

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Der Medizinischen Fakultät
Der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Die Auswirkung unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung auf die Schmerzwahrnehmung,
das Suchtverhalten und depressionsrelevantes Verhalten

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Golschan Asgarpur
Tabriz, Iran
11. Juli 2016

Für meine Eltern
Manige und Akbar

Bibliographische Beschreibung

Asgarpur, Golschan:

Die Auswirkung unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung auf die Schmerzwahrnehmung, das Suchtverhalten und depressionsrelevantes Verhalten

2016.- 60 Bl., 25 Abb., 1 Tab, 6 Anl.

Kurzreferat

Eine unterschiedliche Ausstattung an μ -Opioidrezeptoren könnte ein Grund dafür sein, warum Patienten unterschiedlich auf die Gabe derselben Menge eines Opioids reagieren. Opiode sind an weitaus mehr physiologischen Prozessen als nur an der Analgesie beteiligt. Welche Prozesse durch eine unterschiedliche μ -Opioidrezeptor-Ausstattung beeinflusst werden, ist Gegenstand aktueller Forschung und könnte zu einem besseren Verständnis und Regime in der akuten und chronischen Schmerztherapie führen. Transgene Mäuse der Gattung BALB-c/C 57 mit 3 unterschiedlichen genetischen Ausstattungen des μ -Opioidrezeptors (Wildtypen 100%, heterozygote Tiere 50% und μ -knock-out Mäuse 0%) wurden gezüchtet und in Bindungsstudien verifiziert, um ausgewählte Opiodeffekte verhaltenspharmakologisch zu untersuchen. Unsere Untersuchungen zeigen, dass der analgetische Effekt, von Opioiden stark von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren abhängig ist. Die Anzahl der μ -Opioidrezeptoren korreliert genauso stark mit der morphininduzierten Hypothermie und Aktivitätssteigerung. Auch das Sucht- und Belohnungsverhalten ist umso stärker ausgeprägt, umso höher die Anzahl der μ -Opioidrezeptoren ist. Betrachtet man die Auswirkung der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Ausstattung auf das emotionale Verhalten, wie Angst-, Schreck- und Fluchtreaktion sowie auf das depressionsrelevante Verhalten, so sind weitaus komplexere Korrelationen zu finden. Eine Auswirkung auf das endogene Opioidsystem erscheint ebenfalls bedeutsam, genauso wie die Auswirkung auf die zentrale Exzitabilität. Selbst die physiologischen Funktionen weiterer Opioidrezeptorsubtypen, wie die δ - und κ - Opioidrezeptor-vermittelten Effekte, sind durch abweichende μ -Opioidrezeptor-Ausstattungen verändert. Diese Erkenntnisse sind für die Therapie chronischer Schmerzpatienten von immenser Bedeutung.

Schlüsselwörter

μ -Opioidrezeptor, Analgesie, Rewardverhalten, Konditionierte Platz Präferenz, depressionsrelevantes Verhalten, endogens Opioidsystem, δ -Opioidrezeptor, SNC 80

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

AI	Analgetischer Index
CPP	Konditionierte Platzpräferenz (conditioned place preference)
DAMGO	[D-Ala ² ,N-Me-Phe ⁴ ,Gly ⁵ -ol]enkephalin
DOR	δ-Opioidrezeptor
FX	Frontaler Kortex
HP	Heiße Platte
Hp	Hippocampus
5 HT _{1A}	Serotoninrezeptor 1A
HZ	Heterozygote Mäuse (50 % μ-Opioidrezeptor-Ausstattung)
i.p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
KOR	κ-Opioidrezeptor
KO	Knock out
min	Minute
MOR	μ-Opioidrezeptor
MW	Mittelwerte
NaCl	Physiologische Kochsalzlösung 0,9 %
PTZ	Pentylentetrazol
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
SWR	Schwanzwurzelreizung
TST	<i>Tail suspension</i> Test
VBZ	Vorbehandlungszeit
VM	Vormessung
WT	Wildtyp Mäuse (maximale μ-Opioidrezeptor-Ausstattung)
\bar{x}	Mittelwert
μ-KO	μ-Opioidrezeptor-knock-out Mäuse

Inhaltsverzeichnis

Dokumentationsblatt.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
1	Einleitung..... 1
1.1	Opioide -allgemeine und geschichtliche Aspekte 1
1.2	Opioidrezeptoren 1
1.3	Opioide und ihre physiologische Funktion.....2
1.4	Lokalisation der Opioidrezeptoren2
1.5	Wechselwirkungen mit weiteren Transmittersystemen.....3
1.6	Toleranz und Abhängigkeit 4
1.7	Endogene Opioide5
1.8	Zielsetzung5
1.9	Aktueller Stand der Literatur7
2	Material und Methodik8
2.1	Versuchstiere.....8
2.2	Haltungsbedingungen und Versuchsbedingungen.....8
2.3	Substanzen8
2.3.1	Natriumchlorid9
2.3.2	Morphin-Hydrochlorid Trihydrat9
2.3.3	Etorphin-Hydrochlorid9
2.3.4	SNC 80.....9
2.3.5	Naloxon 10
2.3.6	Naltrindol-Hydrochlorid 10
2.3.7	Nor-Binaltorphimin-Hydrochlorid..... 10
2.3.8	Pentylenetetrazol..... 10
2.3.9	³ H-DAMGO [D-Ala ² ,N-Me-Phe ⁴ ,Gly ⁵ -ol]enkephalin 11
2.4	Verhaltenspharmakologische Untersuchungen..... 11
2.4.1	Heiße Platte..... 11

Inhaltsverzeichnis

	2.4.2 Schwanzwurzelreizung	12
	2.4.3 Körpertemperatur	13
	2.4.4 Conditioned Place Preference (CPP).....	13
	2.4.5 Motilitätsmessung.....	14
	2.4.6 Angschwelenbestimmung	15
	2.4.7 Startle Response	16
	2.4.8 <i>Tail suspension</i> Test.....	17
	2.4.9 PTZ Kindling.....	17
	2.4.10 Bindungsstudie mit [³ H-DAMGO].....	18
2.5	Statistische Methoden	19
3	Ergebnisse	20
3.1	Grundeffekte.....	20
	3.1.1 ³ H-DAMGO- Bindung.....	20
3.2	Morphineffekte.....	21
	3.2.1 Einfluss der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor- Anzahl auf Analgesie und Körpertemperatur.....	21
	3.2.2 Einfluss der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Lokomotion	24
	3.2.3 Einfluss der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die morphininduzierte Platzpräferenz.....	26
	3.2.4 Einfluss der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Analgesie unter Aktivierung weiterer Opioidrezeptor-Subtypen durch Etorphin	31
3.3	Charakterisierungen von Verhaltensänderungen ohne Opioidstimulation	34
	3.3.1 Angst- und Schmerz- bzw. Fluchtschwellenbestimmung	34
	3.3.2 Einfluss der unterschiedlichen Anzahl an μ -Opioidrezeptoren auf die Schreckreaktion	36
	3.3.3 Wirkung der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf das depressionsrelevante Verhalten... ..	37
	3.3.4 Wirkung der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die zentrale Erregbarkeit und Krampfentwicklung.....	39

Inhaltsverzeichnis

3.4	Wechselwirkungen von μ -, δ - und κ -Opioidrezeptor-Antagonisten und δ -Opioidrezeptor-Agonisten auf Opioideffekte	40
3.4.1	<i>Tail suspension</i> Test bei Mäusen mit unterschiedlicher Ausstattung des μ -Opioidrezeptors unter der Wirkung von Naloxon, Naltrindol und nor-Binaltorphimin.....	40
3.4.2	<i>Tail suspension</i> Test, Analgesie und Körpertemperatur bei Mäusen mit unterschiedlicher Ausstattung des μ -Opioidrezeptors unter der Wirkung des δ -Opioidrezeptor-Agonisten SNC 80	42
4	Diskussion	45
4.1	μ -Opioidrezeptor-Bindung.....	45
4.2	μ -Opioidrezeptor- vermittelte Wirkungen mit direkter Korrelation zur Rezeptordichte	45
4.3	Emotionales Verhalten ohne exogene Opioidstimulation	50
4.3.1	Schreck- und Angstreaktion.....	51
4.3.2	Depressionsrelevantes Verhalten	53
4.3.3	Zentrale Exzitabilität	54
4.4	Interaktionen zwischen den Opioidrezeptorsubtypen.....	55
4.4.1	Schmerzschwellenbestimmung mit Etorphin.....	55
4.4.2	Wirkung der Opioidrezeptorsubtypen auf das emotionale Verhalten- ein vorrangiger δ -Opioidrezeptor-Effekt?	56
5	Zusammenfassung	61
6	Literaturverzeichnis	62
7	Abbildungsverzeichnis	83
8	Danksagung	84
9	Ehrenerklärung.....	85
10	Curriculum vitae.....	86
11	Anlagen	89
11.1	Abstract	89

1 Einleitung

1.1 Opioide -allgemeine und geschichtliche Aspekte

Opioide zählen zu den wirksamsten Schmerzmitteln und sind bisher für eine effektive Schmerztherapie unverzichtbar. Diese Wirkungen der Opioide sind seit langem bekannt. Schon vor ca. fünftausend Jahren kannten die Sumerer und Ägypter die Vorzüge des Schlafmohns und gebrauchten ihn als Heilpflanze. Der persische Arzt Abu 'Ali al-Husain ibn Sina (Avicenna) beschrieb 1025 n. Chr. „Opium als das mächtigste der Betäubungsmittel“ im „Canon medicinae“ (1). Rohopium ist der aus den unreifen Kapseln des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) gewonnene getrocknete Milchsaft. Dem deutschen Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner (1783-1806) gelang es 1803, aus dem Rohopium, den heute noch zu den effektivsten Schmerzmitteln zählenden natürlichen Wirkstoff Morphin, zu isolieren (2). Opioide weisen neben ihrer schmerzlindernden Wirkung stets auch eine psychoaktive Wirkung auf (3). Ein Schüler Galens beschrieb 845 bis 920 n. Chr. die Anwendung von Opium zur Behandlung der „Melancholie“ (4). Im medizinischen Alltag dienen Opioide in den verschiedensten Darreichungsformen der Behandlung von akuten und chronischen Schmerzen, zur Analgesie und Anästhesie bei chirurgischen Eingriffen und werden als Antitussiva und bei schweren Durchfallerkrankungen eingesetzt. Aufgrund ihrer ernstzunehmenden zentralen Wirkungen wie Atemdepression, Emesis, Euphorie, Sucht -und Toleranzbildung schrecken immer noch viele Patienten vor der Zustimmung zu einer Behandlung mit Opioiden und Ärzte vor der Anwendung zurück. Die mittlerweile größtenteils synthetisch hergestellten Präparate weisen eine hohe Vielfalt auf. Das liegt nicht zuletzt in dem Versuch begründet, die Nebenwirkungen insbesondere die Toleranz und die physische Anhängigkeit zu minimieren (5) bzw. die schmerzlindernde Potenz zu steigern.

1.2 Opioidrezeptoren

Die Wirkungen der Opioide werden durch Wechselwirkungen mit Opioidrezeptoren realisiert. 1973 identifizierten Pert und Snyder spezifische Opioidrezeptorsubtypen im zentralen Nervensystem und im peripheren Gewebe. Diese 3 Haupt-Opioidrezeptoren μ , δ und κ (6–8) konnten einzeln geklont werden (9,10) und ihre Effekte durch Untersuchungen mittels selektiver Liganden untermauert werden (11). Opioidrezeptoren binden endogen oder exogen zugeführte Opioide mit unterschiedlicher Affinität (12).

Die Opioide entfalten ihre pharmakologischen Wirkungen auf zellulärer Ebene durch Interaktionen an den Opioidrezeptoren (13). Opioidrezeptoren gehören zur Gruppe der Gi-Protein-gekoppelten Rezeptoren mit 7 Transmembrandomänen. Nach Aktivierung durch einen Liganden, erfolgt die Hemmung der Adenylatzyklase und dadurch eine Senkung der intrazellulären cAMP-Konzentration (14). Durch die Öffnung von einwärts gerichteten Kaliumkanälen erhöht sich die Kaliumkonzentration intrazellulär (15), welches zusammen mit der Inhibition spannungsabhängiger

Einleitung

Kalziumkanäle zu einer Stabilisierung des neuronalen Membranpotentials und somit zur Abnahme der neuronalen Erregbarkeit und Neurotransmission führt (16,17).

Über den μ -Opioidrezeptor werden die Haupt-Opioideffekte vermittelt. μ -Opioidrezeptor-vermittelte Wirkungen sind vor allem morphininduzierte supraspinale Analgesie (18), Sedierung, Euphorie, Hypothermie, Miosis, Atemdepression und Emesis. Arzneimittel, die mit hoher Affinität an diesem Rezeptor binden und interagieren werden klinisch am effektivsten genutzt (19–21). Der μ -Opioidrezeptor ist bis heute Mittelpunkt zahlreicher Studien. Er wird unter anderem auch für die Entstehung physischer Abhängigkeit verantwortlich gemacht (3,16,22–24). Die δ -Opioidrezeptor vermittelte Analgesie sowie die κ -Opioidrezeptor vermittelte Dysphorie, Analgesie und Sedierung sind ebenfalls weitestgehend in der Literatur beschrieben (25).

1.3 Opioide und ihre physiologische Funktion

Als Opioide werden alle endogenen und exogenen Substanzen bezeichnet, die peptidischen oder nicht-peptidischen Aufbaus sind, und durch Interaktionen mit Opioidrezeptoren morphinähnliche Effekte auslösen. Opioide können die verschiedenen Opioidrezeptoren, μ , δ und κ aktivieren. Dabei können zentrale und periphere Effekte je nach Lokalisation der Rezeptoren differenziert werden. Im Vordergrund der zentralen μ -Opioidrezeptor-vermittelten Wirkungen stehen die spinale und supraspinale Analgesie durch Hemmung synaptischer Übertragung, die sedierende, euphorisierende, atemdepressive und antitussive Wirkung, sowie die emetische, hypotherme und suchterzeugende Wirkung. Eine Miosis, hervorgerufen durch Stimulation des Nucleus Edinger Westphals kann vor allen bei Verdachtsfällen der Intoxikation und Opioidabhängigkeit von klinischer Bedeutung sein (26). Außerhalb des zentralen Nervensystems hat die Aktivierung des μ -Opioidrezeptors u.a. analgetische, obstruktive, harnretinierende und immunsuppressive Effekte zur Folge. Seit der Entdeckung der Opioidrezeptorsubtypen und des endogenen Opioidsystems in den 1970er Jahren wird eine hohe Affinität der endogenen Opioidpeptide, insbesondere des Met- und Leuk-enkephalins zum δ -Opioidrezeptor deutlich. Effekte die durch die Aktivierung des δ -Opioidrezeptors hervorgerufen werden, sind Gegenstand aktueller, umfangreicher Forschungen. Weitestgehend bekannt sind minimale analgetische Effekte, das Fehlen atemdepressiver Effekte, mögliche antidepressive Effekte und eine Verstärkung der Entzugssymptomatik (27).

1.4 Lokalisation der Opioidrezeptoren

Die Lokalisation von Opioidrezeptoren konnte durch Bindungsstudien mit spezifischen Liganden verifiziert werden. Mit einer hohen Dichte sind sie im Striatum, und mit jeweils abnehmender Dichte im cerebralen Cortex, im Mittel- und Stammhirn zu finden (6). Es wird davon ausgegangen, dass durch die Stimulation von supraspinalen μ -Opioidrezeptoren im Bereich des Mittelhirns absteigende Nervenbahnen inhibierend auf die Übertragung der Nervenerregung im Tractus spinothalamicus

wirken und somit modulierend auf die Schmerzempfindung einwirken. Weiterhin haben im medialen Thalamus befindliche Opioidrezeptoren modulierende Effekte auf die Schmerzwahrnehmung. Das limbische System, darin vor allem die Amygdala, beeinflusst weite Bereiche des emotionalen Verhaltens und zeigt auch eine dichte Besetzung des μ -Opioidrezeptors (28). Auf spinaler Ebene sind vor allem δ - und μ -Opioidrezeptoren vertreten. Sie hemmen im Rückenmark die Freisetzung primär afferenter Transmitter, wie Glutamat und Substanz P und vermindern so die Erregungsübertragung auf die spinothalamischen Projektionsneurone. Autoradiographische Untersuchungen zeigten eine hohe Dichte an μ -Opioidrezeptoren in Kerngebieten des Nucleus accumbens, des Putamens, des Striatums, der Amygdala, des Thalamus, des Hypothalamus, des ventralen Tegmentums, des zentralen Graus, des Gyrus dentatus, der Substantia nigra und des oberen Colliculus (29). δ -Opioidrezeptoren konnten im Bulbus olfactorius, im Putamen, im Nucleus accumbens, der Amygdala und vereinzelt im gesamten Kortex nachgewiesen werden (30). Während die anatomische Verteilung der μ - und δ -Opioidrezeptoren in Regionen überwiegt, die olfaktorische, visuelle, auditive, nozizeptive und emotionale Reize vermitteln, ist die der κ -Opioidrezeptoren vornehmlich im Hypothalamus und der Eminentia mediana zu finden. Dies könnte eine μ -Opioidrezeptor-vermittelte sensorische Integration, sowie eine κ -Opioidrezeptor-vermittelte Rolle in der neuroendokrinen Regulation implizieren (31). Durch μ -Opioidrezeptor-vermittelte Modulation der Empfindlichkeit des medullären Atemzentrums gegenüber CO_2 kommt es zur Atemdepression. Im peripheren Nervensystem kommen κ - und δ -Opioidrezeptoren im Hinterhorn des Rückenmarks vor (32–34) sowie μ -Opioidrezeptoren im Gastrointestinaltrakt und an nozizeptiven Endigungen der C-Fasern (35), im muskuloskelettalen und arteriovenösen System (36).

1.5 Wechselwirkungen mit weiteren Transmittersystemen

Wesentliche Morphineffekte weisen Interaktionen mit weiteren Transmittersystemen nach Aktivierung von Opioidrezeptoren auf. Dabei sind μ -Opioidrezeptor-vermittelte Effekte am weitesten erforscht. Für die euphorisierenden Effekte wird nach Aktivierung von μ -Opioidrezeptoren die Hemmung inhibitorischer GABAerger Interneurone in der Area tegmentalis diskutiert. Es kommt zur Dopaminfreisetzung im Nucleus accumbens, was für die Entstehung von Euphorie verantwortlich gemacht wird und die Suchtentwicklung fördert (37). Inwiefern die Anzahl der μ -Opioidrezeptoren oder ihre Verfügbarkeit im Rahmen einer chronischen Opioidmedikation mit der Entwicklung von depressionsrelevantem Verhalten korreliert, ist Gegenstand aktueller Studien. Eine Interaktion von Trizyklischen Antidepressiva (Amoxapine und Amitriptylin) an δ - und κ - Opioidrezeptoren im Sinne eines agonistischen Effekts ist beschrieben (38). Über μ -Opioidrezeptoren wird im Hypothalamus eine Hypothermie induziert. Neben den Neurotransmittern Serotonin, Noradrenalin und Acetylcholin sind vor allem Dopamin und β -Endorphin in die Thermoregulation involviert. Des

Einleitung

Weiteren wurden immunhistochemisch enkephalin-haltige Neuronen im noradrenergen Kerngebiet des Locus coeruleus, in der Substantia gelatinosa des Rückenmarks und Stammhirns sowie in den vagalen Kernen nachgewiesen und beweisen die Interaktion mit dem Transmittersystem des vegetativen Nervensystems (39,40).

1.6 Toleranz und Abhängigkeit

Als Toleranz wird jenes Phänomen beschrieben, bei der es nach wiederholter Applikation oder Einnahme eines Stoffes zu dessen Wirkungsabnahme kommt und es zur Erzeugung der ursprünglichen Wirkung einer Dosissteigerung bedarf. Es ist zwischen der pharmakokinetischen und der pharmakodynamischen Toleranz zu unterscheiden. Als Grundlage der pharmakodynamischen Toleranzentwicklung werden zelluläre Adaptationsmechanismen verantwortlich gemacht (13). Diskutiert werden Phosphorylierungsvorgänge am Opioidrezeptor, die letztendlich zur Desensibilisierung und zur Abnahme der Rezeptoranzahl führen könnten (16,23). Diese zellulären Vorgänge verursachen vor allem bei chronischen Schmerzpatienten eine unzureichende Analgesie nach langfristiger Opioidtherapie, was als Toleranzentwicklung bezeichnet werden kann. Das glutamaterge System scheint hierbei eine zentrale Rolle einzunehmen. So konnte gezeigt werden, dass bei Ratten die Toleranzentwicklung gegenüber Morphin ausblieb, wenn sie einer Co-Substitution mit einem NMDA-Antagonisten ausgesetzt waren (41,42). Die Toleranzentwicklung und der steigende Bedarf an Opioiden zur adäquaten Schmerztherapie kann in der klinischen Praxis durch eine Opioidrotation oder durch eine Ketamininfusion - einem nicht kompetitiven NMDA-Rezeptor Antagonisten- positiv beeinflusst werden, sodass ein geringerer Opioidbedarf zu einer suffizienten Analgesie führt. Dazu zeigten Bindungsstudien, dass die Downregulation der μ -Opioidrezeptoren, hervorgerufen durch wiederholte Opioidinjektionen, durch die Gabe von NMDA-Antagonisten rückgängig gemacht werden konnte (43,44). Anders verhält es sich mit dem Sucht- und Abhängigkeitspotential von Opioiden. Hierbei steht die euphorisierende Wirkung im Vordergrund, welche möglicherweise unter der Abwesenheit von Schmerzsymptomen weiter verstärkt wird. Belegt wird dies durch verschiedene Studien, die offenlegen, dass die Suchtentwicklung bei adäquat behandelten chronischen Schmerzpatienten wesentlich geringer ausfällt, als bei Patienten, die ohne adäquaten Schmerzreiz mit Opioiden behandelt werden (45). Wird dem opioidgewöhnten Patienten der Zugang zu Opioiden verwehrt, so kann sich die Entzugssymptomatik folgendermaßen zeigen: Dysphorie, Tremor, Schwitzen, Schmerzen, Tachykardie und andere vegetative Reaktionen, sowie dem sogenannten Opiathunger als gesteigerten Antrieb mit Wunsch nach physischer, vegetativer und psychischer Befriedigung durch erneute Zufuhr. Das dopaminerge Belohnungssystem ist maßgeblich an der Entstehung einer Opioidabhängigkeit beteiligt (46). Die konditionierte Platzpräferenz (CPP) ist eine etablierte Methode, um die belohnenden und somit möglicherweise

Einleitung

suchterzeugenden Effekte einer Substanz nachzuweisen. Das Lebewesen lernt dabei die belohnenden Wirkungen einer Substanz, wie z.B. Morphin (47) mit einer bestimmten Umgebung zu assoziieren (Konditionierung nach Pawlow). Die belohnende Eigenschaft der Substanz dient dabei als unkonditionierter Stimulus (UCS) und wird wiederholt gepaart mit anfangs neutralen, taktilen, visuellen oder olfaktorischen Umgebungsreizen. Nach der Konditionierung gewinnen die Umgebungsreize sekundär belohnende Eigenschaften, so dass sie fortan als konditionierte Stimuli (CS) dienen. Dies führt zu einer erhöhten Aufenthaltsdauer in der jeweiligen, mit der Belohnung gepaarten, Umgebung (48). Die Aufenthaltsdauer gilt somit als Indikator für die Präferenz eines Bereiches gegenüber einem anderen Bereich, in welchem keine Aktivierung des Belohnungssystems erfolgte.

1.7 Endogene Opioide

Endogene Opioide spielen entwicklungsgeschichtlich eine zentrale Rolle in stressbehafteten Situationen. Die durch eine Belastungssituation ausgelöste physiologische Wirkung der endogenen Opioide ermöglicht eine regulierte Unterdrückung von Schmerz, Tachykardie, Hypertension, Husten, Stuhl- und Harndrang, Angst und Tachypnoe. Die Enkephaline sind natürliche Liganden der Opioidrezeptoren. Neben der Verhaltensregulation und der Sezernierung hypophysärer Hormone nehmen sie eine wichtige Rolle in der Schmerzverarbeitung ein. Sie entstehen aus einem Vorläuferpolypeptid, dem Proopiomelanokortin, durch Abspaltung verschiedener Aminosäuresequenzen. Ihre Peptidstruktur ermöglicht einen schnellen Abbau durch Peptidasen. Einer Tachyphylaxie und der damit verbundenen Abhängigkeit wird dadurch physiologisch entgegengewirkt. Ihre relativen Affinitäten zu den Opioidrezeptorsubtypen μ , κ und δ sind unterschiedlich. Met- und Leu-Enkephaline binden dabei mit einer relativ hohen Affinität am δ -Opioidrezeptor gefolgt vom μ -Opioidrezeptor. Die Dynorphine sind hochaffine κ -Opioidrezeptor-Agonisten. α - und β -Endorphin binden mit einer höheren Affinität am μ - als am δ -Opioidrezeptor (49). Ihre einzelnen physiologischen Funktionen sind noch nicht vollständig erforscht. Endogene Opioide nehmen außerdem eine entscheidende Rolle in der Modulation des emotionalen Verhaltens ein. Ein wichtiges Korrelat ist der immunhistochemische Nachweis hoher Konzentrationen von β -Endorphin im Vorder- und Hinterlappen der Hypophyse sowie im Hypothalamus und im limbischen System (50). Die Konzentration von endogenen Opioidpeptiden im Plasma wurde in verschiedenen Studien zum Nachweis von Stressreaktionen (51) und ausreichender Analgesie während einer Narkose (52) herangezogen.

1.8 Zielsetzung

Opioide sind, wie eingangs dargelegt, wichtige potente Schmerzmittel, auf deren therapeutischen Einsatz auch heute nicht verzichtet werden kann. Ein ernstzunehmendes Problem

Einleitung

stellt jedoch neben der Toleranz -und Suchtentwicklung, die starke interindividuelle Empfindlichkeit von Patienten bezüglich weiterer Effekte und Nebenwirkungen der Opioidmedikation dar. Es stellt sich die Frage, welche Mechanismen diesen Unterschieden zugrunde liegen könnten. Könnte eine unterschiedliche Ausstattung mit Opioidrezeptoren eine Rolle spielen? Es ist bisher nur unzureichend untersucht worden, welche Auswirkung die unterschiedliche Rezeptordichte des μ -Opioidrezeptors auf die morphininduzierten Effekte und Verhaltensweisen hat. Geht man davon aus, dass jedes Individuum eine bestimmte Anzahl an μ -Opioidrezeptoren besitzt, könnte erklärt werden, weshalb Patienten unterschiedlich auf dieselbe Dosis eines Opioids reagieren. Bindungsstudien in post mortem Hirngewebe und In-vivo-Positronen-Emissions-Tomographien zeigten bereits eine interindividuelle, um 30 - 50 % schwankende μ -Opioidrezeptordichte (32,53).

Zur Untersuchung dieser Frage bieten sich transgene Mäuse mit einer unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl an. Durch die Bereitstellung von Wildtyp-Mäusen mit „normaler“ μ -Opioidrezeptor-Anzahl und μ -Opioidrezeptor-knock-out Mäusen ohne μ -Opioidrezeptoren konnten heterozygote Tiere gezüchtet werden, die die Hälfte der μ -Opioidrezeptoren exprimierten. Schon 1996 konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen, denen der μ -Opioidrezeptor fehlt, keine Analgesie und auch kein Rewardverhalten ausgelöst werden kann (54). Nach der Bestimmung der μ -Opioidrezeptordichte durch Bindungsstudien haben wir diese Genotypen im Rahmen dieser Arbeit verhaltenspharmakologisch umfassend charakterisiert. Dabei wurden 2 unterschiedliche Fragestellungen verfolgt:

- 1) Welche Wirkung hat Morphin bei den unterschiedlichen Genotypen in spezifischen Tests zur Analgesie, Temperatur und konditionierten Platzpräferenz.
- 2) Inwieweit kann die Charakterisierung des Verhaltes der Genotypen in spezifischen Verhaltensmodellen zur Emotionalität, zum Angst -und Schreckverhalten sowie zur zentralen Exzitabilität und depressionsrelevantem Verhalten erfolgen. Wie korreliert das Verhalten mit der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren?

Während unter 1) Wirkungen untersucht wurden, von denen man annehmen kann, dass sie durch direkte Interaktion mit dem Rezeptoragonisten ausgelöst werden, geht es unter Punkt 2) um komplexes Verhalten, das wahrscheinlich durch Opioidrezeptorsysteme moduliert wird.

Weiterhin wurde untersucht, welche Auswirkungen die veränderte μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die weiteren Opioidrezeptorsubtypen hat und welche Interaktionen dargestellt werden können.

Hinweise aus diesen Experimenten könnten vor allem bei chronischen Schmerzpatienten, Krebspatienten, Suchtpatienten und depressiven Patienten hilfreich sein und für ein erweitertes,

besseres Therapiemanagement und -outcome sorgen. Durch den Einbezug weiterer Substanzen, die aktivierend oder hemmend auf δ - und κ -Opioidrezeptoren wirken, könnten Ergebnisse dieser Arbeit zu einem Fortschritt im Verständnis depressiver Erkrankungen und zu neuen Therapieansätzen beitragen.

1.9 Aktueller Stand der Literatur

Die analgetische Wirkung am μ -Opioidrezeptor ist seit über 40 Jahren Gegenstand verhaltenspharmakologischer Untersuchungen. Täglich werden Opiode im Rahmen der Schmerztherapie verschrieben. Die Toleranzentwicklung mit konsekutiver Dosiserhöhung begegnet uns im klinischen Alltag fast täglich bei primär am μ -Opioidrezeptor wirkenden Analgetika. Eine Coexpression und Interaktion von δ - und μ -Opioidrezeptoren wurde kürzlich an nozizeptiven sensorischen Neuronen nachgewiesen, die auf einen modulierenden Effekt in der Schmerzverarbeitung hinweist (33). Aktuell wird ein Augenmerk auf die δ - und κ -Opioidrezeptoren gesetzt, um möglicherweise eine Optimierung der Schmerztherapie mit neuen Wirkspektren zu erzielen. Neue oral verfügbare Medikamente, die am δ -Opioidrezeptor ansetzen und in Studien zu einer verbesserten Schmerztoleranz geführt haben sind Gegenstand neuester Untersuchungen (55). Die Anzahl der Patienten mit psychischen Krankheitsbildern stieg in den letzten Jahren an (56). Patienten mit chronischen Schmerzen leiden auffällig häufig auch an einer Depression. Bei nicht optimal eingestellten Schmerzen ist das sehr naheliegend. Betrachtet man das Rewardverhalten, so ist mehrfach die Interaktion zwischen dem dopaminergen System und dem Opioidsystem nachgewiesen (57–59). Der euphorisierende und belohnende Effekt des μ -Opioidrezeptors wurde vielfach nachgewiesen. Die euphorisierende Wirkung des δ -Opioidrezeptors und die dysphorisierende Wirkung des κ -Opioidrezeptors (60) wird in den verschiedensten Versuchsmodellen sowohl zur Sucht (61), als auch in Hinblick auf depressionsrelevantes Verhalten untersucht (62). Das endogene Opioidsystem ist maßgeblich am Rewardverhalten und somit an der Entstehung von Suchtverhalten beteiligt. Des Weiteren scheint es auch einen großen Einfluss auf die Gemütslage zu haben (63). Der μ -Opioidrezeptor spielt hierbei eine zentrale Rolle, sogar bei Substanzen, die nicht primär mit dem μ -Opioidrezeptor interagieren (64). Es wird vermutet, dass eine sekundäre Aktivierung des endogenen Opioidsystems zur Interaktion von β -Endorphin am μ -Opioidrezeptor führt und eine euphorisierende Wirkung hervorruft (65).

