

2. HYPOTHESEN, EXPERIMENTELLE STRATEGIEN UND ERGEBNISSE

2.1. Hypothesen der Habilitationsschrift

Ausgangspunkt dieser Habilitationsschrift sind die folgenden 5 Hypothesen:

Hypothese A: Opioidhaltige Granulozyten und Monozyten/Makrophagen tragen zu einer peripheren Schmerzhemmung unter Entzündungsbedingungen bei.

Hypothese B: Adhäsionsmoleküle und CXCR2-Liganden regulieren die Einwanderung opioidhaltiger Immunzellen und beeinflussen dadurch die Intensität einer lokalen Schmerzhemmung durch Opioidpeptide.

Hypothese C: Eine Schmerzhemmung im entzündeten Gewebe lässt sich durch eine vermehrte Rekrutierung opioidhaltiger Leukozyten verstärken.

Hypothese D: Im Gegensatz zu einem Entzündungsmodell führt die selektive Einwanderung von Granulozyten in nicht entzündetes Gewebe zu keiner Schmerzentstehung.

Hypothese E: CXCR1/2 Liganden führen zu einer kalziumabhängigen Freisetzung von Opioidpeptiden aus Granulozyten und hemmen dadurch lokal Entzündungsschmerz.

2.2. Bedeutung verschiedener Leukozytenpopulationen für eine periphere Schmerzhemmung durch Opioidpeptide im Entzündungsverlauf

Hypothese A: Opioidhaltige Granulozyten und Monozyten/Makrophagen tragen zu einer peripheren Schmerzhemmung unter Entzündungsbedingungen bei.

Zur Untersuchung der Hypothese wurde zunächst eine Methode zur Quantifizierung opioidhaltiger Leukozyten etabliert und diese zur Zellquantifizierung im entzündeten Gewebe eingesetzt. Im zweiten Schritt wurde die Bedeutung einzelner Leukozytenpopulationen mit Hilfe spezifischer Depletionsstrategien analysiert.

I

Rittner HL, **Brack A**, Machelska H, Mousa S, Bauer M, Schäfer M, Stein C
 „Opioid peptide expressing leucocytes – identification, recruitment and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain“
Anesthesiology 2001; 95 (2): 500-8

Kapitel 9 "Sonderdrucke" S. 28-36

Die Quantifizierung opioidhaltiger Leukozyten im entzündeten Pfortengewebe erfolgte mit Hilfe der Durchflusszytometrie. Nach enzymatischem Verdau des Gewebes wurde in einer Einzelzellsuspension eine Doppelfärbung von Leukozyten (CD45) und Opioidpeptiden durchgeführt. Der zur Färbung der Opioidpeptide eingesetzte Antikörper (3E7) erkennt β -Endorphin, Met-Enkephalin und Dynorphin (68). Die Spezifität der 3E7-Färbung wurde durch zwei Kontrollen bestätigt: die Färbung mit einem isotypengleichen Kontrollantikörper und der dosisabhängige Verlust einer Färbung nach vorheriger Inkubation mit exogen zugegebenen β -Endorphin. Im Entzündungsverlauf nahm die Anzahl opioidhaltiger Leukozyten zu. Parallel hierzu stiegen der Gehalt an β -Endorphin und die Anzahl β -Endorphin positiver Zellen im Gewebe an. Die Schmerzschwellen waren zu allen Zeitpunkten gleichermaßen erniedrigt, während eine durch Stress auslösbare Schmerzhemmung im Entzündungsverlauf signifikant zunahm. In der frühen Entzündung (2 und 6 h nach CFA-Gabe) waren opioidhaltige Leukozyten in der Mehrzahl Granulozyten. Später (96 h nach CFA-Gabe) dominierten Monozyten/Makrophagen.

II

Brack A, Labuz D, Schiltz A, Rittner HL, Machelska H, Schäfer M, Reszka R, Stein
 „Tissue monocytes/macrophages in inflammation: hyperalgesia versus opioid-mediated peripheral antinociception“
Anesthesiology 2004; 101 (1): 204-11

Kapitel 9 "Sonderdrucke" S. 37-44

Um die Bedeutung opioidhaltiger Monozyten/Makrophagen zu untersuchen, wurden clodronathaltige Liposomen zur selektiven Depletion eingesetzt (69,70). Clodronathaltige Liposomen werden phagozytiert und lysiert (71). Das freigesetzte, toxische Clodronat verursacht Zelltod durch Apoptose, indem mitochondriale Enzyme inhibiert werden (72-74).

