

**Die Nociceptinrezeptor mRNA Expression
im humanen Vollblut:
eine prospektive Kohortenstudie
verschiedener Patientengruppen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Christina Comos
aus Aachen

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Professor Dr. med. U. Stamer
2. Gutachter: Privatdozent Dr. med. M. von Lilienfeld-Toal

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.05.2010

Aus der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und operative
Intensivmedizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. A. Hoefft

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	10
1.1 Molekulare Aspekte des NOP-Rezeptors	10
1.2 Anatomische Verteilung des NOP-Rezeptors	10
1.3 Nociceptin	11
1.4 zentrale Effekte von Nociceptin	11
1.4.1 Nociceptin und Schmerz	11
1.4.2 Neurologie und Psyche	13
1.4.3 Kardiovaskuläres- und renales System	13
1.5 Immunsystem	14
1.6 periphere Effekte von Nociceptin	14
1.7 Fragestellung	15
2 Material und Methodik	16
2.1 Genehmigung der Studie durch die Ethik-Kommission	16
2.2 Patientenkollektiv	16
2.3 Laborparameter	17
2.3.1 Ex vivo Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS)	17
2.3.1.1 Aufarbeitung der Blutproben	17
2.3.1.2 Inkubation mit dem „Milena ex vivo stimulation“ Kit (Gruppe I)	17
2.3.1.3 Inkubation mit LPS von Sigma-Aldrich (Gruppe G)	18
2.3.1.4 Isolierung von zellulärer Gesamt-RNA aus menschlichem Vollblut	18
2.3.2 cDNA-Synthese aus totaler RNA	20
2.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR	20
2.3.3.1 Technik des LightCyclers	20
2.3.3.2 Methodik rtPCR	22

2.4	Procalcitonin (PCT)	24
2.4.1	Aufarbeitung der Blutproben	24
2.4.2	Grundlagen des Verfahrens	24
2.4.3	Präzision und Messbereich des Verfahrens	24
2.4.4	Interaktion und Kreuzreaktivität mit anderen Substanzen	25
2.4.5	Normbereich	25
2.5	IL-6	25
2.6	Statistische Auswertung	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Demographische und krankheitsbezogene Daten	27
3.1.1	Gruppe T (Tumorpatienten)	27
3.1.2	Gruppe I (Intensivpatienten)	28
3.1.3	Gruppe G (Gesunde Kontrollen)	28
3.1.4	Entzündungsparameter der drei Untersuchungsgruppen	28
3.2	NOP mRNA Expression im nativen Blut	29
3.3	NOP Expression ex vivo von Gesunden Probanden mit LPS stimuliertem Blut	32
3.4	NOP Expression ex vivo von Patienten mit LPS inkubiertem Blut	33
3.5	Zusammenhang zwischen inflammatorischen Markern und dem Schweregrad der Erkrankung	34
4	Diskussion	36
4.1	NOP System und Entzündung	36
4.2	NOP-Regulation unter Lipopolysaccharid	39
4.3	Inflammation bei terminal erkrankten Patienten	39
5	Zusammenfassung	42
6	Anhang	44
7	Abbildungsverzeichnis	46

8	Tabellenverzeichnis	47
9	Literaturverzeichnis	48
10	Danksagung	57
11	Lebenslauf	58

Abkürzungsverzeichnis

AMV+	avian myeloblastosis virus
Bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	complementary DNA
CCP	Katacalcin
CGRP	Calcitonin Gene-Related Peptide
COS-7	African Green Monkey SV40-transf'd kidney fibroblast cell line
CO₂	Kohlenstoffdioxid
CRP	c-reaktives Protein
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
H₂O	Wasser
HPRT	humane Hypoxanthine Phospho-ribosyl Transferase
IL-6	Interleukin 6
i.v.	intravenös
NOP	Nociceptinrezeptor
N/OFQ	Nociceptin/Orphanin
NRS	Numerische Rating Skala
LED	Licht-Emittierende Diode
LPS	Lipopolysaccharid
MgCl₂	Magnesium Chlorid
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MW	Mittelwert
OP4	orphan opioid receptor
ORL 1	opioid receptor like 1
PCT	Procalcitonin
RNA	Ribonucleinsäure
RNAase	Ribonuclease

RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
rtPCR	real time Polymerasekettenreaktion
RPMI	Zellkulturmedium für normale und neoplastische Leukozyten (Roswell Park Memorial Institute)
SEA	bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin A
SEM	Standart Error of the Mean
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
tRNA	Transfer-RNA
UFP-101	NOP Antagonist
vs.	versus
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Der Nociceptin Rezeptor und das dazugehörige Ligandensystem moduliert eine Vielzahl biologischer Funktionen. Verschiedene Studien demonstrierten neben der Modulation der Schmerzwahrnehmung auch einen Einfluss auf das Immunsystem und viele weitere Organsysteme. Jedoch sind viele Details bezüglich der Wirkungsmechanismen und deren Effekte noch unklar.

In der Literatur wird bis zum heutigen Zeitpunkt keine einheitliche Nomenklatur für diesen Rezeptor verwendet. Es finden sich die Namen Nociceptin Rezeptor (NOP), opioid receptor like 1 receptor (ORL 1), orphan opioid receptor oder auch OP4. Alle Namen beschreiben jedoch ein und denselben Rezeptor. Im Folgenden wird ausschließlich der Name Nociceptin Rezeptor (NOP) verwendet.

1.1 Molekulare Aspekte des NOP-Rezeptors

Der NOP Rezeptor gehört zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben transmembranösen Domänen (Mollereau et al., 1994). Er wurde 1994 unabhängig von verschiedenen Arbeitsgruppen identifiziert (Bunzow et al., 1994; Fukuda et al., 1994; Mollereau et al., 1994). Der NOP-Rezeptor weist eine über 60%ige Homologie mit den schon länger bekannten klassischen μ -, κ - und δ -Opioidrezeptoren auf. Diese Homologie spiegelt sich ganz besonders in den transmembranösen Domänen, in den Aminosäuresequenzen und der Signalübertragung (Mollereau et al., 1994; Calò et al., 2002) wider. Die Aktivierung des NOP Rezeptors führt G-Protein-gekoppelt zu einer Hemmung der Adenylatzyklase und somit zu einer Verminderung der Konzentration des „second messengers“ cAMP. Außerdem kommt es zu einer Regulierung von Ionenkanälen und membrangebunden Enzymen.

1.2 Anatomische Verteilung des NOP-Rezeptors

Der NOP-Rezeptor kommt in vielen Abschnitten des Gehirns und Rückenmark vor, wurde aber besonders häufig im Hinterhorn des Rückenmarks nachgewiesen (Neal et al., 1999). Der Rezeptor ist vor allem auf den Nervenfasern und weniger an den Zellkörpern zu finden. Diesen Umstand interpretierten Anton et al. (1996) als eine präsynaptische Lokalisation der Rezeptoren. Darüber hinaus wurde die NOP mRNA im

peripheren Nervensystem in Spinalganglien und auf efferenten sympathischen Fasern detektiert (Peluso et al., 1998). Die Rezeptoren waren insbesondere in Regionen des nozizeptiven Systems, ähnlich wie die „klassischen“ Opioidrezeptoren verteilt, jedoch nicht auf denselben Nervenfasern lokalisiert (Monteillet et al., 1998). Ebenfalls wurde die mRNA auf humanen Leukozyten gefunden. So gelang Krüger und Koautoren die mRNA auf Granulozyten, Monozyten, T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen nachzuweisen (Krüger et al., 2006).

1.3 Nociceptin

Ein Jahr nach der Entdeckung bzw. Klonierung des NOP Rezeptors wurde Nociceptin als sein endogener Ligand identifiziert (Meunier et al., 1995). Wie für seinen Rezeptor findet man in der Literatur auch für Nociceptin weitere Bezeichnungen: z.B. Orphanin FQ oder auch eine Kombination der beiden Namen Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ). Im Weiteren wird in dieser Arbeit ausschließlich die Bezeichnung Nociceptin verwendet. Nociceptin ist ein aus 17 Aminosäuren bestehendes Peptid, für das sich ebenfalls homologe Sequenzen zu den klassischen Opioidpeptiden, wie z.B. Dynorphin finden. Nociceptin weist jedoch eine sehr niedrige Bindungsaffinität zu den klassischen μ -, κ - und δ -Opioidrezeptoren auf und auch das pharmakologische Profil differiert (Taylor et al., 1998; Fiset et al., 2003). Ligandenbindungsstudien zeigten, dass Opioidliganden und Naloxon keine spezifische Bindung zu COS-7 Zellmembranen aufwiesen, die vorher mit NOP-cDNA transfiziert wurden (Fukuda et al., 1994). Der Mechanismus der zellulären Transduktionskette des NOP Rezeptors scheint jedoch nahezu identisch mit dem der klassischen Opioidrezeptoren zu sein. Trotz dieser engen Beziehung wird die Rolle des NOP Systems in der Schmerzprozessentstehung und Wahrnehmung als deutlich komplexer beurteilt (Zeilhofer and Calò, 2003).

1.4 Zentrale Effekte von Nociceptin

1.4.1 Nociceptin und Schmerz

Zahlreiche, vor allem tierexperimentelle Untersuchungen beschäftigen sich mit NOP und Schmerz. Aufgrund verschiedener experimenteller Schmerzmodelle, variierender Versuchstieren, verschiedenen Dosierungen und unterschiedlichen anatomischen Regionen, die untersucht wurden, ist ein Vergleich der Studien nur schwer möglich. Die

Wirkung von Nociceptin im ZNS ist sehr uneinheitlich und wird z.T. sogar als gegensätzlich beschrieben, abhängig von der untersuchten anatomischen Region und der Applikationsweise (siehe auch Abb. 1). Zum Beispiel wirkt Nociceptin bei spinaler Verabreichung analgetisch, jedoch bei intra-cerebro-ventrikulärer Injektion hyperalgetisch (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995). Hingegen induziert bei Mäusen die intracerebro-ventrikuläre Verabreichung von antisensen, komplementären Oligonucleotiden zur NOP mRNA eine Analgesie (Meunier et al., 1995). Insbesondere bei inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen ist die Rolle des NOP System interessant und Gegenstand vieler Untersuchungen. In einem Versuchsmodell mit Ratten wurde gezeigt, dass im Rahmen von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen eine erhöhte Expression von Nociceptin und des NOP Rezeptors in den Hinterhornneuronen des Rückenmarks stattfindet (Chen und Sommer, 2006).

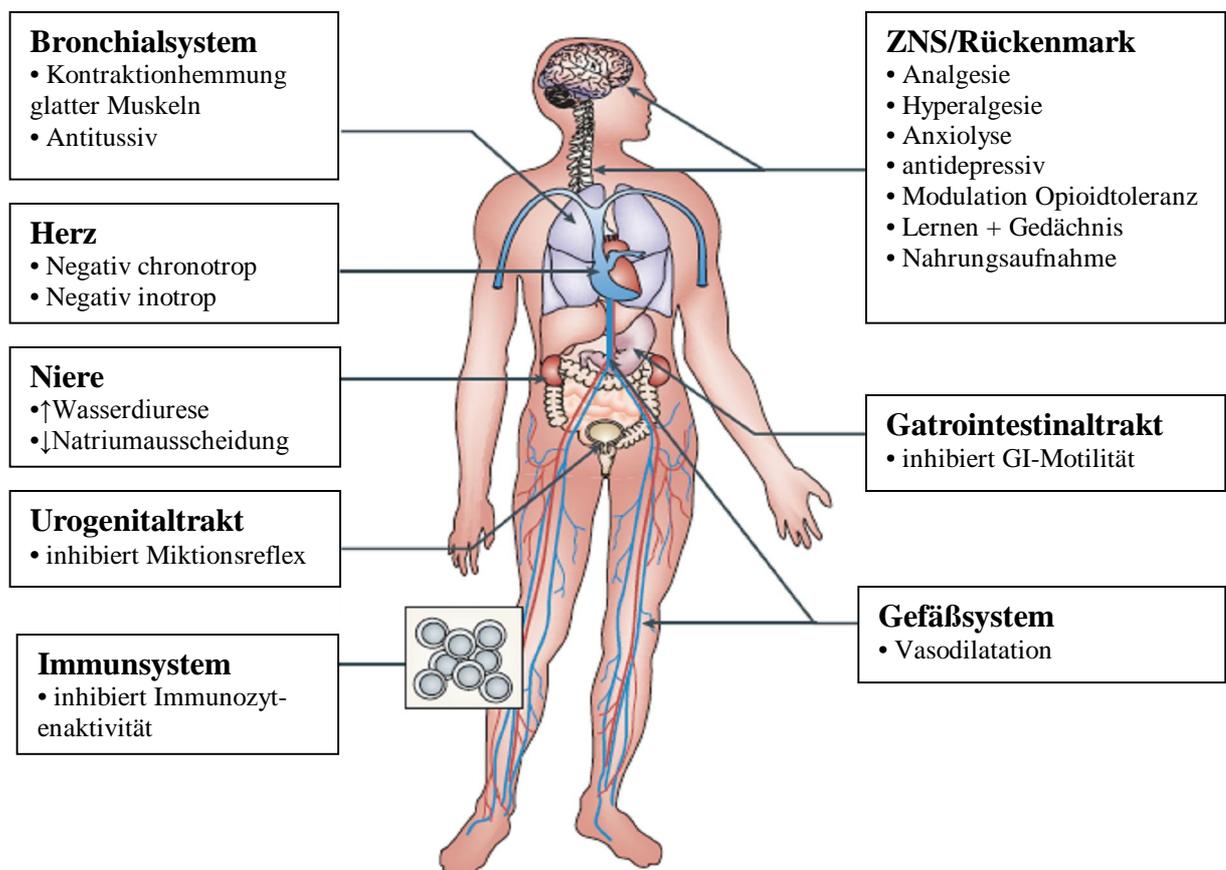


Abbildung 1: Pleiotrope Effekte von Nociceptin in den verschiedenen Organsystemen, modifiziert nach Lambert et al., 2008

Eine Rolle des NOP Systems im Rahmen von Schmerzprozessen liegt also nahe und öffnet damit neue und viel versprechende Möglichkeiten im Rahmen der pharmakologischen Forschung bezüglich der Schmerztherapie (Zeilhofer and Calò, 2003; Lambert, 2008).