2 Material und Methodik

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche BALB-c/C 57 Hybrid-Mäuse, die besonders empfindlich gegenüber Substanzen sind, mit und ohne genetischer Ausstattung des μ -Opioidrezeptorgens, die im Tierlabor unseres Institutes gezüchtet werden, verwendet. Im weiteren Verlauf wurden homozygote μ -knock-out (KO)-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen (WT) gekreuzt, um heterozygote Mäuse (HZ) zu erhalten. Theoretisch wurde angenommen, dass diese Kreuzung zur Expression einer 50%igen Anzahl der μ -Opioidrezeptoren führt. Jedes Experiment wurde demnach mit WT, μ -KO und heterozygoten Mäusen unter Standardbedingungen durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung hatten die Mäuse ein Alter von 8 Wochen und wogen durchschnittlich 30g.

2.2 Haltungsbedingungen und Versuchsbedingungen

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte unter standardisierten Bedingungen, nach den Richtlinien der EU und des Deutschen Tierschutzgesetzes. Die Tierversuchsnummer lautet 2-514. Es wurde ein 12 stündiger Tag- Nacht-Rhythmus mit künstlicher Beleuchtung von 6:00 Uhr bis 18 Uhr aufrecht erhalten. Die Lufttemperatur betrug 20 -24 °C. Es herrschte eine relative Luftfeuchtigkeit von 50-60 %.

In Gruppen von maximal 11 Tieren wurden die Mäuse in Käfigen vom Macrolon Typ III mit Drahtgitteraufsatz auf einer Fläche von 900 cm² gehalten. Der Wechsel des Einstreus erfolgte einmal wöchentlich mit *Animal Bedding 3-4*. Wasser und Standardfutter (*Altromin 1326*) standen den Tieren ad libidum zur Verfügung.

Nach jedem Verhaltensexperiment erfolgte die Reinigung und Flächendesinfektion der Versuchsaapparaturen. Falls es mehrere Apparate für ein Experiment gab, so erfolgte die stochastische Verteilung der Tiere auf die Apparaturen.

2.3 Substanzen

Folgende Substanzen wurden prinzipiell mit einem Volumen von 1 ml/100 g KG injiziert:

- Natriumchlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München)
- Morphin Hydrochlorid Trihydrat (*Synopharm*, Barsbüttel)
- Ethorphan Hydrochlorid (*Grampain Pharmaceuticals limited*, UK)
- SNC80 (*Tocris Bioscience Ballwin*, USA)
- Naloxon Hydrochlorid (*Tocris Bioscience Ballwin*, USA)

Material und Methodik

- Naltrindole Hydrochlorid (*Tocris Bioscience Ballwin, USA*)
- nor-Binaltorphimine Dihydrochlorid 2H₂O (*Tocris Bioscience Ballwin, USA*)
- Pentylenetetrazol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe)
- Imipramin Hydrochlorid (*Novarits, Nürnberg*)
- ³H- DAMGO (Perkin Elmer, USA)

2.3.1 Natriumchlorid

Natriumchlorid wurde zum Ansetzen physiologischer Kochsalzlösung 0,9 % verwendet, die zur Lösung der Substanzen genutzt wurde. Weiterhin erhielten die in allen Experimenten mitgeführten Kontrollgruppen physiologische Kochsalzlösung mit einem Volumen von 1ml/100g.

2.3.2 Morphin Hydrochlorid Trihydrat

Der reine Agonist am μ , δ -und κ -Opioidrezeptor mit überwiegender μ -Opioidrezeptor-Aktivität wurde subkutan im Nackenbereich appliziert. Morphin wurde in einer Dosierung von 5, 10 und 20 mg/kg KG jeweils einer Lösung, die 1 ml/100 g Volumen ergab, verabreicht.

2.3.3 Etorphin Hydrochlorid

Das halbsynthetische Opioid besitzt eine 3200 fach höheres analgetisches Potential als Morphin und ist ein außerordentlich potenter, selektiver μ -Opioidrezeptor-Ligand (66). Er wurde erstmals 1963 aus Thebain, welches heute noch die Ausgangssubstanz vieler klinisch verwendeter Opiode ist, synthetisiert (67). Seine analgetische Wirkung wird in der Veterinärmedizin vornehmlich zur Immobilisation von großen Tieren verwendet. In vivo Rezeptorbindungsstudien haben gezeigt, dass Etorphin ein selektiver μ -Opioidrezeptor-Agonist mit niedrigem suchterzeugenden Potential ist (66). In vitro Studien gehen jedoch von einer Bindung am μ , δ -und κ - Opioidrezeptor aus (67, 166). Wir injizierten Etorphin in einer Dosierung von 20 μ g/kg KG subkutan.

2.3.4 SNC 80

(+)-4-[(α R)- α ((2S,5R)-4-Allyl-2,5demethyl-1-piperaziny)-3-methoxybenzyl]-N,N-diethylbenzamide

SNC 80 ist ein hochselektiver und potenter nicht-peptidischer δ -Opioidrezeptor-Agonist. In der experimentellen Pharmakologie kann SNC 80 zur Exploration und Identifikation spezifischer δ -

Opioidrezeptor-Effekte dienen (70). SNC 80 wurde mit einer Latenz bis zum Beginn des Experiments von 45 Minuten, in einer Dosierung von 12,5 mg/kg KG subkutan verabreicht.

2.3.5 Naloxon Hydrochlorid

Naloxon ist das N-Allylderivat von Oxymorphon und wird als reiner Opioidantagonist in mehreren Bereichen im klinischen Alltag eingesetzt. Es wirkt kompetitiv antagonistisch an allen Opioidrezeptoren, weist jedoch die höchste Affinität zu den μ -Opioidrezeptoren auf. Naloxon wurde in einer Dosierung von 10 mg/kg KG subkutan verabreicht. Die Einwirkzeit von 15 Minuten wurde beachtet.

2.3.6 Naltrindol Hydrochlorid

Naltrindol ist ein hochselektiver Antagonist am δ -Opioidrezeptor. Als nicht-peptidische Substanz gelangt er über die Blut-Hirn-Schranke ins ZNS. δ -Opioidrezeptor-Antagonisten haben bei der Behandlung von Kokainmissbrauch klinisches Potential gezeigt (69). Naltrindol wurde unter Einhaltung einer Wirkdauer von 15 Minuten, in einer Dosierung von 2 mg/kg KG subkutan verabreicht.

2.3.7 Nor-Binaltorphimin Dihydrochlorid

Der κ -Opioidrezeptor-Antagonist wirkt hoch selektiv und irreversibel (72). Nor-Binaltorphimin (nor-BNI) kann die Blut-Hirnschranke passieren und ist somit sowohl zentral als auch peripher wirksam. Seine maximale und ausschließlich κ -Opioidrezeptor-antagonistische Wirkung entfaltet nor-BNI 24 h nach Applikation, wobei die Wirkung bis zu 4 Wochen nachweisbar sein kann (73). Deshalb wurde in unseren Untersuchungen nor-BNI in einer Dosierung von 3 mg/kg KG, 24 h vor Versuchsbeginn, subkutan appliziert, um die Wahrscheinlichkeit der Besetzung aller Rezeptoren zu maximieren und um eine Nachinjektion zu vermeiden.

2.3.8 Pentylenetetrazol

Die konvulsive Wirkung des nicht-kompetitiven GABA-Rezeptor-Antagonisten wird tierexperimentell zur Untersuchung der zentralen Erregbarkeit und pharmakologischen Krampferzeugung gebraucht. Elektrophysiologische Studien zeigten, dass PTZ durch Erhöhung der Permeabilität am Kaliumkanal und durch die Herabsetzung der Refraktärzeit die Erregbarkeit der Neuronen erhöht. Bei unseren Untersuchungen wurde PTZ in NaCl 0,9% gelöst und wiederholt in

einer Dosierung von 37,5 mg/kg KG und einem Volumen von 1 ml/100 g intraperitoneal injiziert. Die Mäuse in der Kontrollgruppe erhielten ebenso häufig gewichtsadaptierte Injektionen mit Kochsalz.

2.3.9 ³H-DAMGO [D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]enkephalin

Dieses synthetisch hergestellte Enkephalin-Analogon funktioniert als selektiver μ -Opioidrezeptor-Agonist. In unseren Bindungsstudien konnten wir mit Hilfe des ³H-markierten DAMGO die Anzahl der μ -Opioidrezeptoren im frontalen Cortex und Hippocampus der Versuchstiere bestimmen.

2.4 Verhaltenspharmakologische Untersuchungen

2.4.1 Heiße Platte

Die Heiße Platte ist eine Methode zur Testung der analgetischen Aktivität bei Mäusen. Dabei können Änderungen der nozizeptiven Wahrnehmung nach Applikation eines Medikaments bzw. eines schädlichen Stimulus evaluiert werden (74). Es wurde die antinozizeptive Wirkung der Opiode bei Mäusen mit unterschiedlicher Ausstattung des μ -Opioidrezeptors untersucht.

Apparatur

Die Apparatur „Hot plate, Ugo Basile, Comerio, Italy“ bestand aus einer beheizbaren Metallplatte mit einem Durchmesser von 19 cm und einer transparenten Kunststoffwand, die rund um die Metallplatte angebracht war. Sie besaß eine Höhe von 35 cm und hinderte die Maus daran, während des Experiments, die Apparatur zu verlassen. Die Sicht und somit die Interpretation der Reizantwort der Mäuse ist jedoch gewährleistet. Weiterhin war ein Trittschalter zur Bedienung einer Stoppuhr mit der Apparatur verbunden.

Versuchsablauf

Die Heiße Platte wurde auf eine konstante Temperatur von 56 °C beheizt. Die Maus wurde darauf gesetzt und die Reaktionszeit [s] als Schmerzschwelle ermittelt, bei der eine Schmerzreaktion des Tieres erfolgte. Die Schmerzreaktionen waren definiert als: Lecken der Hinterpfoten und Trampeln mit den oder Heben der Hinterpfoten. Sprang das Tier über die Kunststoffwand, wurde es aus dem Experiment entfernt. Reagierte das Tier innerhalb von 30 Sekunden nicht, wurde es von der Platte genommen, um thermische Verletzungen zu vermeiden. Zuerst erfolgten Vormessungen an der Heißen Platte bei naiven Mäusen. Anschließend folgten 30 Minuten nach Morphininjektion 10 mg/kg KG s.c. die erneute Messung unter gleichbleibenden Bedingungen bei denselben Tieren. Die Reaktionszeit [s] wurde 30 Minuten nach Applikation der Substanz beurteilt. Die Messung der Reaktionszeit vor und nach Applikation des Morphins ermöglichte zusätzlich zu den ermittelten Schmerzschwellen, die Berechnung des Analgetischen Index ($AI = \frac{HMW[s] - VMW[s]}{MaxMW[s]}$ -

VMW[s]). In einer weiteren Versuchsreihe wurde im Rahmen der Vormessung Kochsalz und SNC80 12,5mg/kg KG s.c. 45 Minuten vor der Hauptmessung verabreicht. Dadurch sollten Beeinflussungen der Ergebnisse durch die Injektion bzw. des zusätzlichen Handlings minimiert werden.

2.4.2 Schwanzwurzelreizung

Mit der elektrischen Schwanzwurzelreizung wird die Stromintensität ermittelt, bei der das Tier mit einer Vokalisation als Schmerzreaktion antwortet und diese als Schmerzschwelle festgelegt (75).

Apparatur

Die in unserem Institut gebaute Apparatur besteht aus 12 Kunststoffzylindern (12 cm lang, Innendurchmesser 3 cm). Die Innenwände sind mit rostfreiem Edelstahl ausgekleidet.

Versuchsablauf

Die Mäuse wurden für die Schwanzwurzelreizung in folgender Form präpariert: Es wurde ein 0,1mm durchmessendes rostfreies Stahldraht mithilfe einer chirurgischen Nadel subkutan Schwanzwurzelnah implantiert und verknotet, so dass ca. 1 cm des Drahtes sichtbar als Elektrode dienen konnte. 24 h nach der Präparation erfolgte die Einteilung der Versuchstiere in die einzelnen Versuchsgruppen, hierbei wurde darauf geachtet, dass opioidnaive Tiere gleichmäßig auf die Etorphin -und Kochsalzgruppen eingeteilt wurden. Für die Testung wurden die Tiere in die Kunststoffzylinder gesetzt. Die metallische, als indifferente Elektrode dienende Innenauskleidung des Zylinders und der in der Schwanzwurzel implantierte Draht jeden einzelnen Tieres, wurden mit einem Reizstromstimulator verbunden. Mit dem Stimulator (TUR RS12) wurde stromkonstant mit Rechteckimpulsen (Impulsbreite 50 ms, Frequenz 50 Hz) und kontinuierlich ansteigender Stromstärke gereizt, bis das Tier mit einer Vokalisation als Schmerzantwort auf den Reiz reagierte. Als Maximalwert der Stromstärke wurden 300 mA festgelegt, um eine physikalische Schädigung durch hohe Stromintensitäten zu vermeiden. Auf diese Weise wurden vor und nach Applikation der Substanzen die Schmerzschwellen ermittelt.

Zeit [Min]	Durchführung
X-30	Vormessung durch Schwanzwurzelreizung und Heiße Platte
X	Substanz Injektion s.c. (NaCl 1ml/100g bzw. Etorphin 20µg/kg)
X+30	Hauptmessung durch Schwanzwurzelreizung und Heiße Platte

2.4.3 Körpertemperatur

Die Körperkerntemperatur wurde mit einem digitalen Thermometer der Marke „*ama-digital ad 15th der Firma A-Precision*“, die Temperaturen im Bereich von -40 °C bis 120 °C wahrnehmen kann, gemessen. Die Messungen erfolgten individuell mit einer Metallsonde, die 3 cm rektal eingeführt wurde. Um innere Verletzungen zu vermeiden wurde die Sonde mit Vaseline beschichtet. Zunächst wurde die Körpertemperatur von naiven Mäusen gemessen, 30 Minuten nach Morphininjektion 10 mg/kg KG oder SNC 80 Injektion 12,5 mg/kg s.c. wurde die Messung wiederholt.

2.4.4 Conditioned Place Preference (CPP)

Apparatur

Die T-förmige Apparatur bestand aus zwei Bereichen, die sich farblich voneinander unterschieden. Ein weißer und schwarzer Arm wurden durch einen grauen Bereich voneinander getrennt, der als neutrale Zone fungierte und wo das Tier zum Versuchsbeginn eingesetzt wurde, um sich anschließend anhand der Reize für einen Bereich zu entscheiden. Am Eingang des hellen und des dunklen Kompartiments waren Sensoren angebracht, die den Durchtritt der Maus erkannten und diese Information an einen Computer weiterleiten. Die Dauer des Aufenthaltes im jeweiligen Bereich konnte so ausgewertet werden. Der graue Bereich maß eine kleinere Fläche (15 cm x 10,5 cm) als die anderen Bereiche (jeweils 40,5 cm x 13 cm). Alle Bereiche waren mit gleichfarbigen Wänden ausgestattet, die hoch genug waren, damit die Mäuse nicht aus der Apparatur springen konnten. Hin und wieder schaffte es jedoch eine Maus zu entkommen und musste mühsam eingefangen werden. Die erhobenen Daten wurden dann verworfen. Gleichfarbige Trennwände konnten das jeweilige Versuchstier daran hindern, einen Bereich (heller oder dunkler Arm) zu verlassen, so wie es im Training verlangt wurde. Dabei musste nicht der Aufenthalt in einem Bereich untersucht werden. Der Boden des weißen Arms war mit einer Metalleinlage ausgelegt, welche grobe Öffnungen enthielt; der Boden des schwarzen Armes besaß eine korbgeflechtartige Metalleinlage. Die unterschiedlichen Bodenbeschaffenheiten dienten zusätzlich zur unterschiedlichen farblichen Ausstattung als taktiler Reiz.

Habituation

Die Maus wurde in den grauen Bereich der Apparatur gesetzt. Sie konnte sich frei zwischen den verschiedenen Bereichen bewegen. Die Aufenthaltsdauer ging als prozentualer Anteil der Gesamtzeit (Habituation = 15 Minuten) in die Auswertung und in die weitere Versuchsplanung ein. Nach einer zweitägigen Habituationsphase wurde für jede Maus, je nachdem wo sie sich länger auf enthielt, (anhand des prozentualen Aufenthalts) der präferierte und nicht präferierte Arm, ermittelt.

Die Einteilung der Tiere auf die verschiedenen Versuchsgruppen erfolgte so, dass die Mittelwerte des Aufenthalts in jeder Behandlungsgruppe gleich verteilt waren.

Training

Das Training erfolgte an vier aufeinanderfolgenden Tagen. Dabei wurden am ersten und dritten Tag Morphin injiziert. Danach wurde die Maus in den von ihm vorher nicht präferierten Arm eingesetzt. Am zweiten und vierten Tag wurde NaCl 0,9 % injiziert und die Maus wurde in den von ihm vorher präferierten Arm eingesetzt. Die Versuchstiere wurden 15 Minuten im jeweiligen Bereich gehalten; Trennwände verhinderten den Übertritt in andere Bereiche der Apparatur. Dabei wirkte der belohnende Effekt des Morphins im zuvor nicht präferierten Bereich und entsprechend die physiologische Kochsalzlösung im zuvor präferierten Arm, auf die Maus ein. Hier erfolgte keine Messung der Aufenthaltsdauer.

Test

Am fünften Tag wurden die Mäuse für 30 Minuten in die Apparatur hineingesetzt und konnten sich, wie während der Habituation, frei zwischen den verschiedenen Bereichen bewegen. Die Aufzeichnung der prozentualen Aufenthaltsdauer der Maus im schwarzen oder weißen Arm wurde erneut über die Sensoren ermöglicht. Es erfolgte eine erneute Auswertung der mittleren Aufenthaltsdauer in den verschiedenen Bereichen. Hatte die Applikation der Testsubstanzen dazu geführt, dass der vorher nicht präferierte Bereich nun präferiert wurde, konnte von einer morphininduzierten, konditionierten Platzpräferenz ausgegangen werden.

2.4.5 Motilitätsmessung

Apparatur

Die Motilitätsbox (MOTI-TEST, TSE-System, Bad Homburg, Deutschland) diente der Analyse der Aktivität. Sie stellte eine 45x45x50 cm große, würfelförmige Apparatur dar, deren Seitenwände aus transparentem Plexiglas und dessen Boden aus grauem Kunststoff bestanden. Eine Öffnung befand sich am oberen Ende. Auf einer Höhe von 4 cm und 8 cm über dem Bodenniveau waren im Bereich der Seitenwände zwei horizontal verlaufende, jeweils 60 Infrarotsensoren enthaltende Rahmen installiert. Jede Bewegungsaktivität der Tiere in horizontaler und vertikaler Richtung führte zu einer Unterbrechung der Infrarotstrahlung und wurde mit einer Frequenz von 10 Hz erfasst. Die Apparatur war mit einem Computer verbunden, der die verschiedenen Mobilitätsparameter der Maus als Bewegungen in der x-, y-, und z-Koordinate, aufzeichnete (75).

Versuchsablauf

Die Versuchstiere wurden in die Mitte der Box gesetzt. Bei gedämmtem Licht (30 Lux) und unter menschlicher Abwesenheit wurden die Aufzeichnungen gestartet. Die Bedingungen während der Habituation entsprachen denen des Tests. Nach einer 15 minütigen Habituation mit der

Registrierung der Aktivität erfolgte die Injektion der Testdosis (Morphin 5 mg/kg) und es folgte eine erneute, unmittelbar anschließende 30 minütige Aufzeichnung der Aktivität. Die Apparatur erlaubte die Berechnung einer Vielzahl von Aktivitätsparametern: wie die Gesamtaktivitätszeiten [s], die gelaufene Strecke [m] und die Häufigkeit des Aufrichtens [n]. Wir interessierten uns vor allem für die Darstellung der gelaufenen Gesamtstrecke [m], sowie für die zurückgelegte Strecke in der Mitte der Motilitäts-Box [m].

Durch die Bereitstellung von 4 Motilitäts-Boxen konnte zeitgleich die Aktivitäten von vier Mäusen aufgezeichnet werden. Die Verteilung der Tiere auf die Anlagen erfolgte stochastisch.

2.4.6 Angstschwellenbestimmung

Apparatur

Die Shuttle Box der Firma TSE (Technical Science Equipment GmbH) kann zur Bestimmung der Angstschwelle nach elektrischer Reizung für Mäuse genutzt werden. Die rechteckige Apparatur besaß graue Seitenwände sowie eine transparente Front- und Rückseite. Sie bestand aus zwei gleich großen Kompartimenten, die durch eine Hürde getrennt waren. Der Boden der Box bestand aus einem Stahlgitter (31 cm x 13 cm), welches durch Stäbe gebildet wurde. Der Abstand der einzelnen Stäbe betrug 1cm und der Durchmesser der Stäbe 1,5 mm. Über installierte Fußroste konnte ein elektrischer Fußreiz (Rechteckimpuls, Frequenz 50 Hz) appliziert werden. Die Reizintensität konnte von 0,05 bis 1,5 mA gewählt werden. Die Shuttle Box war an einen Computer angeschlossen, welcher die Anzahl der Reize und die Stromstärke digital verarbeitete. Die Beurteilung des *freezing* erfolgte für jedes Versuchstier einzeln, durch den Versuchsleiter, wobei die Stromstärke, bei der das Tier eine *freezing-Reaktion* zeigte, als Angstschwelle festgehalten wurde.

Versuchsablauf

Die maximale Stromstärke wurde auf 0,7 mA gesetzt, die minimale Stromstärke betrug 0,05 mA. Die Erhöhung der Stromstärke erfolgte in 0,025 mA Schritten. Die Maus wurde in die Apparatur eingesetzt. Nach einer Habituationszeit von 240 Sekunden begann die elektrische Reizung mit der Dauer von 1 Sekunde. Es wurde dreimalig mit derselben Stromstärke gereizt bevor eine Erhöhung der Stromstärke erfolgte. Es resultierte die maximale Anzahl der elektrischen Reize von 78. Die maximale Reizdauer betrug 10 s. Beurteilt wurde die Reaktion der Maus auf den elektrischen Fußreiz. Als Reaktion wurden folgende Reizantworten des Tieres definiert: *freezing* bedeutete, dass das Tier absolut regungslos war und nur der Herzschlag und die Atmung durch den Versuchsleiter wahrnehmbar waren (Angstschwelle); *escape* war der zweimalige Wechsel auf die reizfreie Seite der Box innerhalb einer Stromstärke. Die unmittelbar vor dem Wechsel gemessene Stromstärke stellte die Fluchtschwelle der jeweiligen Maus dar [mA]. Ein Sprung auf die Hürde wurde als Wechsel gewertet. Zu beachten waren außerdem folgende Bedingungen: ein Vertreiben der Maus

von der Hürde durfte weder durch Erhöhung der Stromstärke, noch manuell erfolgen. Ein Wechsel wurde nur gewertet, wenn ein Reiz vorgeschaltet war. Die digital ermittelten Werte für die Phänomene *freezing* und *escape* in [mA] gingen anschließend in die statistische Auswertung ein.

2.4.7 Startle Response

Der *startle* Reflex zählt zu den phylogenetisch alten, bei allen Säugetieren vorkommenden Reflexen. Es handelt sich um eine universell motorische Antwort auf unerwartete, stärkere sensorische Reize in Serie. Er zählt zu den Hirnstammreflexen, die der Regulation höherer Hirnzentren unterliegen. Ausgelöst wird dabei eine nicht unterdrückbare, protektive Reaktion, die rasch habituiert. Der Auslöser kann jeder sensorische Stimulus, ausreichender Intensität und Dauer sein. In unseren Untersuchungen kamen akustische Reize zur Anwendung.

Apparatur

Die Apparatur (Startle Response TSE, Bad Homburg, Deutschland) bestand aus einer ventilierten schallgedämpften Box (42 x 42 x 42 cm), mit einer 5 Watt-Neon-Innenbeleuchtung. Im Innenraum, der mit grauem Schaumstoff gepolstert war, befand sich ein 8 x 5 x 5,5 cm großer Metallgitter-Käfig, welcher auf einer 19 x 14 cm großen Metallplatte befestigt war. Den Käfigboden bildete ein 1 cm hoher Lattenrost, dessen Gitterstäbe im Abstand von 0,5 cm zueinander standen. Akustische Signale, erzeugt in einem digitalen Generator (Waldmann, SigGen-PC), wurden über Lautsprecher, die auf jeder Seite der Box in einem Abstand von 4 cm angebracht waren, präsentiert. Die Stärke der Bewegung des Tieres nach dem akustischen Reiz wurde anhand eines Transducers gemessen, der sich am Boden des Metallgitter-Käfigs befand. Dieser konnte einwirkende Kräfte bei der Reaktion des Tieres, von 0 - 10 Newton registrieren und diese umwandeln. Die aufgewendete Kraft der Schreckreaktion nach den Tonreizen wurde in [g] angegeben. Die gemessenen Werte waren definiert als Durchschnittswerte, die 50 ms nach dem Stimulus zum Reaktionszeitpunkt des *startle* Reflexes abgelesen wurden.

Versuchsablauf

Die Maus wurde in den Metallgitter-Käfig innerhalb der Apparatur auf den Transducer gesetzt. Nach einer 5 minütigen Habituation erfolgte die Präsentation von Schallpulsen in der Länge von 30ms und einer Schallstärke von 120 dB in unterschiedlichen Abständen. Die Schreckreaktion der Maus wurde anhand seiner Bewegungen und die damit verbundene Gewichtsveränderung nach dem Reiz, durch den Transducer gemessen und in [g] umgewandelt wiedergegeben. Diese Werte gingen in die statistische Auswertung ein.

2.4.8 Tail suspension Test

Der *tail suspension* Test ist eine etablierte Methode zur Untersuchung depressionsrelevanten Verhaltens.

Apparatur

Die Apparatur bestand aus einem Stab und einer daran angebrachten Vorrichtung zur Befestigung der Schwanzspitze des Nagers.

Versuchsablauf

Beim *tail suspension* Test wurden die naiven Mäuse in der oben genannten Vorrichtung, 40cm über dem Boden kopfüber am Schwanz, 1cm von dessen Spitze entfernt, aufgehängt. Sie wurden über einen Zeitraum von 360 Sekunden beobachtet. In den ersten 60 Sekunden versuchten sich die Tiere durch lebhaftere Bewegungen aus ihrer Lage zu befreien. Daher wurde die erste Minute in diesem Versuch nicht berücksichtigt. Im weiteren Zeitverlauf zeigten die Versuchstiere hingegen immer wieder Phasen von Regungslosigkeit. In diesen Phasen nahmen sie eine charakteristische Haltung ein, bei der alle vier Pfoten eng am Körper gehalten wurden. Jene Immobilitätsphasen wurden von der zweiten bis zur sechsten Minute beurteilt. Die kumulative Dauer wurde in [s] angegeben. Tiere, die durch zu heftige Bewegungen aus der Apparatur herunterfielen und solche, denen es gelang, am eigenen Schwanz empor zu klettern, wurden aus dem Experiment entfernt. Durch Polsterung der Klemmapparatur konnte weitgehend sichergestellt werden, dass die Mäuse keinen Schmerz empfanden und keine mechanischen Schäden erlitten.

Der *tail suspension* Test erfolgte bei naiven Tieren sowie unter der Wirkung folgender Opioidantagonisten:

- **Naloxon** 10 mg/kg s.c., 15 Minuten VBZ
- **Naltrindol** 2 mg/kg s.c., 15 Minuten VBZ
- **Nor-Binaltorphimin** 3 mg/kg s.c., 24 Stunden VBZ
- **SNC 80** 12 mg/kg s.c., 45 Minuten VBZ

Kontrollgruppen erhielten zum selben Zeitpunkt und mit entsprechender Vorbehandlungszeit NaCl 0,9 %. Die Dauer der Immobilität in [s] ging in die statistische Auswertung ein.

2.4.9 PTZ Kindling

Beim PTZ-Kindling wurde anfänglich eine subkonvulsive Dosis von 37,5 mg/kg KG Pentylenetetrazol (ED₁₆ für die Induktion tonisch-klonischer Krämpfe) jeweils am Montag, Mittwoch und Freitag i.p. appliziert. Das konvulsive Verhalten wurde 20 Minuten nach jeder Injektion beobachtet und die resultierende Krampfstufe wie folgt klassifiziert:

Stadium 0: keine Reaktion

Stadium 1: faziale und orale Zuckungen

Material und Methodik

Stadium 2: konvulsive Bewegungen über den gesamten Körper ohne Aufrichtung

Stadium 3: myoklonische Zuckungen, mit Aufrichtung

Stadium 4: fokal tonisch-klonischer Anfall; Wechsel in die Seitenlage

Stadium 5: generalisierte tonisch-klonische Anfälle, Haltungsverlust

Die Dauer des Versuchs umfasste 13 Injektionen. So konnte die Wirkung einer kumulativen Gabe von zunächst subkonvulsiven Dosen beobachtet werden. Die Mäuse der Kontrollgruppen erhielten die gleiche Anzahl an Injektionen mit physiologischer Kochsalzlösung. Resultierende Krampfstufen (1-5) vom 1. Tag bis zum 13. Tag gingen in die statistische Auswertung ein, um eine Aussage über die Krampfentwicklung treffen zu können.

2.4.10 Bindungsstudie mit [³H-DAMGO]

Die μ -Opioidrezeptordichte wurde durch eine Bindungsstudie ermittelt. Das Funktionsprinzip ist die Inkubation und somit die Markierung der zu untersuchenden Gewebeproben mit radioaktiv markiertem ³H-DAMGO, nach dem diese auf Objektträger aufgezogen wurden. Die Auswertung erfolgte durch Densitometrie nach Exposition dieser Schnitte auf einem [³H]-sensitiven Film.

Radioligand-Bindungsstudie

Die Mäuse wurden dekapitiert, die Kalotten entfernt und die Gehirne herauspräpariert. Die Hippocampi sowie die frontales Cortices wurden freigelegt, abgetragen und sofort in vorgekühlten Behältern kryokonserviert. Anschließend wurden die Proben in 50 mM Tris- HCl Puffer (pH 8,7) bestehend aus 1 mM EGTA, 2mM EDTA und 5 mM MgCl₂ homogenisiert und für 15 Minuten bei 50.000g zentrifugiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen der Pellets mit Puffer. Die resultierenden Pellets wurden mit dem oben genannten Puffer resuspendiert. Aliquote der Suspension mit einem Proteinanteil von jeweils 50-100 μ g synaptischer Membranen wurden für 40 Minuten bei 25 °C mit 2.5 nM ³H- DAMGO (SA 1.43 TBq/mmol, Perkin Elmer, USA) inkubiert. Dabei wurde die Konzentration im Bereich des oberen Umschlagpunktes der Bindungskurve nahe der vollständigen Sättigung gewählt (203). Die Werte stellen Punktbindungen dar. Die spezifische Bindung wurde durch die Subtraktion der nicht spezifischen Bindung von der Gesamtbindung mit dem Radioliganden berechnet. Die nicht spezifische Bindung war hierbei definiert als jene Bindung, die bei Inkubation mit 1 μ M nicht markierter DAMGO, nachgewiesen werden konnte. In jeder Gruppe wurden 6- 8 Tiere untersucht.

2.5 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung der Versuche wurde die PC-Software SPSS 15 und 17 für Windows verwendet.

Es erfolgten multivariate Varianzanalysen mittels *Two-Way ANOVA* mit nachfolgender post hoc Analyse nach *Bonferroni und Dunnet* (2-seitig) bei vorrausgegangener statistischer Signifikanz mit $p < 0,05$. Dies erfolgte im Einzelnen für die Versuche der Heißen Platte, Körpertemperatur, Lokomotion, CPP, Angst- und Schmerzschwellenbestimmung sowie für die *startle response* und den *tail suspension* Test. Die PTZ-Kindlingskurven wurden mit Hilfe der ANOVA mit Messwertwiederholungen (repeated measures) ausgewertet. Die Auswertung der DAMGO-Bindungsstudie erfolgte mittels *One-way-ANOVA* und anschließender post hoc Untersuchung nach *Bonferroni und Dunnet*. Beim Versuch der Angst- und Schmerzschwellenbestimmung und der *startle response* ergab die Überprüfung der Normalverteilung mittels Levene Test keine Normalverteilung bzw. Varianzhomogenität. Daher erfolgte hier die statistische Auswertung mit dem parameterfreien *Kruskal-Wallis-Test (H-Test)* und anschließender paarweiser Vergleiche auf signifikante Mittelwerte. Der *tail suspension* Test wurde mittels univariater Varianzanalyse mit anschließender post hoc Berechnung nach Bonferroni ausgewertet. Eine Überprüfung der ist durch einen niedergelassenen Statistiker erfolgt.

