

1. EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG

1.1. Schmerz und Schmerzhemmung in entzündetem Gewebe

Neben Schwellung, Rötung und Erwärmung zählt der Schmerz zu den klassischen Parametern einer Entzündung. Schmerz wird definiert als „eine unangenehme sensorische oder emotionale Empfindung, die mit einem tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschaden einhergeht“ (Definition der International Association for the Study of Pain; IASP). Schmerz kann nach dieser Definition beim Menschen, nicht aber im Tiermodell gemessen werden. Neben Schmerz kommt es in Entzündungen aber auch zu einer Hyperalgesie, also „einer verstärkten Antwort auf einen Stimulus, der normalerweise schmerzhaft ist“ (Definition der IASP). Im Gegensatz zum Schmerz lässt sich Hyperalgesie auch in Tiermodellen erfassen. Obwohl die Unterscheidung von „Schmerz“ und „Hyperalgesie“ wichtig ist, soll im Folgenden wegen der besseren Verständlichkeit auch im Tiermodell von Schmerz anstelle von Hyperalgesie gesprochen werden. Verschiedene Tiermodelle sind zur Untersuchung von Entzündungsschmerz etabliert worden; eines von diesen ist die unilaterale Injektion von komplettem Freundschem Adjuvanz (CFA) in die Hinterpfote von Ratten. Das CFA-Modell bietet mehrere Vorteile: Die Entzündung hält mehrere Tage an, ist auf eine Pfote beschränkt und verursacht keine systemische Entzündungsreaktion. Schmerzschwellen lassen sich im Tiermodell quantifizieren: Bei der modifizierten Randall-Selitto Methode wird lokal Druck ausgeübt und derjenige Druck bestimmt, bei dem das Tier die Pfote wegzieht („paw pressure threshold“) (**Abbildung 1**) (1). Mit der Methode nach Hargreaves lassen sich thermische nozizeptive Schwellen erfassen (2): Ein hitzeinduzierender Laserstrahl wird auf die Pfote gerichtet, und die Zeit bis zum Zurückziehen wird bestimmt („paw withdrawal latency“).

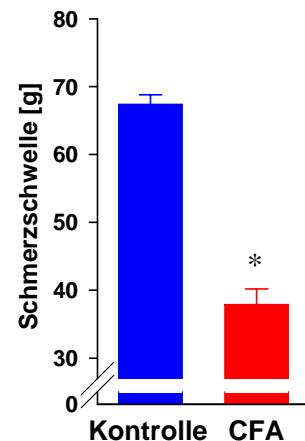


Abbildung 1: Schmerzmessung im Entzündungsmodell

Im Modell einer lokalen Entzündung (CFA = komplettes Freundsches Adjuvanz) ist die Pfotendruckschwelle auf der entzündeten Seite (= rot) niedriger als auf der nicht entzündeten (= blau) (3).

Die Intensität von Entzündungsschmerz wird durch schmerzverstärkende und -hemmende Mediatoren bestimmt (4,5). In tierexperimentellen Studien wird Schmerzhemmung als „Antinozizeption“ oder „Anti-Hyperalgesie“ bezeichnet. Wegen ihrer Allgemeinverständlichkeit werden in dieser Habilitationsschrift jedoch die Bezeichnungen „Schmerz“ und „Schmerzhemmung“ verwendet. Schmerzverstärkende, aber auch -hemmende Mediatorsysteme sind im entzündeten Gewebe und auf allen Ebenen des zentralen Nervensystems wirksam. Periphere Schmerzhemmung lässt sich durch eine Vielzahl von Medikamenten wie beispielsweise NSAID („non steroidal antiinflammatory drugs“), Lokalanästhetika, Cannabinoide und Opioide erzielen (Übersicht in (6)). In dieser Habilitationsschrift wird eine lokale Schmerzhemmung durch Opioide als ein wesentlicher Mechanismus näher untersucht.

