

**Verhaltenspharmakologische und molekularbiologische
Untersuchungen zum
Opiatentzug bei der Ratte**

Dissertation
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilian-Universität München
Zoologisches Institut
Fachbereich Neurobiologie

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Christian Kirschke

am 31.10.2001

Erstgutachten: Prof. Dr. Rainer Landgraf
Zweitgutachten: Prof. Dr. Peter Schlegel
Sondergutachten: Prof. Dr. Rainer Spanagel

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2002

Meiner Großmutter

Inhaltsverzeichnis

1.	Allgemeine Einleitung	3
2.1.	Einleitung [S^{35}]-GTPγS-Autoradiographie-Studie	11
2.2.	Material und Methoden [S^{35}]-GTPγS-Autoradiographie-Studie	17
2.2.1.	Tiere und Tierhaltung	17
2.2.2.	Versuchsablauf und Gruppendesign	17
	Experiment 1	17
	Experiment 2	18
	Experiment 3	19
2.2.3.	Auswahl der Gehirngebiete	19
2.2.4.	[S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie	21
2.2.5.	[H^3]-DAMGO-Bindungsstudie	22
2.2.6.	Auswertung und Statistik	23
2.3.	Ergebnisse [S^{35}]-GTPγS-Autoradiographie-Studie	25
	Experiment 1	25
	Experiment 2	31
	Experiment 3	35
2.4.	Diskussion [S^{35}]-GTPγS-Autoradiographie-Studie	37
3.1.	Einleitung <i>low dose</i> Naloxon-Konzept	42
3.2.	Material und Methoden <i>low dose</i> Naloxon-Konzept	46
3.2.1.	Tiere und Tierhaltung	46
3.2.2.	Morphinpellets	46
3.2.3.	Experimente im <i>open field</i>	47
	Verabreichung von <i>low dose</i> Naloxon akut	47
	Sensitivierung	48
3.2.4.	Experimente in Skinnerboxen	49
	<i>drug discrimination</i>	49
	Opiatentzug in Skinnerboxen	50
3.2.5.	Experiment in Beobachtungsboxen	51
3.2.6.	Auswertung und Statistik	52
3.3.	Ergebnisse <i>low dose</i> Naloxon-Konzept	54
	Morphinpellets	54
	Experimente im <i>open field</i>	55
	Experimente in Skinnerboxen	58
	Experiment in Beobachtungsboxen	61
3.4.	Diskussion <i>low dose</i> Naloxon-Konzept	63

4.1.	Einleitung konditionierter Entzug	68
4.2.	Material und Methoden konditionierter Entzug	74
4.2.1.	Tiere und Tierhaltung	74
4.2.2.	Tiermodell zum konditionierten Entzug	75
4.2.3.	Experiment im <i>open field</i>	77
4.2.4.	Test auf Hyperalgesie (<i>hot plate</i>)	77
4.2.5.	Messung von Stresshormonen	77
4.2.6.	Vergleich des Tiermodells mit einem Stressparadigma	78
4.2.7.	<i>in situ</i> Hybridisierung	79
4.2.8.	Intervention durch Memantin	82
4.2.9.	Auswertung und Statistik	82
4.3.	Ergebnisse konditionierter Entzug	83
1.	Teil: Tiermodell zur Messung konditionierter Entzugssymptome	83
2.	Teil: <i>in situ</i> Hybridisierung	96
3.	Teil: Pharmakologische Intervention durch Memantin	99
4.4.	Diskussion konditionierter Entzug	106
1.	Teil: Tiermodell zur Messung konditionierter Entzugssymptome	106
2.	Teil: <i>in situ</i> Hybridisierung	109
3.	Teil: Pharmakologische Intervention durch Memantin	111
5.	Schlussbetrachtung	113
6.	Literaturverzeichnis	116
	Danksagung	131
	Lebenslauf	132



*Wie dem blühenden Mohn sein Haupt zur Seite herabsinkt,
Wenn die Frucht ihn beschwert und Regenschauer des Lenzes:
Also sank des Jünglings Haupt, vom Helme beschweret.*

Homer, Ilias, VIII. Gesang

1. Allgemeine Einleitung

Die ältesten Belege für die frühzeitliche Kultur des Mohns haben Funde von Mohnsamen und Mohnkapseln geliefert, die bei Ausgrabungen in der Schweiz am Ufer des Bodensees gemacht wurden. All diese Funde stammen aus verschiedenen Perioden der jüngeren Steinzeit, sind also in das 4. Jahrtausend vor Christus zu datieren. Weitere Funde dieser Art wurden in Savoyen und in der Provence gemacht. Ob die Menschen schon damals um der betäubenden Wirkung des Mohns wussten, oder ihn nur als willkommene Abwechslung auf ihrem Speiseplan nutzten, kann auf Grund der Funde nicht geklärt werden. Überhaupt fällt es schwer sowohl den frühesten Zeitpunkt einer Kultivierung der opiumliefernden Mohnpflanze *papaver somniferum* als auch den Zeitpunkt des ersten Gebrauchs oder Missbrauchs festzulegen. Übersetzungen sumerischer (3000 v. Chr.) und assyrischer (1500 v. Chr.) Schrifttafeln liefern jedoch eindeutige Hinweise auf das Prozedere zum Gewinnen von Mohnsaft, welches sich nicht von heutigen Verfahren zur Gewinnung von Rohopium unterscheidet: durch Anritzen der unreifen Mohnkapsel tritt Milchsaft [griech. opos, austretender Saft] aus, trocknet und wird am nächsten Morgen durch Abschaben von der Kapsel gewonnen. Dass die Wirkung des so gewonnenen Opiums durchaus nicht unbekannt war, zeigt die Statue der Schlafgöttin von Gazi (ca. 1500 v. Chr.) (Abbildung 1): 1936 fand der griechische Archäologe Marinatos in Gazi auf Kreta die aus Ton gebrannte Büste einer Frau, aus deren Kopf 3 Mohnkapseln herauswachsen. Die Darstellung derselben ist erstaunlich originalgetreu und weist dieselben Kerbungen auf, die die Sumerer 1500 Jahre vorher beschrieben hatten. Das Gesicht dieser Frauenbüste wirkt selig verklärt und vermutlich stellt diese Büste zum ersten Mal in der

Geschichte der Menschheit die Wirkung des Opiums dar. Der angeblich blinde Homer (ca. 700 v. Chr.) dürfte den Mohn und seine Wirkungen gut gekannt haben; mehrere Stellen in der „Odyssee“ und „Ilias“ deuten darauf hin. Des Weiteren gibt es in der griechischen Kultur zahlreiche Hinweise auf die Wirkungsweise des Opiums; die wohl bekanntesten sind die Aufzeichnungen des Arztes Hippokrates: *mekonium*, der durch Auspressen der Mohnpflanze gewonnene Saft wurde wegen seiner narkotischen und obstipatorischen Wirkung empfohlen (Seefelder, 1996).



Abb. 1: Skulptur der Schlafgöttin von Gazi (um 1500 v. Chr.). Fundort: Gazi auf Kreta, 1936. Ausgestellt im Museum von Heraklion

Eine Abwandlung des *mekoniums* durch Zugabe weiterer Inhaltsstoffe wurde vor allem bei den Römern verwendet und als Theriak bezeichnet. Es bestand aus über 60 Inhaltsstoffen, im wesentlichen jedoch aus Gewürzen, Eisenoxid, Schlangenfleisch, Baldrian und Opium. Theriak wurde damals prophylaktisch und regelmäßig gegen Beschwerden aller Art und zur Stärkung eingenommen. Den Aufzeichnungen des Griechen Galenos aus Pergamon, dem Leibarzt des römischen Kaisers und Feldherren Marc Aurel, verdanken wir die wohl erste Aufzeichnung eines Opiatentzugs in der Geschichte. Den Kaiser plagten auf einem Feldzug gegen die Markomannen Gliederschmerzen, Erbrechen, Magenschmerzen, allgemeine Depressionen, eine triefende Nase, Schlafstörungen und ein heftiger Durchfall. Man hatte aus dem fernen Rom zu wenig Theriak mitgenommen (Kreutel, 1987). Bis weit nach der Jahrtausendwende schien das Opium und seine Elixiere im Abendland verschollen, nur wenige Stellen deuten auf eine Verwendung hin. Erst im Mittelalter wurde durch die Kreuzzüge arabische Kunst, Architektur, Alchimie und Medizin nach Europa zurückgebracht und somit auch das Wissen um die Wirkung des Saftes der Mohnkapsel. Der Name des 1493 geborenen Theophrastus Bombastus von Hohenheim ist eng mit der Geschichte des Opiums

in Verbindung zu bringen. Paracelsus, wie er sich später nannte, entwickelte eine zur damaligen Zeit als Wundermittel gehaltene Tinktur, das *laudanum*. Aus heutiger Sicht wissen wir, dass *laudanum* vermutlich ursprünglich kein Opium enthielt; *anodynum specificum* war die Mischung, welche Opium enthielt und wurde von Paracelsus als das Mittel bezeichnet, das „den Schmerz auslöscht wie Wasser das Feuer“ (Seefelder, 1996). Ende des 18. und Anfang des 19. Jahrhunderts machte auch die neue wissenschaftlich-technisch orientierte Wissbegier nicht halt vor der bis dato mystischen Wirkung des Opiums. 1805 gelang dem Paderborner Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner die Isolation des „schlafmachenden Prinzips des Opiums“. Bewandert in griechischer Mythologie nannte er den Stoff, den er durch flüssigen Ammoniak aus einer Opiumlösung gewann, Morphin, nach Morpheus, dem Gott der Träume. Durch die Entwicklung der Injektionsspritze 1855 nahm der Siegeszug des Morphins seinen Lauf, allerdings häuften sich Berichte über erhebliche Nebenwirkungen nach Absetzen der Droge. 1880 erkannte der Berliner Arzt Eduard Levinstein den Zusammenhang zwischen Suchtentstehung und chronischer Morphineinnahme und diskutierte erste Entzugsbehandlungen (Schröder, 1993).

In der Trockenmasse von Rohopium sind etwa 25 Alkaloide enthalten, Morphin stellt mit ca. 12 Prozent das Hauptalkaloid, weitere Nebenalkaloide mit deutlich weniger als 1 Prozent sind unter anderem Papaverin, Thebain, Codein, Narcotin, Noscapin, Narcein und Protopin. Stark analgetisch wirksam sind Morphin und Codein. Versuche die respiratorisch dämpfende Komponente von Morphin zu verringern, mündeten um die Jahrhundertwende in die Entwicklung und intensive Vermarktung von Diacetylmorphin. Dieses Präparat der Bayer AG wurde zum Inbegriff für die suchterzeugende Komponente der Opiate und der Konzern sah sich in den 30er Jahren gezwungen das Produkt vom Markt zu nehmen: Heroin.

Lange wurde über die Wirkungsweise von Morphin und seiner Derivate spekuliert. 1973 konnten 3 Forschergruppen unabhängig voneinander spezifische Bindungsstellen für Morphin in Säugergehirnen nachweisen (Pert und Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973). Einige Jahre nach dieser Entdeckung gelang die weitere Charakterisierung und Differenzierung dieser Bindungsstellen. Bindungsstudien mit Morphinanaloga deckten die Existenz von mindestens 3 verschiedenen Opiatrezeptoren auf: μ -Opiatrezeptoren, benannt nach der hohen Affinität für Morphin, κ -Rezeptoren (hohe Affinität für Benzomorphan-derivate wie z.B. Ketocyclazocine) und einen δ -Rezeptor, der zunächst am *vas deferens* der Maus beschrieben wurde (Gilbert and Martin, 1976; Martin et al., 1976; Lord et al., 1977). Erst 20 Jahre später gelang der molekularbiologische Nachweis dieser Rezeptoren an Hand von Klonierungs-experimenten (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992; Minami et

al., 1993; Wang et al., 1993). Auch die menschlichen Opioidrezeptoren wurden inzwischen kloniert und die dazugehörigen Gene auf chromosomaler Ebene lokalisiert (Befort et al., 1994; Yasuda et al., 1994; Wang et al., 1994). Bei diesen Untersuchungen stellte sich heraus, dass diese Rezeptoren 7 Transmembrandomänen besitzen und zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören (Abbildung 2 und Kap.2.1.).

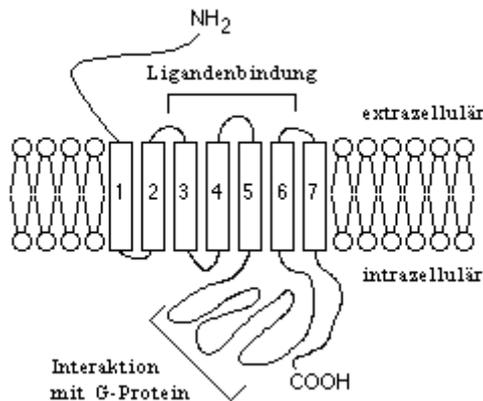


Abb. 2: Schematische Zeichnung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors. Transmembrandomänen 1-7 bilden eine ringähnliche Struktur. Opioidrezeptoren besitzen den gleichen strukturellen Aufbau, Differenzierungen zwischen μ -, κ -, und δ -Rezeptoren ergeben sich durch unterschiedliche Aminosäuresequenzen. Die Homologie der Aminosäuresequenzen zwischen den 3 Rezeptortypen ist wie folgt: extrazellulär 34-40 Prozent, intrazellulär 63-66 Prozent, Transmembranregion 73-76 Prozent (Minami und Satoh, 1996).

Die Entdeckung der Opioidrezeptoren warf die Frage nach deren physiologischer Bedeutung auf, denn es schien unwahrscheinlich, dass ein Organismus Rezeptoren allein für exogene Stoffe bereit hält. 1975 konnte der Nachweis endogener Opiatliganden erbracht werden (Hughes et al., 1975). Erstaunlicherweise bestanden diese Liganden nicht aus einem einzelnen Molekül wie zum Beispiel Morphin, sondern stellten sich als 2 strukturverwandte Pentapeptide dar, mit der Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu. Diese Peptide wurden Met- und Leu-Enkephalin benannt. Intensive Arbeiten auf diesem Gebiet führten zu der Entdeckung von über 20 weiteren endogenen Opioidpeptiden, die alle die N-terminale Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe-Met/Leu haben. Differenzierungen ergaben sich in der Länge der Sequenzen, die von 5 bis 31 Aminosäuren reichen können. Herausragend aus dieser Reihe von Opioidpeptiden sind β -Endorphin, mit einer außerordentlichen analgetischen Potenz, vermittelt über μ -Opioidrezeptoren und Dynorphin A, ein 17-Aminosäurepeptid mit deutlich unterschiedlichem Verteilungsmuster im Nervengewebe und unterschiedlichem pharmakologischen Profil im Vergleich zu β -Endorphin (Hökfelt et al., 1977; Bloom et al.,

1978). Der Grund für diese Differenzierung und Vielfalt an Opioidpeptiden liegt in einem gewebespezifischen, posttranslationalen Prozessieren dreier unterschiedlicher Opioidpeptidvorläufer-Moleküle. Diese werden als Pro-Opiomelanocortin, Pro-Dynorphin und Pro-Enkephalin bezeichnet. Aus Pro-Opiomelanocortin kann das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), β -Endorphin und das Melanocyten-stimulierende Hormon (MSH) prozessiert werden. Pro-Enkephalin dient als gemeinsames Vorläufermolekül für Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und längerkettige δ -agonistische Opioidpeptide. Dynorphin A/B und Neoendorphin werden aus Pro-Dynorphin gebildet (Nakanishi et al., 1979; Akil et al., 1998). Die Frage, ob die 3 verschiedenen Vorläufermoleküle und deren opioiderge Endprodukte sich den Rezeptortypen μ , κ und δ zuordnen lassen, kann mit geringfügigen Überschneidungen bejaht werden. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Opioidrezeptortypen, deren endogenen/exogenen spezifischen Liganden, Wirkungsweise und die wichtigsten Verteilungsmuster im Gehirn. Für jeden Rezeptortyp sind weitere Subklassifizierungen postuliert und zum Teil auch schon bestätigt worden. μ -Opioidrezeptoren lassen sich in $\mu 1$ - und $\mu 2$ -Rezeptoren klassifizieren mit zum Teil unterschiedlichem pharmakologischen Profil (Pasternak und Wood, 1986). Bindungsstudien und Verhaltensexperimente deuten auch im Fall der δ -Opioidrezeptoren auf Subtypen hin ($\delta 1$ und $\delta 2$) (Portoghese et al., 1992). Die anfänglichen Befunde von 3 Subtypen des κ -Opioidrezeptors konnten sich nach weiteren Untersuchungen nicht bestätigen, so dass auch hier davon auszugehen ist, dass 2 Unterklassen dieses Rezeptortyps bestehen (Zukin et al., 1988; Clark et al., 1989; Raynor et al., 1994). Verschiedene Untersuchungen zur Identifizierung weiterer Subtypen von Opioidrezeptoren waren bis dato erfolglos. 1994 konnten jedoch in verschiedenen Laboratorien Klone isoliert werden, die eine hohe Strukturhomologie zu den bekannten Opioidrezeptoren aufwiesen. Allerdings konnten keine oder nur stark verminderte Bindungsaffinitäten der bekannten Liganden festgestellt werden. (Bunzow et al., 1994; Mollereau et al., 1994). Ein Jahr später konnten 2 Forschergruppen unabhängig voneinander den endogenen Liganden dieser Rezeptoren nachweisen (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995): ein aus 17 Aminosäuren bestehendes Peptid mit außerordentlich hoher Sequenzhomologie zu Dynorphin A. Es unterscheidet sich am N-terminalen Ende zu Dynorphin A im Wesentlichen nur im Austausch einer Aminosäure (Phe-Gly-Gly-Phe an Stelle von Thy-Gly-Gly-Phe). Offensichtlich bewirkt der Austausch von nur

μ-Rezeptor	κ-Rezeptor	δ-Rezeptor
<i>endogene Liganden</i> β-Endorphin Endomorphin-1 Endomorphin-2	<i>endogene Liganden</i> Dynorphin A/B Neoendorphin	<i>endogene Liganden</i> Met-Enkephalin Leu-Enkephalin längerkettige Peptide
<i>exogene Liganden</i> Morphin (Heroin, Codein) Methadon DAMGO	<i>exogene Liganden</i> U69593	<i>exogene Liganden</i> DPDPE
<i>Funktion</i> Analgesie Euphorie Respiration Immunregulation Thermoregulation neuroendokrine Sekretion gastrointestinale Regulation	<i>Funktion</i> Analgesie Sedation Dysphorie Diurese neuroendokrine Sekretion	<i>Funktion</i> Analgesie gastrointestinale Regulation Immunregulation
<i>Vorkommen</i> Neocortex, Thalamus, Nucleus accumbens, Hippocampus, Amygdala, Locus coeruleus Darm Rückenmark	<i>Vorkommen</i> Amygdala Hippocampus Hypothalamus Thalamus Nucleus accumbens Substantia nigra Rückenmark	<i>Vorkommen</i> Bulbus olfactorius Neocortex Nucleus accumbens Hippocampus Amygdala Darm Rückenmark

Tab 1: Übersicht über Liganden, Funktion und Vorkommen der Opioidrezeptoren. Angaben über Vorkommen sind nicht vollständig und weisen nur die wichtigsten Kerngebiete aus (Dhawan et al., 1998; Harrison et al., 1998)

einer Aminosäure ein eklatant verändertes Bindungsverhalten an den bereits bekannten Opioidrezeptoren. Es wurde von Reinscheid et al. (1995) Orphanin FQ, von Meunier et al. (1995) Nociceptin benannt. Die Entdeckung dieser Rezeptoren und ihrer endogenen Liganden eröffnet ein bis dato völlig unbekanntes neuropeptiderges System mit hohem Verwandtschaftsgrad zum opioidergen System, wie aus dem Vergleich der Vorläufermoleküle hervorging (Mollereau et al., 1996; Nothacker et al., 1996). Die Identifizierung und Analyse dieses Vorläufermoleküls zu Orphanin FQ/Nociceptin durch Nothacker et al. (1996) und Pan et al. (1996) lassen auf die Kodierung weiterer biologisch relevanter Peptide dieser Klasse schließen. Die neuroanatomische Verteilung dieses Systems weist auf eine wichtige Rolle im Cortex, Hippocampus und einer Reihe von sensorischen Arealen hin (Neal et al., 1999). Ein Einfluss von Nociceptin auf die Aktivität der Neurone, die

für die circadiane Steuerung verantwortlich sind, konnte ebenfalls nachgewiesen werden (Allen et al., 1999).