3 Ergebnisse

3.1 Grundeffekte

3.1.1 ^3H -DAMGO- Bindung

Als Voraussetzung für alle verhaltenspharmakologischen Experimente untersuchten wir die spezifische μ -Opioidrezeptorbindung mit dem μ -Opioidrezeptor-Agonisten ^3H -DAMGO an einer stochastisch ausgewählten Tiergruppe.

DAMGO Bindung frontaler Cortex

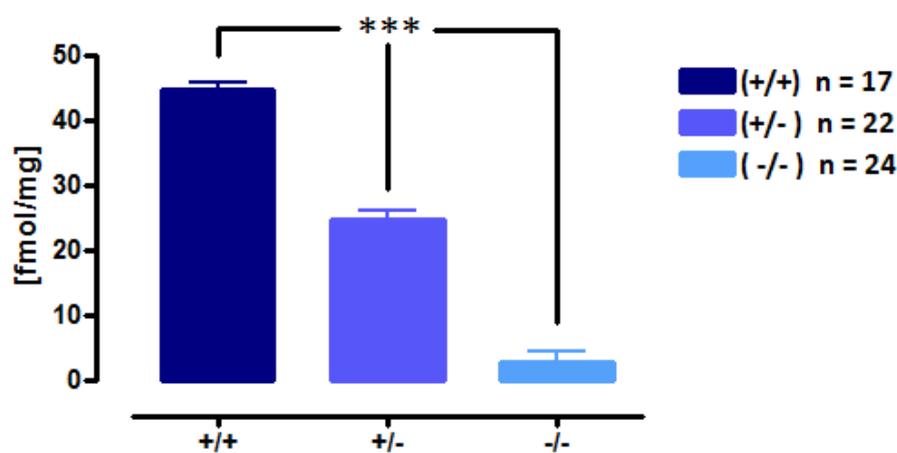


Abb. 1) ^3H -DAMGO Bindung bei unterschiedlichen Genotypen im frontalen Cortex
Abszisse: Genotypen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl und Untersuchungen am frontalen Cortex. Ordinate: Bindung des μ -Agonisten ^3H -DAMGO in [fmol/mg]. Angegeben sind MW \pm SEM; One-Way ANOVA Test: post hoc Bonferroni/Dunnett T-Test *** $p < 0,001$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO)

DAMGO Bindung Hippocampus

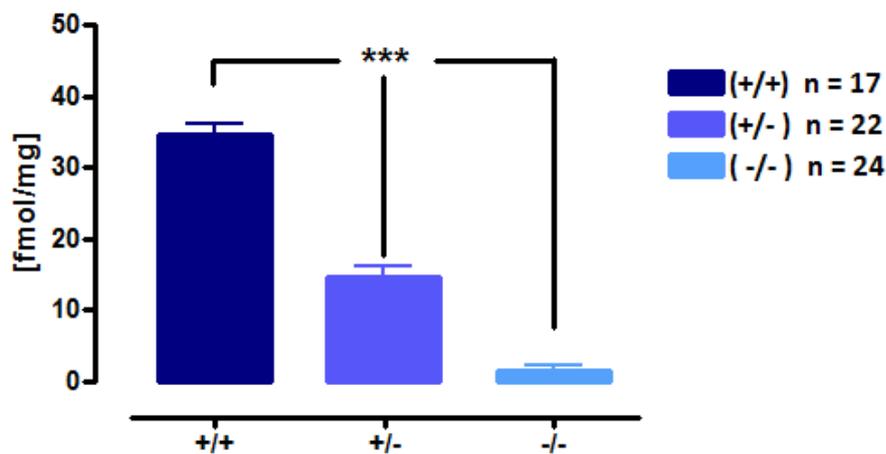


Abb. 2) ^3H -DAMGO Bindung bei unterschiedlichen Genotypen im Hippocampus

Abszisse: Genotypen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl und Untersuchungen am Hippocampus. Ordinate: Bindung des μ -Agonisten ^3H -DAMGO in [fmol/mg]. Angegeben sind MW \pm SEM; One-Way ANOVA Test: post hoc Bonferroni/Dunnett T-Test *** $p < 0,001$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO)

Untersucht wurde die Bindung des μ -Opioidrezeptor selektiven Tritium-markierten Agonisten DAMGO im Hippocampus (Abb.2) und frontalen Cortex (Abb.1) von 63 naiven BALB-C/C 57-Mäusen. Wildtypen zeigten hierbei die höchste μ -Opioidrezeptorbindung in beiden Hirnregionen auf (Abb.2: Hp: \bar{x} = 35,2 fmol/mg, Abb.1: FX: \bar{x} = 45,8 fmol/mg). Die μ -Opioidrezeptor-KO-Mäuse zeigten die geringste DAMGO-Bindung am μ -Opioidrezeptor (Abb.2: Hp: \bar{x} = 3,2 fmol/mg, Abb.1: FX: \bar{x} = 4,1 fmol/mg). Heterozygote Tiere wiesen eine mittlere μ -Opioidrezeptordichte mit einer Bindung von 18,2 fmol/mg in den Hippocampi und 24,6 fmol/mg in den frontalen Cortices auf. Die spezifische μ -Opioidrezeptorbindung der HZ-Mäuse lag zwischen den, der untersuchten WT- und KO-Mäuse. Der Vergleich der Rezeptorbindungen zwischen den einzelnen Tiergruppen zeigte einen hochsignifikanten Unterschied (Hp: $F_{2,57} = 230,28$; $p < 0,0001$ und FX: $F_{2,57} = 422,27$; $p < 0,0001$). Die Ergebnisse beweisen eine hohe Stabilität der μ -Opioidrezeptor-Ausstattungen der einzelnen Tiergruppen in der Zucht.

3.2 Morphineffekte

3.2.1 Einfluss der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf Analgesie und Körpertemperatur

Um die Auswirkung einer unterschiedlichen Anzahl an μ -Opioidrezeptoren auf Analgesie und Körpertemperatur zu prüfen, untersuchten wir naive Mäuse im Versuch der Heißen Platte und

Ergebnisse

fürten Körpertemperaturmessungen durch. Die Messungen der Reaktionszeit in [s] vor und nach Applikation des Morphins stellten Absolutwerte dar. Aus diesen Werten wurde der Analgetische Index (AI), als Ausdruck der analgetischen Wirkung errechnet. Der AI konnte einen Wert zwischen 0 und 1 annehmen, wobei ein AI von 1 gleichbedeutend war mit einer maximalen analgetischen Wirkung, und ein Wert von 0 bedeutete, dass keine analgetische Wirkung vorhanden war.

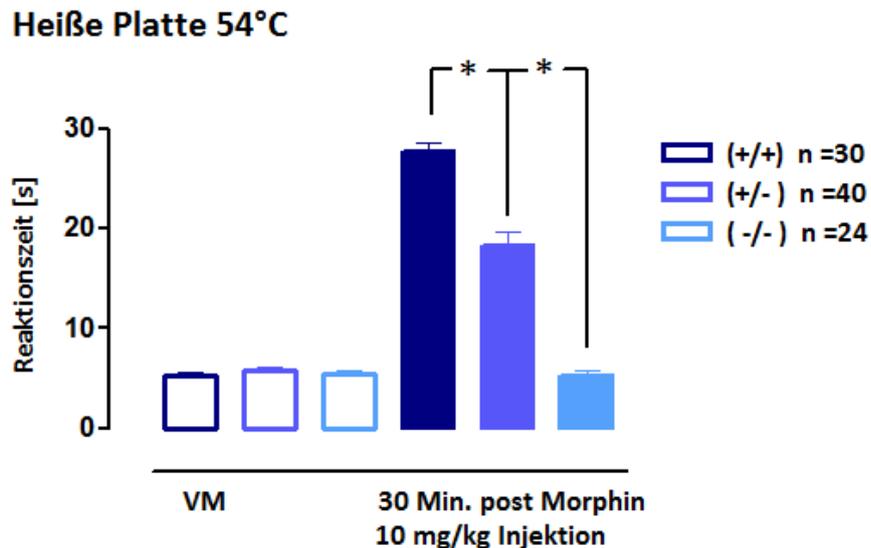


Abb. 3) Schmerzschwelle bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung
Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung unterteilt in Vormessung (naive Tiere) und Hauptmessung (30 Minuten nach Morphininjektion 10 mg/kg s.c.); Ordinate: Schmerzschwellenbestimmung durch Untersuchung der Reaktionszeiten in Sekunden [s] auf der Heißen Platte mit und ohne Morphininjektion. Angegeben sind MW \pm SEM; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Ergebnisse

Körpertemperatur

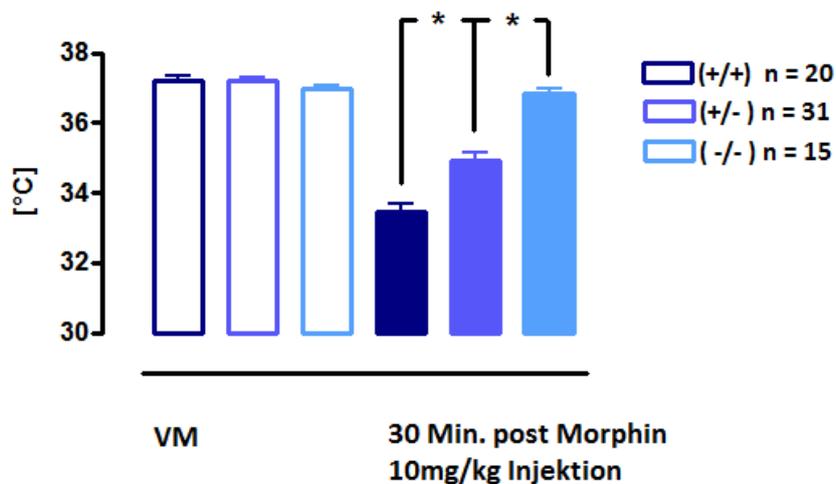


Abb. 4) Wirkung von Morphin auf die Körpertemperatur

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung unterteilt in Vormessung (naive Tiere) und Hauptmessung (30 Minuten nach Morphininjektion 10 mg/kg s.c.); Ordinate: Körpertemperatur in [°C] der naiven Versuchstiere sowie nach Morphininjektion. Angegeben sind $MW \pm SEM$; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Analgetischer Index Heiße Platte

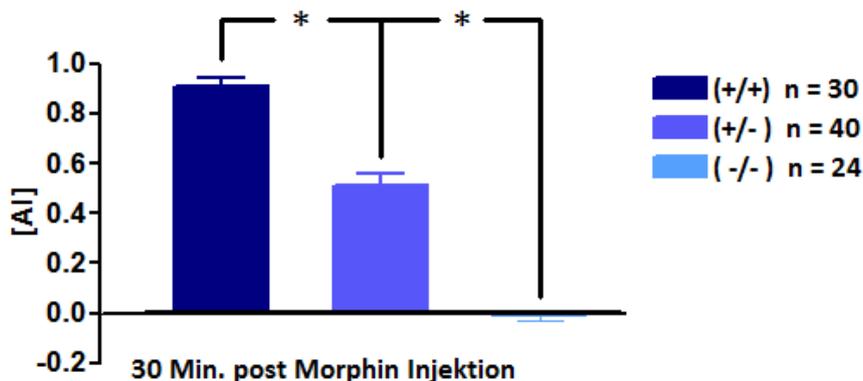


Abb. 5) Analgetische Indizes (AI) für die Wirkung von Morphin

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung; Ordinate: Analgetischer Index nach $(AI = \frac{HMW-VMW}{MaxMW-VMW})$. Angegeben sind $MW \pm SEM$; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Die Abbildungen 3-5 zeigen, dass es keine Unterschiede in den basalen Schmerzschwellen ($F_{2,92} = 0,79$; $p = 0,45$) auf der Heißen Platte (Abb.3) und den Basalwerten für die Körpertemperaturen ($F_{2,64} = 1,5$; $p = 0,23$) zwischen den Mäusen mit oder ohne μ -Opioidrezeptoren gab (Abb.4). Der Effekt der Testdosis Morphin war dagegen signifikant unterschiedlich ($F_{2,92} = 91,64$; $p = 0,001$). 10 mg/kg Morphin erzeugte bei den Wildtypen den stärksten antinozizeptiven Effekt im Vergleich zu den HZ und KO-Mäusen. Die μ -Opioidrezeptor-KO-Mäuse zeigten keinen Morphineffekt. Der Vergleich

Ergebnisse

dieser beiden Gruppen ergab in der Fragestellung des Morphineffekts einen hochsignifikanten Unterschied (WT vs. KO $p=0,001$) (Abb.4 und 5). Die Schmerzschwellen, die 30 Minuten nach Morphininjektion ermittelt wurden, unterschieden sich bei den KO-Mäusen nicht von den Schmerzschwellen der Vormessungen ohne Substanzapplikation (Abb. 3), woraus sich ein analgetischer Index von 0 ergab (Abb. 5). Bei den heterozygoten Tieren führte die Morphininjektion zu einem halb so hohen analgetischen Effekt (Abb.5). Die Effekte der Morphininjektion auf die Körpertemperatur (Abb.4) im Vergleich zwischen den WT, HZ und KO-Mäusen zeigte signifikante Unterschiede ($F_{2, 64} = 40,38$; $p= 0,001$). Bei den Wildtyp-Mäusen erzeugten 10 mg/kg Morphin die stärkste Senkung der Körpertemperatur von mehr als 3 °C, bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen war kein Effekt nachweisbar. Der Morphineffekt bei den heterozygoten Mäusen lag zwischen dem der WT -und KO-Mäuse (-2 °C). Bei den Vormessungen unterschieden sich die Körpertemperaturen der Versuchsgruppen nicht voneinander. Ein Grundeffekt der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Ausstattung auf die Körpertemperatur konnte somit vernachlässigt werden.

3.2.2 Einfluss der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Lokomotion

Es wurden für die Erfassung der Beeinflussung der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Lokomotion bzw. Motivation zur Fortbewegung, 61 naive BALB-C/C 57 in der Motilitäts-Box untersucht. Zur Beurteilung der Morphineffekte auf die Lokomotion, von Mäusen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl, wurde das Verhalten der Tiere nach Morphinapplikation untersucht.

Morphinwirkung auf die Lokomotion

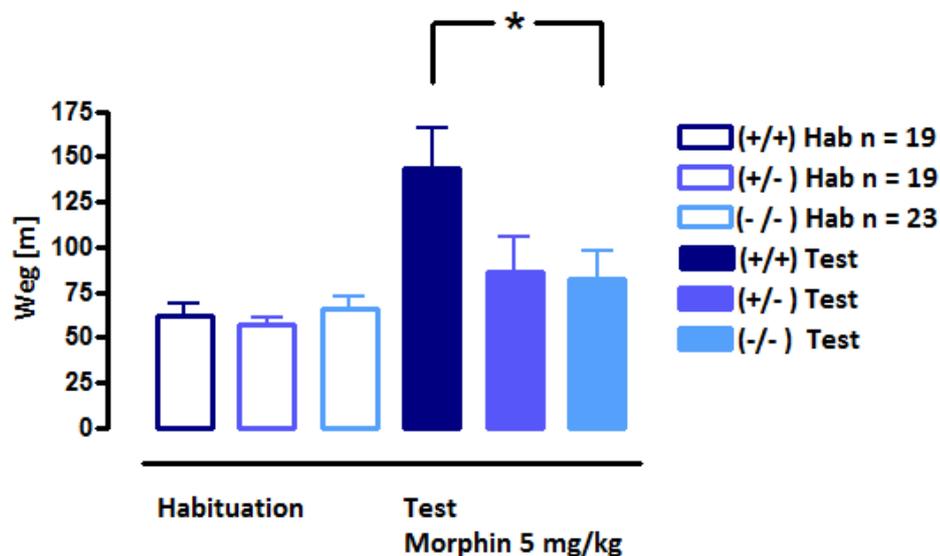


Abb. 6) Morphinwirkung auf die Lokomotion

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung, unterteilt in Habituation und Morphinwirkung (5 mg/kg); Ordinate: zurückgelegter Gesamtweg [m] in 30 Minuten Testphase. Angegeben sind $MW \pm SEM$; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Morphinwirkung auf die geschützte Lokomotion

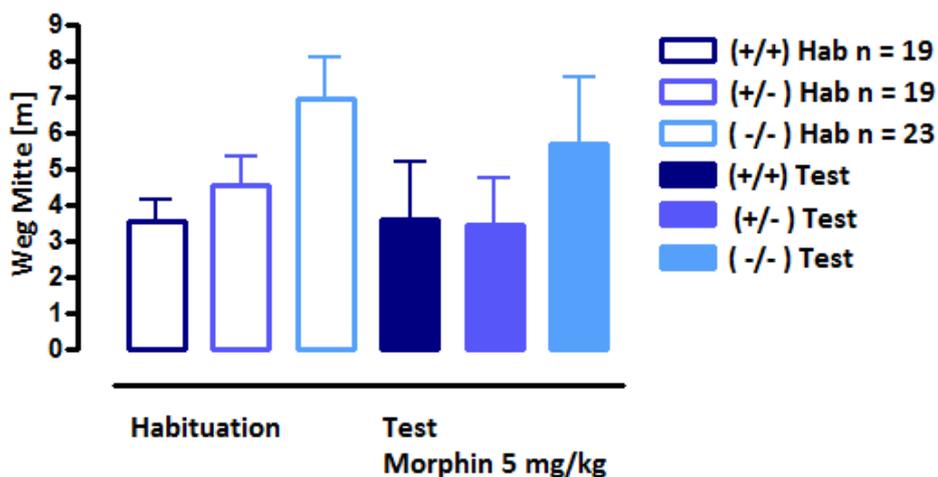


Abb. 7) Morphinwirkung auf die geschützte Lokomotion

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung, unterteilt in Habituation und Morphinwirkung (5 mg/kg); Ordinate: zurückgelegter Gesamtweg [m] in 30 Minuten Testphase. Angegeben sind $MW \pm SEM$.

Ergebnisse

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen, dass während der 15 minütigen Habituation keine Unterschiede bezüglich der Laufstrecken in [m] zwischen WT, HZ -und KO-Mäuse festzustellen waren ($F_{2,59} = 0,235$; $p=0,791$). Nach Applikation des Morphins (5 mg/kg) war der Behandlungseffekt signifikant unterschiedlich in Abhängigkeit vom Status: WT, HZ oder KO ($F_{2,59} = 3,547$ $p<0,05$). Die morphininduzierte Aktivierung war bei den WT am stärksten, bei den KO-Mäusen kaum vorhanden und bei den HZ- Mäusen etwas ausgeprägter zu beobachten (Abb. 6). Post hoc war der Behandlungseffekt zwischen den WT und KO-Mäusen signifikant unterschiedlich ($p<0,05$), er konnte weder zwischen den HZ und WT ($p= 0,11$), noch zwischen den HZ und KO-Tieren gesichert werden ($p=1$). Wird der in der Mitte der Motilitäts-Box zurückgelegte Weg betrachtet (Abb.7), so war kein signifikanter Unterschied zwischen WT, HZ und KO-Mäusen zu verzeichnen, und zwar weder während der Habituation ($F_{2,59} = 1,823$; $p= 1,711$) noch nach der Morphininjektion ($F_{2,59} = 0,362$; $p= 0,698$) zu sichern. In der Mitte der Motilitätsbox konnte kein Morphineffekt in Abhängigkeit vom Status gesichert werden. Die μ -Opioidrezeptor-KO-Mäuse legten während der Habituation den längsten Weg in der Mitte zurück ($\bar{x}= 6,94\text{m}$; $\text{SEM}= 1,15$ vs. WT: $\bar{x}= 3,52\text{m}$; $\text{SEM}= 0,61$ vs. HZ: $\bar{x}= 4,55\text{m}$; $\text{SEM}= 0,80$).

3.2.3 Einfluss der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die morphininduzierte Platzpräferenz

Zur Untersuchung der morphininduzierten konditionierten Platzpräferenz wurden 139 (+/+ $n=47$, -/- $n= 54$, +/- $n= 38$) naive Mäuse und 2 Testdosen Morphin eingesetzt (5 mg und 20 mg/kg). Die Kontrollgruppen erhielten physiologische Kochsalzlösung. Die nach zweitägiger Habituation entstandenen neun Versuchsgruppen wurden so auf die Behandlungsgruppen verteilt, dass die Mittelwerte der einzelnen Gruppen sich nicht voneinander unterschieden. Die in die Auswertung eingegangenen Messwerte beziehen sich auf den Aufenthalt im „nicht präferierten Arm“ als prozentualer Anteil der Gesamtzeit (Habituation bzw. Test = je 15 Minuten entsprechen 100 %).

Ergebnisse

CPP Kochsalz

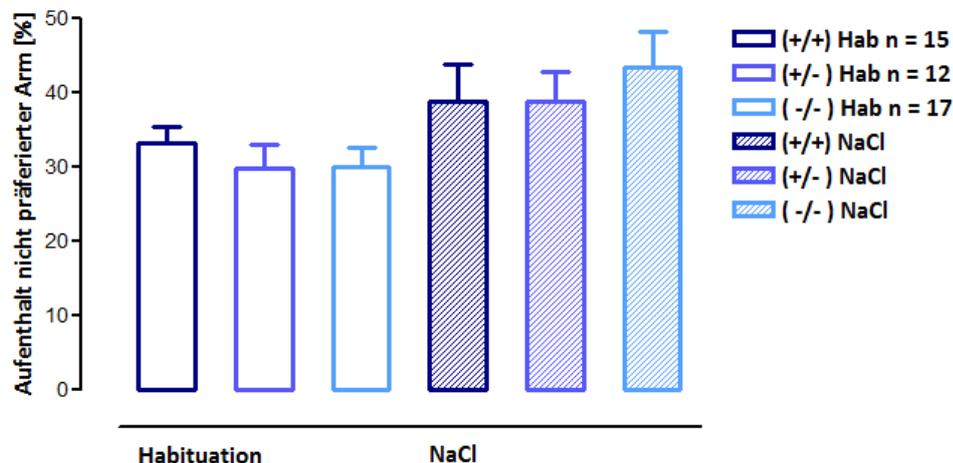


Abb. 8) Wirkung von Kochsalz auf die Konditionierte Platzpräferenz (CPP)

Abszissen: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung, unterteilt in die Präferenz während der Habituation und nach Kochsalzinjektion (Test). Ordinate: Aufenthalt im nicht präferierten Arm in [%]. Angegeben sind $MW \pm SEM$; in dieser Untersuchung sind keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

CPP Morphin 5 mg/kg

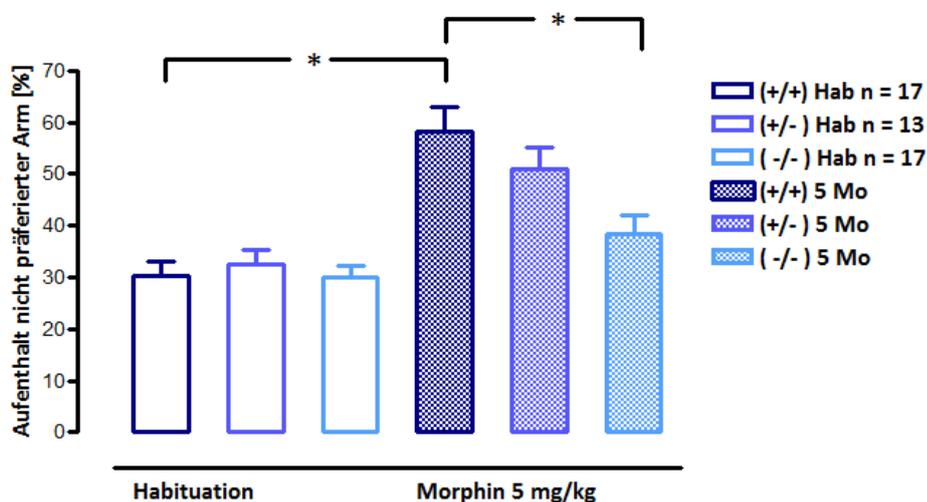


Abb. 9) Wirkung von 5 mg/kg Morphin auf die Konditionierte Platzpräferenz (CPP)

Abszissen: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung, unterteilt in die Präferenz während der Habituation und nach Morphininjektion (5 mg/kg). Ordinate: Aufenthalt im nicht präferierten Arm in [%]. Angegeben sind $MW \pm SEM$; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Ergebnisse

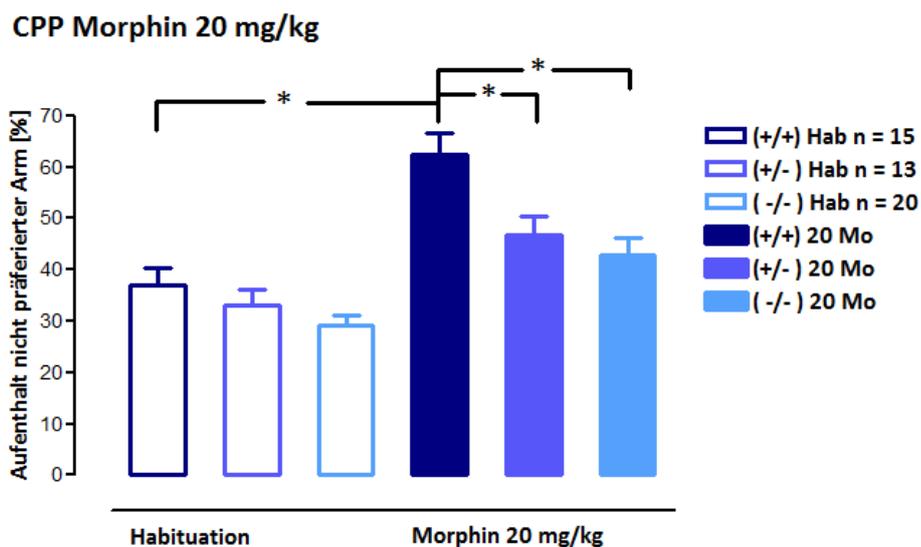


Abb. 10) Wirkung von 20 mg/kg Morphin auf die Konditionierte Platzpräferenz (CPP)
Abszissen: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung, unterteilt in die Präferenz während der Habituation und nach Morphininjektion (20 mg/kg). Ordinate: Aufenthalt im nicht präferierten Arm in [%]. Angegeben sind MW \pm SEM; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Aus den Abbildungen 8-10 ist ersichtlich, dass es keinen signifikanten Unterschied während der Habituation in Bezug auf die Anzahl der μ -Opioidrezeptoren ($F_{2,137}=1,482$; $p = 0,231$) gab. Die unterschiedliche Anzahl an μ -Opioidrezeptoren hatte keinen Einfluss auf die Präferenz während der Habituation. Weiterhin zeigte der Vergleich der Habituation keinen signifikanten Unterschied bezüglich der nachstehenden Behandlungen: Habituation-NaCl (Abb.8): ($F_{2,42} = 0,445$; $p = 0,644$); Habituation-5 mg/kg Morphin (Abb.9): ($F_{2,45} = 0,224$; $p = 0,800$); Habituation-20 mg/kg Morphin (Abb.10): ($F_{2,46} = 2,151$; $p = 0,128$). Nach dem viertägigem Training und der Applikation der Testsubstanzen ergab der Vergleich aller Gruppen untereinander, dass sowohl ein signifikanter Anstieg der Präferenz in Abhängigkeit von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren (Statuseffekt: $F_{2,137} = 4,594$; $p = 0,012$), als auch einen hochsignifikanten Unterschied bezüglich der applizierten Substanzen (Behandlungseffekt: $F_{2,137} = 5,646$; $p = 0,004$) zu beobachten war. Die Applikation von physiologischer Kochsalzlösung führte zu keiner Änderung der Präferenz ($p=1$). Insbesondere zeigte sich kein signifikant unterschiedlicher Effekt der Kochsalz-Applikation auf den Aufenthalt im nicht präferierten Arm bei den WT, HZ und KO-Mäusen (Abb.8): ($F_{2,42} = 0,295$; $p = 0,644$). Der Vergleich der Präferenzen während der Habituation und nach Kochsalz Injektion zeigte keinen

Ergebnisse

signifikanten Unterschied in Abhängigkeit von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren (Abb.8): ($F_{2,42} = 0,712$; $p = 0,497$). Somit konnte kein signifikanter Anstieg der Präferenz nach Kochsalz-Injektion bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl nachgewiesen werden. Die Injektion der Testdosis Morphin (5 mg/kg) führte dagegen zu einer signifikant unterschiedlichen Präferenzentwicklung, je nach μ -Opioidrezeptor-Ausstattung (Abb.9): ($F_{2,45} = 5,285$; $p = 0,009$). Auch die Differenz des prozentualen Aufenthalts im nichtpräferierten Arm zwischen Habituation und Test (Abb.11) ergab einen hochsignifikanten Effekt in den Versuchsgruppen nach Applikation von 5 mg/kg Morphin ($F_{2,45} = 5,602$; $p = 0,007$). Dies konnte post hoc für den Vergleich WT vs. KO ($p = 0,007$) verifiziert werden, blieb im Vergleich WT vs. HZ ($p = 0,824$) und KO vs. HZ ($p = 0,195$) nicht signifikant (Abb. 9 und 11). Die heterozygoten Mäuse entwickelten eine mittlere Platzpräferenz nach Morphininjektion bei einer Dosierung von 5 mg/kg, die genau zwischen denen der Wildtypen und der KO-Tieren lag und post hoc im Vergleich zu diesen ohne signifikanten Unterschied blieb. Die Testdosis 20 mg/kg Morphin erzeugte eine signifikant veränderte Platzpräferenz bei den heterozygoten Mäusen (Abb.10): ($F_{2,46} = 7,683$; $p = 0,001$). Dabei konnte die Entwicklung der Platzpräferenz signifikant nach Bonferroni, zwischen den WT und KO-Mäusen unterschieden werden (Abb.10): ($p = 0,001$), wie auch zwischen den WT und HZ-Mäusen ($p = 0,025$). Es konnte kein signifikanter Unterschied der morphininduzierten Platzpräferenz zwischen HZ und KO-Mäusen nachgewiesen werden ($p = 1$). Analog zeigte der Vergleich der Präferenzen während der Habituation und nach der Morphininjektion (Abb. 10) signifikante Unterschiede nach der Applikation von 20 mg/kg Morphin bei den WT, HZ und KO-Mäusen ($F_{2,46} = 5,291$; $p = 0,009$). Diese Signifikanzsternchen wurden in Abb. 10 nicht eingetragen, um die Übersicht zu wahren. Analog zeigte der Vergleich der einzelnen Status in der Betrachtung der Differenz der Aufenthaltsdauer (Abb. 11) post hoc untereinander signifikante Unterschiede nach Bonferroni zwischen den WT und KO-Mäusen ($p = 0,013$), sowie zwischen den WT und HZ-Mäusen ($p = 0,036$) und blieb nicht unterscheidbar zwischen den HZ und KO-Mäusen ($p = 1$).