1.4.2 Neurologie und Psyche

Tierexperimente sowie eine Studie mit menschlichem Blut weisen auch auf eine Rolle des NOP/Nociceptinsystems im Zusammenhang mit emotionalen Fehlregulationen bis hin zu psychiatrischen Erkrankungen hin (Jenck et al., 1997; Gavioli et al., 2002). Der NOP-Rezeptor und Nociceptin wurden in wichtigen Arealen der emotionalen Wahrnehmung und Modulierung nachgewiesen. Bei niedriger Dosierung von Nociceptin und einigen anderen Nicht-Peptid-Agonisten wurde von einer Anxiolyse berichtet (Wichmann et al., 1999; Jenck et al., 1997; Varty et al., 2005).

Patientinnen mit postpartalen Depressionen weisen eine signifikante Erhöhung des Nociceptinplasmaspiegels und einen signifikant erniedrigten Serotoninspiegel verglichen mit gesunden Probanden auf (Gu et al., 2003). Auch konnte ein modulierender Effekt des NOP/Nociceptinsystems auf Abhängigkeits- und Toleranzentwicklung nachgewiesen werden (Ciccocioppo et al., 2002; Kuzmin et al., 2003). Nociceptin zeigte im Tierexperiment bei verschiedenen Formen von Epilepsien antikonvulsive Eigenschaften (Gutierrez et al., 2001).

1.4.3 Kardiovaskuläres- und renales System

Nociceptin bewirkt im Tierexperiment nach intravenöser (Bigoni et al., 1999) und/oder intracerebroventrikulärer (Kapusta et al., 1999) Applikation Hypotension und Bradykardie (Malinowska et al., 2002; Kapusta et al., 1999) sowie eine Vasodilatation (Champion et al., 1997 und 1998). Zusätzlich steigerte Nociceptin nach intravenöser Verabreichung die Diurese und verminderte die Natriumausscheidung sowie die sympathische Nierennervenaktivität (Kapusta et al., 1999 und 2005; Bigoni et al., 1999). Besonders interessant sind die Auswirkungen von Nociceptin im Tierexperiment bei Sepsis. Nach der Verabreichung eines NOP Antagonisten UFP-101 (Gavioli et al., persönliche Kommunikation zwischen Lambert und Gavioli) konnte die Sepsis

assoziierte Mortalitätsrate der betroffenen Ratten von 70% auf 40% gesenkt werden. Passend zu diesen Ergebnissen veröffentlichten Williams et al. (2008) eine Studie in der Nociceptin im humanen Blut von 21 Sepsispatienten gemessen wurde. Es zeigte sich eine Erhöhung des Nociceptins bei denjenigen Patienten, die an einer Sepsis verstarben im Vergleich zu denjenigen, die überlebten. Dieser hochinteressante Umstand lässt Lambert (2008) vermuten, dass der Einsatz von NOP-Antagonisten im Rahmen des Sepsismanagements sinnvoll wäre. Jedoch fehlen hierzu noch größer angelegte Studien.

1.5 Immunsystem

Die Hypothese, dass das NOP System eine potentielle Regulatorfunktion innerhalb des Immunsystems hat, wurde in den letzten Jahren durch verschiedene, voneinander unabhängigen Studien gestützt (Lambert, 2008; Waits et al., 2008). Wie schon erwähnt wurde die NOP Rezeptor mRNA auf Granulo-, Mono- und Lymphozyten nachgewiesen (Krüger et al., 2006). Auch Nociceptin mRNA kommt in der Milz und den Lymphozyten des Menschen vor (Nothacker et al., 1996). Neutrophile Granulozyten sind in der Lage Nociceptin freizusetzen (Fiset et al., 2003). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass Nociceptin die Chemotaxis von Monozyten und Neutrophilen stimuliert. Jedoch wurde auch beobachtet, dass Nociceptin in vitro die Proliferation von Lymphozyten verminderte (Peluso et al., 2001). Diese Beobachtungen und der Umstand das NOP zu gleichen Teilen im menschlichen ZNS und in den peripheren Immunzellen exprimiert wird, lässt vermuten, dass das Nociceptin-NOP Rezeptor System eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen dem Nerven- und Immunsystem spielt und wichtige physiologische und pathophysiologische Prozesse beeinflussen kann (Peluso et al., 1998; Wick et al., 1995).

1.6 Periphere Effekte von Nociceptin

Zusätzlich wird Nociceptin mit vielen weiteren physiologischen und pathologischen Funktionen in Zusammenhang gebracht (siehe Abb. 1). Im Urogenitaltrakt wirkt sich Nociceptin inhibierend auf den Miktionsreflex aus und unterdrückt evozierte Kontraktionen der Vasa deferentia (Lazzeri et al., 2006; Calo et al., 1996). Im Bronchialsystem zeigt Nociceptin eine antitussive und eine inhibierende Wirkung auf die

glatte Muskelkontraktion. Osinski et al. (2000) wiesen, analog zu den klassischen Opioiden, einen hemmenden Effekt auf die Motilität des Gastrointestinalraum nach.

1.7 Fragestellung

Es gibt viele Hinweise darauf, dass es einen Zusammenhang zwischen dem NOP Rezeptor und seinem dazugehörigen Liganden Nociceptin mit Schmerz und der Immunfunktion gibt. Bis zum heutigen Zeitpunkt liegen jedoch kaum Daten zur NOP mRNA Expression beim Menschen vor. Diese Studie untersucht erstmals die Expression im humanen Vollblut in einem großen Kollektiv von gesunden Probanden und Patienten. Dabei stand die Frage im Mittelpunkt, ob Patienten mit einer malignen Tumorerkrankung und chronischen Schmerzen sowie kritisch kranke Patienten mit und ohne Sepsis eine Veränderung der NOP Expression im Vergleich zu gesunden Probanden aufweisen.

2 Material und Methodik

2.1 Genehmigung der Studie durch die Ethik-Kommission

Die Durchführung der Studie wurde durch die Ethik-Kommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn genehmigt. Die Untersuchungsmethoden entsprechen der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den gesetzlichen Grundlagen der Bundesrepublik Deutschland.

2.2 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 154 Patienten bzw. Probanden in diese prospektive Fall-Kontroll-Studie eingeschlossen und in die folgenden drei Hauptgruppen eingeteilt.

Gruppe G gesunde Probanden (n=39)

Gruppe I intensivpflichtige Patienten (n=28)

Gruppe I-N intensivpflichtige Patienten ohne Anzeichen einer systemischen Entzündung (n=11)

Gruppe I-S intensivpflichtige Patienten mit nachgewiesener Sepsis (n=17)

Gruppe T Patienten mit einer fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankung und chronischen Schmerzen (n= 88)

Die Untergruppe der intensivpflichtigen Patienten ohne Sepsis (Gruppe I-N) erlitt ein Trauma und/oder wurde einem großen chirurgischen Eingriff unterzogen. Die Untergruppe der intensivpflichtigen Patienten mit Sepsis (Gruppe I-S) erfüllten die Sepsiskriterien des American College of Chest Physician / des Society of Critical Care Medicine Consensus Conference Committee (1992) und wurden alle nach den Richtlinien der Surviving Sepsis Campaign (Dellinger et al., 2004) behandelt.

Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Studie waren das Fehlen des schriftlichen Patienteneinverständnisses durch den Patienten oder seinen gesetzlichen Vertreter und ein Alter unter 18 Jahren.

2.3 Laborparameter

Der größte Teil der Laborparameter konnte aus Blutproben der morgendlichen Routine-Blutentnahme im Rahmen der stationären Diagnostik erhoben werden. Leukozyten (Normwert $4,0-10,0 \times 10^3/\mu\text{l}$), Lymphozyten (Normwert 20-40%) sowie CRP (Normwert $<5 \text{ mg/l}$) wurden mit den standardisierten biochemischen Methoden des zentralen Labors der Universitätsklinik bestimmt. Zusätzlich benötigtes Blutmaterial konnte ebenfalls bei der morgendlichen Blutentnahme mit z.T. speziellen Monovetten abgenommen werden (siehe 2.3.1.1). Neben den Routinelaborparametern wurde bei allen Patienten die NOP Expression mittels quantitativer Echtzeit-PCR (rtPCR) bestimmt.

Von allen Patientengruppen (G, I (I-N, I-S) und T) wurde eine einmalige Blutabnahme durchgeführt und die NOP Expression im nativen Blut bestimmt. Bei den Patienten der Gruppe I-S erfolgte zusätzlich am Tag der Diagnose einer Sepsis (Tag 1), sowie am 3. und 5. Tag und nach der individuellen Genesung der septischen Symptomatik bei Überlebenden bzw. während der Verschlechterung im Falle der Nichtüberlebenden, die Entnahme einer Blutprobe. Zusätzlich wurden Vollblutkulturen von Probanden / Patienten der Gruppen G, I-N und I-S durchgeführt. Diese Blutproben wurden unter Zusatz verschiedener Dosen an Lipopolysaccharid (LPS) für einen Zeitraum von bis zu 24 Stunden inkubiert, um ein akutes inflammatorisches Geschehen in vitro nachzuahmen.

2.3.1 Ex vivo Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS)

Die Inkubation der Vollblutkulturen erfolgte mittels 2 verschiedener Ansätze. Die venösen Vollblutkulturen von gesunden Probanden (Gruppe G) wurden mit verschiedene LPS Konzentrationen (0; 0,1; 10; 100 ng/ml LPS) bis zu 24 Stunden inkubiert (Sigma-Aldrich / Taufkirchen- Germany).

Für Patientenblut der Gruppe I (I-N und I-S) wurde das „Milena ex vivo stimulation“ Kit (Milena Biotec) verwendet. Hierbei erfolgte eine Inkubation mit 500 pg/ml LPS über 4 Stunden.

2.3.1.2 Inkubation mit dem „Milena ex vivo stimulation“ Kit (Gruppe I)

Das für die Vollblutkulturen verwendete Blut wurde in eine 7,5 ml Na-Heparin Monovette entnommen und als heparinisierendes Vollblut für die Inkubation weiter verarbeitet.

Das im Kit enthaltene lyophilisierte LPS (10.000 pg) wurde 30 Minuten vor Gebrauch in 1 ml sterilem, pyrogenfreien Aqua dest. aufgelöst und sorgfältig gemischt. Dann erfolgte eine 1:20 Verdünnung der rekonstituierten LPS-Lösung auf eine Endkonzentration von 500 pg/ml. Je 500 µl dieser Stimulationslösung wurden dann in die im Kit enthaltenen 1,5 ml pyrogenfreien Reaktionsgefäße verteilt.

Die Reaktionsgefäße inklusive Inhalt wurden auf Raumtemperatur (18-28°C) gebracht. Danach gab man je 50 µl heparinisierendes Vollblut in die vorbereiteten Reaktionsgefäße die die Stimulationslösung enthielten. Dieser gemischte Ansatz wurde bei $37\pm 1^\circ\text{C}$ und 5% CO₂ für 4 Stunden inkubiert. Nach der Inkubation mischte man den Ansatz erneut und zentrifugierte ihn für 5 min. bei 3600 U/min ab.

2.3.1.3 Inkubation mit LPS von Sigma-Aldrich (Gruppe G)

Das für die Vollblutkulturen verwendete Blut wurde in eine 30 ml Na-Heparin Monovette entnommen und ebenfalls wie oben beschrieben als heparinisierendes Vollblut für die Inkubation weiter verarbeitet. Zur Herstellung der Stimulationslösung wurde 0,001g LPS (von Escherichia Coli, Serotype: 0111, Sigma-Aldrich / Taufkirchen, Germany) abgewogen und in 10 ml H₂O aufgelöst. Somit lag eine Konzentration von 1 mg/ 10ml = 100 µg/ 10 ml = 10 µg/ml vor. Danach stellte man eine 2 ml LPS Lösung her. Dazu verdünnte man zuerst 100 µg/ml Lösung 1:100 (20µl von 100µg/ml + 1980µl RPMI 1640 Medium) und es ergab sich 1µg/ml = 1000 ng/ ml, was wiederum 1:10 verdünnt 100 ng/ml bzw. 500 µl LPS ergab. Danach wurden je 900 µl heparinisierendes Blut mit der entsprechend vorbereiteten LPS Lösung (0, 0,1; 10; 100 ng/ml) gemischt und direkt bei 5000 U/min für 5 min zentrifugiert. Es folgte die Inkubation für verschiedene Zeitintervalle in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Vollblutkulturen entnommen und in je ein 1,5 ml steriles Eppendorfröhrchen gegeben und wiederum bei 5000 U/min für 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Vollblut vom Plasma getrennt, um es für die RNA-Isolierung weiter zu verarbeiten.

