

**Opioidrezeptor-vermittelte Hemmung
der Monoaminfreisetzung in der
Meerschweinchenretina und im Nagerkortex**

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

Sabrina Judel
aus Bonn

2013

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Schlicker
2. Gutachter: Prof. Dr. B. Weber

Tag der Mündlichen Prüfung: 19.09.2013

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Rheinischen Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn

Direktor : Prof. Dr. Alexander Pfeiffer

Denen, die immer an mich glauben

Meinen Großeltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung.....	8
1.2 Die Opioidrezeptorfamilie.....	9
1.2.1 Nomenklatorisches.....	9
1.2.2 Die Opioidrezeptoren.....	9
1.2.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	10
1.2.4 Vorkommen und Funktion der verschiedenen Subtypen.....	11
1.2.4.1 Der μ -Rezeptor.....	12
1.2.4.2 Der δ -Rezeptor.....	12
1.2.4.3 Der κ -Rezeptor.....	13
1.2.4.4 Der NOP-Rezeptor.....	14
1.3 Endogene Liganden.....	15
1.4 Zielsetzung dieser Arbeit.....	18

2. Methoden und Statistik

2.1 Superfusionsversuche.....	19
2.2 Berechnungen und Statistik.....	20
2.2.1 Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung.....	20
2.2.2 Berechnung der Wirkstärke von Pharmaka.....	21
2.2.3 Statistik.....	22
2.3 Verwendete Substanzen.....	23

2.4	<i>Verwendete Geräte und Materialien</i>	25
2.5	<i>Verwendung der tritiummarkierten Transmitter</i>	26

3. Ergebnisse

3.1	<i>Allgemeines</i>	27
3.2	<i>Opioidrezeptorsubtypen in der Retina</i>	31
3.3	<i>Opioidrezeptorsubtypen im Nagerkortex</i>	33
3.4	<i>μ-Opioid-Rezeptor im Nagerkortex: nähere Charakterisierung</i>	35
3.5	<i>μ-Opioid-Rezeptor im Nagerkortex: Wirkung von Cannabinoid-Rezeptor-Liganden</i>	40
3.6	<i>NOP-Rezeptor im Nagerkortex: nähere Charakterisierung</i>	43
3.7	<i>δ-Opioid-Rezeptor am Samenleiter der Maus</i>	45

4. Diskussion

4.1	<i>Allgemeines</i>	47
4.1.1	<i>Wahl der Reizbedingungen</i>	48
4.1.2	<i>Verwendung von Hilfspharmaka</i>	49
4.1.3	<i>Geschlecht der Versuchstiere</i>	49
4.2	<i>Opioidrezeptorsubtypen in der Retina</i>	49
4.3	<i>Opioidrezeptorsubtypen im Nagerkortex</i>	50
4.4	<i>μ-Opioid-Rezeptor im Nagerkortex: Wirkung von Morphin</i>	51
4.5	<i>μ-Opioid-Rezeptor im Nagerkortex: Wirkung von Cannabinoid-Rezeptor-Liganden</i>	53

4.5.1 SR141716.....	54
4.5.2 Cannabidiol.....	55
4.6 NOP-Rezeptor im Nagerkortex.....	56
5. Zusammenfassung.....	58
6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	60
7. Literaturverzeichnis.....	62
8. Danksagung.....	70
9. Lebenslauf.....	71

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Einführung

Bereits in prähistorischen Kulturen von vor 12000 Jahren finden sich Spuren des Gebrauchs von psychotropen Pflanzenextrakten als Rausch- und Genussmittel sowie als Bestandteil von Gift- und Heiltränken. Erste Hinweise auf die Kultivierung des Schlafmohns (*Papaver somniferum*) liefern archäologische Funde von Mohnsamen- und kapseln aus steinzeitlichen Pfahlbauten am Ufer des Bodensees in der Schweiz. 6000 Jahre alte Schrifftafeln der Sumerer beschreiben das Prozedere zur Gewinnung des Mohnsaftes: durch Anritzen der Kapsel tritt die Mohnmilch aus, trocknet ein und wird am nächsten Tag durch Abschaben gewonnen. Die Sumerer nannten den Schlafmohn die *Pflanze der Freuden*. Über Ägypten gelangte das Wissen über die Droge und deren Zubereitung nach Griechenland, wo die Mohnmilch auch ihren heute bei uns gebräuchlichen Namen Opium (von altgriechisch ὀπός, Saft) erhielt. Auch im Mittelalter fanden Auszüge des Schlafmohns Anwendung; so erfand Paracelsus seine Wunderarznei *Laudanum*, deren tatsächlicher Opiumgehalt jedoch bis heute ungeklärt ist (Schmidbauer und vom Scheidt, 2004). Bis Anfang des 19. Jahrhunderts war jedoch völlig unbekannt, welche Inhaltsstoffe die wohlgeschätzte Wirkung des Opiums ausmachen.

In der Trockenmasse des Opiums im Rohzustand sind ca. 25 Alkaloide enthalten, darunter in geringen Anteilen Papaverin, Thebain, Narcotin, Codein und Noscapin. Mit ca. 12 % Gesamtanteil stellt jedoch das 1806 vom Paderborner Apotheker Friedrich Wilhelm Adam Sertürner erstmals isolierte und charakterisierte Morphin das Hauptalkaloid des Opiums dar (Sertürner, 1806). Seinen Namen erhielt es 1817 von Sertürner in Anlehnung an Morpheus, den griechischen Gott des Schlafes.

Heute spielen vom Morphin abgeleitete Substanzen wie Fentanyl, Sufentanil, Remifentanil, Oxycodon und viele andere eine wichtige Rolle in der modernen Medizin. Als Substanzen mit hohem analgetischem Potential finden sie vor allem Anwendung in der intraoperativen

Ausschaltung des Schmerzempfindens sowie in der adäquaten Therapie postoperativer und chronischer Schmerzzustände einschließlich des Tumorschmerzes. Auch in der Substitutionstherapie heroinabhängiger Patienten haben einige der mittlerweile synthetisch hergestellten Substanzen, wie Buprenorphin oder Methadon, ihren Platz gefunden.

1.2 Die Opioidrezeptorfamilie

1.2.1 Nomenklatorisches

Im Jahr 1996 wurde durch die NC-IUPHAR (International Union of Basic and Clinical Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification) eine neue Nomenklatur für die Opioidrezeptoren vorgeschlagen. Demnach wird eine Benennung der Rezeptorsubtypen μ , δ , κ , als OP_3 , OP_1 und OP_2 empfohlen. Allerdings konnte sich dieses System in der Forschergemeinde gegenüber der geläufigen Nomenklatur mit griechischen Buchstaben bis dato nicht vollends durchsetzen und wurde revidiert, so dass an dieser Stelle die Benennung der Subtypen in der bisher vertrauten Nomenklatur erfolgt. Eine Sonderstellung nimmt der zuletzt entdeckte und den Opioidrezeptoren zugeordnete Nociceptin/Orphanin FQ-Rezeptor ein. Nach anfänglichen Zuordnungsschwierigkeiten und unterschiedlicher Namensgebung findet nach offizieller Empfehlung der NC-IUPHAR (Foord et al., 2005) in dieser Arbeit die Bezeichnung NOP-Rezeptor Verwendung.

1.2.2 Die Opioidrezeptoren

Lange wurde über den Wirkmechanismus des Morphins und seiner Derivate spekuliert, bis 1973 drei Forschergruppen unabhängig voneinander spezifische Bindungstellen für Morphin im Hirn von Säugern nachweisen konnten (Pert und Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973).

Dass es mehr als einen Opioidrezeptor bzw. verschiedene Interaktionsmöglichkeiten für Liganden an diesem gibt, vermutete Philip S. Portoghese aufgrund von Strukturanalysen (Portoghese, 1965), bevor es schließlich gelang, die Existenz von zunächst zwei verschiedenen Opioidrezeptoren aufzudecken (Martin et al., 1976). Die entdeckten Rezeptortypen wurden aufgrund ihrer hohen Affinität für Morphin μ bzw. κ -Rezeptor (hohe Affinität für Ketocyclazocin, ein Benzomorphan-derivat) genannt. Pharmakologische Untersuchungen am Ileum des Meerschweinchens sowie am Vas deferens der Maus führten zur Entdeckung des dritten Opioidrezeptors, genannt δ (für *deferens*) (Lord et al., 1977). Die Suche nach weiteren verwandten Rezeptoren führte zur Charakterisierung des zunächst als ORL1 (Mollereau et al., 1994) bzw. LC132 (Bunzow et al., 1994) benannten Rezeptors mit signifikanter Sequenzhomologie zu den bereits bekannten Typen.

Durch Klonierungs-Experimente gelang der molekularbiologische Nachweis der Rezeptoren im Säugetier (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992; Minami et al., 1993; Wang et al., 1993). Inzwischen gelang auch die Klonierung menschlicher Opioidrezeptoren sowie die Lokalisierung der zugehörigen Gene auf chromosomaler Ebene (Befort et al., 1994; Wang et al., 1994; Yasuda et al., 1994). Durch diese Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Opioidrezeptoren sieben Transmembrandomänen besitzen und zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählen.

1.2.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Struktur der Opioidrezeptoren entspricht dem einheitlichen Bausystem der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Der N-Terminus der Aminosäurekette liegt im Extrazellulärraum, während der C-Terminus intrazellulär lokalisiert ist. Die ca. 400 Aminosäuren lange Peptidkette durchspannt die Zellmembran siebenmal (Evans et al., 1992), wodurch außer den beiden N- und C-terminalen Sequenzen und den sieben transmembranären Domänen drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen entstehen (Abbildung 1). G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren (GPCR) lassen sich nach phylogenetischen Gesichtspunkten in mehrere Klassen unterteilen, wobei die

Opioidrezeptoren der Klasse 1, für die prototypisch der Rhodopsin-Rezeptor gilt, zuzurechnen sind (Foord et al., 2005). Die Opioidrezeptor-Subtypen zeigen in ihrer Aminosäuresequenz eine hohe Strukturhomologie, unterscheiden sich allerdings in der Sequenz des N- und C-Terminus, sowie weiterer Bereiche, woraus man schließt, dass eben diese Abweichung für die Bindungscharakteristik der Subtypen für verschiedene spezifische Liganden verantwortlich ist (Kong et al., 1994). Grundsätzlich treten alle Opioide über den N-Terminus mit dem Rezeptor in Verbindung und inhibieren G-Protein-vermittelt die Bildung von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) durch Hemmung der Adenylatcyclase. Desweiteren kommt es zur Inaktivierung von Calciumkanälen sowie zur Aktivierung von Kaliumkanälen.

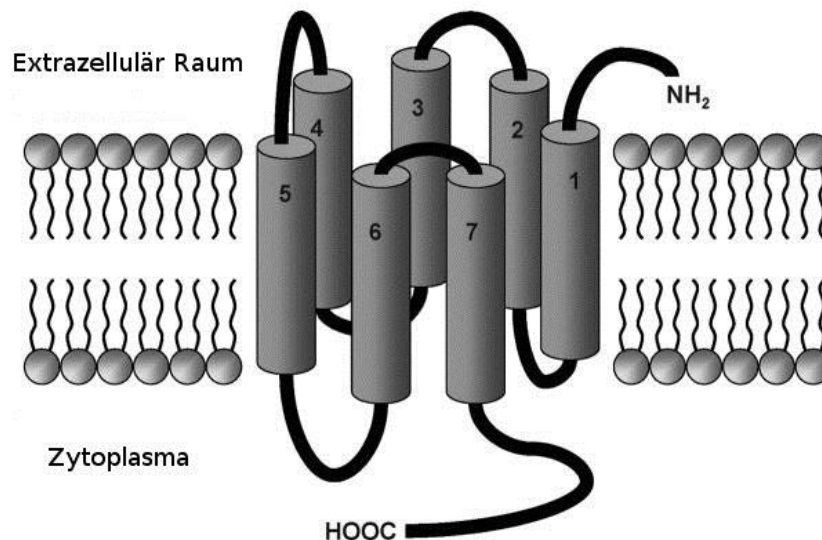


Abb. 1: Exemplarische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit sieben Transmembrandomänen (modifiziert nach Tikhonova und Constanzi, 2009)

1.2.4 Vorkommen und Funktion der verschiedenen Subtypen

Die Opioidrezeptorsubtypen sind in unterschiedlicher Verteilung im Zentralnervensystem (ZNS) sowie im peripheren Gewebe lokalisiert. Die Rezeptordichte der Subtypen variiert stark in den unterschiedlichen Gewebearten.

1.2.4.1 Der μ -Rezeptor

Der μ -Rezeptor ist quantitativ der am meisten exprimierte der drei Opioidrezeptorsubtypen. Die höchste Dichte findet sich in Strukturen des Vorder-, Mittel- und Hinterhirns. Insbesondere in Amygdala, Hippocampus, Thalamus, Nucleus accumbens, der Pars compacta der Substantia nigra (Mansour et al., 1987) sowie in den Raphekernen und dem periaquäduktalen Grau (Hawkins et al., 1988) konnte der μ -Rezeptor in hoher Dichte gefunden werden. Mit Hilfe immunzytochemischer Verfahren konnte eine hohe Dichte auch im Bulbus olfactorius (Schulz et al., 1998; Thompson et al., 1993) sowie in den oberflächlichen Schichten des Hinterhorns des Rückenmarks (Besse et al., 1991; Cheng et al., 1997) gesichert werden. Im Kleinhirn fetaler, neugeborener und erwachsener Ratten konnten Mrkusich et al. (2004) insbesondere in den Purkinje-Zellen eine Expression von μ -Rezeptor mRNA detektieren.

Neben der Verbreitung im ZNS lassen sich noch eine Vielzahl peripherer Gewebe benennen, in denen eine Rezeptorexpression beobachtet werden kann, so im Gastrointestinaltrakt (Bagnol et al., 1997), in der Cochlea (Jongkomonwiwat et al., 2003), in dermalen und epidermalen Nervenfasern der Haut (Ständer et al., 2002) sowie in CD 4⁺-Immunzellen (Chuang et al., 1995). Die weite Verbreitung des Rezeptors in unterschiedlichen peripheren Geweben und zentralen Arealen legt den Schluss nahe, dass der μ -Rezeptor eine Rolle bei vielen physiologischen Prozessen spielt. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die funktionelle Bedeutung des Rezeptors.

1.2.4.2 Der δ -Rezeptor

Im Gegensatz zum μ -Rezeptor konnte für den δ -Rezeptor nur eine diskrete Expression im Zentralnervensystem gefunden werden. Es ist ein ausgeprägter Gradient von hoher Dichte in Vorderhirnregionen zu relativ niedriger Dichte in den Regionen des Hinterhirns zu verzeichnen. Die höchsten Konzentrationen konnten im Bulbus olfactorius, im Putamen, im Nucleus accumbens sowie in der Amygdala bei Untersuchungen am Mäusehirn gefunden werden (Goody et al., 2002). Ähnlich dem μ -Rezeptor findet sich eine hohe Rezeptorexpression auch in den

Laminae I und II des Hinterhorns, über welche die analgetischen Effekte der entsprechenden Rezeptoragonisten vermittelt werden (Besse et al., 1991). Vergleichende in vitro Untersuchungen am Hirn von Ratten und Menschen konnten eine nahezu gleiche Verteilung des δ -Rezeptors für beide Spezies im ZNS nachweisen (Blackburn et al., 1988).

Auch außerhalb des ZNS ließ sich das Vorkommen des δ -Subtyps sichern. Unlängst gelang der Nachweis in der Haut (Salemi et al., 2005), im Innenohr der Ratte (Jongkamonwiwat et al., 2003) sowie in Immunzellen (Gavériaux et al., 1995). Im Mausmodell konnte eine erhöhte Expression des Rezeptors bei gastrointestinaler Inflammation beobachtet werden (Pol et al., 2003). Die Funktion des δ -Rezeptors bei verschiedenen physiologischen Prozessen ist weniger gut belegt als beim μ -Subtyp. Es wird jedoch angenommen, dass er eine Rolle in der gastrointestinalen und kardiovaskulären Regulation sowie in der Regulation von Stimmung und Verhalten spielt (Reinscheid et al., 1995) (siehe auch Tabelle 1).

1.2.4.3 Der κ -Rezeptor

κ -Rezeptoren sind hauptsächlich im zerebralen Kortex, Nucleus accumbens, Claustrum und Hypothalamus verbreitet (Kitchen et al., 1997). Im Gegensatz zum μ - bzw. δ - Subtyp spielen κ -Rezeptoren im Hinterhorn des Rückenmarks nur eine untergeordnete Rolle (Besse et al., 1991), scheinen jedoch gemeinsam mit den δ -Rezeptoren eine Rolle bei Inflamationsprozessen zu spielen (Pol et al., 2003). Weitere Bedeutung wird dem κ -Rezeptor insbesondere für die Regulation neuroendokriner Prozesse, der Diurese und dem Schmerzempfinden zugeschrieben (Dhawan et al., 1996) (Tabelle 1).