Gerade die Entdeckung dieses Systems, welches zum opioidergen System verwandt ist, legt die Vermutung nahe, dass viele der schon als aufgeklärt geltenden Mechanismen und Funktionen in der Opioidpharmakologie immer wieder der Überprüfung und Neubewertung an Hand der aktuellen Forschungsergebnisse bedürfen. Opiate und ihre meist synthetisch hergestellten Derivate stellen heute nach wie vor die potentesten Medikamente zur Schmerzbekämpfung dar. Allerdings konnten bis heute keine Opiatabkömmlinge gefunden werden, die nicht den Prinzipien von Toleranz, Abhängigkeit und Entzugssymptomatik nach Absetzen einer chronischen Medikation unterworfen sind. Opiate können ihre akute schmerzlindernde Wirkung nur über die Aktivierung der vorgestellten Rezeptoren entfalten; die intrazellulären Veränderungen, die in Toleranz und Abhängigkeit unter chronischer Verabreichung münden, können nicht von der Opioidrezeptoraktivierung abgekoppelt werden.

Die Aufklärung der Veränderung intrazellulärer Mechanismen unter chronischer Opiatverabreichung mittels molekularbiologischer Untersuchungsmethoden lieferte in den letzten Jahren weitreichende Einblicke in die Funktionalität opioidgesteuerter Neurone. Dennoch bleiben Unklarheiten bestehen, gerade was die Interaktion des Opioidrezeptors mit dem nachgeschalteten G-Protein betrifft (siehe Abbildung 2). Die vorliegende Arbeit versucht deshalb in Kapitel 2 zu klären, inwieweit μ -Opioidrezeptor-gekoppelte G-Proteine in Abhängigkeit und Entzug verändert sind. Untersuchungsmethode war hierbei, neben verhaltensbiologischen Versuchen, eine in den letzten Jahren entwickelte Autoradiographie, die es erlaubt, Gewebe *in situ* zu untersuchen.

Kapitel 3 beschäftigt sich mit einem Forschungsansatz zur Verstärkung einer Opiatdosierung unter Zugabe eines klassischen Opiatantagonisten, in äußerst geringer Konzentration. Dieses Konzept könnte den Zielkonflikt zwischen wirkungsvoller Analgesie und deutlich verminderter Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung lösen. Untersuchungen in der Schmerzforschung lassen dieses Konzept als vielversprechend erscheinen. Ziel in diesem Teil der vorliegenden Arbeit war, dieses Konzept auch auf andere opiatvermittelte Wirkungen zu untersuchen, wobei ein besonderer Schwerpunkt auf die Untersuchung des angedachten und noch wenig beschriebenen entzugsvermindernden Effekts einer zusätzlichen Verabreichung von Opiatantagonisten (zu Opiatagonisten) gelegt wurde (Crain und Shen, 1996). Dieser Teil bedient sich rein verhaltensbiologischer Untersuchungsmethoden.

Kapitel 4 beschäftigt sich mit einer speziellen Form der Entzugssymptomatik, dem sogenannten konditionierten Entzug: in einer bestehenden Opiatabhängigkeit können sowohl positive als auch negative Begleiterscheinungen der Sucht mit einem ursächlich neutralen Umweltreiz assoziiert werden, so dass (analog zum Pavlow'schen Hund) eine klassische Konditionierung stattfinden kann. Entzugserfahrungen während einer bestehenden Abhängigkeit können so mit zunächst neutralen Stimuli assoziiert werden, so dass diese Stimuli nach vollzogener Drogenabstinenz einen körperlichen Entzug provozieren können, der ursächlich physiologisch nicht gegeben sein kann. Diese Konditionierung findet unabhängig vom persönlichen Willen der Einzelperson statt (O'Brien et al., 1977, 1992). Das verschiedenartige Spektrum an körperlichen und psychischen Entzugssymptomen legt die Vermutung nahe, dass durch eine Opiatabhängigkeit langfristige Störungen und Veränderungen des gesamten Nervensystems auf unterschiedlichen Ebenen hervorgerufen werden (Koob et al., 1988). Diese Beeinflussungen lassen sich am treffendsten durch die *opponent-process-theory* erklären, nach der die wiederholte Drogeneinnahme Gegenregulationsmechanismen im Körper hervorruft. Diese Gegenregulationen treten beim Fehlen der extern zugeführten Droge in den Vordergrund und haben Symptome zur Folge, die allgemein mit körperlichem und psychischem Entzug beschrieben werden können. Das Bedürfnis diese Entzugserscheinungen zu mildern, wird in der *opponent-process-theory* der Suchtentwicklung als der eigentliche Grund für die Motivation angesehen, die kontinuierliche Drogenselbstverabreichung fortzusetzen und folglich die Drogenabhängigkeit aufrechtzuerhalten (Koob et al., 1989a). Diese Entzugserfahrung während einer bestehenden Abhängigkeit steht im Verdacht, nachhaltige Wirkungen auf einen Entzugs-therapieerfolg zu haben. Ziel dieses Teils der Arbeit war, ein Tiermodell zur Messung eines konditionierten Entzugssymptoms zu etablieren, welches einer Datenerhebung auf Basis eines Beobachtungsexperimentes gerecht wird. Des Weiteren wurde versucht, den Zustand eines Tieres während des konditionierten Entzugs durch zusätzliche Verhaltenstests und Stresshormonbestimmungen weiter zu charakterisieren. Parallel dazu erfolgte eine neuroanatomische Untersuchung der Gehirnregionen, die im Verdacht stehen, ein konditioniertes Entzugssymptom auslösen zu können (*in situ* Hybridisierung, c-fos-mRNA). Abschließend sollte ein Pharmakon (Memantin, NMDA-Antagonist) getestet werden, das möglicherweise einem konditionierten Entzugssymptom entgegenzuwirken vermag.

2.1. Einleitung [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie-Studie

Opiatentzug stellt sich als ein äußerst komplexes Geschehen dar. Eine Vielzahl an körperlichen und seelischen Beschwerden während eines Opiatentzugs legen die Vermutung nahe, dass es sich im Falle einer Opiatabhängigkeit und dem daraus resultierenden Entzug um weitreichende Veränderungen und Beeinträchtigungen neuronaler Strukturen und neurochemischer Prozesse handelt. Als körperliche Entzugserscheinungen können Gliederschmerzen, Erbrechen, Schlafstörungen, erhöhter Blutdruck, Puls und Temperatur, Appetitlosigkeit, Ruhelosigkeit und Diarrhöe, einhergehend mit hohem Gewichtsverlust, aufgezählt werden. Psychischer Entzug äußert sich in Depressionen, Angstzuständen und übermäßigem Verlangen nach dem Suchtstoff, welches immer wieder über Jahre hinweg auftreten kann. Dieses Verlangen wird im allgemeinen als *craving* bezeichnet.

Beide Entzugskomponenten können nicht voneinander getrennt werden, sie treten aber zu unterschiedlichen Zeitpunkten eines Entzugs verstärkt auf (Himmelsbach, 1942). Bei einem durchschnittlichen, unbehandelten Heroinentzug treten die ersten Symptome ca. 6 Stunden nach dem letztmaligen Verabreichen der Droge auf. Hier steht dann neben ersten körperlichen Beschwerden, wie zum Beispiel Durchfall, vor allem ein übermäßiges Verlangen nach dem missbrauchten Stoff im Vordergrund. Der volle körperliche Entzug erreicht hingegen erst nach 48 Stunden seinen Höhepunkt (Ray et al., 1993). Auch über den körperlichen Entzug hinaus, dessen akute Symptome nach etwa 7-10 Tagen abklingen, bleiben dennoch Veränderungen über Wochen hinweg bestehen, die sich in einer erhöhten Atmung und Blutdruck, Hyperthermie und Mydriasis (Pupillenverengung) äußern (Himmelsbach, 1942). Die psychische Komponente des Entzugsgeschehens hingegen, in der Hauptsache das *craving*, kann jederzeit durch geeignete Auslöser auftreten und zum Rückfall in eine erneute Abhängigkeit führen.

In den Fokus des Interesses treten die intrazellulären Ereignisse während der Abhängigkeitsentwicklung und des Entzugs. Gerade diese Veränderungen auf molekularer Ebene sind noch nicht vollständig untersucht und verstanden. Fast alle körperlichen Entzugsbeschwerden sind in der Übererregbarkeit des noradrenergen Systems während des Entzugsgeschehens, ausgehend vom größten noradrenergen Nucleus im Gehirn, dem Locus coeruleus, begründet. Die zentrale Beteiligung dieses Kerns in der Entwicklung und Ausprägung von Abhängigkeit, Toleranz und Entzug ist wissenschaftlich hinreichend gesichert (Hayward et al., 1990; Rasmussen et al., 1990; Nestler et al., 1992). Um die Funktionsweise dieser Neurone zu

verstehen, ist es nötig einen Blick auf die Signaltransduktion dieser Neurone zu werfen, einem äußerst wichtigen Funktionsprinzip in der Biologie:

Prinzipiell lassen sich 2 Arten von Rezeptoren unterscheiden: ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Ionotrope Rezeptoren öffnen (oder schließen) nach Aktivierung durch einen spezifischen Agonisten *direkt* einen Ionenkanal, der wiederum die elektrische Leitfähigkeit und somit die Reaktion des Neurons bestimmt (De- oder Hyperpolarisation). Metabotrope Rezeptoren hingegen aktivieren primär ein als G-Protein bezeichneten Proteinkomplex, der als Mittler zwischen einem spezifischen Agonisten am Rezeptor und dem Öffnen (oder Schließen) von Ionenkanälen fungiert. Darüber hinaus vermag das G-Protein Enzyme zu aktivieren oder inhibieren, die wiederum intrazelluläre Botenstoffe (*second messenger*) produzieren. Gerade dieser Schritt stellt sich als besonders bedeutsam dar, da über diese Signaltransduktionskaskade Transkriptionsfaktoren gebildet werden können, die einen Einfluss auf die genomische Aktivität haben. Somit können sich längerfristige Veränderungen in der Funktionalität einzelner Neurone manifestieren.

Die Klassifizierung der G-Proteine erfolgt nach ihrem Einfluss auf nachgeschaltete Enzymkomplexe, in der Hauptsache Adenylatcyclasen und Phospholipasen, die wiederum für die Produktion und intrazelluläre Regulation von *second messenger*-Molekülen (z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Inositol-3-Phosphat (IP₃)) verantwortlich sind. G-Proteine, die auf diese Enzyme stimulativ wirken, werden als G_s bezeichnet, inhibitorisch wirkende als G_i. Daneben gibt es noch eine Reihe weiterer G-Proteine, die auf Grund ihrer biochemischen Charakterisierung der Familie der G_T-Proteine zugeordnet werden und als G_o bezeichnet werden. Abbildung 3 gibt einen Überblick über den Aufbau und die einzelnen Schritte nach Aktivierung des Proteinkomplexes durch einen Agonisten. Das G-Protein besteht aus 3 unterschiedlichen Untereinheiten, die je nach Aktivierung unterschiedlich miteinander konfiguriert sind: im Ruhezustand sind alle 3 Untereinheiten, α , β und γ , miteinander assoziiert, die α -Untereinheit bindet dabei GDP. Nach Aktivierung durch einen Agonisten dissoziiert die α -Untereinheit, wobei es zum Austausch von GDP und zur Bindung von GTP kommt. Die β - und γ -Untereinheiten bilden dabei ein Dimer. In dieser Form können Ionenkanäle (K⁺, Ca²⁺) moduliert werden und/oder Enzymkomplexe aktiviert oder inhibiert werden, die die Bildung von *second messenger*-Molekülen steuern. Durch Hydrolyseaktivität der α -Untereinheit wird GTP zu GDP transformiert und auf Grund der daraus resultierenden Konformationsänderung reassoziieren die Untereinheiten zum ursprünglichen, inaktiven Zustand.

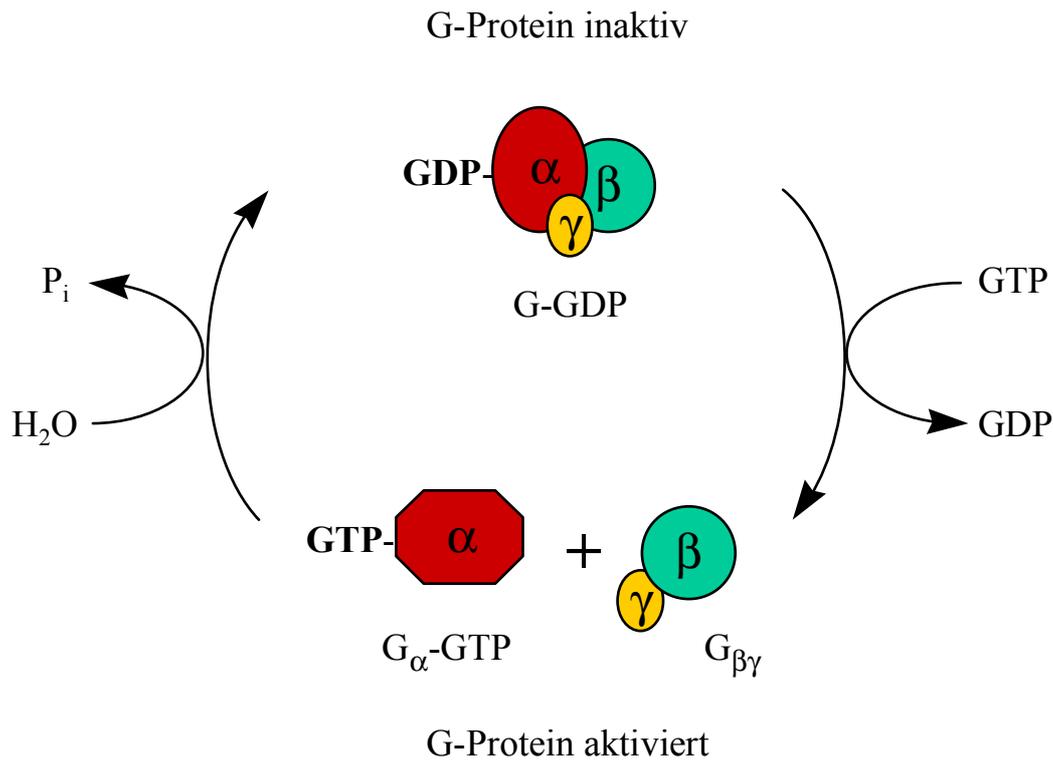


Abb. 3: G-Proteinzyklus, modifiziert nach Lubert Stryer, Biochemistry, 1995. Erläuterung siehe Text

Im Fall der Opiatrezeptoren handelt es sich in der überwiegenden Zahl um Rezeptoren, die an G-Proteine der G_i/G_o -Familie gekoppelt sind.

Die *akute* Verabreichung von Opiaten hat in den Neuronen des Locus coeruleus auf Grund der bereits dargestellten Signaltransduktionskaskade eine reduzierte Feuerrate zur Folge. Diese Hyperpolarisation basiert auf der Öffnung von K^+ -Kanälen und Schließung von depolarisierenden Ca^{2+} -Kanälen. Darüber hinaus wird die Adenylatcyclase gehemmt und somit die Bildung von cAMP als intrazellulärer *second messenger* inhibiert (Childers, 1991; Nestler, 1992). Diese Hyperpolarisation geht mit einer messbaren Reduktion des cAMP-Spiegels in den betroffenen Neuronen einher (Wang et al., 1990).

Die Gewährleistung der Homöostase steht in einem funktionierenden biologischen System an erster Stelle. Unter chronischer Verabreichung von Opiaten versucht deshalb das Neuron die akute inhibitorische Wirkung von außen zugeführter Opiate zu kompensieren. Diese Kompensation wird allgemein als neurobiologisches Korrelat für Toleranz gesehen und drückt sich in einer gesteigerten Feuerrate aus, die trotz chronischer Opiatgabe wieder auf das Level unter naiven Bedingungen zurückkehrt (Christie et al., 1987). Beim Absetzen der externen Opiatzufuhr oder durch Administration eines geeigneten Antagonisten kommt es zu überschießenden neuronalen Feuerraten, die weit über Entladungsraten unter normalen

Bedingungen hinausgehen (Rasmussen et al., 1990). Die Ursachen dieser neuronalen Übererregbarkeit im Entzug konnten durch Bindungsstudien (meist durchgeführt mit [H^3]-markierten selektiven Opioidagonisten) und Bestimmung von Opioidrezeptor-mRNA nicht oder nur unzureichend geklärt werden. Gerade die Untersuchungen zur Anzahl und Dichte von Opioidrezeptoren nach chronischer Opiatzufuhr erbrachten zum Teil gegensätzliche Ergebnisse: die Bandbreite der Ergebnisse reicht von keinerlei Unterschied (Höllt et al., 1975), bis zu erhöhter Dichte (Brady et al., 1989) oder gar erniedrigt (Tao et al., 1987). Diese Untersuchungen belegen, dass Toleranz und Abhängigkeit nicht auf der Anzahl von Opioidrezeptoren beruhen, selbst eine Veränderung in Anzahl und Dichte von opiatgesteuerten Ionenkanälen konnte nicht festgestellt werden (Loh et al. 1990). Wenn Rezeptor- und Ionenkanaldichte keine schlüssigen Konzepte zur Erklärung von Toleranz und Abhängigkeit und somit zur überschießenden neuronalen Aktivität im Entzug liefern, müssen intrazelluläre Ereignisse und Veränderungen verantwortlich für Toleranz und Abhängigkeit sein. Rezeptoreffektivität und intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden erscheinen geeignete Faktoren zu sein. Eric Nestler und Kollegen haben in einer Reihe von Experimenten nachgewiesen, dass gerade das cAMP-System unter chronischer Opiatgabe massiv verändert ist (Nestler, 1992; Nestler et al., 1988a,b, 1989). Die Veränderungen bestehen in einer erhöhten Expression von Adenylatcyclasesubtypen (Matsuoka et al. 1994; Lane-Ladd et al. 1997), einer erhöhten katalytischen Aktivität der Proteinkinase A (Nestler et al., 1988a; Lane-Ladd et al. 1997) und einer erhöhten Proteinphosphorylierung (Guitart et al., 1989). Dass diese Vorgänge in ihrer Gesamtheit als kompensatorische Antwort der Zelle auf die inhibierende Wirkung von Opiaten anzusehen ist, gilt als gesichert. Darüber hinaus ist die Korrelation von „hypertrophiertem“ cAMP-System und der elektrischen Übererregbarkeit der Locus coeruleus-Neurone nachgewiesen (Nestler, 1992). Die Mechanismen mit denen eine chronische Opiatverabreichung Teile der cAMP-gesteuerten Signaltransduktionskaskade verändert, sind unbekannt. Es wird allerdings eine Veränderung in der Genexpression der betroffenen Neurone diskutiert (Nestler et al., 1993). Diese Diskussion basiert auf der Beobachtung, dass in Neuronen des Locus coeruleus die Expression und Phosphorylierung des cAMP-regulierten Transkriptionsfaktors *cAMP response binding element* (CREB) selektiv nach chronischer Morphingabe erhöht ist (Guitart et al., 1992). Unterstützung erfährt die Hypothese von veränderter Genexpression unter chronischer Opiatverabreichung durch die Untersuchungen von Maldonado et al. (1996c) und Lane-Ladd et al. (1997). Mäuse, die durch genetische Eingriffe CREB nicht exprimieren, entwickeln eine signifikant geringere Opiatabhängigkeit und weniger Entzugssymptome als die entsprechenden Kontrollen. Lane-Ladd et al. (1997) konnten in Antisense-Oligonukleotid-Studien gegen CREB und in weiteren

Studien auf biochemischer, elektrophysiologischer Ebene und in Verhaltensversuchen die Rolle von CREB in der Entwicklung von Abhängigkeit und der Expression von Entzugerscheinungen weiter charakterisieren. So konnte unter chronischer Morphinverabreichung ein erhöhter Level der Adenylatcyclasesubtypen I und VIII festgestellt werden. Diese Erhöhung ist im Gegensatz zur erhöhten katalytischen Aktivität der Proteinkinase A abhängig von erhöhten CREB-Werten. Eine persistierende Inhibition des cAMP-Systems durch Opiate bewirkt offensichtlich eine erhöhte Transkription von CREB und somit in Folge eine erhöhte Transkription der Adenylatcyclase.