In späten Phasen der Entzündung (48 und 96 h nach CFA-Gabe) nahm die Anzahl von Monozyten/Makrophagen und von opioidhaltigen Leukozyten in der Pfote nach lokaler Injektion clodronathaltiger Liposomen um 30-35% ab. Andere Leukozytenpopulationen blieben unverändert. Die Schmerzschwellen waren in allen Gruppen vergleichbar, während eine durch Stress ausgelöste periphere Schmerzhemmung bei einer Depletion der Monozyten/Makrophagen signifikant vermindert war.

III (Teil A)

Brack A, Rittner HL, Machelska H, Leder K, Mousa S, Schäfer M, Stein C

„Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells“

Pain 2004; 112 (3): 229-238

Kapitel 9 "Sonderdrucke" S. 45-54

In der frühen Entzündung (< 24 h nach CFA-Gabe) waren Granulozyten die quantitativ größte Population opioidhaltiger Leukozyten im Gewebe. Die systemische Injektion eines granulozytendepletierenden Serums reduzierte die Anzahl der Granulozyten in der Zirkulation und in der entzündeten Pfote um 90%. Die Anzahl der Monozyten/Makrophagen in der Pfote blieb unverändert. Während die Granulozytendepletion die Schmerzschwellen nicht beeinflusste, waren die opioidhaltigen Leukozyten und eine durch CRF ausgelöste periphere Schmerzhemmung signifikant vermindert.

Zusammenfassung: Im Verlauf einer experimentellen Entzündung steigen die Anzahl opioidhaltiger Leukozyten, der Gesamtgehalt an Opioidpeptiden in der Pfote und eine durch Opioidpeptide vermittelte lokale Schmerzhemmung signifikant an. Diese periphere Schmerzhemmung wird in der frühen Phase der Entzündung durch Granulozyten vermittelt. In der späten Phase tragen Monozyten/Makrophagen hierzu bei.

2.3. Regulation der Einwanderung opioidhaltiger Leukozyten durch Adhäsionsmoleküle und Chemokine

Hypothese B: Adhäsionsmoleküle und CXCR2-Liganden regulieren die Einwanderung opioidhaltiger Immunzellen und beeinflussen dadurch die Intensität einer lokalen Schmerzhemmung durch Opioidpeptide.

Um die Bedeutung der Adhäsionsmoleküle und Chemokine für die Leukozytenrekrutierung und Antinozizeption zu charakterisieren, wurden die einzelnen Schritte der Rekrutierung durch spezifische Antikörper gezielt blockiert.

IV

Machelska H, Mousa SA, **Brack A**, Schopohl JK, Rittner HL, Schäfer M, Stein C

„Opioid control of inflammatory pain regulated by intercellular adhesion molecule-1“

J Neurosci 2002; 22 (13): 5588-96

Kapitel 9 "Sonderdrucke" S. 55-63

V

Machelska H, **Brack A**, Mousa SA, Schopohl JK, Rittner HL, Schäfer M, Stein C

„Selectins and integrins, but not platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 regulate opioid inhibition of inflammatory pain“

Br J Pharmacol 2004; 142 (4): 772-780

Kapitel 9 "Sonderdrucke" S. 64-72

Die Untersuchungen zur Rolle der Adhäsionsmoleküle wurden in der frühen Phase der Entzündung durchgeführt (6 h nach CFA-Gabe). Unter Entzündungsbedingungen nahm die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, E-, P-Selektin und PECAM-1 auf Endothelzellen der Gefäße in der Pfote zu. Integrine (α_4 und β_2) ließen sich auf opioidhaltigen Leukozyten in der Zirkulation und im Gewebe nachweisen, während L-Selektin nur auf zirku-

lierenden, nicht aber auf Leukozyten im entzündeten Gewebe exprimiert wurde („shedding“). Eine systemische Blockade von Adhäsionsmolekülen (ICAM-1 oder Integrine α_4 und β_2) führte zu einer Zunahme zirkulierender Immunzellen und zu einer Abnahme von Leukozyten in der Pfote. Bei einer Blockade von Selektinen durch Fucoidin nahmen sowohl die Leukozyten in der Zirkulation als auch im Gewebe ab. Bei allen drei Behandlungsstrategien gegen Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, Integrine α_4 und β_2 oder Selektine) nahmen die opioidhaltigen Leukozyten in der Pfote ab und verhinderten so eine körpereigene, periphere Schmerzhemmung durch Opioidpeptide. Nur nach Blockade von PECAM-1 waren weder die Anzahl opioidhaltiger Leukozyten noch die periphere Schmerzhemmung verändert.