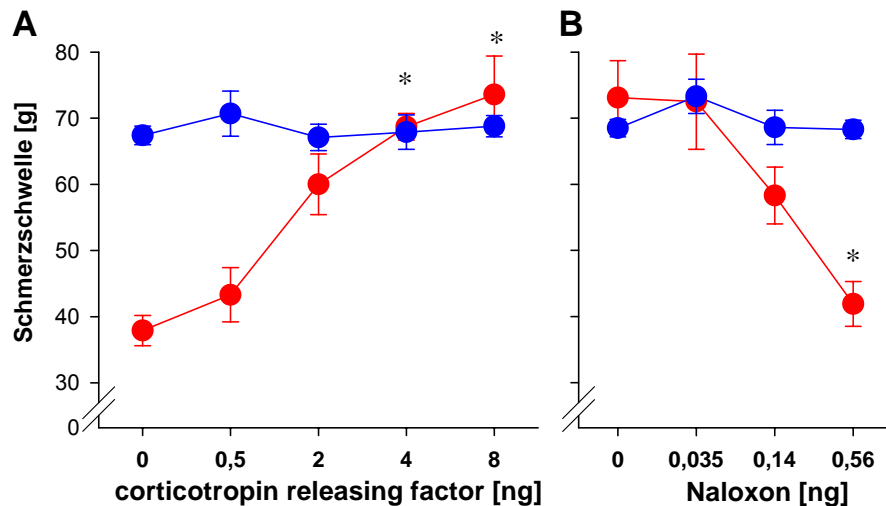
1.2. Lokale Schmerzhemmung durch Opioide und Opioidpeptide

Im Tiermodell lässt sich Entzündungsschmerz durch die lokale Gabe von Opioiden in systemisch unwirksamer Dosierung aufheben (1,7). Auch bei Patienten mit akuten und chronischen Schmerzen wirkt eine lokale Opioidinjektion schmerzhemmend (8-15).

Nicht nur injizierte Opioide wirken analgetisch. Auch der Organismus nutzt diesen Mechanismus zur körpereigenen Schmerzhemmung: Im Entzündungsmodell steigen die Schmerzschwellen unter Stressbedingungen (z. B. Schwimmen in kaltem Wasser (1,16)) oder nach lokaler Injektion verschiedener Mediatoren signifikant an (u. a. corticotropin releasing factor, **Abbildung 2** nächste Seite; (16-19)). Diese Schmerzhemmung lässt sich durch lokale Gabe von Opioidrezeptorantagonisten in systemisch unwirksamer Dosierung blockieren (1,16-18,20). Auch bei Patienten nehmen postoperative Schmerzen und Analgetikabedarf nach Arthroskopien signifikant zu, wenn lokal Naloxon in geringer Menge injiziert wird (21).

Abbildung 2: Periphere opioidvermittelte Schmerzhemmung

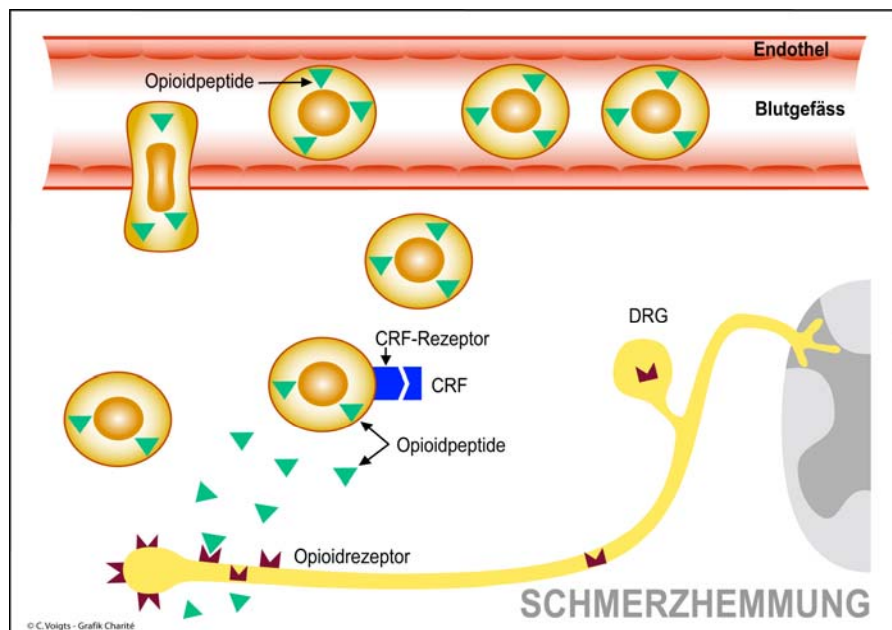
Im Entzündungsmodell (komplettes Freundesches Adjuvanz =CFA) führt die lokale Injektion von CRF (= „corticotropin releasing factor“) zum Anstieg der Schmerzschwellen in der entzündeten (rot), nicht aber in der nicht entzündeten Pfote (blau; [A]). Diese Schmerzhemmung lässt sich Naloxon, einen Opioidrezeptorantagonisten, lokal blockieren [B] (* $p < 0.05$) (3).