Untersuchungen von μ -Opioidrezeptor-gekoppelten G-Proteinen nach chronischer Opiatverabreichung deuten darauf hin, dass auch hier Veränderungen angezeigt sind. Die Veränderungen betreffen sowohl die Zusammensetzung der Untereinheiten des G-Proteins als auch die katalytische Aktivität der GTPase, wobei auch hier zum Teil widersprüchliche Ergebnisse vorliegen. So erscheint nach einer Studie von Tao et al. (1993) die katalytische Aktivität der GTPase in Form einer verringerten Affinität für GTP verändert. Selley et al. (1997) konnten diesen Befund widerlegen und lediglich eine verringerte Umsetzungsgeschwindigkeit nach chronischer Morphingabe feststellen. Untersuchungen zur Zusammensetzung von G-Proteinuntereinheiten zeigten einen Anstieg der α -Untereinheit nach chronischer Opiatverabreichung, der $\beta\gamma$ -Komplex erscheint unverändert (Nestler et al, 1988a,b; van Vliet et al., 1993).

Limitierende Faktoren all dieser Untersuchungen liegen in der Tatsache, dass in diesen Studien entweder auf Zellkulturen oder auf Zellhomogenate zurückgegriffen werden musste. Die Ergebnisse stellen somit nicht den funktionellen Zustand einer weitgehend intakten Zelle dar. In den letzten Jahren konnten durch die Weiterentwicklung der $[S^{35}]$ -GTP γ S-Autoradiographie die Möglichkeiten zur Untersuchung von G-Proteinen weiter verbessert werden. So konnte erstmals in einer Studie von Sim et al. (1996) an Gehirnschnitten mit hoher anatomischer Auflösung *in situ* eine verringerte μ -Opioidrezeptor-gekoppelte G-Proteinaktivität unter chronischer Morphinverabreichung in einigen Gehirnstammkernen nachgewiesen werden: Locus coeruleus, dorsaler Raphekern, lateraler und medialer Nucleus parabrachialis und im commissuralen Nucleus des Tractus solitarius. Diese Strukturen scheinen neben der Aufrechterhaltung der Homöostase und der Regulation von autonomen Funktionen auch an der Entwicklung von Abhängigkeit und an der Expression von Entzugerscheinungen beteiligt. Keine Veränderungen konnten im Nucleus accumbens, in der Amygdala, im Thalamus und in der Substantia nigra detektiert werden.

Über die Aktivität μ -Opioidrezeptor-gekoppelter G-Proteine in Entzug gibt es noch keine Erkenntnisse, so dass die Frage nicht geklärt ist, inwieweit die überschießende neuronale Aktivität im Entzug von G-Proteinen und deren Funktionalität beeinflusst wird. Ziel dieser Studie ist deshalb die Untersuchung der Aktivität μ -Opioidrezeptor-gekoppelter G-Proteine in Entzug unter Berücksichtigung verschiedener Parameter. Untersuchungsmethode ist die von Sim et al. (1995) weiter entwickelte [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie, die es ermöglicht am weitgehend intakten Gehirnschnitt diese Aktivitätsmessung durchzuführen und gleichzeitig eine genaue anatomische Lokalisation dieser Aktivität zu bestimmen. Dadurch ist es auch möglich am selben Gehirn weitere molekularbiologische Untersuchungsmethoden durchzuführen (z.B. eine Ligandenbindungstudie), um etwaige Unterschiede in der Interaktion Rezeptorbindung/G-Proteinaktivierung zu detektieren.

2.2. Material und Methoden [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie-Studie

2.2.1. Tiere und Tierhaltung

Die Versuche wurden an experimentell naiven, männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Nach Anlieferung wurden die Tiere in Einzelkäfige umgesetzt und in dem Raum gehalten, in dem die einzelnen Experimente stattfanden. Die Raumtemperatur betrug 21 ± 2 °C bei ca. 55 % Luftfeuchtigkeit. Mittels einer Zeitschaltuhr wurde ein künstlicher 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus erzeugt (Licht an: 07.00 Uhr). Futter (Fa. Atormin, Ratten-Mäusediät) und Wasser stand über die gesamte Versuchsdauer zur freien Verfügung bereit. Vor Beginn der Experimente wurden die Tiere mindestens 5 Tage an die Haltungsbedingungen habituiert. Bei Anlieferung wogen die Ratten ca. 200 - 220 g.

2.2.2. Versuchsablauf und Gruppendesign

Ziel der im folgenden beschriebenen Experimente ist die Untersuchung μ -Opioidrezeptor-gekoppelter G-Proteine in verschiedenen Stadien des Opiatentzugs. Die Studie gliedert sich in drei Einzelexperimente:

Experiment 1:

Den Versuchstieren wurde zur Erzeugung einer Opiatabhängigkeit alle 12 Stunden über 14 Tage Morphinlösung (Morphin-HCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) injiziert (Gruppe 1 und Gruppe 2). Begonnen wurde mit einer Dosis von 5 mg/kg, 100 mg/kg war die nach 14 Tagen erreichte Enddosis. Bei der täglichen Steigerung wurde die 1,25-fache Dosis des Vortages nicht überschritten. Die Kontrollgruppe erhielt jeweils zur gleichen Zeit eine Kochsalzinjektion (Gruppe 3). Die Tieranzahl betrug jeweils 8 Ratten pro Gruppe.

Nach Erreichen der höchsten Morphindosierung wurden die Tiere nach dem Zufallsprinzip in 2 Gruppen unterteilt: In Gruppe 1 wurde weiterhin eine hohe Morphinabhängigkeit gewährleistet durch fortgesetzte Morphininjektionen (100 mg/kg alle 12 Stunden); in Gruppe 2 wurde durch Absetzen der Morphininjektionen für 36 Stunden spontaner Entzug induziert. Zur notwendigen Gleichbehandlung wurde den Tieren der Gruppe 2 alle 12 Stunden

physiologische Kochsalzlösung injiziert. Nach der 36 Stunden andauernden Entzugsphase wurden in allen Gruppen körperliche Entzugssymptome durch ein Beobachtungsexperiment erfasst und die Gewichtsveränderung in diesen 36 Stunden ermittelt. Als Entzugssymptome wurden die von Bläsig et al. (1973) und von vielen anderen Autoren beschriebene Entzugssymptome gewertet und mittels Strichlisten innerhalb der Beobachtungszeit (30 min) erfasst. Die erfassten Entzugssymptome waren Zähneknirschen (*teeth chattering*), kurze Episoden von schnellem repetitiven Schütteln des Rumpfes, wobei die Tiere auf ihren Hinterpfoten stehen (*wet dog shakes*), ein als Katzenbuckel bezeichnetes Symptom (*writhing*), mehr als 10 Sekunden andauerndes Schnüffeln, wobei die Tiere eine schlangenähnliche Haltung einnehmen (*sniffing*), Peniserektion (*penile erection*) und Schütteln der vorderen Extremitäten (*paw tremor*). Diese Symptome wurden ihrer Häufigkeit nach erfasst. Unmittelbar nach der Beobachtung wurden die Tiere dekapitiert.

Das Symptom Gewichtsverlust wurde durch Wiegen der Tiere nach der halbstündigen Beobachtung ermittelt und in Prozent ausgewertet, wobei das mittlere Gewicht der letzten 3 Tage vor der Entzugsphase als 100 % festgesetzt wurde.

Experiment 2:

Auch in diesem Experiment wurde zur Induktion einer Morphinabhängigkeit den Versuchstieren alle 12 Stunden Morphininjektionen in aufsteigenden Dosierungen verabreicht (siehe Experiment 1). Bei Erreichen der maximalen Dosis von 100 mg/kg Morphin-HCl wurde den Tieren 6 Stunden nach der Morphininjektion der Opiatantagonist Naloxon (Merck, Darmstadt, Deutschland) in einer Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht injiziert. Die Ratten wurden 4 verschiedenen Gruppen zugeordnet und zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Naloxoninjektion dekapitiert. Die Gehirnentnahme erfolgte 5, 10, 20 und 60 Minuten nach der Naloxoninjektion (jeweils 5 Tiere/Gruppe). Um einen möglichen Eigeneffekt von Naloxon auf μ -Opioidrezeptor-gekoppelte G-Proteine zu kontrollieren, wurde eine [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie in Salinekontrollen und Tieren durchgeführt, die Naloxon in einer Dosis von 1 mg/kg s.c. verabreicht bekamen. Hierzu wurden die Tiere 5 Minuten nach der Naloxoninjektion (bzw. Salineinjektion) dekapitiert, die Hirne sofort entnommen und in Methylbutan auf Trockeneis schockgefroren.

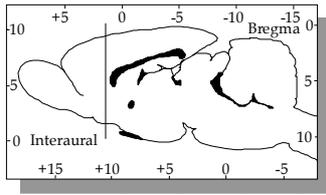
Eine Beobachtung der Entzugssymptome wurde nicht durchgeführt, dennoch zeigten sich auch in diesen Tieren deutliche Entzugssymptome, deren Erfassung auf Grund des Versuchsdesigns nicht möglich war.

Experiment 3:

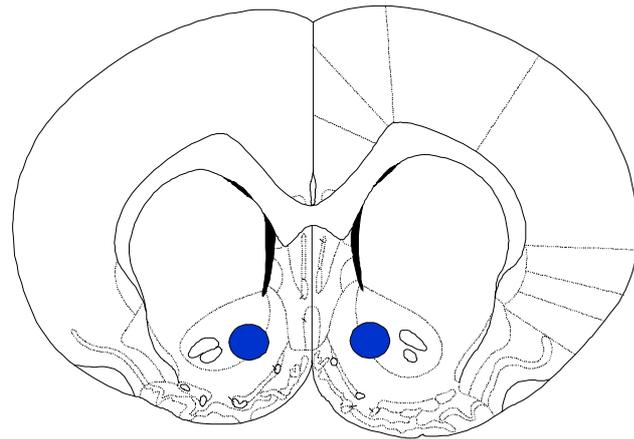
Um sicherzustellen, dass etwaige G-Proteinveränderungen nicht auf die intermittierende Morphinverabreichung während der Abhängigkeitsentwicklung zurückzuführen sind, wurden in einem kleineren Experiment Ratten Morphinpellets (75 mg Morphinbase, siehe Kap. 3.2.2.) implantiert, die eine kontinuierliche und ausreichend stabile Morphinabgabe gewährleisten. Hierzu wurde unter Halothannarkose (Hoechst, Deutschland) im Nackenbereich des Tieres über einen kleinen Schnitt (ca. 1 cm) mittels einer chirurgischen Klemme eine *subcutane* Tasche eröffnet, in die 3, in Nylongaze eingewickelte Morphinpellets eingebracht wurden. Mit Wundklemmen wurde die Wunde verschlossen und anschließend desinfiziert. Zum Zeitpunkt dieser Implantation wogen die Tiere ca. 250 g. Kontrolltieren wurde ein Placebopellet ohne Morphin implantiert. Nach sieben Tagen wurde in einem Teil der Morphinpellet-implantierten Tieren mittels Naloxon (1 mg/kg) körperliche Entzugssymptome provoziert, der andere Teil erhielt Saline. Mit den Placebo-implantierten Tieren wurde ebenso verfahren. 60 Minuten nach der Injektion wurden die Tiere getötet, das Gehirn entnommen und schockgefroren.

2.2.3. Auswahl der Gehirngebiete

Als bedeutend für körperliche Entzugsserscheinungen konnte der größte noradrenerge Nucleus im Gehirn, der Locus coeruleus identifiziert werden (Rasmussen et al., 1990). In allen drei Einzelexperimenten nimmt deshalb die Untersuchung dieser Gehirnregion zentralen Raum ein. Nucleus accumbens und die Amygdala erscheinen unter anderem auch bei der hedonistischen Bewertung des Entzugs beteiligt zu sein (Stinus et al., 1990); in den Experimenten 1 und 2 wird diesem Umstand Rechnung getragen. In einer Studie von Sim et al. (1996) konnte neben anderen Hirnstammkernen auch im Nucleus parabrachialis eine deutliche Abnahme an G-Proteinaktivität unter chronischer Morphinverabreichung festgestellt werden. Die Untersuchung dieses Kerngebietes erfolgte deshalb zur Validierung der vorliegenden Studie und weniger in Hinsicht auf seinen Einfluss auf das Entzugsgeschehen.

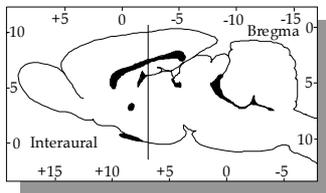


Nucleus accumbens

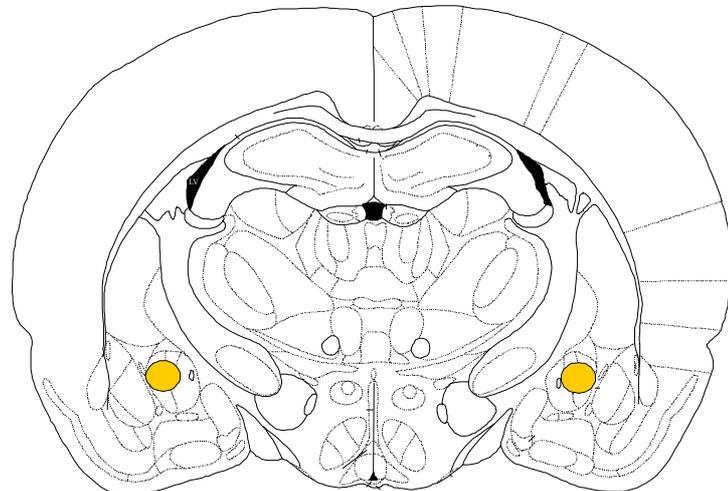


Interaural 10.60 mm

Bregma 1.60 mm

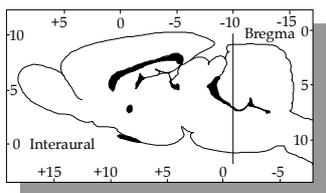


Zentraler Nucleus der Amygdala



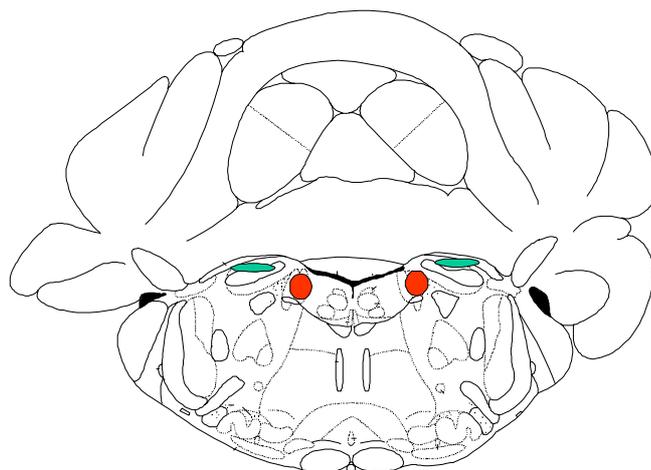
Interaural 6.70 mm

Bregma -2.30 mm



Locus coeruleus

Nucleus parabrachialis



Interaural -0.80 mm

Bregma -9.80 mm

Abb. 4: Illustration und Lage der untersuchten Gehirngebiete. Darstellung verändert nach Paxinos und Watson (1998)

Nur in den Experimenten 1 und 2 wurde der Nucleus parabrachialis untersucht. In Experiment 3 wurde nur auf den Locus coeruleus fokussiert. Auf die Untersuchung weiterer Kerngebiete wurde auf Grund der Ergebnisse aus den Experimenten 1 und 2 verzichtet. Abbildung 4 illustriert die Lage der untersuchten Gehirngebiete an Hand von adaptierten schematischen Zeichnungen von Paxinos und Watson (1998). Die farbigen Markierungen umschreiben das Kerngebiet nicht im Ganzen, sondern dienen nur als Anhaltspunkt.

2.2.4. [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie

Prinzip der Autoradiographie:

Mittels dieser erst vor wenigen Jahren weiterentwickelten Autoradiographie ist es möglich am Gehirnschnitt G-Proteinaktivität zu messen und bestimmten Gehirnregionen zuzuordnen. Grundlage dieses Verfahrens ist der Einsatz von verändertem und radioaktiv markiertem GTP ([S^{35}]-GTP γ S), welches nicht hydrolysiert werden kann. Nach Aktivierung der metabotropen Rezeptoren durch einen geeigneten selektiven Agonisten, bindet das G-Protein irreversibel [S^{35}]-GTP γ S. Durch Auflegen eines Filmes kann über den Schwärzungsgrad der einzelnen Gehirnregionen auf die gebundenen Radioaktivität und somit indirekt über die Aktivität des G-Proteins rückgeschlossen werden. Entscheidend für die Durchführung dieser Autoradiographie ist der Einsatz von GDP in relativ hohen Konzentrationen (2 mM). Diese Konzentration ist nötig um alle G-Proteine in den Ruhezustand zu versetzen und damit eine deutliche Stimulation durch Zugabe des selektiven Agonisten zu erzielen.

Durchführung der Autoradiographie:

Die zu bestimmenden Schnitte wurden über Nacht in einem Exicator bei 4 °C getrocknet. Der erste Präinkubationsschritt erfolgte bei Raumtemperatur für 10 Minuten in einer Lösung aus 50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 0,2 mM EGTA und 100 mM NaCl (pH 7,7) (Sigma). Diese Lösung diente als Grundlage aller weiterer Inkubationsschritte. Die Schnitte wurden dann für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur in dem oben genannten Puffer, dem GDP in einer Konzentration von 2 mM hinzugegeben wurde, inkubiert. Die Hauptinkubation (25 °C, 2 Stunden) erfolgte in kleineren Inkubationsgefäßen, denen in jedem Fall radioaktives [S^{35}]-GTP γ S (0.04 nM) (NEN, Deutschland) und je nach Fragestellung der μ -opioid-selektive Rezeptoragonist [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly⁵-ol]enkephalin (DAMGO, 10 μ M) (Sigma) alleine oder in Kombination mit Naloxon (μ -opioid-selektiver Rezeptorantagonist, 1 μ M) (Sigma)

beigegeben wurde. Dieser Inkubationsschritt erfolgte ebenfalls unter Zugabe von GDP (Sigma) in ausreichend hoher Konzentration von 2 mM. Des Weiteren wurde basale Aktivität ohne Zusatz jeglicher Agonisten oder Antagonisten ermittelt. Unspezifische Bindung wurde durch Zugabe von unmarkiertem GTP γ S (10 μ M) (Sigma) bestimmt. Nach der zweistündigen Inkubation wurden die Schnitte zweimal in eiskalter Pufferlösung für je 30 Sekunden gewaschen, anschließend 5 Minuten in 0,5 % Formaldehyd/50 mM Tris-HCl fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Nach Trocknung über Nacht wurden geeignete Autoradiographiefilme aufgelegt (Hyperfilm β -max, Amersham) und nach 40 Stunden von Hand entwickelt.

2.2.5. [H^3]-DAMGO-Bindungsstudie

Prinzip der Autoradiographie:

Mittels einer Bindungsstudie sollte die μ -Opioidrezeptor-Dichte ermittelt werden. Funktionsprinzip ist die Verwendung von radioaktiv markiertem [H^3]-DAMGO (NEN, Deutschland), in welchem auf Objektträger aufgezogene Schnitte inkubiert werden. Die Auswertung erfolgt durch Densitometrie, nach Exposition dieser Schnitte eines für [H^3]-sensitiven Filmes. Die einzelnen Arbeitsschritte werden im folgenden dargestellt:

Durchführung der Autoradiographie:

Die tiefgefrorenen Gehirne wurden mittels eines Kryostaten auf Objektträger (Superfrost, Menzel) aufgebracht (Schnittdicke 20 μ m). Diese wurden auf Raumtemperatur gebracht und ca. 1 Stunde getrocknet. Nach Umrandung der Schnitte auf dem Objektträger mit einem fetthaltigen Stift (DAKO-Pen, Sigma), erfolgte eine Präinkubation in 50 mM Tris-HCl/150 mM NaCl (pH 7,4) bei 4 °C für 30 Minuten. Pro Objektträger wurden dann ca. 800 μ l [H^3]-markiertes DAMGO in einer Konzentration von 4,2 nM auf die liegenden Objektträger aufgebracht. Für die notwendige Kontrolle wurde bei einigen Schnitten nicht-markiertes DAMGO in 1000-fach höherer Konzentration hinzugegeben. Dieser Inkubationsschritt erfolgte bei Raumtemperatur für 60 Minuten. Durch zweimaliges vorsichtiges Waschen in 4 °C kaltem 50 mM Tris-HCl/150 mM NaCl (jeweils 3 Minuten) wurde ungebundenes DAMGO entfernt. Nach Trocknung der Schnitte über Nacht wurde ein [H^3]-sensitiver Film (Hyperfilm β -max, Amersham) aufgelegt und für 4 Monate exponiert.