1.2.4.4 Der NOP-Rezeptor

Der NOP-Rezeptor, welcher als bisher Letzter der Klasse der Opioidrezeptoren zugeordnet wurde, zeigt eine breitgefächerte Verteilung innerhalb des Zentralnervensystems. Insbesondere in Kortex, Ncl. suprachiasmaticus, Amygdala, Hippocampus sowie in Kernregionen des Thalamus fand sich eine starke Rezeptorexpression (Clarke et al., 2002). Funktionelle Bedeutung wird dem NOP-Rezeptor u.a. in der Regulation von Stress- und Angstreaktionen zugeschrieben (Tabelle 1). Dabei konnten durch verhaltensexperimentelle Studien an Ratten, denen Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ), also der endogene Ligand dieses Rezeptors, intracerebroventriculär appliziert wurde, sowohl Hinweise für eine anxiolytische (Jenck et al., 2000) als auch anxiogene (Fernandez et al., 2004) Komponente gefunden werden. Ferner löst die Gabe von Nociceptin/Orphanin FQ bei Ratten eine kardiovaskuläre Depression mit Bradykardie und Hypotension, sowie eine gesteigerte Diurese aus (Kapusta et al., 2005). In zwei unterschiedlichen Studien konnte sowohl eine durch NOP-Agonisten induzierte Inhibition der Opiat-Analgesie und Hyperalgesie (Mogil et al., 1996) als auch ein dosisabhängig gegenläufiger Effekt beobachtet werden (Inoue et al., 1999). Die Frage nach einer NOP-Rezeptor gebundenen Hyperalgesie bedarf weiterer Untersuchungen.

Durch in vivo und in vitro Studien am Nager zeigte sich eine NOP-Rezeptor vermittelte Inhibition der Glutamat- (Nicol et al., 1996), Dopamin- (Murphy et al., 1996), Acetylcholin- (Itoh et al., 1999), Serotonin- (Marti et al., 2003) und Noradrenalinfreisetzung (Schlicker et al., 1998a). Das NOP-Rezeptor-System scheint daher eine entscheidende Rolle bei der synaptischen Transmission im Zentralnervensystem zu spielen.

Rezeptorsubtyp	Funktion
μ	<i>Analgesie Atemdepression Euphorie Gastrointestinale Regulation Immunregulation Neuroendokrine Sekretion</i>
δ	<i>Analgesie Diurese Dysphorie Neuroendokrine Sekretion Thermoregulation Sedation</i>
κ	<i>Analgesie Immunregulation Gastrointestinale Regulation</i>
NOP	<i>Anxiogenese Anxiolyse Kardiovaskuläre Depression Diurese Spinale Analgesie Supraspinale Hyperalgesie</i>

Tab. 1: Übersicht über die Funktion der einzelnen Opioidrezeptorsubtypen

1.3 Endogene Liganden

Mit der Entdeckung der Opioidrezeptoren stand nun die Frage nach endogenen Liganden im Raume. Es erschien unwahrscheinlich, dass der Körper die Rezeptoren lediglich zur Bindung exogener Substanzen bereithält. Durch Hughes et al. (1975) konnte erstmals das Vorkommen

endogener Opioidliganden belegt werden. Es handelt sich um zwei strukturverwandte Pentapeptide mit der Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/ Leu. Sie wurden Met- bzw. Leu-Enkephalin genannt.

Dieser Entdeckung folgte die Identifizierung von mehr als 20 weiteren endogenen Opioidliganden, die N-terminal alle über die oben erwähnte Aminosäuresequenz verfügen. Unterschiede bestehen in der Länge der Aminosäureketten, die von 5-31 Aminosäuren reichen kann. Die präferentielle Wirkung einiger endogener Liganden in Bezug auf die jeweiligen Rezeptorsubtypen sowie eine Auswahl exogener Liganden sind in Tabelle 2 dargestellt.

Alle endogenen Opioidliganden leiten sich von Opioidprecursor-Molekülen ab, welche als Pro-Opiomelanocortin (POMC), Pro-Enkephalin und Pro-Dynorphin bezeichnet werden. Durch posttranslationale Prozessierung kann aus POMC das melanozytenstimulierende Hormon (MSH), das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) sowie β -Endorphin gebildet werden. Die beiden Enkephaline werden aus Pro-Enkephalin gebildet; Pro-Dynorphin dient als Vorläufermolekül für Dynorphin A und B (Nakanishi et al., 1979).

Als endogener Ligand des Nociceptin/Orphanin FQ-Rezeptors gilt das 1995 von zwei unabhängigen Forschergruppen identifizierte Heptadekapeptid Nociceptin (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995). Nociceptin bindet mit hoher Affinität an den NOP-Rezeptor, zeigt jedoch trotz der hohen Sequenzhomologie zwischen dem NOP-Rezeptor und den klassischen Opioidrezeptoren keinen Effekt an Letzteren und lässt sich durch Naloxon, das einen stark antagonistischen Effekt an den drei klassischen Opioidrezeptoren entfaltet, nicht antagonisieren. Nociceptin, das eine gewisse Ähnlichkeit bezüglich der Aminosäuresequenz mit Dynorphin A besitzt, wird aus Prepronociceptin (PPNOC) abgespalten. Das PPNOC-Gen konnte sowohl aus Nager-, als auch menschlicher DNA isoliert werden und ähnelt in der genetischen Zusammensetzung stark den Genen für die Vorläufermoleküle der endogenen Liganden der klassischen Opioidrezeptoren (Preproenkephalin, Preprodynorphin, Preproopiomelanocortin) (Mollereau et al., 1996).

Rezeptorsubtyp	Endogene Liganden	Exogene Liganden	
		Agonisten	Antagonisten
μ	<i>β-Endorphin</i> <i>Endomorphin-1</i> <i>Endomorphin-2</i>	<i>DAMGO</i> <i>Fentanyl</i> <i>Morphin</i> <i>Sufentanil</i>	<i>CTAP</i>
δ	<i>Leu-Enkephalin</i> <i>Met-Enkephalin</i>	<i>DPDPE</i> <i>DSBULET</i> <i>SNC 80</i>	<i>Naltrindol</i> <i>Naltriben</i>
κ	<i>Big-Dynorphin</i> <i>Dynorphin A</i>	<i>CI977</i> <i>Salvinorin A</i> <i>U-69,593</i>	<i>Nor-binaltorphimin</i> <i>GNTI</i>
NOP	<i>Nociceptin</i> (anderer Name: <i>Orphanin F/Q</i>) (<i>N/OFQ</i>)	<i>N/OFQ-(1-13)-NH₂</i> <i>Ro 64-6198</i> <i>UFP102</i>	<i>J-113397</i> <i>JTC-801</i> <i>[Nphe¹]N/OFQ(1-13)NH₂</i> <i>UFP101</i> <i>SB612111</i>

Tab. 2: Endogene und exogene Liganden der Opioidrezeptorsubtypen μ, δ, κ und NOP (modifiziert nach Alexander et al., 2009)

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Identifizierung der Opioidrezeptorsubtypen μ , κ , δ und NOP in unterschiedlichen Gewebearten (Retina, zerebraler Kortex, und Vas deferens) und verschiedenen Tierspezies (Meerschweinchen, Ratte, Maus). Desweiteren soll die Wirkung von Opioidrezeptor-Agonisten- und Antagonisten auf die elektrisch stimulierte Noradrenalinfreisetzung untersucht werden. Ein weiteres Augenmerk liegt auf der Untersuchung der Wirkung von Effektoren des Endocannabinoidsystems am opioidergen System, d.h. ob und in welcher Weise am Cannabinoidsystem wirksame Substanzen einen Effekt über Opioidrezeptoren vermitteln oder die Wirkung von Opioiden über einen synergistischen oder allosterischen Mechanismus zu beeinflussen vermögen.

2. Methoden und Statistik

2.1 Superfusionsversuche

Die Superfusionsversuche wurden an zerebralem Kortexgewebe von NMRI-Mäusen und Wistar-Ratten durchgeführt. Desweiteren wurden Superfusionsversuche an der Retina von Dunkin-Hartley-Meerschweinchen sowie am Samenleiter von NMRI-Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden nach Dekapitation der Tiere vom Gehirn 0,3 mm dicke Lagen präpariert, die durch eine Stanze zu runden Schnitten von 3 mm Durchmesser weiterverarbeitet wurden. Auch von der Retina wurden Schnitte mit einem Durchmesser von 3 mm ausgestanzt. Vom Samenleiter, der eine sehr derbe Konsistenz aufweist, wurden ca. 3 mm große Gewebsschnitte nach dem Augenmaß präpariert. Die Präparate wurden dann 60 Minuten lang mit 25 nmol [³H]-Noradrenalin (spezifische Aktivität 53,0 Ci/mmol) bei 37 °C in physiologischer Kochsalzlösung (PSL; entspricht modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung) inkubiert.

NaCl	118	CaCl ₂	1,3 ¹	Ascorbinsäure	0,06
NaHCO ₃	25	KH ₂ PO ₄	1,2	Na ₂ EDTA ²	0,03
KCl	4,8	MgSO ₄	1,2	Glucose	10

Tab. 3: Zusammensetzung der für die Inkubation und Superfusion verwendeten physiologischen Kochsalzlösung (PSL) in mM (Millimolar); ¹CaCl₂- Konzentration war 3,25 mM in den Versuchen am Vas deferens und manchen Superfusionsversuchen am Kortex der Maus, ²Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz

Die Schnitte wurden für die Dauer der Inkubation und während des gesamten Versuches mit Carbogen (95 % O₂ und 5 % CO₂) begast. Das vorinkubierte Gewebe wurde dann in Superfusionskammern zwischen zwei Platinelektroden überführt; die Superfusion mit PSL erfolgte bei 37 °C mit einem Durchlauf von ca. 1 ml/Minute. Ab der 35. Minute wurden 5-Minuten-Fractionen des Superfusates gesammelt. Zur Bestimmung des Tritiumgehalts der einzelnen Fractionen durch Flüssigkeitsszintillationsmessung (mit dem Zählgerät Beckman LS

6000 TA) wurden den Fraktionen 1,2 Volumeneinheiten Lumagel Safe[®], ein Szintillationsmittel mit großer Wasseraufnahmekapazität, zugefügt. Auch in den Gewebeschnitten selbst wurde nach Versuchsende der Tritiumgehalt mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt. Hierzu wurden die Gewebeproben in je 0,5 ml Soluene aufgelöst und mit einem selbsthergestellten Cocktail (6 mg PPO und 100 µg POPOP in 1 ml Toluol), einem Szintillationsmittel mit geringer Wasseraufnahmekapazität, versetzt.

Die Dauer der Versuche betrug 110 Minuten, wobei die Tritiumabgabe nach der 40. und nach der 90. Minute für jeweils zwei Minuten mit elektrischen Rechteckimpulsen stimuliert wurde: S₁ und S₂. Hierbei wurden folgende Stimulationsparameter gewählt: 0,3 Hz, 50 mA und 2 ms bei Versuchen am Kortexgewebe und 3 Hz, 200 mA und 2 ms bei Versuchen an Retina und Vas deferens. In einer Versuchsreihe am Kortex wurden die Versuche sowohl mit einer Reizfrequenz von 0,3 Hz als auch mit 3 Hz durchgeführt. Die im Versuchsansatz enthaltenen Hilfspharmaka Desipramin (1 µM), Rauwolscin (1 µM), Nomifensin (10 µM), sowie die zu untersuchenden Antagonisten waren während des gesamten Versuchs in der Superfusionslösung enthalten, die Agonisten hingegen wurde dem Medium erst ab der 62. Minute zugefügt.

2.2 Berechnungen und Statistik

2.2.1 Berechnung der basalen und stimulierten Tritiumfreisetzung

Zunächst wurde durch Flüssigkeitsszintillationsmessung der Tritiumgehalt einer jeden 5-Minuten-Fraktion ausgezählt. Die Tritiumabgabe wurde dann als Anteil des Tritiumgehalts in den Schnitten zu Beginn der jeweiligen Sammelperiode berechnet ("Efflux"). Durch Ermittlung der Tritiumabgabe in der Sammelperiode unmittelbar vor dem Pharmakonwechsel (t₁; 55.-60. Minute) und unmittelbar vor dem 2. Reiz (t₂; 85.-90. Minute) konnte der basale Efflux quantifiziert werden, d. h. die ohne Stimulation gemessene Tritiumabgabe. Hierbei wurde als Maß für den Einfluss der Pharmaka auf die Tritiumabgabe t₁ bei Pharmaka, die während des gesamten Experiments anwesend waren, bzw. t₂/ t₁ bei ab der 62. Minute anwesenden Pharmaka bestimmt. Aus der Differenz zwischen der basalen und der totalen Tritiumabgabe während der Stimulation und der folgenden 13 Minuten ergab sich die stimulierte Tritiumfreisetzung, die in

Prozent des zu Beginn der Stimulation in den Schnitten enthaltenen Tritiums angegeben wurde. Hierbei wurde angenommen, dass die basale Tritiumabgabe von der Fraktion vor dem Reiz bis zur Fraktion 15-20 Minuten nach dem Reiz linear abnimmt. Bei Pharmaka, die während der gesamten Superfusionsdauer anwesend waren, wurde zur Quantifizierung einer Pharmakonwirkung auf die stimulierte Tritiumabgabe S_1 ermittelt, während der Quotient S_2/S_1 betrachtet wurde für Pharmaka, die ab der 62. Minute anwesend waren.

2.2.2 Berechnung der Wirkungsstärken von Pharmaka

Als Maß für die Wirkungsstärke eines Agonisten diene der pEC_{50} -Wert. Dieser ist definiert als negativer dekadischer Logarithmus der Agonistenkonzentration, welche die halbmaximale Wirkung hervorruft (EC_{50}). Als Maximaleffekt wurde die Wirkung definiert, die bei der höchsten untersuchten Konzentration beobachtet wurde. Wenn beispielsweise die höchste untersuchte Konzentration eine Hemmung um 80 % bewirkte, dann wurde die EC_{50} auf der Basis des Wertes graphisch ermittelt, der um 40% hemmt. Substanzen, deren Bindung an den Rezeptor nur zu einem reduzierten Maximaleffekt führte, d. h. die weder den reinen Agonisten noch den reinen Antagonisten zugeordnet werden konnten, wurden als Partialagonisten klassifiziert. Ihre intrinsische Aktivität ist definiert als das Verhältnis der am Rezeptor maximal auslösbaren Wirkung zum absoluten Wirkungsmaximum, d. h. der durch einen reinen oder vollen Agonisten desselben Rezeptors maximal auslösbaren Wirkung. Die intrinsische Aktivität kann Werte zwischen 0 und 1 annehmen.

Die Wirkungsstärke eines Antagonisten wurde durch den "scheinbaren" pA_2 -Wert bestimmt (Furchgott, 1972). Der pA_2 -Wert gibt den negativen dekadischen Logarithmus der Antagonistenkonzentration an, die nötig ist, um die Konzentration mit der halbmaximalen Wirkung des Agonisten zu verdoppeln.

$$pA_2 = \log\left(\frac{[E']}{[E]} - 1\right) - \log[B]$$

[E'] EC_{50} in Anwesenheit des Antagonisten

[E] EC_{50} in Abwesenheit des Antagonisten

[B] Konzentration des Antagonisten

2.2.3 Statistik

Bei den Versuchsergebnissen wurde jeweils der Mittelwert \pm SEM (Standardabweichung des Mittelwerts) aus n Experimenten aufgeführt, wobei n die Anzahl der Versuche wiedergibt. Hierbei errechnet sich die SEM aus dem Quotienten der Standardabweichung und der Quadratwurzel der Versuchsanzahl. Die S_1 - und t_1 -Werte ergeben sich aus einem Mittelwert von mehreren Schnitten pro Versuch, die S_2/S_1 - und t_2/t_1 -Werte basieren auf je einem Schnitt pro Experiment. Die Diagramme zeigen die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung, dargestellt als Quotient S_2/S_1 , der in Relation gesetzt wurde zum S_2/S_1 -Wert der Kontrollversuche.

Die Mittelwerte wurden mithilfe des t-Tests für unverbundene Stichproben verglichen. Lagen mehrere Versuchswerte mit identischer Kontrolle vor, wurde die Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

2.3 Verwendete Substanzen

Zur Durchführung der Superfusionsversuche wurden verschiedene Pharmaka genutzt. Eine Übersicht über die verwendeten Substanzen und deren Bezugsquellen gibt Tabelle 4.

-(-)-[Ring-2,5,6-³H-Noradrenalin	NEN, Zaventem, Belgien
Cannabidiol	GW Pharmaceuticals, Ely, England
DAMGO [D-Ala ² ,NMe-Phe ⁴ ,Gly-ol ⁵]encephalin (Formel, s. Abb. 9)	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Desipraminhydrochlorid	Ciba-Geigy, Basel, Schweiz
DPDPE [D-Pen ² ,D-Pen ⁵]- enkephalin	NeoMPS, Straßburg, Frankreich
J-113397 (1-[3R,4R)-1-Cyclooctylmethyl-3-hydroxymethyl-4-piperidyl]-3-ethyl-1,3-dihydro-2H-benzimidazol-2-on)	Banyu, Tsukuba, Japan
Lumagel Safe[®]	Lumac-LSC B.V, Groningen, Niederlande
Morphin (Formel s. Abb. 9)	Merck, Darmstadt, Deutschland
MR-2266 (N-methyl-2-phenyl-N-[(5R,7S,8S)-7-pyrrolidin-1-yl-1-oxaspiro[4.5]decan-8-yl]acetamid	Boehringer, Ingelheim, Deutschland
Naloxonhydrochlorid (Formel, s. Abb. 7)	Sigma, München, Deutschland
Naltrindol	Sigma, München, Deutschland
Nociceptin (Formel s. Abb. 14)	Bachem, Heidelberg, Deutschland
Nomifensin	Hoechst, Frankfurt, Deutschland
NPhe¹-Nociceptin (1-13)	NeoMPS, Straßburg, Frankreich
Rauwolscinhydrochlorid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Soluene[®]	Packard Instrument Company, Meriden, USA
SR141716	Sanofi, Montpellier, Frankreich
Tetrodotoxin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
U69,593	Sigma, München, Deutschland

Tab. 4: Zusammenstellung der für die Superfusionsversuche verwendeten Substanzen und deren Bezugsquellen

Lumagel Safe[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen der Lumac-LSC B.V., P.O. Box 9540, 9703 LM Groningen, Niederlande.