Körpereigene Liganden von Opioidrezeptoren sind Opioidpeptide wie β -Endorphin, Enkephaline, Dynorphin und Endomorphine. Im entzündeten Gewebe lassen sich Opioidpeptide in verschiedenen Leukozytenpopulationen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten (T-Zellen) nachweisen (22-24). Zudem exprimieren Leukozyten mehrere Rezeptoren (u. a. für CRF und Katecholamine), deren Aktivierung eine Freisetzung von Opioidpeptiden aus Leukozyten und eine periphere Schmerzhemmung bewirkt (19,25-27). Hieraus ergibt sich ein Modell einer körpereigenen opioidvermittelten Schmerzhemmung im entzündeten Gewebe (**Abbildung 3**).

Abbildung 3 Modell einer peripheren Schmerzhemmung durch Opioidpeptide

Opioidhaltige Leukozyten wandern aus dem zirkulierenden Blut in entzündetes Gewebe. Im Gewebe setzen Leukozyten Opioidpeptide frei, die an Opioidrezeptoren auf peripheren sensorischen Neuronen binden und eine periphere Schmerzhemmung erzeugen. Eine Freisetzung von Opioidpeptiden erfolgt durch Stress oder durch lokale Injektion von Mediatoren wie CRF („corticotropin releasing factor“; DRG = Hinterwurzelganglion, „dorsal root ganglion“).



Untersuchungen an immunsupprimierten Tieren weisen auf die Bedeutung von Leukozyten für eine periphere Schmerzhemmung hin. Im entzündeten Gewebe sind die basalen Schmerzschwellen nach Gabe von Cyclosporin A bzw. nach Radiatio unverändert, während eine periphere Schmerzhemmung durch Opioidpeptide nicht mehr nachweisbar ist (17,20,22, 28). Allerdings erlauben diese Studien keinen Rückschluss auf die Rolle spezifischer Leukozytenpopulationen. In entzündetem Gewebe sind in den ersten Tagen vor allem Granulozyten und Monozyten/Makrophagen nachweisbar (29,30), während Zellen der spezifischen Immunität (T- und B-Zellen) erst im späteren Entzündungsverlauf zunehmen. Als **Hypothese A** dieser Habilitationsschrift wird daher postuliert, dass opioidhaltige Granulozyten und Monozyten/Makrophagen wesentlich zu einer peripheren Schmerzhemmung im Entzündungsmodell beitragen.

1.3. Adhäsionsmoleküle und Chemokine in der Leukozytenrekrutierung

Da opioidhaltige Leukozyten für eine periphere, opioidvermittelte Schmerzhemmung wichtig sind, stellt sich die Frage nach den molekularen Mechanismen ihrer Einwanderung. Grundsätzlich wird die Leukozytenrekrutierung durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine reguliert. Adhäsionsmoleküle und ihre dazu passenden Liganden werden auf Endothelzellen von Blutgefäßen bzw. als Teil der Oberflächenstruktur von zirkulierenden Leukozyten exprimiert. Unter Entzündungsbedingungen wird die Expression gesteigert (31,32). Die Migration von Leukozyten aus der Blutzirkulation ins entzündete Gewebe erfolgt in mehreren Schritten (31,32): Selektine (z. B. CD62L) vermitteln den initialen, kurzen Kontakt zwischen Leukozyten und Gefäßendothel („tethering“) sowie das Rollen der Leukozyten („rolling“). Integrine (z. B. $\alpha 4\beta 1$ (CD49d/CD29), $\beta 2$ (CD18)) und ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1 (CD54)) erzeugen die anschließende feste Adhärenz („firm adhesion“) der Leukozyten. Die Migration durch das Endothel („diapedesis“) wird u. a. durch PECAM gesteuert (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31)).