2.2.6. Auswertung und Statistik

Auswertung der [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie und Statistik:

Die entwickelten Filme wurden mit Hilfe einer Videokamera (Sony XC-77) digitalisiert und computergestützt ausgewertet (Optimas, BioScan). Der Schwärzungsgrad der einzelnen Gehirnregionen wurde mittels Densitometrie erfasst und die [S^{35}]-Radioaktivität durch Vergleich einem aufgelegten [C^{14}]-Standards (NEN) und eines ermittelten Umrechnungsfaktors bestimmt. Das Ergebnis wurde in nCi/g ausgedrückt.

Der Umrechnungsfaktor wurde errechnet, indem inkubierte Schnitte von den Objektträgern abgezogen wurden, das Gewicht ermittelt und die Radioaktivität in einer Flüssigscintillationsphotometrie bestimmt wurde. Aus den Graustufen und dem aufgelegten [C^{14}]-Standard wurde auf Grund der Ergebnisse der Flüssigscintillationspektrophotometrie ein Umrechnungsfaktor kalkuliert.

Die gewonnenen Daten wurden als Gruppenmittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Statistische Berechnungen wurden mittels einer zwei-faktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, Faktor A: Stimulation \Rightarrow basale Messung versus DAMGO-Stimulation, Faktor B: Gruppen) durchgeführt. Als nachfolgender *post hoc*-Test wurde Newman-Keuls Test verwendet. Wenn die daraus berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war, konnte dieses Ergebnis als signifikant angesehen werden, bei $p < 0,01$ als hoch signifikant.

Auswertung der [H^3]-Autoradiographie und Statistik:

Die Filme der Ligand-Rezeptorbindungsstudien wurden ebenfalls digitalisiert und desitometrisch ausgewertet. Hier erfolgte die Angabe des Ergebnisses in nCi/g durch direkten Vergleich mit einem aufgelegten [H^3]-Standard. Die Ermittlung eines Umrechnungsfaktors war somit nicht notwendig. Statistische Berechnungen wurden mittels einer ein-faktoriellen ANOVA durchgeführt.

Auswertung der Verhaltensexperimente und Statistik:

Die Daten der einzelnen Entzugssymptome wurden als absolute Anzahl innerhalb 30 Minuten pro Gruppe ausgewertet. Sie wurden als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. Statistische Berechnungen wurden mittels einer ein-faktoriellen ANOVA durchgeführt. Die aus der Gewichtsmessung gewonnenen Daten wurden als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. Die statistische Bearbeitung erfolgte auch hier auf Basis einer ein-faktoriellen ANOVA.

Als nachfolgenden *post hoc*-Test wurde hier Fisher's LSD (protected t-Test) verwendet. Wenn die daraus berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war, konnte dieses Ergebnis als signifikant angesehen werden, bei $p < 0,01$ als hoch signifikant.

2.3. Ergebnisse [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie-Studie

Experiment 1:

Ziel des Experiments war die Untersuchung der Aktivität μ -Opioidrezeptor-gekoppelter G-Proteine nach 36 Stunden spontanen Entzugs.

Verhaltensdaten:

Aus den erhobenen Verhaltensparametern konnte ein ausreichend starker Entzug nachgewiesen werden. Sowohl Verhaltensbeobachtung als auch Gewichtsermittlung erfolgte nach 36 Stunden spontanen Entzugs (Versuchs- und Gruppendesign: Seite 17). Abbildung 5 zeigt die Gewichtsveränderung der einzelnen Gruppen nach der 36-stündigen Entzugsphase. Während die Salinekontrollen geringfügig an Gewicht zunahmen und die morphinabhängigen Tiere in ihrem Gewicht stagnierten, verloren die Tiere der Entzugsgruppe deutlich an Körpergewicht innerhalb des Versuchszeitraumes. Damit unterscheidet sich diese Gruppe hoch signifikant von den beiden anderen Vergleichsgruppen ($F[2,12]=64,7$, $p<0,0001$).

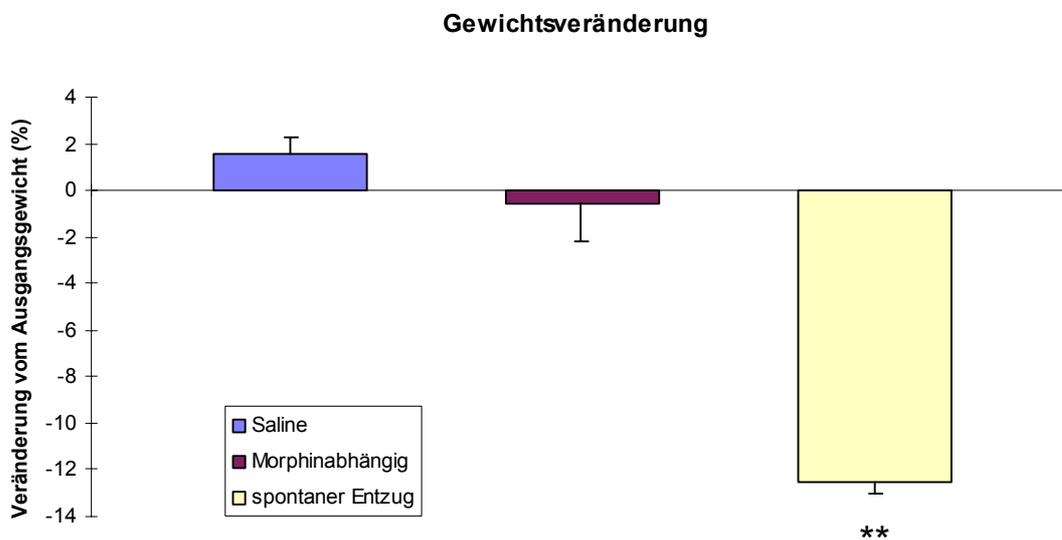


Abb. 5: Gewichtsveränderung der Gruppen „Saline“, „Morphinabhängig“ und „spontaner Entzug“ nach der 36-stündigen Entzugsphase (Gruppenstärke jeweils $n=5$). Die Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. Mit ** ist die Gruppe gekennzeichnet, die sich signifikant ($p<0,01$) von den anderen Gruppen unterscheidet. Zur Induktion einer Opiatabhängigkeit wurde den Tieren alle 12 Stunden Morphin-HCl in aufsteigender Dosierung von 5 mg/kg bis 100 mg/kg s.c. verabreicht. Die Salinekontrollen bekamen physiologische NaCl-Lösung, Tiere der Gruppe „Morphinabhängig“ während der 36-stündigen Entzugsdauer alle 12 Stunden 100 mg/kg Morphin-HCl.

Die Auswertung der Verhaltensparameter (Abbildung 6) ergab bezüglich der Symptome *wet dog shakes*, *teeth chattering* und *sniffing* signifikante Unterschiede auf $p < 0,01$ -Niveau in der Entzugsgruppe (*wet dog shakes* $F[2,12]=23,4$, $p < 0,0001$; *teeth chattering* $F[2,12]=26,8$, $p < 0,0001$; *sniffing* $F[2,12]=12,8$, $p = 0,001$). Die Anzahl der Episoden von *paw tremor* ($F[2,12]=10,8$, $p = 0,021$) und *penile erection* ($F[2,12]=8,96$, $p = 0,042$) innerhalb der Entzugsgruppe konnten ebenfalls als statistisch signifikant gegenüber allen anderen Gruppen gewertet werden. Im Entzugssymptom *writhing* konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden ($F[2,12]=2,67$, $p = 0,11$). Die morphinabhängigen Tiere und die Salinekontrollen zeigen im Beobachtungszeitraum nur wenige *wet dog shakes* und geringen *paw tremor*, was in dieser Frequenz als Teil des normalen Verhaltensrepertoires anzusehen ist. Die Entzugsgruppe unterscheidet sich somit signifikant in allen Entzugsparametern (ausgenommen hiervon das Symptom *writhing*) von den beiden anderen Gruppen.

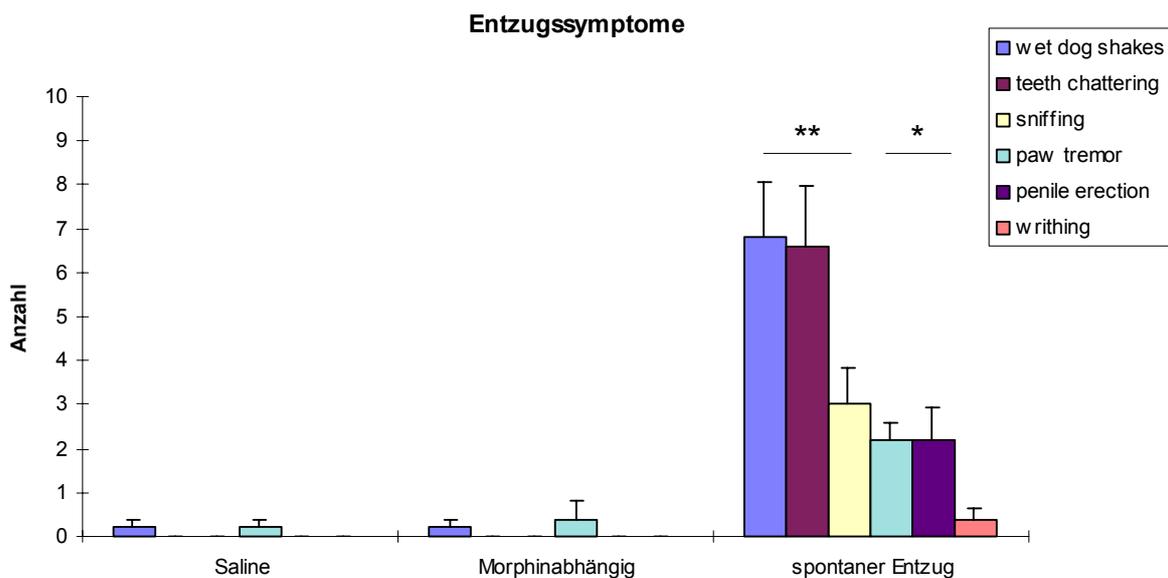


Abb. 6: Entzugssymptomatik der Gruppen „Saline“, „Morphinabhängig“ und „spontaner Entzug“ innerhalb der 30-minütigen Beobachtungszeit (Gruppenstärke jeweils $n=5$). Die Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. Mit *,** sind die Symptome gekennzeichnet, in denen sich die Entzugsgruppe signifikant (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$) von den Kontrollen unterscheidet.

Der gemessene Gewichtsverlust und die Verhaltensbeobachtungen lassen die Schlussfolgerung zu, dass es sich in der Entzugsgruppe eindeutig um spontanen Opiatentzug handelt.

[S³⁵]-GTPγS-Autoradiographie:

Abbildung 7 zeigt exemplarisch ein [S³⁵]-GTPγS-Autoradiogramm im Bereich des Nucleus accumbens unter basalen Bedingungen, einer Stimulation der μ-Opioidrezeptor-gekoppelten G-Proteine durch DAMGO und einer kompetitiven Verdrängung von DAMGO durch den Opiatantagonisten Naloxon. Auf die Darstellung einer Abbildung mit unspezifischer Bindung wurde verzichtet, da das Autoradiogramm im Signal zu schwach ausfällt, um gut präsentiert zu werden.

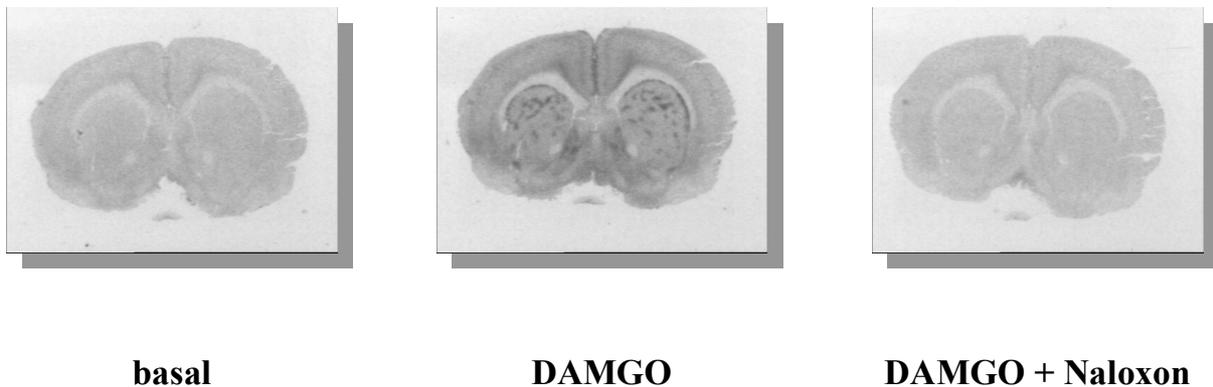


Abb. 7: [S³⁵]-GTPγS-Autoradiogramme im Bereich des Nucleus accumbens unter basalen Bedingungen, Stimulation durch DAMGO und dessen Verdrängung durch Naloxon. Die Schnitte wurden in 2mM GDP-Lösung vorinkubiert; die Hauptinkubation erfolgte mit 2 mM GDP und 0,04 nM [S³⁵]-GTPγS. Basale Aktivität wurde ohne weitere Zusätze durchgeführt, die Stimulation erfolgte mit 10 μM DAMGO. Verdrängt wurde DAMGO mit 1 μM Naloxon in der Inkubationslösung. Ein Test auf unspezifische Bindung wurde ebenfalls durchgeführt, kann allerdings hier auf Grund des schwachen Signals nicht geeignet präsentiert werden.

Die [S³⁵]-GTPγS-Autoradiographie (Abbildung 8) wurde im Locus coeruleus, Nucleus accumbens, zentralen Kern der Amygdala und Nucleus parabrachialis durchgeführt. In allen genannten Kerngebieten und allen Gruppen konnte eine deutliche Aktivierung der μ-Opioidrezeptor-gekoppelten G-Proteine durch DAMGO gegenüber basaler Aktivität erreicht werden. Dieser Befund wird durch die statistische Berechnung der Autoradiographiewerte bestätigt: bezüglich des Faktors Stimulation (basal vs. DAMGO-stimuliert) weist die Statistik einen hoch signifikanten Unterschied aus (Locus coeruleus: F[1,33]=52,9, p<0,0001; Nucleus accumbens: F[1,29]=83,6, p<0,0001; zentraler Kern der Amygdala: F[1,25]=64,5, p<0,0001; Nucleus parabrachialis: F[1,33]=93,6, p<0,0001). Innerhalb der untersuchten Gebiete ergaben sich allerdings keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Locus coeruleus:

F[2,33]=1,47, p=0,24; Nucleus accumbens: F[2,29]=1,62, p=0,21; zentraler Kern der Amygdala: F[2,25]=0,15, p=0,85; Nucleus parabrachialis: F[2,31]=0,18, p=0,83).

[S³⁵]-GTP γ S-Autoradiographie

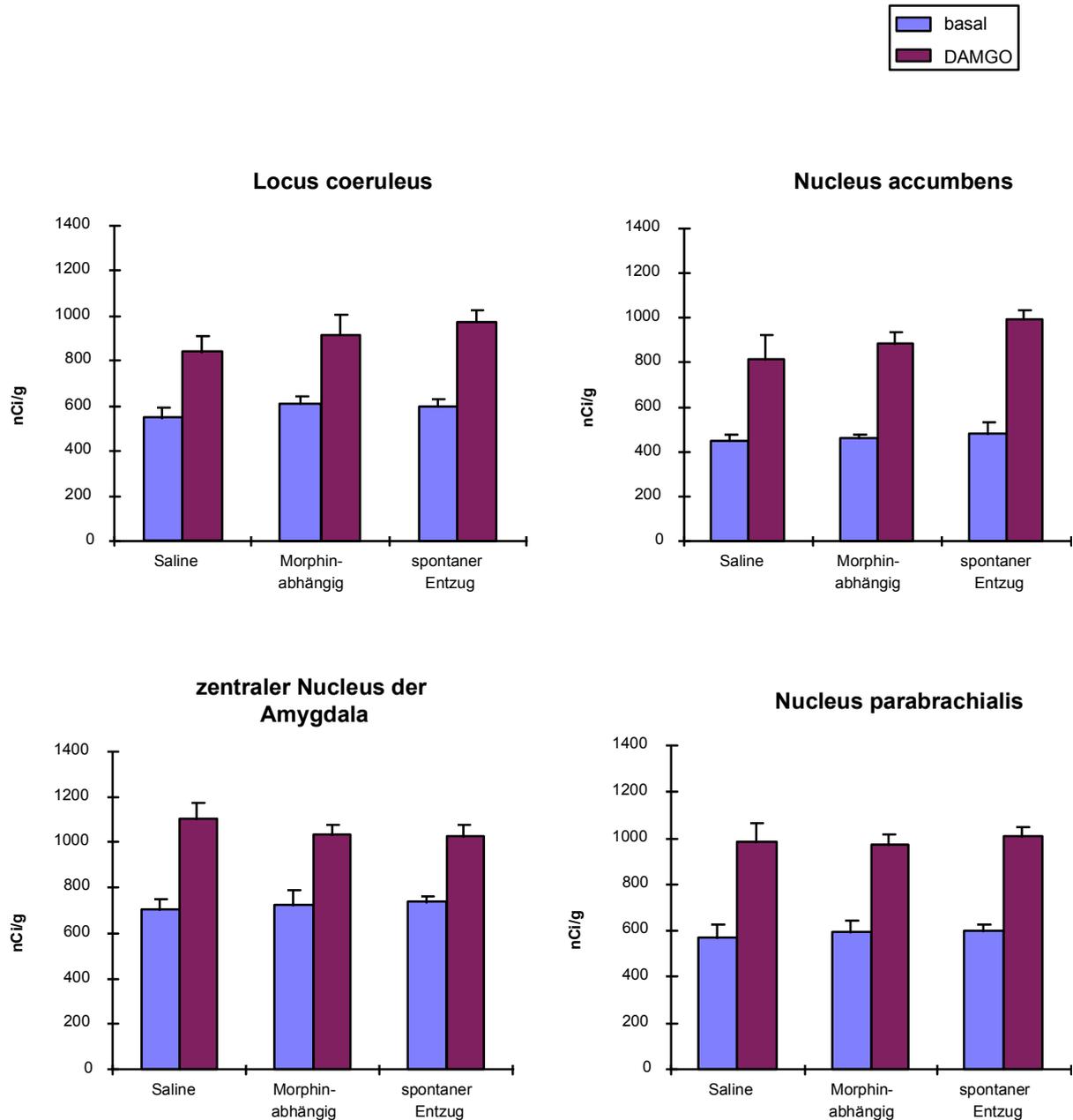


Abb. 8: [S³⁵]-GTP γ S-Autoradiographie im Locus coeruleus, Nucleus accumbens, zentralen Kern der Amygdala und Nucleus parabrachialis unter basalen Bedingungen und Stimulation durch DAMGO in den Gruppen „Saline“ (n=5), „Morphinabhängig“ (n=5) und „spontaner Entzug“ (n=6). Die Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM in nCi/g angegeben. Auf eine Kennzeichnung der statistischen Signifikanz bezüglich des Faktors Stimulation (basale Aktivität vs. DAMGO-Stimulation) in den einzelnen Gruppen wurde bewusst verzichtet. Die Daten zur Durchführung der Autoradiographie können aus Abb. 7 oder Kap. 2.2.4. entnommen werden.

Auch eine Interaktion beider Faktoren ergab die statistische Berechnung nicht (Locus coeruleus: $F[2,33]=0,34$, $p=0,71$; Nucleus accumbens: $F[2,29]=1,62$, $p=0,21$; zentraler Kern der Amygdala: $F[2,25]=0,15$, $p=0,85$; Nucleus parabrachialis: $F[2,31]=0,18$, $p=0,83$). Im Vergleich zwischen den Hirngebieten ergaben sich leicht unterschiedliche G-Proteinaktivitäten unter basalen wie auch unter DAMGO-stimulierten Bedingungen. Im Nucleus accumbens war die basale G-Proteinaktivität allgemein im Vergleich zu den anderen untersuchten Kernregionen niedriger, die DAMGO-stimulierte Reaktion dagegen fiel hier stärker aus (ca. 100 % Steigerung) als in den anderen Hirnarealen. So konnte zum Beispiel im zentralen Kern der Amygdala eine Stimulation durch DAMGO nur um ca. 25 Prozent erzielt werden. Da sich das Interesse dieser Studie jedoch auf Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen konzentrierte, wurde auf die statistische Berechnung dieses Sachverhaltes verzichtet sowie auch auf einen graphischen Hinweis der Signifikanz des Faktors Stimulation in Abbildung 8.