2.3.1.4 Isolierung von zellulärer Gesamt-RNA aus menschlichem Vollblut

Die RNA Isolierung erfolgte mit dem „QIAamp RNA Blood Mini Kit“ der Firma Qiagen. Dazu nahm man 1 Volumen menschliches Vollblut (hier: mit LPS stimuliertes Vollblut) und mischte es mit 5 Volumina „Puffer EL“ (im Kit enthalten). Das verwendete Volumen wurde hierbei der zu erwarteten Leukozytenzahl im jeweiligen Vollblut angepasst. Bei erhöhter Leukozytenzahl, reduzierte man das Ausgangsvolumen entsprechend. Die hergestellte Mischung wurde dann für 10-15 min. auf Eis inkubiert um die Erythrozytenlyse in Gang zu setzen. Nach der Zentrifugation mit 1500 U/min für 10 min bei 4°C bildeten die Leukozyten ein Pellet. Der dabei entstandene Überstand wurde verworfen. Nun folgte ein Waschschriff mit „Puffer EL“, um noch eventuell mit sedimentierte Erythrozyten zu entfernen. Danach zentrifugierte man das Material nochmals mit 1500 U/min für 10 min. bei 4°C. Jetzt pipettierte man gemäß der zu erwartenden Leukozytenzahl (siehe Tab. 1) „Puffer RLT“ zu den pelletierten Leukozyten. Nun wurde das Lysat direkt in eine „QIAshredder Spinsäule“ pipettiert und zum Homogenisieren für 2 min. bei maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert um die DNA zu verdauen. Nach Zugabe von 70%igem Ethanol wurde dann nach Mischung der Probe, diese in eine neue Spinsäule pipettiert und für 15 sec. mit ≥ 10.000 U/min zentrifugiert. Hiernach erfolgte ein Waschschriff mit einem Puffer. Nach erneuter Zugabe eines Puffers und anschließender Zentrifugation und wiederholter Pufferzugabe wurde die QIAamp Spinsäule in ein sauberes Reaktionsgefäß gesetzt und anschließend RNAase-freies Wasser (im Kit enthalten) dazu pipettiert. Danach wurde wiederholt 1 min bei ≥ 8000 U/min zentrifugiert um die RNA zu eluieren. Das RNA Produkt wurde dann bei -80°C gelagert.

Puffer RLT (μ l)	Vollblut gesunder Probanden (ml)	Anzahl Leukozyten
350	bis zu 0,5	bis zu 2×10^6
600	0,5 bis 1,5	2×10^6 bis 1×10^7

Tabelle 1: Volumina des zu pipettierenden Puffer RLT des „QIAamp RNA Blood Mini Kit“ der Firma Qiagen für verschiedene Ausgangsmengen von Blut und Leukozyten zur RNA Isolierung aus menschlichem Vollblut

2.3.2 cDNA-Synthese aus totaler RNA

Zur cDNA-Synthese wurde das 1st Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR® (avian myeloblastosis virus (AMV+), Roche Diagnostica, Mannheim, Deutschland) verwendet. Die hier angewandte Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Kombination von zwei Methoden der Molekularbiologie (die Nutzung der Reversen Transkriptase und der Polymerase-Kettenreaktion) um die Expression von spezifischen Genen in Zellen, Geweben oder Blutserum nachzuweisen. Die verwendete Reverse Transkriptase ist eine veränderte Enzymvariante aus dem Retrovirus des avian myeloblastosis virus (AMV RT). Die Reaktionsmischung beinhaltet 8,2 µl (ca. 500 ng) totale RNA, 5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 3,2 µg Random-Primer p(dN)₆, 50 Einheiten RNase Inhibitor, 20 Einheiten AMV Reverse Transkriptase und 20 µl Reaktionspuffer. Diese Lösung wurde für 10 min. bei 25°C, 60 min. bei 42°C, und 5min. bei 99°C inkubiert und danach für 5 min. auf 4°C abgekühlt.

2.3.3 Quantitative Echtzeit-PCR

2.3.3.1 Technik des LightCyclers: Das Prinzip des LightCyclers beruht auf einer Kombination aus einem ultraschnellen Cyclus und einem Fluorimeter, der eine Spezialoptik für die Messung von Mikrovolumina nutzt. Der Aufheiz- und Abkühlungsprozess wird durch wechselnde Zufuhr von heißer Luft und Luft mit Raumtemperatur gesteuert. Durch die geringe Masse der Luft können sehr schnelle Temperaturwechsel innerhalb der Reaktionskammer erzielt werden (siehe Abb. 2). Diese schnelle „thermal cycling“ Technik wird erst durch den Einsatz von Glaskapillaren als Reaktionsgefäß möglich. Durch das günstige Verhältnis von Oberfläche zu Volumen bei diesen Kapillaren wird ein besonders effizienter Hitzetransfer ermöglicht. Dieses spiegelt sich in den kurzen Cycluszeiten wider. Die speziell entwickelten Glaskapillaren dienen als optisches Element zur Sammlung des Lichtes (ähnlich einer Glasfaseroptik). Damit wird das Licht kanalisiert und konzentriert an die Spitze der Kapillare geleitet. Das Ergebnis ist eine effektive Lichtbestrahlung und Fluoreszenz-Messung der Probe. Die Kapillaren ermöglichen die Verwendung sehr kleiner Reaktionsvolumina von 10-20 µl. Zur Beladung der Kapillaren wird das Reaktionsgemisch in die Plastikhalterung der Kapillare pipettiert und über einen kurzen Zentrifugationsschritt luftblasenfrei in den

Glaskörper eingebracht (siehe Abb. 2). Die befüllten und luftdicht verschlossenen Kapillaren werden in einem Rotor mit 32 Probenplätzen gehalten.

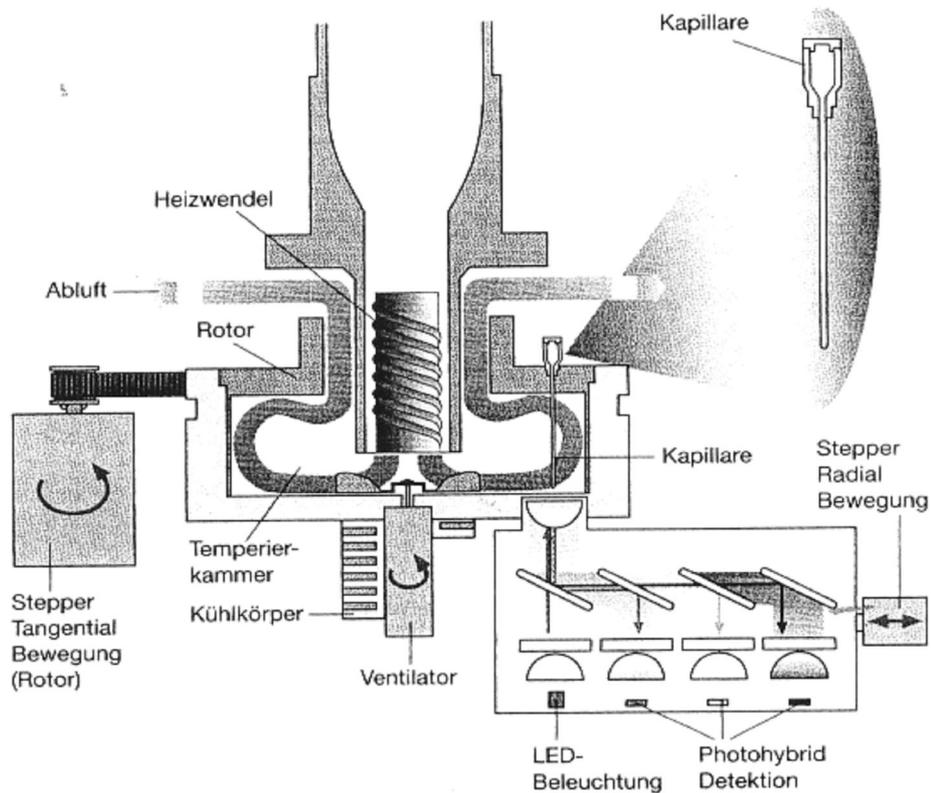


Abbildung 2: Schemazeichnung des LightCyclers (aus Biochemica Information, 1998) zur Durchführung einer quantitativen Echtzeit- Polymerasenkettenreaktion

Das Fluorimeter als weitere Komponente des LightCyclers beherbergt die Lichtquelle, eine wartungsfreie LED (Licht-Emitterende Diode). Das emittierte Licht wird gefiltert und über eine Linse auf die Spitze der Kapillare fokussiert. Die von der Probe ausgesandte Fluoreszenz wird dann von derselben Linse wieder gesammelt, über dichroitische Filter spezifisch gefiltert und an Photohybrid-Detektoren weitergeleitet. Diese optische Einheit enthält drei Filtersysteme für 530, 640 und 710 nm, so dass eine Detektion von drei Farben möglich ist. Für unterschiedliche Aufgabenstellungen steht

eine Reihe von Optionen für den Messzeitpunkt zur Auswahl, wie z.B. die hier verwendete Schmelzpunktanalyse nach jedem Lauf.

2.3.3.2 Methodik rtPCR

Die PCRs für NOP und dem für die Quantifizierung der mRNA notwendigen Standard, dem „house-keeping gene“ humane HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) wurden getrennt in separaten Kapillaren mit dem LightCycler® 2.0 (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Als Kalibrator diente eine cDNA, die aus der SK-N-DZ Zelllinie gewonnen wurde (1:50 verdünnt).

Für die Amplifikation von NOP wurden 4 µl LightCycler® FastStart DNA Master^{plus} SYBR Green I benutzt. Diese Reaktionsmischung beinhaltet FastStart Taq DNA Polymerase, Reaktions-Puffer, dNTP mix, SYBR Green I Färbung und MgCl₂. Dazu wurden 10 pmol von jedem Primer NOP-f und NOP-r (Tab. 2) und 500 ng vorverdünnte cDNA (entspricht 30 ng tRNA) gegeben, so dass sich ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Nach der Denaturierung bei 95° C für 10 min. wurde die Amplifikation mit 45 Zyklen durchgeführt (Denaturierung bei 95°C für 5 sek., Annealing bei 60°C für 10 sek., Extension bei 72°C für 20 sek.).

NOP-f	5'→TgCCgTTCTgggAggTTATCTA→3'
NOP-r	5'→TTAgggTgAAggTgCTggTgA→3'
HPRT-f	5'→TgACCTTgATTTATTTTgCATAC→3'
HPRT-r	5'→CgACgAAGAAgTTCAGTCCT→3'

Tabelle 2: Primer Sequenzen für die Amplifikation des Nociceptinrezeptors (NOP) und der humanen Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) zur Durchführung einer Polymerasenkettenreaktion. f= forward Primer, r= reverse Primer

Für den Nachweis von HPRT wurden die Fragmente in 20 µl PCR Reaktionsmischung amplifiziert. Diese beinhaltet 500 ng vorverdünnte cDNA, Universal ProbeLibrary 16nM, Probe #73, 4 µl LightCycler® TagMan® Master (FastStart Taq DNA Polymerase,

Reaktions-Puffer, $MgCl_2$ und dNTP mix, alle Reagenzien von Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und 4 pmol von jedem Primer (siehe Tab. 2). Analog zu dem vorher beschriebenen PCR-Arbeitsschritt erfolgte nun eine Denaturierung bei $95^\circ C$ für 10 min. und die Amplifikation mit 45 Zyklen (Denaturierung $95^\circ C$ für 10 sek., Annealing $55^\circ C$ für 15 sek., Extension $72^\circ C$ für 15 sek.). Dann erfolgte eine Abkühlung der Reaktion auf $40^\circ C$ für 30 sek. Die Fluoreszenz wurde für beide Läufe bei $55^\circ C$ im Kanal F2/F1 ausgewertet.

Die Expression von NOP mRNA wurden mit der LightCycler Relative Quantification Software (Roche Diagnostics) analysiert. In diesem Experiment wurde der Koeffizient durch die PCR Amplifikation von NOP und HPRT in einer Serie von verdünnter cDNA (Normalverteilungskurve) in dreifacher Ausfertigung ermittelt. Die Daten der Echtzeit-PCR, inklusive der Kalibrator- und Probanddaten wurden in die Relative Quantification Software importiert und mit dem Fit Coefficients File analysiert. Mit der „normalised ratio“ hat man eine direkte Aussage über die mRNA Expression des NOPs.

Im folgenden Verlauf wird die mRNA Expression des NOP-Rezeptors als NOP-Normratio (normalised ratio) angegeben. Bei dieser relativen Quantifizierung wird die Expression des Targetgens (NOP) mit der eines nicht regulierten Haushaltsgenes normalisiert. Dabei wird nicht die absolute Startkopienzahl bestimmt, sondern die Expression wird auf das zweite, ubiquitär und unreguliertes Gen, in diesem Fall HPRT, bezogen.

Zur externen Kontrolle und einer besseren Visualisierung wurde zusätzlich eine Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurden die amplifizierten PCR Produkte auf einem 1,5%igem Agarosegel zusammen mit $0.5 \mu g/ml$ Ethidiumbromid aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen (Nytran® 0.2, Schleicher & Schuell, Germany; Trans-Blot® SD, BioRad, Germany) und mit dem Stratalinker® 1800 UV Crosslinker (Stratagene) fixiert. Für die Hybridisierung und Verifikation der Transkripte wurden spezifische für NOP gelabelte Oligonukleotide verwendet (DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer, Mannheim, Deutschland). Als Negativkontrollen dienten spezifische Sonden für μ - und δ -Opioidrezeptoren.

2.4 Procalcitonin (PCT)

2.4.1 Aufarbeitung der Blutproben

Das zur Bestimmung des Procalcitonin verwendete Blut wurde in EDTA-Plasma-Röhrchen zum gleichen Zeitpunkt entnommen wie alle anderen Laborparameter. Die Röhrchen wurden nach maximal zwei Stunden zentrifugiert („Labofuge 400R“, Kendro Lab Products, Dauer fünf Minuten, 1000fache Erdbeschleunigung (=1000 x g)). Anschließend wurde das Plasma dann bei -30°C gelagert.

2.4.2 Grundlagen des Verfahrens

Die Procalcitononkonzentrationen wurden mit dem „LUMItest PCT-Assay“ der Firma B.R.A.H.M.S Diagnostica GmbH im „Luminometer“ der Firma Behring bestimmt. Bei der Nachweismethode handelt es sich um ein immunoluminometrisches Verfahren. Die folgende Beschreibung des Testverfahrens entspricht den Herstellerangaben.