III (Teil B)

Brack A, Rittner HL, Machelska H, Leder K, Mousa S, Schäfer M, Stein C

„Control of inflammatory pain by chemokine-mediated recruitment of opioid-containing polymorphonuclear cells“

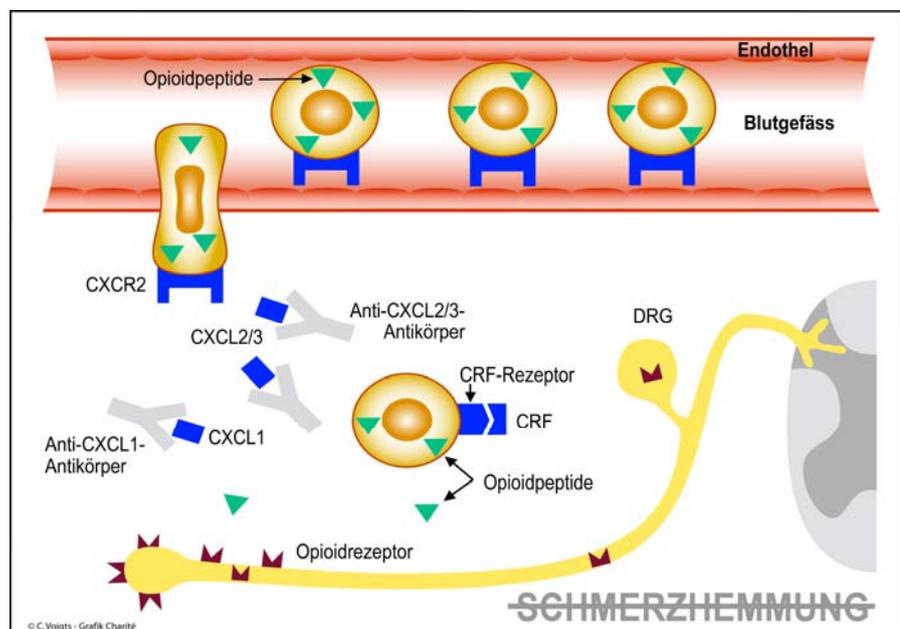
Pain 2004; 112 (3): 229-238

Kapitel 9 „Sonderdrucke“ S. 45-54

Im entzündeten Gewebe waren zu frühen Zeitpunkten (2 h nach CFA-Gabe) nur eine geringe Menge granulozytenspezifischer Chemokine (nur CXCL1 und CXCL2/3) nachweisbar. Im weiteren Entzündungsverlauf wurden alle CXCR2 Liganden (CXCL1, CXCL2/3 und CINC-2) in hohem Maße in der Pfote produziert. Der Chemokinrezeptor CXCR2 war auf nahezu allen Granulozyten und opioidhaltigen Leukozyten, nicht aber auf Monozyten/Makrophagen nachweisbar. Die lokale Injektion von Antikörpern gegen CXCL1 und CXCL2/3 bewirkte eine signifikante Abnahme der Anzahl der Granulozyten und der opioidhaltigen Leukozyten, nicht aber der Monozyten/Makrophagen. Parallel zur Abnahme opioidhaltiger Leukozyten war auch eine durch CRF ausgelöste lokale Schmerzhemmung signifikant vermindert (graphische Darstellung in **Abbildung 4**).

Abbildung 4: Einfluss einer Chemokinblockade auf eine periphere Schmerzhemmung im Entzündungsmodell

Die kombinierte Blockade von CXCL1 und CXCL2/3 bewirkte eine signifikante Reduktion der PMN und der opioidhaltigen Leukozyten in der entzündeten Pfote (CFA = komplettes Freundesches Adjuvanz). Parallel hierzu nahm eine durch CRF ausgelöste Schmerzhemmung signifikant ab. (CRF = „corticotropin releasing factor“; DRG = Hinterwurzelganglion, „dorsal root ganglion“).