[H³]-Autoradiographie:

Parallel zur Durchführung der [³⁵S]-GTPγS-Autoradiographie wurde eine Ligandenbindungsstudie durchgeführt um etwaige Unterschiede in der Interaktion Rezeptor/G-Proteinaktivierung zu eruieren. Als Ligand wurde [³H]-markiertes DAMGO verwendet. Abbildung 9 zeigt die Verhältnisse im Locus coeruleus, Nucleus accumbens, zentralen Kern der Amygdala und Nucleus parabrachialis nach Inkubation mit 4,2 nM [³H]-DAMGO und Exposition eines für [³H]-sensitiven Filmes. Die Überprüfung der Ergebnisse mittels einer ein-faktoriellen ANOVA erbrachte in keinem der untersuchten Kerngebiete Unterschiede zwischen den Gruppen (Locus coeruleus: $F[2,13]=1,13$, $p=0,28$; Nucleus accumbens: $F[2,13]=2,80$, $p=0,10$; zentraler Nucleus der Amygdala: $F[2,13]=1,28$, $p=0,30$; Nucleus parabrachialis: $F[2,13]=2,52$, $p=0,11$).

Auch hier ergaben sich im Vergleich zwischen den untersuchten Arealen Unterschiede in der DAMGO-Bindung. Nucleus accumbens und Nucleus parabrachialis waren im Vergleich zu den beiden anderen untersuchten Kerngebiete (Locus coeruleus und zentraler Kern der Amygdala) die Kernareale mit der geringeren Dichte an μ-Opioidrezeptoren. Auch hier wurde auf eine statistische Berechnung verzichtet.

[H³]-DAMGO-Bindung

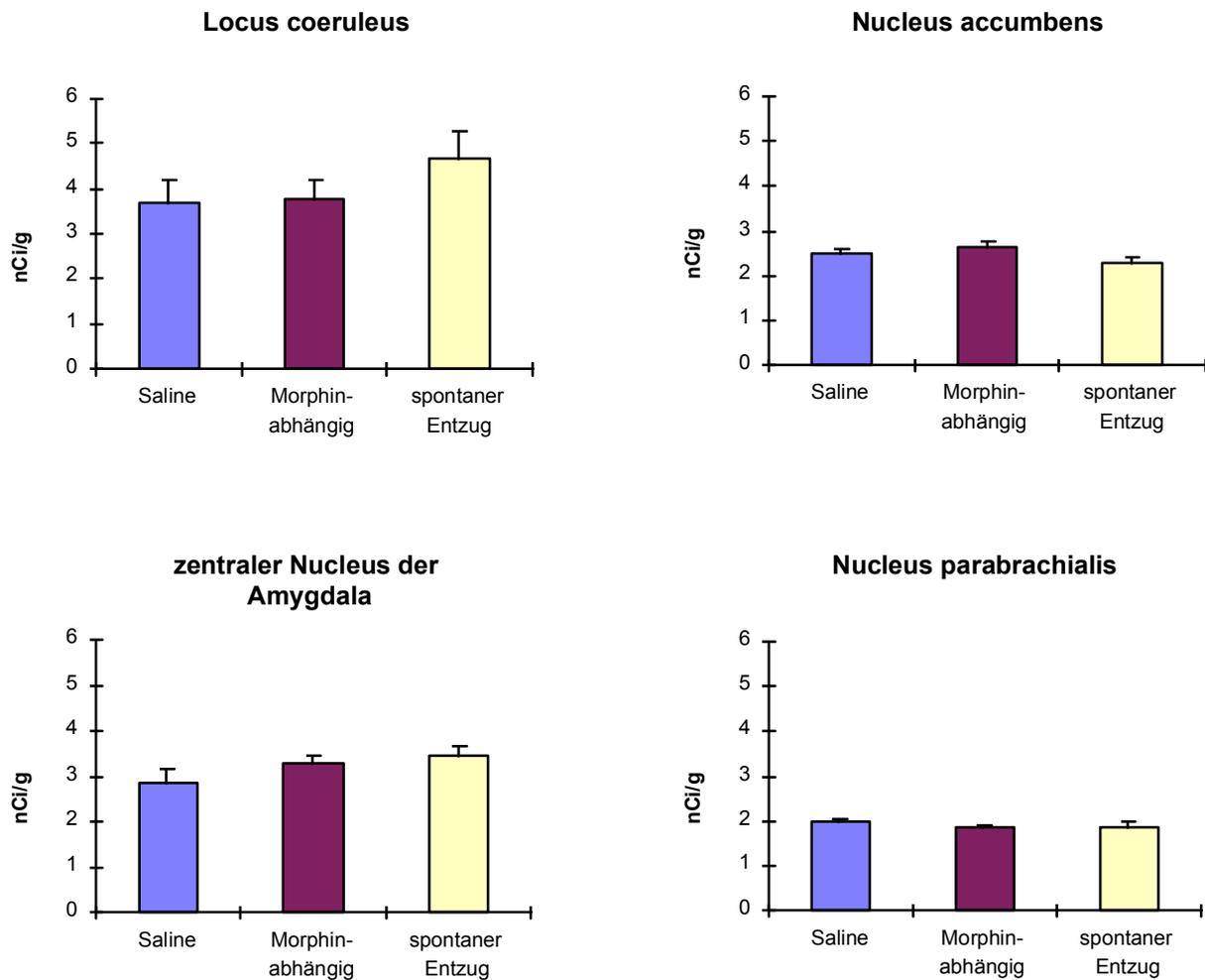


Abb. 9: [H³]-Autoradiographie im Locus coeruleus, Nucleus accumbens, zentralen Kern der Amygdala und Nucleus parabrachialis unter Verwendung des radioaktiv markierten μ -opioid selektiven Agonisten DAMGO. Die Tieranzahl betrug jeweils n=5 in den Gruppen „Saline“, „Morphinabhängig“ und n=6 in der Gruppe „spontaner Entzug“. Die Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM in nCi/g angegeben. Nach einer Präinkubation in 50 mM Tris-HCl/150 mM NaCl (pH 7,4) bei 4 °C für 30 Minuten erfolgte die Inkubation mit [H³]-DAMGO in einer Konzentration von 4,2 nM für 60 Minuten bei Raumtemperatur. Für die notwendige Kontrolle wurde bei einigen Schnitten nicht-markiertes DAMGO in 1000-fach höherer Konzentration hinzugegeben. Durch Waschen in 4 °C kaltem 50 mM Tris-HCl/150 mM NaCl (pH 7,4) wurde ungebundenes [H³]-DAMGO entfernt und die Schnitte [H³]-sensitiven Filmen exponiert.

Aus den Ergebnissen des ersten Experimentes lässt sich zusammenfassen, dass die [S³⁵]-GTP γ S-Autoradiographie zwar Unterschiede in den einzelnen untersuchten Gehirngebieten aufzeigt, die basale und DAMGO-stimulierte Aktivität allerdings innerhalb der Kerngebiete

unabhängig von der jeweiligen Behandlung ist. Eine starke Morphinabhängigkeit hat ebenso wenig Einfluss auf G-Proteinaktivität wie eine 36-stündige Entzugsperiode in den untersuchten Gehirnarealen. Die Ligandenbindungsstudie unterstützt diesen Befund, da keine Unterschiede in der DAMGO-Bindung zwischen den Vergleichsgruppen ermittelt wurden; allerdings traten auch hier Unterschiede zwischen den Kerngebieten auf.

Experiment 2:

In Experiment 2 wurde die μ -Opioidrezeptor-gekoppelte G-Proteinaktivität im Entzug in Abhängigkeit des zeitlichen Verlaufes untersucht. Hierzu wurde morphinabhängigen Tieren der Opiatantagonist Naloxon in einer Dosis von 1 mg/kg s.c. injiziert und nach 5, 10, 20 und 60 Minuten die basale und DAMGO-stimulierte G-Proteinaktivität mittels [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie untersucht. Parallel dazu wurde ein möglicher Eigeneffekt von Naloxon in salinebehandelten Tieren kontrolliert. Die Untersuchung erfolgte 5 Minuten nach Verabreichung von 1 mg/kg s.c. Naloxon (Saline vs. 1 mg/kg Naloxon).

Abbildung 10 zeigt die G-Proteinaktivität unter basalen und DAMGO-stimulierten Bedingungen im Zeitverlauf nach der Naloxoninjektion im Locus coeruleus, Nucleus accumbens, zentralen Kern der Amygdala und Nucleus parabrachialis. In allen untersuchten Regionen konnten die G-Proteine durch DAMGO deutlich über das basale Niveau stimuliert werden (Locus coeruleus: $F[1,9]=216$, $p<0,0001$; Nucleus accumbens: $F[1,9]=19,3$, $p=0,0023$; zentraler Kern der Amygdala: $F[1,9]=22,2$, $p=0,0015$; Nucleus parabrachialis: $F[1,9]=100$, $p<0,0001$). Zu den verschiedenen Zeitpunkten der Studie konnten statistisch jedoch keine Unterschiede gefunden werden (Locus coeruleus: $F[3,24]=1,11$, $p=0,36$; Nucleus accumbens: $F[3,24]=1,54$, $p=0,22$; zentraler Kern der Amygdala: $F[3,24]=2,08$, $p=0,12$; Nucleus parabrachialis: $F[3,24]=1,80$, $p=0,17$). Auch eine Interaktion beider Faktoren ergab die statistische Berechnung nicht (Locus coeruleus: $F[3,24]=0,11$, $p=0,95$; Nucleus accumbens: $F[3,24]=0,32$, $p=0,80$; zentraler Kern der Amygdala: $F[3,24]=0,14$, $p=0,93$; Nucleus parabrachialis: $F[3,24]=0,44$, $p=0,72$). Wie in Experiment 1 ergaben sich Unterschiede in den untersuchten Gehirnarealen. Insgesamt aber lagen die nCi/g-Werte innerhalb der Kernregionen zu den einzelnen Zeitpunkten auf dem Niveau eines spontanen Entzugs. Dies ist in Abbildung 10 durch Vergleich mit dem Säulendiagramm zu entnehmen.

[S³⁵]-GTPγS-Autoradiographie

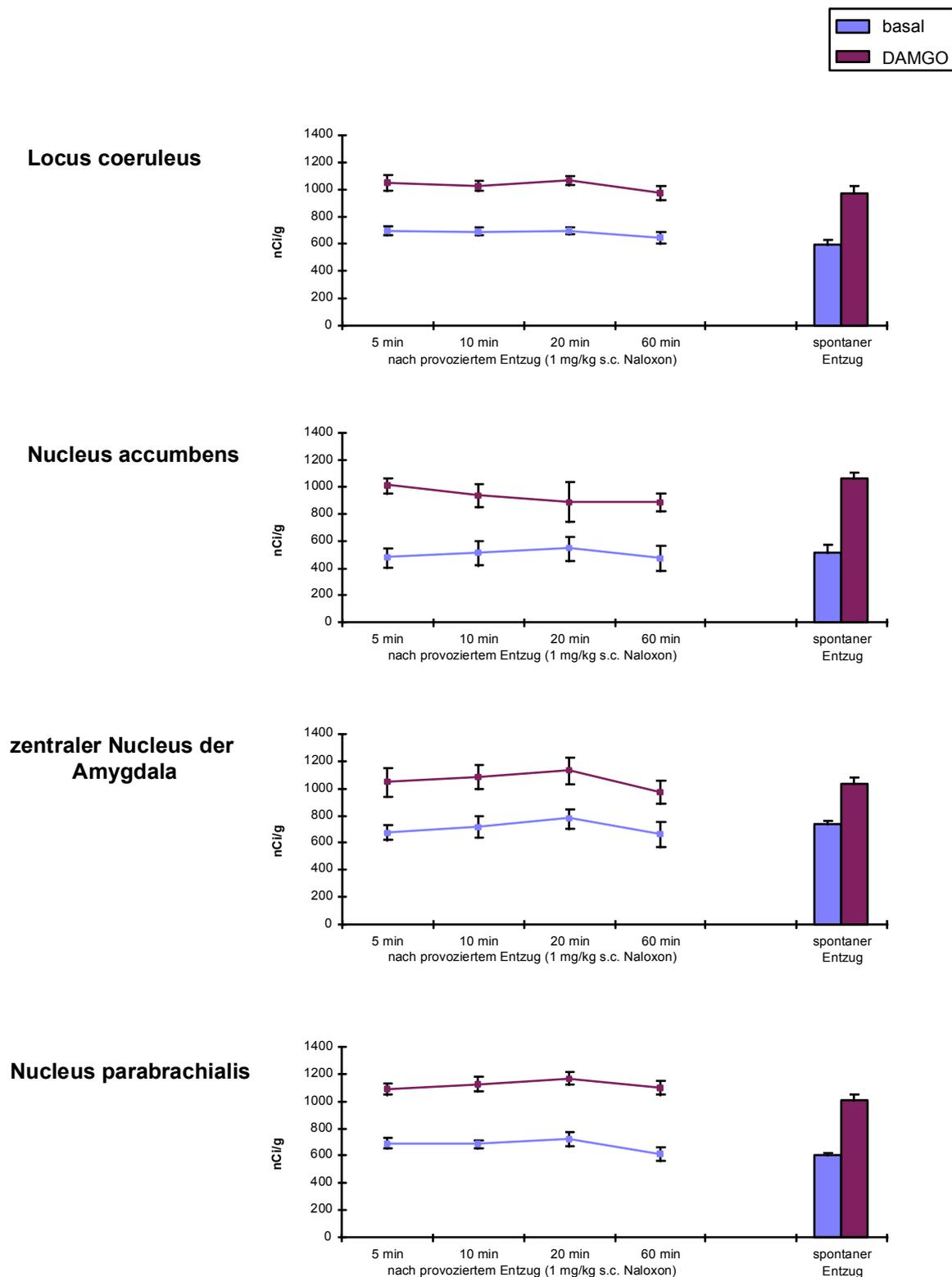


Abb. 10: [S³⁵]-GTPγS-Autoradiographie im Locus coeruleus, Nucleus accumbens, zentralen Kern der Amygdala und Nucleus parabrachialis unter basalen Bedingungen und Stimulation durch DAMGO im zeitlichen Verlauf nach Entzugsprovokation durch Verabreichung von 1 mg/kg s.c. Naloxon in morphinabhängigen Tieren. Die Tieranzahl betrug jeweils n=5. Die Werte sind als Gruppenmittelwert ± SEM in nCi/g angegeben. Als Referenz werden die

Werte des 36-stündigen spontanen Entzugs aus Experiment 1 in Form des Säulendiagramms mit angegeben. Die Durchführung der [^{35}S]-GTP γ S-Autoradiographie entspricht der aus Experiment 1 und kann aus Abb. 7 oder Kap. 2.2.4. entnommen werden.

Um einen möglichen Eigeneffekt von Naloxon auf μ -Opioidrezeptor-gekoppelte G-Proteine zu kontrollieren, wurde eine [^{35}S]-GTP γ S-Autoradiographie in Salinekontrollen und Tieren durchgeführt, die Naloxon in einer Dosis von 1 mg/kg s.c. verabreicht bekamen (Tiere nicht mit Morphin vorbehandelt!). Die Autoradiographie spiegelt die Verhältnisse unter basalen wie auch DAMGO-stimulierten Bedingungen 5 Minuten nach der Naloxoninjektion wider (Abbildung 11). Die untersuchten Hirnregionen waren auch hier der Locus coeruleus, Nucleus accumbens, der zentrale Kern der Amygdala und Nucleus parabrachialis. Die statistische Überprüfung der Werte für den Locus coeruleus ergab eine hohe Signifikanz bezüglich der Stimulation durch DAMGO ($F[1,20]=20,8$, $p=0,0002$). Auch für den Faktor Gruppe ergab sich statistische Signifikanz ($F[1,20]=4,61$, $p=0,044$), allerdings keine Interaktion der beiden Faktoren ($F[1,20]=0,23$, $p=0,63$). Deshalb erfolgte die statistische Berechnung auf einem Einzelvergleich zwischen den beiden Gruppen getrennt nach basalen und DAMGO-stimulierten Bedingungen. Für den Paarvergleich unter basalen Konditionen konnte keine statistische Signifikanz erreicht werden ($F[1,10]=1,41$, $p=0,26$). Auch der Vergleich der DAMGO-stimulierten Gruppen erbrachte keine statistisch signifikanten Unterschiede ($F[1,10]=3,41$, $p=0,094$). Im Nucleus accumbens und zentralen Kern der Amygdala konnte die Statistik eine Signifikanz auf $p<0,01$ -Niveau bezüglich des Faktors Stimulation (basal vs. DAMGO) ausweisen (Nucleus accumbens $F[1,16]=22,7$, $p=0,0002$; zentraler Kern der Amygdala $F[1,14]=32,6$, $p<0,0001$). Es ergaben sich aber keine Unterschiede im Faktor Gruppe und Interaktion (Nucleus accumbens: Faktor Gruppe: $F[1,16]=1,17$, $p=0,29$, Interaktion: $F[1,16]=0,20$, $p=0,66$; zentraler Kern der Amygdala: Faktor Gruppe: $F[1,14]=0,06$, $p=0,81$, Interaktion: $F[1,14]=0,01$, $p=0,90$). Im Nucleus parabrachialis konnten statistische Unterschiede sowohl in der Stimulation als auch zwischen den Gruppen festgestellt werden, allerdings keine Interaktion (Faktor Stimulation: $F[1,16]=62,4$, $p<0,0001$; Faktor Gruppe: $F[1,16]=7,78$, $p=0,013$; Interaktion: $F[1,16]=0,42$, $p=0,52$). Deshalb erfolgte auch hier die statistische Berechnung auf einem Einzelvergleich zwischen den beiden Gruppen getrennt nach basalen und DAMGO-stimulierten Bedingungen. Das Ergebnis dieser statistischen Überprüfung zeigt, dass die Gruppen nicht differenzierbar sind (basal $F[1,8]=3,14$, $p=0,11$; DAMGO $F[1,8]=4,65$, $p=0,063$).

[S³⁵]-GTPγS-Autoradiographie

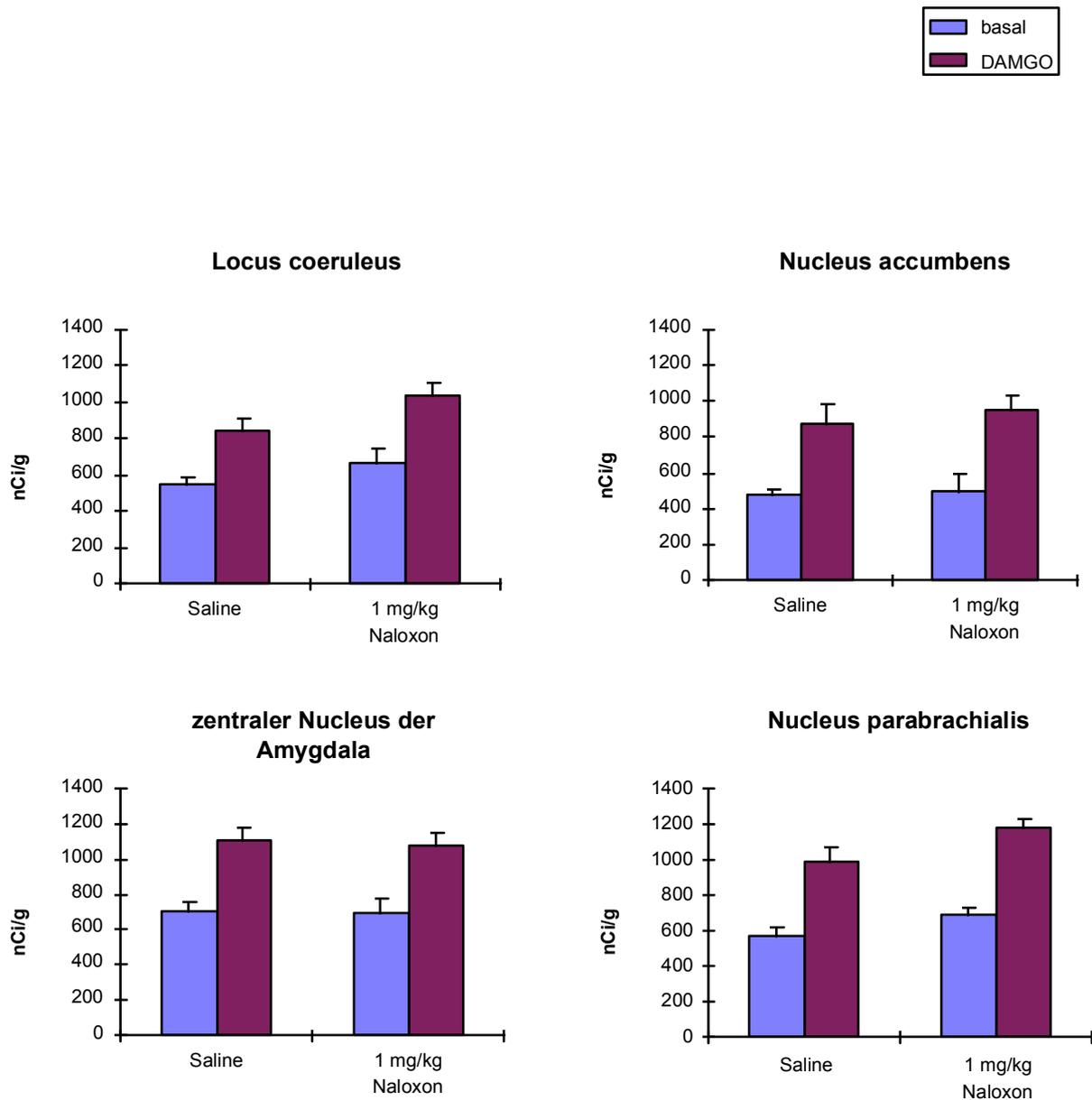


Abb. 11: [S³⁵]-GTPγS-Autoradiographie im Locus coeruleus, Nucleus accumbens, zentralen Kern der Amygdala und Nucleus parabrachialis unter basalen Bedingungen und Stimulation durch DAMGO 5 Minuten nach Verabreichung von 1 mg/kg s.c. Naloxon in salinevorbehandelten Tieren. Die Kontrollgruppe erhielt physiologische Kochsalzlösung. Die Tieranzahl betrug jeweils n=5. Die Werte sind als Gruppenmittelwert ± SEM in nCi/g angegeben. Die Durchführung der [S³⁵]-GTPγS-Autoradiographie entspricht der aus Experiment 1 und kann aus Abb. 7 oder Kap. 2.2.4. entnommen werden.