Die verwendeten Reagenzröhrchen sind mit monoklonalen Antikörpern gegen den konstanten Teil des Katalcalcin (CCP)-Sequenz des PCT beschichtet („coated tubes“) (1), so dass diese gleichermaßen mit CPP-I und CPP-II reagieren. Nach Zugabe der zu messenden Lösung werden die PCT-Moleküle an dieser Sequenz gebunden (2). Monoklonale Antikörper gegen die Calcitoninsequenz des PCT binden im folgenden Schritt ebenfalls an den Komplex (3). Die hinzu gegebenen Antikörper sind mit einem lumineszierenden Akridinium-Derivat markiert („Tracer“) (4). Nach Auswaschen des nicht gebundenen Überstandes an Calcitonin-Antikörpern kann das Lumineszenzsignal der gebundenen Tracer quantitativ bestimmt werden. Durch Vergleich mit Standardkurven von definierten PCT-Konzentration und Lumineszenzsignalen wird das gemessene Signal der entsprechenden PCT-Konzentration zugeordnet.

2.4.3 Präzision und Messbereich des Verfahrens

Die analytische Assaysensitivität des „LUMItest PCT“-Assay wird von der Herstellerfirma für 0,1 ng/ml genannt. Jedoch wird die funktionelle Assaysensitivität für 0,3 ng/ml angegeben, da erst ab dieser Konzentration eine Interassayvarianz unter 20% vorliegt. Proben können mit dem im Nachweis-Set enthaltenen „Nullserum“ (PCT-freies Humanserum) bis auf ein Verhältnis von 1:16 verdünnt werden. Für diesen Bereich liegt

die Wiederfindung, d.h. das Verhältnis von gemessenem Wert zu errechneter verdünnter Konzentration, zwischen 95% und 110%. Die Konzentration, ab der ein „High Dose Hook“ Effekt einsetzt (hohe Konzentrationen führen zu fälschlich niedrigen Messwerten) liegt nach Angaben des Herstellers über 1000ng/ml. Dies ist der oberste Bereich der Werte, die unter klinischen Bedingungen beobachtet wurden.

2.4.4 Interaktion und Kreuzreaktivität mit anderen Substanzen

Die zu PCT sequenzanalogen Substanzen Calcitonin (CT), Katalcalcin (CCP) und CGRP führen nach Angaben der Herstellerfirma in klinisch relevanten Konzentrationen (CT und CCP bis 10 ng/ml, CGRP bis 10.000 ng/ml getestet) zu keinen falsch erhöhten Messergebnissen des PCT. Medikamente die häufig auf Intensivstationen verwendet werden wie Heparin, Furosemid, Fentanyl, Cefotaxim, Imipenem, Vancomycin und Katecholamine führten in therapeutischen Blutkonzentrationen nur zu äußerst geringer Kreuzreaktivität.

2.4.5 Normbereich

Für Gesunde wird von der Herstellerfirma des verwendeten „LUMItest“ PCT-Assay eine PCT-Konzentration von unter 0,1 ng/ml als Normbereich angegeben (Meisner, 2000). Andere Studien belegen diesen Wert (Ghillani et al., 1989), bzw. nennen für Gesunde eine mediane Blutkonzentration von 0,13 ng/ml (Morgenthaler et al., 2002a).

Eine neuere Studie aus dem Jahr 2002 (Morgenthaler et al., 2002b) beschreibt für diesen Assay eine funktionelle Sensitivität von 0,007 ng/ml (7 ng/l). Bei Gesunden fanden sich PCT-Konzentrationen im Blut im Mittelwert von 0,05 ng/ml (0,02-0,09 ng/ml). Höhere PCT- Werte bei verschiedenen infektionsbedingten Grunderkrankungen stimmen mit Ergebnissen anderen Studien, die mit dem etablierten „LUMItest“ Assay erhoben wurden, überein.

2.5 IL-6

Die Aufarbeitung der Blutproben zur Interleukin-6-Bestimmung erfolgte analog zur Procalcitoninbestimmung (s. Kap. 2.4.1). Die IL-6 Konzentrationen wurden mit dem IL-6-ELISA-CB Kit (BioSource Europe S.A, Belgium) und dem IL-6-ELISA-CB and the ELISA-Reader (BioRad Lab., USA) gemessen. Bei diesem Verfahren sind die

Mikrotiterplatten mit verschiedenen monoklonalen Antikörpern gegen Epitope des IL-6 Moleküls bestückt und können so das in der zu messenden Lösung enthaltene IL-6 in einem ersten Schritt binden. Zugegebene Antikörper gegen IL-6, welche mit Meerrettichperoxidase markiert sind, binden im nächsten Schritt an diesen Komplex. Nach Auswaschen des Überstandes wird ein Chromogen (Tetramethylbenzidin) hinzugegeben und durch die Peroxidase aktiviert. Nach Beendigung der Inkubationszeit durch eine Stopplösung wird die Lichtabsorption des Chromogens colorimetrisch gemessen und anhand einer Standardkurve der entsprechenden IL-6-Konzentration zugeordnet. Der Normwert für IL-6 liegt bei <24 pg/ml.

2.6 Statistische Auswertung

Sämtliche klinische Daten sowie die Ergebnisse der Laboruntersuchungen wurden für die statistische Auswertung in STATISTICA 6.0 (StatSoft, Tulsa, USA) eingegeben um dort MW (Mittelwert) \pm SEM (Standard Error of the Mean) sowie Median (1./3. Quartile) zu berechnen. Für den Vergleich der verschiedenen Probanden- / Patientengruppen wurden nicht-parametrische Testverfahren verwendet (Kruskal-Wallis-Test und Mann-Whitney-U-Test), da bei den zu untersuchenden Größen nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte. Ein p-Werte $<0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet. Eine Korrektur für multiples Testen wurde vorgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Demographische und krankheitsbezogene Daten

3.1.1 Gruppe T (Tumorpatienten)

Die Patienten der Gruppe T litten an einer fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankung (Diagnosen siehe Tab. 3) und den damit meist assoziierten chronischen Schmerzen. In den meisten Fällen war ein zusätzliches metastatisches Geschehen bekannt.

Lokalisation des Primärtumors	Anzahl der Patienten n (%)
Lunge / Bronchialsystem	21 (23,86)
Gastrointestinal	28 (31,82)
Urogenital	16 (18,18)
Zervix / Ovar	9 (10,23)
Brust	7 (7,95)
Oropharynx	2 (1,14)
Sonstiges	5 (5,68)
gesamt	88 (100%)

Tabelle 3: Lokalisation der Primärtumore und jeweilige Anzahl (%) der Patienten der Gruppe T (Tumorpatienten)

Abhängig von der Überlebenszeit nach der Blutabnahme wurde die Gruppe T in drei Subgruppen aufgeteilt (siehe auch Tab.7):

- Überlebenszeit unter 10 Tagen n= 36
- Überlebenszeit zwischen 11 und 30 Tagen n= 25
- Überlebenszeit über 30 Tagen n= 27

3.1.2 Gruppe I (Intensivpatienten)

Von den 17 Patienten der Gruppe I-S (intensivpflichtige Patienten mit nachgewiesener Sepsis) verstarben neun an einem Sepsis assoziierten Organversagen. Patienten der Gruppe I-N (n=11) zeichneten sich zwar durch Intensivpflichtigkeit aus, jedoch fehlten hier klinische sowie laborchemische Zeichen einer Infektion.

3.1.3 Gruppe G (gesunde Kontrollen)

Die gesunden Kontrollprobanden litten weder an Schmerzen, noch war zum Zeitpunkt der Blutentnahme eine akute oder chronische Erkrankung bekannt.

3.1.4 Entzündungsparameter der drei Untersuchungsgruppen

Die Entzündungsparameter der Patientengruppen zeigten zum Teil sehr deutliche Abweichungen zu den Normwerten.

	T	I	G
Anzahl der Patienten	88	28	39
männlich / weiblich	45 / 43	19 / 9	20 / 19
Alter (Jahre) MW \pm SEM	64,7 \pm 1,5	57,0 \pm 2,8	32,8 \pm 1,5
Leukozyten (x10 ³ /m ³) MW \pm SEM	11,7 \pm 1,2	14,5 \pm 2,9	n.g.
IL-6 (pg/ml) MW \pm SEM	71,2 \pm 13,9	101,5 \pm 28,5	n.g.
PCT (ng/ml) MW \pm SEM	3,5 \pm 2,4	24,2 \pm 14,3	0,05 \pm 0,005

PCT= Procalcitonin; IL6= Interleukin 6, n.g. = nicht gemessen

Tabelle 4: Demographische Daten und Laborergebnisse der Gruppen T (Tumorpatienten), I (Intensivpatienten), und G (gesunde Probanden)

Bei den gesunden Probanden befinden sich die PCT-Werte im Normbereich, hingegen weisen die Intensivpatienten eine massive Erhöhung der PCT-Werte auf. Bei den

Tumorpatienten lässt sich ebenfalls eine Erhöhung um das 70-fache im Vergleich zu den gesunden Probanden verzeichnen. Analog dazu verhält sich Interleukin-6. Hingegen weisen die Leukozyten, gemäß der bekannten zeitlich verzögerten Reaktion, einen trägeren Anstieg auf.

3.2 NOP mRNA Expression im nativen Blut

Der NOP Rezeptor wurde erwartungsgemäß im Vollblut aller Patientengruppen exprimiert. Die Expression in den Gruppen G und I war vergleichbar, jedoch zeigten sich erhöhte Werte in der Gruppe T (10,2 (7,4/17,8), $p < 0,001$) wie auch die Abb. 3 verdeutlicht.

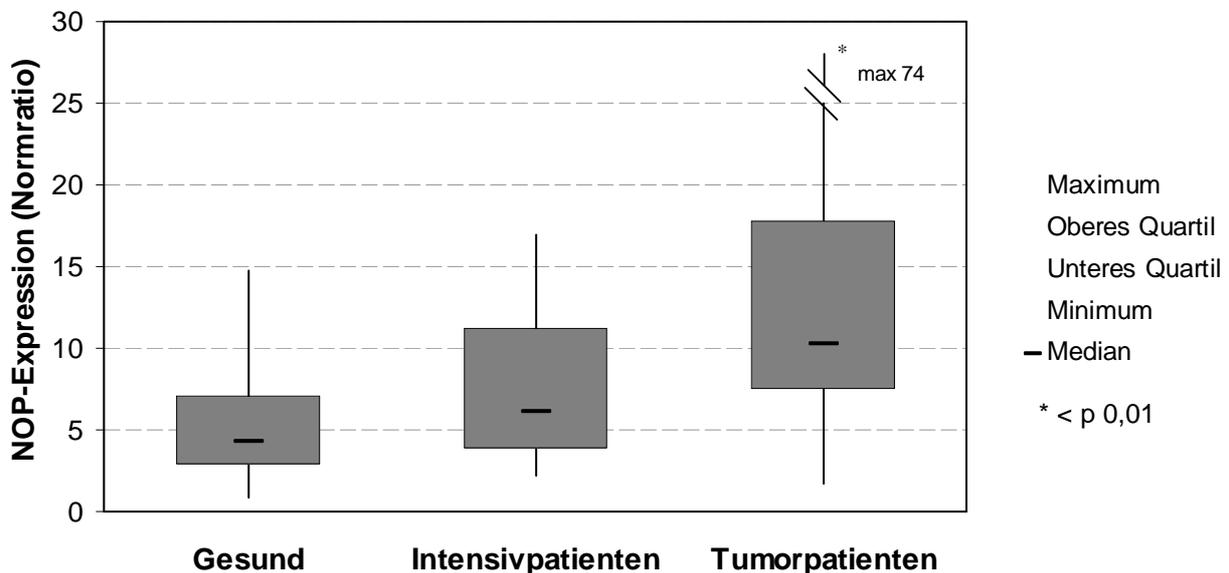


Abbildung 3: Nociceptinrezeptor-Expression (NOP) im nativen Vollblut der Patientengruppen G (gesunde Probanden), I (Intensivpatienten) und T (Tumorpatienten) im Vergleich zueinander

Die Überlebenszeit, die tägliche Opioiddosis (Morphinäquivalente), sowie die Dauer der Opioidvorbehandlung (0-45 Monate) hatten keinen Einfluss auf die NOP Expression in der Gruppe T (vgl.Tab. 7).

Ferner konnten in Gruppe T keine Unterschiede zwischen Patienten ohne Schmerzen (NRS=0), mit leichten Schmerzen (NRS=1-5) und mit starken Schmerzen (NRS 6-10) beobachtet werden (vgl. Tab. 5).

Schmerzen	Schmerzscore (NRS)	n	NOP Expression
Keine	0	20	14,4 (7,6/28,8)
Leicht	1-5	28	11,4 (8,5/18,8)
Stark	6-10	21	12,2 (9,6/20,4)

Tabelle 5: Nociceptinrezeptor-Expression (NOP) der Gruppe T (Tumorpatienten) mit unterschiedlichen Schmerzscores bei stationärer Aufnahme, NRS (Numerische Ratingskala 0-10)

Der hier benutzte Schmerzscore NRS (Numerische Rating Skala) gibt die subjektive Schmerzwahrnehmung des Patienten an, wobei 0 für keine Schmerzen und 10 für den stärksten vorstellbaren Schmerz steht.

Des Weiteren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der NOP Expression zwischen den verschiedenen neoplastischen Erkrankungen. Ebenfalls unterschieden sich die beiden Gruppen der Intensivpatienten I-N und I-S nicht hinsichtlich der NOP Expression. Auch das Alter der verschiedenen Patienten / Probanden spielte keine Rolle für die Quantität der NOP-Expression (vgl. Tab.6).