Neben den Adhäsionsmolekülen spielen Chemokine eine wesentliche Rolle in der Leukozyteneinwanderung (33). Chemokine werden im entzündeten Gewebe produziert und erzeugen so einen Gradienten vom Gewebe zum Gefäßendothel (34). Zirkulierende Leukozyten mit passenden Chemokinrezeptoren wandern daraufhin gezielt in das entzündete Gewebe (Chemotaxis). Die WHO-Klassifikation der Chemokine erfolgt anhand der Chemokinrezeptoren (35). Die Rekrutierung von Granulozyten wird beim Menschen vor allem von zwei Rezeptoren - CXCR1 und CXCR2 - beeinflusst (33). Im Gegensatz dazu verfügen Granulozyten von Mäusen und Ratten nur über einen der beiden Rezeptoren (CXCR2) (36). Studien an CXCR2 defizienten Mäusen zeigen, dass die Einwanderung von Granulozyten in entzündetes Gewebe nahezu aufgehoben ist (37-39). Die Nomenklatur der Liganden erfolgt in Analogie zu den Rezeptoren. Der wichtigste Ligand der humanen Rezeptoren CXCR1 und 2 heißt CXCL8 (früher Interleukin-8). In Ratten binden vier Chemokine an CXCR2 (CXCR2 Liganden) (40): CXCL1, CXCL2/3, CXCL5 und CINC-2 (cytokine induced chemokine) (38,41-43). Obwohl die Nomenklatur der WHO nur für Chemokine und -rezeptoren von Menschen und Mäusen etabliert wurde (35), wird sie vielfach auf Ratten übertragen. CINC-2 ist eine Ausnahme, da dieses Chemokin keine Homologie zu Chemokinen von Mensch oder Maus aufweist und daher weiterhin unter seinen ursprünglichen Namen verwendet wird.

Ausgehend von den molekularen Mechanismen einer Leukozytenrekrutierung wird als **Hypothese B** postuliert, dass Adhäsionsmoleküle und CXCR2-Liganden die Einwanderung opioidhaltiger Immunzellen regulieren und eine periphere Schmerzhemmung beeinflussen.

1.4. Opioidpeptide und Opioidrezeptoren in der Schmerzhemmung

Die Bindung von Opioidpeptiden an Opioidrezeptoren auf peripheren Nervenendigungen ermöglicht eine periphere Schmerzhemmung. Die Intensität einer solchen Schmerzhemmung wird sowohl durch Opioidpeptide als auch durch Opioidrezeptoren beeinflusst. So ist die lokale Opioidinjektion im Entzündungsmodell in der frühen Entzündung weniger wirksam als in der späten Entzündung (1-12 h bzw. 96 h nach CFA-Gabe) (44). Ungeklärt ist jedoch, ob auch eine körpereigene, periphere Schmerzhemmung in der frühen Entzündung geringer ausgeprägt ist und ob diese durch die Anzahl opioidhaltiger Leukozyten oder durch die Expression von Opioidrezeptoren begrenzt wird. In vielen Entzündungsmodellen nimmt die Anzahl der Leukozyten in den ersten Tagen kontinuierlich zu (30,45). Da verschiedene Leukozytenpopulationen Opioidpeptide enthalten, sollte die Anzahl opioidhaltiger Leukozyten im Entzündungsverlauf ebenfalls ansteigen. Als **Hypothese C** wird daher postuliert, dass die Intensität einer peripheren Schmerzhemmung in der frühen Entzündung durch eine vermehrte Einwanderung opioidhaltiger Leukozyten gesteigert werden kann.

Opioidrezeptoren (μ = MOR, δ = DOR und κ = KOR) werden im Hinterwurzelganglion (= DRG) synthetisiert, anterograd transportiert und auf peripheren sensorischen Nervenendigungen exprimiert (siehe Abbildung 3). Unter Entzündungsbedingungen kommt es nicht nur zu einer Einwanderung opioidhaltiger Leukozyten in das Gewebe, sondern auch zu einer Steigerung von Synthese, axonalem Transport und peripherer Expression von Opioidrezeptoren (46-49). Im Gegensatz zu diesen Daten der Proteinexpression liegen wider-

sprüchliche Ergebnisse zur transkriptionellen Regulation von Opioidrezeptoren im DRG vor (44,50,51). Die Menge an Opioidrezeptortranskripten kann die Anzahl von Opioidrezeptoren im entzündeten Gewebe und damit die Intensität einer peripheren Schmerzhemmung beeinflussen. Deshalb wird die Transkription als Teilaspekt der Hypothese C im Entzündungsverlauf quantifiziert.