Die Autoradiographiewerte lagen auch hier auf dem Niveau der anderen Experimente. Zusammenfassend lässt sich aus Experiment 2 festhalten, dass zu keinem Zeitpunkt eines durch

Naloxon provozierten Entzugs veränderte μ -Opioidrezeptor-gekoppelte G-Proteinaktivität ausgemacht werden konnte. Auch ein Eigeneffekt von Naloxon konnte in dieser Versuchsanordnung nicht festgestellt werden.

Experiment 3:

Um sicherzustellen, dass die wiederholte Injektion von Morphin einer kontinuierlich chronischen Morphinverabreichung vergleichbare Effekte auf die μ -Opioidrezeptor-gekoppelten G-Proteinaktivität induziert, wurden Ratten Morphinpellets (3 x 75 mg) implantiert, die eine kontinuierliche und ausreichend stabile Morphinabgabe gewährleisten (Herstellung und Diffusionskinetik siehe Kap. 3.2.2.). Den Kontrolltieren wurde ein Placebopellet implantiert. Nach 7 Tagen wurde in einem Teil der Morphinpellet-implantierten Tiere mittels Naloxon (1 mg/kg s.c.) körperliche Entzugssymptome provoziert, der andere Teil erhielt Saline. Mit den Placebo-implantierten Tieren wurde ebenso verfahren. Abbildung 12 stellt die G-Proteinaktivität im Locus coeruleus 60 Minuten nach der Injektion dar.

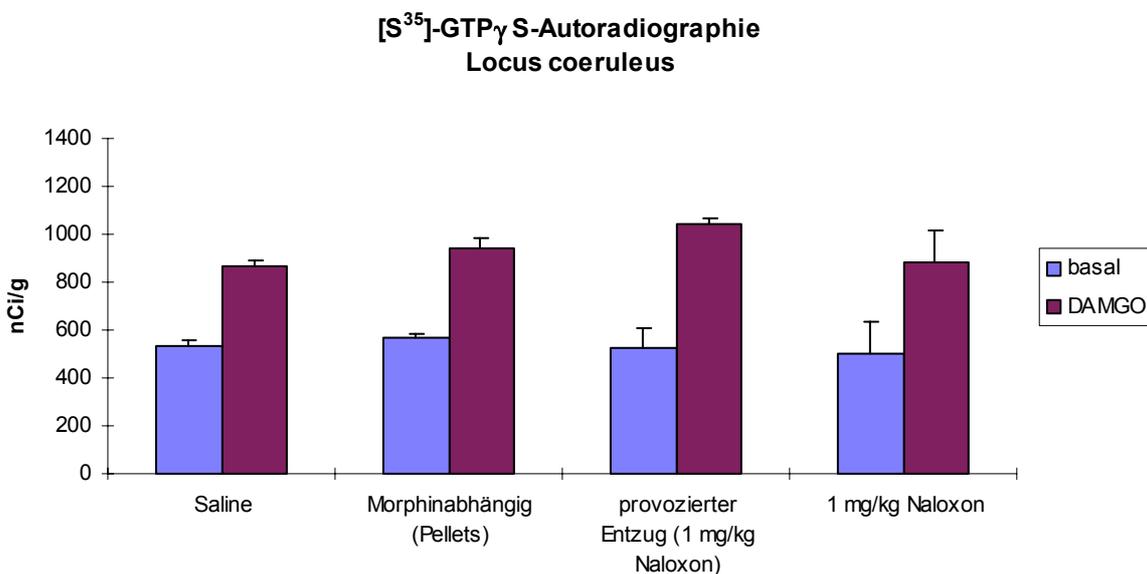


Abb. 12: [S³⁵]-GTP γ S-Autoradiographie im Locus coeruleus unter basalen Bedingungen und Stimulation durch DAMGO. Morphinabhängigkeit wurde durch die Implantation von Morphinpellets (3 x 75 mg) gewährleistet. Entzug wurde durch 1 mg/kg s.c. Naloxon provoziert; die Hirne 60 Minuten danach entnommen. Die Kontrollgruppe erhielt Placebopellets und physiologische Kochsalzlösung. Die Tieranzahl betrug jeweils n=3. Die Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM in nCi/g angegeben. Die Durchführung der [S³⁵]-GTP γ S-Autoradiographie entspricht der aus Experiment 1 und kann aus Abb. 7 oder Kap. 2.2.4. entnommen werden.

Auch in diesem Experiment liegen die nCi/g-Werte auf vergleichbarem Niveau der Experimente 1 und 2. Die Statistik weist eine signifikante Stimulation durch DAMGO aus ($F[1,23]=58,3$, $p<0,0001$). Statistisch nicht differenzierbar waren jedoch der Faktor Gruppe ($F[3,23]=0,69$, $p=0,56$) und Interaktion ($F[3,23]=0,58$, $p=0,63$). Ein Effekt durch Naloxon konnte bei einem Einzelvergleich der Gruppe „Saline“ und „1 mg/kg Naloxon“ auch hier nicht festgestellt werden (Faktor Stimulation: ($F[1,11]=14,5$, $p=0,0051$); Faktor Gruppe: ($F[1,11]=0,01$, $p=0,95$); Interaktion: ($F[1,11]=0,08$, $p=0,78$)). Weitere Gehirnregionen wurden nicht untersucht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass auch eine veränderte Form der Abhängigkeitsentwicklung zu keinen Unterschieden in der μ -Opioidrezeptor-gekoppelten G-Proteinaktivität im Entzug führt.

2.4. Diskussion [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie-Studie

Die vorliegende Studie beschäftigt sich mit der μ -Opioidrezeptor-gekoppelten G-Proteinaktivierung zu verschiedenen Stadien eines Opiatentzugs. Dabei fließen unterschiedliche Aspekte der Induktion einer Opiatabhängigkeit ebenso ein wie eine differentielle Entzugsprovokation. Die Studie bedient sich dabei einer weiter entwickelten [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie, die es ermöglicht, *in situ* diese G-Proteinaktivität zu bestimmen. Parallel dazu wurden die Verhältnisse in Salinekontrollen als auch in morphinabhängigen Tieren bestimmt.

Durch den direkten Vergleich der Einzelergebnisse der Experimente 1, 2 und 3 kann festgehalten werden, dass diese mehrmals reproduziert werden konnten. Die Autoradiographie konnte somit in ihrer Durchführung erfolgreich in diesem Labor etabliert werden.

Die Stimulation mit dem μ -opioide-selektiven Agonisten DAMGO lieferte in allen Fällen, unabhängig vom untersuchten Gehirngebiet und Gruppe, einen deutlichen Anstieg der G-Proteinaktivität über basale Werte, der in allen Fällen statistisch hoch signifikant ausfiel. Hinsichtlich der untersuchten Hirngebiete gab es Unterschiede in der μ -Opioidrezeptor-gekoppelten G-Proteinaktivität, diese waren aber innerhalb der Gehirnareale unabhängig von der jeweiligen Behandlung. So zeigten sich keinerlei Unterschiede in den Gruppen „Saline“, „Morphinabhängig“ und „spontaner Entzug“. Dies konnte durch statistische Berechnungen untermauert werden. Die Untersuchungen der Verhältnisse im Entzug wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt, wobei Entzugserscheinungen durch eine 36-stündige Morphinabstinenz spontan auftraten und diese durch ein einfaches Beobachtungsexperiment verifiziert werden konnten. Es ergaben sich in keiner der untersuchten Gruppen Unterschiede. In einem zweiten Ansatz wurde versucht, mögliche kurzfristige Veränderungen der G-Proteinaktivität in Entzug zu detektieren. Hierzu wurden Entzugserscheinungen durch Naloxon (1 mg/kg s.c.) provoziert und die Hirne 5, 10, 20 und 60 Minuten nach der Entzugsprovokation der Autoradiographie zugeführt. Eine Beobachtung konnte auf Grund dieses experimentellen Designs nicht durchgeführt werden, gleichwohl traten in diesen Tieren deutliche Entzugssymptome auf. Dass diese Dosis ausreichend ist für die Induktion schwerer Entzugssymptome, ist zudem durch eine Vielzahl an Experimenten hinreichend gesichert (Bläsig et al. 1973; Gellert und Sparber, 1977). Zu keinem Zeitpunkt konnte eine veränderte G-Proteinaktivität festgestellt werden.

Ein Eigeneffekt durch Naloxon selbst konnte in Salinekontrollen nicht nachgewiesen werden. Auch eine chronisch intermittierende Morphinverabreichung (Injektion in 12-Stunden-Intervallen) erbrachte keinen Unterschied gegenüber einer chronisch stabilen Morphingabe (Pelletimplantation). Die nach internationaler Rezeptur selbst hergestellten Morphinpellets erzeugten in einer eigenen Testreihe konstante Morphinplasmaspiegel. Eine Veränderung μ -Opioidrezeptor-gekoppelter G-Proteinaktivität im Entzug zu irgendeinem anderem Zeitpunkt erscheint nach den vorliegenden Ergebnissen als unwahrscheinlich, zumal kurz- als auch längerfristige Zeiträume untersucht wurden.

Die Ergebnisse dieser Studie stehen im Widerspruch zu einer Studie von Sim et al. (1996), in der Veränderungen in wenigen Hirnstammkernen nach chronischer Opiatverabreichung in der μ -Opioidrezeptor-gekoppelten G-Proteinaktivität gefunden wurden. Diese Studie bedarf der kritischen Auseinandersetzung, da in den meisten anderen untersuchten Hirnstrukturen keine Unterschiede detektiert wurden. Auch die Induktion der Morphinabhängigkeit wirft Fragen auf, wurde mit einer außergewöhnlich hohen Dosierung gearbeitet (320 mg/kg). Darüber hinaus kam Morphinsulfat zur Anwendung, welches bei gleicher Dosierung über mehr gebundenes Morphin als Morphinhydrochlorid verfügt (Morphin-HCl 375,85 g/mol; Morphin-SO₄ 668,76 g/mol). Die in der hier vorliegenden Studie angewandten Methoden zur Abhängigkeitsentwicklung und Dosierung sind in einer Vielzahl von Publikationen als ausreichend für Induktion einer Opiatabhängigkeit beschrieben worden (Bhargava H., 1977; Bläsig et al., 1973; Cicero et al., 1973, Maldonado et al. 1996a,c; Spanagel et al., 1998), so dass eine weitere Dosissteigerung über den Rahmen üblicher Untersuchungspraxis hinausgeht. Die Frage nach der Rekrutierung weiterer, bisher unbekannter Mechanismen auf intrazellulärer Ebene unter extremen Bedingungen kann nicht ausreichend beantwortet werden, möglicherweise gewährleisten auch Veränderungen in der μ -Opioidrezeptor-gekoppelten G-Proteinaktivität die Aufrechterhaltung der Homöostase unter massiver externer Opiatzufuhr.

Die in der Einleitung beschriebenen intrazellulären Veränderungen, ausgelöst durch wiederholte Gabe externer Opiate, werden durch μ -Opioidrezeptoren vermittelt (Nestler und Aghajanian, 1997). Dennoch gibt es fundierte Hinweise auf eine Beteiligung von δ - und κ -Rezeptoren (Übersicht über Opiatrezeptoren: siehe allgemeine Einleitung, Seite 8) bei der Entstehung dieser Veränderungen. Versuche mit selektiven δ -Opioidrezeptor-Agonisten und Antagonisten konnten μ -Opioidrezeptor-vermittelten Ausprägungen von Abhängigkeit und Entzug ähnlich nahe kommen. κ -Rezeptoren kann ein ähnliches Profil zugestanden werden, allerdings mit deutlichen Einschränkungen hinsichtlich der Provokation durch Naloxon in κ -agonistabhängigen Tieren (Cowan et al., 1988; Maldonado et al., 1992a). Auch wenn μ -Opioidrezeptoren eine zentrale

Bedeutung bei der Induktion von Abhängigkeit und Toleranz zukommt, können Opiatrezeptoren nicht gänzlich unabhängig voneinander betrachtet werden. Dies wird umso deutlicher durch Studien von Vaught et al. (1982) und Barrett et al. (1982), die belegen, dass zwischen μ -Opioid- und δ -Opioidrezeptoren eine funktionelle Kopplung besteht, indem eine subanalgetische Dosierung von δ -Opioidrezeptor-Agonisten eine μ -vermittelte Analgesie verstärkt. Rothman et al. (1993) formulierte die Hypothese einer allosterischen Kopplung von μ -Opioid- und δ -Opioidrezeptoren. Diese Interaktion konnte durch immunohistochemische und biochemische Studien nachgewiesen werden (Ji et al., 1995; Schoffelmeer et al., 1990; Cvejic und Devi, 1997), so dass ein Rezeptorkomplex wahrscheinlich erscheint und indirekt Interaktionen zwischen beiden Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Die Koordination und Funktionsweise einer derartigen Kooperation bleibt unklar, zumal auch hier unterschiedliche Hypothesen und Forschungsergebnisse vorliegen. Untersuchungen an gentechnisch veränderten Mäusen, die μ -Opiatrezeptoren nicht mehr exprimieren, deuten zwar auf einen Rezeptorkomplex hin, allerdings eher auf Basis eines neuronalen Netzwerks als auf eine direkte Kolokalisation (Matthes et al., 1998). Die Bildung von Dimeren und Oligomeren vieler anderer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ist in einer Vielzahl von Publikationen beschrieben worden (Dopamin: Ng et al., 1994; Zawarynski et al., 1998; Serotonin: Ng et al., 1993; Vasopressin: Zhu et al., 1998). Neuere Studien schließen bei Opiatrezeptoren ein neuronales Netzwerk nicht aus, tatsächlich scheint es aber auch hier eine Heterodimerisation und somit eine funktionelle Kopplung von μ - und δ -Rezeptoren im selben Neuron zu geben (Cvejic et al., 1997; Jordan et al., 1999; George et al., 2000). Eine derartige Oligomerisation ermöglicht dem betreffenden Neuron eine adäquate Reaktion auf ein Reizereignis und eröffnet neuartige Rezeptorfunktionalitäten.

In der vorliegenden [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie-Studie wurde die Aktivität von δ - und κ -Rezeptoren nicht untersucht, so dass keine Aussage getroffen werden kann, inwieweit hier Veränderungen in Abhängigkeit und Entzug angezeigt sind. Unter den Untersuchungsbedingungen unveränderte μ -Opioidrezeptor-gekoppelte G-Proteinaktivitäten lassen jedoch nicht den Schluss zu, dass hier generell auf dieser Ebene keine Veränderungen vorstatten gegangen sind.

Neben der traditionellen Kopplung von Opioidrezeptoren an $G_{i/o}$ -Proteine (inhibitorisch, siehe Einleitung), gibt es deutliche Hinweise auf die Existenz einer Kopplung von Opioidrezeptoren an G_s -Proteine (excitatorisch, siehe Einleitung). Shen und Crain haben sich durch diverse Arbeiten dieser Thematik angenommen und postulieren eine Einflussnahme dieser G_s -gekoppelten Rezeptoren in Toleranz und Abhängigkeit. Elektrophysiologische Studien an nociceptiven Hinterhornanglien in Kultur zeigten, dass unter Applikation von μ -, κ - und δ -Agonisten sowohl

eine Verkürzung als auch eine Verlängerung des Aktionspotentials zu verzeichnen war, was auf die Existenz von G_s -Proteinen neben $G_{i/o}$ -Proteine hinweist. Selektive Blockade dieser excitatorischen Opiatwirkung mit Antagonisten wie Naloxon oder Naltrexon in picomolarer Konzentration vermochte die Wirkung von Morphin bei gleichbleibender Dosierung deutlich zu verstärken. Diese Ergebnisse konnten in Verhaltensexperimenten an Mäusen verifiziert werden (Crain und Shen, 1996). [In Kap. 3 dieser Arbeit wird auf diese Thematik näher eingegangen.]

Die in dieser Arbeit durchgeführte [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie detektiert die gesamte μ -Opioidrezeptor-gekoppelte G-Proteinaktivität, so dass das Verhältnis zwischen G_s - und $G_{i/o}$ -Proteinen möglicherweise zu Gunsten einer Subpopulation verschoben sein könnte, ohne dass sich an der Gesamtaktivität Veränderungen ergeben. Hier erscheint eine Weiterentwicklung der Autoradiographie angezeigt, in der zwischen G_s - und $G_{i/o}$ -Proteinen differenziert werden kann.

Die erwarteten Ergebnisse der [H^3]-DAMGO-Bindungsstudie (keine Veränderungen zwischen den unterschiedlich behandelten Gruppen) in Verbindung mit den vorliegenden [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographiedaten lassen Raum für die Überlegung, dass in den untersuchten Gehirngebieten unterschiedlich viele G-Proteine an einen μ -Opiatrezeptor gekoppelt sein könnten oder dass die funktionelle Kopplung der Opiatrezeptoren an G-Proteine in verschiedenen Gehirnstrukturen unterschiedlich effizient ist. Dass G-Proteine in ihrer Effizienz moduliert werden können, wurde durch Experimente von Wang et al. (1999, 2000) nachgewiesen. Calmodulin als Mediator verschiedener intrazellulärer Proteinaktivitäten kommt dieser Modulation zentrale Bedeutung zu. Liu und Kollegen konnten 1997 erstmals zeigen, dass ein Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex an die $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Protein zu binden vermag und die katalytische Aktivität der α -Untereinheit moduliert (Liu et al., 1997). Darüber hinaus bindet Calmodulin an den dritten intrazellulären Loop des Opioidrezeptors und beeinflusst direkt die Kopplung des Rezeptors an das G-Protein (Wang et al., 1999). Der Einfluss von Calmodulin auf die G-Proteinaktivität morphinvorbehandelter HEK 293-Zellen, in die menschliche μ -Opioidrezeptor-cDNA eingeschleust wurde, konnte nicht eindeutig geklärt werden (Wang et al., 2000), so dass hier weitere Experimente notwendig erscheinen. Dass die Bindung von Calmodulin an ein G-Protein nicht nur auf μ -Opioidrezeptor-gekoppelte G-Proteine beschränkt ist, konnte 1997 nachgewiesen werden: metabotrope Glutamatrezeptorsubtypen (mGluR 5) können ebenfalls Calmodulin binden. Phosphorylierung der Bindungsstelle macht ein Andocken von Calmodulin unmöglich, so dass hier eine kompetitive Interaktion die Kopplung von Rezeptor und G-Protein reguliert (Minakami et al., 1997). Unter Berücksichtigung der vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit könnte Calmodulin hypothetisch ein Faktor sein, der unter

allen „Betriebszuständen“ der Zelle die Kopplung von Rezeptor und zugehörigem G-Protein aufrecht erhält, so dass sich eine konstante G-Proteinaktivität ergibt.