	Gruppe T		Gruppe I	
	Alter	NOP	Alter	NOP
jüngere Patienten	40,8±1,3	9,3(5,6/11,9)	41,1 ±2,9	5,6(4,2/9,6)
ältere Patienten	68,9±1,3	10,8(7,2/17,4)	66,4±1,8	5,2(4,0/9,8)

Tabelle 6: Vergleich der Nociceptinrezeptor-Expression (NOP) bei jüngeren und älteren Patienten der Gruppe T (Tumorpatienten) und Gruppe I (Intensivpatienten), Normratio; Median (1./3. Quartile) und Alter (Jahre, MW±SEM)

In den seriellen Blutabnahmen der Gruppe I variierte die mRNA Expression ebenfalls nicht gravierend während der verschiedenen gemessenen Zeitpunkte.

Allerdings ergab sich eine signifikante Erhöhung der Expression in der Gruppe I-S bei denjenigen Patienten, die innerhalb von 10 Tagen verstarben (9,9(8,3/14,1)) im Vergleich zu denjenigen, die länger als 10 Tage überlebten (5,5(4,2/8,2), $p=0,002$) wie Abb. 4 verdeutlicht.

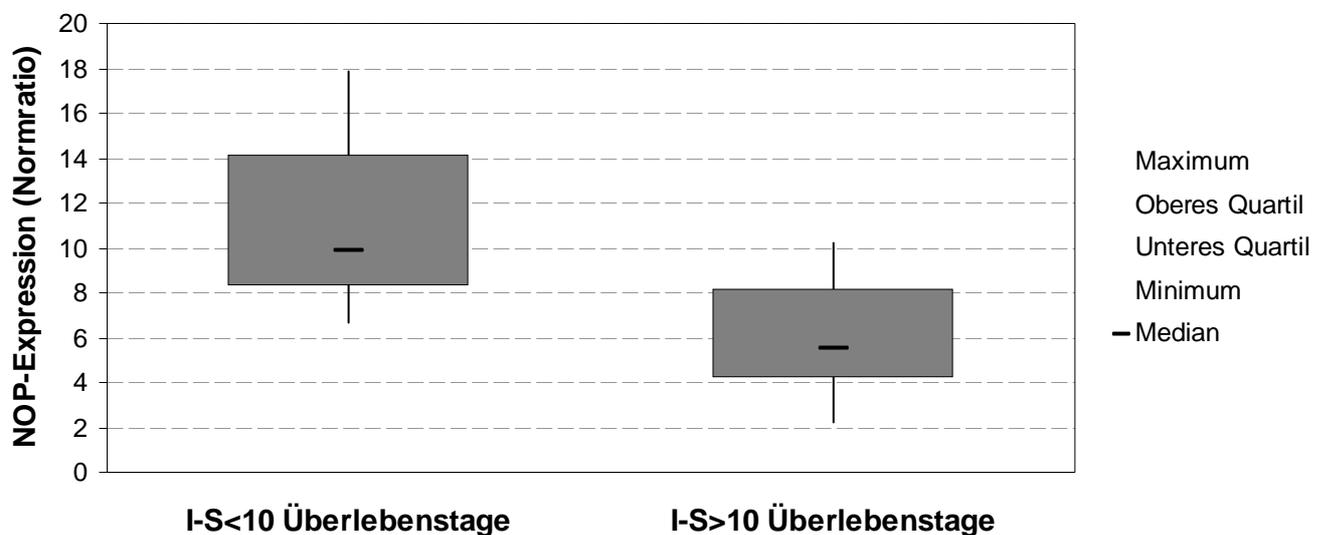


Abbildung 4: Nociceptinrezeptor-Expression (NOP) im nativen Vollblut der Gruppe I-S (intensivpflichtige Sepsispatienten) differenziert nach Überlebenszeit von unter 10 und über 10 Tagen

3.3 NOP Expression ex vivo in mit LPS stimuliertem Probandenblut

Vollblutkulturen ohne LPS-Zusatz zeigten keine Veränderungen innerhalb von 24 Stunden hinsichtlich der mRNA Expression verglichen mit der NOP Expression in nativen Proben. Im Gegensatz dazu ließ sich nach Ko-Inkubation mit LPS eine deutliche Herabregulation, abhängig von LPS-Dosis und Zeitdauer der Inkubation beobachten ($p < 0,01$) (Abb. 5). Die Konzentration von 0,1 ng/ml LPS verursachte eine Verminderung

der NOP Expression nach 24 Stunden, während die Inkubation mit 100 ng/ml LPS schon nach 3 Stunden eine deutliche Subpression aufwies.

Im Gegensatz zu den Blutzellen zeigten die humanen Neuroblastomzellen SH-SY5Y keine Veränderungen in Ihrer NOP Expression unter LPS.

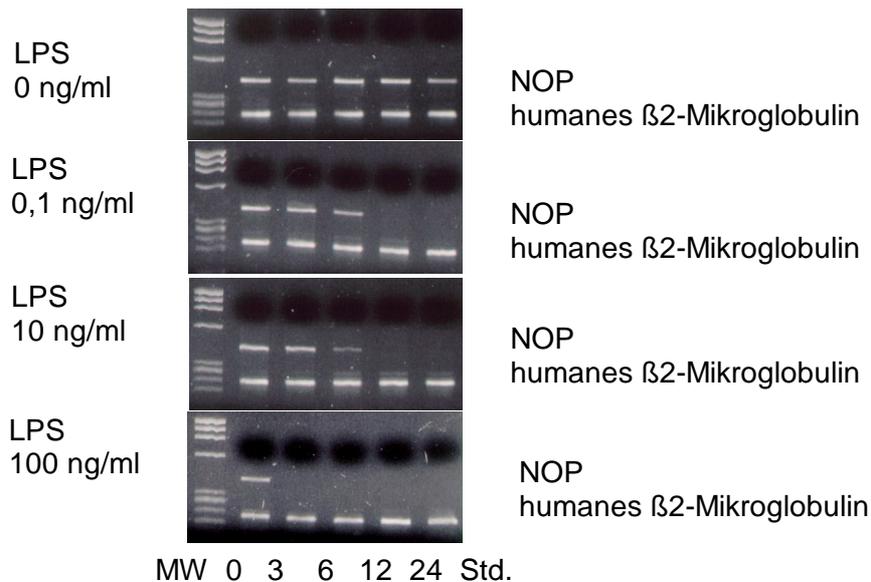


Abbildung 5a: Gelelektrophorese: Expression von Nociceptinrezeptor mRNA (NOP) und einem internen Standard (humanes β 2-Mikroglobulin) als Haushaltsgen in Vollblutkulturen eines Individuums. Es erfolgte eine Inkubation des Vollblutes mit LPS (0; 0,1; 10; 100 ng/ml) für 0, 3, 6, 12 und 24 Stunden. MW: Molekulargewichtsmarker

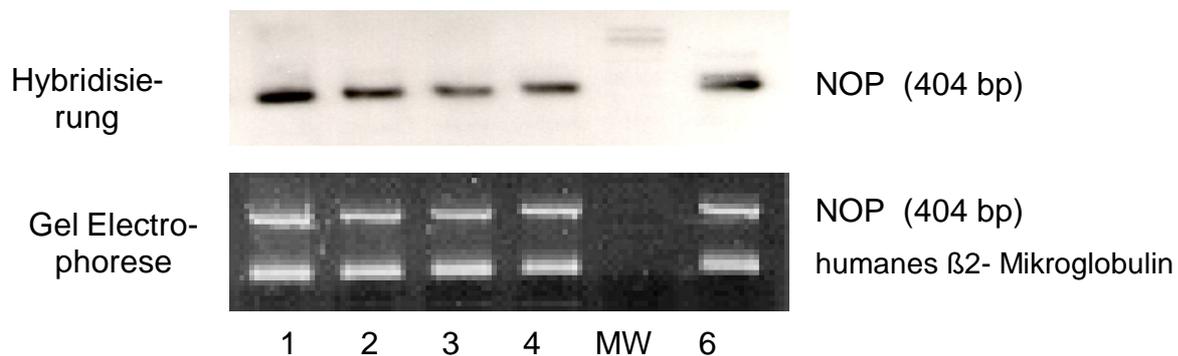


Abbildung 5b: Hybridisierung der PCR-Produkte mit einer für die Nociceptinrezeptor spezifischen DIG gelabelten Sonde, Linie 1;2;3;4 und 6 zeigen PCR-Ergebnisse für NOP und einem internen Standard, Linie 5= Molekulargewichtsmarker, bp=Basenpaare

Mittels Southern Blot Analysen und Hybridisierung mit einer DIG-gelabelten NOP spezifischen Sonde wurde die Spezifität der amplifizierten PCR Produkte überprüft. Ein positives Hybridisierungssignal bestätigte die PCR-Produkte als NOP (Abb. 5b). Hingegen ergab die Hybridisierung der PCR-Produkte mit spezifischen Sonden für den μ - und δ -Opioidrezeptor erwartungsgemäß kein Signal. Abb. 6 zeigt die Ergebnisse aller Vollblutkulturen von gesunden Probanden unter den verschiedenen LPS-Dosen und Zeitintervallen.

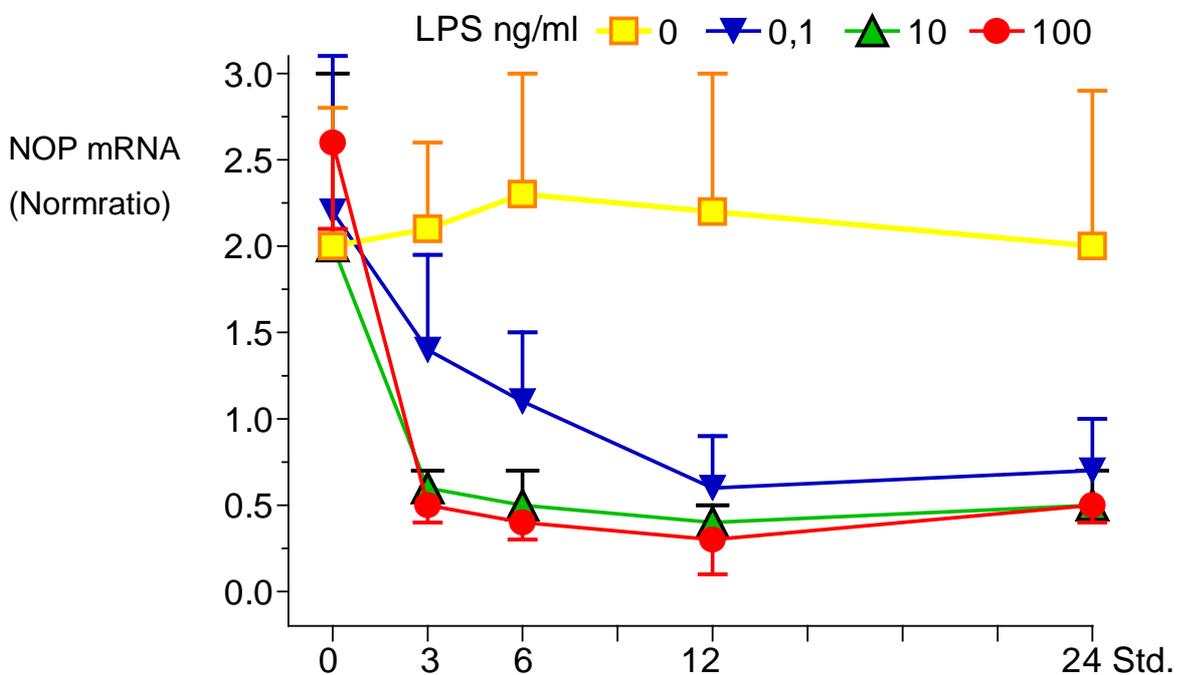


Abbildung 6: Nociceptinrezeptor mRNA Expression im Vollblut von allen gesunden Probanden (Gruppe G) unter verschiedenen LPS-Dosen und Zeitintervallen

3.4 NOP Expression ex vivo von Patienten mit LPS inkubiertem Blut

In einem zweiten Schritt wurde die NOP Expression ex vivo in Vollblutkulturen von Patientenblut der Gruppen I und Gesunden im Vergleich untersucht. Eine LPS Stimulation mit 500 pg/ml LPS für vier Stunden verursachte eine deutliche Reduktion der

NOP Expression von 4,3 (2,8/7,1) auf 1,0 (0,6/4,7), $p=0,002$ in der Gruppe G und von 4,6 (3,8/11,1) auf 1,5 (0,8/2,1), $p=0,004$ in der Gruppe I-N. Diese Herabregulierung fand sich jedoch nicht in der Gruppe I-S. Differenzierte man jedoch zwischen Patienten der Gruppe I-S, die innerhalb von 10 Tagen verstarben und denen, die länger als 10 Tage überlebten, so konnte man eine Herabregulierung der länger Überlebenden (3,8(2,7/7,9) $p=0,002$) beobachten, die bei den kurz Überlebenden fehlte (11,4(7,5/ 16,2)). Abb. 7 verdeutlicht die Ergebnisse noch mal graphisch.