Zusammenfassung: Die Einwanderung opioidhaltiger Leukozyten wird in der frühen Entzündung durch Adhäsionsmoleküle auf zirkulierenden Leukozyten (L-Selektin, Integrine α_4 , β_2) und auf dem Gefäßendothel (ICAM-1, E-, P-Selektin) reguliert. Darüber hinaus ist diese Einwanderung abhängig von den im entzündeten Gewebe produzierten CXCR2 Liganden (CXCL1 und 2/3) und dem auf Granulozyten exprimierten Chemokinrezeptor CXCR2. Eine Blockade von Adhäsionsmolekülen oder von CXCR2 Liganden verursacht neben einer verminderten Einwanderung opioidhaltiger Immunzellen auch den Verlust einer peripheren Schmerzhemmung durch Opioidpeptide.

2.4. Die Intensität einer peripheren Schmerzhemmung wird durch Opioidrezeptoren und nicht durch Opioidpeptide begrenzt

Hypothese C: Eine Schmerzhemmung im entzündeten Gewebe lässt sich durch eine vermehrte Rekrutierung opioidhaltiger Leukozyten verstärken.

In Hypothese A und B wurde gezeigt, dass opioidhaltige Granulozyten zu einer peripheren Schmerzhemmung beitragen. Im Vergleich zur späteren Phasen der Entzündung war die Anzahl opioidhaltiger Leukozyten jedoch gering und eine Schmerzhemmung weniger stark ausgeprägt. Um die Anzahl opioidhaltiger Granulozyten in der entzündeten Pfote zu erhöhen, wurden zwei Strategien gewählt: die Expansion von Granulozyten im Blut durch hämatopoetische Wachstumsfaktoren und die lokale Injektion von granulozytenspezifischen Chemokinen in die Pfote.

VI

Brack A, Rittner HL, Machelska H, Beschmann K, Sitte N, Schäfer M, Stein C

„Mobilization of opioid-containing polymorphonuclear cells by hematopoietic growth factors and influence on inflammatory pain“

Anesthesiology 2004; 100 (1): 149-57

Kapitel 9 "Sonderdrucke" S. 73-81

Nach mehrtägiger Injektion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren (G-CSF (= „granulocyte-colony stimulating factor“) und SCF (= „stem cell factor“)) werden Granulozyten verstärkt aus dem Knochenmark freigesetzt und die Anzahl zirkulierender Granulozyten nimmt signifikant zu (75). Die kombinierte Gabe beider Wachstumsfaktoren ist dabei effektiver als die Einzelgabe (76,77). In verschiedenen Modellen führt eine solche Expansion zirkulierender Granulozyten auch zu einer verstärkten Rekrutierung in entzündetes Gewebe (78,79).

In unserem Entzündungsmodell verzehnfachte sich die Anzahl zirkulierender Granulozyten durch die Injektion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren, während die Anzahl opioidhaltiger Granulozyten in der entzündeten Pfote nur in geringem Maße zunahm (Anstieg um 30-40%). Die Intensität einer peripheren Schmerzhemmung ließ sich hierdurch nicht steigern. Untersuchungen zur mRNA-Expression der CXCR2 Liganden zeigten, dass in diesem frühen Entzündungsstadium (2 h nach CFA-Gabe) nur wenige Transkripte von CXCL1 nachweisbar waren. Die Menge an Transkripten aller vier CXCR2 Liganden war erst im weiteren Entzündungsverlauf deutlich erhöht (12 h nach CFA-Gabe).

VII

Brack A, Rittner HL, Machelska H, Shaqura M, Mousa S, 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 2004; 108 (1-2): 67-75

Kapitel 9 "Sonderdrucke" S. 82-90

Da die Injektion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren nur einen geringen Einfluss auf die Rekrutierung opioidhaltiger Leukozyten hatte und da CXCR2 Liganden in der frühen Entzündung in niedriger Menge im Gewebe nachweisbar waren, wurde ein zweiter experimenteller Ansatz untersucht. Die lokale Injektion von einem granulozytenspezifischen Chemokin (CXCL2/3) führte zu einem dosisabhängigen, maximal vierfachen Anstieg der Granulozyten und der opioidhaltigen Leukozyten in der entzündeten Pfote (2 h nach CFA-Gabe). Ebenso wie nach der Gabe hämatopoetischer Wachstumsfaktoren wurde jedoch keine Steigerung einer peripheren Schmerzhemmung erzielt. In dieser frühen Entzündungsphase waren sowohl die körpereigene als auch eine durch lokale Injektion von Opioidpeptiden ausgelöste Schmerzhemmung nur wenig wirksam. Übereinstimmend ließ sich nur eine geringgradige Expression von Opioidrezeptoren im DRG und auf peripheren Nervenendigungen nachweisen.