1.5. Leukozyten und Schmerzentstehung

In dieser Habilitationsschrift wird postuliert, dass Leukozyten Opioidpeptide freisetzen und dadurch Entzündungsschmerz hemmen (Hypothese A). Diese Hypothese steht im Gegensatz zur weit verbreiteten Ansicht, dass Granulozyten und andere Leukozyten vor allem schmerzverstärkend wirken. So treten Entzündungsparameter (Überwärmung und Schwellung) und Rekrutierung von Leukozyten häufig parallel zum Entzündungsschmerz auf. Zahlreiche pronozizeptive Mediatoren entstehen in Leukozyten (z.B. proinflammatorische Zytokine wie IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Protonen, Prostaglandine wie PGE₂; Übersicht in (4,5)). Diese schmerzverstärkenden Mediatoren werden allerdings auch von gewebeständigen Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, Mastzellen und Makrophagen synthetisiert (45,52). Bisherige Studien lieferten widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich eines kausalen Zusammenhanges von Hyperalgesie und Granulozyteneinwanderung (53-57). Zwei unterschiedliche Aspekte sind dabei von Bedeutung: Zum einen die Rolle der Granulozyten in einem Entzündungsmodell (dieser Aspekt wird in Hypothese A durch eine systemische Granulozytendepletion untersucht). Zum anderen stellt sich die Frage (**Hypothese D**), ob die selektive Einwanderung von Granulozyten in nicht entzündetes Gewebe Schmerz erzeugt.

1.6. Molekulare Mechanismen der Freisetzung von Opioidpeptiden

Eine periphere Schmerzhemmung durch Opioidpeptide setzt deren Freisetzung aus Leukozyten im Gewebe voraus. Bisherige *in vitro* Studien untersuchten die Opioidpeptidfreisetzung entweder an humanen Granulozyten (58) oder an Zellsuspensionen aus Lymphknoten von Ratten (17,59-61). Als Stimulatoren einer Freisetzung wurden Formylpeptide (58), Hormone (CRF) (17,59,60), Zytokine (IL-1 β) (17) und Katecholamine (61) eingesetzt. Alle bisher untersuchten Stimulatoren sind allerdings nicht spezifisch für eine bestimmte Leukozytenpopulation. Auch liegen keine detaillierten Studien zur intrazellulären Signaltransduktion einer Opioidpeptidfreisetzung vor.

In der Hypothese B wird die Rolle von CXCR2 Liganden in der Rekrutierung opioidhaltiger Granulozyten und ihre Bedeutung für eine periphere Schmerzhemmung untersucht. Neben ihrer chemotaktischen Wirkung führen CXCR1/2 Liganden auch zur Freisetzung von Granula aus Granulozyten (62,63). CXCR1/2 sind Gi-Protein gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung die G-Proteine in die Untereinheiten G α und G $\beta\gamma$ spaltet (33). G $\beta\gamma$ aktiviert Phospholipase C und diese katalysiert die Umwandlung von Phosphoinositoldiphosphat in Inositol-1,4,5 triphosphat (IP₃) (64,65). IP₃ bindet an Rezeptoren auf dem endoplasmatischen Retikulum und erzeugt eine intrazelluläre Kalziumfreisetzung (65). Außerdem aktiviert G $\beta\gamma$ die Phosphoinositol-3-Kinase (PI₃Kinase) (66) (graphische Darstellung siehe Abbildung 5, Seite 11). Beide Signaltransduktionswege sind an der Freisetzung von Granula aus Granulozyten beteiligt (62,63) und Opioidpeptide sind in Granula von Granulozyten enthalten (67). Als **Hypothese E** wird postuliert, dass CXCR1/2 Liganden die oben genannten Signaltransduktionswege aktivieren, hierdurch eine Freisetzung von Opioidpeptiden aus Granulozyten stimulieren und zu einer peripheren Schmerzhemmung führen.