Konditionierte Platz Präferenz

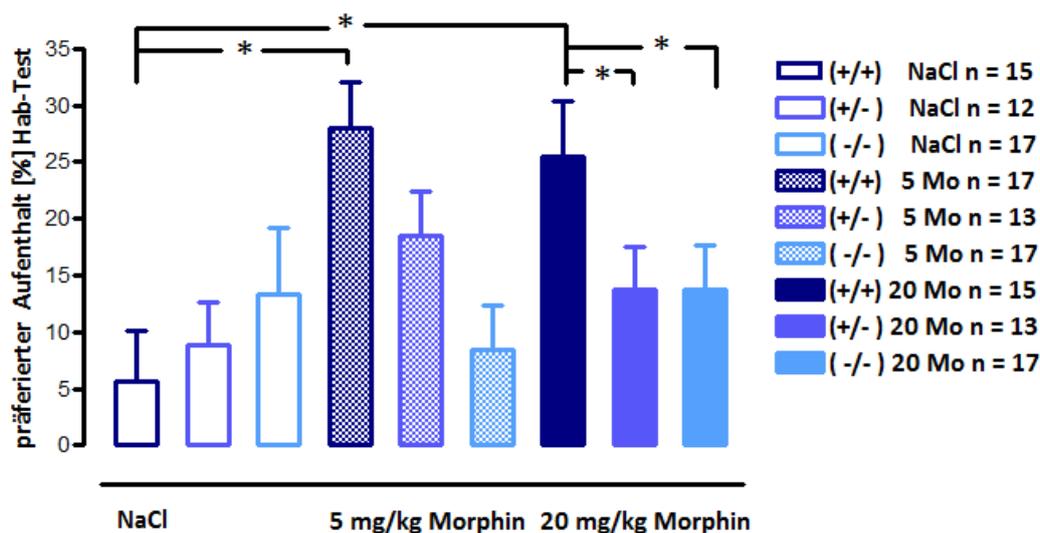


Abb. 11) Differenz der Aufenthaltsdauer zwischen Test und Habituation nach Kochsalz, 5 bzw. 20 mg/kg Morphininjektion unter Vernachlässigung der Mitte

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung und Testsubstanzen; Ordinate: Differenzen der Aufenthaltsdauer im nicht präferierten Arm (Test – Habituation) in [%]. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Die Entwicklung einer Morphininduzierten Platzpräferenz war abhängig von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren (Abb.11): ($F_{2,137} = 4,036; p = 0,020$). Es konnte ein signifikanter Unterschied des prozentualen Aufenthalts im vorher nicht präferierten Bereich je nach applizierter Substanz nachgewiesen werden (Behandlungseffekt, Abb.11): ($F_{2,137} = 4,188; p = 0,017$). Die Individuen mit maximaler Ausstattung des μ -Opioidrezeptors zeigten einen hochsignifikanten Behandlungseffekt ($F_{2,42} = 7,954; p = 0,001$). Die morphininduzierte Platzpräferenz war bei einer Morphindosis von 20 mg/kg und einer maximalen μ -Opioidrezeptor-Anzahl im Vergleich zum Kochsalzeffekt am stärksten ausgeprägt. Bei einer reduzierten Morphindosis von 5 mg/kg, im Vergleich zum Kochsalzeffekt, konnte ein signifikanter Unterschied bei einer maximalen μ -Opioidrezeptor-Anzahl, wie es die Wildtypen aufweisen, festgestellt werden (post hoc, signifikant nach Bonferroni: (WT) NaCl vs. 20 mg/kg $p = 0,002$, (WT) NaCl vs. 5 mg/kg $p = 0,006$, (WT) 5 mg/kg vs. 20 mg/kg $p = 1$.) Bei der Untersuchung der μ -Opioidrezeptor-KO-Mäuse konnte keine signifikant unterschiedliche Änderung der Präferenz nach Applikation aller Testsubstanzen nachgewiesen werden ($F_{2,52} = 0,348; p = 0,708$). Die Untersuchung der HZ-Mäuse zeigte einen deutlichen Anstieg der Platzpräferenz nach Applikation von 5 mg/kg Morphin (Differenz Aufenthalt zwischen Test und Habituation: $\bar{x} = 18,44\%$). Der Anstieg der Präferenz der HZ-Mäuse lag zwischen dem der WT ($\bar{x} = 28,04\%$) und der KO-Mäuse

Ergebnisse

($\bar{x}=8,4\%$). Der Vergleich der Effekte aller Testsubstanzen auf die Präferenz zeigte bei den heterozygoten Mäusen keinen signifikanten Unterschied bei der Betrachtung der Differenzen und unter Anwendung unserer statistischer Methoden ($F_{2,36}=1,580; p=0,22$).

3.2.4 Einfluss der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Analgesie unter Aktivierung weiterer Opioidrezeptor-Subtypen durch Etorphin

Zur Messung der Schmerzschwelle mittels elektrischer Schwanzwurzelreizung und anschließender Untersuchung an der Heißen Platte nach Etorphin Applikation untersuchten wir 78 naive Tiere. Der Mittelwert der aus 5 Einzelmessungen bestehenden Vormesswerte, wie auch der Mittelwert, der aus 3 Einzelmessungen bestehenden Hauptmesswerte, wurden ausgewertet. Der Analgetische Index wurde aus Vor- und Hauptmesswert nach folgender Formel berechnet: $AI = \frac{HMW[mA] - VMW[mA]}{MaxMW[mA] - VMW[mA]}$.

Bestimmung der Schmerzschwelle anhand 2er Methoden unter Etorphin bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung

Schwanzwurzelreizung unter Kochsalz

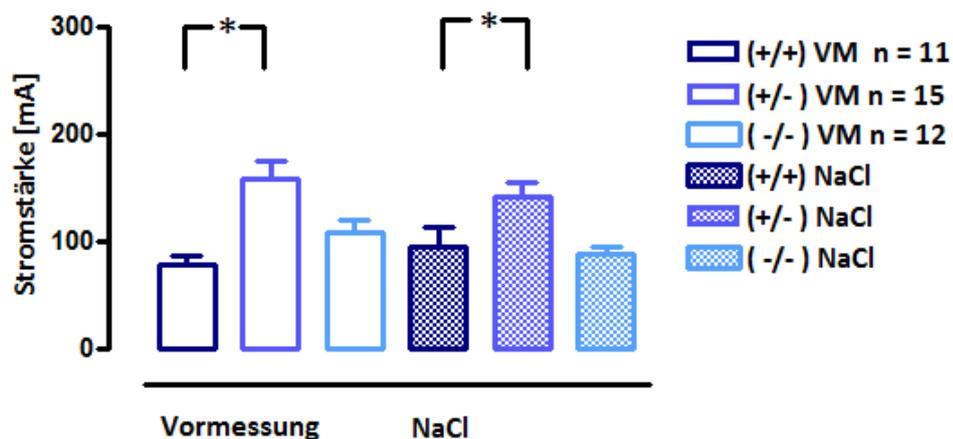


Abb. 12) Schwanzwurzelreizung- Schmerzschwellen ohne Opioidwirkung
Abszisse: Vor- und Hauptmessungen nach Kochsalzinjektion (0,1 ml/kg KG) bei den Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung; Ordinate: Schmerzschwellen in [mA]. Angegeben sind $MW \pm SEM$; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Ergebnisse

Schwanzwurzelreizung unter Etorphin 20 µg/kg KG

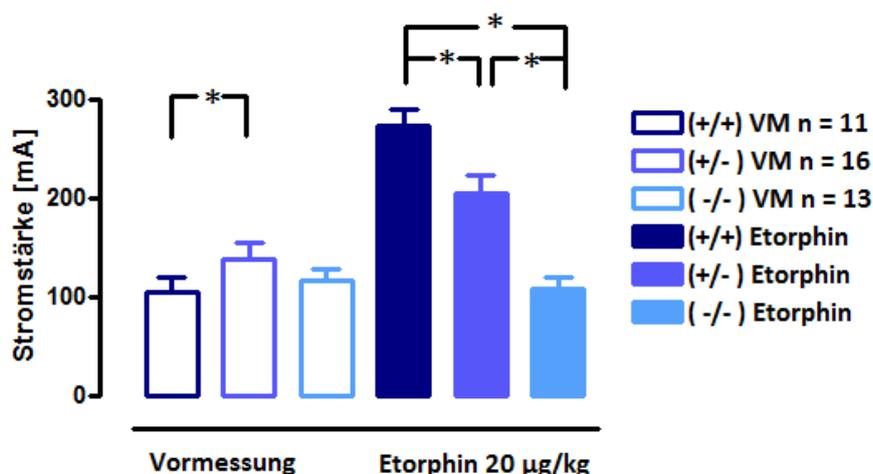


Abb. 13) Schwanzwurzelreizung- Schmerzschwellen unter Etorphinwirkung
 Abszisse: Vor- und Hauptmessungen nach Etorphininjektion (20 µg/kg KG) bei den Versuchsgruppen mit unterschiedlicher µ-Opioidrezeptor-Ausstattung; Ordinate: Schmerzschwellen in [mA]. Angegeben sind MW ± SEM; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni p<0,05 (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Heiße Platte 56 °C unter Etorphin 20 µg/kg KG

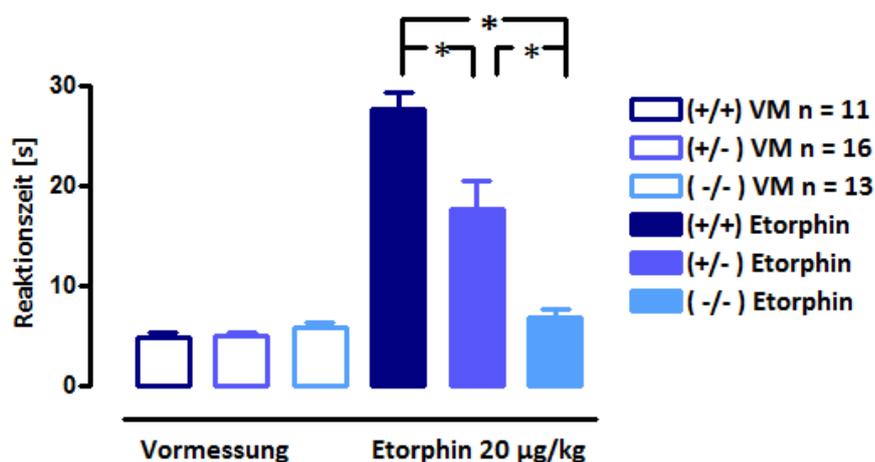


Abb. 14) Schmerzschwellenbestimmung mittels Heißer Platte mit maximal 56 °C
 Abszisse: Vor- und Hauptmessungen nach Etorphininjektion (20 µg/kg KG) bei den Versuchsgruppen mit unterschiedlicher µ-Opioidrezeptor-Ausstattung; Ordinate: Reaktionszeit in [s]. Angegeben sind MW ± SEM; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni p<0,05 (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Analgetischer Index Schwanzwurzelreizung

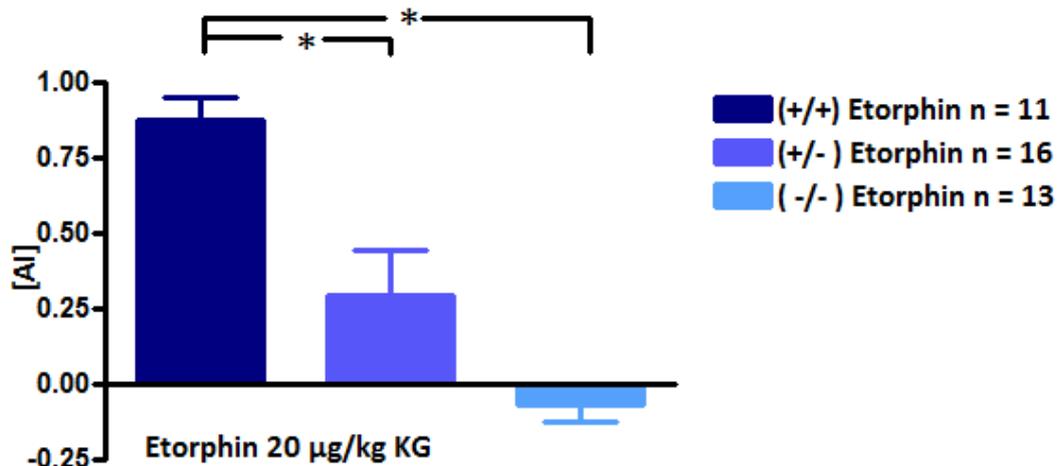


Abb. 15) *Analgetischer Index des Etorphins bei der Schwanzwurzelreizung*

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung nach Etorphininjektion (20 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$); Ordinate: Berechneter Analgetischer Index des Etorphins bei der SWR (max. 300 mA) nach folgender Formel: $([AI]) = \text{HMW-VMW}/\text{MaxMW-VMW}$. Angegeben sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Analgetischer Index Heiße Platte 56 °C

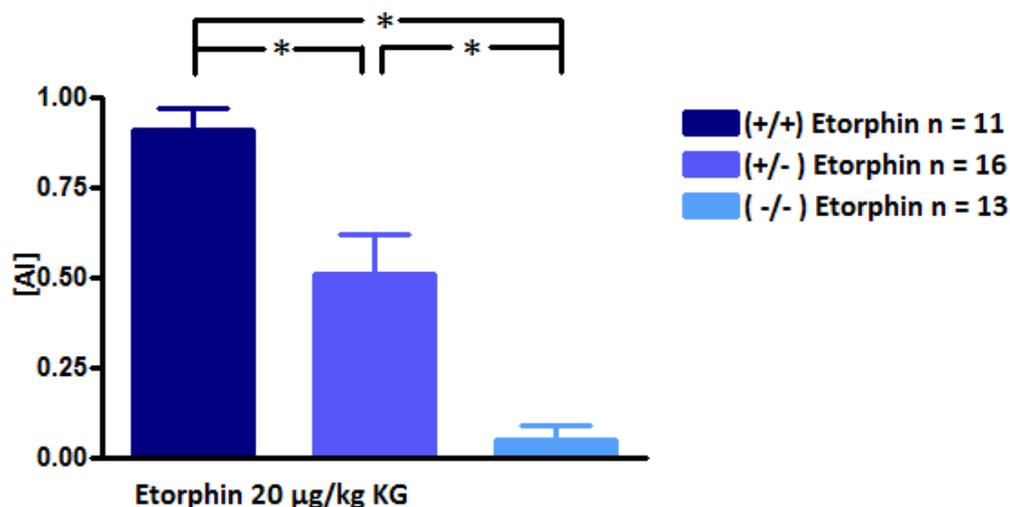


Abb. 16) *Analgetischer Index des Etorphins gemessen an der Heißen Platte*

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung nach Etorphininjektion (20 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$); Ordinate: Berechneter Analgetischer Index nach der gemessenen Reaktionszeit in [s] an der Heißen Platte nach folgender Formel: $([AI]) = \text{HMW-VMW}/\text{MaxMW-VMW}$. Angegeben sind $\text{MW} \pm \text{SEM}$; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Ergebnisse

Abbildungen 12-16 zeigen, dass die Schmerzschwellen signifikant nach der Vormessung im Vergleich zur Etorphininjektion sowohl im Versuch der Schwanzwurzelreizung (Abb. 13): ($F_{2,76}=44,685;p=0,0001$), als auch im Versuch der Heißen Platte (Abb. 14): ($F_{2,76}=49,155;p=0,0001$) unterschiedlich waren. Die basalen Schmerzschwellen unterschieden sich nicht zwischen den Mäusen mit und ohne μ -Opioidrezeptoren im Versuch der Heißen Platte (Abb. 14): ($p=0,552$), sie unterschieden sich hochsignifikant im Versuch der Schwanzwurzelreizung ($F_{2,75}=7,824;p=0,001$) zwischen den WT und HZ-Mäusen (Abb. 12). Die unterschiedlichen Status hatten signifikant unterschiedliche Auswirkungen auf die Schmerzschwellen in beiden Testmethoden (Abb. 13): (SWR: $F_{2,75}=16,841;p=0,0001$); (Abb.14): (HP: $F_{2,75}=14,337;p=0,0001$). Sowohl die Testsubstanzen, als auch die unterschiedliche μ -Opioidrezeptor-Anzahl führten zu signifikant unterschiedlichen Analgetischen Indices bei der Schwanzwurzelreizung (Abb. 15): ($F_{2,75}=3,891;p=0,025$) und auf der Heißen Platte (Abb. 16): ($F_{2,75}=22,782;p=0,0001$). Nach Applikation der Testdosis Etorphin 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zeigten die WT-Mäuse im Versuch der SWR signifikant höhere Schmerzschwellen als HZ-Mäuse (Abb.13): ($F_{1,26}=5,998;P=0,022$) und μ -KO-Mäuse ($F_{1,23}=67,570;p=0,0001$). Weiterhin zeigten HZ-Mäuse nach Etorphininjektion signifikant höhere Schmerzschwellen als KO-Mäuse (Abb.13): ($F_{1,28}=15,915;p=0,0001$). Die Schmerzschwellen der HZ-Mäuse lagen nach Injektion der Testdosis Etorphin 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ zwischen denen der WT und KO-Tiere (Abb.13) und unterschieden sich signifikant von beiden ($p<0,05$). Analoge Ergebnisse ergaben die Vergleiche im Versuch der Heißen Platte (Abb.14): (WT vs. KO ($F_{1,23}=128,115;p=0,0001$); WT vs. HZ ($F_{1,26}=8,078;p=0,009$); HZ vs. KO ($F_{1,28}=9,016;p=0,006$), wie auch für die berechneten Analgetischen Indices nach der SWR (Abb. 15): WT vs. KO ($F_{1,23}= 85,337;p=0,0001$); WT vs. HZ: ($F_{1,26}=7,914;p=0,009$); KO vs. HZ ($F_{1,28}=3,785;p=0,062$) und auf der Heißen Platte (Abb. 16): (WT vs. KO ($F_{1,23}=133,517;p=0,0001$); WT vs. HZ ($F_{1,26}=8,241;p=0,008$); KO vs. HZ ($F_{1,28}=19,781;p=0,003$). Interessanterweise unterschieden sich die Schmerzschwellen ohne jegliche Substanzapplikation - bzw. in den Kontrollgruppen nach Applikation von Kochsalz - signifikant zwischen den WT und den HZ Mäusen (Abb.12): ($F_{2,76}=7,824; p=0,001$).

3.3 Charakterisierungen von Verhaltensänderungen ohne Opioidstimulation

3.3.1 Angst- und Schmerz- bzw. Fluchtschwellenbestimmung

Das *freezing* -und *escape*-Verhalten (Angst- und Schmerz-bzw. Fluchtverhalten) wurde an einer stochastischen Auswahl von $n= 87$ Versuchstieren untersucht. Nach der Habituation, die 240 Sekunden dauerte, erfolgte die Beobachtung der definierten Verhaltensweisen. In die Auswertung gingen gemessene Stromstärken [mA] zum Zeitpunkt der gezeigten Verhaltensweisen ein.

Angstschwellenbestimmung "freezing"

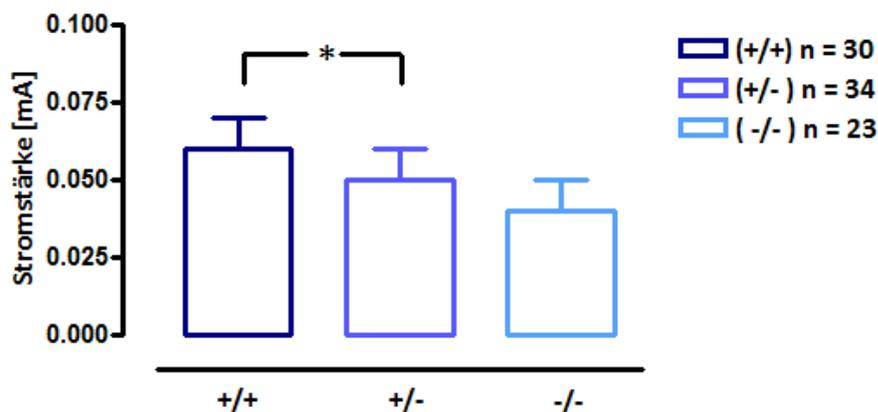


Abb. 17) Angstschwellenbestimmung (freezing) anhand des elektrischen Fußreizes
 Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung; Ordinate: Stromstärke bei Angstreaktion in [mA]. Angegeben sind Median \pm SEM. *Signifikanz nach Kruskal-Wallis mit anschließenden paarweisen Vergleichen $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Fluchtschwellenbestimmung "escape"

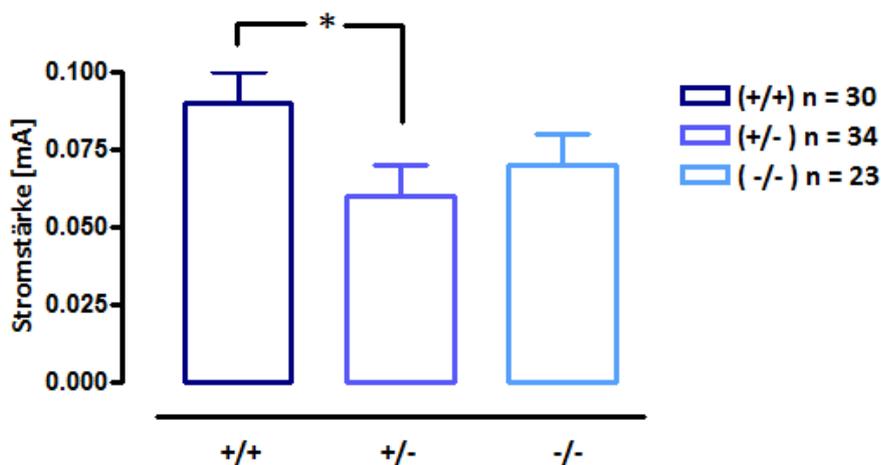


Abb. 18) Schmerz- bzw. Fluchtschwellenbestimmung (escape) nach elektrischem Fußreiz
 Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung; Ordinate: Stromstärke bei Fluchtreaktion in [mA]. Angegeben sind Median \pm SEM. *Signifikanz nach Kruskal-Wallis mit anschließenden paarweisen Vergleichen $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Abb. 17 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Stromstärken [mA], bei der eine *freezing* Reaktion nach elektrischem Fußreiz registriert wurde. Dieser niedrigste elektrische Fußreiz, der zu der vorher charakterisierten Reaktion bei den Mäusen führte, wurde als Angstschwelle definiert. Im Rahmen der Multivarianzanalyse ergab der Kruskal-Wallis Test einen

Ergebnisse

signifikanten Unterschied der Angstschwellen in Abhängigkeit von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren ($\chi^2=6,952$, $df=2$; $p=0,031$). Dabei wurde die höchste Angstschwelle bei maximaler Ausstattung mit dem μ -Opioidrezeptor erreicht (WT $\bar{x}=0,06$ mA) und die niedrigste Angstschwelle bei den KO-Mäusen (KO $\bar{x}=0,04$ mA) beobachtet. Die Angstschwellen der heterozygoten Tiere lagen zwischen denen der WT und KO-Mäuse (HZ $\bar{x}=0,05$ mA). Die Untersuchung der einzelnen Verteilungen im Mann-Whitney-U-Test zeigte eine zweiseitige Signifikanz zwischen WT und HZ ($p=0,023$) und WT vs. KO ($p=0,025$). Die Abgrenzung des *freezing* Verhaltens zwischen HZ und KO-Mäusen konnte nicht verifiziert werden ($p=0,862$). Abb. 18 zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen der gemessenen Stromstärken [mA] nach elektrischem Fußreiz für die Fluchtreaktion in der Shuttlebox® an. Analog zur Angstschwelle war diese Reaktion ebenfalls definiert und folgend als Schmerz- bzw. Fluchtschwelle beschrieben. Die höchste Fluchtschwelle (Abb. 18) zeigten die WT mit $\bar{x}=0,09$ mA, während die KO-Mäuse bei $\bar{x}=0,07$ mA und HZ bei $\bar{x}=0,06$ mA die *escape* Reaktion ausführten. Die ermittelten Fluchtschwellen waren in Abhängigkeit von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren signifikant unterschiedlich (Abb.18): ($F_{2,85}=3,467$; $p=0,036$). Post hoc konnte weiterhin ein signifikanter Unterschied zwischen WT und HZ-Mäusen ($p=0,031$) nach Bonferroni gesichert werden. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Fluchtschwellen zwischen WT und KO ($p=0,470$) wie auch HZ und KO-Mäusen ($p=1$) verifiziert werden. Die nicht parametrische Auswertung ergab einen signifikanten Effekt der μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Fluchtschwelle ($\chi^2=6,298$, $df=2$; $p=0,043$). Die Prüfung der Übereinstimmungen der Verteilungen im U-Test ergab eine entsprechende zweiseitige Signifikanz im Vergleich zwischen WT und HZ ($p=0,012$). Unsere Daten und die darin ermittelten Schwellen korrelieren nicht linear mit der Anzahl der μ -Rezeptoren.

3.3.2 Einfluss der unterschiedlichen Anzahl an μ -Opioidrezeptoren auf die Schreckreaktion

Bei der *startle* Reaktion handelt es sich um eine universell motorische Antwort auf unerwartete stärkere sensorische Reize in Serie, die bei normaler Physiologie rasch habituiert. Um die Schreckreaktion (*startle response*) von Mäusen mit unterschiedlicher Ausstattung des μ -Opioidrezeptors im Vergleich beurteilen zu können, untersuchten wir 60 naive Mäuse.

Schreckreaktion "startle response"

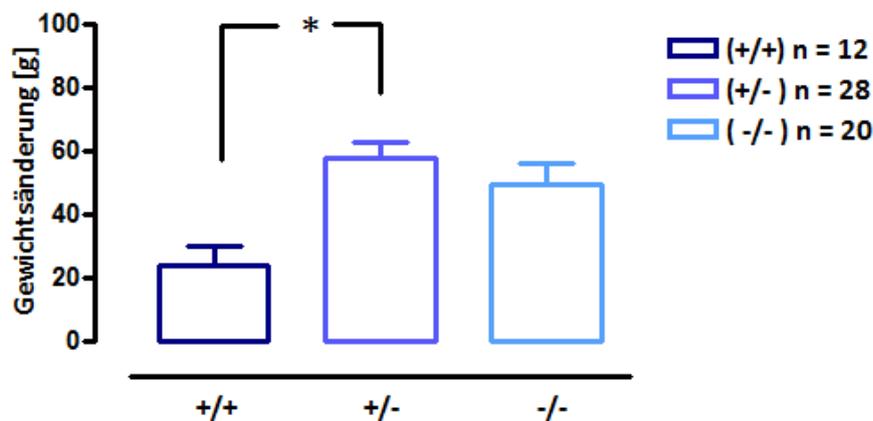


Abb. 19) Schreckreaktion nach akustischem Reiz

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung; Ordinate: Gewichtsänderung als Ausdruck des Kraftaufwands nach Schreckreaktion in [g]. Angegeben sind Median \pm SEM. *Signifikanz nach Kruskal-Wallis mit anschließenden paarweisen Vergleichen $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Abb. 19 zeigt die Schreckreaktion nach Präsentation von Tonreizen in einer Lautstärke von 120 dB. WT, HZ und KO-Mäuse reagierten signifikant unterschiedlich stark auf die präsentierten Tonreize ($F_{2,60}=4,108; p=0,022$). Dabei war die Schreckreaktion der Wildtypen am geringsten ($\bar{x}=24,3g$), die der HZ am höchsten ($\bar{x}=58,2g$) und die der μ -KO-Mäuse relativ hoch ($\bar{x}=49,8g$). Post hoc konnte die Schreckreaktion der WT vs. HZ signifikant unterschieden werden ($p=0,018$). Eine unterschiedliche Schreckreaktion der WT im Vergleich zu den KO-Mäusen ($p=0,247$) sowie der HZ-Mäuse im Vergleich zu den KO-Mäusen ($p=0,745$) konnte statistisch nicht nachgewiesen werden. Die HZ-Mäuse zeigten eine ausgeprägte Schreckhaftigkeit, ähnlich der KO-Mäuse. Eine Reduktion der μ -Opioidrezeptoren um 50% führte bei den HZ-Mäusen zu einer erhöhten Schreckhaftigkeit ähnlich dem Verhalten der KO-Mäuse. Eine lineare Korrelation der Schreckreaktion mit der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden.

3.3.3 Wirkung der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf das depressionsrelevante Verhalten

Es wurden 50 naive Tiere ohne Substanzapplikation im *tail suspension* Test untersucht. Beurteilt wurde die Dauer der Immobilität in [s] während des sechsminütigen Tests. Daraus konnten Schlussfolgerungen über depressionsrelevantes Verhalten gezogen werden. In die Auswertung

Ergebnisse

gingen die Dauer der Immobilität von der zweiten bis zur sechsten Minute. Die erste Minute wurde als Habituationszeit gewertet und ist nicht in die Abbildungen und Berechnungen eingeflossen.

Tail Suspension Test

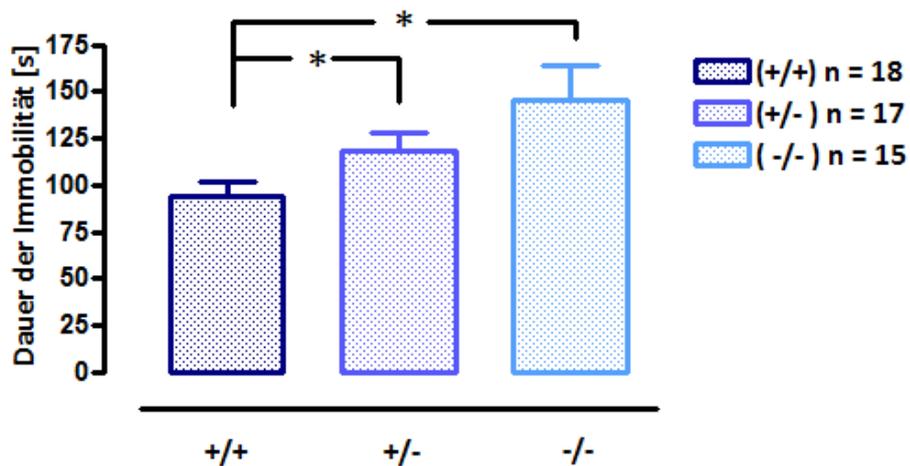


Abb. 20) Depressionsrelevantes Verhalten bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl
Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung; Ordinate: Dauer der Immobilität während der 2.-6. Minute in Sekunden [s]. Angegeben sind Median \pm SEM. Univariate Varianzanalyse, post hoc nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Abb. 20 zeigt die Auswirkung der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Immobilitätsdauer und damit auf das depressionsrelevante Verhalten. Dabei zeigten die WT-Mäuse die kürzeste Immobilitätsdauer $\bar{x} = 93,76$ s. Die HZ-Mäuse demonstrierten eine mittlere Immobilitätsdauer von $\bar{x} = 118,72$ s und die KO-Mäuse die längste Dauer der Immobilität $\bar{x} = 145,76$ s. Die Dauer der Immobilität in den einzelnen Gruppen war signifikant unterschiedlich bezüglich der unterschiedlichen Status ($\chi^2 = 6,395$, $df = 2$, $p = 0,041$). Weiterhin war sie signifikant unterschiedlich im Vergleich zwischen den WT vs. HZ ($p = 0,036$), sowie WT vs. μ -KO ($p = 0,028$). Ein Unterschied in der Dauer der Immobilität konnte im Vergleich zwischen den KO- und HZ-Mäusen nicht gesichert werden ($p = 0,605$). μ -Opioidrezeptor-KO-Mäuse präsentierten die am längsten andauernde und WT die kürzeste Episode der Immobilität. Die HZ-Mäuse ließen eine etwa halb so lange Episode der Immobilität erkennen.

3.3.4 Wirkung der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die zentrale Erregbarkeit und Krampfentwicklung

Um die Bedeutung von μ -Opioidrezeptoren auf die zentrale Exzitabilität aufzuklären, untersuchten wir 67 naive Mäuse (WT n=20, HZ n=23, μ -KO n=24) im einem Kindling-Experiment. Pentylenetetrazol wurde an 13 aufeinanderfolgenden Tagen in einer Dosierung von 37,5 mg/kg KG i.p. appliziert. Aus den beobachteten Krampfstufen wurden in Bezug auf die μ -Opioidrezeptor-Anzahl Kindlingkurven erstellt.