Soluene[®] ist ein eingetragenes Warenzeichen der Packard Instrument Company Inc., One State Street, Meriden, CT 06450, USA

Stammlösungen der Pharmaka wurden mit DMSO (Dimethylsulfoxid) (Cannabidiol, SR 141617), Zitratpuffer (0,1 mM, pH 4,8) (Tetrodotoxin) oder Wasser (restliche Pharmaka) hergestellt und mit physiologischer Salzlösung auf die gewünschte Endkonzentration verdünnt. Der Tritiumefflux wurde durch DMSO und Zitratpuffer nicht beeinflusst.

2.4 Verwendete Geräte und Materialien

Im Rahmen der Superfusionsversuche wurden verschiedene Geräte und Verbrauchsmaterialien benutzt. Tabelle 5 gibt einen Überblick über die verwendeten Geräte und Materialien sowie deren Bezugsquellen.

Analysenwaage Sartorius 2004 MP	Göttingen, Deutschland
Flüssigkeitsszintillationszähler Beckman LS 6000 TA	Fullerton, Californien, USA
Laborwaage Sartorius 1610	Göttingen, Deutschland
Magnetrührer IKA RH 464995	Staufen im Breisgau, Deutschland
Mikroliterpipette Eppendorf Nr. 4780	Hamburg, Deutschland
Mini Poly-Q-Vials Beckman Nr. 592928	München, Deutschland
Pipettenspitze Eppendorf Nr. 0030063.619 und 627	Hamburg, Deutschland
Stimulator Hugo-Sachs 125/T	March-Hugstetten, Deutschland
Superfusionsanlage	Eigenbau der Werkstatt des Pharmakologischen Instituts
Thermostat Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Wasserbad GFL 1003	Burgwedel, Deutschland

Tab. 5: Zusammenstellung der für die Superfusionsversuche verwendeten Geräte und Materialien sowie deren Bezugsquellen

2.5 Verwendung der tritiummarkierten Transmitter

In einigen der im Folgenden beschriebenen Versuchsserien finden Gewebeschnitte aus der Retina des Meerschweinchens Verwendung. Die Besonderheit der Retina des Meerschweinchens liegt darin, dass sie – im Gegensatz zur Netzhaut anderer Säugetierspezies - selbst nicht vaskularisiert ist und keine noradrenergen Neurone besitzt. Frühere Studien haben gezeigt, dass tritiummarkiertes Noradrenalin ebenso wie Dopamin selbst in dopaminerge Zellen (Amakrin-Zellen) aufgenommen und von dort freigesetzt wird (Schlicker, et al.; 1998b). Die Versuchswerte variieren stärker bei Verwendung von tritiummarkiertem Dopamin (Schlicker 1996), so dass in den Versuchsreihen dieser Studie, die an der Retina durchgeführt wurden, der Verwendung von tritiummarkiertem Noradrenalin der Vorzug gegeben wurde. Die anderen in dieser Studie verwendeten Gewebe (zerebraler Kortex und Samenleiter) verfügen über noradrenerge Neurone, in die [³H]-Noradrenalin regulär aufgenommen wird.

3. Ergebnisse

3.1 Allgemeines

Der basale Tritiumefflux wurde - wie bereits im Methodenteil beschrieben - als t_1 bei Pharmaka, die während der gesamten Versuchsdauer anwesend waren, und als t_2/t_1 für Pharmaka, die nach dem Pharmakonwechsel (ab der 62. Minute) der Superfusion zugefügt wurden angegeben. Tabelle 6 zeigt verschiedene t_1 -Werte von Kontrollversuchen (jeweils in Abwesenheit von Antagonisten und Agonisten). Der basale Tritiumefflux während t_1 wurde von den zugegebenen Pharmaka nicht beeinflusst (hier nicht gezeigt).

Die t_2/t_1 -Werte in 9 Kontrollversuchen an der Retina des Meerschweinchens in Anwesenheit von Nomifensin 10 μM lagen bei $0,80 \pm 0,08$. In 11 Versuchen am Rattenkortex in Anwesenheit von Desipramin 1 μM und Rauwolscin 1 μM ergaben sich t_2/t_1 -Werte von $0,84 \pm 0,03$. Ähnliche Werte ergaben sich auch in Versuchen am Mäusekortex und am Samenleiter der Maus. Diese Werte wurden von den untersuchten Pharmaka nicht beeinflusst (nicht gezeigt). Tabelle 7 zeigt die S_1 -Werte jeweils in An- und Abwesenheit der unterschiedlichen Antagonisten; die Antagonisten selbst beeinflussten die stimulierte $^3\text{[H]}$ -Noradrenalinfreisetzung nicht.

	Hilfsmittel (μM ; während der gesamten Versuchsdauer anwesend)				Basale Tritiumabgabe während t_1	Stimulierte Tritiumabgabe	
		Frequenz (Hz)	Versuchsdauer (min)	Stromstärke (mA)	S_1	S_2/S_1	
Kortex (Maus)	Desipramin 1 Rauwolscin 1	0,3	110	50	0,0035 \pm 0,0004	10,84 \pm 0,66	1,10 \pm 0,02
Kortex (Maus)¹	Desipramin 1 Rauwolscin 1	3	110	50	0,0079 \pm 0,0003	37,11 \pm 4,56	0,66 \pm 0,04
Kortex (Ratte)	Desipramin 1 Rauwolscin 1	0,3	110	50	0,0043 \pm 0,0005	6,80 \pm 0,47	1,05 \pm 0,04
Retina (Meerschweinchen)	Nomifensin 10	3	110	200	0,0089 \pm 0,0013	9,39 \pm 1,99	0,92 \pm 0,12
Vas deferens (Maus)	Desipramin 1 Rauwolscin 1	3	110	200	0,0040 \pm 0,0003	2,94 \pm 0,24	1,04 \pm 0,11

¹ Ca²⁺-Konzentration im Superfusionsmedium 3,25 mM statt 1,3 mM

Tab. 6: Basale und stimulierte Tritiumabgabe von ³[H]-Noradrenalin-vorinkubierten Gewebeschnitten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen

Die Schnitte wurden mit ³[H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und unter den oben genannten Versuchsbedingungen superfundiert. t_1 (basale Tritiumabgabe) wurde in der 5-Minuten-Fraktion vor dem Pharmakonwechsel (55.-60. Minute) gemessen. Die Stimulation der Tritiumabgabe erfolgte nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten. S_2/S_1 entspricht dem Quotienten der stimulierten Tritiumabgabe aus S_1 und S_2 . Die Daten basieren auf Kontrollversuchen in Abwesenheit von Agonisten und Antagonisten. Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 3-24 Versuchen. Hz (Hertz); mA (Milliampere); μM (Mikromolar); mM (Millimolar)

Die Quantifizierung der stimulierten Tritiumabgabe erfolgte mittels Bestimmung der S_1 bzw. S_2/S_1 Werte, die Reize S_1 und S_2 wurden nach 40 bzw. 90 Minuten bei 110 Minuten Versuchsdauer appliziert. Entsprechende Werte sind in Tabelle 6 für Kontrollexperimente an verschiedenen Gewebeschnitten zusammengefasst. Die elektrisch stimulierte Tritiumabgabe aus $^3\text{[H]}$ -Noradrenalin-vorinkubierten Retinaschnitten wurde durch Tetrodotoxin (TTX) $1\ \mu\text{M}$ um $96 \pm 1\%$ und durch Calcium-Entzug um $99,95 \pm 0,05\%$ gehemmt (Abbildung 2).

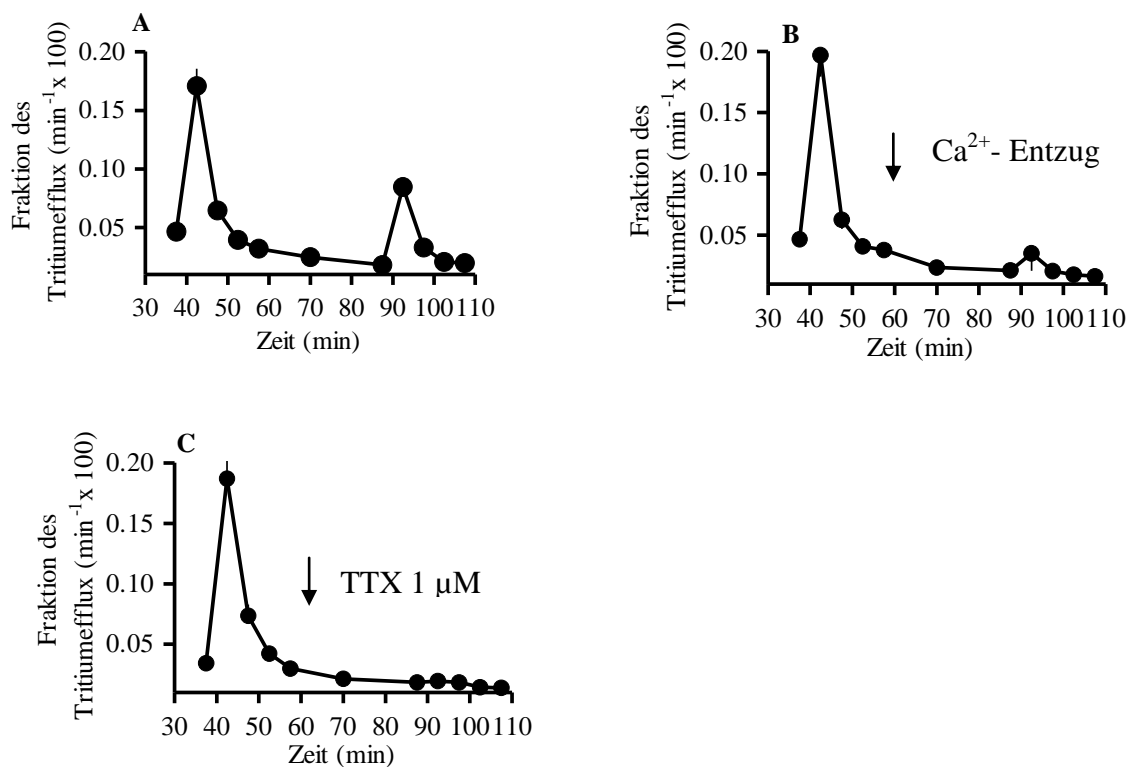


Abb. 2: Einfluss von Tetrodotoxin und Ca^{2+} -Entzug auf den Tritiumefflux

Retinascheiben vom Meerschweinchen wurden in $^3\text{[H]}$ -Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch (3 Hz, 200 mA, 2 ms) nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten. Dem Superfusionsmedium war Nomifensin $10\ \mu\text{M}$ zugegeben. Tetrodotoxin (TTX) $1\ \mu\text{M}$ wurde ab der 62. Minute zugegeben (C). Der Entzug der Ca^{2+} -Ionen erfolgte ebenfalls ab der 62. Minute (B). A zeigt den Kontrollversuch. Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 5-8 Versuchen. Hz (Hertz); mA (Milliampere); μM (Mikromolar)

Opioid-Rezeptor-Subtyp	Gewebe	Antagonist	Konzentration (μM)	n	S_1
μ	<i>Maus Kortex</i>	<i>Naloxon</i>	0	3	$8,26 \pm 1,04$
			0,1	3	$8,01 \pm 0,79$
δ	<i>Maus Vas deferens</i>	<i>Naltrindol</i>	0	5	$2,61 \pm 0,72$
			0,0001	4	$2,80 \pm 0,79$
			0,001	5	$3,89 \pm 0,62$
κ	<i>Meerschweinchen Retina</i>	<i>MR 2266</i>	0	6	$10,00 \pm 1,80$
			0,032	6	$9,07 \pm 1,01$
<i>NOP</i>	<i>Maus Kortex</i>	<i>J-113397</i>	0	6	$10,90 \pm 0,32$
			0,1	6	$11,22 \pm 0,46$
			1	5	$10,38 \pm 0,55$
			0	4	$11,94 \pm 0,52$
		<i>NPhe¹-Nociceptin (1-13)</i>	0,5	4	$13,80 \pm 0,41$

Tab. 7: Einfluss der Opioidrezeptorantagonisten auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung (S_1) aus $^3\text{[H]}$ -Noradrenalin-vorinkubierten Gewebeschnitten; n (Anzahl der Versuche); μM (Mikromolar)

3.2 Opioidrezeptorsubtypen in der Retina

Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss des κ -Opioidrezeptor-Agonisten U-69,593, des μ -Agonisten DAMGO, sowie des δ -Agonisten DPDPE auf die Tritiumfreisetzung aus [^3H]-Noradrenalin vorinkubierten Retinaschnitten untersucht. Die Versuchsdauer betrug 110 Minuten; die Stimulation erfolgte elektrisch mit den Stimulationsparametern: 3 Hz, 200 mA und 2 ms. Dem Superfusionsmedium war von Beginn an und für die gesamte Versuchsdauer Nomifensin 10 μM zugegeben. Der Agonist wurde dem Medium ab der 62. Minute zugeführt.

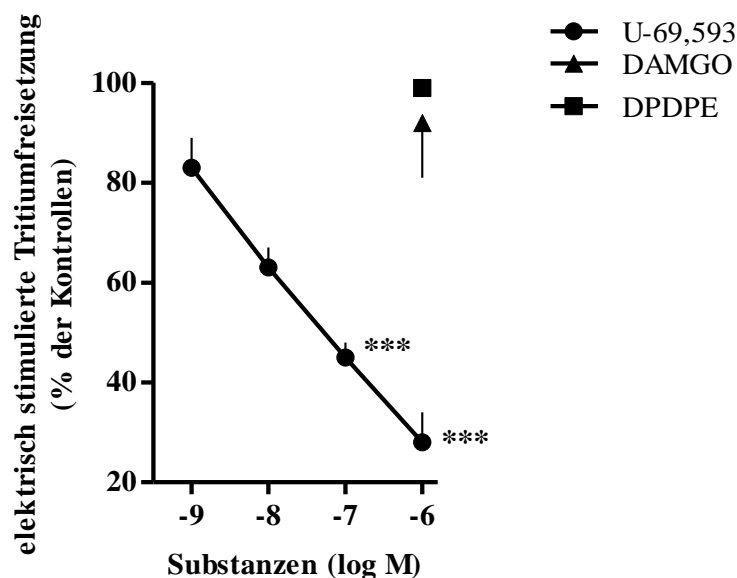


Abb. 3: Wirkung von U-69,593, DAMGO und DPDPE

Retinascheiben von Meerschweinchen wurden in [^3H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 min superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch (3 Hz, 200 mA, 2 ms) nach 40 (S_1) und 90 (S_2) min. Dem Superfusionsmedium war Nomifensin 10 μM für die gesamte Versuchsdauer zugegeben. Die Agonisten (U-69,593, DAMGO, DPDPE) waren ab der 62. min anwesend. Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 5-9 Versuchen. *** $p < 0,001$, verglichen zu der nicht im Bild gezeigten Kontrolle. Hz (Hertz); mA (Milliampere); μM (Mikromolar)

Für den κ -Opioidrezeptoragonisten U-69,593 zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Tritiumfreisetzung auf bis zu $28 \pm 6\%$ der Kontrollen. Eine sehr hohe Konzentration von DAMGO und DPDPE zeigte keinen Einfluss auf die Tritiumfreisetzung (Abbildung 3). In der nächsten Versuchsreihe wurde die Wirkung von U-69,593 und dessen Wechselwirkung mit MR-2266 näher charakterisiert. Der κ -Opioidrezeptor-Antagonist MR-2266 (während der ganzen Versuchsdauer im Medium enthalten) bewirkte eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von U69,593 (siehe Abbildung 4). Der pA_2 -Wert beträgt 7,59. MR-2266 selbst beeinflusste die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung nicht (S_1 ; siehe Tabelle 7).