Allerdings ist eine Veränderung in den Opioidrezeptor-G-Protein-Komplexen während Abhängigkeit und Entzug nicht zwingend notwendig, da das betreffende Neuron über eine Vielzahl anderer intrazellulärer Möglichkeiten verfügt, auf Veränderungen mit Gewährleistung der Homöostase zu reagieren. Trotz verschiedener Publikationen, die unter chronischer Morphingabe Veränderungen in der Opioidrezeptoranzahl feststellen konnten, hat sich heute die gängige Lehrmeinung durchgesetzt, dass während Abhängigkeit und Entzug Veränderungen auf Opioidrezeptorebene nicht angezeigt sind. Die in der Einleitung ausführlich beschriebenen Veränderungen in der Signaltransduktionskaskade beinhalten vor allem eine erhöhte Expression von CERB und als Folge davon eine Erhöhung der Adenylatcyclasen. Diese kompensatorischen intrazellulären Mechanismen sind ausreichend für eine erfolgreiche Adaption an veränderte Umweltbedingungen. Die Ergebnisse dieses Teils der vorliegenden Arbeit bestätigen dieses.

3.1. Einleitung *low dose* Naloxon-Konzept

Kompetitiver Antagonismus ist in der heutigen modernen Pharmakologie ein weit verbreitetes Wirkprinzip. Es beschreibt das Binden eines Pharmakons am zugehörigen Rezeptor, löst aber keine Reaktion am Effektor aus und fördert somit den Übergang des Rezeptors in einen inaktiven Zustand. Wenn der Antagonist „im Wettbewerb“ mit den physiologischen Transmittern oder deren Analoga steht, spricht man von kompetitivem Antagonismus. Im Gegensatz zum nicht-kompetitiven und funktionellen Antagonismus ist hierbei wichtig, dass der Antagonist an die gleiche Bindungsstelle tritt wie die natürlichen Agonisten. Im Fall der Opioidpharmakologie können als reine Antagonisten die Oxymorphin-Analoga Naloxon und Naltrexon genannt werden. Auf Grund der genannten pharmakodynamischen Eigenschaften verursachen diese Substanzen in opiatabhängigen Menschen und Labortieren ein schweres Entzugssymptom (Bläsig et al., 1973; O'Brien, 1995), da bei ausreichend hoher Verabreichung Opiatagonisten vom Rezeptor verdrängt werden und die in Kapitel 2.1. beschriebenen Funktionskaskaden wirksam werden können.

Dennoch kommt gerade deshalb beiden Substanzen in der Medizin wichtige Bedeutung zu, mit Unterschieden im therapeutischen Einsatzbereich, die ausschließlich in deren Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik liegen. Naloxon wird in erster Linie als Antidot bei akuter Überdosierung von Opiatagonisten verwendet. Atemdepression, Bewusstlosigkeit und Miosis, 3 Kardinalsymptome bei akuter Opiatvergiftung, werden durch Verabreichung von Naloxon rasch aufgehoben. Da Naloxon bei oraler Gabe einem hohen hepatischen Metabolismus unterliegt, kann es nur intravenös verabreicht werden. Darüber hinaus sind in den meisten Vergiftungsfällen Nachinjektionen nötig, da die biologische Halbwertszeit von Naloxon nur 60 - 90 Minuten beträgt. Naltrexon hingegen besitzt die gleichen pharmakologischen Effekte, kann aber auf Grund seiner unterschiedlichen metabolischen Umsetzung oral verabreicht werden und verfügt über eine Wirkdauer von 24 - 48 Stunden. Dies prädestiniert Naltrexon als Nüchternheitshilfe für detoxifizierte Suchtpatienten (Gonzales und Brodgen., 1988). Ziel einer Entzugstherapie ist es, den Abhängigen vom Suchtstoff zu entgiften (Detoxifikation) und langfristig auf einen kompetitiven Antagonisten einzustellen. So wird ein Rückfall nach erfolgreichem körperlichen Entzug in eine erneute Opiatabhängigkeit verhindert, da alle Opiatrezeptoren besetzt sind und das erneut zugeführte Opiat seine Wirkung nicht entfalten kann. Im Moment des Rückfalls extern zugeführte Opiate (z. B. Morphin, Heroin, Codein) finden in der üblich angewandten Dosis alle Opiatrezeptoren

blockiert vor und bleiben damit ohne Wirkung auf den Organismus. Problematisch an dieser Form der Entzugsbehandlung ist die Tatsache, dass ein Opiatantagonist, zum Zeitpunkt einer unvollständigen Detoxifikation verabreicht, ein schweres Entzugssymptom verursacht, so dass eine Medikation von Naltrexon erst nach vollzogener Detoxifikation erfolgen darf (Kleber, 1985; Brewer et al., 1988).

Die Effekte von Naloxon und Naltrexon als klassische Opiatantagonisten sind in der Hauptsache bei der Erforschung der Schmerzverarbeitung untersucht worden. Dabei wurden zu Beginn der Beschäftigung mit diesen Substanzen zunächst widersprüchliche Ergebnisse beschrieben, deren Interpretation dazu noch durch methodische Unterschiede in der Erhebung der Daten erschwert wurde. So wurden in frühen humanen Studien entweder keine Effekte von Naloxon gefunden (Grevert et al., 1978; El-Sobky et al., 1978) oder es konnte eine deutliche Hyperalgesie gefunden werden (Frederickson et al., 1977; Chesher et al., 1977): ein Befund, der den pharmakodynamischen Eigenschaften der Opiatantagonisten Rechnung trägt. Wenige Publikationen konnten allerdings auch auf einen dosisabhängigen bi-direktionalen Effekt von Naloxon verweisen (Lasagna, 1965; Buchsbaum et al., 1977). So konnte bei hoher Dosierung die zu erwartende Hyperalgesie gemessen werden, bei Verabreichung niedriger Dosen jedoch wurden analgetische Wirkungen erzielt. Auffällig in diesen Studien ist die Tatsache, dass analgetische Effekte von gering dosiertem Naloxon (*low dose* Naloxon) nur in Studien auftraten, in denen klinischer Schmerz zum Einsatz kam (Levine et al., 1978a, 1979). Ein agonistisches Wirkprofil von Naloxon bedarf offensichtlich einer deutlichen Aktivierung des endogenen opioidergen Systems durch physischen Schmerz. Problematisch zeigt sich auch die Methodik der Verabreichung von Naloxon auf mögliche agonistische Effekte: in Humanstudien mit Einsatz von klinischem Schmerz kommt es bei der Medikation von Naloxon und entsprechenden Kontrollen leicht zu Placeboeffekten, die zu kontrollieren sich als nicht trivial erwies. Die Notwendigkeit einen derartigen Effekt zu kontrollieren, stellt sich als um so bedeutender dar, als bei der placeboinduzierten Analgesie endogene Opiate maßgeblich beteiligt sind (Levine et al., 1978b; ter Riet et al., 1998). Insbesondere hier stellen tierexperimentelle Studien eine geeignete Alternative zur Untersuchung Naloxon-induzierter Analgesie dar. Der beobachtete dosisabhängige bi-direktionale Effekt von Naloxon konnte im Tierexperiment nachgestellt werden (Kayser et al., 1981; Ueda et al., 1986). Diese „paradoxe“ analgetische Wirkung von Naloxon wurde in unbehandelten Tieren nach intrathekaler Injektion beobachtet (Taiwo et al., 1989; Woolf, 1980; Dickenson et al., 1981); vor allem aber in Tierstudien mit experimentell induziertem Entzündungsschmerz (Kayser et al., 1981, 1988b, 1990; Rios et al., 1982, 1983). Hierbei wird durch die Injektion von

Botulinusbakterien (Freud's Adjuvant) oder Carrageenin in die Pfote von Versuchstieren eine chronische Entzündung hervorgerufen.

Bei der Behandlung sehr starker akuter oder chronischer Schmerzen kommen heute in der Regel nur Opiate zum Einsatz. Dabei stehen neben der äußerst wirkungsvollen Schmerzlinderung vor allem Toleranz und Abhängigkeit als effektmindernde Faktoren im Vordergrund. So erscheint die experimentelle Untersuchung naheliegend, die Opiatwirkung durch die Koapplikation von *low dose* Naloxon/Naltrexon zu verstärken. Eine in der üblichen klinischen Praxis erforderliche Dosissteigerung auf Grund von Toleranzeffekten ließe sich somit hinauszögern. Hier treten fast ausschließlich die Arbeiten von Stanley M. Crain und Ke-Fei Shen in den Vordergrund, die sich intensiv mit der Bearbeitung und Aufklärung der Mechanismen befassen, die zur tatsächlichen Verstärkung von Morphin durch *low dose* Naloxon führen. 1995 und 1996 konnten sie erstmals im Tierversuch zeigen, dass die antinocizeptive Wirkung von Morphin durch die Gabe von Naloxon/Naltrexon in *low dose*-Bereich verstärkt werden kann. Ausgangsbasis dieser Untersuchungen waren die Resultate aus elektrophysiologischen Studien an nocizeptiven Neuronen aus Hinterwurzelganglien in Kultur, in denen durch *low dose* Naloxon modulierte Morphinwirkungen gemessen werden konnten (Crain und Shen, 1996; Shen und Crain 1992, 1997). Neben der traditionellen Kopplung von Opiatrezeptoren an $G_{i/o}$ -Proteine scheinen für diese *low dose* Naloxon vermittelten Wirkungen G_s -gekoppelte Opiatrezeptoren verantwortlich zu sein (siehe auch Kapitel 2.4.).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb der Frage nachgegangen werden, inwieweit das „*low dose*-Prinzip“ ein allgemeines Wirkprinzip in der Opiatpharmakologie ist, sich also auch in anderen opiatvermittelten Effekten zeigt. Insbesondere wurde die Fragestellung untersucht, ob die Koverabreichung von *low dose* Naloxon während einer Abhängigkeitsentwicklung die Ausprägung einer Entzugssymptomatik beeinflusst. Die vorliegende Arbeit bedient sich bei der Untersuchung weiterer durch *low dose* Naloxon beeinflusster opiatvermittelter Effekte der Lokomotionsmessung, dem Hebeldruckverhalten in Skinnerboxen und eines einfachen Beobachtungsexperimentes. Versuchstiere zeigen nach Verabreichung von Opiaten in niedriger Dosierung ein gesteigertes Bewegungsverhalten. Hohe Dosierungen haben ein biphasisches Lokomotionsprofil mit anfänglicher Sedierung und späterer lokomotorischer Aktivierung zur Folge (Browne et al., 1980; Brase, 1986; Grung et al., 1998). Eine Verstärkerwirkung von *low dose* Naloxon müsste sich bei einer lokomotorisch aktivierenden Morphingabe in einer gesteigerten Aktivität bei gleichbleibender Morphindosis manifestieren (Experimente im *open field*). Das subjektive Empfinden der Versuchstiere auf

Opiatwirkungen lässt sich elegant mit einem Hebeldruckparadigma in Skinnerboxen messen (Overton,1987; Spanagel und Shoaib, 1994). Mittels dieses Paradigmas lassen sich auch weitere subjektive Empfindungen (z.B. Entzug) erfassen (Baldwin und Koob, 1993) (Experimente in Skinnerboxen). Ziel dieser Arbeit war somit die Untersuchung der Effekte von *low dose* Naloxon/Naltrexon unter akuter Morphin-verabreichung sowie unter chronischen Bedingungen.

3.2. Material und Methoden *low dose* Naloxon-Konzept

3.2.1. Tiere und Tierhaltung

Die Versuche der folgenden Studie wurden an experimentell naiven, männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) durchgeführt. Nach Anlieferung wurden die Tiere in Einzelkäfige umgesetzt. Vor Beginn der Experimente wurden die Tiere mindestens 5 Tage an die Haltungsbedingungen habituiert. Die Raumtemperatur im Haltungs- und Experimentalraum betrug 21 ± 2 °C bei ca. 55 % Luftfeuchtigkeit; ein künstlicher 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus (Licht an: 07.00 Uhr) wurde mittels einer Zeitschaltuhr erzeugt.

Futter (Atormin, Ratten-Mäusediät) und Wasser stand den Tieren in den Experimenten *open field* und Verhaltensbeobachtung über die gesamte Versuchsdauer zur freien Verfügung bereit. Bei Anlieferung wogen die Ratten ca. 200 - 220 g.

Die futterdeprivierten Tiere der Experimente in den Skinnerboxen erhielten pro Tag ca. 10 Gramm Standarddiät (Atormin, Ratten-Mäusediät) zusätzlich zu der Menge, die sie sich an den Trainingstagen in den Skinnerboxen erarbeiteten. Wasser stand über die gesamte Versuchsdauer zur freien Verfügung bereit. Bei Anlieferung wogen die Ratten 220-240 g.

3.2.2. Morphinpellets

Die verwendeten Morphinpellets wurden nach der international anerkannten Rezeptur von Gibson und Tingstad (1970) aus nachfolgenden Substanzen selbst hergestellt:

- 75 mg Morphinbase
- 75 mg mikrokristalline Cellulose (Avicel)
- 0,75 mg gefällte Kieselsäure (Aerosil)
- 1,5 mg Calciumstearat

Die Substanzen wurden gemischt und durch ein Sieb mit einer Maschenbreite von 0,6 mm gesiebt. Dieses Trockengranulat wurde in einer Korsch-Expandertablettiermaschine zu Tabletten von 152 mg Gewicht, 3 mm Dicke und 9 mm Durchmesser gepresst. Aus organisatorischen Gründen musste Morphinbase selbst hergestellt werden:

100 g Morphin-HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden unter ständigem Rühren und Erwärmen in 1600 ml *aqua dest.* gelöst. Die warme Lösung wurde durch Zugabe von 5 molarer Natriumhydroxydlösung (NaOH) auf pH 8 eingestellt (ca. 50 ml). Durch Aufkochen bis kurz vor dem Siedepunkt fällt Morphinbase aus der Lösung aus und kann nach Abkühlen auf ca. 30 °C abgenutscht werden. Vor einer Weiterverarbeitung muss die gewonnene Morphinbase im Trockenschrank bei ca. 80 °C getrocknet werden (100 g Morphin-HCl ergeben etwa 75 g Morphinbase).

Vor Verwendung wurden diese Pellets in einer eigenen Versuchsreihe auf ihr Diffusionsverhalten *in vivo* getestet. Dazu wurde sechs männlichen Sprague-Dawley Ratten (Gewicht ca. 280 g) über einen zuvor gelegten chronischen Jugularvenenkatheter (nach Remie et al., 1990) 2 Pellets s.c. implantiert, alle 24 Stunden ca. 1 ml Blut entnommen, abzentrifugiert und die Morphinplasmakonzentration mittels eines Radioimmunoassays bestimmt (am Institut für Rechtsmedizin der Universität München).

3.2.3. Experimente im *open field*

Mittels dieser Versuchsanordnung kann die Lokomotion eines Versuchstieres innerhalb eines frei gewählten Zeitraumes gemessen werden. Dazu wurden die Tiere einzeln in eine 60x60x60 cm große Box gesetzt und die Bewegungen mittels einer digitalen Kamera (Panasonic) erfasst. Die computergestützte Aufzeichnung und Auswertung (TSE-Motion-System, Deutschland) erfolgt auf Basis des Helligkeitskontrastes zwischen dem Versuchstier (weiße Ratte) und farblich konträrem Hintergrund (schwarze Box). Die Versuchsbedingungen wurden standardisiert (gleiche Zeit der Versuchsdurchführung, Ausleuchtung der Apparatur mit 10 Lux), so dass die Versuche an unterschiedlichen Tagen vergleichbar waren. Je nach Versuchsdesign erfolgte die Exposition im *open field* einmalig (Verabreichung von *low dose* Naloxon akut) oder die Tiere waren an die Versuchsbox habituiert (Sensitivierung).

Verabreichung von low dose Naloxon akut

Ziel des nachfolgenden Experimentes war die Untersuchung, inwieweit die Verabreichung des Opiatantagonisten Naloxon in äußerst geringer Dosierung (*low dose*) einen verstärkenden Effekt auf die lokomotorisch stimulierende Wirkung von 1 mg/kg Morphin (Morphin-HCl, Merck, Darmstadt) hat.

Hierzu wurden Versuchstiere während der Dunkelphase (verstärkte Aktivität der Ratten) einer einstündigen Lokomotionsmessung im *open field* unterzogen. Die Naloxoninjektion (1 µg/kg s.c., 100 ng/kg s.c.) wurde 5 Minuten vor der Morphininjektion (1 mg/kg s.c.) verabreicht; die Kontrolltiere erhielten eine Salineinjektion. Unmittelbar nach der Morphininjektion wurden die Tiere in die einzelnen Boxen der Testapparatur gesetzt und mit der Messung begonnen. Die Laufstrecke innerhalb 5 Minuten wurde als einzelner Messpunkt ausgewiesen. Folgende Vergleichsgruppen wurden gebildet:

- Saline + Saline (n=9)
- Morphin (1 mg/kg s.c.) + Saline (n=9)
- Morphin (1 mg/kg s.c.) + Naloxon (1 µg/kg s.c.) (n=8)
- Morphin (1 mg/kg s.c.) + Naloxon (100 ng/kg s.c.) (n=7)

Sensitivierung

Der Frage nach einer möglichen Verstärkerwirkung von Naloxon, verabreicht in geringer Konzentration zusammen mit Morphin, sollte im nachfolgenden Experiment nachgegangen werden. Im Unterschied zum vorangestellten Experiment sollte hier die akute Wirkung von *low dose* Naloxon auf ein durch chronische Morphingabe verändertes opioiderges System untersucht werden. Auch hier galt als zu untersuchender Parameter die lokomotorische Aktivität im *open field* während der Dunkelphase.

Hierzu wurden Ratten über 5 Tage kontextspezifisch mit 3 mg/kg s.c. Morphin-HCl sensitiviert (akute Verabreichung der Morphindosis und Exposition der Tiere für 1 Stunde in die Boxen der Testapparatur). Nach 2 Tagen ohne Behandlung wurde am dritten Tag die lokomotorische Antwort auf 3 mg/kg Morphin in Kombination mit *low dose* Naloxon (1 µg/kg s.c. bzw. 100 ng/kg s.c.) getestet. Sowohl die Sensitivierung als auch der Test wurden während der Dunkelphase durchgeführt. Als Kontrolle dienten Tiere, die während der 5-tägigen Vorbehandlung nur Salineinjektionen bekommen hatten. Die Testdauer betrug 1 Stunde; die Laufstrecke innerhalb 5 Minuten wurde auch hier als einzelner Messpunkt ausgewiesen. Folgende Vergleichsgruppen wurden gebildet:

- Vorbehandlung Saline Morphin (3 mg/kg s.c.) + Saline (n=7)
- Vorbehandlung Morphin Morphin (3 mg/kg s.c.) + Saline (n=7)
- Vorbehandlung Morphin Morphin (3 mg/kg s.c.) + Naloxon (1 µg/kg s.c.) (n=7)
- Vorbehandlung Morphin Morphin (3 mg/kg s.c.) + Naloxon (100 ng/kg s.c.) (n=7)

3.2.4. Experimente in Skinnerboxen

Mittels dieser Versuchsanordnung kann über die Interpretation des Hebeldruckverhaltens das individuelle Empfinden einzelner Versuchstiere gemessen werden (Overton, 1987). Dieses Verhalten kann je nach Versuchsdesign sowohl das Wirkungsprofil eines verabreichten Pharmakons (*drug discrimination*: Verstärkerfunktion von *low dose* Naloxon) widerspiegeln als auch das individuelle Empfinden eines Tieres nach spezieller Behandlung (Entzug in Skinnerboxen unter *low dose* Naloxon während der Abhängigkeitsentwicklung). Dieses Hebeldruckverhalten kann als äußerst sensitiv angesehen werden.

drug discrimination:

Ziel des Experimentes war die Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung des Opiatagonisten Morphin und der Einfluss einer Verabreichung von *low dose* Naloxon (zusammen mit Morphin) auf diese Wirkungsbeziehung.