Pentylenetetrazol Kindling

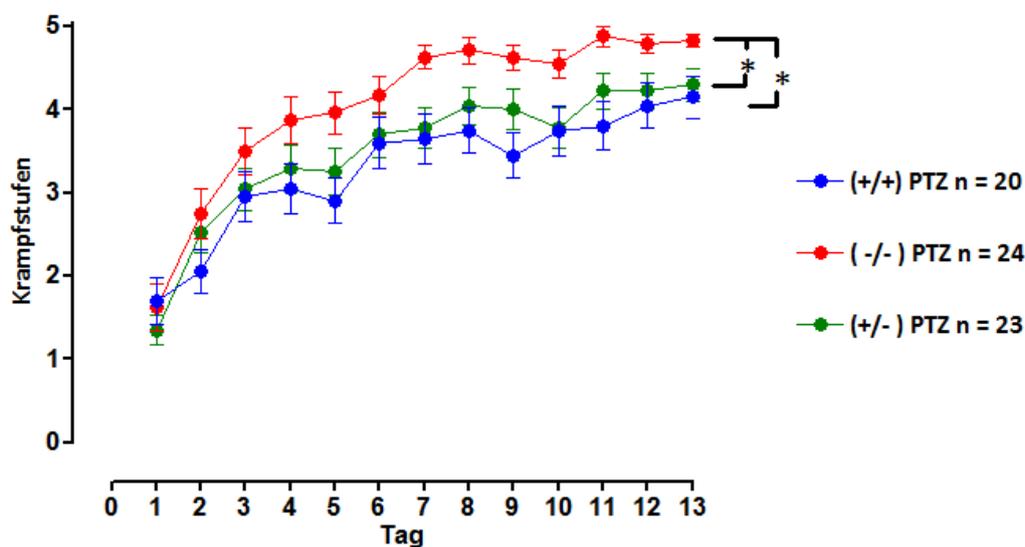


Abb. 21) Zentrale Erregbarkeit bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl

Abszisse: Untersuchungstage 0-13 mit je einer Dosis PTZ 37,5mg/kg; Ordinate: definierte Krampfstufen 0-5. Angegeben sind MW \pm SEM der Krampfstufen bei Versuchstieren mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl. Post hoc Two-Way ANOVA Test: *Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$ (WT vs. HZ, WT vs. KO, HZ vs. KO).

Abbildung 21 zeigt, dass die Tiere eine signifikant unterschiedliche Krampfentwicklung in Abhängigkeit von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl entwickelten ($F_{2,65}=5,313; p=0,007$). Am ersten Versuchstag konnten keine Unterschiede in der Krampfbereitschaft zwischen den einzelnen Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung sichergestellt werden. Im Verlauf des Versuchs stellte sich heraus, dass die WT-Mäuse die niedrigste und die KO-Mäuse die höchste Krampfentwicklung (WT vs. KO $p=0,006$) aufwiesen. Die HZ-Mäuse tendierten zu den WT-Mäusen und zeigten ähnlich niedrigere Krampfstufen (HZ vs. WT $p=1$), allerdings blieb auch ein

Unterschied zwischen HZ und KO-Mäusen nicht signifikant (HZ vs. KO $p=0,064$). Während die Krampfantwicklung bei niedrigerer μ -Opioidrezeptor-Anzahl stark zunahm und die maximale Ausstattung mit dem μ -Opioidrezeptor im Mittel bei gleich hohen Dosen des Konvulsivums PTZ niedrigere Krampfstufen erzeugte, führte eine Reduktion der μ -Opioidrezeptor-Anzahl um die Hälfte nicht zu einer entsprechenden Erhöhung der Krampfbereitschaft.

3.4 Wechselwirkung von μ -, δ - und κ -Opioidrezeptor-Antagonisten und δ -Opioidrezeptor-Agonisten auf Opioideffekte

3.4.1 *Tail suspension* Test bei Mäusen mit unterschiedlicher Ausstattung des μ -Opioidrezeptors unter der Wirkung von Naloxon, Naltrindol und nor-Binaltorphimin

Um die Bedeutung weiterer Opioidrezeptorsubtypen auf das depressionsrelevante Verhalten zu erkunden und etwaige Wechselwirkungen zwischen einer reduzierten Anzahl an μ -Opioidrezeptoren aufzudecken, untersuchten wir 157 naive Mäuse im *tail suspension* Test. Naloxon wurde in einer Testdosis von 10 mg/kg und Naltrindol 2 mg/kg je 15 Minuten vor dem Versuchsbeginn subkutan appliziert. Äquivalent erhielten die Kontrollgruppen physiologische Kochsalzlösung 15 Minuten vor dem Versuchsbeginn. Der irreversible κ -Opioidrezeptor-Antagonist nor-Binaltorphimin wurde 24 h vor Versuchsbeginn in einer Testdosis von 3 mg/kg subkutan appliziert; zum selben Zeitpunkt erfolgten die Applikationen des Kochsalzes in der Kontrollgruppe. Die Gesamtdauer der Immobilität von der zweiten bis zur sechsten Minute in [s] wurde statistisch ausgewertet.

Tail Suspension Test

NaCl 0,1 ml/kg, Naloxon 10 mg/kg 15 min VBZ, Naltrindol 2 mg/kg 15 min VBZ, n-BNP 3 mg/kg 24 h VBZ

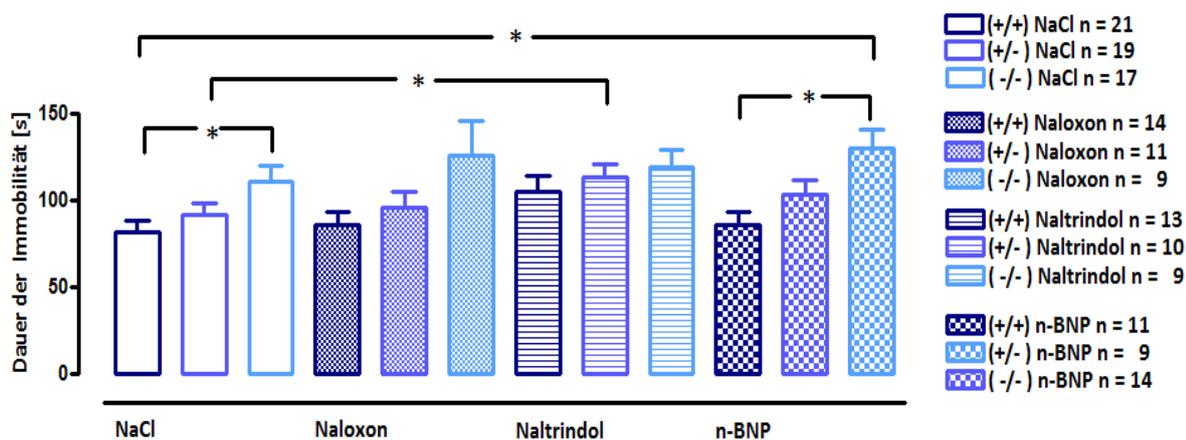


Abb. 22) Auswirkung akuter μ -, δ - und κ -Opioidrezeptor-Antagonisierung auf die Immobilitätsdauer bei Mäusen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung und Testsubstanzen; Ordinate: Dauer der Immobilität in Sekunden [s] 2.-6. Minute. Angegeben sind MW \pm SEM; post hoc Two-Way ANOVA Test: *Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$.

Abbildung 22 zeigt die Dauer der Immobilität bei Mäusen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl unter der Wirkung von Naloxon, Naltrindol und n-BNI. In der Kontrollgruppe bildete sich ein signifikanter Stuseffekt in Hinblick auf die Dauer der Immobilität aus ($F_{2,55}=3,577; p=0,035$) und war korrespondierend mit dem Versuch mit naiven Tieren (siehe Abb.20) nachweisbar. Ein Behandlungseffekt konnte im Vergleich der Testsubstanzen miteinander nicht festgestellt werden ($F_{2,155}=1,956; p>0,05$). Die akute Antagonisierung des μ -Opioidrezeptors durch Naloxon 10 mg/kg hatte keinen Einfluss auf die Dauer der Immobilität, weder in Hinblick auf die unterschiedliche μ -Opioidrezeptor-Anzahl ($F_{2,33}=2,573; p>0,05$), noch im Vergleich zur Kontrollgruppe (WT, HZ, μ -KO: NaCl vs. Naloxon $p>0,05$). Die Applikation des δ -Opioidrezeptor-Antagonisten Naltrindol führte im Vergleich zur Kontrollgruppe in WT-, HZ- und KO-Mäusen zu einem Anstieg der Dauer der Immobilität (Differenz der Dauer der Immobilität im Vergleich zur Kontrollgruppe und in Abhängigkeit von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl: WT: 23,69 s, HZ: 22,10 s, μ -KO: 8,32 s). Ein statistisch nachweisbarer Unterschied konnte hingegen nicht dokumentiert werden: ($F_{2,30}=0,560; p>0,05$). Es konnte bei den HZ-Mäusen ein signifikanter Anstieg der Dauer der Immobilität im Vergleich zur Kontrollgruppe (HZ: NaCl vs. Naltrindol $p=0,048$) nachgewiesen werden. Dieser Effekt war bei den WT-Mäusen tendenziell nachweisbar ($p=0,070$) und bei KO-Mäusen nicht nachweisbar ($p>0,05$). Der δ -Opioidrezeptor-Antagonist verlängerte bei allen Versuchsgruppen die Dauer der Immobilität, statistisch ließ sich kein Unterschied der Abhängigkeit von der μ -Opioidrezeptor-Ausstattung nachweisen. Die Antagonisierung des κ -Opioidrezeptors durch n-BNI zeigte in Abhängigkeit der

Ergebnisse

vorhandenen μ -Opioidrezeptoren signifikante Unterschiede der Immobilitätsdauer ($F_{2,32}=5,051; p=0,013$). Post hoc existierten signifikante Unterschiede zwischen WT und KO-Mäusen ($p=0,01$), HZ-Mäuse nahmen eine Mittelstellung ein und zeigten nach n-BNI-Injektion weder signifikante Unterschiede der Immobilitätsdauer im Vergleich zu den WT, noch zu den μ -KO-Mäusen ($p>0,05$). Weiterhin konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der n-BNI-Behandlung bei WT, HZ und KO-Mäusen nachgewiesen werden ($p>0,05$). Bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl führte die Antagonisierung des κ -Opioidrezeptors zu keiner signifikanten Änderung des depressionsrelevanten Verhaltens (WT, HZ, μ -KO: NaCl vs. n-BNI; $p>0,05$).

3.4.2 Tail suspension Test, Analgesie und Körpertemperatur bei Mäusen mit unterschiedlicher Ausstattung des μ -Opioidrezeptors unter der Wirkung des δ -Opioidrezeptor-Agonisten SNC 80

Wir untersuchten im Einzelnen, die δ -Opioidrezeptor-vermittelte Wirkung bei Individuen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung auf Analgesie, Körpertemperatur und auf depressionsrelevantes Verhalten.

δ -Opioidrezeptor-Effekte bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl

Heiße Platte (max. 30 s) unter SNC 80

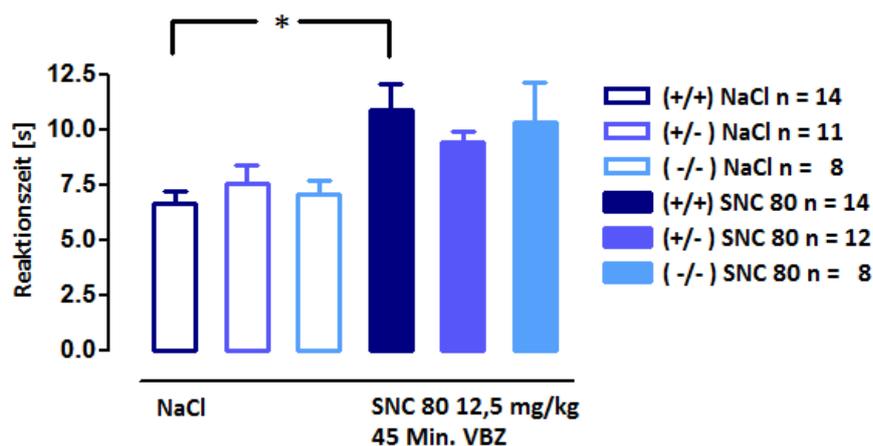


Abb. 23) δ -Opioidrezeptor-Effekte bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Analgesie im Versuchsaufbau der Heißen Platte

Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung unter Kochsalz- bzw. SNC 80 Injektion (12,5 mg/kg 45 Minuten VBZ); Ordinate: Reaktionszeit auf der Heißen Platte einer konstanten Temperatur von 56 °C in [s]; Angegeben sind MW \pm SEM; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p<0,05$.

Körpertemperatur unter SNC 80

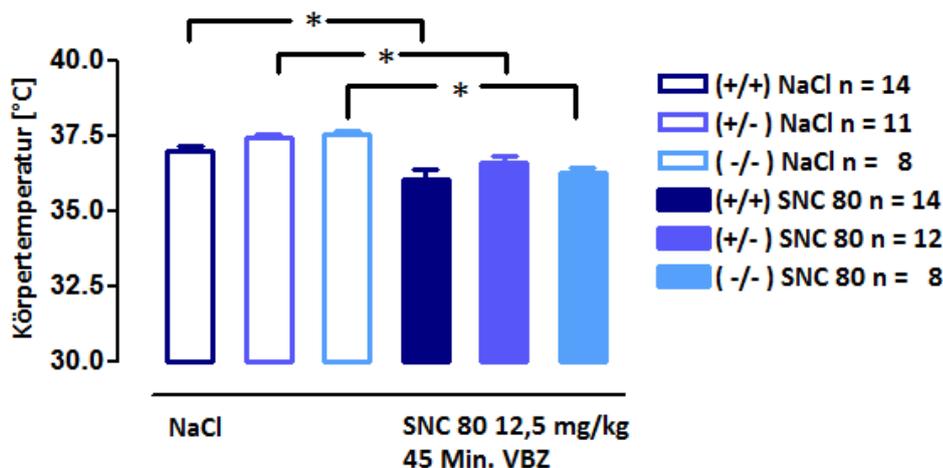


Abb. 24) δ -Opioidrezeptor-Effekte bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Körpertemperatur
 Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung unter Kochsalz- bzw. SNC 80 Injektion (12,5 mg/kg 45 Minuten VBZ); Ordinate: Körpertemperatur in [°C] 30 Minuten nach den jeweiligen Injektionen; Angegeben sind MW \pm SEM; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$.

Tail Suspension Test unter SNC 80

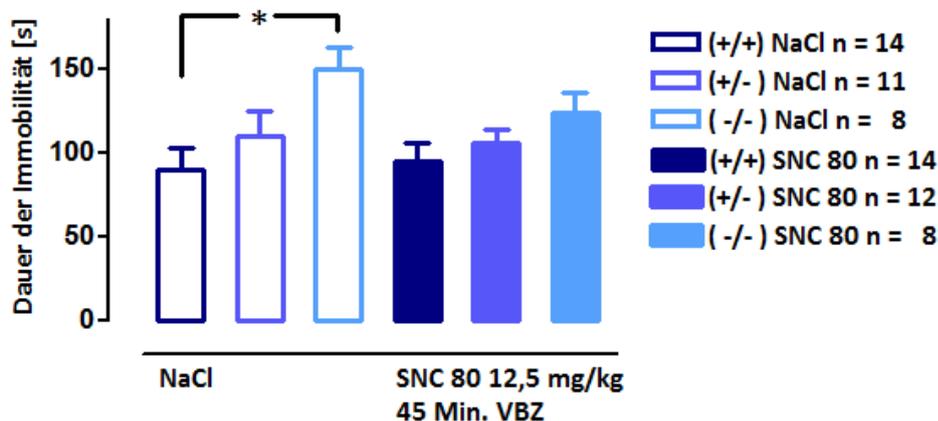


Abb. 25) δ -Opioidrezeptor-Effekte bei unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf die Dauer der Immobilität
 Abszisse: Versuchsgruppen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung unter Kochsalz- bzw. SNC 80 Injektion (12,5 mg/kg 45 Minuten VBZ); Ordinate: Dauer der Immobilität in Sekunden [s] während der 2.-6. Minute; Angegeben sind MW \pm SEM; post hoc Two-Way ANOVA Test: * Signifikanz nach Bonferroni $p < 0,05$.

Ergebnisse

Die Abbildung 23 zeigt die Reaktionszeit bis zur Reizantwort des Versuchstiers auf den thermischen Schmerzreiz nach Applikation von SNC80 (12,5 mg/kg 45 Minuten Vorbehandlungszeit) bzw. physiologischer Kochsalzlösung (1 ml/100g) in der Kontrollgruppe. Die Reaktionen auf den Schmerzreiz differierten bei den Mäusen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl nach der Injektion des Kochsalzes nicht voneinander ($F_{2,65}=0,458;p=0.637$). Es stellte sich keine unterschiedliche δ -Opioidrezeptor-vermittelte Wirkung in Abhängigkeit von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl dar (Abb. 23): ($F_{2,65}=0.403;p=0.672$). Ein analgetischer Effekt nach Applikation des δ -Opioidrezeptor-Agonisten SNC80 existierte ausschließlich bei Mäusen mit maximaler μ -Opioidrezeptor-Anzahl (NaCl vs. SNC80: $F_{1,27}=9,351;p=0,005$). Der Vergleich zwischen der analgetischen Wirkung von NaCl und SNC80 brachte bei den KO-Mäusen (post hoc $p=0,135$) keine signifikanten Unterschiede hervor. Bei den HZ-Mäusen konnte die Tendenz eines Effekts auf die Analgesie nach NaCl bzw. SNC80 Injektion nachgewiesen werden, blieb statistisch jedoch nicht signifikant ($p=0,072$).

Die gemessene Körpertemperatur unterschied sich nicht bei Mäusen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung nach SNC80- Injektion (Abb. 24): ($F_{2,65}=1,068;p=0,356$). Die Kontrollgruppe wies signifikant unterschiedliche Basaltemperaturen in Abhängigkeit von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl auf ($F_{1,32}=3,955;p=0,030$). Signifikante Unterschiede der Körpertemperatur waren nach δ -Opioidrezeptor-Aktivierung im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den WT-Mäusen mit maximaler μ -Opioidrezeptor-Anzahl ($F_{1,27}=4,953;p=0,035$) und bei den HZ-Mäusen mit einer reduzierten μ -Opioidrezeptor-Anzahl ($F_{1,22}=14,889;p=0,001$) nachweisbar. Die δ -Opioidrezeptor-induzierte Senkung der Körpertemperatur zeigte sich umso deutlicher bei den KO-Mäusen und schien eine μ -Opioidrezeptor-unabhängige Wirkung zu sein ($F_{1,15}=40,120;p<0,0001$). Die Abbildung 25 zeigt die Wirkung des δ -Opioidrezeptor-Agonisten SNC80 auf das depressionsrelevante Verhalten. Analog zu den Ergebnissen der naiven Mäuse mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung (Abb. 20), gab es eine deutliche Abhängigkeit der Dauer der Immobilität von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl in den Kontrollgruppen, welche physiologische Kochsalzlösung erhielten ($F_{1,65}=3,856;p=0,032$). Post hoc waren signifikant längere Immobilitätsdauer bei KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen nachweisbar ($p=0,028$). Die Dauer der Immobilität bei HZ-Mäusen lag zwischen der der WT -und KO-Mäuse. Nach Injektion des δ -Opioidrezeptor-Agonisten SNC80 konnte keine signifikant unterschiedliche Dauer der Immobilität zwischen WT, HZ und KO-Mäusen nachgewiesen werden ($F_{2,65}=0,607;p=0,439$; WT, HZ, μ -KO: NaCl vs. SNC80 $p>0,05$).

4 Diskussion

4.1 μ -Opioidrezeptor-Bindung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einem Spektrum von Experimenten BALB-c/C 57 Hybrid-Mäuse mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung verhaltenspharmakologisch charakterisiert, um Unterschiede ihres Reaktionsverhaltens in Abhängigkeit von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl zu detektieren. Als Grundlage für die Experimente wurde die μ -Opioidrezeptordichte zu verschiedenen Zeitpunkten der Gesamtexperimente bei mehreren stochastisch ausgewählten Tiergruppen in Rezeptorbindungsstudien autoradiographisch untersucht. Die Erstbeschreibung dieser Methode erfolgte 1981 (76). Die Anwendung von Rezeptorbindungsstudien half, die einzelnen Rezeptorsubtypen voneinander unterscheiden zu können und etablierte sich zunehmend (77). Fortan wurde die hohe Selektivität von DAMGO zur Detektion von μ -Opioidrezeptoren in vivo und in vitro genutzt (78). Mithilfe des synthetischen Opioidpeptids DAMGO konnten wir im Hippocampus und im frontalen Cortex konstant die höchste μ -Opioidrezeptordichte bei den Wildtypmäusen, die geringste bei den μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen und eine mittlere Rezeptordichte bei den heterozygoten Mäusen nachgewiesen. Diese Untersuchungen belegen die Brauchbarkeit und die Konstanz unseres Tiermaterials.

4.2 μ -Opioidrezeptor- vermittelte Wirkungen mit direkter Korrelation zur Rezeptordichte

Die Charakterisierung der Tiere wurde mit zwei verschiedenen Strategien vorgenommen. Zum Einen wurden Morphineffekte untersucht, von denen angenommen werden kann, dass sie über direkte Interaktionen mit μ -Opioidrezeptoren ausgelöst werden. Zum anderen wurden Funktionen untersucht, bei denen eine Modulation des Verhaltens durch Opioidsysteme zu vermuten ist. Die verhaltenspharmakologischen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine strenge Korrelation zwischen Morphineffekten, von denen postuliert wird, dass sie über direkte Rezeptorwechselwirkungen ausgelöst werden. Zu ihnen zählen die Analgesie, die Beeinflussung der Körpertemperatur und ihr belohnender Effekt. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen eine strenge Korrelation der genannten Effekte mit der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren.

Die antinozizeptive Wirkung von Morphin korrelierte im Analgesiemoell „Heiße Platte“ linear mit der Anzahl exprimierter μ -Opioidrezeptoren, wie sie auch erstmalig 1996 durch die Forschungsgruppe Mattes et al. veröffentlicht wurde (54). Die hyperalgetische Reaktion der μ -KO Mäuse wurde 1997 von Sora et al. beschrieben (110). Bei heterozygoten Versuchstieren imponierte ein mittlerer analgetischer Effekt nach äquieffektiven Morphindosen und unterstützt bisherige Veröffentlichungen (80). Opioide werden in der Medizin als eines der stärksten, bekannten Schmerzmittel eingesetzt. Dabei unterscheiden sich die klinischen Wirkungen und Nebenwirkungen von Patient zu Patient. Eine unterschiedliche genetische Expression von μ -Opioidrezeptoren könnte ein Hinweis darauf

Diskussion

sein, warum Patienten in der postoperativen Schmerztherapie bei gleichem Therapieprinzip, gleicher Schmerzintensität und gleicher Opioiddosis im unterschiedlichen Maße Zufriedenheit äußern (81).

In gleicher Weise waren die hypothermen Morphineffekte abgestuft. Die Untersuchungen zur morphininduzierten Hypothermie zeigten eine deutliche Korrelation zur Anzahl der μ -Opioidrezeptoren. Mit sinkender μ -Opioidrezeptor-Ausstattung sank die morphininduzierte Hypothermie. Die morphininduzierte Körpertemperaturveränderungen waren sowohl abhängig von der Umgebungstemperatur, als auch von der Dosierung des μ -Opioidrezeptor-Agonisten (82). Wir nutzten äquieffektiv hohe Dosen, um Fehler durch den bimodalen μ -Opioidrezeptor-Effekt zu vermeiden, so wie es von Herrmann et al. 1942 erstmals beschrieben wurde (83). Beschrieben ist ebenfalls bereits, dass die hypothermen Effekte am stärksten mit der analgetischen Potenz der μ -Opioidrezeptor-Agonisten korrelieren und mit Naloxon antagonisierbar sind (82). Die hier durchgeführten Versuche bestätigen diese Erkenntnis erneut. Von einer Fixierung zwischen der Applikation des Morphins und der erneuten rektalen Körpertemperaturmessung wurde abgesehen, um keinen weiteren Störfaktor bzw. Fehlerquellen zu generieren (85). Die Mechanismen der opioidinduzierten Hypothermie wurden bei verschiedenen Säugetieren untersucht und zeigten deutliche Unterschiede zwischen den Spezies (86,87). Neben kälteinduzierter Hypothermie ist die opioidinduzierte Hypothermie auch beim Menschen Gegenstand neuester Forschungen. Kahn et al. untersuchten 2011 nach einem Moratorium der Fentanylzufuhr die Analgesie von Patienten mit Verbrennungen mit Morphin (88). Es konnte gezeigt werden, dass unter Morphin die Körpertemperatur der Patienten signifikant niedriger war und trotz systemischer inflammatorischer Reaktion auch blieb. Sicherlich ist dies im Rahmen der morphininduzierten Immunmodulation zu bewerten, kann jedoch für weiterführende Untersuchungen für die therapeutische Hypothermie im Rahmen einer intensivmedizinischen Betreuung beim Postreanimationssyndrom oder im Rahmen der Hirndrucktherapie Anwendung finden. So wurden Fälle von opioidinduzierter Hypothermie nach Spinalanästhesie mit intrathekaler Morphininjektion beschrieben, die mit der Gabe von Benzodiazepinen, welche am GABA Rezeptor agonistische Wirkungen entfalten, rückgängig gemacht werden konnten, aber nicht mit Naloxon (89). Dies könnte für eine Interaktion dieser Neurotransmittersysteme sprechen, aber auch dafür, dass der Opioidrezeptor nicht allein maßgeblich an der Thermoregulation beteiligt ist. Untersuchungen des thermoregulatorischen Systems in vivo können Opioid-Effekte besonders gut widerspiegeln (90).

Eine Hauptfrage dieser Arbeit bezieht sich auf die Bedeutung der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren für das Belohnungsverhalten. Um diese Frage näher zu untersuchen, wurde das Modell der konditionierten Platzpräferenz mit Morphin verwendet. Dieses Modell ist mit einer repräsentativen Konstanz in den letzten 15 Jahren verwendet worden, um potentiell suchterzeugende

Diskussion

Eigenschaften einer Substanz aufzudecken und zu untersuchen (91). Es bietet vergleichbare Ergebnisse wie das Modell der Selbstapplikation von Substanzen (92,93). Der μ -Opioidrezeptor scheint eine zentrale Rolle im Belohnungssystem einzunehmen (94). Seine Aktivierung durch Morphin induziert Rewardverhalten (95,96). Wir konnten keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen während der Habituation und nach der Kochsalzinjektion finden, was beweist, dass die Tiere den Behandlungsgruppen ordnungsgemäß zugeordnet wurden. Dadurch wurde sichergestellt, dass allein die Einteilung in die Behandlungsgruppen oder das Handling keinen statistisch nachweisbaren Behandlungseffekt hervorbrachte. Unsere Untersuchungen zeigten, dass es einen Zusammenhang zwischen der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren und dem Belohnungsverhalten gab und unterstützen die Ergebnisse von Hall et al. (80). So konnte durch die Applikation von 10 mg/kg Morphin eine deutliche Platzpräferenz erzeugt werden. Wir untersuchten dies mit zwei weiteren Dosierungen, da mehrfach in der Literatur ein bimodales Verhaltensmuster bzw. vegetative Reaktionen bei niedrigen, im Vergleich zu hohen Opioiddosierungen gezeigt wurde (82, 84) und wir auch eine Aussage über die dosisabhängige Reaktion treffen wollten. Bei 5 und 20 mg/kg Morphin war ebenfalls eine deutliche Platzpräferenz bei den Wildtypen mit maximaler μ -Opioidrezeptor-Anzahl zu verzeichnen. Bei den heterozygoten Tieren stellte sich eine Platzpräferenz mit 5 mg/kg Morphin im Vergleich zur Applikation von Kochsalz dar. Allerdings war diese Platzpräferenz deutlich geringer ausgeprägt, so dass weder ein signifikanter Unterschied zum vollen Rezeptorbesatz (WT) noch zum vollständigen Fehlen des μ -Rezeptors (KO) festgestellt werden konnte. Wir gehen davon aus, dass die erzeugte Platzpräferenz bei den HZ-Mäusen genau in der Mitte zwischen denen der WT und KO-Mäuse steht (80) und aus diesem Grund der Vergleich zwischen den von uns verwendeten Dosierungen nur eine Tendenz aufdeckt, die statistisch mit Hilfe der Two-Way ANOVA-Analyse - selbst post hoc - nicht nachzuweisen ist. Aus der Literatur sind Untersuchungen mit Morphindosen von 0,5, 1, 2, 3, 5 und 10 mg/kg bei μ -Rezeptor-KO Mäusen, die aus C57B6/ 129 SV mit C57BL/6 rückgekreuzt wurden, bekannt (59,80,97). Sie zeigten eine relevante morphininduzierte CPP bei einer Morphindosis von 10 mg/kg. Verschiedene genetische Hintergründe können unter anderem die unterschiedliche Sensitivität bezüglich der Morphindosen erklären (98). Interessanterweise war die morphininduzierte Platzpräferenz bei den heterozygoten Tieren mit 20 mg/kg zwar geringer, jedoch deutlicher von der Platzpräferenz der WT zu unterscheiden, allerdings nicht von der nicht vorhandenen Platzpräferenz der μ -KO Tiere. Möglicherweise könnte eine noch höhere Dosierung eine deutlichere Platzpräferenz aufdecken, was zukünftig zu untersuchen wäre. Becker et al. beschrieben 2000 eine signifikante Abnahme der Selbstapplikation von Morphin bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen nach Vorbehandlung mit Nor-Binaltorphimin (94). Das bestärkt die Annahme, dass dem κ -Rezeptor, bei der Frage nach Suchtmodulierendem Verhalten, nicht nur die häufig beschriebene aversive Wirkung zukommt (99). Vielmehr gibt es wahrscheinlich auch eine dosisabhängige Wirkung. Durch hohe Morphindosen und

Diskussion

ihrer nachgewiesenen Bindung - auch am κ -Opioidrezeptor (100) - könnte eine aversive Wirkung dazu geführt haben, dass der Vergleich zwischen den HZ- und KO-Tieren unwesentlich ausfiel. Eine höhere Anzahl der Versuchstiere könnte mögliche Signifikanzen aufdecken. Bei den KO-Tieren fanden wir keine Unterschiede zwischen den Effekten von Kochsalz- und Morphininjektionen; weder bei 5 mg/kg, 10 mg/kg (Literatur) noch bei 20 mg/kg. Eine konditionierte Platzpräferenz konnte bei Mäusen, denen der μ -Opioidrezeptor fehlt, mit Morphin nicht etabliert werden. Bei diesen Tieren konnte der belohnende Morphineffekt nicht ausgelöst werden. Viele Studien zeigten ein fehlendes Rewardverhalten bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen nach Applikation eines μ -Opioidrezeptor-Agonisten (54,101,102), was auch die Versuche dieser Arbeit gezeigt haben. Das reduzierte Rewardverhalten bei heterozygoten Tieren konnte - wie in zuvor gezeigten Veröffentlichungen der Gruppe Hall et al. 2004 - reproduziert werden (103). Um eine Wirkung des κ -Rezeptors beurteilen zu können, müsste eine Untersuchung mit μ -KO-Mäusen mit und ohne Vorbehandlung mit nor-Binaltorphimin zur morphininduzierten CPP durchgeführt werden, bzw. eine pharmakologische Hemmung des δ -Rezeptors mit Naltrindol initiiert werden, um die reine κ -Opioidrezeptor-Wirkung zu detektieren. Der Einfluss des δ -Opioidrezeptors auf das Rewardverhalten wird aktuell kontrovers diskutiert (104). Einerseits ist die morphininduzierte Platzpräferenz bei δ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen verringert (105), andererseits bleibt die Morphin-Selbstadministration bei ihnen erhalten (106). Da die Selbstadministration von Substanzen allein durch die Motivation der Tiere erfolgt, können außer dem Reward -und Suchtverhalten auch das allgemeine Lernverhalten eine Rolle spielen, bei dem der δ -Opioidrezeptor stark involviert zu sein scheint (62). Der μ -Opioidrezeptor wurde vornehmlich mit Morphin untersucht. Contarino et al. zeigten 2002, dass Heroin als potentes halbsynthetisches Opioid bei μ -Opioidrezeptor-defizienten Mäusen eine ähnlich starke konditionierte Platzpräferenz hervorruft, wie bei Wildtypen mit entsprechend vollem μ -Opioidrezeptorbesatz (101). Weitere Mechanismen, wie z.B. Interaktionen mit weiteren Transmittersystemen sind nur zum Teil erforscht. Das dopaminerge Belohnungssystem ist maßgeblich an der Entwicklung einer Opioidabhängigkeit beteiligt (102). Die bedeutende Rolle der Dopaminrezeptorsubtypen D_1 (97) und des D_2 (107) bei μ -opioidinduziertem Belohnungsverhalten ist weitestgehend belegt. Darüber hinaus vermitteln dynorphinerge Neurone eine dysphorische Wirkung durch direkte Interaktionen an den dopaminergen Bahnen (108,109,65). Wir gehen davon aus, dass die Anzahl der κ - und δ -Opioidrezeptoren bei veränderter μ -Opioidrezeptor-Anzahl unverändert bleibt (54, 79), es gibt jedoch Berichte über eine veränderte Funktion der κ -Rezeptoren bei BALB/c Mäusen (111). Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum die heterozygoten Mäuse bei einer Morphindosis von 20 mg/kg im Rewardverhalten eher dem Verhalten der μ -KO-Mäuse näher waren. Die hohe Morphindosis könnte durch die verminderte μ -Opioidrezeptor-Anzahl an weiteren Opioidrezeptoren wie z.B. dem κ -Opioidrezeptor gebunden haben, teilweise dysphorische Effekte ausgelöst haben und zu einer geringer ausgeprägten

Diskussion

Platzpräferenz geführt haben. Die reduzierte Dopaminfreisetzung durch Aktivierung des κ -Opioidrezeptors ist in der Literatur bereits ausführlich beschrieben (112). Die Antagonisierung cholinergere Rezeptoren hat zu reduziertem Abhängigkeitsverhalten bei morphinabhängigen Mäusen geführt (113). Der Serotoninrezeptor 5 HT_{1A} scheint eine entscheidende Rolle beim Suchtverhalten morphinabhängiger Mäuse einzunehmen (114). CPP induzierende μ -Opioidrezeptor-vermittelte Effekte sollten mit weiteren Substanzen untersucht werden. Die Selbstadministration von suchterzeugenden Substanzen ist eine weitere etablierte Methode zur Untersuchung des Belohnungsverhaltens (92). Die Morphin-Selbstadministration wurde bei Wildtypen und μ -KO-Mäusen untersucht (94) und unterstützt unsere Ergebnisse. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, warum Menschen ein unterschiedliches Suchtpotential zeigen. Natürlich sind neben der hypothetisch unterschiedlichen Ausstattung mit μ -Opioidrezeptoren weitreichendere physiologische, psychische, soziale und persönliche Faktoren ausschlaggebend für die individuelle Suchanfälligkeit (115). Die klinische Bedeutung interindividueller Unterschiede der μ -Opioidrezeptor-Ausstattung könnte in Zukunft therapeutisch und prophylaktisch bei der Suchtbehandlung wegweisend sein.