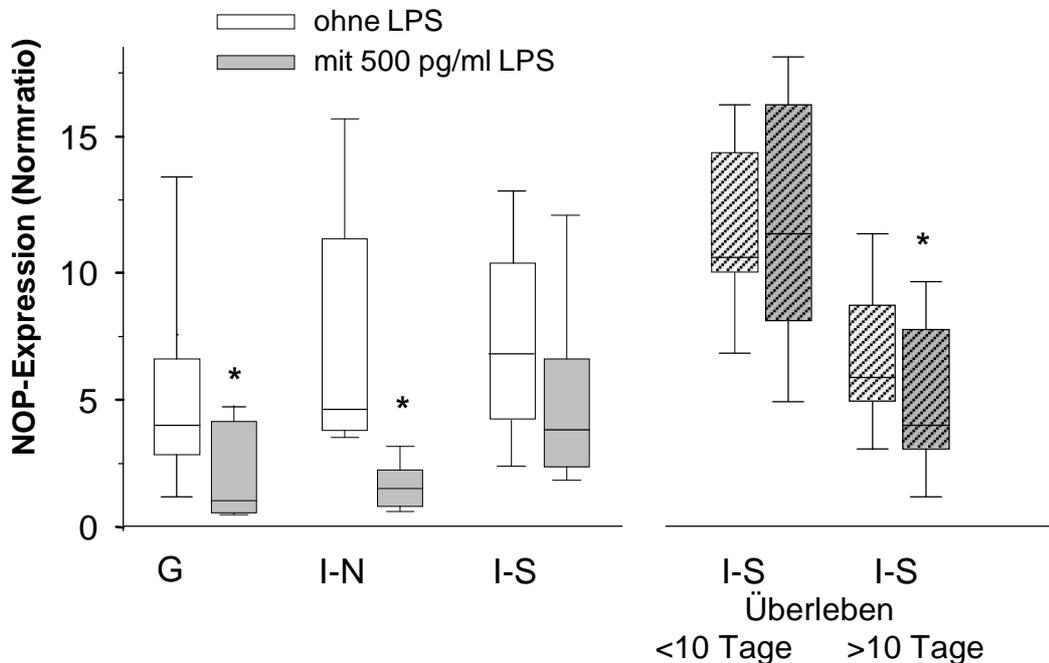


Abbildung 7: Nociceptinrezeptor-Expression (NOP) in peripheren Blutzellen mit und ohne LPS Inkubation der Gruppen G (gesunde Probanden), I-N (intensivpflichtige Patienten ohne Sepsis) und Gruppe I-S (intensivpflichtige Patienten mit Sepsis), rechtes Feld zeigt die Gruppe I-S differenziert nach Überlebenszeit

3.5 Zusammenhang zwischen inflammatorischen Markern und dem Schweregrad der Erkrankung

Ein klinisch relevanter Anstieg der inflammatorischen Marker wurde vor allem in der Gruppe T beobachtet, insbesondere bei denjenigen Patienten die innerhalb von 10 Ta-

gen verstarben. Diejenigen Patienten mit der kürzesten Überlebenszeit zeigten auch die ausgeprägtesten Erhöhungen der IL-6 und PCT Konzentrationen. Bei denjenigen Patienten, die zwischen 11-30 Tagen überlebten, zeigten sich PCT Erhöhungen um das 6-fache, bei Patienten mit einer Überlebensdauer von über 30 Tagen um das 4-fache, bezogen auf den oberen Normbereich. Analog korrelierte in unserer Studie die mRNA Expression von NOP nicht mit CRP, IL-6 und PCT.

	Überleben ≤10Tage	Überleben 11-30 Tage	Überleben >30 Tage
Anzahl der Patienten (männl. / weiblich)	36 (24 / 12)	25 (11 / 14)	27 (10 / 17)
Alter (Jahre) MW±SEM	65,8±1,9	61,8±3,1	65,4±2,9
Überleben (Tage) MW±SEM	4,6±0,5	19,4±1,3	138,6±26,5
Schmerz Skala NRS in Ruhe Median (Quartile) bei Belastung	3 (1/5) 7 (4/8)	1 (0/3) 4 (3/6)	4 (2/5) 7 (3/9)
Morphin Äquivalente/Tag (mg) MW±SEM	108,4±17,5	112,9±33,5	168,4±44,9
NOP (normalized ratio) Median (Quartile)	10,5(7,5/21,5)	9,0(5,8/15,6)	11,9(8,6/16,9)
Leukozyten (x10 ³ /m ³) MW±SEM	12,4±1,7	11,2±1,3	11,2±3,1
CRP (mg/L) MW±SEM	15,8±2,7	12,1±2,0	9,3±2,0
IL6 (µg/ml) MW±SEM	110,1±32,2	70,3±20,4	19,0±5,7
PCT (ng/ml) MW±SEM	7,5±5,7	0,6±0,2	0,4±0,2

NRS: numerische Ratingskala (0-10)

Tabelle 7: Demographische und klinische Daten sowie Laborparameter der Tumorpatienten (Gruppe T) unterteilt nach Überlebenszeit von unter 11 Tagen, 11-30 Tagen und über 30 Tagen

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit untersucht die NOP mRNA Expression in peripheren Blutzellen von Patienten mit einer fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankung im Vergleich zu gesunden Probanden und kritisch kranken Intensivpatienten. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen eine deutliche Hochregulierung der NOP Expression bei den Patienten mit einer terminalen Tumorerkrankung und kritisch kranken Sepsispatienten mit multiplen Organversagen im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Ex vivo Experimente zeigten, dass NOP konstitutiv in peripheren Blutzellen expremiert wird und dass diese Expression sowohl bei gesunden Probanden als auch bei Intensivpatienten ohne Anzeichen eines inflammatorischen Geschehens durch LPS herabreguliert wird. Im Gegensatz dazu fehlte dieser LPS-Effekt der Herabregulation bei Patienten mit schwerer Sepsis.

4.1 NOP System und Entzündung

Vorherige Studien zeigten bereits, dass Mono- Granulo- und Lymphozyten NOP mRNA transkribieren (Williams et al., 2007). Das Rezeptorprotein wurde auf den Zelloberflächen aller Leukozytentypen, unabhängig von Alter oder Geschlecht, nachgewiesen (Krüger et al., 2006). Die vorliegende Untersuchung bestätigt eine fehlende Abhängigkeit des mRNA Level von Alter und Geschlecht.

Die Existenz des NOP Rezeptors auf T-Zellen (Peluso et al., 2001; Waits et al., 2004) und die Fähigkeit von Immunzellen, Nociceptin zu produzieren (Fiset et al., 2003) deutet auf eine immunmodulatorische Rolle des Liganden hin. Auch die Beobachtung, dass bei Nociceptinverabreichung eine dosisabhängige induzierte polymorphonukleäre Chemotaxis an der Injektionsstelle stattfand, ist von Bedeutung (Serhan et al., 2001). Im Einklang dazu sezernieren stimulierte humane polymorphkernige Zellen Nociceptin mittels Exocytose und es wird angenommen, dass Nociceptin intrazellulär in Vesikeln gespeichert wird (Fiset et al., 2003). Die initial erhöhte NOP Expression bei Nichtüberlebenden einer Sepsis (Williams et al., 2008) ist ein weiterer Anhaltspunkt für die Hypothese, dass das NOP System im Status eines beginnenden inflammatorischen Geschehens erheblich hochreguliert wird. In dieser Studie von Williams und Koautoren

(2008) war die Nociceptinplasmakonzentration bei Patienten nach einer großen abdominalen Operation sogar höher als bei Sepsispatienten ohne chirurgischen Eingriff. Die Autoren vermuteten eine erhöhte systemische inflammatorische Antwort bei beiden genannten Patientengruppen (Williams et al., 2008). Williams und Mitarbeiter wiesen auch darauf hin, dass die übermäßige Nociceptinausschüttung dazu beitragen könnte, die Myokardleistung und den vaskulären Tonus zu reduzieren und die Gefäßpermeabilität zu erhöhen. Beides sind typische pathophysiologische Veränderungen im Rahmen einer Sepsis. Diese Hypothese wird von Tierexperimenten gestützt, in denen eine Nociceptin induzierte Abnahme des Herzzeitvolumens, eine Vasodilatation und eine Hypotension beobachtet wurden (Champion et al., 1997; Champion et al., 1998; Malinowska et al., 2002). Dazu passend wurden gegenteilige Effekte bei Knockout-Mäusen beobachtet (Burmeister et al., 2008). Zudem konnte die Nociceptin induzierte erhöhte Gefäßpermeabilität durch einen Histamin-H1-Rezeptor Antagonisten unterdrückt werden (Kimura et al., 2000). Nociceptin stimulierte in Ratten dosisabhängig Mastzellen zur Histaminausschüttung. Kimura et al. (2000) vertreten die Meinung, dass Nociceptin, wahrscheinlich über den NOP Rezeptor wirkend, ein kritischer Faktor für die Verstärkung der inflammatorischen Immunantwort ist, indem es die Histaminfreisetzung aus Mastzellen stimuliert. Unterstützend für diese These wirkt der Umstand, dass NOP-Knockout-Mäuse einen deutlich geringeren Schweregrad einer Toxin induzierten Colitis aufweisen, als Wildtyp-Mäuse. Kato et al. (2005) schlossen daraus, dass Nociceptin die inflammatorische Zellmigration sowie deren Aktivierung stimuliert. Diese Befunde entsprechen auch Phänomenen, die bei schwerer Sepsis beobachtet wurden. Es stellt sich die Frage, ob diese Beobachtungen auch bei einer terminalen, malignen Tumorerkrankung zutreffen.

Bis jetzt wurden keine Studien veröffentlicht, die das NOP System bei Patienten mit fortgeschrittenen neoplastischen Erkrankungen untersuchten. Die vorliegenden Daten zeigen deutlich erhöhte Inflammationsmarker wie CRP, PCT und IL-6 assoziiert mit einer erniedrigten Überlebenszeit bei Tumorpatienten. PCT wurde bereits bei systemischen Infektionen, Sepsis sowie bei febrilen Neutropenien als Validitätsmarker anerkannt. Ebenfalls gilt PCT als wichtiger Faktor für das Outcome von Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen (von Lilienfeld et al., 2006). Es gibt ausreichende Belege dafür, dass Opioidrezeptoren und endogene Opioidpeptide einer

neuroimmunologischen Regulierung unterliegen, deren Stimuli periphere Infektionen sind (Rittner et al., 2008). Ebenfalls spricht vieles dafür, dass auch das NOP System in diese neuroimmunologische Modulationsachse integriert ist. Nociceptin wirkt sich signifikant auf die endogene Schmerzkontrolle während prolongierten nociceptiven Stimuli aus, hat jedoch keinen Effekt auf die Schmerzsensitivität bei akuten Schmerzen (Depner et al., 2003). Homozygote NOP Knockout-Mäuse und Mäuse mit mangelnden Nociceptinvorstufen zeigten eine erhöhte inflammatorische Hyperalgesie verglichen mit Wildtyptieren. Es wird angenommen, dass anhaltende nozizeptive Reize eine Nociceptinfreisetzung zur Schmerztoleranz und Schmerzkontrolle erfordern (Lambert et al., 2008).

Darüber hinaus wurden signifikant erhöhte Nociceptinblutspiegel bei Schmerzpatienten im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen (Ko et al., 2002). Insbesondere wurden höhere Spiegel bei chronischen Schmerzpatienten als bei Patienten mit akuten Schmerzen gemessen, was auf eine enge Beziehung zwischen der Serumkonzentration und der Existenz und vor allem der Dauer von Schmerzen hindeutet. Es sei jedoch erwähnt, dass eine ältere Publikation erniedrigte Nociceptinkonzentrationen bei Patienten mit Fibromyalgie im Vergleich zu den Kontrollen angibt (Anderberg et al., 1998). Horverth et al. (2004) berichten über erhöhte Nociceptinplasmaspiegel bei Patienten mit hepatozellulären Karzinomen. Bedauerlicherweise wurde im Rahmen dieser Studie kein Patient mit einem HCC in die Studie aufgenommen. Wie schon erwähnt ermittelten wir jedoch im Vergleich von Patienten mit und ohne Lebermetastasen keinen Unterschied in der NOP Expression.

Im Einklang zu den meißten Daten, ergab unsere Studie eine ausgeprägte Hochregulation der NOP Expression bei Patienten mit anhaltenden inflammatorischen und noxischen Stimuli, entweder durch ein Malignom oder eine schwere systemische Infektion. Beide Gruppen standen unter einer Opioidtherapie, jedoch gab es keine Korrelation zwischen der Opioiddosis oder der Länge der Opioidtherapie. Im Gegensatz dazu zeigte die Gruppe der kritisch kranken Patienten ohne Sepsis (Gruppe I-N) nur leichte, nicht signifikante Erhöhungen der NOP mRNA Expression. Für dieses Ergebnis könnte aber auch die begrenzte Anzahl der beobachteten Patienten verantwortlich sein. Analog zu der Studie von Krüger et al. (2006), in der eine Modulation der Zytokinproduktion durch

den NOP Rezeptor ausgeschlossen wurde, korrelierte in der vorliegenden Studie der NOP Rezeptor Gehalt nicht mit CRP, IL-6 und PCT.

4.2 NOP-Regulation unter Lipopolysaccharid

LPS wirkt ausgeprägt pro-inflammatorisch und sein Zusatz zu einer ex vivo Blutkultur stellt ein anerkanntes Modell zur Nachahmung einer Infektion durch bakterielles Endotoxin dar. Interessanterweise lässt sich in dieser Studie eine erniedrigte NOP Expression nach LPS-Gabe in den Gruppen G und I-N in der Vollblutkultur beobachten. Im Gegensatz dazu reagierte das Blut der Nichtüberlebenden der Gruppe I-S fast gar nicht auf die Ko-Inkubation mit LPS. Dieses deckt sich mit der von Tamadl et al. (2003) erwähnten reduzierten Immunantwort bei Patienten mit schwerer Sepsis. Andere Autoren berichteten von LPS als potenter Induktor für Nociceptin in sensorischen Neuronen der Hinterhornneuronen der Maus (Acosta und Davies, 2008). Jedoch wurden, verglichen mit der vorliegenden Studie, erheblich höhere LPS-Dosen verwendet und NOP wurde nicht gemessen. Abweichende Ergebnisse der mRNA-Level, nach Stimulation der Immunantwort mit einem bakteriellen Superantigen SEA (bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin A), publizierten Goldfarb et al. (2006). Während der Gehalt von NOP und Nociceptin mRNA nach der Gabe von SEA in der Milz von Mäusen signifikant reduziert wurde, ließ sich ein gegensätzlicher Trend im Thymus beobachten. Ursächlich dafür könnte die unterschiedliche Beanspruchung des NOP Systems in den verschiedenen Organen oder eine veränderte Lymphozytenverteilung sein. Zhao et al. (2002) berichteten über eine inhibierte NOP mRNA Transkription nach einem operativen Trauma im Sinne eines schweren Stress-Modells bei Ratten im zerebralen Kortex, Hippocampus und Hypothalamus. Es wurde dabei jedoch keine Messung der NOP mRNA im peripheren Blut durchgeführt. Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Daten über NOP vorwiegend aus Tierexperimenten gewonnen wurden und nicht einheitlich und sogar oft widersprüchlich sind. Dieser Umstand erschwert die Interpretation der Erkenntnisse der vorliegenden Studie.