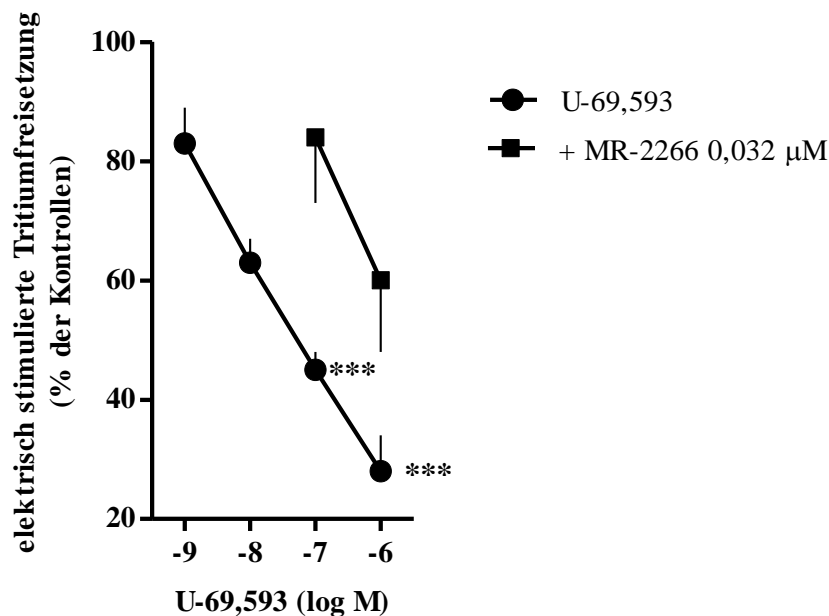


Abb. 4: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von U-69,593 und Wechselwirkung mit MR-2266

Retinascheiben von Meerschweinchen wurden in [^3H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch (3 Hz, 200 mA, 2 ms) nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten. Dem Superfusionsmedium war Nomifensin 10 μM sowie MR-2266 0,032 μM für die gesamte Versuchsdauer zugegeben. U-69,593 wurde dem Medium ab der 62. Minute zugefügt. Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 5-9 Versuchen. *** $p < 0,001$, verglichen zu der im Bild nicht gezeigten U-69,593-freien Kontrolle. Hz (Hertz); mA (Milliampere); μM (Mikromolar)

3.3 Opioidrezeptorsubtypen im Nagerkortex

Analog zur Versuchsreihe an der Meerschweinchenretina erfolgte in dieser Versuchssequenz die Darstellung der Wirkung der drei Opioidrezeptor-Agonisten U-69,593, DAMGO und DPDPE auf die Tritiumfreisetzung im Mäusekortex. Die Stimulation erfolgte elektrisch (0,3 Hz, 50 mA, 2 ms) nach der 40. (S₁) und 90. (S₂) Minute bei 110 Minuten Versuchsdauer. Die Agonisten wurden dem Superfusionsmedium ab der 62. Minute zugesetzt. Während der gesamten Versuchsdauer waren dem Medium zur Hemmung der Wiederaufnahme von Noradrenalin Desipramin 1 µM sowie Rauwolscin 1 µM, als α₂-Adrenozeptor-Antagonist, zugesetzt. Der µ-selektive Agonist DAMGO senkte die Tritiumfreisetzung konzentrationsabhängig auf bis zu 17 ± 1%. Der δ-selektive Agonist DPDPE sowie U-69,593, welches Selektivität am κ-Rezeptor zeigt, beeinflussten die Tritiumfreisetzung in einer hohen Konzentration nicht (Abbildung 5).

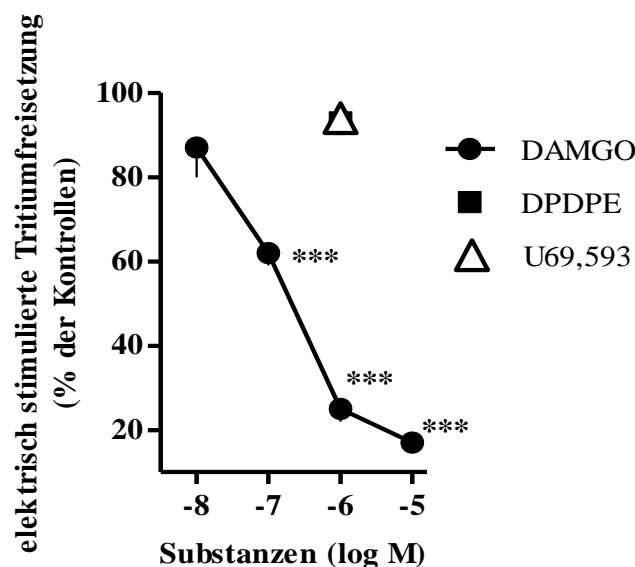


Abb. 5: Wirkung von DAMGO, U-69,593 und DPDPE

Kortexschnitte von der Maus wurden in [³H]-Noradrenalinhaltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch (0,3 Hz, 50 mA, 2 ms) nach 40 (S₁) und 90 (S₂) Minuten. Dem Superfusionsmedium waren Desipramin 1 µM und Rauwolscin 1 µM für die gesamte Versuchsdauer zugegeben. Die Agonisten (U-69,593, DAMGO, DPDPE) waren ab der 62. min anwesend. Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 2-8 Versuchen: *** p<0,001, verglichen zu der im Bild nicht gezeigten Kontrolle. Hz (Hertz); mA (Milliampere); µM (Mikromolar)

In der nächsten Versuchserie wurde die Wirkung des am μ -Rezeptor selektiv wirkenden Peptids DAMGO, sowie seine Wechselwirkung mit dem potenten Opioidrezeptorantagonisten Naloxon am Kortexgewebe der Maus untersucht. Zu diesem Zweck wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt (Abbildung 6); Naloxon war dem Medium während der ganzen Versuchsdauer zugegeben.

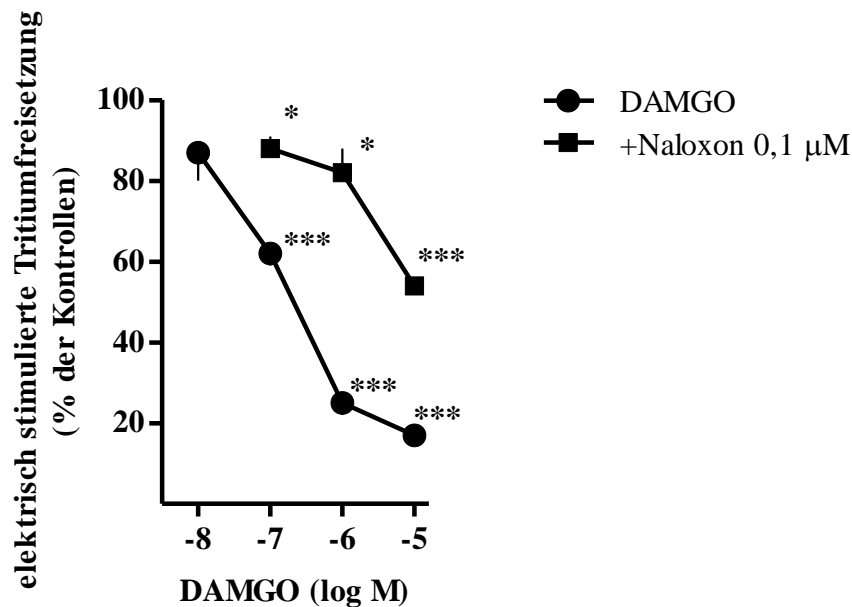


Abb. 6: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DAMGO und Wechselwirkung mit Naloxon

Kortexschnitte von der Maus wurden in [3 H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch (0,3 Hz, 50 mA, 2 ms) nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten. Dem Superfusionsmedium waren Desipramin 1 μ M, Rauwolscin 1 μ M und Naloxon 0,1 μ M für die gesamte Versuchsdauer, DAMGO ab der 62. min zugegeben. Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 3-4 Versuchen. *** $p < 0,001$, * $p < 0,05$, verglichen zu der im Bild nicht gezeigten DAMGO-freien Kontrolle. Hz (Hertz); mA (Milliampere); μ M (Mikromolar)

DAMGO senkte die Tritiumfreisetzung konzentrationsabhängig. Naloxon (Formel, s. Abbildung 7) führte zu einer Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DAMGO.

Der pA_2 -Wert von Naloxon beträgt 8,7. Naloxon selbst hatte keinen Einfluss auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung (S_1 ; siehe Tabelle 7).

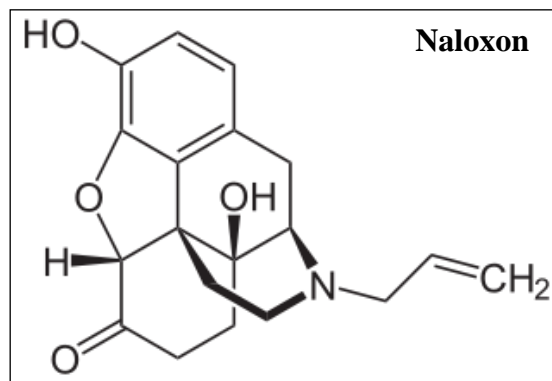


Abb. 7: Strukturformel von Naloxon

3.4 μ -Opioid-Rezeptor im Nagerkortex: nähere Charakterisierung

Der μ -Opioid-Rezeptor wurde in dreifacher Hinsicht näher charakterisiert: a) Vergleich zwischen Maus und Ratte; b) Vergleich zwischen DAMGO und Morphin; c) Vergleich der beiden Agonisten bei verschiedenen Stimulationsbedingungen. Hierfür wurden Kortexschnitte in [3H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte mit 0,3 Hz, 50 mA und 2 ms nach 40 und 90 Minuten (wenn nicht anders angegeben). Desipramin 1 μ M und Rauwolscin 1 μ M waren für die komplette Versuchsdauer anwesend.

Die Auswirkung von DAMGO auf die stimulierte Tritiumfreisetzung im Mäuse- und Rattenkortex wurde in der ersten Versuchssequenz vergleichend untersucht. Abbildung 8 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurven von DAMGO am Mäuse- und Rattenkortex. Sowohl im

Mäuse– als auch im Rattenkortex bewirkte DAMGO konzentrationsabhängig eine Hemmung der stimulierten [^3H]-Noradrenalin- Freisetzung. Im Mäusekortex wurde die Tritiumfreisetzung auf bis zu $20 \pm 1\%$, im Kortexgewebe der Ratte auf bis zu $13 \pm 1\%$ der Kontrolle gesenkt. Der pEC_{50} -Wert (negativer dekadischer Logarithmus des Wertes, der eine Hemmung von 40 % (Maus) bzw. von 42,5 % (Ratte) bewirkt beträgt 7,17 bzw. 7,43.

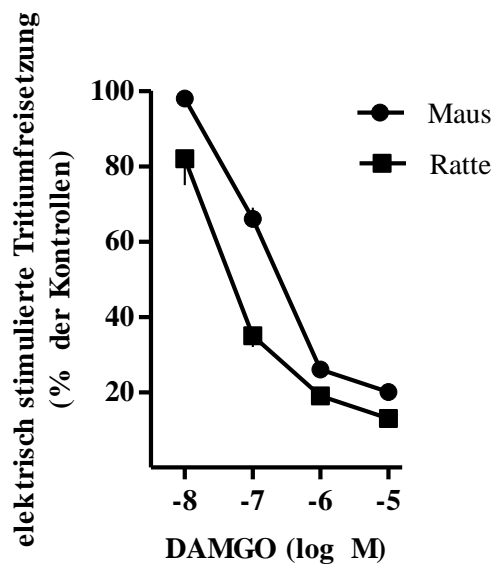


Abb. 8: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DAMGO an Mäuse- und Rattenkortex

Kortexschnitte von Maus und Ratte wurden in [^3H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch (0,3 Hz, 50 mA, 2 ms) nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten. Dem Superfusionsmedium waren Desipramin $1 \mu\text{M}$ und Rauwolscin $1 \mu\text{M}$ für die gesamte Versuchsdauer, DAMGO ab der 62. min zugegeben. Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 3 Versuchen. Für DAMGO 10^{-7}M bis 10^{-5}M waren die Hemmgrade bei der Ratte signifikant stärker ($p < 0,01$) als bei der Maus. Hz (Hertz); mA (Milliampere); μM (Mikromolar)

In der zweiten Versuchsreihe wurden die Effekte von Morphin und DAMGO (Formeln, s. Abb. 9) am Kortexgewebe der Maus verglichen. Morphin zeigte einen konzentrationsabhängigen Hemmeffekt auf die elektrisch evozierte Tritiumfreisetzung im Mäusekortex und senkte die Noradrenalinfreisetzung auf bis zu $67 \pm 6\%$ der Kontrolle. Der pEC_{50} beträgt 6,03. In Versuchen mit Morphin unter Zugabe von Naloxon $0,1 \mu\text{M}$ zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Morphin. Der pA_2 -Wert errechnete sich mit 9,1. Naloxon beeinflusste die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung nicht (S_1 -Wert; Tabelle 7).

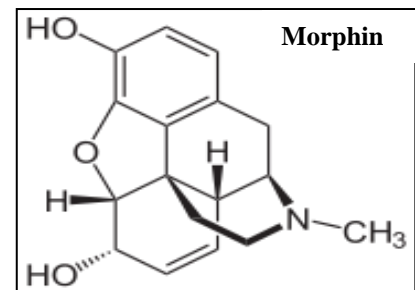
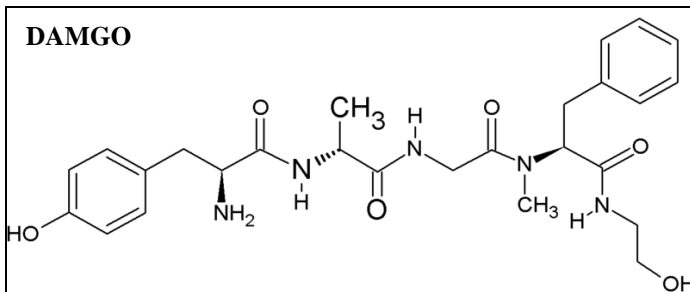


Abb. 9: Strukturformeln von DAMGO und Morphin

Wie schon unter 3.4 berichtet wurde, senkte DAMGO ebenfalls konzentrationsabhängig die stimulierte Freisetzung, jedoch in höherem Maße als Morphin, auf bis zu $20 \pm 1\%$ des Kontrollwertes (Abbildung 10)

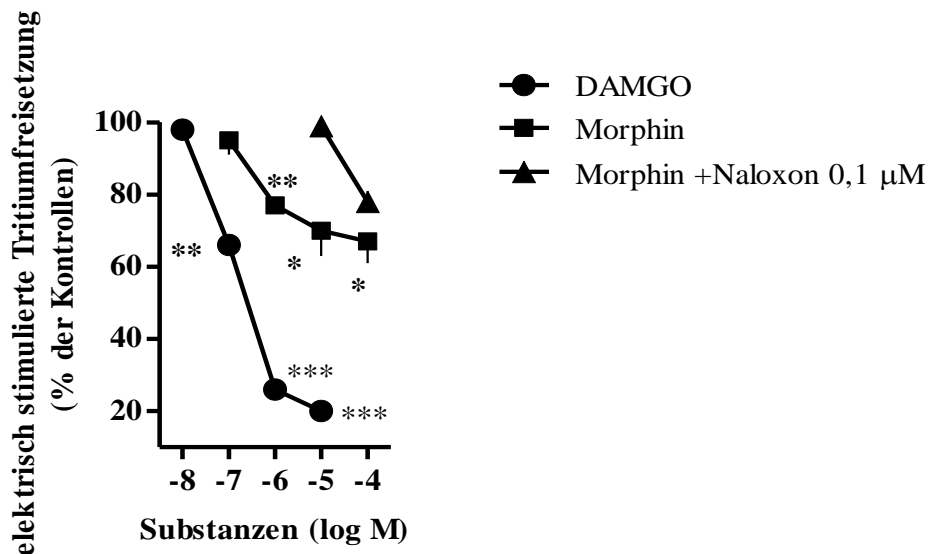


Abb. 10: Konzentrations-Wirkung-Kurven von Morphin und DAMGO bei Stimulation mit 0,3 Hz

Kortexschnitte der Maus wurden in [³H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch (0,3 Hz, 50 mA, 2 ms) nach 40 (S₁) und 90 (S₂) Minuten. Dem Superfusionsmedium waren Desipramin 1 μM und Rauwolscin 1 μM für die gesamte Versuchsdauer zugegeben. Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 3-4 Versuchen. * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001, verglichen zur entsprechenden, nicht im Bild gezeigten DAMGO- bzw. Morphin-freien Kontrolle. Hz (Hertz); mA (Milliampere); μM (Mikromolar)

In der dritten Versuchsserie wurde die Stimulationsfrequenz auf 3 Hz erhöht. Die Stromstärke wurde ebenfalls erhöht (200 mA). Zusätzlich wurde die Calcium-Konzentration im Superfusionsmedium auf 3,25 mM erhöht. Abbildung 11 zeigt den Einfluss von Morphin und DAMGO auf die stimulierte Tritiumfreisetzung bei 3 Hz im Vergleich zur Versuchsreihe mit der Stimulationsfrequenz von 0,3 Hz. DAMGO hemmte die elektrisch stimulierte Freisetzung des Tritiums bei 0,3 Hz signifikant höher als bei 3 Hz (Abbildung 11) Zwar ließ sich für Morphin 100 μM kein signifikanter Unterschied zwischen der Stimulation mit 3 Hz gegenüber der Stimulation

mit 0,3 Hz feststellen, allerdings bestand der Tendenz nach auch hier eine Abschwächung bei der höheren Reizfrequenz.