Zur Vervollständigung der Morphineffekte wurden Untersuchungen zur Lokomotion durchgeführt. Bei der Untersuchung der Motilität zeigte sich, dass es keine Unterschiede in der Grundaktivität der Mäuse gab, wenn diese unter stressarmen Bedingungen gemessen wurde (59,94,103). Stressarm bedeutet hierbei: ohne den Einfluss einer Injektion oder Medikamentenwirkung oder einem zusätzlichem Handling. Die Morphinapplikation erzeugte unterschiedlich starke Wirkungen bei den verschiedenen Genotypen. Bei den Wildtypen führte Morphin erwartungsgemäß in den ersten 30 Minuten nach der Injektion zu einer deutlichen motorischen Stimulation der Tiere (101). Diese konnte bei den μ -KO-Mäusen nicht beobachtet werden (59). Wir fanden bei den heterozygoten Mäusen lediglich eine geringe, im Vergleich zu den anderen Genotypen nicht signifikante Zunahme der motorischen Aktivität. Für die motorische Aktivierung könnte somit der volle μ -Opioidrezeptorbesatz notwendig sein. Sora et al. fanden 2001 eine morphininduzierte Aktivitätszunahme bei heterozygoten Mäusen, die zwei Stunden nach Morphininjektion zwischen denen der Wildtypen und μ -KO-Mäuse lag und somit eine Gen-Dosis-Abhängigkeit bei 10 mg/kg Morphin darstellte (59). Es wurde auch ein exploratives Verhalten der heterozygoten Mäuse, ähnlich dem der Wildtypen während der Habituationszeit von einer Stunde, beobachtet. Die sich unterscheidenden Ergebnisse könnten am unterschiedlichen Versuchsaufbau liegen: bei den hier durchgeführten Untersuchungen wurde 5 mg/kg Morphin verabreicht, eine Habituation von 15 Minuten gewährt (vs. 1 h) und danach die Aktivität für 30 Minuten (vs. 3 h) observiert. Die Interaktion des μ -Opioidrezeptors mit weiteren Transmittersystemen kann durch eine reduzierte μ -Opioidrezeptor-Anzahl verändert sein. Die Enthemmung der dopaminergen Neurone in der Substantia nigra und im ventralen Tegmentum durch μ -Opioidrezeptor-Agonisten (116) und die

daraus resultierende Freisetzung von Dopamin im Striatum und Nucleus Accumbens sind bekannt. Eine morphininduzierte Aktivitätssteigerung konnte bei D1-Rezeptor-KO Mäusen nicht hervorgerufen werden (102). Dies verdeutlicht nicht nur die enge Interaktion des Opioidsystems mit dem dopaminergen System, sondern auch welche zentrale Stellung hierbei die Aktivierbarkeit des μ -Opioidrezeptors einnimmt. Bei einer reduzierten μ -Opioidrezeptor-Anzahl könnte auch eine Mehrbesetzung von κ -Rezeptoren zu einer verminderten Dopaminfreisetzung und damit zur reduzierten horizontalen Aktivität geführt haben (109). Interessanterweise deckten diese Motilitätsuntersuchungen bei feinerer Analyse ein verändertes emotionales Verhalten der μ -Opioidrezeptor-defizienten Mäuse auf. Sie liefen unter stressarmen Bedingungen während der Habituation im Vergleich zu den Wildtypmäusen eine größere Strecke im mittleren Teil der Aktivitätsbox, was in früheren Untersuchungen nicht beschrieben wurde (102). In dem Buch „The Rat“ publiziert von SH Barnett (1963) wird das Verhalten „thigmotaxis“ beschrieben, bei der das Nagetier bestrebt ist, sich eher am Rand des Apparats, also „wandnah“ auf zu enthalten (117). Daraus folgend kann der Aufenthalt in der Mitte als exploratives Verhalten interpretiert werden und somit als einfaches „Angstmodell“ fungieren. Unsere Ergebnisse deuten auf ein - auch als unphysiologisch bewertbares - vermindertes Angstverhalten unter mäßigen Stressbedingungen bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen hin. In der Literatur wurde der Aufenthalt in der Mitte der Apparatur selten explizit dargelegt. Untersuchungen der Lokomotion sind meist in horizontal und vertikal bzw. als Gesamtaktivität dargestellt worden. Unsere Ergebnisse sind dahingehend nicht vergleichbar. Erwähnenswert bleibt, dass die Aktivität der μ -Opioidrezeptor-KO-Mäuse während der Habituation und nach Morphininjektion stark reduziert war (59,118,119). Die Morphinapplikation hatte dagegen bei allen Mäusen keinen Einfluss auf den Aufenthalt in der Mitte der Apparatur und somit keinen Einfluss auf das Angstverhalten. Experimentelle Gegebenheiten, wie die Größe der Versuchsapparatur und die Beleuchtungssituation, sowie das Handling sowie weitere verhaltensrelevante, vor allem die Ängstlichkeit affektierende Reize, können zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben.

4.3 Emotionales Verhalten ohne exogene Opioidstimulation

Um die Effekte einer unterschiedlichen Anzahl an μ -Opioidrezeptoren auf die Emotionalität zu prüfen, sind weiterführende Untersuchungen, zum Angstverhalten und zur Schreckreaktion sowie zum depressionsrelevanten Verhalten durchgeführt worden. Diese Ergebnisse unterlagen komplexen Variationen. Die Betrachtung der zentralen Exzitabilität wird an dieser Stelle mit eingeschlossen.

4.3.1 Schreck- und Angstreaktion

Unter Stressbedingungen fanden wir verminderte Reaktionsschwellen bei den μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen. Sie zeigten eine gesenkte Schwelle für das *freezing*- und *escape*verhalten bei elektrischer Stimulation, sowie eine verstärkte *startle* Reaktion. Die primär gesenkte Angstschwelle in Verbindung mit schmerzvollen Reizen könnte bei den μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen eine reduzierte Wirkung der endogenen Opiode mit dem Angriffspunkt des μ -Opioidrezeptors in Stresssituationen darstellen. Die Annahme, dass dem μ -Opioidrezeptor eine anxiolytische Eigenschaft zukommt, ist in der Literatur beschrieben (120). Unsere Ergebnisse verdeutlichten, dass eine Reduktion des μ -Opioidrezeptors zwar mit einer herabgesetzten Angstschwelle einherging, der komplette Ausfall der μ -Opioidrezeptoren jedoch keine lineare Zunahme der Angstreaktion mit sich brachte. Ein gesteigertes Angstverhalten bei den μ -KO Mäusen im Vergleich zum vollen μ -Opioidrezeptorbesatz ist aus der Literatur bekannt (121). Schmerzen und Angst stellen protektive Funktionen des Organismus dar, die vor weiteren Schäden schützen sollen. In Stresssituationen erfolgt die Aktivierung des adrenergen Systems und des endogenen Opioidsystems, neben der Aktivierung weiterer Hormonsysteme (45). Da die Angstschwelle mit reduziertem μ -Opioidrezeptor (HZ) niedriger wurde, die Fluchtreaktion hingegen als Folge der Angst bei den μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen wieder abnahm, besteht Grund zu der Annahme, dass eine veränderte Anzahl an μ -Opioidrezeptoren eine Disbalance zwischen den Stresshormonen des endogenen –und des adrenergen Systems hervorruft und ihre protektive Funktion möglicherweise maskiert. Filliol D. und Kollegen publizierten 2000 im Nature die anxiolytische Wirkung des δ -Rezeptors (121). In der genannten Studie wurde am Modell des *elevated plus-maze* (122) gezeigt, dass δ -Opioidrezeptor-defiziente Mäuse signifikant ängstlicher waren als die Vergleichsgruppe. Die μ -Opioidrezeptor-defizienten Mäuse zeigten nur mäßig ängstliches Verhalten. Auch wenn die verschiedenen tierexperimentellen Modelle nicht direkt miteinander vergleichbar sind, kann eine überwiegende δ -Rezeptorwirkung bei den μ -KO-Mäusen in unserem Modell zu einer wieder herabgesetzten, reduzierten Angstreaktion im Vergleich zu den HZ-Mäusen geführt haben (121). Da in beiden Experimenten keine Opiode zugeführt wurden, können hier Aussagen über die Aktivität der endogenen Opiode getroffen werden. Die anxiolytische Wirkung von endogenen Opioiden und ihre vorrangige Bindung am μ - und δ -Rezeptor ist in der Literatur beschrieben (123). Die unterschiedlichen Verhaltensweisen von μ -KO-Mäusen und den HZ-Mäusen mit reduzierter μ -Opioidrezeptor-Anzahl deuten auf eine divergente emotionale Regulation von μ - und δ -Opioidrezeptoren und der Beteiligung des endogenen Opioidsystems hin. Dies steht einerseits im Kontrast zu bisherigen Veröffentlichungen (124,125), andererseits werden unsere Ergebnisse in dem Zusammenhang unterstützt, dass dem μ - und dem δ -Opioidrezeptor eine anxiolytische Wirkung zukommt (123). Eine Aussage über eine mögliche stärkere anxiolytische Wirkung einer der beiden Rezeptorsubtypen bleibt zu untersuchen. Der κ -Rezeptor wie es Filliol et al. mit κ -Rezeptor-

Diskussion

defizienten Mäusen zeigten, soll keine signifikante Bedeutung in Hinblick auf ein verändertes Angstverhalten haben. Allerdings zeigten Ukai et al. 1995, dass der κ -Rezeptor indirekt über Interaktionen mit dem muscarinergen Rezeptor eine Rolle im Angstverhalten spielt (126). Der muscarinerge M1 Rezeptors ist bei μ -KO Mäusen geringer exprimiert und führt zu einem reduzierten Angstverhalten (127). Um einen dezidierten Vergleich herstellen zu können, sollten mit unseren Tieren weitere Experimente, wie z.B. dem *elevated plus-maze* oder dem *forced swimming* Test durchgeführt werden und dabei weitere Opioidrezeptorsubtypen pharmakologisch inaktiviert werden, um mögliche Interaktionen zu beleuchten. Unsere Untersuchungen zeigten, dass eine Reduktion der μ -Opioidrezeptoren eine verstärkte Schreckreaktion mit sich brachte. Die Reduktion des μ -Opioidrezeptors scheint zu genügen, um ein gesteigertes Schreckverhalten hervorzurufen. Die weitere Reduktion führte zu keiner Änderung bzw. Steigerung der Schreckreaktion. Bei der Angstkonditionierung konnte keine direkte Korrelation zur Anzahl der μ -Opioidrezeptoren hergestellt werden. Die Angstkonditionierung hat in den letzten Jahren viel Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Verhaltenspharmakologisch gesehen hat die Angstkonditionierung ihren Stellenwert direkt am Übergang von Erinnerung und Emotion (128,129). Beeinträchtigungen in der Angstkonditionierung können zum Formenkreis der Angststörungen, wie z.B. Panikstörungen oder spezifische Phobien bei Menschen beitragen (130,131). Ratten mit Amygdalaläsionen zeigten kein *freezing* wenn der Fußschock mit einem lauten Ton gepaart war (132). Weitere Prädiktoren, wie ein lauter Ton, wurden genauso wenig mit einer Angstreaktion beantwortet (133). Die Amygdala spielt zwar eine entscheidende, jedoch nicht die alleinige Rolle beim Erlernen aus einer aversiven Erfahrung. Die Bedeutung der hippocampalen Formationen, der thalamischen und hypothalamischen Formationen, des NMDA-Rezeptors sowie weiterer anatomischer Schaltkreise darf nicht außer Acht gelassen werden (134,135). Die Injektion des NMDA-Antagonisten (APV=2-Amino-5-phosphonovaleriansäure) führte zu einer manifesten Abschwächung des *freezing*verhaltens (136,137). Die hohe Dichte an Opioidrezeptoren im limbischen System kann auf ihre mögliche modulierende Bedeutung in der Angstkonditionierung deuten (138). Untersuchungen von Sanders et al. zeigten, dass es eine signifikante Beeinträchtigung der Angstkonditionierung zwischen WT-, μ -KO- und HZ-Mäusen gab, wenn sie über 5 Tage den Reizen ausgesetzt waren. Wurde die Angstkonditionierung jedoch nur an einem Tag untersucht, sah man keine signifikanten Unterschiede (139). Unsere Untersuchungen an den einzelnen Mäusen fanden an einem Tag statt und sind mit den Ergebnissen der genannten Studie einstimmig. Erwähnenswert ist, dass in der Literatur Unterschiede in der Angstkonditionierung und im Lernverhalten verschiedener Mäusestämme beschrieben sind. Insbesondere beim Stamm Balb-c imponiert eine gesteigerte momentane Angstreaktion (140). Unsere Mäuse gehören dem Stamm Balb-c/C57 an. Sanders und Kollegen untersuchten Mäuse des C57 Stammes, um Verhaltenseffekte aufgrund genetischer Manipulation zu minimieren. Die Methoden zur Untersuchung der Angstkonditionierung variieren

immens. Allein bei der Angschwelenbestimmung mittels Applikation eines elektrischen Schocks der Pfoten, wie wir sie mit maximal 78 elektrischen Reizen an einem Tag durchführten, beschreiben Sanders et al. maximal 5 und Filliol D. et al. 36 pro Tag und Untersuchung. Die unterschiedliche genetische Ausstattungen, sowie das Handling, der Versuchsaufbau und die Habituationszeiten können zu unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Letztendlich bleibt festzuhalten, dass ein partieller Verlust des μ -Opioidrezeptors genügte, um ein verändertes verhaltenspharmakologisch nachweisbares Angstverhalten hervorzurufen. So kann festgestellt werden, dass eine Reduktion der μ -Opioidrezeptoren genügt, um ein deutliches Defizit beim Erlernen einer schmerzreizmotivierten, bedingten Reaktion auszulösen. Die elektrische Schwelle für das *freezing*-Verhalten war bei 50 %iger μ -Opioidrezeptor-Ausstattung deutlich gesenkt, die Schwelle für die Fluchtreaktion war eher weniger affektiert und vergleichbar mit der der μ -Opioidrezeptor-defizienten Mäuse. Lernen und Gedächtnisspeicherung wurden durch negative emotionale Reaktionen gestört, die motorische Antwort blieb ungestört.

4.3.2 Depressionsrelevantes Verhalten

Erkrankungen aus dem Formenkreis der Depressionen sind ein weltweit führender Auslöser für Invalidität, enormem Leidensdruck und Arbeitsunfähigkeit, die in den kommenden Dekaden zuzunehmen droht (141). 50 % der diagnostizierten depressiven Episoden heilen nach einem Jahr auch ohne pharmakotherapeutische Unterstützung ab. Leider werden 80 % der Patienten innerhalb der folgenden 15 Jahre rückfällig (142). Unsere Untersuchungen zum depressionsrelevanten Verhalten am Modell des *tail suspension* Tests (143) zeigten eine Abhängigkeit der Immobilitätsdauer und somit des depressionsrelevanten Verhaltens von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren. Die Reduktion der μ -Opioidrezeptor-Anzahl deutete auf ein erhöhtes depressionsrelevantes Verhalten hin, die Abwesenheit des μ -Opioidrezeptors steigerte diesen Zustand signifikant im Vergleich zum vollen μ -Opioidrezeptorbesatz, jedoch nicht mehr wesentlich im Vergleich zum halben μ -Opioidrezeptorbesatz. Unsere Ergebnisse schließen sich den Ergebnissen der Gruppe Filliol et al. an (121). Sie beschrieben ein erhöhtes, aber nicht signifikantes depressionsrelevantes Verhalten von μ -KO-Mäusen am Modell des *forced swimming* Tests, einer weiteren etablierten Methode zur Untersuchung der Depressivität. Andererseits wird eine reduzierte Immobilitätsdauer bei μ -KO Mäusen im *tail suspension* Test bei längerer Exposition (15 min) beschrieben (144). Die Rolle des μ -Opioidrezeptors ist vielfach in Hinblick auf ihre regulatorische Funktion auf den Gemütszustand bzw. auf das emotionale -und depressionsrelevante Verhalten untersucht worden (145) und nimmt immer mehr an Bedeutung zu, so dass Opiode als Antidepressiva diskutiert werden (146). Antidepressiva wiederum werden im klinischen Alltag leitliniengetreu zur Therapie von neuropathischen Schmerzen eingesetzt. Ihre Wirkung ist durch

Diskussion

Naloxon regredient (147), was die Bedeutung des μ -Opioidrezeptors in diesem Kontext betont. Neue Antidepressiva mit serotoninerger und opioiderger Wirkung sind Gegenstand aktueller Forschungen (148). Untersuchungen an heterozygoten Mäusen sind in der Literatur bisweilen rar. Schon die Reduktion der μ -Opioidrezeptoren hatte einen signifikanten Einfluss auf das depressionsrelevante Verhalten; sie wirkte immobilisierend auf den physiologischen Drang, sich aus einer misslichen Lage befreien zu wollen. Auch wenn endogenen Opioide, wie Endomorphin-1 und -2, die am μ -Opioidrezeptor angreifen können, eine signifikante Reduktion der Immobilitätsdauer hervorrufen (149), reicht eine 50 %ige Reduktion der μ -Opioidrezeptor-Anzahl aus, um diese Wirkung zu beeinträchtigen. Die Bedeutung weiterer Opioidrezeptorsubtypen in der Regulation von emotionalem und depressionsrelevantem Verhalten ist Gegenstand aktueller Untersuchungen (62). Wir untersuchten diese Zusammenhänge ebenfalls und beleuchten sie im letzten Teil der Diskussion.

4.3.3 Zentrale Exzitabilität

Kindling ist ein chronisches Epilepsiemodell, bei dem wiederholte Gaben initial subkonvulsiver elektrischer Reize oder Dosen von epileptogenen Substanzen, stufenweise zum Krampfgeschehen führen und letztendlich generalisierte Krampfanfälle auslösen (150). Die Erstbeschreibung erfolgte 1969 (151), die chemische Induktion etablierte sich 20 Jahre später (152), und pointierte die Bedeutung des GABAergen Systems. Zwischen alternativen Substanzen ist das Kindling mit PTZ (GABA_A Rezeptor-Antagonist) das am weitesten anerkannte Modell zur Untersuchung der Epileptogenese (153). Die zentrale Exzitabilität wird durch μ -Opioidrezeptoren moduliert; bisherige Ergebnisse konnten durch unsere Experimente bestätigt werden. Subkonvulsive Dosen von PTZ aktivieren das Opioidsystem (154). Ein chemisch induziertes Kindling mit Pentylenetetrazol setzt bei μ -Opioidrezeptor-defizienten Mäusen mit schnellerer Latenz ein als bei Mäusen mit vollem μ -Opioidrezeptorbesatz und ist zudem stärker ausgeprägt (155). In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass heterozygote Mäuse eine vergleichbare Krampfentwicklung nach pharmakologischer Induktion mit PTZ wie die Wildtypmäuse aufwiesen. Auch eine verminderte μ -Opioidrezeptor-Anzahl konnte eine nahezu normale Epileptogenese gewährleisten. In den niedrigen Krampfstufen gab es keine Unterschiede zwischen Wildtypen, heterozygoten- und sogar den μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen. Ab der 3. Krampfstufe (Myoklonien) waren signifikante Unterschiede zwischen vollem und leerem μ -Rezeptorbesatz erkennbar. Selbst die Ausstattung mit 50 % der μ -Opioidrezeptoren hatte einen stabilisierenden Effekt auf die Krampfentwicklung ähnlich dem des vollen μ -Opioidrezeptorbesatzes. Der Einfluss weiterer Opioidrezeptorsubtypen an der zentralen Exzitabilität ist in der Literatur beschrieben. Die Verabreichung von δ -Opioidrezeptor-Agonisten führte tierexperimentell zur Krampfauslösung (156), während die Aktivierung von κ -Opioidrezeptoren eine eher antikonvulsive

Wirkung mit sich brachte (157). Die Verabreichung des δ -Opioidrezeptor-Antagonisten Naltrindol führte zu einer herabgesetzten Krampfantwicklung bei Tieren mit vollem μ -Opioidrezeptorbesatz (158). Als möglicher Grund dafür wird die Suppression der erhöhten Glutamatbindung induziert durch das PTZ-Kindling diskutiert (158). Ohne μ -Opioidrezeptoren führte die Antagonisierung des δ -Opioidrezeptors zu einer beschleunigten Krampfantwicklung (155), obwohl zuvor in Bindungsstudien gezeigt werden konnte, dass es keinen Unterschied in der Bindung des δ -Opioidrezeptors zwischen μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen und Wildtypen gab (30,159–161). Eine reduzierte G-Protein-Aktivierung durch den δ -Opioidrezeptor-Agonisten DPDPE in μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen wurde diskutiert (162), was wiederum auf eine funktionelle Co-Aktivität des δ -Opioidrezeptors hindeutet. Die Bedeutung der μ -Opioidrezeptor-abhängigen δ -Opioidrezeptorwirkung könnte auch beim Kindling eine Erklärung dafür sein, warum es funktionelle Unterschiede gibt, die jedoch nicht durch Bindungsstudien zu verifizieren sind (163). Sie könnte der bereits bei der antinozizeptiven Wirkung besprochenen reduzierten δ -Opioidrezeptor-induzierten Analgesie bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen gleichen (164, 110). Trotz vorhandener δ -Opioidrezeptoren bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen scheint ihre Funktion von der Aktivierbarkeit der μ -Opioidrezeptoren abhängig zu sein.

4.4 Interaktionen zwischen den Opioidrezeptorsubtypen

4.4.1 Schmerzschwellenbestimmung mit Etorphin

Das 1967 von Bentley und Hardy isolierte Thebainderivat Etorphin wurde zunächst für einen reinen μ -Opioidrezeptor-Agonisten gehalten (66,165). Die analgetischen Effekte wurden u.a. mit einer 25-fach stärkeren Potenz als die des Morphins beschrieben (166). Bindungsstudien zeigten einheitliche Aktivitäten an allen 3 Opioidrezeptorsubtypen (167). Wir untersuchten Mäuse mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Anzahl nach der Etorphingabe, um mögliche Unterschiede in der Schmerzschwelle zu detektieren, die durch die Aktivierung von δ - und κ -Opioidrezeptoren entstehen. Unsere Ergebnisse zeigten eine maximale Analgesie bei den Wildtypen, analog zu unseren Untersuchungen mit Morphin, sowie eine Abstufung der Analgesie korrelierend mit der μ -Opioidrezeptor-Anzahl. Die Schwanzwurzelreizung wurde hier, als über die spinale Nozizeption hinaus reichende Ergänzung zu den Schmerzschwellenbestimmungen an der Heißen Platte hinzugezogen. Die Schmerzschwellenbestimmung nach Etorphinwirkung an der Heißen Platte zeigte eine deutliche Schmerzschwellenabnahme in Abhängigkeit von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl, wie wir sie bereits in unseren grundlegenden Untersuchungen mit Morphin dargelegt hatten. Auch die analgetischen Indices korrelierten mit der μ -Opioidrezeptor-Anzahl und scheinen nicht von der

Aktivierung weiterer Rezeptorsubtypen beeinflusst zu sein. Eine äquivalente Wirkung am δ - oder κ -Opioidrezeptor hätte vor allem bei den μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen eine veränderte Analgesie gezeigt. Dosis-Wirkungskurven zeigten mehrfach einen ED₅₀ Wert von 1-1.5 μ g/kg Etorphin (66,163). Wir untersuchten mit einer Gesamtdosis von 20 μ g/kg Etorphin. 1982 beschrieben Law et al. eine höhere Affinität des Etorphins am δ -Opioidrezeptor als die des Morphins (168). Dies konnte in unseren Untersuchungen nicht rekonstruiert werden. Die Aktivierung von μ - und δ -Opioidrezeptoren führte unabhängig voneinander zu einer antinozizeptiven Antwort (169). Andererseits ist eine Interaktion zwischen dem μ - und dem δ -Opioidrezeptor mehrfach beschrieben worden (163,170,171). Nach 24 stündiger intrathekalen Applikation von Morphin erhöhte sich die Anzahl der δ -Opioidrezeptoren im Hinterhorn des Rückenmarks (172). Belegt ist ebenfalls, dass sich die Anzahl der δ -Opioidrezeptoren speziell bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen nicht verändert (54,159). Die Rekrutierung der δ -Opioidrezeptoren scheint von einer prolongierten μ -Opioidrezeptor-Aktivierung abhängig zu sein, die bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen nicht konstatiert werden kann (163). So konnten wir auch entgegen unserer Erwartungen bei den μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen keine überzeugende Schmerzlinderung durch das Etorphin erreichen, belegten jedoch auch eine enge Interaktion zwischen den analgetischen Effekten, die von μ - und δ -Opioidrezeptoren ausgehen. Unsere Ergebnisse untermauern die in der Forschung verbreitete Annahme, dass die heterozygoten Mäuse eine höhere Schmerzschwelle ohne Antinozizeptiva aufwiesen als ihre Artgenossen ohne μ -Opioidrezeptoren. Die Aktivierung des endogenen Opioidsystems ist denkbar. Die setzt scheinbar die Existenz des μ -Opioidrezeptors voraus, denn bei den μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen hatte sich die gesteigerte Grundschwelle nicht etabliert. Die intrinsische Aktivität von Etorphin am κ -Opioidrezeptor wurde in vitro als verhältnismäßig niedrig eingestuft. Sie ist niedriger als die des Morphins; die höchste intrinsische Aktivität zeigte Fentanyl (173). Weitere physiologische und regulatorische Einflüsse in vivo werden zukünftig zu erforschen sein. Eine Aktivierung des κ -Opioidrezeptors und eine damit verbundene veränderte antinozizeptive Wirkung konnte im Rahmen dieses Experiments nicht beleuchtet werden. Weiterführende Experimente mit einem hochselektiven κ -Opioidrezeptor-Agonisten, wie z.B. U 50488 könnten diese Fragestellung weiter beleuchten.

