziertem BUP bei Kontrolltieren und Tieren mit FCA-induzierter Entzündung.

Um die funktionelle Bedeutung der bisherigen Ergebnisse in-vivo zu untersuchen, verabreichten wir Kontrolltieren und Tieren mit FCA-induzierter Entzündung BUP i.pl. Bis zu einer Konzentration von 5 µg BUP i.pl. wurden keine signifikanten Änderungen in den Pfortendruckschwellenwerten (PPT) ($p > 0,05$) (Abb.23.A) nachgewiesen. Die Injektion höherer BUP-Dosierungen erhöhte die Pfortendruckschwelle (Paw Pressure Threshold PPT) sowohl in der ipsi-, als in der kontralateralen Pfote von Ratten mit FCA-Entzündung (PPT ipsi: $100 \pm 1,6$ g; PPT contra: $98 \pm 0,8$ g). Dies läßt auf einen systemischen (zentralen) Wirkeffekt schließen. Die Applikation von BUP in entzündete Pfoten führte zu einer signifikanten Erhöhung des PPT in Dosierungen unterhalb der systemische wirksamen Dosis von BUP ($p < 0,05$) (Abb.23.A). Keine PPT Veränderungen ließen sich in den kontralateralen, nicht-entzündeten Pfoten (PPT der kontralateralen Seite $62 \pm 0,5$ g; $p > 0,05$) nachweisen, was auf einen lokal auf die entzündete Pfote begrenzten Wirkmechanismus hinweist. Diese PPT-Erhöhung in den entzündeten Pfoten steigt dosisabhängig an. Die PPT-Erhöhung zeigte ein Maximum bei 5 µg BUP und 30 min nach i.pl. Injektion und hielt bis zu 2 Stunden an. (Abb.23.A).

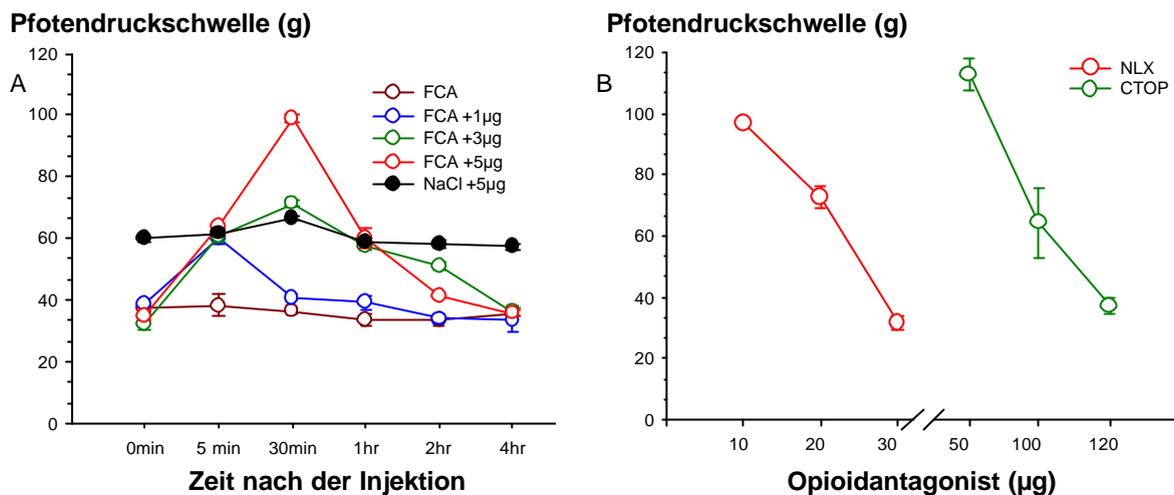


Abbildung 23. Dosis-Wirkungsbeziehung und Antagonismus analgetischer Wirkungen i.pl. Buprenorphins in der entzündeten Rattenpfote.

Die lokale Entzündung einer Hinterpfote von Wistar-Ratten ($n=6-8$ pro Gruppe) wurde durch die i.pl. Inokulation mit FCA hervorgerufen. Am vierten Tag der FCA-Entzündung bewirkte die i.pl. Injektion von 5 µg BUP in der entzündeten (offene Symbole), nicht jedoch in der nicht-entzündeten Hinterpfote (geschlossene Symbole) eine signifikante Erhöhung der Pfortendruckschwelle ($P<0,05$; ANOVA; linke Grafik). Dieser analgetische Effekt nahm dosisabhängig zu ($P<0,05$; lineare Regressions-ANOVA; linke Grafik) und war durch i.pl. Naloxon bzw. CTOP antagonisierbar ($P<0,05$; lineare Regressions-ANOVA; rechte Grafik).

Die PPT-Erhöhung nach BUP-Injektion in die entzündeten Pfoten (5µg nach 30min) ließ sich dosisabhängig durch die i.pl. Gabe verschiedener MOR-Antagonisten (Naloxon 30µg, $p<0,05$) und CTOP (120µg, $P < 0,05$) (Abb.23.B) spezifisch antagonisieren.