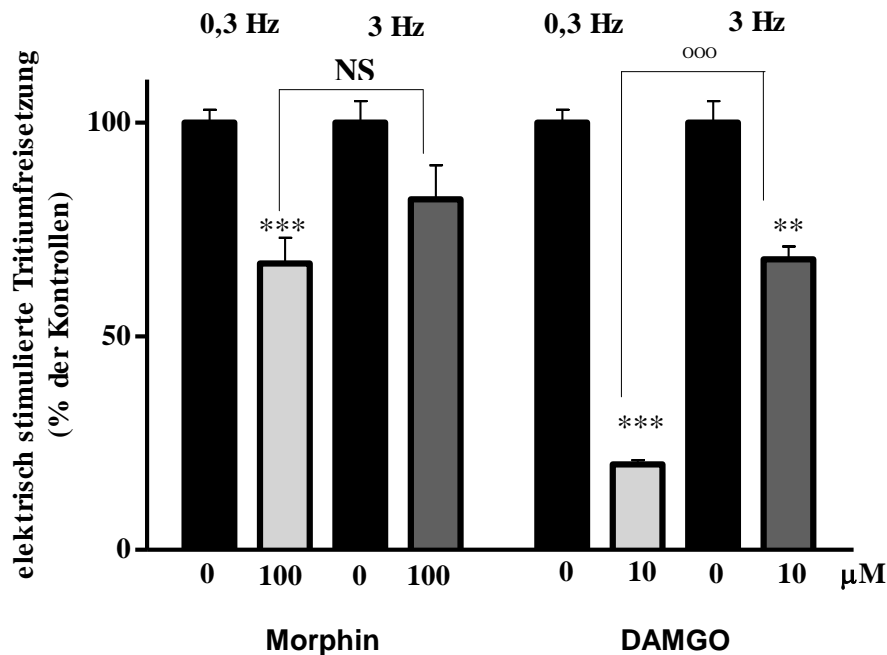


Abb. 11: Einfluss von Morphin und DAMGO auf den stimulierten Tritiumefflux bei 0,3 und 3 Hz

Kortexschnitte der Maus wurden in [³H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte in der ersten Versuchsreihe mit 0,3 Hz, 50 mA, 2 ms und in der zweiten Versuchsreihe mit 3 Hz, 200 mA, 2 ms jeweils nach 40 (S₁) und 90 (S₂) Minuten. Dem Superfusionsmedium waren Desipramin 1 µM und Rauwolscin 1 µM für die gesamte Versuchsdauer zugegeben; bei den Versuchen mit 3 Hz war ferner die Ca²⁺-Konzentration 3,25 mM (statt der üblichen 1,3 mM). Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 3-4 Versuchen. ** p<0,01; *** p<0,001, verglichen zur Morphin- bzw. DAMGO-freien Kontrolle; °°°p<0,001, verglichen zum Werte bei 0,3 Hz; NS (nicht signifikant); Hz (Hertz); mA (Milliampere); µM (Mikromolar); mM (Millimolar)

3.5 μ -Opioid-Rezeptor im Nagerkortex: Wirkung von Cannabinoid-Rezeptor-Liganden

SR141716 (Rimonabant) greift in das körpereigene Cannabinoidsystem (Endocannabinoidsystem) ein und vermittelt seine Wirkung über einen antagonistischen Effekt an Cannabinoid-Rezeptoren des Subtyps CB₁. Das aus der Hanfpflanze gewonnene, schwach psychoaktive Cannabidiol hemmt die Wirkung von Cannabinoiden am CB₂-Rezeptor über einen inversen Agonismus und entfaltet eine antagonistische Wirkung am GPR55-Rezeptor, dessen physiologische Rolle noch nicht endgültig aufgeklärt werden konnte, von einigen Autoren jedoch als dritter Cannabinoid-Rezeptor postuliert wird (Ryberg et al., 2007).

In dieser Versuchsserie sollte geklärt werden, ob die beiden am Endocannabinoidsystem wirksamen Substanzen SR141716 und Cannabidiol eine Wirkung auf die Opioidrezeptor-vermittelte Hemmung der elektrisch evozierten Tritiumfreisetzung besitzen. Zu diesem Zweck wurden Superfusionsversuche am Kortexgewebe der Ratte durchgeführt.

Die präparierten Gewebeschnitten wurden für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch mittels Rechteckimpuls mit einer Frequenz von 0,3 Hz und einer Stromstärke von 50 mA für 2ms nach 40 und 90 Minuten Versuchsdauer. Dem Medium waren Desipramin und Rauwolscin (jeweils 1 μ M) für die gesamte Versuchsdauer zugegeben. Abbildung 12 zeigt die Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DAMGO unter Zugabe von 10 μ M SR141716. Rimonabant 10 μ M zeigte keinen signifikanten Eigeneffekt bezüglich der evozierten Tritiumfreisetzung (S_1 -Wert; Tabelle 7 und S_2/S_1 -Wert; Abb. 12).

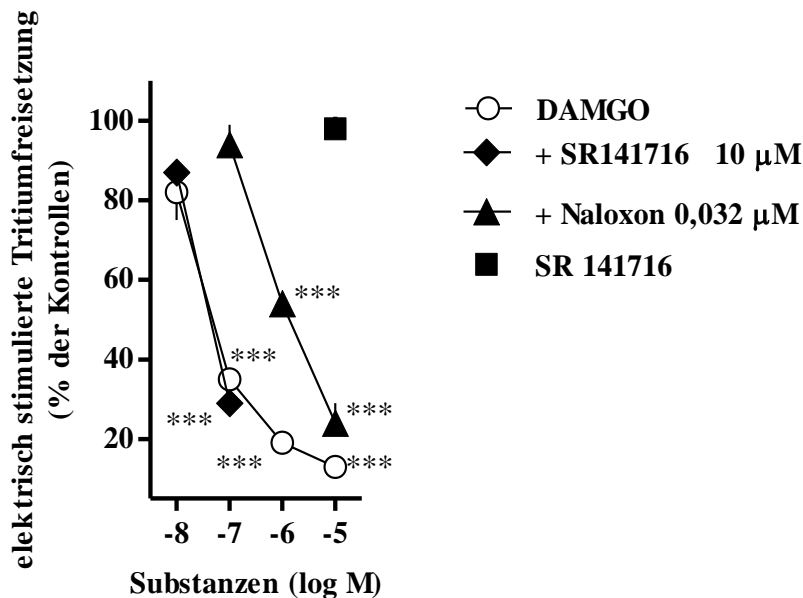


Abb. 12: Konzentrations-Wirkungs-Kurve SR141716

Kortexschnitte der Ratte wurden in [³H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch mit 0,3 Hz, 50 mA, 2 ms nach 40 (S₁) und 90 (S₂) Minuten. Dem Superfusionsmedium waren Desipramin 1 µM und Rauwolscin 1 µM für die gesamte Versuchsdauer zugegeben. Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 3-8 Versuchen. ***p<0,001, verglichen zur entsprechenden, nicht im Bild gezeigten DAMGO-freien Kontrolle. Hz (Hertz); mA (Milliampere); µM (Mikromolar)

Aus den Konzentrations-Wirkungs-Kurven wird ersichtlich, dass - wie bereits in Kapitel 3.3 und 3.4 - beschrieben der µ-Agonist DAMGO eine konzentrationsabhängige Hemmung der elektrisch stimulierten Tritiumfreisetzung bewirkt. Zugabe von Naloxon 0,032 µM (scheinbarer pA₂: 8,87) bewirkt eine Verschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach rechts. Unter Zugabe von SR141716 wird die DAMGO-vermittelte Hemmung der stimulierten Tritiumfreigabe nicht signifikant verändert. Mit der zweiten Versuchsreihe wurde untersucht, ob Cannabidiol neben seiner Wirkung an Cannabinoidrezeptoren auch einen Einfluss am µ-Opioidrezeptor besitzt (Versuchsbedingungen wie in der vorherigen Serie). Es wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für DAMGO alleine sowie für DAMGO unter Zugabe von Cannabidiol 10 µM, unter

Zugabe von Naloxon 0,01 μM und letztlich eine Kurve unter Beifügung beider Substanzen in der jeweiligen oben angegebenen Konzentration erstellt. Erwartungsgemäß senkte DAMGO auch in dieser Versuchsserie die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung gegenüber der Kontrolle. Cannabidiol zeigte keinen Einfluss auf die DAMGO-vermittelte Hemmung der Monoaminfreisetzung. Unter Naloxon-Zugabe verschob sich die Konzentrations-Wirkungs-Kurve nach rechts. Cannabidiol 10 μM beeinflusste auch diesen Effekt nicht.

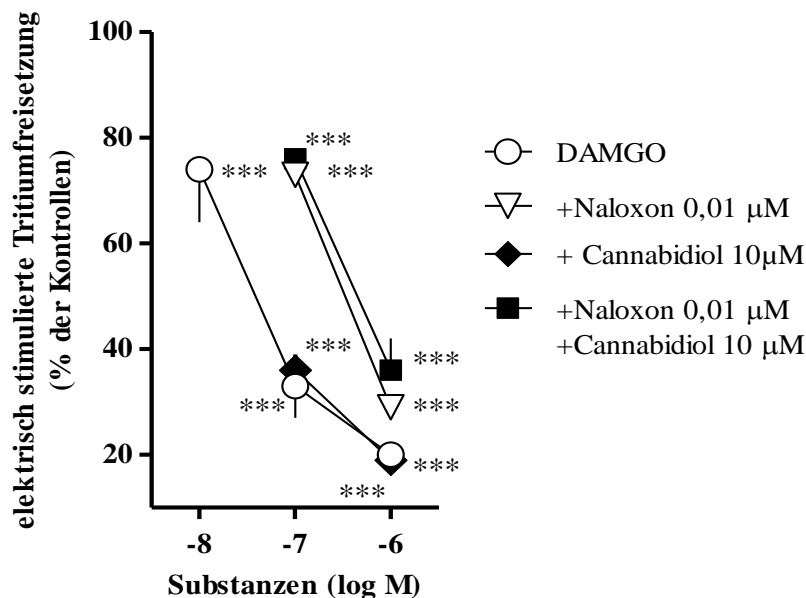


Abb. 13: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Cannabidiol

Kortexschnitte der Ratte wurden in [^3H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch mit 0,3 Hz, 50 mA, 2 ms nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten. Dem Superfusionsmedium waren Desipramin 1 μM und Rauwolscin 1 μM für die gesamte Versuchsdauer zugegeben. Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 3-8 Versuchen. *** $p < 0,001$, verglichen mit der entsprechenden, nicht im Bild gezeigten DAMGO-freien Kontrolle. Hz (Hertz); mA (Milliampere); μM (Mikromolar)

3.6 NOP-Rezeptor im Nagerkortex: nähere Charakterisierung

In zwei Versuchsreihen wurde die Wirkung von Nociceptin (Formel, s. Abb. 14), dem endogenen Liganden des NOP-Rezeptors, auf die stimulierte Tritiumfreisetzung und seine jeweilige Interaktion mit den NOP-Rezeptor-Antagonisten NPhe¹-Nociceptin (1-13) und J-113397 untersucht. Die Versuche wurden jeweils mit einer Stimulationsfrequenz von 0,3 Hz und einer Stromstärke von 50 mA durchgeführt. Die Reizdauer betrug 2 ms. Die Antagonisten waren von Beginn an im Superfusionsmedium enthalten; Nociceptin wurde ab dem Pharmakonwechsel (d.h. ab der 62. Minute) dem Superfusionsmedium zugeführt.

NPhe¹-Nociceptin (1-13) sowie J-113397 hatten in beiden Versuchsreihen keinen signifikanten Eigeneffekt auf die stimulierte Freisetzung von [³H]-Noradrenalin (S₁; Tabelle 7.) Zur Wirkungscharakterisierung wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Kurve für Nociceptin alleine und in Interaktion mit NPhe¹-Nociceptin (1-13) bzw. J-113397 erstellt (Abbildung 15).

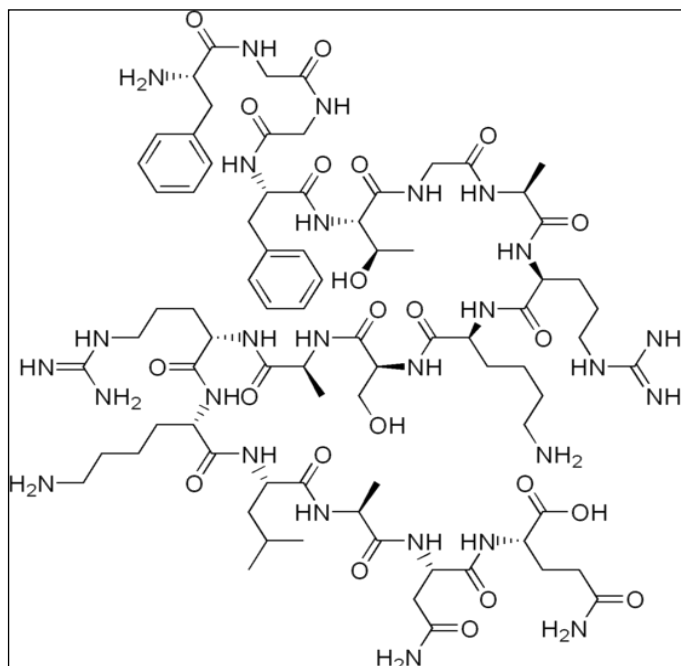


Abb. 14: Strukturformel von Nociceptin (Phe-Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln); Aminosäuresequenz gemäß internationalem Dreibuchstabencode

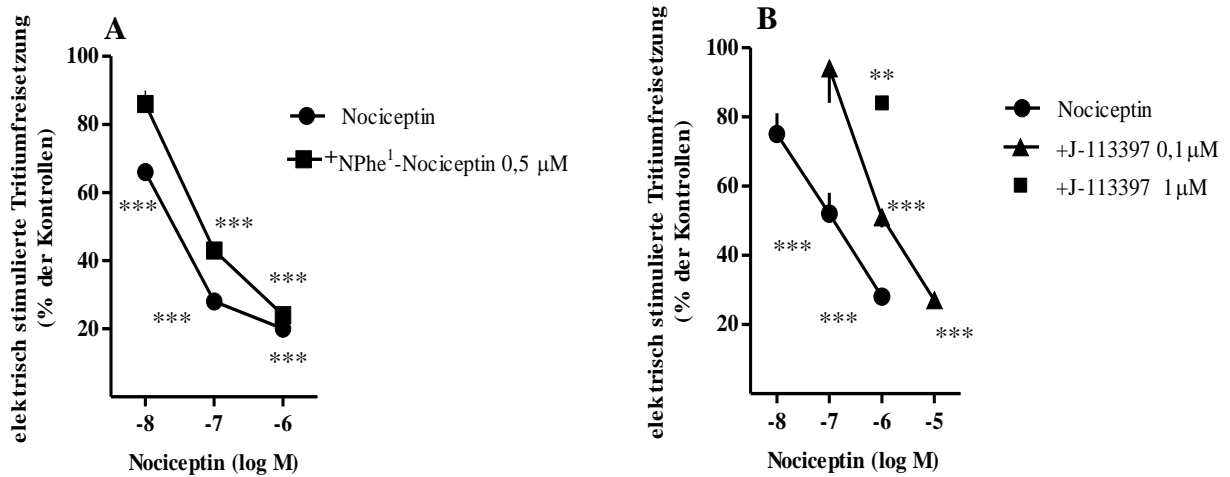


Abb. 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Nociceptin und Interaktion mit Nphe¹-Nociceptin (1-13) und J-113397

Kortexschnitte der Maus wurden in [³H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch mit 0,3 Hz, 50 mA, 2 ms nach 40 (S₁) und 90 (S₂) Minuten. Dem Superfusionsmedium waren Desipramin 1 μM und Rauwolscin 1 μM für die gesamte Versuchsdauer zugegeben. Mittelwert ± SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 3-8 Versuchen. ** p<0,01; *** p<0,001, verglichen zur entsprechenden, nicht im Bild gezeigten Nociceptin-freien Kontrolle. Hz (Hertz); mA (Milliampere); μM (Mikromolar)

Nociceptin hemmte in beiden Versuchsreihen konzentrationsabhängig die stimulierte Tritiumfreisetzung um bis zu 80 ± 1% der Kontrolle. Der pEC₅₀-Wert in den beiden Serien war 8,17 bzw. 7,53 und unterschied sich aus unbekanntem Gründen. Sowohl Nphe¹-Nociceptin (1-13) als auch J-113397 bewirkten eine Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Nociceptin. Die pA₂-Werte waren: Nphe¹-Nociceptin (1-13) 6,5 und J-113397- 8,1).

3.7 δ - Opioidrezeptor am Samenleiter der Maus

In den Kapiteln 3.2 und 3.3 wurde nach dem Vorkommen von δ -Opioid-Rezeptoren in der Meerschweinchen-Retina und im Nagerkortex gesucht, allerdings war eine hohe Konzentration des δ -selektiven-Opioidrezeptor-Agonisten DPDPE ohne Wirkung. Die grundsätzliche Wirksamkeit von DPDPE wurde in einem klassischen δ -Opioid-Rezeptor-Modell, dem Samenleiter der Maus überprüft. Dort wurde auch seine Wechselwirkung mit Naltrindol, als selektivem δ -Opioidrezeptor-Antagonisten, untersucht.