4.4.2 Wirkung der Opioidrezeptorsubtypen auf das emotionale Verhalten- ein vorrangiger δ -Opioidrezeptor-Effekt?

Wir untersuchten eine große Anzahl an Versuchstieren, um den Einfluss verschiedener Opioidrezeptor-Antagonisten auf das depressionsrelevante Verhalten zu untersuchen. Viele Studien demonstrierten die potentielle Rolle des endogenen Opioidsystems als möglichen Modulator von klinisch eingesetzten trizyklischen Antidepressiva. Die Injektion von β -Endorphinen führte bei

Diskussion

depressiven Patienten zu einem sich rapide darstellenden antidepressiven Effekt (174). Es konnte gezeigt werden, dass eine dauerhafte Gabe von Imipramin zu einer Zunahme der Naloxon-Bindung in bestimmten Hirnarealen von Ratten führte (175). Andererseits konnte Naloxon die antidepressive Wirkung von Desipramin aufheben (176). Wir gehen davon aus, dass eine akute Antagonisierung der μ -Opioidrezeptoren durch Naloxon bei WT -und HZ-Mäusen nicht gleichzusetzen ist mit der genetischen Ausschaltung des μ -Opioidrezeptors in Hinblick auf das depressionsrelevante Verhalten. Naloxon führte nicht zu einer Zunahme der Immobilität bei WT -und HZ-Mäusen. Die tendenziell verlängerte Immobilitätsdauer nach Naloxongabe bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen, kann auf weitere Rezeptorinteraktionen, insbesondere mit dem δ -Opioidrezeptor hindeuten. Naloxon wird häufig als nicht-selektiver Opioidrezeptor-Antagonist bezeichnet (177). Kürzlich veröffentlichte Daten betonen die antidepressive Wirkung des δ -Opioidrezeptors (178). Weitere pharmakologische Studien zeigten einen antidepressiven Effekt von endogenen Opioiden, die am δ -Opioidrezeptor agonistische Wirkungen entfalten konnten (179,180). Naltrindol als δ -Opioidrezeptor-Antagonist sollte nach unserer Prognosen die Immobilitätsdauer verlängern. Unsere Untersuchungen deuten darauf hin, dass je größer die μ -Opioidrezeptor-Anzahl ist (WT>HZ> μ -KO), desto größer auch die Verlängerung der Immobilitätsdauer ausfällt (nicht signifikante Werte). Bei den μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen veränderte sich die Immobilitätsdauer im Vergleich zur Kontrollgruppe kaum. Diese Ergebnisse unterstreichen die Abhängigkeit der δ -Rezeptor-Wirkung vom μ -Opioidrezeptorbestand auch in Hinblick auf depressionsrelevante Verhaltensweisen. Dieser Effekt wird noch deutlicher bei den Mäusen mit halbem μ -Opioidrezeptorbesatz: sie zeigten ein signifikant erhöhtes depressionsrelevantes Verhalten im direkten Vergleich zu der Kontrollgruppe. Betrachten wir ausschließlich die Änderung der Immobilitätsdauer innerhalb dieser Versuchsgruppe, so fällt auf, dass der 50 %ige Besatz mit μ -Opioidrezeptoren und die gleichzeitige pharmakologische Blockade des δ -Opioidrezeptors, keinen Unterschied im Verhalten hervorgerufen haben. Alle Versuchsgruppen waren „gleich“ depressiv. Auch der bisher konstante antidepressive Effekt des μ -Opioidrezeptors bei den Wildtypen ist durch die Antagonisierung des δ -Opioidrezeptors aufgehoben. Broom und Kollegen zeigten 2002, dass Naltrindol allein keinen Einfluss auf die Dauer der Immobilität im Versuch des *forced swimming* Tests mit sich brachte (178). Der κ -Opioidrezeptor spielt in der Akutphase, selbst wenn er durch endogene Opiode aktiviert würde, keine maßgebende Rolle. Andererseits scheint die Blockade des κ -Opioidrezeptors eine dominante Rolle im depressionsrelevanten Verhalten zu spielen, v.a. wenn es wenige oder keine μ -Opioidrezeptoren gibt. Eine Blockade steigerte das depressionsrelevante Verhalten in einem höheren Ausmaß als die alleinige Ausschaltung der μ -Opioidrezeptoren. Die Kombination aus genetischer μ -Opioidrezeptor-Ausschaltung und pharmakologischer κ -Opioidrezeptor-Blockade scheinen das depressionsrelevante Verhalten potenziert zu haben. Nor-Binaltorphimin stellt eine zuverlässige Substanz dar, den κ -Opioidrezeptor zu blockieren. Er kann die Immunreaktivität nach der Bindung

Diskussion

von dem spezifischen κ -Opioidrezeptor-Antikörper mit dem κ -Opioidrezeptor unterbinden (181). Die alleinige Blockade des κ -Opioidrezeptors führte bisweilen zu einer Abnahme von depressionsrelevantem Verhalten (182–184). In der Literatur führt eine Aktivierung des κ -Opioidrezeptors zu Dysphorie (185,186) und zur Erzeugung depressiven Verhaltens (187–189). Die κ -Opioidrezeptor-vermittelte Wirkung scheint bimodal zu sein: Seine Aktivierung führt im akuten Stresszustand zu Adaptationsverhalten indem es analgetische und motivierende Effekte realisiert. Die längere Aktivierung des κ -Opioidrezeptors führt eher zu depressivem Verhalten (190,191). Er spielt also eine zentrale Rolle in der akuten und chronischen Stressbewältigung. Weitere Stresshormone, wie das Cortisol beeinflussen den körpereigenen κ -Opioidrezeptor-Agonisten Dynorphin (60). Dynorphin wird in Regionen, die eine zentrale Rolle für das emotionale Verhalten spielen, so wie dem Hippocampus und Hypothalamus (192,193), als auch in der Amygdala und im Striatum freigesetzt (194,195). Die intracerebroventriculäre Injektion des Corticotropin-releasing-factors konnte die Freisetzung von Dynorphin induzieren (196). Schwarzer und Kollegen beschreiben 2009 eine vermehrte Dynorphinfreisetzung im Limbischen System während belastender Situationen im Rahmen einer erhöhten neuronalen Aktivität. Die Bedeutung des Dynorphins im Rahmen von Lernvorgängen aus aversiven Situationen wird diskutiert (197). Unsere Ergebnisse betonen die enge Interaktion der μ -Opioidrezeptorsubtypen. Eine strenge Trennung der einzelnen Funktionen ist insbesondere hinsichtlich des emotionalen Verhaltens nicht möglich. Auch darf die Rolle der weiterhin intakten endogenen Opioiden - insbesondere bei μ -Opioidrezeptor-KO-Mäusen aber auch bei heterozygoten - und Wildtypmäusen - nicht außer Acht gelassen werden. In unseren Kontrollgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede im depressionsrelevanten Verhalten, die möglicherweise durch die endogenen Peptide hervorgerufen sein könnten. Endogene Peptide, wie Met- und Leu-enkephaline weisen eine bis zu 10-fach höhere Affinität zum δ -Opioidrezeptor auf (198). Wäre ihre Wirkung nur von der Anzahl der δ -Opioidrezeptoren abhängig, hätten wir keine Unterschiede in unseren Kontrollgruppen erhalten. Dem entgegengesetzt ist die kurze Halbwertszeit der endogenen Peptide. Ein forcierter pharmakologischer Erhalt von endogenen Peptiden durch die Blockade des enzymatischen Abbaus, zeigte hinsichtlich des antidepressiven und anxiolytischen Verhaltens keinen Unterschied zwischen μ -Opioidrezeptor-KO- und Wildtyp-Mäusen (199). Wieder ragt die immense Bedeutung des δ -Opioidrezeptors hinsichtlich des emotionalen Verhaltens hervor. Wir untersuchten daher in einer weiteren Versuchsreihe die δ -Opioidrezeptor-vermittelte Wirkung anhand des hochselektiven und systemisch aktiven Agonisten SNC80 (70). Unsere Experimente deuteten auf eine Abhängigkeit der δ -Opioidrezeptor-vermittelten Wirkung von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren hin. Die antidepressive Wirkung des δ -Opioidrezeptor-Agonisten SNC80 in Abhängigkeit der μ -Opioidrezeptor-Anzahl war in unseren Untersuchungen statistisch nicht nachweisbar, zeigte jedoch bei den heterozygoten Tieren geringe Tendenzen der Reduktion der Immobilitätsdauer und die größte Wirkung bei den μ -Opioidrezeptor-

Diskussion

KO-Mäusen. Hier wurde die Dauer der Immobilität eindrücklich reduziert. Nach selektiver Aktivierung des δ -Opioidrezeptors konnte bei vollem Besatz des μ -Opioidrezeptors kein antidepressiver Effekt nachgewiesen werden. Erst durch die Reduktion der μ -Opioidrezeptoren kristallisierte sich die antidepressive Wirkung des δ -Opioidrezeptor-Agonisten heraus. 2005 zeigten Nieto und Kollegen, dass die antidepressive Wirkung von endogenen Peptiden, durch Naltrindol vollständig reversibel und gleichzeitig unabhängig vom μ -Opioidrezeptor war und somit eine ausschließlich auf den δ -Opioidrezeptor zurückzuführendes Phänomen darstellte (199). Die antidepressive Wirkung von SNC80 scheint dosisabhängig zu sein. Die maximale antidepressive Wirkung konnte bei Ratten im *forced swimming* Test unter einer Dosis von 32mg/kg s.c. erzielt werden (178). Eine höhere Dosierung hätte unsere Ergebnisse möglicherweise besser hervorheben können. Broom et al. zeigten auch, dass Morphin keinen Einfluss auf das depressionsrelevante Verhalten im *forced swimming* Test hat. Die für die physiologische Funktion essentielle und enge Interaktion zwischen dem μ - und δ -Opioidrezeptor, wird wiederholt betont. Der Versuch mit exogenen Substanzen die endogenen Mediatoren nachzuahmen und v.a. die Interaktionen zwischen den Rezeptoren abzubilden ist nach wie vor eine große Herausforderung. Methodologische Limitationen des *tail suspension* Tests zur Detektion von depressionsrelevantem Verhalten, bei denen keine Unterscheidung zwischen passiver Immobilität und aktivem Versuch sich aus einer misslichen Lage zu befreien- wie dem Klettern- gemacht werden (178,200), dürfen nicht außer Acht gelassen werden. Die Methode des *forced swimming* Tests ist weitaus häufiger in der Literatur zu finden und hat sich wiederholt bei der Fragestellung nach depressionsrelevantem Verhalten bewährt (201). Abschließend sind wir auch der Fragestellung nachgegangen, ob der spezifische δ -Opioidrezeptor-Agonist einen analgetischen Effekt erzeugen kann und ob dieser von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren abhängig ist. Dabei gab es deutliche Hinweise darauf, dass die δ -Opioidrezeptor-vermittelte Analgesie von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren abhängig sein könnte. Ähnliche Untersuchungen sind nach ausführlicher Literaturrecherche bis dato nicht beschrieben. Eine antinozizeptive Wirkung von SNC80, die durch Naltrindol reversibel war, wird diskutiert (70). Es wird jedoch betont, dass SNC80, welches zu den nicht peptidischen δ -Opioidrezeptor-Agonisten zählt, eine eher schwach ausgeprägte antinozizeptive Eigenschaft besitzt (202). Diese Veröffentlichungen stehen im Kontrast zu unseren Ergebnissen. Eine mögliche Wirkung des SNC80 an weiteren Opioidrezeptoren darf nicht außer Acht gelassen werden, da teilweise antidepressive Effekte durch nicht selektive Dosen von Naltrexon aufgehoben werden konnten und selbst bei viel höheren Dosierungen (SNC80 1-80 mg/kg s.c.) im Versuch des *warm water tail dips* keine analgetischen Effekte darlegen konnten (178). Der Vergleich der beiden Tests ist sicherlich als diffizil zu betrachten. Die durch SNC80 hervorgerufene Hypothermie war unabhängig von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl. Es ist bis dato keine weitere Untersuchung diesbezüglich in den großen Literaturdatenbanken zu finden. Lediglich eine Arbeit von Broom und

Diskussion

Kollegen aus dem Jahre 2002 beschreibt einen Abfall der Körperkerntemperatur bei Ratten, die mit 32 mg/kg SNC80 behandelt wurden. Somit liefern unsere Untersuchungen bei dieser Fragestellung neue Erkenntnisse.

Die im Rahmen dieser Arbeit mit Mäusen mit unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung gewonnenen Ergebnisse belegen sowohl die enorme Bedeutung der μ -Opioidrezeptoren als auch ihrer Anzahl für eine Vielzahl an Funktionen. Effekte, die vermutlich durch direkte Interaktionen an μ -Opioidrezeptoren ausgelöst werden, wie vor allem die antinozizeptive Wirkungen, die Hypothermie, aber auch die CPP, korrelieren in ihrer Ausprägung direkt mit der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren. Interessanterweise werden Funktionen, die komplexer über Opioidsysteme moduliert werden, auf unterschiedliche Weise durch die Zahl der vorhandenen μ -Opioidrezeptoren beeinflusst. So zeigen μ -Opioidrezeptor-defiziente Tiere ein verstärktes depressionsrelevantes Verhalten im Vergleich zu Wildtypen. Die heterozygoten Tiere dagegen zeigen Werte, die zwischen denen der Wildtypen und der KO-Tiere liegen. Anders sieht es bei der Krampfentwicklung im PTZ-*kindling* aus. Während die μ -Opioidrezeptor-defizienten Tiere eine deutlich verstärkte Krampfentwicklung aufweisen, unterscheiden sich die heterozygoten Tiere hierbei nicht von den Wildtypen. Der halbe μ -Opioidrezeptorbesatz reicht also aus, um das normale Verhalten aufrecht zu erhalten. Zu anderen Ergebnissen führten die Untersuchungen, die das Flucht- und Schreckverhalten analysieren. So ist die *startle* Reaktion bei den KO-Tieren verstärkt und die Schwelle für die Fluchtreaktion gesenkt. In diesen Untersuchungen zeigen die heterozygoten Tiere ein Verhalten wie die KO-Tiere. Das bedeutet, dass für diese Reaktionen die volle μ -Opioidrezeptor-Anzahl notwendig ist, um ein physiologisches Verhalten zu gewährleisten. Eine unterschiedliche Ausstattung mit μ -Opioidrezeptoren beim Menschen kann daher der Grund für eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Opioiden in der Schmerztherapie und auch entscheidend verantwortlich für eine Suchtentstehung sein. Das Angstverhalten ist schon bei einer Reduktion der μ -Opioidrezeptor-Anzahl gestört. Das depressionsrelevante Verhalten scheint auch von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren abhängig zu sein.

5 Zusammenfassung

Motiviert durch die Fragestellung, welche Auswirkungen eine unterschiedliche Anzahl an μ -Opioidrezeptoren auf die Schmerzwahrnehmung und Suchtentstehung hat, führten wir Untersuchungen an männlichen BALB-c/C 57 Hybrid-Mäusen durch. Diese waren mit einer unterschiedlichen Anzahl von μ -Opioidrezeptoren ausgestattet, so dass die Korrelation zu μ -Opioidrezeptor-vermittelten Effekten geklärt werden konnte. Folgende Effekte untersuchten wir mit diesen etablierten Methoden: Die Analgesie am Modell der Heißen Platte, die Hypothermie mit der rektalen Temperaturmessung post injectionem, die Lokomotion in der Motibox®, das Sucht –bzw. Belohnungsverhalten im Versuch der konditionierten Platzpräferenz, den Einfluss auf das Schreck-, Lern- und Fluchtverhalten am Modell der Shuttlebox®, sowie das depressionsrelevante Verhalten am *tail suspension* Test. Zuletzt wurde die Auswirkung der unterschiedlichen μ -Opioidrezeptor-Anzahl und die medikamentöse Krampfschwellenbestimmung mittels Pentylenetetrazol untersucht. Die tatsächliche μ -Opioidrezeptordichte wurde in Bindungsstudien bestätigt. Die analgetische und hypotherme Wirkung des μ -Opioidrezeptor-Agonisten Morphin, sowie die Aktivitätssteigerung waren proportional abhängig von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren. Diese Effekte kamen mit sinkender Anzahl der μ -Opioidrezeptoren weniger zur Geltung. Die Reduktion der μ -Opioidrezeptor-Anzahl führte verhältnismäßig zu einer sehr starken Reduktion der Aktivität. Die morphininduzierte Platzpräferenz war ebenso abhängig von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl. Diese Linearität konnte bei einer Morphindosis von 5mg/kg nachgewiesen werden. Bei einer Morphindosis von 20 mg/kg führte die Reduktion der μ -Opioidrezeptoren zur Aufhebung der Platzpräferenz. Die Untersuchungen zur Analgesie mit Etorphin, welches am μ -, δ - und κ -Opioidrezeptor bindet, zeigten auch eine Abhängigkeit von der μ -Opioidrezeptor-Anzahl. Zusätzlich konnte eine gehobene Schmerzschwelle, isoliert bei den heterozygoten Mäusen, gezeigt werden. Dies könnte ein Hinweis auf die Wirkung von endogenen Opioiden sein, die von der Anwesenheit des μ -Opioidrezeptoren abhängig zu sein scheinen. Eine Reduktion der μ -Opioidrezeptoren führte zu einer unverhältnismäßig hohen Reduktion der Angst-, Flucht- und Schrecksschwellen. Tiere ohne μ -Opioidrezeptoren waren schreckhafter, flohen jedoch verspätet. Die Reduktion des μ -Opioidrezeptors führte somit zur Beeinträchtigung von physiologischem Verhalten sowie Lern- und Gedächtnisleistung. Das depressionsrelevante Verhalten und die zentrale Exzitabilität waren abhängig von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren. Der μ -Opioidrezeptor scheint einen antidepressiven Einfluss zu haben. Die Aktivierung des δ -Opioidrezeptors hatte keinen antidepressiven Effekt, der im *tail suspension* Test verifiziert werden konnte. Die δ -Opioidrezeptor-induzierte Hypothermie war unabhängig von der Anzahl der μ -Opioidrezeptoren. Die medikamentöse Hemmung des κ -Opioidrezeptors zog eine antidepressive Wirkung nach sich, die umso stärker ausfiel, je niedriger die μ -Opioidrezeptor-Anzahl war.

6 Literaturverzeichnis

1. Heydari M, Hashempur M H, Zargaran A: Medicinal aspects of opium as described in Avicenna'S Canon of Medicine. *Acta med-hist Adriat* 11, 101–112 (2013)
2. Schmitz R, Friedrich Wilhelm Sertürner and the discovery of morphine. pp 61-74 *American Institute of the History of Pharmacy* (1985)
3. Raehal KM & Bohn LM: Mu opioid receptor regulation and opiate responsiveness. *AAPS J.* 2005 7, 587–591 (2005)
4. Richarz: Über Wesen und Behandlung der Melancholie. pp 28–65 *Allg. Zeitschrift der Psychiatr. und Psych. Medizin* (1858)
5. Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A: Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *EMBO J.* 17, 886–97 (1998)
6. Pert CB & Snyder SH: Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011–4 (1973)
7. Moolten M, Fishman J, Chen J-C, & Carlson K: Etonitazen: An opioid selective for the mu receptor types. *Pharmacol. Lett.* 52, 199–203 (1993)
8. Terenius L: Characteristics of the 'receptor' for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol. (Copenh).* 33, 377–84 (1973)
9. Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, & Hirtht CG: The d-opioid receptor : Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 12048–12052 (1992)

Literaturverzeichnis

10. Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K & Edwards RH: Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258, 1952–5 (1992)
11. Cheney BV, Lahti RA, Barsuhn C & Gay DD: An analysis of binding at the opioid receptor based upon agonist/ antagonist model. *Mol. Pharmacol.* 22, 349–359 (1982)
12. Hughes J & Kosterlitz HW: Opioids an introduction. *Br. Med. Bull.* 39, 1–3 (1983)
13. Yu Y, Zhang L, Yin, X, Sun H, Uhl GR, Wang JB: μ Opioid Receptor phosphorylation, desensitization and ligand efficacy. *J. Biol. Chem.* 272, 28869–28874 (1997)
14. Ferguson SSG: Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: The role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological Rev.* 53, 1–24 (2001)
15. Kieffer BL: in *Handb. Exp. Pharmacol.* 130, 281–303 *Springer Berlin Heidelberg* (1997)
16. Zastrow M, Von Svingos A, Haberstock-Debic H & Evans C: Regulated endocytosis of opioid receptors: Cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs. *Curr. Opin. Neurobiol.* 13, 348–353 (2003)
17. Law P, Wong YH, Loh HH: Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu. Rev. pharmacological Toxicol.* 40, 389–430 (2000)
18. Blake AD, Bot G, Freeman JC & Reisine T: Differential opioid agonist regulation of the mouse μ opioid receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 782–790 (1997)
19. Raynor K, Kong H, Chen Y, L, Yu, Bell GI and Reisine T: Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol. Pharmacol.* 45, 330–334 (1994)
20. Raynor K, Kong H, Mestek A, Leighan S, Tian By M, Liu J, Yu L & Reisine T: Characterization of the cloned human mu opioid receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 272, 423–428 (1995)

Literaturverzeichnis

21. Rothman R, Xu H, Wang J, Partilla JS, Kayakiri H, Rice KC, Uhl GR: Ligand selectivity of cloned human and rat opioid mu receptors . *Synapse* 21, 60-64 (1995)
22. Pasternak GW: The pharmacology of mu analgesics : From patients to genes. *Neurosci.* 7, 220–231 (2001)
23. Koch T, Widera A, Bartzsch K, Schulz S, Brandenburg L, Wundrack Nicole, Beyer A, Grecksch G, Höllt V: Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol. Pharmacol.* 67, 280–287 (2005)
24. Koch T & Höllt V: Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol. Ther.* 117, 199–206 (2008)
25. Taylor AMW, Roberts KW, Pradhan AA & Akbari HA: Anti-nociception mediated by a κ opioid receptor agonist is blocked by a δ receptor agonist. *Br. J. Pharmacol.* 172, 691–703 (2015)
26. Larson MD: Mechanism of opioid-induced pupillary effects. *Clin. Neurophysiol.* 119, 1358–1364 (2008)
27. Jutkiewicz EM: The antidepressant-like effect of delta-opioid receptor agonists. *Mol. Interv.* 6, 162–169 (2006)
28. Hiller JM, Itzhak Y, Simon EJ: Selective changes in μ , δ and κ opioid receptor binding in certain limbic regions of the brain in Alzheimer 's disease patients. *Brain Res.* 406, 17–23 (1987)
29. Bingel U & Wiech K: Funktionelle MRT. *Psychiatr. und Neurol.* 59, 534–529, 531 (2013)
30. Kitchen I, Slowe SJ, Matthes HW & Kieffer B: Quantitative autoradiographic mapping of mu-, delta- and kappa-opioid receptors in knockout mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Brain Res.* 778, 73–88 (1997)

Literaturverzeichnis

31. Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H & Watson S: Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci.* 7, 2445–2464 (1987)
32. Pfeiffer A, Pasi A, Mehraein P, Herz A: Opiate receptor binding sites in human brain. *Brain Res.* 248, 87–96 (1982)
33. Wang H, Zhao B, Zhong Y, Li K, Li Z, Wang Q, Lu Y: Coexpression of δ - and μ -opioid receptors in nociceptive sensory neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13117–13122 (2010)
34. Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL: Recent findings on the mechanism of implications for the development of new analgesics. *CNS Drugs* 10, 1–10 (1998)
35. Stein C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N. Engl. J. Med.* 332, 1685–1690 (1995)
36. Tsuchimochi H, Mccord JL & Kaufman MP: Peripheral μ -opioid receptors attenuate the augmented exercise pressor reflex in rats with chronic femoral artery occlusion. *Am. J. Physiol. Hear. Circ Physiol* 299, 557–565 (2010)
37. Herz A: Endogenous opioid systems and alcohol addiction. *Psychopharmacology (Berl)*. 129, 99–111 (1997)
38. Onali P, Dedoni S & Olianias MC: Direct agonist activity of tricyclic antidepressants at distinct opioid receptor subtypes. *J. Pharmacology Exp. Ther.* 332, 255–265 (2010)
39. Simantov R, Kuhar MJ, Uhl GR & Snyder SH: Opioid peptide enkephalin: Immunohistochemical mapping in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 2167–71 (1977)
40. Mansour A, Fox CA, Akil H & Watson SJ: Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: Anatomical and functional implications. *Trends Neurosci.* 18, 22–29 (1995)

Literaturverzeichnis

41. Trujillo KA & Akil H: Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 251, 85–87 (1991)
42. Ben-eliyahu S, Przemylaw M, Vaccarino A, Mogil JS, Sternberg WF, Liebeskind JC: The NMDA receptor antagonist MK-801 prevents long-lasting non-associative morphine tolerance in the rat. *Brain Res.* 575, 304–308 (1992)
43. Wong C, Luk H, Ho S. & Tung C.: Effects of NMDA receptor antagonists on inhibition of morphine tolerance in rats: Binding at mu-opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 297, 27–33 (1996)
44. Shimoyama N, Shimoyama, M, Inturrisi CE & Elliott KJ: Ketamine attenuates and reverses morphine tolerance in rodents. *Anesthesiology* 85, 1357–1366 (1996)
45. Freye E: Opiode der Medizin p1–5 und p151 *Springer* (2010)
46. Young KA, Gobrogge KL & Wang Z: The role of mesocorticolimbic dopamine in regulating interactions between drugs of abuse and social behavior. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 35, 498–515 (2011)
47. Sherman J, Pickman C, Rice A, Liebeskind J. & Holman E: Rewarding and aversive effects of morphine: Temporal and pharmacological properties. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13, 501–505 (1980)
48. Tzschentke TM: Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: A comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Prog. Neurobiol.* 56, 613–672 (1998)
49. Zadina J, Laszlo H, Ge LJ & Kastin A: A potent and selective endogenous agonist for the μ -opiate receptor. *Nature* 386, 499–501 (1997)
50. Rossier J, Vargo TM, Minick S, Ling N & Bloom FE: Regional dissociation of β -endorphin and enkephalin contents in rat brain and pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5162–5165 (1977)

51. Sarkar DK & Zhang C: Beta-endorphin neuron regulates stress response and innate immunity to prevent breast cancer growth and progression. *Vitam. Horm.(Elsevier)* 93, 263-76 (2013)
52. Hynynen M, Lehtinen AM, Salmenpera M, Fyhrquist F, Takkunen O, Heinonen J: Continuous infusion of fentanyl or alfentanil for coronary artery surgery: Effects on plasma cortisol concentration, β -Endorphin immunoreactivity and arginine. *Br. J. Anaesth.* 58, 1260–1266 (1986)
53. Frost JJ, Douglass KH, Mayberg HS, Dannals RF, Links JM, Wilson AA, Ravert HT, Crozier WC, Wagner HN: Multicompartmental analysis of ^{11}C [^3H]-carfentanil: Binding to opiate receptors in humans measured by positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9, 398–409 (1989)
54. Matthes H, Maldonado R, Kieffer BL: Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -opioid-receptor gene. *Nature* 383, 819–823 (1996)
55. Hughes FM, Shaner BE, Brower J.O, Woods RJ & Dix TA: Development of a peptide-derived orally-active kappa-opioid receptor agonist targeting peripheral pain. *Open Med. Chem. J.* 7, 16–22 (2013)
56. Jachertz N: Hohes Aufkommen, niedrige Behandlungsrate. *Dtsch. Arztebl.* 7, 269–270 (2013)
57. Rezayof A, Zarrindast M, Sahraei H & Haeri-rohani A: Involvement of dopamine receptors of the dorsal hippocampus on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rats. *J. Psychopharmacol.* 17, 415–423 (2003)
58. Zarrindast M, Dinkoub Z, Homayoun H, Bakhtiarian A & Khavandgar S: Dopamine receptor mechanism (s) and morphine tolerance in mice. *J. Psychopharmacol.* 16, 261–266 (2002)
59. Sora I, Elmer G, Funada M, Pieper J, Li XF, Hall FS, Uhl GR: Mu opiate receptor gene dose effects on different morphine actions: Evidence for differential in vivo mu receptor reserve. *Neuropsychopharmacology* 25, 41–54 (2001)

60. Knoll AT & Carlezon WA: Dynorphin, stress and depression. *Brain Res.* 1314, 56–73 (2010).
61. Zan G., Wang Q, Wang Y, Liu Y, Hang A, Shu X, Liu J: Antagonism of κ opioid receptor in the nucleus accumbens prevents the depressive-like behaviors following prolonged morphine abstinence. *Behav. Brain Res.* 291, 334–341 (2015)
62. Lutz PE & Kieffer BL: Opioid receptors: Distinct roles in mood disorders. *Trends Neurosci.* 36, 195–206 (2013)
63. Charbogne P, Kieffer BL, Befort K: 15 years of genetic approaches in vivo for addiction research: Opioid receptor and peptide gene knockout in mouse models of drug abuse. *Neuropharmacology* 76, 204–17 (2014)
64. Sasaki K, Fan LW, Tien LT, Ma T, Loh HH, Ho IK: Interaction of morphine & γ -aminobutyric acid (GABA)ergic systems in anxiolytic behaviour: Using μ -opioid receptor knockout mice. *Brain research bulletin.*57, 689–94 (2002)
65. Ramsey NF & Van Ree JM: Reward and abuse of opiates. *Pharmacol & Toxicology.*71, 81–94 (1992)
66. Aceto MD, Harris LS, Bowman ER & Tommson J: Etorphine : M-opioid receptor-selective antinociception and low physical dependence capacity. *Eur. J. Pharmacol.* 338, 215–233 (1997)
67. Bentley KW, Hardy DG, Meek B: Novel analgesics and molecular rearrangements in the morphine-thebaine Group II: Alcohols derived from 6,14-endo-etheno-and 6,14-endo-ethanotetrahydrothebaine. *J. Am. Chem. Soc.* 89, 3273–3280 (1967)
68. Richards ML & Sadée W: In vivo opiate receptor binding of oripavines to mu, delta and kappa sites in rat brain as determined by an ex vivo labeling method . *Eur. J. Pharmacol.* 114, 343–53 (1985)
69. Niwa M, Luay YA, Shuichiro O, Ken-ichi K, Masakatsu N, Kaito T, Tatsunori I, Tadashi K: Introduction etorphine. *Pharmacol. Lett.* 56, 395–400 (1995)

Literaturverzeichnis

70. Bilsky E, Calderon S, Wang T & Bernstein R: SNC 80, a selective opioid delta agonist nonpeptidic and systemically active. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273, 359–366 (1995)
71. Coop, A & Rice KC: Role of delta-opioid receptors in biological processes. *Drug News Perspect* 2000 13, 2000 (2000)
72. Porthoghes PS, Lipkowski AW, Takemori AE: Binaltorphimin and nor-binaltorphimin: Potent and selective k opioid receptor anagonists. *Liefe Sci.* 40, 1287–1292 (1987)
73. Endoh T, Matsuura H, Tanaka C & Nagase H: Nor-binaltorphimine: A potent and selective kappa-opioid receptor antagonist with long-lasting activity in vivo. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 316, 30–42 (1992)
74. Kitchen I & Crowder M: Assessment of the hot-plate antinociceptive test in mice: A new method for the statistical treatment of graded data. *J. Pharmacol. Methods* 7, 1–7 (1985)
75. Grecksch G, Bartzsch K, Widera A, Becker A, Höllt V, Koch T: Development of tolerance and sensitization to different opioid agonists in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 186, 177–84 (2006)
76. Handa B, Lane AC, Lord J, Morgan BA, Race MJ, Smith C: Analogues of β -LPH₆₁₋₆₄ possessing selective agonist activity at μ opiate receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 70, 531–540 (1981)
77. Oktem H, Varga E, Hepp J, Medzihradzky K, Lajtha A, Borsodi A: Opioid receptor labeling with the chloromethyl ketone derivative of (3)h-tyr-d-ala-gly-(me)phe-gly-ol (DAMGO) I: Binding properties of (3)h-tyr-d-ala-gly-(me)phe chloromethyl ketone. *Life Sci.* 48, 1757–1762 (1991)
78. Minami M, Onogi T, Nakagawa T, Katao Y, Aoki Y, Katsumata S, Satoh M: DAMGO, a mu-opioid receptor selective ligand, distinguishes between mu-and kappa-opioid receptors at a different region from that for the distinction between mu- and delta-opioid receptors. *FEBS Lett.* 364, 23–7 (1995)
79. Sora I, Funada M. & Uhl GR: The μ -opioid receptor is necessary for [D-Pen², D-Pen⁵] enkephalin-induced analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 324, R1–R2 (1997)

Literaturverzeichnis

80. Hall FS, Li XF, Goeb M, Roff S, Hoggatt H, Sora I, Uhl GR: Congenic C57BL/6 mu opiate receptor (MOR) knockout mice: baseline and opiate effects. *Genes. Brain. Behav.* 2, 114–21 (2003)
81. Ballantyne JC, Carr DB, Chalmers TC, Dear KBG, Angelillo IF, Mosteller F: Postoperativ patient-controlled analgesie: Meta-analyses of initial randomized control trials. *J. Clin. Anesth.* 5, 193–182 (1993)
82. Rosow CE, Miller M, Pelikan W & Cochin J: Opiates and thermoregulation in mice I: Agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther. pain symptom Manag.* 213, 273–283 (1980)
83. Herrmann BJ: The pyretic action on rats of small doses of morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2, 315–311 (1942)
84. Rosow CE, Miller JM, Poulsen-Burke J & Cochin J: Opiates and thermoregulation in mice II: Effects of opiate antagonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 220, 464–467 (1982)
85. Appelbaum BD & Holtzman SG: Stress-induced changes in the analgesic and thermic effects of morphine administered centrally. *Brain Res.* 358, 303–308 (1985)
86. Holtzman G & Villarreal J: Morphine dependence and body Temperature in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 166, 133–125 (1968)
87. Clark WG & Cumby HR: Hyperthermic response to central and peripheral injections of morphine sulphate in the cat. *Br. J. Pharmacol.* 63, 65–71 (1978)
88. Kahn SA, Beers RJ, Lentz CW & Peters B: Do fentanyl and morphine influence body temperature after severe burn injury? *J. Burn Care Res.* 32, 309–16 (2011)
89. Ryan KF, Price JW, Warriner, CB & Choi PT: Persistent hypothermia after intrathecal morphine: Case report and literature review. *Can. J. Anaesth.* 59, 384–8 (2012)
90. Spencer RL, Hruby VJ, Burks TF & Tommson J: Alteration of thermoregulatory set point with opioid. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 252, 696–705 (1989)

91. Tzschentke TM: Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: Update of the last decade. *Addict. Biol.* 12, 227–462 (2007)
92. Donny EC, Caggiula AR, Knopf S & Brown C: Nicotine self-administration in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 122, 390–394 (1995)
93. Zhou L & Zhu Y: Changes of CREB in rat hippocampus, prefrontal cortex and nucleus accumbens during three phases of morphine induced conditioned place preference in rats. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 7, 107–113 (2006)
94. Becker A, Grecksch G, Brödemann R, Kraus J, Peters B, Schroeder H, Thiemann W, Loh HH, Höllt V: Morphine self-administration in μ -opioid receptor-deficient mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 361, 584–589 (2000)
95. Di Chiara G & North RA: Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 185–193 (1992)
96. Wise RA: Addictive drugs and brain stimulation reward. *Annu. Rev. Neurosci.* 19, 319–340 (1996)
97. Fenu S, Spina L, Rivas E, Longoni R & Di Chiara G: Morphine-conditioned single-trial place preference: Role of nucleus accumbens shell dopamine receptors in acquisition, but not expression. *Psychopharmacology (Berl)*. 187, 143–53 (2006)
98. Cunningham CL, Niehus DR, Malott DH & Prather LK: Genetic differences in the rewarding and activating effects of morphine and ethanol. *Psychopharmacology (Berl)*. 107, 385–393 (1992)
99. Mucha, R. F. & Herz, a. Motivational properties of kappa and mu opioid receptor agonists studied with place and taste preference conditioning. *Psychopharmacology (Berl)*. 86, 274–280 (1985)