4.3 Inflammation bei terminal erkrankten Patienten

Sowohl PCT als auch CRP sind beides infektionsassoziierte Serummarker. Jedoch können sie auch durch nicht infektiöse Auslöser einer systemischen Inflammation und

bei Patienten mit eingeschränkter Organfunktion erhöht sein. Während CRP schon bei Organdysfunktionen und Sepsis milden Ausmaßes erhöht ist und während schwereren Stadien der Erkrankung nicht weiter ansteigt, ist PCT ein sehr guter Indikator für die Schwere und den Verlauf einer systemischen Infektion bzw. Sepsis. PCT ist auch erhöht bei Patienten in hohen Kategorien des SOFA-Scores (Castelli et al., 2004; Chiesa et al., 1998). Der SOFA Score (Sepsis-related Organ Failure Assessment) ist ein von Experten der European Society for Intensive Care Medicine (ESICM) festgelegter Konsens zur objektiven Beschreibung der Organ(-dys)funktion, die nicht nur bei einer Sepsis vorkommen kann. Grundlage der täglichen Erhebung (24-Stunden-Zeiträume) sind die jeweils schlechtesten Werte des jeweiligen Organsystems.

Inflammatorische Geschehen finden sich auch häufig bei Patienten mit malignen Erkrankungen. Dies kann verschiedene bakterielle, virale und fungale Ursachen haben und ist in über 50% der Fälle der Grund für Fieber während einer Tumorerkrankung (Penel et al., 2004). Der Anteil von paraneoplastischem Fieber infolge von induzierter proinflammatorischer Zytokinfreisetzung wurde auf ca. 25% geschätzt, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung und bei Lebermetastasen (Penel et al., 2004). Andere Arbeitsgruppen beschreiben ausgedehnte, solide Organtumore oder fortgeschrittene Lymphome mit einem hohen Tumorzellumsatz und spontanem Tumorzerfall, die zu einer systemischen Inflammation führen (Schuttrumpf et al., 2006). Zudem spielen Zytokine nicht nur im Immunsystem, sondern auch bei Schmerzerkrankungen eine große Rolle. Verschiedene Studien assoziierten erhöhte Zytokine oder auch ein Inbalance zwischen pro- und antiinflammatorischen Zytokinen mit Schmerzen, z.B. im Rahmen einer Fibromyalgie, eines chronisch regionalen Schmerzsyndroms, einer postherpetischen Neuralgie, einer Polyneuropathie und im Rahmen von Rückenschmerzen infolge eines Bandscheibenvorfalles (Anderberg et al., 1998; Üceyler und Sommer, 2008). Lediglich ein Tumorpatient der vorliegenden Studie litt an einer diagnostizierten begleitenden Infektion, die mit Antibiotika behandelt wurde. Größtenteils wurde bei den Patienten der Gruppe T mit erhöhten Entzündungsparametern auf Grund der palliativen Situation und fehlender therapeutischer Konsequenz auf eine spezielle Diagnostik zur Fokussuche verzichtet.

Die vielen, z.T. voneinander abweichenden bisher publizierten Ergebnisse zum Nociceptinrezeptor spiegeln die Komplexität des NOP Systems wider. Mogil und Pasternak (2001) erklärten diese Tatsache damit, dass das Nociceptinverhalten vermutlich von sehr vielen, weitgehend noch unbekanntem Faktoren abhängt. Die erhöhte NOP Expression bei terminal erkrankten Patienten unterstreicht die Bedeutung dieser Signal- und Reaktionskette bei eingeschränkter Immunfunktion. Ob einzig und allein eine ausgeprägte Inflammation, ein Ungleichgewicht der Zytokine, eine Apoptose oder eine sich zunehmend verschlechternde Organfunktion der Schlüssel für Veränderungen im NOP System sind, kann aus den vorliegenden Daten nicht geschlossen werden. Die physiologische und pathophysiologische Rolle des menschlichen NOP Systems bleibt in zukünftigen Studien zu untersuchen.

Die Ergebnisse dieser Studie unterstreichen die Bedeutung von inflammatorischen Prozessen bei chronischen Schmerzzuständen und erweitern die Erkenntnisse über klinisch relevante physiologische und pathophysiologische Prozesse im Zusammenhang mit dem NOP/Nociceptinsystem. Ein möglicher Einsatz von NOP-Liganden wird zwar diskutiert (Lambert 2008), zuvor sind jedoch weitere Studien zur Regulation des Nociceptinrezeptors und seines endogenen Liganden notwendig, um die Physiologie und Pathophysiologie des Nociceptinsystems aufzuzeigen.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Studie untersucht die NOP mRNA Expression in peripheren Blutzellen von Patienten mit einer fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankung im Vergleich zu gesunden Probanden und kritisch kranken Intensivpatienten.

Blutproben von gesunden Probanden (Gruppe G, n=39), von intensivpflichtigen Patienten (Gruppe I, n= 28) mit und ohne nachgewiesener Sepsis und von Patienten mit einer fortgeschrittenen malignen Tumorerkrankung (Gruppe T, n=88) wurden untersucht. Zusätzlich wurden von gesunden Probanden und Intensivpatienten Vollblutkulturen mit und ohne LPS-Zusatz bis zu 24 Stunden angelegt. Die NOP-Rezeptor mRNA wurde quantitativ per Echtzeit PCR bestimmt und zwischen den Untersuchungsgruppen verglichen. Zusätzlich wurden die inflammatorischen Marker PCT, IL-6 und CRP bestimmt.

NOP wurde im Blut aller Probanden konstitutiv expremiert. Die Patienten der Gruppe T zeigten die höchste NOP-Expression (10,2 (7,4/17,8), $p < 0,001$) im Vergleich zu den Patienten der Gruppe G (4,3 (2,8/7,1) und I (7,8 (4,1/10,1). Septische Patienten zeigten eine höhere NOP Expression als kritisch kranke Intensivpatienten ohne Sepsis (6,6 (4,2/9,5) vs. 4,6 (3,8/11,2). Differenziert man die Intensivpatienten mit Sepsis nach Überlebenszeit, so wiesen Patienten, die innerhalb von 10 Tagen verstarben eine höhere NOP-Expression (9,9(9,0/11,9), $p = 0,02$) auf als diejenigen, die 10 Tage überlebten. Die Tumorpatienten zeigten vergleichbar hohe inflammatorische Marker wie kritisch kranke septische Intensivpatienten (I-S), darunter vor allem diejenigen, die innerhalb von 10 Tagen verstarben.

Eine Inkubation des Vollbluts über 24 Stunden ohne Zusatz von LPS änderte die mRNA Quantität nicht, hingegen sank diese dosis- und zeitabhängig unter LPS-Inkubation. Die NOP-Expression der Gruppe G sank von den oben genannten Nativwerten auf 1,0 (0,6/4,7) und die der Gruppe I-N auf 1,5 (0,8/2,1). Diese verminderte Expression von NOP ließ sich in der Gruppe I-S nicht beobachten. Eine Korrelation der NOP Expression zur Schmerzstärke und dem Bedarf an Analgetika konnte bei den Tumorpatienten nicht nachgewiesen werden.

Eine erhöhte Expression von NOP im Rahmen von inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen ist nicht nur in den Neuronen der Hinterwurzel (Chen et al., 2006), sondern auch bei systemischer Inflammation sowie bei fortgeschrittenen

Malignomen auf peripheren Blutzellen nachweisbar. Die erhöhte NOP-Expression bei septischen Patienten und Tumorpatienten, vor allem bei denjenigen im Endstadium ihrer jeweiligen Erkrankung, sowie die fehlende „Herabregulation“ durch LPS bei Sepsispatienten bestätigen Vorbefunde, dass das NOP/Nociceptin-System im Rahmen einer kompromittierten Immunfunktion von zentraler Bedeutung ist.

6 Anhang

Organdysfunktion	Schweregrad			
	1	2	3	4
Punkte				
Respiratorische Insuffizienz PaO ₂ /FiO ₂ [mmHg]	< 400	< 300	< 200	< 100
Leberdysfunktion Bilirubin [µmol/l]	20-32	33-101	102-204	>204
Störungen der Gerinnung Thrombozytenzahl [Thrombo x 10 ³ /mm ³]	<150	<100	<50	<20
Kreislaufinsuffizienz Blutdruck [mmHg]	MAP < 70	Dopamin ≤ 5 µg/kg/min oder Dobutamin	Dopamin > 5 µg/kg/min od. Adrenalin ≤ 0,1 µg/kg/min od. Noradrenalin ≤ 0,1 µg/kg/min	Dopamin > 15 µg/kg/min od. Adrenalin > 0,1 µg/kg/min od. Noradrenalin > 0,1 µg/kg/min
Störungen des ZNS Glasgow Coma Scale	13-14	10-12	6-9	<6
Niereninsuffizienz Serumkreatinin [µmol/l] Urinproduktion [ml/Tag]	100-170	171-299	300-440 oder <500	> 440 oder < 200

MAP: mittlerer arterieller Blutdruck

Tabelle 8: SOFA Score (Sepsis-related Organ Failure Assessment)

Antwortverhalten/Reaktion	Score
Augenöffnen	
Spontan	4
Auf Aufforderung	3
Auf Schmerzreiz	2
Kein Augenöffnen	1
Beste sprachliche Antwort	
Voll orientiert, prompt	5
Verwirrt, desorientiert	4
Verworren, unangemessen	3
Unverständliche Laute	2
Keine	1
Beste motorische Reaktion	
Adäquat auf Aufforderung	6
Gezielte Abwehr auf Schmerzreiz	5
Ungezielte Abwehr, Massenbewegungen	4
Beugesynergismen auf Schmerzreiz (Rigidität)	3
Strecksynergismen auf Schmerzreiz (Rigidität)	2
Keine Bewegung	1
Summe	

Tabelle 9: Glasgow Coma Scale

GCS-Wert	Schweregrad
GCS Punkte 3–8 (bewusstlos)	Schweres Schädelhirntrauma (SHT)/Schwere Bewusstseinsstörung oder Koma
GCS Punkte 9–12	Mittelschweres SHT/ Mittelschwere Bewusstseinsstörung
GCS Punkte 13–15	Leichtes SHT/Leichte Bewusstseinsstörung

Tabelle 10: Einteilung der Schweregrade in Abhängigkeit vom GCS-Wert

7 **Abbildungsverzeichnis**

	Seite
Abbildung 1: Pleiotrope Effekte von Nociceptin in den verschiedenen Organsystemen	12
Abbildung 2: Schemazeichnung eines LightCyclers	21
Abbildung 3: NOP-Expression im nativen Vollblut aller Patientengruppen	29
Abbildung 4: NOP-Expression im nativen Vollblut von Sepsispatienten nach Überlebenszeit	31
Abbildung 5a: Gelelektrophorese der NOP mRNA Expression und eines internen Standards (humanes β 2-Mikroglobulin) in peripheren Blutzellen eines Individuums differenziert nach Inkubationszeit und LPS-Dosis	32
Abbildung 5b: Hybridisierung der PCR-produkte (NOP) mit einer spezifischen DIG gelabelten Sonde	32
Abbildung 6: NOP mRNA Expression im Vollblut von gesunden Probanden unter verschiedenen LPS-Dosen und Zeitintervallen	33
Abbildung 7: NOP-Expression in peripheren Blutzellen nach LPS Inkubation	34

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Volumina an Buffer RLT für verschiedene Ausgangsmengen von Blut/Leukozyten	19
Tabelle 2: Primer Sequenzen für NOP und humaner Hypoxanthine Phospho-ribosyl Transferase (HPRT)	22
Tabelle 3: Karzinomursprung und jeweilige Anzahl der Patienten der Gruppe T	27
Tabelle 4: Demographische Daten und Laborergebnisse der Gruppen T, I, und G	28
Tabelle 5: NOP Expression bei Tumorpatienten mit unterschiedlichen Schmerzscores bei stationärer Aufnahme	30
Tabelle 6: Vergleich der NOP Expression bei jüngeren und älteren Patienten der Gruppe T (Tumorpatienten) und Gruppe I (Intensivpatienten)	30
Tabelle 7: Demographische und klinische Daten sowie Laborparameter der Tumorpatienten (Gruppe T) unterteilt nach Überlebenszeit	35
Tabelle 8: <i>SOFA</i> Score (Sepsis-related Organ Failure Assessment)	44
Tabelle 9: Glasgow Coma Scale	45
Tabelle 10: Einteilung der Schweregrade in Abhängigkeit vom GCS-Wert	45

9 Literaturverzeichnis

Acosta C, Davies A. Bacterial lipopolysaccharide regulates nociceptin expression in sensory neurons. *J Neurosci Res* 2008; 86: 1077-1086

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1992; 20: 864-874

Anderberg UM, Liu Z, Berglund L, Nyberg F. Plasma levels on nociceptin in female fibromyalgia syndrome patients. *Z Rheumatol* 1998; 57: 77-80

Anton B, Fein J, To T, Li X, Siberstein L, Evans CJ. Immunohistochemical localization of ORL-1 in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol* 1996; 368: 229-251

Bigoni R, Giuliani S, Calo G, Rizzi A, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D, Maggi CA. Characterization of nociceptin receptors in the periphery: in vitro and in vivo studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1999; 359:160–167

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest* 1992; 101: 1481-1483

Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK. Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Letters* 1994; 347: 284-288