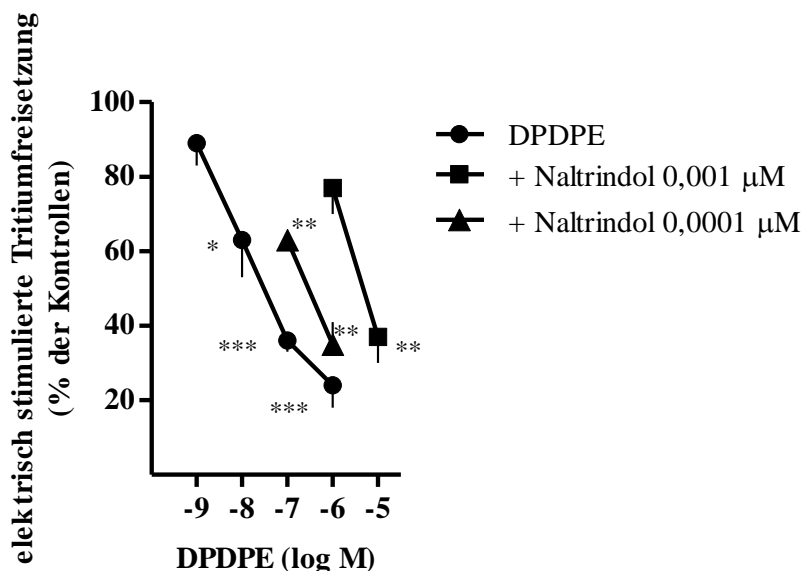


Abb. 16: Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DPDPE und Wechselwirkung mit Naltrindol

Samenleiterschnitte der Maus wurden in [^3H]-Noradrenalin-haltiger physiologischer Salzlösung vorinkubiert und im Anschluss für 110 Minuten superfundiert. Die Stimulation erfolgte elektrisch mit 3 Hz, 200 mA, 2 ms nach 40 (S_1) und 90 (S_2) Minuten. Dem Superfusionsmedium waren Desipramin 1 μM und Rauwolscin 1 μM sowie Ca^{2+} 3,25 mM für die gesamte Versuchsdauer zugegeben. Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts) aus 3-7 Versuchen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, verglichen zur entsprechenden, nicht im Bild gezeigten DPDPE-freien Kontrolle. Hz (Hertz), mA (Milliampere), μM (Mikromolar); mM (Millimolar)

Wie aus Abbildung 16 ersichtlich senkte DPDPE die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung im Samenleiter der Maus konzentrationsabhängig auf bis $24 \pm 6\%$ der Kontrolle. Der pEC_{50} -Wert betrug 8,07. Naltrindol verschob die Konzentrations-Wirkung-Kurve von DPDPE konzentrationsabhängig nach rechts. Der pA_2 -Wert betrug für Naltrindol $0,001 \mu\text{M}$ 11,30 und für Naltrindol $0,0001 \mu\text{M}$ 10,94. Naltrindol hatte in beiden Konzentrationen keine Auswirkung auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung (S_1 ; Tabelle 7).

4. Diskussion

4.1 Allgemeines

Viele Pharmaka vermitteln ihre Wirkung über eine Beeinflussung des körpereigenen neuronalen „Botensystems“ und führen zu einer vermehrten oder verminderten Freisetzung von Neurotransmittern.

Neurotransmitter, wie z. B. Noradrenalin oder Dopamin, liegen in Vesikeln gespeichert in den Axonterminalen von Neuronen vor. Kommt es zur Depolarisation der neuronalen Zellmembran, werden diese Transmitter über einen Calcium-abhängigen Prozess exozytotisch in den synaptischen Spalt entleert. Von dort aus können sie sowohl prä- als auch postsynaptische Rezeptoren erregen. Zur Quantifizierung der Neurotransmitterfreisetzung und zur Analyse der Modulation der Transmitterfreisetzung dient die Superfusion als gängige in-vitro-Methode. Hierzu werden Gewebeschnitte mit einem tritiummarkierten Transmitter für eine definierte Zeitspanne inkubiert. Die Botenstoffe werden über neuronale Transporter in Nervenendigungen aufgenommen und können durch chemische oder elektrische Stimulation freigesetzt werden. Der Einfluss von Test-Pharmaka kann anhand der Menge an tritiummarkiertem Transmitter im Superfusat nach Gewebepassage bestimmt werden.

In dieser Arbeit wurde in allen Versuchsreihen mit [³H]-Noradrenalin vorinkubierten Gewebeschnitten gearbeitet. [³H]-Noradrenalin wird in Kortex und Vas deferens des Nagers in noradrenerge Neurone aufgenommen. Anders sieht es in der Retina des Meerschweinchens aus, die im Gegensatz zu anderen Säugetierspezies keine noradrenergen Neurone besitzt. Frühere Studien haben jedoch gezeigt, dass Noradrenalin über Dopamin-Transporter in die dopaminergen Zellen der Meerschweinchenretina aufgenommen wird (Schlicker et al., 1996). Insbesondere konnte eine geringere Streuung der Messergebnisse bei Verwendung von [³H]-Noradrenalin zur Inkubation an Stelle von [³H]-Dopamin beobachtet werden (Schlicker et al., 1996), so dass in dieser Arbeit die Messung der Dopaminausschüttung indirekt über [³H]-Noradrenalin erfolgte. Bei einer Versuchsserie an der Retina des Meerschweinchens konnte die elektrisch stimulierte Abgabe des tritiummarkierten Transmitters durch Zugabe von Tetrodotoxin (TTX) oder Entzug von Ca²⁺-Ionen praktisch aufgehoben werden (Hemmung um bis zu 99,95 %; siehe Kapitel 3.1)

Ähnliche Beobachtungen konnten am Kortex von Ratte (Taube et al., 1977), Maus (Schlicker et al., 1992) und Meerschweinchen (Timm et al., 1998) gemacht werden.

TTX hemmt die elektrisch stimulierte Transmitterfreisetzung über die Blockade spannungsabhängiger Natriumkanäle, während der Entzug von Ca^{2+} -Ionen den für die exozytotische Transmitterfreisetzung unabdingbaren Calciumeinstrom unterdrückt. Das Ansprechen der Transmitterausschüttung auf TTX bzw. Ca^{2+} -Ionen-Entzug in den hier gezeigten Modellen belegt, dass die elektrisch stimulierte Tritiumabgabe in der Meerschweinchenretina einer quasi-physiologischen Dopamin- und im Kortex einer quasi-physiologischen Noradrenalinfreisetzung entspricht.

4.1.1 Wahl der Reizbedingungen

Zwischen der Reizfrequenz und der Rezeptor-vermittelten Modulation der Transmitterfreisetzung besteht eine reziproke Beziehung (Starke, 1977). Dies bedeutet, dass bei einer niedrigen Reizfrequenz eine stärkere Modulation der Transmitterfreisetzung, jedoch eine geringere absolute Freisetzung des Transmitters zu erwarten ist. In den hier beschriebenen Versuchen an der Retina des Meerschweinchens und des Vas deferens der Ratte wurde mit 3 Hz eine relativ hohe Reizfrequenz gewählt, um eine ausreichend hohe absolute Transmitterfreisetzung zu erzielen. Versuche am Nagerkortex wurden mit einer Reizfrequenz von 0,3 Hz durchgeführt, da im Hirngewebe bereits eine niedrigere Reizfrequenz zu einer ausreichenden Transmitterfreisetzung führt. Zur Wirkungscharakterisierung von Morphin und DAMGO am Kortex wurde je eine Versuchsreihe mit einer Reizfrequenz von 0,3 und 3 Hz durchgeführt

4.1.2 Verwendung von Hilfspharmaka

In allen hier beschriebenen Versuchsserien wurden zur Vermeidung von Störfaktoren und zur Erhöhung der absoluten Transmitterfreisetzung Hilfspharmaka verwendet. Zur Steigerung der Freisetzung von [³H]-Noradrenalin durch Wiederaufnahmehemmung wurde in den Versuchen am Kortex und Vas deferens der neuronale Monoamintransporter mittels Desipramin gehemmt. In Versuchen an der Retina wurde Nomifensin als Dopamin-Wiederaufnahmehemmer verwendet. Zusätzlich wurde in allen Versuchen (mit Ausnahme der Versuche an der Retina) Rauwolscin (ein Antagonist am α_2 -Rezeptor) zur Verhinderung der Rückkopplungshemmung von [³H]-Noradrenalin am eigenen Autorezeptor eingesetzt. Die Verwendung von Rauwolscin bietet drei Vorteile: Erstens wird der Betrag des freigesetzten [³H]-Noradrenalins erhöht. Zweitens wird das Ausmaß der Hemmung der [³H]-Noradrenalin-Freisetzung gesteigert. Drittens wird die mögliche Interaktion eines Testpharmakons mit dem α_2 -Autorezeptor unterbunden.

4.1.3 Geschlecht der Versuchstiere

In aktuellen Studien konnte eine Geschlechtsdifferenz in der Expression von Opioidrezeptoren in unterschiedlichen Regionen des Zentralnervensystems gefunden werden (Rasakham und Liu-Chen, 2011). So findet sich beispielsweise eine signifikant höhere Expression des μ -Rezeptors im periaquäduktalen Grau und ein stärkerer analgetischer Effekt von Morphin bei männlichen im Vergleich zu weiblichen Sprague-Dawley-Ratten (Loyd et al., 2008). Als mögliche Ursache wird eine Beeinflussung der Opioidrezeptor-Expression durch Geschlechtshormone diskutiert (Kren et al., 2008). Um hormonelle Interaktionen auszuschließen, wurde daher lediglich Gewebe von männlichen Versuchstieren genutzt.

4.2 Opioidrezeptorsubtypen in der Retina

In der Retina des Meerschweinchens erzielte der selektive κ -Rezeptoragonist U-69,593 eine Hemmung der [³H]-Noradrenalin Ausschüttung um bis zu 70 %. Der μ -selektive Agonist DAMGO sowie der δ -Agonist DPDPE zeigten hingegen keinen Effekt an der

Meerschweinchenretina. Dass DAMGO geeignet ist, μ -Opioid-Rezeptoren zu aktivieren, konnte in den Versuchen am Nagerkortex klar gezeigt werden. Dass DPDPE imstande ist, δ -Opioid-Rezeptoren zu aktivieren, zeigen die Versuche am Vas deferens der Maus, dem klassischen und sogar namensgebenden Gewebe für diesen Opioid-Rezeptor-Subtyp (Toll et al., 1998). DPDPE hemmte die Noradrenalinfreisetzung um bis zu 75 %, und die entsprechende Konzentrations-Wirkungs-Kurve wurde durch Naltrindol nach rechts verschoben. Dessen pA_2 -Wert von 11,1 stimmte gut überein mit dem pA_2 -Wert in einem anderen δ -Opioid-Rezeptor-Modell (Hemmung der Acetylcholin-Freisetzung im Hippokampus der Maus; Schulte et al.; 2012). Tabelle 8 zeigt, dass außer dem κ -Opioid-Rezeptor-Subtyp auch noch der NOP-Rezeptor die Dopaminfreisetzung in der Meerschweinchen-Retina hemmt (Flau et al.; 2002). Dazu konnten im retinalen Gewebe der Ratte Husain et al. (2008) mittels Western-Blot-Analyse auch noch den μ - und δ -Opioidrezeptor-Subtyp nachweisen.

4.3 Opioidrezeptorsubtypen im Nagerkortex

Anders als in der Meerschweinchen-Retina konnte im Mäusekortex zwar der μ -, nicht aber der κ -Opioidrezeptorsubtyp nachgewiesen werden. Beide Gewebe ähneln sich darin, dass der δ -Rezeptor nicht zu identifizieren, der NOP-Rezeptor aber nachweisbar ist (Tabelle 8). In ähnlichen Versuchen wie den hier durchgeführten gelangten auch Trendelenburg et al. (2000) zum Ergebnis, dass die Noradrenalinfreisetzung im Mäusekortex über μ - und NOP-Rezeptoren hemmbar, durch δ - und κ -Rezeptoren aber nicht modulierbar ist. Obwohl im Mäusekortex nur das Vorkommen von μ - (und NOP-) Rezeptoren gesichert werden konnte, wurde durch andere Forschergruppen mittels Autoradiographiestudien bzw. *in-situ*-Hybridisierungsstudien der Beweis für das Vorkommen des μ -, δ - und κ -Subtyps im Kortex von Nagern (Mansour et al., 1987) und Mensch (Peckys und Landwehrmeyer, 1999) geführt. Die unterschiedlichen Versuchsergebnisse lassen sich wahrscheinlich auf eine unterschiedliche Opioidrezeptor-Verteilung in verschiedenen Säugetierspezies zurückführen. Nicht zuletzt könnte aber auch die Verwendung unterschiedlicher Methoden (Superfusion, Autoradiographie, *in-situ*-Hybridisierung) zur Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse geführt haben.

Die beiden Rezeptoren, die im Mäusekortex zur Hemmung der Noradrenalinfreisetzung führen wurden näher untersucht. Für den μ -Rezeptor wird dies in 4.4 und 4.5 und für den NOP-Rezeptor in 4.6 diskutiert.

4.4 μ -Opioidrezeptor im Nagerkortex: Wirkung von Morphin

Der μ -Opioid-Rezeptor wurde in mehreren Versuchsserien noch weiter charakterisiert. Sein Vorkommen an noradrenergen Neuronen im Rattenkortex wurde schon in den 70er Jahren gezeigt (Starke 1977), erst viel später wurde dieser Rezeptor auch an noradrenergen Neuronen des Mäusekortex nachgewiesen (Trendelenburg et al., 2000). In der vorliegenden Studie wurden beide Spezies diesbezüglich miteinander verglichen. So lässt sich bei Analyse der Konzentrations-Wirkung-Kurven feststellen, dass der Hemmeffekt von DAMGO am Rattenkortex stärker ausgeprägt ist als bei der Maus. Diese Ergebnisse lassen auf eine eventuell stärker ausgeprägte Affinität und/oder Bindungskapazität für DAMGO am μ -Rezeptor im Kortex der Ratte schließen, wie auch von Yoburn et al. (1991) in Bindungsstudien gezeigt werden konnte. Dieses unterschiedliche funktionelle Potential in verschiedenen Spezies könnte sich auch auf das Vorkommen verschiedener Splice-Varianten des μ -Opioidrezeptor-Gens (Oprm-Gen) zurückführen lassen, durch die es zu einer veränderten Affinität und/oder Bindungskapazität für Agonisten am Rezeptor kommt (Pasternak et al., 2004).

In einer Versuchsserie an Kortexschnitten der Maus wurde die Wirkung von DAMGO und Morphin verglichen. Beide Substanzen reduzierten konzentrationsabhängig die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus den [^3H]-Noradrenalin vorinkubierten Hirnschnitten. DAMGO hemmte bei einer maximal wirksamen Konzentration von 10 μM die Ausschüttung des Neurotransmitters auf bis zu 20% der Kontrolle (Stimulationsfrequenz von 0,3 Hz). Morphin senkte die Transmitterfreisetzung bei der maximal wirksamen Konzentration von 100 μM auf nur 67%. Insgesamt lässt sich also für beide Substanzen ein hemmender Effekt auf die Noradrenalinfreisetzung festhalten. Allerdings war der von DAMGO hervorgerufene Hemmeffekt auf die Neurotransmitterfreisetzung bei allen hier verwendeten Substanzkonzentrationen (0,1-10 μM) signifikant höher gegenüber dem von Morphin hervorgerufenen Effekt. Der hemmende Einfluss von DAMGO und Morphin ließ sich durch Naloxon antagonisieren. Naloxon verschob die Konzentrations-Wirkungs-Kurve bei beiden

Agonisten im gleichen Umfang nach rechts, was belegt, dass beide Substanzen mit dem μ -Opioidrezeptor interagieren.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde die Reizfrequenz auf 3 Hz erhöht sowie dem Superfusionsmedium eine erhöhte Calciumkonzentration (3,25 mM) zugesetzt. Bei dieser Versuchsserie wurden nur diejenigen Konzentrationen eingesetzt, die bei 0,3 Hz den Maximaleffekt erzielten. Obwohl bei 3 Hz/ erhöhter Ca^{2+} -Konzentration die Hemmwirkung beider Agonisten gegenüber 0,3 Hz abgeschwächt war, galt erneut, dass der Hemmeffekt von DAMGO stärker als derjenige von Morphin war. Morphin ist in diesem Modell also ein Partialagonist (intrinsische Aktivität von etwa 0,5).

Unter einem Partialagonisten versteht man einen Agonisten, der, auch wenn in so hoher Konzentration verabreicht, dass alle Rezeptoren besetzt sein müssten, nicht den gleichen Effekt hervorruft wie ein Agonist, der am selben Rezeptor die maximal mögliche Rezeptorantwort auslöst. Ob eine Substanz als Voll- oder Partialagonist fungiert, ist in erster Linie Systemabhängig, d.h. hier insbesondere gewebeabhängig. Eine Substanz kann also in einem experimentellen System partialagonistische, in einem anderen System, in dem z.B. mehr Rezeptoren exprimiert werden, vollagonistische Wirkung besitzen (Neubig et al., 2003).

In Untersuchungen anderer Autoren zeigte sich DAMGO bezüglich seiner Wirkung am Gewebe unterschiedlicher Versuchstiere und am Menschen durchweg als vollagonistisch wirksam am μ -Rezeptor (Raynor et al., 1994; Toll et al., 1998). Morphin hingegen zeigte in Studien an menschlichen μ -Rezeptoren eine vollagonistische (Toll et al., 1998), an μ -Rezeptoren in Kortex und Vas deferens des Nagers hingegen eine partialagonistische Wirkung (Raynor et al., 1994; Rónai et al., 2006). Diese Versuche sind deshalb so interessant, da Morphin bei der therapeutischen Verwendung beim Menschen als Vollagonist wirkt. Buprenorphin hingegen erweist sich bei der Schmerztherapie als Partialagonist. Diese Differenzierung hat hohe praktische Relevanz. Das hier verwendete Nagersmodell hat einen schlechten prädiktiven Wert bezüglich der maximal erzielbaren analgetischen Wirkung beim Menschen.