VIII

Pühler W, Zöllner C, **Brack A**, Shaqura M, Krause H, Schäfer M, Stein C
 „Upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction“
Neuroscience 2004; 129 (2): 473-479 Kapitel 9 “Sonderdrucke” S. 91-97

IX

Pühler W, Rittner HL, Mousa SA, **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 2006; 141(2): 989-98 Kapitel 9 “Sonderdrucke” S. 98-107

Die Intensität einer peripheren Schmerzhemmung ließ sich durch vermehrte Einwanderung opioidhaltiger Leukozyten nicht steigern. Die Intensität einer peripheren Schmerzhemmung scheint also von der Anzahl und Funktion der Opioidrezeptoren abhängig zu sein. Um die Regulation der Bildung von Opioidrezeptoren genauer zu verstehen, wurde die Anzahl von Opioidrezeptortranskripten im DRG im Entzündungsverlauf quantifiziert.

Die Anzahl der μ -Opioidrezeptortranskripte stieg zu frühen Entzündungszeitpunkten (1 und 2 h nach CFA Gabe) signifikant an. Eine erhöhte Anzahl von μ -Opioidrezeptoren ließ sich erst im späteren Entzündungsverlauf (24 h nach CFA Gabe) im DRG nachweisen. Beide Veränderungen waren nicht mehr nachweisbar, wenn vor dem Entzündungsbeginn der ipsilaterale Nervus ischiadicus entweder ligiert oder seine Funktion durch Leitungsanästhesie blockiert wurde. Eine Entzündung scheint also durch die begleitende neuronale Aktivierung direkt die Neusynthese von μ -Opioidrezeptoren im DRG zu beeinflussen.

Die Anzahl der Opioidrezeptortranskripte stieg nicht nur für μ , sondern auch für κ während der Entzündung an. Die größte Anzahl der Transkripte wurde aber zu einem späteren Entzündungszeitpunkt gemessen (12 h nach CFA-Gabe) und ließ sich durch systemische Gabe eines IL-1 Rezeptorantagonisten blockieren. Eine intraplantare Injektion des Zytokins IL-1 β führte ebenso wie CFA zu einer erhöhten Anzahl der κ -Opioidrezeptortranskripte und der κ -Opioidrezeptorpositiven Nervenfasern im ipsilateralen DRG zu. Beide Anstiege ließen sich durch einen IL-1 Rezeptorantagonisten blockieren. In der Entzündung gebildete Zytokine scheinen also die Neusynthese von κ -Opioidrezeptoren im DRG zu beeinflussen.

Zusammenfassung: Im Gegensatz zur systemischen Gabe von hämatopoetischen Wachstumsfaktoren nimmt die Einwanderung opioidhaltiger Leukozyten in die Pfote nach lokaler Injektion granulozytenspezifischer Chemokinen erheblich zu. Dennoch bleibt die Intensität einer peripheren Schmerzhemmung unverändert. Somit scheint diese Form der Schmerzhemmung weniger durch Opioidpeptide als durch Opioidrezeptoren begrenzt zu sein. Zwar wird die Opioidrezeptortranskription innerhalb weniger Stunden nach Entzündungsbeginn gesteigert, aber deren Translation und Transport in die Peripherie dauert offensichtlich einen bis mehrere Tage.

2.5. Keine Schmerzentstehung bei selektiver Granulozyteneinwanderung in nicht entzündetes Gewebe

Hypothese D: Im Gegensatz zu einem Entzündungsmodell führt die selektive Einwanderung von Granulozyten in nicht entzündetes Gewebe zu keiner Schmerzentstehung.

In unserem Entzündungsmodell führte weder die Granulozytendepletion noch deren vermehrte Einwanderung zu Veränderungen der Schmerzschwellen (siehe Hypothese A und C). Hieraus leitet sich die Frage ab, ob Granulozyten überhaupt zur Schmerzentstehung beitragen. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden CXCR2 Liganden in die nicht entzündete Pfote injiziert und die Schmerzschwellen gemessen.