Literaturverzeichnis

100. Reisine T: Review neurotransmitter receptors V: Opiate receptor. *Neuropharmacology* 34, 463–472 (1995)
101. Contarino, A. Picetti R, Matthes HW, Koob GF, Kieffer BL, Gold LH: Lack of reward and locomotor stimulation induced by heroin in mu-opioid receptor-deficient mice. *Eur. J. Pharmacol.* 446, 103–9 (2002)
102. Becker A, Grecksch G, Kraus J, Loh HH, Schroeder H, Höllt V: Rewarding effects of ethanol and cocaine in μ opioid receptor-deficient mice. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 365, 296–302 (2002)
103. Hall FS, Goeb M, Li XF, Sora I & Uhl GR: Mu-Opioid receptor knockout mice display reduced cocaine conditioned place preference but enhanced sensitization of cocaine-induced locomotion. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 121, 123–30 (2004)
104. Mitchell JM, Margolis EB, Coker AR, Allen DC & Fields HL: Intra-VTA deltorphin, but not DPDPE, induces place preference in ethanol-drinking rats: Distinct DOR-1 and DOR-2 mechanisms control ethanol consumption and reward. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 38, 195–203 (2014)
105. Chefer VI & Shippenberg TS: Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* 34, 887–98 (2009)
106. Le Merrer J, Plaza-Zabala A, Del Boca C, Matifas A, Maldonado R, Kieffer BL: Deletion of the δ opioid receptor gene impairs place conditioning but preserves morphine reinforcement. *Biol. Psychiatry* 69, 700–3 (2011)
107. Rezayof A, Zarrindast MR, Sahraei H, Haeri-rohani A & Rassouli Y: Involvement of dopamine D2 receptors of the central amygdala on the acquisition and expression of morphine-induced place preference in rat. *Brain Res.* 965, 212–221 (2003)
108. Abbott A: Neurobiological perspectives on drugs of abuse. *Trends Pharmacol. Sci.* 13, 169 (1992)

Literaturverzeichnis

109. Di Chiara G & Imperato A: Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 5274–5278 (1988)
110. Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR: Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1544–1549 (1997)
111. Belzung C & Barreau S: Differences in drug-induced place conditioning between BALB/c and C57BL/6 mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 65, 419–423 (2000)
112. Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS: The effects of opioid peptides on dopamine release in the nucleus accumbens: an in vivo microdialysis study. *J. Neurochem.* 55, 1734–1740 (1990)
113. Holland LN, Shuster LC, Buccafusco JJ: Role of spinal and supraspinal muscarinic receptors in the expression of morphine withdrawal symptoms in the rat. *Neuropharmacology* 32, 1387–1395 (1993)
114. Sastre-Coll A, Esteban S, García-Sevilla JA: Supersensitivity of 5-HT_{1A} autoreceptors and alpha₂-adrenoceptors regulating monoamine synthesis in the brain of morphine-dependent rats. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 365, 210–9 (2002)
115. Lima LD, Fernandopulle R, Schuster RC, Suryawati S, Suzuki T, Verachai V: WHO expert committee on drug dependence. *World Heal. Organ. Expert Comm. Drug Depend.* 1, 13 (2006)
116. Johnson SW & North RA: Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. *J. Neurosci.* 12, 483–488 (1992)
117. Barnett SA: The Rat A Study in Behaviour.pp 31-32 *Taschenbuch Verlag: Aldine Pub.* (1963)
118. Chefer VI, Kieffer BL, Shippenberg TS: Basal and morphine-evoked dopaminergic neurotransmission in the nucleus accumbens of MOR- and DOR-knockout mice. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1915–1922 (2003)

Literaturverzeichnis

119. Tian BM, Broxmeyer HE, Fan Y, Lai Z, Zhang S, Aronica S, Cooper S, Bigsby RM, Steinmetz R, Engle SJ, Mestek A, Pollock JD, Lehman MN, Jansen HT, Ying M, Stambrook PJ, Tischfield JA, Yu L: Altered hematopoiesis, behavior, and sexual function in μ -opioid receptor-deficient mice. *J. Exp. Medicine* 185, 1517–1522 (1997)
120. Milman A, Weizman R, Rigai T, Rice KC & Pick CG: Behavioral effects of opioid subtypes compared with benzodiazepines in the staircase paradigm. *Behav. Brain Res.* 170, 141–147 (2006)
121. Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gavériaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL: Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nat. Genet.* 25, 195–200 (2000)
122. Pellow S, Chopin P, File SE & Briley M: Validation of open versus closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J. Neurosci. Methods* 14, 149–167 (1985)
123. Asakawa A, Inui A, Momose K, Ueno N, Fujino MA, Kasuga M: Endomorphins have orexigenic and anxiolytic activities in mice. *Neuroreport* 9, 2265–2267 (1998)
124. Rothman RB: Opioids, *Handbuch der Experimentellen Pharmakologie*. pp 151-155 *Springer* (1993)
125. Traynor J & Elliott J: Delta opioid receptor subtypes and cross-talk with mu-receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 14, 84 (1993)
126. Ukai M, Shinkai N, Kameyama T: K-Opioid receptor agonists improve pirenzepine-induced disturbance of spontaneous alternation performance in the mouse. *Eur. J. Pharmacol.* 281, 173–178 (1995)
127. Yoo JH, Lee SY, Loh HH, Ho IK & Jang CG: Altered emotional behaviors and the expression of 5-HT_{1A} and M1 muscarinic receptors in micro-opioid receptor knockout mice. *Synapse* 54, 72–82 (2004)

Literaturverzeichnis

128. Schafe GE & LeDoux JE: Memory consolidation of auditory pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. *J. Neurosci.* 20, RC96 (2000)
129. LeDoux JE: Emotion circuits in the brain. *Annu. Rev. Neurosci.* 23, 155–184 (2000)
130. Rosen JB & Schulkin J: From normal fear to pathological anxiety. *Psychol. Rev.* 105, 325–350 (1998)
131. Wolpe J: The dichotomy between classical conditioned and cognitively learned anxiety. *J. Behav. Ther. Exp. Psychiatry* 12, 35–42 (1981)
132. Vazdarjanova A & McGaugh JL: Basolateral amygdala is not critical for cognitive memory of contextual fear conditioning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 15003–15007 (1998)
133. Blanchard DC & Blanchard RJ: Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 81, 281–290 (1972)
134. Gerlai R: Contextual learning and cue association in fear conditioning in mice: A strain comparison and a lesion study. *Behav. Brain Res.* 95, 191–203 (1998)
135. Maren S: Neurobiology of Pavlovian Fear Conditioning. *Neuroscience* 24, 897–931 (2001)
136. Maren S, Aharonov G, Stote DL & Fanselow MS: N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. *Behav. Neurosci.* 110, 1365–1374 (1996)
137. Miserendino MJ, Sananes CB, Melia KR & Davis M: Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. *Nature* 345, 716–718 (1990)
138. Bodnar RJ: Endogenous opiates and behavior: Ann. Rev. 2012. *Peptides* 50, 55–95 (2013)

139. Sanders MJ, Kieffer BL, Fanselow MS: Deletion of the mu opioid receptor results in impaired acquisition of Pavlovian context fear. *Neurobiol. Learn. Mem.* 84, 33–41 (2005)
140. Radulovic J, Kammermeier J, Spiess J: Generalization of fear responses in C57BL / 6N mice subjected to one-trial foreground contextual fear conditioning. *Behav. Brain Res.* 95, 179 – 189 (1998)
141. Mathers CD & Loncar D: Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med.* 3, e442 (2006)
142. Mueller T, Leon A, Keller M & Maser J: Recurrence after recovery from major depressive disorder during 15 years of. *Am J Psychiatry* 156, 1000–6 (1999)
143. Steru L, Chermat R, Thierry B & Simon P: A new method for screening antidepressants in mice. *Psychopharmacology* 85, 367–370 (1985)
144. Ide S, Sora I, Ikeda K, Minami M, Uhl GR, Ishihara K: Reduced emotional and corticosterone responses to stress in μ -opioid receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 58, 241–247 (2010)
145. Berrocoso E, Sánchez-Blázquez P, Garzón J & Mico J: Opiates as antidepressants. *Curr Pharm Des.* 15, 1612–22 (2009)
146. Tenore PL: Psychotherapeutic benefits of opioid agonist therapy. *J. Addict. Dis.* 27, 49–65 (2008)
147. Benbouzid M, Choucair-Jaafar N, Yalcin I, Waltisperger E, Muller A, Freund-Mercier M, José BM: Chronic, but not acute, tricyclic antidepressant treatment alleviates neuropathic allodynia after sciatic nerve cuffing in mice. *Eur. J. Pain* 12, 1008–17 (2008)
148. Mehr-un-Nisa, Munawar MA, Lee YS, Rankin D, Munir J, Lai J, Khan MA, Hruby VJ: Design, synthesis, and biological evaluation of a series of bifunctional ligands of opioids/SSRIs. *Bioorg. Med. Chem.* 23, 1251–9 (2015)

Literaturverzeichnis

149. Fichna J, Janecka A, Piestrzeniewicz M, Costentin J. & Do Rego JC: Antidepressant-like effect of endomorphin-1 and endomorphin-2 in mice. *Neuropsychopharmacology* 32, 813–21 (2007)
150. McNamara J, Galloway T, Rigsbee C & Shin C: Evidence kindled. *J. Neurosci.* 4, 2410–2417 (1984)
151. Goddard GV, McIntyre DC, Leech CK: A permanent change in brain function resulting from daily electrical stimulation. *Exp. Neurol.* 25, 295–330 (1969)
152. Karler R, Murphy V, Calder L & Turkanis S: Pentylentetrazol kindling in mice. *Neuropharmacology* 28, 775–80 (1989)
153. Dhir A: Pentylentetrazol (PTZ) kindling model of epilepsy. *Curr. Protoc. Neurosci.* Chapter 9, 9.37.3–9.37.12 (2012)
154. Rocha L, Cano A, Cruz C & Oman I: Opioid peptide systems following a subconvulsant dose of pentylentetrazol in rats. *Epilepsy Res.* 37, 141–150 (1999)
155. Grecksch G, Becker A, Schroeder H, Kraus J, Loh HH, Höllt V: Accelerated kindling development in μ -opioid receptor deficient mice. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 369, 287–293 (2003)
156. Jutkiewicz EM, Baladi MG, Folk JE, Rice KC & Woods JH: The convulsive and electroencephalographic changes produced by nonpeptidic δ -Opioid agonists in rats: Comparison with pentylentetrazol. 317, 1337–1348 (2006)
157. Loacker S, Sayyah M, Wittmann W, Herzog H & Schwarzer C: Endogenous dynorphin in epileptogenesis and epilepsy: Anticonvulsant net effect via kappa opioid receptors. *Brain* 130, 1017–28 (2007)
158. Grecksch G, Becker A, Schroeder H & Höllt V: Involvement of delta-opioid receptors in pentylentetrazol kindling development and kindling-related processes in rats. *Naunyn. Schmiedeberg's. Arch. Pharmacol.* 2, 151–6 (1999)

159. Chen H, Seybold VS, Loh HH: An autoradiographic study in μ -Opioid receptor knockout mice. *Mol. Brain Res.* 76, 170–172 (2000)
160. Loh HH, Liu H, Cavalli A, Yang W, Chen Y, Wei L: μ Opioid receptor knockout in mice: Effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Molecular Brain Research.* 54, 321-326 (1998)
161. Schroeder H, Becker A, Grecksch G, Schroeder U. & Höllt V: The effect of pentylenetetrazol kindling on synaptic mechanisms of interacting glutamatergic and opioid system in the hippocampus of rats. *Brain Res.* 811, 40–6 (1998)
162. Park Y, Ma T, Tanaka S, Jang C, Loh HH, Ko KH: Comparison of G-protein activation in the brain by μ - , δ - , and κ -opioid receptor agonists in μ -opioid receptor knockout mice. *Brain Res. Bull.* 52, 297–302 (2000)
163. Morinville A, Cahill CM, Esdaile MJ, Aibak H, Collier B, Kieffer BL, Beaudet A: Regulation of delta-opioid receptor trafficking via μ -opioid receptor stimulation: Evidence from μ -opioid receptor knock-out mice. *J. Neurosci.* 23, 4888–4898 (2003)
164. Matthes HW, Smadja C, Valverde O, Vonesch JL, Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubié M, Severini C, Negri L, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL: Activity of the delta-opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the kappa-receptor is maintained in mice lacking the mu-receptor. *J. Neurosci.* 18, 7285–95 (1998)
165. Wang D, Lu X, Qin B: Dihydroetorphine is a mu-receptor-selective. *J Pharm Pharmacol.* 47, 669–73 (1995)
166. Cowan A, Doxey JC, Harry EJR: The Animal pharmacology of buprenorphine, an oripravine analgesic agent. *Br. J. Pharmacol.* 60, 547–554 (1977)
167. Katsumata S, Minami M, Nakagawa T, Iwamura T & Satoh M: Dihydroetorphine is a mu-receptor-selective: Pharmacological study of dihydroetorphine in cloned mu-, delta -and kappa-opioid. *J Pharm Pharmacol.* 47, 669–73 (1995)
168. Law PY, Hom DS, Loh HH: Loss of opiate receptor activity in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells after chronic opiate treatment. *Mol. Phar* 22, 1–4 (1982)

169. Zhu Y, King MA, Schuller AGP, Nitsche JF, Reidl M, Elde RP, Unterwald E, Pasternak GW, Pintar JE: Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in δ -opioid receptor knockout mice. *Neuron* 24, 243–252 (1999)
170. Heyman JS, Mulvaney SA, Mosberg HI & Porreca F: Opioid δ -receptor involvement in supraspinal and spinal antinociception in mice. 420, 100–108 (1987)
171. Gomes I, Jordan BA, Gupta A, Trapaidze N, Nagy V, Devi LA: Heterodimerization of μ and δ Opioid Receptors : A role in opiate synergy. *J. Neurosci.* 20, 1–5 (2000)
172. Cahill CM, Morinville A, Lee M, Vincent JP, Collier B, Beaudet A: Prolonged morphine treatment targets delta opioid receptors to neuronal plasma membranes and enhances δ - mediated antinociception. *The Journal of Neuroscience* 21, 7598–7607 (2001)
173. Gharagozlou P, Hashemi E, DeLorey TM, Clark JD & Lameh J: Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors. *BMC Pharmacol.* 6, 3 (2006)
174. Kline NS, Li CH, Lehmann HE, Lajtha A, Laski E, Cooper T: β -Endorphin-Induced changes in schizophrenic and depressed patients. *Arch Gen Psychiatry* 34, 1111–1113 (1977)
175. Baraldi M, Poggioli R, Santi M, Vergoni AV & Bertolini A. Antidepressants and opiates interactions: Pharmacological and biochemical evidences. *Pharmacol. Res. Commun.* 15, 843–857 (1983)
176. Martin P, Soubrié P, Simon P: Noradrenergic and opioid mediation of tricyclic-induced reversal of escape deficits caused by inescapable shock pretreatment in rats. *Psychopharmacology (Berl)*. 90, 90–94 (1986)
177. Portoghese PS, Sultana M, Takemori AE: Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide delta opioid receptor antagonist. *Eur. J. Pharmacol.* 146, 185–186 (1988)
178. Broom DC, Jutkiewicz EM, Rice KC, Traynor JR & Woods JH: Behavioral effects of delta opioid receptor agonists : Potential antidepressants? *Jpn. J. Pharmacol* 6, 1–6 (2002)

Literaturverzeichnis

179. Baamonde A, Daugé V, Ruiz-Gayo M, Fulga IG, Turcaud S, Fournié-Zaluski MC: Antidepressant-type effects of endogenous enkephalins protected by systemic RB 101 are mediated by opioid delta and dopamine D1 receptor stimulation. *Eur. J. Pharmacol.* 216, 157–166 (1992)
180. Tejedor-Real P, Micó JA, Smadja C, Maldonado R, Roques BP, Gibert-Rahola J: Involvement of δ -opioid receptors in the effects induced by endogenous enkephalins on learned helplessness model. *Eur. J. Pharmacol.* 354, 1–7 (1998)
181. McLaughlin JP, Marton-Popovici M, Chavkin C: Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *J. Neurosci.* 23, 5674–5683 (2003)
182. Bruchas MR, Land BB, Aita M, Xu M, Barot S, Li S, Chavkin C: Stress-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation mediates κ -opioid dependent dysphoria. *J. Neurosci.* 27, 11614–11623 (2007)
183. McLaughlin J, Li S, Valdez J, Chavkin T & Chavkin C: Social defeat stress-induced behavioral responses are mediated by the endogenous kappa opioid system. *Neuropharmacology* 6, 1241–1248 (2006)
184. Newton SS, Thome J, Wallace TL, Shirayama Y, Schlesinger L, Sakai N, Chen J, Neve R, Nestler EJ, Duman RS: Inhibition of cAMP response element-binding protein or dynorphin in the nucleus accumbens produces an antidepressant-like effect. *J. Neurosci.* 22, 10883–10890 (2002)
185. Pfeiffer A, Brantl V, Herz A: Psychotomimesis mediated by κ opiate receptor. *Science* 233, 774–776 (1986)
186. Wadenberg MLG: A review of the properties of spiradoline: A potent and selective kappa-opioid receptor agonist. *CNS Drug Rev.* 9, 187–198 (2003)
187. Mague SD & Pliakas AM: Antidepressant-like effects of κ -opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 305, 323–330 (2003)
188. Carlezon WA, Béguin C, DiNieri JA, Baumann MH, Richards MR, Todtenkopf MS, Rothman RB, Ma Z, Lee DYW, Cohen BM: Depressive-like effects of the kappa-opioid receptor agonist

- salvinorin A on behavior and neurochemistry in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 440–447 (2006)
189. Carlezon WA & Thomas MJ: Biological substrates of reward and aversion: A nucleus accumbens activity hypothesis. *Neuropharmacology* 56, 122–132 (2009)
190. Nestler EJ & Carlezon WA: The mesolimbic dopamine reward circuit in depression. *Biol. Psychiatry* 59, 1151–1159 (2006)
191. Pittenger C & Duman RS: Stress, depression, and neuroplasticity: A convergence of mechanisms. *Neuropsychopharmacology* 33, 88–109 (2008)
192. Drake CT, Terman GW, Simmons ML, Milner TA, Kunkel DD, Schwartzkroin PA, Chavkin C: Dynorphin opioids present in dentate granule cells may function as retrograde inhibitory neurotransmitters. *J. Neurosci.* 14, 3736–3750 (1994)
193. Iremonger KJ & Bains JS: Retrograde opioid signaling regulates glutamatergic transmission in the hypothalamus. *J. Neurosci.* 29, 7349–7358 (2009)
194. Reyes BAS, Johnson AD, Glaser JD, Commons KG & Van Bockstaele EJ: Dynorphin-containing axons directly innervate noradrenergic neurons in the rat nucleus locus coeruleus. *Neuroscience* 145, 1077–1086 (2007)
195. Yakovleva T, Bazov I, Cebers G, Marinova Z, Hara Y, Ahmed A, Vlaskovska M, Johansson B, Hochgeschwender U, Singh IN, Bruce-Keller AJ, Hurd YL, Kaneko T, Terenius L, Ekström TJ, Hauser KF, Pickel VM, Bakalkin G: Prodynorphin storage and processing in axon terminals and dendrites. *FASEB J.* 20, 2124–2126 (2006)
196. Land BB, Bruchas MR, Lemos JC, Xu M, Melief EJ, Chavkin C: The dysphoric component of stress is encoded by activation of the dynorphin kappa-opioid system. *J. Neurosci.* 28, 407–414 (2008)
197. Schwarzer C: 30 years of dynorphins – new insights on their functions in neuropsychiatric diseases. *Pharmacol Ther* 123, 353–370 (2009)

Literaturverzeichnis

198. Lord JA, Waterfield AA, Hughes J & Kosterlitz HW: Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267, 495–499 (1977)
199. Nieto MM, Guen SLE, Kieffer BL, Roques BP & Noble F: Physiological control of emotion-related behaviors by endogenous enkephalins involves essentially the delta opioid receptors. *Neuroscience* 135, 305–13 (2005)
200. Detke MJ, Rickels M, Lucki I: Active behaviors in the rat forced swimming test differentially produced by serotonergic and noradrenergic antidepressants. *Psychopharmacology (Berl)*. 121, 66–72 (1995)
201. Jutkiewicz EM, Rice KC, Woods JH & Winsauer PJ: Effects of the delta-opioid receptor agonist SNC80 on learning relative to its antidepressant-like effects in rats. *Behav. Pharmacol.* 14, 509–516 (2003)
202. Negus SS, Butelman ER, Chang KJ, DeCosta B, Winger G, Woods JH: Behavioral effects of the systemically active delta opioid agonist BW373U86 in rhesus monkeys. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 1025–1034 (1994)
203. Shaqura MA, Zo C, Mousa SA, Stein C, Schäfer M: Characterization of μ opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord and primary afferent neurons during Inflammatory Pain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2, 712-718 (2004)

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1) <u>^3H-DAMGO Bindung bei unterschiedlichen Genotypen im frontalen Cortex</u>	20
Abb. 2) <u>^3H-DAMGO Bindung bei unterschiedlichen Genotypen im Hippocampus</u>	21
Abb. 3) <u>Schmerzschwelle bei unterschiedlicher μ-Opioidrezeptor-Ausstattung</u>	22
Abb. 4) <u>Wirkung von Morphin auf die Körpertemperatur</u>	23
Abb. 5) <u>Analgetische Indizes (AI) für die Wirkung von Morphin</u>	23
Abb. 6) <u>Morphinwirkung auf die Lokomotion</u>	25
Abb. 7) <u>Morphinwirkung auf die geschützte Lokomotion</u>	25
Abb. 8) <u>Wirkung von Kochsalz auf die Konditionierte Platzpräferenz (CPP)</u>	27
Abb. 9) <u>Wirkung von 5 mg/kg Morphin auf die Konditionierte Platzpräferenz (CPP)</u>	27
Abb. 10) <u>Wirkung von 20 mg/kg Morphin auf die Konditionierte Platzpräferenz (CPP)</u>	28
Abb. 11) <u>Differenz der Aufenthaltsdauer zwischen Test und Habituation nach Kochsalz, 5 bzw. 20 mg/kg Morphininjektion unter Vernachlässigung der Mitte</u>	30
Abb. 12) <u>Schwanzwurzelreizung- Schmerzschwellen ohne Opioidwirkung</u>	31
Abb. 13) <u>Schwanzwurzelreizung- Schmerzschwellen unter Etorphinwirkung</u>	32
Abb. 14) <u>Schmerzschwellenbestimmung mittels Heißer Platte mit maximal 56 °C</u>	32
Abb. 15) <u>Analgetischer Index des Etorphins bei der Schwanzwurzelreizung</u>	33
Abb. 16) <u>Analgetischer Index des Etorphins gemessen an der Heißen Platte</u>	33
Abb. 17) <u>Angstschwellenbestimmung (freezing) anhand des elektrischen Fußreizes</u>	35
Abb. 18) <u>Schmerz- bzw. Fluchtschwellenbestimmung (escape) nach elektrischem Fußreiz</u>	35
Abb. 19) <u>Schreckreaktion nach akustischem Reiz</u>	37
Abb. 20) <u>Depressionsrelevantes Verhalten bei unterschiedlicher μ-Opioidrezeptor-Anzahl</u>	38
Abb. 21) <u>Zentrale Erregbarkeit bei unterschiedlicher μ-Opioidrezeptor -Anzahl</u>	39
Abb.22) <u>Auswirkung akuter μ-, δ-, - und κ-Opioidrezeptor-Antagonisierung auf die Immobilitätsdauer bei Mäusen mit unterschiedlicher μ-Opioidrezeptor-Anzahl</u>	41
Abb. 23) <u>δ-Opioidrezeptor-Effekte bei unterschiedlicher μ-Opioidrezeptor-Anzahl auf die Analgesie im Versuchsaufbau der Heißen Platte</u>	42
Abb. 24) <u>δ-Opioidrezeptor-Effekte bei unterschiedlicher μ-Opioidrezeptor-Anzahl auf die Körpertemperatur</u>	43
Abb. 25) <u>δ-Opioidrezeptor-Effekte bei unterschiedlicher μ-Opioidrezeptor-Anzahl auf die Dauer der Immobilität</u>	43

Danksagung

8 Danksagung

Die vorliegende Arbeit wäre ohne den Rat und die Unterstützung anderer nicht möglich gewesen.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Höllt für die Möglichkeit danken, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zu promovieren.

Mein herzlicher Dank gilt vor allem Frau Prof. Dr. med. Gisela Grecksch für die Bereitstellung des Themas der vorliegenden Dissertation, ihre umfassende Unterstützung bei der Klärung von Problemen und ihrem außergewöhnlich großen Engagement während der Entstehung dieser Arbeit. Mein Dank geht auch an Herrn Prof. Dr. rer. nat. Axel Becker, für die Bereitstellung aller, für diese Arbeit notwendigen Ressourcen und für die fachlich kompetente Lösung aufgetretener Probleme.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Helmut Schmidt † für seine Expertise bezüglich der Bindungsstudien und weil er jederzeit ein offenes Ohr und einen guten Rat für mich hatte.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Petra Dehmel und Frau Schulze, die mich geduldig in die experimentelle Forschung eingearbeitet haben und mich bei der Lösung technischer Fragestellungen tatkräftig unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Heinz Rührich, der mich motiviert hat und an mich geglaubt hat.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen anderen Mitarbeitern des IPTs für die gute Zusammenarbeit. Ohne die Unterstützung der Leistungsorientierten Mittelvergabe (LOM) zur Förderung von Doktoranden der OvG-Universität Magdeburg in Form eines Promotionsstipendiums, hätte ich diese Arbeit nicht vervollständigen können.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. med. A. Kopf, der mir trotz vollem Terminkalender mit Zeit, Rat und Tat zur Seite stand.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich in ein freies Land brachten, in dem mir Tür und Tore offen standen und sehr früh das Interesse an der Medizin in mir vernahmen und mich unterstützten. Meiner Mutter möchte ich danken, dass sie mich lehrte ausdauernd und geduldig zu sein. Ein herzlicher, lebenslanger Dank an meinen Vater, der mir stets Mut machte und es mir durch seine unermüdliche Unterstützung ermöglichte, Medizin zu studieren und damit auch die vorliegende Dissertation zu erstellen.

Vielen Dank!

Ehrenerklärung

9 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Die Auswirkung unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung auf die Schmerzwahrnehmung, das Suchtverhalten und depressionsrelevantes Verhalten

im Institut für Pharmakologie und Toxikologie
mit Unterstützung durch Frau Prof. Dr. med. Grecksch

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Unterschrift

10 Curriculum vitae

Golschan Asgarpur

Gotenstraße 64

10829 Berlin

golschan.asgarpur@charite.de

Persönliche Daten

Geburtsdatum, -ort 07.07.1982 Tabriz, Iran

Staatsangehörigkeit deutsch/iranisch

Familienstand ledig

Beruflicher Werdegang

04/2016

Fachärztin für Anästhesiologie

01/2016

Zusatzbezeichnung Notfallmedizin

08/2010-

Assistenzärztin im Fachbereich Anästhesiologie,
Schmerz-, Intensiv- und Notfallmedizin

07/2009 - 09/2010

Promotionsstudentin

06/2009

Approbation

03/2005

Ärztliche Vorprüfung

Dissertation

07/2009 -

Die Auswirkung unterschiedlicher μ -Opioidrezeptor-Ausstattung auf die Schmerzwahrnehmung, das Suchtverhalten und depressionsrelevantes Verhalten
Betreuung: Prof. Dr. med. G. Grecksch, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Medizinische Fakultät Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

09/2009 - 08/2010

Promotionsstipendium an der Medizinischen Fakultät Magdeburg

Studium

10/2002 - 06/2009

Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Curriculum vitae

Praktisches Jahr

10/2008 - 01/2009	<i>Neurologie</i> – Hospital of Neurology and Neurosurgery, UCL London, Großbritannien
05/2008 - 09/2008	<i>Chirurgie</i> – Allgemein –und Kinderchirurgie Hospital Regional Guillermo Grant Benavente- Concepción, Chile
02/2008 - 05/2008	<i>Innere Medizin</i> – Pulmologie und Kardiologie Lungenklinik Lostau und Pfeiffersche Stiftung Magdeburg, Deutschland

Famulaturen

09/2007 - 10/2007	Dermatologie – Universitätsklinik Magdeburg
03/2007 - 04/2007	Allgemeinmedizin – Vale Practice, N8 8SU London
03/2006 - 04/2006	MKG- Chirurgie – Praxis Fr. Dr. Dr. L. Anvari, Berlin
08/2005 - 09/2005	Chirurgie – Schlosspark-Klinikum-Charl., Berlin

Medizinische und wissenschaftliche Tätigkeiten

07/2015	ERC Instruktorin
06/2013	Abschluss GCP Kurs, Studienärztin für iTOVAP und SETPOINT II-Studie auf der interdisziplinären Intensivstation 44i Charité Campus Benjamin Franklin
08/2006 - 05/2008	Ausbildung und Tätigkeit in der kardiologischen Telemetrie, Universitätsklinikum Magdeburg Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pulmologie, , Prof. Dr. med. Braun- Dullaeus
12/2007 - 01/2008 und 07/2009 - 08/2009	OP- Assistenz MKG-Chirurgie Praxis Fr. Dr. Dr. L. Anvari, Berliner Str. 12, 13507 Berlin
10/2004 - 10/2005	Wissenschaftlicher Hilfsassistent im Institut für Anatomie, Medizinischen Fakultät Universität Magdeburg

Auslandsaufenthalt

09/2008 - 01/2009	London, GB – PJ
05/2008 - 09/2008	Concepción, Chile – PJ

Curriculum vitae

03/2007 - 04/2007

London, GB – Famulatur

Schulbildung

06/2002

Abitur am Rheingau- Gymnasium Berlin

Sonstiges

Sprachen

Farsi und Deutsch: Muttersprache

Englisch: Sehr gute Kenntnisse

Spanisch: gute Kenntnisse

Französisch: Grundkenntnisse

EDV

Erfahrung im Umgang mit PC und Apple, MS Office,
Graph Pad Prism 5, SPSS >15

Veröffentlichungen

Posterpräsentationen:

G. Asgarpur, A. Becker, H. Schröder, V. Höllt, G. Grecksch,

AMOUNT OF MU-OPIOID RECEPTORS EFFECTING OPIOID-INDUCED BEHAVIOR

Posterpräsentation International Narcotic Research Conference 07/2010

Malmö, Schweden

G. Grecksch, G. Asgarpur, A. Becker, H. Schröder, V. Höllt

THE ROLE OF OPIOID RECEPTORS IN DEPRESSIVE-LIKE BEHAVIOUR

Posterpräsentation 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT) 03/2011 Frankfurt am Main, Deutschland

11 Anlagen

11.1 Abstract

To understand the relation between the number of mu opioid receptors and receptor-induced effects we investigated mu receptor knock-out mice together with wild type and heterozygous mice. Binding studies revealed heterozygous mice showing exactly half the amount of mu receptors (24.5 vs. 49 fmol/mg) in frontal cortex compared to wild type. Behavioral studies showed half-reduced effects in heterozygous mice on the measurement of analgesia with the hot plate, electric pain threshold determination, morphine-induced hypothermia and place preference. In terms of locomotion and in learning trials heterozygous mice showed impaired learning behavior like the μ -knock-out mice and locomotion was reduced inappropriate and not correlating to the reduction of μ -opioid-receptors. Depression-related immobility on tail suspension as well as the δ -opioid-receptor mediated antidepressant effect seemed to be dependent of the amount of μ -opioid-receptors. Our results indicate a direct correlation of these effects with the number of mu receptors. In contrast we found a non linear relation between the number of mu receptors and diverse qualities of emotional behavior such as fear, startle response and central excitability and epileptogenesis. Our experiments indicate a crucial role of the mu opioid receptor with a modulating influence on the depressive-like behavior and other named emotional behavior and central functions- even delta opioid receptor related functions are influenced.