Die Versuche mit erhöhter Stimulationsfrequenz und erhöhter Ca^{2+} -Konzentration wurden auch deshalb durchgeführt, um einen weiteren Beleg für die präsynaptische Lokalisation des μ -Opioidrezeptors zu bekommen. Es ist bekannt (Starke, 1977), dass Effekte, die über präsynaptische

Rezeptoren erfolgen, umso schwächer ausgeprägt sind, je höher die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist. Letztere wurde gleich durch zwei Maßnahmen erhöht, nämlich durch Erhöhung der elektrischen Stimulationsfrequenz und durch Erhöhung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Superfusionslösung.

<i>Gewebe</i>	<i>Transmitter</i>	μ	δ	κ	<i>NOP</i>
<i>Meerschweinchen-Retina</i>	<i>Dopamin</i>	–	–	+	+ ¹
<i>Mäuse-Kortex</i>	<i>Noradrenalin</i> ²	+	–	–	+

¹ Flau et al. (2002)

² Die gleiche Verteilung wurde auch in der Studie von Trendelenburg et al. (2000) gefunden.

Tab. 8: Vorkommen von freisetzungsmulierenden Opioidrezeptorsubtypen in der Meerschweinchenretina und im Nagerkortex (- Rezeptor nicht nachgewiesen, + Rezeptor nachgewiesen)

4.5 μ -Opioid-Rezeptor im Nagerkortex: Wirkung von Cannabinoid-Rezeptor Liganden

Cannabinoid- und Opioidrezeptoren zeigen Ähnlichkeit bezüglich ihrer anatomischen Verteilung und pharmakologischen Effekte im Zentralnervensystem. Cannabinoidrezeptoren vermitteln ebenso wie die Opioidrezeptoren Analgesie, Sedation, Hypothermie und eine Reduktion der motorischen Aktivität im Versuchstier (Manzaneras et al., 1999; Massi et al., 2001) über einen G_i -gesteuerten Signaltransduktionsweg (Bidaut-Russell et al., 1990; Pugh et al., 1994). Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten liegt die Vermutung nahe, dass ein synergistischer Effekt zwischen

Opioid- bzw. Cannabinoidrezeptorliganden oder aber eine funktionelle Interaktion auf zellulärer Ebene zwischen den Rezeptortypen besteht.

Mit Hilfe neuester Untersuchungsmethoden konnte unlängst die Existenz eines funktionellen heterodimeren Komplexes der beiden Rezeptortypen entdeckt werden (Hojo et al.; 2008). In einigen Studien konnte ein additiver Effekt von Cannabinoidagonisten auf die Opioid-induzierte Antinozizeption nachgewiesen werden (Cichewicz und Mc Carthy, 2003; Pacheco et al., 2009), in anderen jedoch keine Interaktion (Carai et al., 2006) oder nur eine Interaktion in vorgeschädigtem aber nicht im gesunden Gewebe beobachtet werden (Capasso et al., 2008 b).

Im Rahmen der hier vorgestellten Modelle wurde zum einen untersucht, inwiefern der Antagonist am Cannabinoidsystem, SR141716, die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung beeinflusst, zum anderen, ob Cannabidiol (ein nicht psychotrop wirksamer Bestandteil der Hanfpflanze *Cannabis sativa*) über einen allosterischen Mechanismus die Opioid-induzierte Inhibition der Transmitterfreisetzung beeinflusst.

4.5.1 SR141716

SR141716 (Rimonabant) wirkt als Antagonist am CB₁-Rezeptor und hebt die durch Endocannabinoide hervorgerufene Wirkung auf. In den durchgeführten Superfusionsexperimenten zeigte SR141716 alleine, in einer Konzentration von 10 µM, keinen Effekt auf die elektrisch evozierte Neurotransmitterfreisetzung. SR141716 (10 µM) hatte ebenfalls keinen signifikanten Effekt auf die durch DAMGO hervorgerufene Inhibition der Transmitterfreisetzung. Die gezeigten Ergebnissen deuten also darauf hin, dass SR141716 selbst keine Wirksamkeit am µ-Rezeptor besitzt und auch den durch µ-Agonisten hervorgerufenen inhibitorischen Einfluss auf das Neurotransmittersystem weder zu steigern noch zu vermindern mag.

Walentiny et al. (2010) konnten in Bindungsstudien eine Abschwächung der Aktivierung von κ-Opioidrezeptoren durch U-69,593 bei Zugabe von SR141716 nachweisen. Carpasso et al. (2008a) hingegen konnten keinen Effekt von Rimonabant auf die durch den Opioidagonisten Loperamid hervorgerufene Abschwächung der Darmmotilität in Mäusen finden. Ein Effekt von Rimonabant

am Opioidsystem lässt sich also generell nicht bestätigen und ist eventuell auf bestimmte Opioidsubtypen und Schädigungsmodelle beschränkt.

4.5.2 Cannabidiol

Cannabidiol (CBD) ist ein nicht psychotroper Wirkstoff der weiblichen Hanfpflanze, der nur geringe Affinität an den Cannabinoidrezeptoren CB₁ und CB₂ besitzt, aber die Wirkung von Agonisten an diesen Rezeptoren zu antagonisieren vermag (Thomas et al., 2007). Es wird diskutiert, ob CBD seine Wirkung eventuell noch über andere Rezeptorsysteme, wie z.B. für den Vanilloidrezeptor belegt, entfaltet (Bisogno et al., 2001; Watanabe et al., 1998). In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten sollte untersucht werden, ob Cannabidiol einen Effekt an Opioidrezeptoren besitzt und die Wirkung von Opioiden über eine allosterische Modulation des Rezeptors verändert.

Die Versuche wurden an Kortexgewebe der Maus durchgeführt und zeigten erwartungsgemäß eine Hemmung der Neurotransmitterfreisetzung durch DAMGO am μ -Rezeptor. Die Zugabe von Cannabidiol 10 μ M beeinflusste die Wirkung von DAMGO nicht signifikant. Durch Zugabe von Naloxon in einer Konzentration von 0,01 μ M wurde die durch DAMGO bewirkte Inhibition der Transmitterfreisetzung abgeschwächt. Die zusätzliche Applikation von Cannabidiol (10 μ M) bewirkte keine signifikante weitere Abschwächung des durch Naloxon hervorgerufenen Effekts. Eine Verstärkung des antagonistischen Effekts des kompetitiven Antagonisten Naloxon wäre durch einen negativen allosterischen Modulator zu erwarten (Christopoulos und Kenakin, 2002). Es bleibt also festzuhalten, dass Cannabidiol in dieser Untersuchung keinen allosterisch modulierenden Effekt am μ -Opioidrezeptor besitzt. Diese Ergebnisse decken sich nicht mit den von Kathmann et al. (2006) in Radioligand-Bindungsstudien gemachten Beobachtungen, welche Cannabidiol als allosterischen Modulator am μ - und δ -Rezeptor identifizierten.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass in der vorliegenden Studie weder SR141716 noch Cannabidiol eine Wirkung auf die durch μ -Rezeptoren hervorgerufenen pharmakologischen Effekte hatten. Dennoch sprechen einige von anderen Autoren gezeigten Ergebnisse für einen

Einfluss der Cannabinoide auf das opioiderge System, so dass es weiterer Untersuchungen diesbezüglich bedarf.

4.6 NOP-Rezeptor im Nagerkortex: nähere Charakterisierung

NOP-Rezeptoren haben ein breites Verteilungsmuster und werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert. Mittels Superfusionstudien am Hirnrindengewebe der Maus wurde in diesem Modell der Schwerpunkt auf die Detektion von NOP-Rezeptoren mit Hilfe des endogenen Liganden Nociceptin gelegt. Desweiteren wurde der Einfluss der beiden Substanzen NPhe¹-Nociceptin (1-13) und J-113397 auf die Transmitterfreisetzung untersucht.

Nociceptin zeigte in beiden Versuchsserien einen hemmenden Effekt auf die elektrisch induzierte Tritiumfreisetzung und senkte diese maximal auf 20% der Kontrollen.

Durch NPhe¹-Nociceptin (1-13) 0,5 µM wurde der hemmende Effekt des Nociceptins auf die Transmitterfreisetzung mit hoher Signifikanz ($p < 0,005$ bzw. $p < 0,0001$ je nach Konzentration) abgeschwächt (Rechtsverschiebung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve). Gleiches gilt für J-113397 welches sowohl in einer Konzentration von 0,1 bzw. 1 µM den Nociceptin-Effekt auf die [³H]-Noradrenalinfreisetzung signifikant verminderte ($p < 0,0001$).

Es lässt sich also festhalten, dass Nociceptin in den hier durchgeführten Superfusionsversuchen die Rezeptor-vermittelte Monoaminfreisetzung hemmt. Durch Herabsetzung dieses Effekts mittels NPhe¹-Nociceptin (1-13) und J-113397 lässt sich zum einen die Wirkung dieser Substanzen als Antagonisten am NOP-Rezeptor belegen zum anderen wird daraus ersichtlich, dass Nociceptin seine Wirkung über Interaktion mit dem NOP-Rezeptor entfaltet.

Desweiteren lässt sich aus diesem Modell entnehmen, dass die beiden Antagonisten die Nociceptin-Wirkung mit unterschiedlich starkem Effekt abmildern. Vergleicht man den Effekt beider Substanzen, so stellt man fest, dass J-113397 die Nociceptin-induzierte Hemmung der Transmitterausschüttung signifikant stärker abschwächt als NPhe¹-Nociceptin (1-13) ($p < 0,0008$).

Die hier gezeigten Ergebnisse bezüglich des Vorkommens von NOP-Rezeptoren im Kortex des Nagers decken sich mit, durch andere Methoden (in erster Linie Radioligand-Bindungsstudien), ermittelten Resultaten (Clarke et al., 2001; Clarke et al., 2003; Slowe et al., 2001). Die beiden hier antagonistisch am NOP-Rezeptor wirksamen Substanzen NPhe¹-Nociceptin (1-13) und J-

113397 stellten sich auch in anderen Untersuchungen als potente Antagonisten dar (Calo et al., 2002; Ozaki et al., 2000).

5. Zusammenfassung

Präparierte Gewebeschnitte der Retina des Meerschweinchens sowie Kortex und Vas deferens Schnitte von Ratte und Maus wurden mit [³H]-Noradrenalin inkubiert und im Anschluss mit physiologischer Salzlösung, der je nach Versuchsanordnung verschiedene Pharmaka zugegeben wurden, durchströmt. Ziel dieser Superfusionsversuche war zum einen die Identifizierung des Musters verschiedener funktioneller Opioid-Rezeptor-Subtypen in unterschiedlichen Geweben, zum anderen zu untersuchen, welchen Einfluss Liganden des Opioidsystems, aber auch anderer Rezeptorsysteme (Cannabinoidsystem) auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung haben.

Die evozierte Tritiumfreisetzung entspricht einer quasi-physiologischen Noradrenalinfreisetzung in Kortex und Vas deferens, in der Retina des Meerschweinchens hingegen einer quasi-physiologischen Dopaminfreisetzung, da dort keine noradrenergen Neurone vorhanden sind und [³H]-Noradrenalin stattdessen in dopaminerge retinale Zellen aufgenommen wird.

Mit Hilfe der am jeweiligen Rezeptorsubtyp selektiv agonistischen Substanzen DAMGO, DPDPE und U-69,593 konnte an der Retina des Meerschweinchens lediglich das Vorkommen von κ -Rezeptoren bzw. am Kortex des Nagers lediglich die Existenz von μ -Rezeptoren nachgewiesen werden. Im Vas deferens ließ sich das Vorkommen von δ -Rezeptoren belegen. Der hemmende Effekt auf die [³H]-Noradrenalinfreisetzung konnte durch die jeweiligen Antagonisten vermindert werden. In Versuchen am Kortex der Maus führte DAMGO zu einer Hemmung der elektrisch stimulierten Neurotransmitterfreisetzung auf $20\pm 1\%$ der Kontrollen, Morphin hingegen erreichte nur eine Hemmung der Freisetzung auf $67\pm 6\%$ der Kontrolle, so dass Morphin in diesem Versuchssystem als Partialagonist klassifiziert werden konnte. Erhöhung der Reizfrequenz und Zugabe von Ca^{2+} zum Superfusionsmedium führte zu einer Abschwächung der Wirkung von DAMGO und Morphin.

DAMGO zeigte am Rattenkortex einen größeren hemmenden Effekt als am Mäusekortex, was auf eine eventuell größere Anzahl von μ -Rezeptoren in der Hirnrinde der Ratte zurückzuführen ist. Die beiden im Cannabinoidsystem wirksamen Substanzen Cannabidiol und SR 141716 zeigten weder alleine noch in Kombination mit Effektoren des Opioidsystems einen signifikanten Einfluss auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung. Schließlich konnte der aus früheren Studien der Arbeitsgruppe bereits bekannte hemmende Effekt von Nociceptin auf die Noradrenalinfreisetzung im Nagerkortex bestätigt werden und mit Hilfe der beiden Antagonisten

NPhe¹-Nociceptin (1-13) und J-113397 gezeigt werden, dass Nociceptin über NOP-Rezeptoren wirkt.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen

	<u>Seite</u>
Abbildung 1	Exemplarische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors mit sieben Transmembrandomänen.....11
Abbildung 2	Einfluss von Tetrodotoxin und Ca ²⁺ -Entzug auf den Tritiumefflux.....29
Abbildung 3	Wirkung von U-69,593, DAMGO und DPDPE.....31
Abbildung 4	Wirkung von U-69,593 und Wechselwirkung mit MR-2266.....32
Abbildung 5	Wirkung von DAMGO, U-69,593 und DPDPE.....33
Abbildung 6	Wirkung von DAMGO und Wechselwirkung mit Naloxon.....34
Abbildung 7	Strukturformel von Naloxon.....35
Abbildung 8	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DAMGO am Mäuse- und Rattenkortex.....36
Abbildung 9	Strukturformel von DAMGO und Morphin.....37
Abbildung 10	Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Morphin und DAMGO bei Stimulation mit 0,3 Hz.....38
Abbildung 11	Einfluss von Morphin und DAMGO auf den stimulierten Tritiumefflux bei 0,3 und 3 Hz.....39
Abbildung 12	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von SR141716.....41
Abbildung 13	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Cannabidiol.....42

Abbildung 14	Strukturformel von Nociceptin.....	43
Abbildung 15	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Nociceptin und Interaktion mit NPh ^{e1} -Nociceptin (1-13) und J-113397	44
Abbildung 16	Konzentrations-Wirkungs-Kurve von DPDPE und Wechselwirkung mit Naltrindol.....	45

Tabellen

		<u>Seite</u>
Tabelle 1	Übersicht über die Funktion der einzelnen Opioidrezeptorsubtypen.....	15
Tabelle 2	Endogene und exogene Liganden der Opioidrezeptorsubtypen μ , δ , κ und NOP.....	17
Tabelle 3	Zusammensetzung der physiologischen Kochsalzlösung	19
Tabelle 4	Auflistung der verwendeten Substanzen und deren Bezugsquellen.....	23
Tabelle 5	Verwendete Geräte und Materialien und deren Bezugsquellen.....	25
Tabelle 6	Basale und stimulierte Tritiumabgabe von ³ [H]-Noradrenalin-vorinkubierten Gewebeschnitten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen.....	28
Tabelle 7	Einfluss der Opioidrezeptorantagonisten auf die elektrisch stimulierte Tritiumfreisetzung aus ³ [H]-Noradrenalin-vorinkubierten Gewebeschnitten.....	30
Tabelle 8	Vorkommen von freisetzungsmulierenden Opioidrezeptorsubtypen in der Meerschweinchen-Retina und im Nagerkortex.....	53

7. Literaturverzeichnis

- Alexander SPH, Mathie A, Peters JA.** Guide to Receptors and Channels (GRAC), 4th edn (Supplement). *Br J Pharmacol.* 2009; 158: 1-254
- Bagnol D, Mansour A, Akil H, Watson SJ.** Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract. *Neuroscience* 1997; 81: 579-591
- Befort K, Mattei MG, Roeckel N, Kieffer B.** Chromosomal localization of the delta opioid receptor gene to human 1p34.3-p36.1 and mouse 4D bands by in situ hybridization. *Genomics* 1994, 20: 143-145
- Besse D, Lombard MC, Besson JM.** Autoradiographic distribution of mu, delta and kappa opioid binding sites in the superficial horn, over the rostrocaudal axis of the rat spinal cord. *Brain Res* 1991, 548: 287-291
- Bidaut-Russell M, Devane WA, Howlett AC.** Cannabinoid receptors and modulation of cyclic AMP accumulation in the rat brain. *J Neurochem* 1990; 55: 21-26
- Bisogno T, Hanus L, De etrocellis L, Tchilibon S, Ponde DE, Brandi I, Moriello AS, Davis JB, Mechoulam R, Di Marzo V.** Molecular targets for cannabidiol and its synthetic analogues: effect on vanilloid VR1 receptors and on the cellular uptake and enzymatic hydrolysis of anandamide. *Br J Pharmacol* 2001; 134: 845-852
- Blackburn TP, Cross AJ, Hille C, Slater P.** Autoradiographic localization of delta opiate receptors in rat and human brain. *Neuroscience* 1988; 27: 497-506
- 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 mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 1994; 347: 284-288
- Calo G, Rizzi, A, Rizzi, D, Bigoni R, Guerrini R, Marzola G, Marti M, McDonald J, Morari M, Lambert DG, Salvadori S, Regoli D.** [Nphe1, Arg14, Lys15]nociceptin-NH₂, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Br J Pharmacol* 2002; 136: 303-311
- Capasso R, Borrelli F, Aviello G, Romano B, Scalisi C, Capasso F, Izzo AA.** Cannabidiol, extracted from *Cannabis sativa*, selectively inhibits inflammatory hypermotility in mice. *Br J Pharmacol* 2008a; 154: 1001-1008
- Capasso R, Borrelli F, Cascio MG, Aviello G, Huben K, Zjawiony JK, Marini P, Romano B, Di Marzo V, Capasso F, Izzo AA.** Inhibitory effect of salvinorin A, from *Salvia divinorum*, on ileitis-induced hypermotility: cross-talk between κ -opioid and cannabinoid CB1 receptors. *Br J Pharmacol* 2008b; 155: 681-689