X

Rittner HL, Mousa SA, Labuz D, Beschmann K, Schäfer M, Stein C, **Brack A**
 „Selective local PMN recruitment by CXCL1- or CXCL2/3-injection does not cause
 inflammatory pain“

J Leukocyte Biol 2006; 79 (5):1022-32

Kapitel 9 "Sonderdrucke" S. 108-118

Im CFA-Modell ist ein lokaler Entzündungsschmerz messbar. Hingegen kam es nach lokaler Injektion von CXCL1 und CXCL2/3 in die nicht entzündete Pfote zu einer dosis- und zeitabhängigen Einwanderung von Granulozyten ohne Schmerzentstehung. Dieser Unterschied kam nicht durch eine fehlende Aktivierung der Granulozyten zustande, denn typische Aktivierungsmarker von Granulozyten zeigten ein vergleichbares Muster nach Injektion von CFA und CXCL2/3 (L-Selektin-Shedding und Expression von CD11b und CD18 gleicher Intensität). Entzündungsschmerz löst eine Synthese pronozizeptiver Mediatoren wie beispielsweise Prostaglandin E₂ aus. Dementsprechend wurde Prostaglandin E₂ nach Injektion von CFA, nicht aber von CXCL2/3 vermehrt gebildet. Entzündung und Schmerz führen darüber hinaus zu einer neuronalen Aktivierung und zu einem Anstieg der Genexpression so genannter „immediate early genes“ wie c-fos in den Laminae I und II des Hinterhorns des Rückenmarks (80). Die Untersuchungen zeigten, dass sowohl die Menge an c-fos-mRNA als auch die Anzahl c-fos positiver Zellen nach Injektion von CFA, nicht aber von CXCL2/3, erhöht war.

Zusammenfassung: Die selektive Granulozyteneinwanderung in nicht entzündetes Gewebe verursacht im Gegensatz zu einem Entzündungsmodell keine Schmerzen, obwohl die eingewanderten Granulozyten ein identisches Aktivierungsmuster aufweisen. Auch die für Entzündungsschmerz charakteristischen Begleitveränderungen (lokale Prostaglandinbildung und Expression von Aktivierungsmarkern im Rückenmark) treten nur im Entzündungsmodell, nicht aber nach Chemokinjektion auf.

2.6. Chemokininduzierte Freisetzung von Opioidpeptiden aus Granulozyten *in vitro* und Schmerzhemmung *in vivo*

Hypothese E: CXCR1/2 Liganden führen zu einer kalziumabhängigen Freisetzung von Opioidpeptiden aus Granulozyten und hemmen dadurch lokal Entzündungsschmerz.

Bisherige Arbeiten beschrieben Opioidpeptide in vesikelähnlichen Strukturen von Leukozyten (67) und zeigten eine Freisetzung von Granula aus Granulozyten nach Stimulation mit CXCL8 (62,63). Ausgehend hiervon wurde *in vitro* und *in vivo* untersucht, ob CXCR1/2 Liganden Opioidpeptide aus Granulozyten freisetzen und welche Signaltransduktionswege hieran beteiligt sind.

XI

Rittner HL, Labuz D, Schaefer M, Mousa SA, Schulz S, Schäfer M, Stein C, **Brack A**
 „Control of inflammatory pain by CXCR2 ligand-induced release of opioid peptides from
 polymorphonuclear cells“

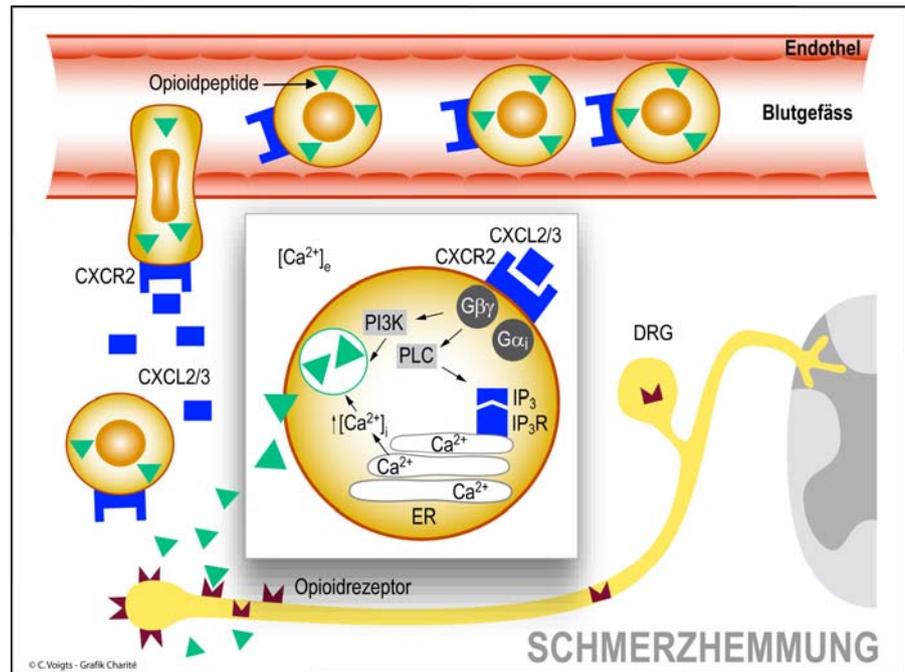
FASEB J. 2006; published October 23, 2006 as doi: 10.1096/fj.06-5867fje