Burmeister MA, Ansonoff MA, Pintar JE, Kapusta DR. Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ)-evoked bradycardia, hypotension and diuresis are absent in N/OFQ peptide (NOP) receptor knockout (NOP^{-/-}) mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 326: 897-904

Calo G, Rizzi A, Bogoni G, Neugebauer V, Salvadori S, Guerrini R, Bianchi C, Regoli D. The mouse vas deferens: a pharmacological preparation sensitive to nociceptin. *Eur.J.Pharmacol* 1996; 311: R3-R5

Calo G, Guerrini R, Bigoni R, Rizzi A, Marzola G, Okawa H, Bianchi C, Lambert DG, Salvadori S, Regoli D. Characterization of [Nphe1]nociceptin(1–13)NH₂, a new selective nociceptin receptor antagonist. *Br. J. Pharmacol* 2002; 129: 1183–1193

Castelli GP, Pognani C, Meisner M, Stuani A, Bellomi D, Sgarbi L. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction. *Crit Care* 2004; 8: 234-242

Champion HC, Czaplá MA, Kadowitz PJ. Nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, decreases cardiac output and total peripheral resistance in the rat. *Peptides* 1997; 18: 729-732

Champion HC, Pierce RL, Kadowitz PJ. Nociceptin, a novel endogenous ligand for the ORL1 receptor, dilates isolated resistance arteries from the rat. *Regul Pept* 1998; 78: 69-74

Chen Y, Sommer C. Nociceptin and its receptor in rat dorsal root ganglion neurons in neuropathic and inflammatory pain models: implications on pain processing. *J Peripher Nerv Syst.* 2006;11: 232-240

Chiesa C, Panero A, Rossi N, Stegagno M, De Giusti M, Osborn JF, Pacifico L. Reliability of procalcitonin concentrations for the diagnosis of sepsis in critically ill neonates. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 664-672

Ciccocioppo R, Panocka I, Polidori C, Regoli D, Massi M. Effect of nociceptin on alcohol intake in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 1999; 141: 220–224

Ciccocioppo R, Polidori C, Antonelli L, Salvadori S, Guerrini R, Massi M. Pharmacological characterization of the nociceptin receptor which mediates reduction of alcohol drinking in rats. *Peptides* 2002; 23: 117–125

Depner UB, Reinscheid RK, Takeshima H, Brune K, Zeilhofer HU. Normal sensitivity to acute pain, but increased inflammatory hyperalgesia in mice lacking the nociceptin precursor polypeptide or the nociceptin receptor. *Eur J Neurosci* 2003; 17: 2381-2387

Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004; 32: 858–873

Fiset ME, Gilbert C, Poubelle PE, Pouliot M. Human neutrophils as a source of nociceptin: a novel link between pain and inflammation. *Biochemistry.* 2003; 42:10498-10505

Fukuda K, Kato S, Mori K. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Letters* 1994; 343: 42-46

Gavioli EC, Calo G. Antidepressant- and anxiolytic-like effects of nociceptin/orphanin FQ receptor ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2006; 372: 319–330

Gavioli EC, Rae GA, Calo G, Guerrini R, De Lima TC. Central injections of nocistatin or its C-terminal hexapeptide exert anxiogenic-like effect on behaviour of mice in the plus-maze test. *Br. J. Pharmacol.* 2002; 136: 764–772

Ghillani PP, Motte P, Troalen F, Julienne A, Gardet P, Le Chevalier T, Rougier P, Schlumberger M, Bohuon C, Bellet D. Identification and measurement of calcitonin precursors in serum of patients with malignant diseases. *Cancer Res* 1989; 49: 6845-6851

Goldfarb Y, Reinscheid RK, Kusnecov AW. Orphanin FQ/nociceptin interactions with the immune system in vivo: Gene expression changes in lymphoid organs and regulation of the cytokine response to staphylococcal enterotoxin A. *J Neuroimmunol* 2006; 176: 76–85

Gu H, Hu D, Hong XR, Mao J, Cui Y, Hui N, Sha JY. Changes and significance of orphanin and serotonin in patients with postpartum depression. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi* 2003; 38: 727–728

Gutierrez R, Leff P, Romo-Parra H, Acevedo R, Anton B. Orphanin-FQ/nociceptin inhibits kindling epileptogenesis and enhances hippocampal feed-forward inhibition. *Neurosciences* 2001; 105: 325-333

Horvath A, Folhoffer A, Lakatos PL, Halosz J, Illyes G, Schaff Z, Hantos MB, Tekes K, Szalay F. Rising plasma nociceptin level during development of HCC: a case report. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 152-154

Jenck F, Wichmann J, Dautzenberg FM, Moreau JL, Ouagazzal AM, Martin JR, Lundstrom K, Cesura AM, Poli SM, Roever S, Kolczewski S, Adam G, Kilpatrick G. A synthetic agonist at the orphanin FQ/nociceptin receptor ORL1: anxiolytic profile in the rat. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97: 4938-4943

Jenck F, Moreau JL, Martin JR, Kilpatrick GJ, Reinscheid RK, Monsma FJ Jr, Nothacker HP, Civelli O. Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1997; 94: 14854–14858

Kapusta DR, Chang JK, Kenigs VA. Central administration of [Phe¹psi(CH₂-NH)Gly²]nociceptin(1–13)-NH₂ and orphanin FQ/nociceptin (OFQ/N) produce similar cardiovascular and renal responses in conscious rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1999; 289: 173–180

Kapusta DR, Burmeister MA, Calo G, Guerrini R, Gottlieb HB, Kenigs VA. Functional selectivity of nociceptin/orphanin FQ peptide receptor partial agonists on cardiovascular and renal function. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005; 314: 643–651

Kato S, Tsuzuki Y, Hokari R, Okada Y, Miyazaki J, Matsuzaki K, Iwai A, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Suzuki H, Nabeshima T, Miura S. Role of nociceptin/orphanin FQ (Noc/oFQ) in murine experimental colitis. *J Neuroimmunol* 2005; 161: 21-28

Kimura T, Kitaichi K, Hiramatsu K, Yoshida M, Ito Y, Kume H, Yamaki K, Suzuki R, Takagi K. Intradermal application of nociceptin increases vascular permeability in rats: the possible involvement of histamine release from mast cells. *Eur J Pharmacol* 2000; 407: 327-332

Ko MH, Kim YH, Woo RS, Kim KW. Quantitative analysis of nociceptin in blood of patients with acute and chronic pain. *Neuroreport* 2002; 13: 1631-1633

Krüger C, Köthe L, Struppert A, Pietruck C, Simm A, Grond S. Expression und Funktion des ORL-1-Rezeptors auf humanen Leukozyten, *Schmerz.* 2006; 20: 509-518

Kuzmin A, Kreek MJ, Bakalkin G, Liljequist S. The nociceptin/orphanin FQ receptor agonist Ro 64-6198 reduces alcohol self-administration and prevents relapse-like alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology* 2007; 32: 902-910

Lambert DG. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 2008; 7: 694-710

Lazzeri M, Spinelli M. The challenge of overactive bladder therapie: alternative to antimuscarinic agents. *Int.Braz.J.Urol.* 2006; 32: 620-630

Malinowska B, Godlewski G, Schlicker E. Function of nociceptin and opioid OP4 receptors in the regulation of the cardiovascular system. *J. Physiol. Pharmacol.* 2002; 53: 301–324

Meissner M. Procalcitonin (PCT)- A new, innovative infection parameter. Biochemical and clinical aspects. Stuttgart - New York: Thieme, 2000

Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monserrat B, Mazarguil H, Vassart G, Parmentier M, Costentin J. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995; 377: 532–535

Mogil JS, Pasternak GW. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol Rev* 2001; 53: 381-415

Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 1995; 377: 532-533

Mollereau C, Parmentier M, Milleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput C, Vassart B, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Letters* 1994; 341: 33-38

Monteillet C, Agius G, Fein J, Anton B, Evans CJ. ORL-1 and mu opioid receptor antisera label different fibers in areas involved in pain processing. *J Comp Neurol* 1998; 399: 373-383

Morgenthaler NG, Struck J, Fischer-Schulz C, Bergmann A. Sensitive immunoluminometric assay for the detection of procalcitonin. *Clin Chem* 2002a; 48: 788-790

Morgenthaler NG, Struck J, Fischer-Schulz C, Seidel-Müller E, Beier W, Bergmann A. Detection of Procalcitonin (PCT) in healthy controls and patients with local infection by a sensitive ILMA. *Clin Lab* 2002b; 48: 263-270

Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson SJ Jr. Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.*1999; 406: 503-547

Nothacker HP, Reinscheid RK, Mansour A. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 8677-8682

Osinski M, Brown DR. Orphanin FQ/nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function? *Petides* 2000; 21: 999-1005

Peluso J, LaForge KS, Matthes HW, Kreek MJ, Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C. Distribution of nociceptin / orphanin FQ receptor transcripts in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol* 1998; 81: 184-192

Peluso J, Gavériaux-Ruff C, Matthes HW, Filliol D, Kieffer BI. Orphanin FQ/nociceptin binds to functionally coupled ORL1 receptors on human immune cell lines and alters peripheral blood mononuclear cell proliferation. *Brain Res Bull* 2001; 54: 655-660

Penel N, Fournier C, Clisant S, N'Guyen M. Causes of fever and value of C-reactive protein and procalcitonin in differentiating infections from paraneoplastic fever. *Support Care Cancer* 2004; 12 : 593-598

Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 1995; 270: 792-794

Rittner HL, Brack A, Stein C. Pain and the immune system. *Br J Anaesth* 2008; 101: 40-44

Schuttrumpf S, Binder L, Hagemann T, Berkovic D, Trumper L, Binder C. Utility of procalcitonin concentration in the evaluation of patients with malignant diseases and elevated C-reactive protein plasma concentrations. *Clin Infect Dis* 2006; 43 : 468-473

Serhan CN, Fierro IM, Chiang N, Pouliot M. Cutting edge: nociceptin stimulates neutrophil chemotaxis and recruitment: inhibition by aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A4. *J Immunol* 2001; 166: 3650-3654

Tamandl D, Bahrami M, Wessner B, Weigel G, Ploder M, Fürst W, Roth E, Boltz-Nitulescu G, Spittler A. Modulation of toll-like receptor 4 expression on human monocytes by tumor necrosis factor and interleukin-6: tumor necrosis factor evokes lipopolysaccharide hyporesponsiveness, whereas interleukin-6 enhances lipopolysaccharide activity. *Shock* 2003; 20: 224-229

Taylor F, Dickenson A. Nociceptin / orphanin FQ. A new opioid, a new analgesic? *Neuroreport* 1998, 9: R65-R70

Uçeyler N, Sommer C. Cytokine regulation and pain : Results of experimental and clinical research. *Schmerz* 2008; 22: 652-64

Varty GB, Hyde LA, Hodgson RA, Lu SX, McCool MF, Kazdoba TM, Del Vecchio RA, Guthrie DH, Pond AJ, Grzelak ME, Xu X, Korfmacher WA, Tulshian D, Parker EM, Higgins GA. Characterization of the nociceptin receptor (ORL-1) agonist, Ro64-6198, in tests of anxiety across multiple species. *Psychopharmacology (Berl.)* 2005; 182: 132–143

von Lilienfeld-Toal M, Schneider A, Orlopp K, Hahn-Ast C, Glasmacher A, Stüber F. Change of procalcitonin predicts clinical outcome of febrile episodes in patients with hematological malignancies. *Support Care Cance.* 2006; 14: 1241-1245

Waits PS, Purcell WM, Fulford AJ, McLeod JD. Nociceptin/orphanin FQ modulates human T cell function in vitro. *J Neuroimmunol.* 2004; 149: 110-120

Wick MJ, Minnerath SR, Roy S, Ramakrisham S, Loh HH. Expression of alternate forms of brain opioid 'orphan' receptors mRNA in activated human peripheral blood lymphocytes and lymphocytic cell lines. *Molecular Brain Res* 1995; 32: 342-347

Wichmann J, Adam G, Rover S, Hennig M, Scalo'ne M, Cesura AM, Dautzenberg FM, Jenck F. 8-acenaphthen-1-yl-1-phenyl-1,3,8-triaza-spiro[4.5]decan-4-one derivatives as orphanin FQ receptor agonists. *Bioorg. Med. Chem.* 1999; 9: 2343–2348

Williams JP, Thompsen JP, Young SP, Gold SJ, McDonald J, Rowbotham DJ, Lambert DG. Nociceptin and urotensin-II concentrations in critically ill patients with sepsis. *Br. J. Anaesth.* 2008; 100: 810–814

Williams JP, Jonathan P, Thompson JP, McDonald J, Barnes TA, Cote T, Rowbotham DJ, Lambert DG. Human peripheral blood mononuclear cells express nociceptin / orphanin FQ, but not m, d, or k opioid receptors. *Anesth. Analg.* 2007; 105: 998–1005

Zeilhofer HU, Calò G. Nociceptin/orphanin FQ and its receptor--potential targets for pain therapy? *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 423-429

10 Danksagung

Vielen Dank meiner Doktormutter Frau Professor Dr. med. Stamer für die Vergabe des interessanten Themas, die kompetente fachliche Betreuung und vor allem für ihre ständige Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit.

Ferner danke ich Sabine Mehring und Makbule Kolibay für ihre wertvolle Arbeit im Labor und unermüdliche Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Außerdem ein großes Dankeschön an meine Freunde für ihre Aufbauarbeit und teilweise sogar für ihren körperlichen Einsatz, als gesunde Probanden.

Besonderer Dank gilt meinem Freund Jan Norta für das zeitintensive Korrekturlesen, die anregende Kritik und die stete Geduld und Hilfsbereitschaft.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern für ihren nicht zu ersetzenden Anteil an meiner Ausbildung, sie haben durch ihre immerwährende liebevolle Förderung und Unterstützung zum Gelingen und Fertigstellen der Arbeit beigetragen.