Carai MAM, Colombo G, Gessa GL, Ratnakumar Y, Balapal SB, Basalingappa LH. Investigation on the relationship between cannabinoid CB1 and opioid receptors in gastrointestinal motility in mice. *Br J Pharmacol* 2006; 148: 1043-1050

Cheng PY, Lin-Chen LY, Pickel VM. Dual ultrastructural immunocytochemical labeling of mu and delta opioid receptors in the superficial layers of the rat cervical spinal cord. *Brain Res* 1997; 778: 367-380

Christopoulos A und Kenakin T. G protein-coupled receptor allosterism and complexing. *Pharmacol Rev* 2002; 54: 323-374

Chuang TK, Killam KF, Chuang LF, Kung HF, Sheng WS, Chao CC, Yu L, Chuang R. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 216: 922-930

Cichewicz DL und McCarthy EA. Antinociceptive synergy between Δ^9 -Tetrahydrocannabinol and opioids after oral administration. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003; 304: 1010-1015

Clarke S, Chen Z, Hsu MS, Pintar J, Hill R, Kitchen I. Quantitative autoradiographic mapping of the ORL1, mu-, delta- and kappa-receptors in the brains of knockout mice lacking the ORL1 receptor gene. *Brain Res* 2001; 906: 13-24

Clarke S, Czyzyk T, Ansonoff M, Nitsche J, Hsu MS, Nilsson L, Larsson K, Borsodi A, Toth G, Hill R, Kitchen I, Pintar JE. Autoradiography of opioid and ORL1 ligands in opioid receptor triple knockout mice. *Eur J Neurosci* 2002; 16: 1705-1712

Clarke S, Chen Z, Hsu MS, Hill RG, Pintar JE, Kitchen I. Nociceptin/orphanin FQ knockout mice display up-regulation of the opioid receptor-like receptor and alterations in opioid receptor expression in the brain. *Neuroscience* 2003; 117: 157-168

Dhawan BN, Cesselin F, Raghbir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M. International Union of Pharmacology. XII. Classification for opioid receptors. *Pharmacol Rev* 1996; 48: 567- 592

Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992; 258: 1952-1955

Fernandez F, Misilmeri MA, Felger JC, Devine DP. Nociceptin/orphanin FQ increases anxiety-related behavior and circulating levels of corticosterone during neophobic tests of anxiety. *Neuropsychopharmacology* 2004; 29: 59-71

Flau K, Redmer A, Liedtke S, Kathmann M, Schlicker E. Inhibition of striatal and retinal dopamine release via nociceptin/orphanin FQ receptors. *Br J Pharmacol* 2002; 137: 1355-1361

Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev* 2005; 57: 279-288

- Furchgott RF.** The classification of adrenoceptors (adrenergic receptors). An evaluation from the standpoint of receptor theory. In: Blaschko H, Muscholl E (Hrsg.): *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin-Heidelberg-New York: Springer, 1972, S. 283-335
- Gavériaux C, Peluso J, Simonin F, Laforet J, Kieffer B.** Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. *FEBS Lett* 1995; 369: 272-276
- Goody RJ, Oakley SM, Filliol D, Kieffer BL, Kitchen I.** Quantitative autoradiographic mapping of opioid receptors in the brain of delta- opioid receptor gene knockout mice. *Brain Res* 2002; 945: 9-19
- Hawkins KN, Knapp RJ, Gehlert DR, Lui, GK, Yamamura MS, Roeske LC, Hruby VJ, Yamamura HI.** Quantitative autoradiography of (³H) CTOP binding of μ opioid receptors in rat brain. *Life Sci*. 1988; 42: 2541- 2551
- Hoyo M, Sudo Y, Ando Y, Minami K, Takada M, Matsubara T, Kanaide M, Taniyama K, Sumikawa K, Uezono Y.** μ -opioid receptor forms a functional heterodimer with cannabinoid CB1 receptor: Electrophysiological and FRET Assay Analysis. *J Pharmacol Sci* 2008; 108: 308-319
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR.** Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975; 258: 577-579
- Husain S, Potter DE, Crosson CE.** Opioid Receptor-Activation: Retina Protected from Ischemic Injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009; 50: 3853-3859
- Inoue M, Shimohira I, Yoshida A, Zimmer A, Takeshima H, Sakurada T, Ueda H.** Dose-related opposite modulation by nociceptin/ orphanin FQ of substance P nociception in the nociceptors and spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 291: 308-313
- Itoh K, Konya H, Takai E, Masuda H, Nagai K.** Modification of acetylcholine release by nociceptin in conscious rat striatum. *Brain Res* 1999; 845: 242-245
- Jenck F, Wichmann J, Dautzenberg FM, Morea 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
- Jongkamonwiwat N, Phansuwan-Pujito P, Sarapoke P, Chetsawang B, Casalotti SO, Forge A, Dodson H, Gavitrpong P.** The presence of opioid receptors in rat inner ear. *Hear Res* 2003; 181: 85-93
- 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

- Kathmann M, Flau K, Redmer A, Tränkle C, Schlicker E.** Cannabidiol is an allosteric modulator at mu- and delta-opioid receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2006; 372: 354-361
- Kieffer B, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth C.** The delta opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89: 12048-12052
- Kitchen I, Slowe SJ, Matthes HWD, Kieffer B.** Quantitative autoradiographic mapping of mu, delta and kappa- opioid receptors in knockout mice lacking the mu- opioid receptor gene. *Brain Res.* 1997; 778: 73-88
- Kong H, Raynork K, Yano H, Takeda J, Bell GI, Reisine T.** Agonists and Antagonists bind to different domains of the cloned kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 8042-8046
- Kren MC, Haller VL, Welch SP.** The role of gonadal hormones on opioid receptor protein density in arthritic rats. *Eur J Pharmacol* 2008; 578: 177-184
- Lord JAH, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW.** Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 1977; 267: 495- 499
- Loyd DR, Wang X, Murphy AZ.** Sex differences in micro-opioid receptor expression in the rat midbrain periaqueductal grey are essential for eliciting sex differences in morphine analgesia. *J Neurosci* 2008; 28: 14007-14017
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ.** Autoradiographic differentiation of mu, delta and kappa receptors in the rat forebrain and midbrain. *J. Neurosci* 1987; 7: 2445- 2464
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA.** Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci.*1999; 20: 287-294
- Marti M, Stocchi S, Paganini F, Mela F, De Risi C, Calo G, Guerrini R, Barnes TA, Lambert DG, Beani L, Bianchi C, Morari M.** Pharmacological profiles of presynaptic nociceptin/ orphanin FQ receptors modulating 5- hydroxytryptamine and noradrenaline release in the rat neocortex. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 91-98
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE.** The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine- dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*1976; 197: 517-532
- Massi P, Vaccani A, Romorini S, Parolaro D.** Comparative characterization in the rat of the interaction between cannabinoids and opiates for their immunosuppressive and analgesic effects. *J Neuroimmunol.* 2001; 117: 116-124

Meunier JC, 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: 532-535

Minami M, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Nakamura S, Onogi T, Kaneko S, Satoh M. Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. *FEBS Lett* 1993; 329: 291-295

Mogil JS, Grisel JE, Zhangs G, Belknap JK, Grandy DK. Functional antagonism of mu-, delta-, and kappa- opioid antinociception by orphanin FQ. *Neurosci Lett* 1996; 214: 131-134

Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL 1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 1994; 341: 33- 38

Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier JC, Parmentier M. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sc USA.* 1996; 93: 8666-8670

Mrkusich EM, Kivell BM, Miller JH, Day DJ. Abundant expression of mu and delta opioid receptor mRNA and protein in the cerebellum of the fetal, neonatal and adult rat. *Brain Res Dev Brain Res* 2004; 148: 213-222

Murphy NP, Ly HT, Maidment NT. Intracerebroventricular orphanin FQ/ nociceptin supresses dopamine release in the nucleus accumbens of anaesthetized rats. *Neuroscience* 1996; 75: 1-4

Nakanishi S, Inone A, Kita T, Nakamura M, Chang AC, Cohen SN, Numa S. Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 1979; 278: 423-427

Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor XXXVIII. Update on Terms and Symbols in Quantitative Pharmacology Nomenclature and Drug Classification. *Pharmacol Rev.* 2003; 55: 597-606

Nicol B, Lambert DG, Rowbotham DJ, Smart D, McKnight AT. Nociceptin induced inhibition of K⁺ evoked glutamate release from rat cerebrocortical slices. *Br J Pharmacol* 1996; 119: 1081-1083

Ozaki S, Kawamoto H, Itoh Y, Miyaji M, Azuma T, Ichikawa D, Nambu H, Iguchi T, Iwasawa Y, Ohta H. In vitro and in vivo pharmacological characterization of J-113397, a potent and selective non-peptidyl ORL1 receptor antagonist. *Eur J Pharmacol* 2000; 402: 45-53

Pacheco da Fonseca D, Klein A, Castro Perez A, Pacheco da Fonseca CM, Nogueira de Francischi J, Lopes Reis GM, Gama Duarte ID. Central antinociception induced by mu-opioid receptor agonist morphine, but not d- or k-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. *Br J Pharmacol* 2009; 158: 225-231

Pasternak DA, Pan L, Xu J, Yu R, Xu MM, Pasternak GW, Pan YX. Identification of three new alternatively spliced variants of the rat mu opioid receptor gene: dissociation of affinity and efficacy. *J Neurochem.* 2004; 91: 881-890

Peckys D und Landwehrmeyer GB. Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. *Neuroscience* 1999; 88: 1093-1135

Pert CB und Snyder SH. Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. *Science* 1973; 179: 1011-1014

Pol O, Palacio JR, Puig MM. The expression of delta- and kappa-opioid receptor is enhanced during intestinal inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306: 455-462

Portoghese PS. A new concept of the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. *J. Med. Chem.* 1965; 8: 609- 616

Pugh G Jr, Smith PB, Dombrowski DS, Welch SP. The role of endogenous opioids in enhancing the antinociception produced by the combination of delta tetrahydrocannabinol and morphine in the spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther.* 1996; 279: 608-616

Rasakham K, Liu-Chen LY. Sex differences in kappa opioid pharmacology. *Life Sci.* 2011; 88: 2-16

Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol.* 1994; 45: 330-334

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

Rónai AZ, Al-Khrasani M, Benyhe S, Lengyel I, Kocsis L, Orosz G, Tóth G, Kató E, Tóthfalusi L. Partial and full agonism in endomorphin derivatives: comparison by null and operational model. *Peptides* 2006; 27: 1507-1513

Ryberg E, Larsson N, Sjögren S, Hjorth S, Hermansson NO, Leonova J, Elebring T, Nilsson K, Drmota T, Greasley PJ. The orphan receptor GPR55 is a novel cannabinoid receptor. *Br J Pharmacol.* 2007; 152: 1092-1101

Salemi S, Aeschlimann A, Reinsch N, Jüngel A, Gay RE, Heppner FL, Michel BA, Gay S, Sprott H. Detection of kappa and delta opioid receptors in skin outside the nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 1012-1017

Schlicker E, Behling A, Lümmer G, Malinowska B, Göthert M. Mutual interaction of histamine H3-receptors and alpha 2-adrenoceptors on noradrenergic terminals in mouse and rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1992; 345: 639-649

Schlicker E, Timm J, Göthert M. Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1996; 354: 791-795

Schlicker E, Werthwein S, Kathmann M, Bauer U. Nociceptin inhibits noradrenaline release in the mouse brain cortex via presynaptic ORL1 receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998a; 358: 418-422

Schlicker E, Werthwein S, Kathmann M. Orphan opioid receptor-mediated inhibition of noradrenaline, dopamine and serotonin release in the mouse, rat and guinea-pig brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. (Supplement)* 1998b; 357: R90

Schmidbauer W und vom Scheidt J. *Handbuch der Rauschdrogen.* Frankfurt am Main: Fischer, 2004

Schulte K, Kumar M, Zajac JM, Schlicker E. Noradrenaline release in rodent tissues is inhibited by interleukin-1 β but is not affected by urotensin II, MCH, NPW and NPPF. *Pharmacological Reports* 2011; 63:102-111

Schulz S, Schreff M, Koch T, Zimprich A, Gramsch C, Elde R, Höllt V. Immunolocalization of two mu- opioid receptor isoforms (MOR1 and MOR1B) in the rat central nervous system. *Neuroscience* 1998; 82: 613-622

Sertürner, FWA. Darstellung der reinen Mohnsäure (Opiumsäure) nebst einer chemischen Untersuchung des Opiums mit vorzüglicher Hinsicht auf einen darin neu entdeckten Stoff und die dahingehöri gen Bemerkungen. *Journal der Pharmacie* 1806; 14: 47-93

Simon, E, Hiller J, Edelman I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1973; 70: 1947-1949

Slowe SJ, Clarke S, Lena I, Goody RJ, Lattanzi R, Negri L, Simonin F, Matthes HW, Filliol D, Kieffer BL, Kitchen I. Autoradiographic mapping of the opioid receptor-like 1 (ORL1) receptor in the brains of mu-, delta- or kappa-opioid receptor knockout mice. *Neuroscience* 2001; 106: 469-480

Ständer S, Gunzer M, Melze D, Luger T, Steinhoff M. Localization of mu opioid receptor 1A on sensory nerve fibers in human skin. *Regul Pept* 2002; 110: 75-83

Starke K. Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1977; 77: 1-124

Taube HD, Starke K, Borowski E. Presynaptic receptor systems on the noradrenergic neurons of the rat brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1977; 299: 123-141

Terenius L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat brain cortex. *Acta Pharmacol Toxicol* 1973; 32: 317-320

Thomas A, Baillie GL, Phillips AM, Razdan RK, Ross RA, Pertwee RG. Cannabidiol displays unexpectedly high potency as an antagonist of CB1 and CB2 receptor agonists in vitro. *Br J Pharmacol* 2007; 150: 613-623

Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ. Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor. *Neuron* 1993; 11: 903-913

Tikhonova IG und Costanzi S. Unraveling the structure and function of G-protein-coupled receptors through NMR spectroscopy. *Curr Pharm Des.* 2009; 15: 4003-4016

Timm J, Marr I, Werthwein S, Elz S, Schunack W, Schlicker E. H₂ receptor-mediated facilitation and H₃ receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the guinea-pig brain. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1998; 357: 232-239

Toll L, Berzetei-Gurske IP, Polgar WE, Brandt SR, Adapa ID, Rodriguez L, Schwartz RW, Haggart D, O'Brien A, White A, Kennedy JM, Craymer K, Farrington L, Auh JS. Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications. *NIDA Res Monogr* 1998; 178: 440-466

Trendelenburg AU, Cox SL, Schelb V, Klebroff W, Khairallah L, Starke K. Modulation of [³H]-noradrenaline release by presynaptic opioid, cannabinoid and bradykinin receptors and β adrenoceptors in mouse tissue. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 321-330

Walentiny DM, Vann RE, Warner JA, King LS, Seltzman HH, Navarro HA, Twine CE, Thomas BF, Gilliam AF, Gilmour BP, Carroll FI, Wiley JL. Kappa opioid mediation of cannabinoid effects of the potent hallucinogen, salvinorin A, in rodents. *Psychopharmacology (Berl)* 2010; 210: 275-284

Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR. Mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 10230-10234

Wang JB, Johnson PS, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Uhl GR. Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett* 1994; 338: 217-222

Watanabe K, Ogi H, Nakamura S, Kayano Y, Masunaga T, Yoshimura H, Yamamoto I. Distribution and characterization of anandamide amidohydrolase in mouse brain and liver. *Life Sci* 1998; 62: 1223-1229

Yasuda K, Espinosa R 3rd, Takeda J, Le Beau MM, Bell GI. Localization of the kappa opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2. *Genomics* 1994; 19: 596-597

Yoburn BC, Lutfy K, Candido J. Species differences in mu- and delta-opioid receptors. *Eur J Pharmacol.* 1991; 193: 105-111

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Eberhard Schlicker für die Überlassung des Themas und sein Engagement mir mit fachlichem Rat zur Seite zu stehen. Für die Einarbeitung in die korrekte technische Durchführung der Experimente danke ich Frau Doris Petri ganz herzlich. Mein Dank gilt ebenfalls Frau Kirsten Schulte für die nette und kollegiale „Schreibtischnachbarschaft“. Meinen Großeltern Werner und Dorothea Judel danke ich ebenso wie meiner Patentante Ulrike Bärwaldt und ihrem Ehemann Joachim Bärwaldt für die Ermöglichung des Medizinstudiums und ihre moralische und finanzielle Unterstützung. Nicht zuletzt möchte ich meinem Freund Thomas Vasiliou für sein Verständnis und die Lösung so mancher Computerproblems danken.