Kapitel 9 "Sonderdrucke" S. 121-132

In unserem Entzündungsmodell führte die lokale Injektion von CXCL2/3 zu einer peripheren opioidvermittelten Schmerzhemmung. Um die molekularen Mechanismen der Opioidpeptidfreisetzung aus humanen und Ratten Granulozyten zu verstehen, wurden Stimulationsexperimente mit CXCR1/2 Liganden (human: CXCL8, Ratte: CXCL2/3) *in vitro* durchgeführt. CXCR1/2 Liganden induzierten die Freisetzung von β -Endorphin und Met-Enkephalin. Diese Freisetzung wurde durch intrazelluläre (BAPTA/AM), nicht aber extrazelluläre Kalziumchelatbildung (EGTA) blockiert. In Anwesenheit eines IP₃-Rezeptorantagonisten (2-APB) war die Freisetzung ebenfalls inhibiert. Darüber hinaus blockierten auch Inhibitoren der PI₃Kinase (Wortmannin und LY294002) partiell die CXCL8 bzw. CXCL2/3 induzierte Freisetzung von Opioidpeptiden (graphische Darstellung in **Abbildung 5**, nächste Seite).

Abbildung 5: Die chemokininduzierte Freisetzung von Opioidpeptiden aus Granulozyten im Entzündungsmodell

In vivo löste die Injektion von CXCL2/3 eine periphere opioidvermittelte Schmerzhemmung aus. *In vitro* Untersuchungen zeigten, dass die Opioidpeptidsekretion durch Aktivierung des Inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃)-Rezeptors mit nachfolgender Freisetzung von intrazellulärem Kalzium aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgte. Weiterhin trug die Aktivierung der Phosphoinositol-3-Kinase hierzu bei. Beide Signaltransduktionswege kooperieren also in der Freisetzung von Opioidpeptiden.



Zur Untersuchung der *in vivo* Relevanz der *in vitro* charakterisierten Signaltransduktionswege wurde zunächst eine systemische Granulozytendepletion vor Entzündungsbeginn durchgeführt. In diesen depletierten Tieren war keine periphere Schmerzhemmung durch lokale Injektion von CXCR2 Liganden auslösbar. Im nächsten Schritt wurden Granulozyten aus einem Spendertier gewonnen und lokal injiziert. In rekonstituierten Tieren ließ sich jetzt eine Schmerzhemmung durch CXCR2 Liganden erzielen. Im dritten Schritt wurden die Granulozyten vor dem Transfer mit einem intrazellulären Kalziumchelatorbildner (BAPTA/AM) inkubiert und hierdurch die für die Opioidpeptidfreisetzung wichtige Signaltransduktion blockiert. Wurden diese vorbehandelten Granulozyten injiziert, ließ sich keine Schmerzhemmung durch CXCR2 Liganden auslösen.

Zusammenfassung: CXCR2 Liganden spielen eine duale Rolle für eine periphere Schmerzhemmung durch Opioidpeptide. Erstens sind sie für die Rekrutierung opioidhaltiger Granulozyten verantwortlich (siehe Hypothese B). Zweitens führen sie zur direkten Opioidpeptidfreisetzung aus Granulozyten. Eine solche Opioidpeptidfreisetzung erfordert die Aktivierung der klassischen Signaltransduktionswege der CXCR1/2 Rezeptoren. Hierzu zählen die IP₃-Rezeptorvermittelte Kalziumfreisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum und möglicherweise die Aktivierung der PI₃Kinase. Auch *in vivo* ermöglichen diese Kaskaden eine opioidvermittelte Schmerzhemmung durch granulozytenspezifische Chemokine.