Futterdeprivierte Ratten wurden in Skinnerboxen (Coulbourn Instruments, California, USA) darauf trainiert, sich mittels Hebeldruckverhalten innerhalb von 15 Minuten Futterpellets (45 mg, Bioserve, Frenchtown, USA) zu erarbeiten. Innerhalb der Boxen waren 2 Hebel angebracht, jeweils rechts und links in gleicher Entfernung eines Futterspenders. Das anfängliche Verhältnis von einem Hebeldruck/1 Futterpellet (fixed ratio, FR-1) wurde schrittweise auf 10 Hebeldrücke/1 Futterpellet gesteigert (FR-10). Sobald sich ein stabiles Hebeldruckverhalten abzeichnete, konnte mit dem Diskriminationstraining begonnen werden. Die Tiere erhielten je nach Trainingsprogramm entweder Morphin (3 mg/kg s.c.) oder Saline (0,9 % s.c.) und wurden 10 Minuten nach der Injektion in die Boxen gesetzt und die Hebel für 15 Minuten freigeschaltet. Dem Trainingstag entsprechend richtige Hebeldrücke wurden mit einem Futterpellet belohnt, die falsche Hebelwahl wurde lediglich aufgezeichnet. Die Tiere wurden einmal täglich über mehrere Wochen nach einer randomisierten Sequenz von Morphin- bzw. Salineinjektionen trainiert, wobei 3 gleichartige Injektionen in Folge nicht überschritten wurden. Als Kriterium für ein erfolgreiches Erlernen der *drug discrimination* wurde ein 90 % richtiges Antwortverhalten während 10 aufeinander folgenden Trainingstagen gewertet.

Für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve für Morphin wurden folgende Dosierungen gewählt: 0 mg/kg (n=22), 0,25 mg/kg (n=14), 0,75 mg/kg (n=22), 1,5 mg/kg (n=15), 2 mg/kg (n=12), und 3 mg/kg (n=22).

Nach Erstellung dieser Dosis-Wirkungsbeziehung wurde die Dosierung von 0,75 mg/kg Morphin ausgewählt und der Einfluss einer Verabreichung von Naloxon (s.c., 5 Minuten vor der Morphininjektion) in den Dosierungen 50 ng/kg (n=19) und 10 ng/kg (n=14) getestet. Versuche mit einer Dosierung von 1 µg/kg Naloxon wurden abgebrochen, nachdem unter dieser Behandlung eindeutig eine antagonistische Wirkung zu beobachten war. Zwischen den einzelnen Tests der verschiedenen Dosierungen und Koapplikationen mit Naloxon wurden intensive Trainingstage und Wochen eingelegt, um in den Tieren Irritationen zu vermeiden.

Opiatentzug in Skinnerboxen:

Ziel des Experimentes war die Untersuchung inwieweit die Gabe von *low dose* Naloxon während einer chronischen Morphingabe die Ausprägung einer Entzugssymptomatik beeinflusst. Kriterium hierfür war das Absinken der Hebeldruckleistung in Skinnerboxen in morphinabhängigen Tieren bei Entzugsprovokation durch Naloxon.

Die futterdeprivierten Versuchsratten wurden darauf trainiert, sich innerhalb von 30 Minuten in den bereits vorgestellten Skinnerboxen (*drug discrimination*) Futterpellets zu erarbeiten. Das anfängliche Verhältnis von einem Hebeldruck/1 Futterpellet (*fixed ratio*, FR-1) wurde schrittweise auf 15 Hebeldrücke/1 Futterpellet gesteigert (FR-15). Es wurde über einen Gesamtzeitraum von ca. 6 Wochen trainiert (an 6 von 7 Tagen), bis eine stabile Hebeldruckrate sich abzeichnete und zur Induzierung einer Opiatabhängigkeit die unter 3.2.2. beschriebenen Morphinpellets *subcutan* implantiert werden konnten. Das Kriterium hierfür war eine Abweichung von ± 10 Prozent vom Mittelwert über 3 aufeinanderfolgende Tage. Die 24 Tiere wurden randomisiert und in 3 Gruppen aufgeteilt (n=8):

- Vorbehandlung Saline + Saline ⇒ Vorbehandlung Saline
- Vorbehandlung Morphin (Pellets) + Saline ⇒ Vorbehandlung Morphin
- Vorbehandlung Morphin (Pellets) + Naloxon (10 ng/kg/h) ⇒ Vorbehandlung *low dose*
Naloxon

Die Implantation der Morphinpellets erfolgte unter Halothannarkose (Hoechst, Deutschland). Über einen kleinen Schnitt im Nackenbereich des Tieres (ca. 1 cm) wurde mittels einer chirurgischen Klemme eine *subcutane* Tasche eröffnet, in die 3 (in Nylongaze eingewickelte) 75 mg Morphinpellets eingebracht wurden. Mit Wundklemmen (Aesculap, Deutschland) wurde die Wunde verschlossen und anschließend desinfiziert. Zum Zeitpunkt dieser Implantation wogen die Tiere ca. 380 g. Einer der 3 Versuchsgruppen wurde zusätzlich eine

osmotische Minipumpe (Alzet) implantiert, aus der 10 ng/kg/h Naloxon über einen Zeitraum von 7 Tagen diffundiert. Die anderen beiden Versuchsgruppen erhielten Implantate, die mit Saline gefüllt waren. Nach 3 Tagen hatten sich die Versuchstiere von dem Eingriff erholt und waren in der Leistung im Hebeldruckverhalten auf den Ausgangswert vor der Implantation zurückgekehrt, so dass nach insgesamt 5 Tagen der Entzug in den Boxen mit 25 µg/kg s.c. Naloxon provoziert wurde. Die unterschiedlich vorbehandelten Gruppen (siehe oben) wurden wie folgt benannt:

- (Vorbehandlung) Saline + Naloxon (25 µg/kg)
- (Vorbehandlung) Morphin + Naloxon (25 µg/kg)
- (Vorbehandlung) *low dose* Naloxon + Naloxon (25 µg/kg)

Die parallel geführte Gruppe (Vorbehandlung) Saline + Saline wurde der Übersichtlichkeit wegen nicht in die Abbildungen übernommen, da sich hier gegenüber der Gruppe (Vorbehandlung) Saline + Naloxon (25 µg/kg) keinerlei Unterschiede in der Hebeldruckleistung ergaben.

Um den unterschiedlichen Tagesschwankungen der Tiere Rechnung zu tragen, wurde die jeweilige Tageshebeldruckleistung erfasst und gleich 100 Prozent gesetzt. Danach wurden die Tiere pharmakologisch behandelt und der Abfall der Hebeldruckleistung gegenüber der Tagesverfassung in Prozent berechnet.

3.2.5. Experiment in Beobachtungsboxen

Entzugssymptomatik und Gewichtsveränderung

In dieser Studie sollte der Einfluss einer gleichzeitigen Gabe von *low dose* Naltrexon während der Abhängigkeitsentwicklung auf ein nachfolgendes Entzugsgeschehen untersucht werden. Um die Implantation von osmotischen Minipumpen zu vermeiden, wurde wegen seiner pharmakokinetischen Eigenschaften (stark verlängerte biologische Halbwertszeit gegenüber Naloxon bei gleichwertigen pharmakodynamischen Eigenschaften) Naltrexon als Opiat-antagonist gewählt (Gonzales und Brodgen, 1988). Zur Erzeugung einer Opiatabhängigkeit wurde den Tieren alle 12 Stunden eine Morphininjektion verabreicht (Dosierung von 5 mg/kg bis 50 mg/kg über 7 Tage, s.c.), wobei einer Hälfte der Versuchsratten jeweils 5 Minuten vor der Morphininjektion 1µg/kg Naltrexon s.c., der anderen Hälfte Saline appliziert wurde (jeweils n=10). Der Entzug wurde am achten Tag mittels 10 mg/kg s.c. Naloxon provoziert

und die Entzugssymptome in einer 30-minütigen Beobachtungsphase erfasst. Nach weiteren eineinhalb Stunden wurde die Gewichtsveränderung der Tiere ermittelt und in Prozent ausgewertet, wobei das Gewicht vor der Entzugsprovokation als 100 % festgesetzt wurde. Zur Erfassung des Entzugs wurden die unter 2.2.2. (Experiment 1) beschriebenen Entzugssymptome gewertet und entweder nach Anzahl oder Schwere erfasst:

teeth chattering, wet dog shakes, paw tremor, sniffing, penile erection, Putzverhalten (*grooming*) und vertikales Springen (*jumping*). Durchfall, Ptosis (Herabhängen des Oberlides), Speichelfluß (*salivation*), Augenbluten und Nasenbluten wurden zusammengefasst und als globales Entzugssymptom (*global withdrawal*) gewertet.

3.2.6. Auswertung und Statistik

Auswertung der Experimente im open field

Die Daten beider Experimente (Verabreichung von *low dose* Naloxon akut und Sensitivierung) wurden als Gesamtlaufstrecke, aufgeteilt in 5-Minuten-Intervalle, angegeben. Einzelne Datenpunkte sind die Gruppenmittelwerte \pm SEM. Die statistische Bearbeitung erfolgte auf der Basis einer zwei-faktoriellen Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA, Faktor A: Gruppe, Faktor B: wiederholte Messung). Statistische Signifikanz wurde bei $p < 0,05$ gewertet, bei $p < 0,01$ wurde das Ergebnis als hoch signifikant angesehen.

Auswertung der Experimente in Skinnerboxen

drug discrimination:

Aus dem Hebeldruckverhalten der Versuchstiere wurde ihr subjektives Empfinden auf die verabreichte Morphindosis ermittelt. Ausschlaggebend hierfür waren am Testtag die ersten Hebeldrücke bis zum Erreichen von FR-10 für einen der beiden Hebel. Somit konnten pro Tier maximal 19 mögliche Hebeldrücke gegeben werden, aus denen nach folgender Formel das prozentuale Entscheidungsverhalten der Tiere gewonnen wurde:

$$\frac{\text{Anzahl der Hebeldrücke für Morphinwirkung}}{\text{Anzahl der Gesamthebeldrücke}} \times 100$$

Die Daten zum Einfluss von *low dose* Naloxon wurden unter selbigen Voraussetzungen erhoben. Die Datenpunkte sind auch hier als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. Eine ein-faktorielle ANOVA wurde zu statistischen Berechnungen verwendet.

Opiatentzug in Skinnerboxen:

Als auszuwertende Daten wurden die von den Tieren in den operanten Boxen erzielten Hebeldruckraten (innerhalb von 30 min) ermittelt. Sämtliche Daten der einzelnen Gruppen wurden als Mittelwert \pm SEM berechnet. Die ersten 10 Minuten wurden als Tagesleistung gewertet, die nachfolgenden 20 Minuten errechneten sich als prozentuale Abweichung von der jeweiligen Tagesleistung. Die so erhaltenen Daten der einzelnen Gruppen wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA statistisch überprüft. Als nachfolgender *post hoc*-Test wurde der Newman-Keuls Test verwendet. Wenn die daraus berechnete Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ war, konnte dieses Ergebnis als signifikant angesehen werden, bei $p < 0,01$ als hoch signifikant.

Experiment in Beobachtungsboxen:

Die Daten der einzelnen Entzugssymptome wurden als absolute Anzahl innerhalb 30 Minuten Beobachtungszeit ausgewertet. Die Bewertung mehrerer Entzugssymptome zu einem globalen Entzugssymptom erfolgte nach der beobachteten Intensität (Skala von 0-3). Die Angabe erfolgte als Gruppenmittelwert \pm SEM. Statistische Berechnungen wurden mittels einer einfaktoriellen ANOVA durchgeführt.

3.3. Ergebnisse *low dose* Naloxon-Konzept

Morphinpellets

Abbildung 13 zeigt das Diffusionsverhalten der selbst hergestellten Morphinpellets *in vivo* über einen Zeitraum von 12 Tagen nach *subcutaner* Implantation. Die Rezeptur richtete sich nach internationalem Standard.

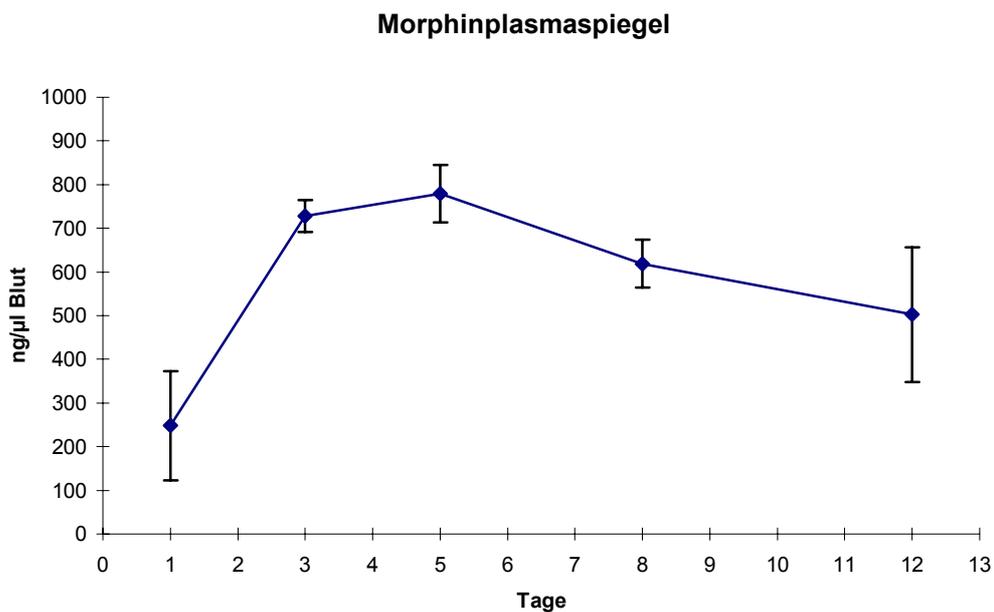


Abb. 13: Morphinplasmakonzentration in ng/µl Blut über die Testzeit von 12 Tagen. Den Versuchstieren wurden 2 Morphinpellets, sowie ein chronischer Jugularvenenkatheter implantiert, über den an den Bestimmungstagen Blut entnommen werden konnte. Die Werte sind als Mittelwert (n=6) ± SEM wiedergegeben.

Die gewonnenen Daten gehen mit Betrachtungen von Yoburn et al. (1990) und Berkowitz et al. (1974) konform, die eine durchschnittliche Morphinplasmakonzentration von 200 ng/µl als gerade noch ausreichend für diverse morphininduzierte Effekte (incl. Entzug) aufzeigen konnten. Diese Grenze von 200 ng/µl wurde weit überschritten, so dass mit einer relativ konstanten und ausreichenden Morphinplasmakonzentration in den Versuchstieren gerechnet werden konnte. Diese Ergebnisse lassen eine Verwendung der selbst hergestellten Morphinpellets zur Erzeugung einer Opiatabhängigkeit zu.

Experimente im open field

Verabreichung von low dose Naloxon akut

Ziel des Versuchs war die Überprüfung eines verstärkenden Effektes von Naloxon (koappliziert im *low dose*-Bereich) auf eine lokomotorisch stimulierende Morphindosierung nach akuter Verabreichung beider Substanzen.

Für diesen Versuch typische Laufmuster einzelner Versuchstiere im *open field* sind exemplarisch in Abbildung 14 zu sehen: nach anfänglicher Exploration der neuen Umgebung lässt die Aktivität der Salinekontrolle (A) deutlich nach, die lokomotorische Aktivität morphinbehandelter Tiere (B, C, D) hingegen fällt weniger deutlich ab; in der gewählten Dosierung von 1 mg/kg wirkt Morphin stimulatив.

Multi-cage distance traveled monitor
Date : 06/05/98
Datafile : NLX9.prn

(c) 1994 TSE GmbH

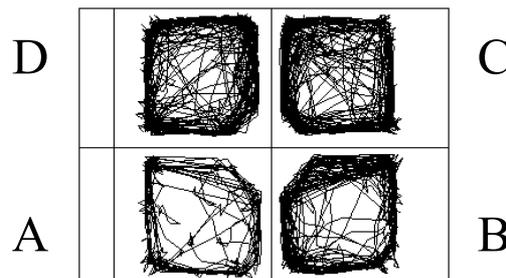


Abb. 14: Laufstreckendiagramm einzelner Versuchstiere im *open field*. (A) Saline + Saline, (B) Morphin (1 mg/kg s.c.) + Saline, (C) Morphin (1 mg/kg s.c.) + Naloxon (1 µg/kg s.c.), (D) Morphin (1 mg/kg s.c.) + Naloxon (100 ng/kg s.c.)

Abbildung 15 zeigt das Gesamtergebnis dieser einstündigen Lokomotionsmessung. Die statistische Berechnung weist einen hoch signifikanten Unterschied aus bezüglich der Gruppen ($F[3,32]=7,42$, $p=0,0008$) als auch im zeitlichen Verlauf ($F[11,319]=40,9$, $p<0,0001$). Auch die Interaktion beider Faktoren ($F[33,319]=1,58$, $p=0,025$) konnte als statistisch gesichert gewertet werden. Darauf basierend erbrachte eine weitergehende statistische Überprüfung allerdings keine Unterschiede in den morphinbehandelten Gruppen ($F[2,23]=0,72$, $p=0,49$; wiederholte Messung $F[11,231]=23,0$, $p<0,0001$); Interaktion $F[22,231]=1,28$, $p=0,18$).

Naloxon "low dose" akut

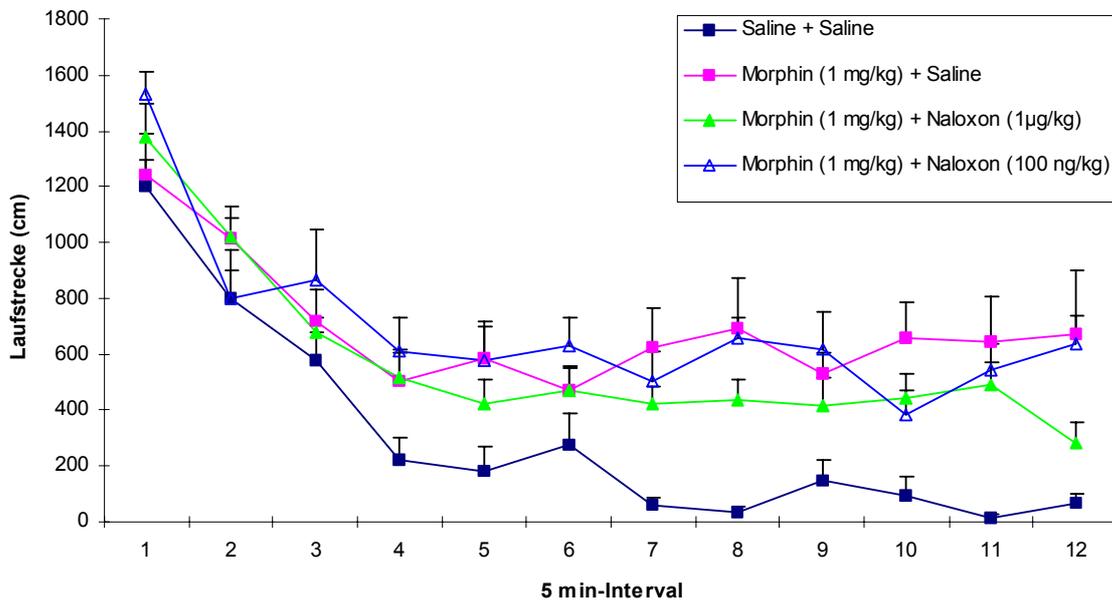


Abb. 15: Einstündige Lokomotionsmessung im *open field* nach akuter Verabreichung von Naloxon (1 µg/kg s.c. bzw. 100 ng/kg s.c.) und Morphin (1 mg/kg s.c.). Die Naloxoninjektion erfolgte 5 min vor der Morphininjektion, Kontrolltiere erhielten Saline. Das Gruppendesign und Tieranzahl/Gruppe waren folgende: Saline + Saline (n=9); Morphin (1 mg/kg s.c.) + Saline (n=9), Morphin (1 mg/kg s.c.) + Naloxon (1 µg/kg s.c.) (n=8), Morphin (1 mg/kg s.c.) + Naloxon (100 ng/kg s.c.) (n=7).

Es zeigt sich folglich deutlich eine lokomotorisch stimulierende Komponente durch die Verabreichung von Morphin, allerdings kann kein Einfluss einer Koapplikation von Naloxon im *low dose*-Bereich ausgemacht werden.

Sensitivierung:

Ziel dieses Experiments war die Untersuchung der Wirkungsweise von Morphin in Kombination mit *low dose* Naloxon in sensitivierten Versuchstieren (Abbildung 16). Die statistische Signifikanz aller Gruppen gemeinsam (Faktor Gruppe $F[3,27]=4,35$, $p=0,014$; Faktor wiederholte Messung $F[11,264]=25,9$, $p<0,0001$; Interaktion $F[33,264]=0,88$, $p=0,64$) ist auf die salinevorbehandelte Vergleichsgruppe zurückzuführen: in den mit Morphin sensitivierten Gruppen konnte kein statistischer Unterschied ausgemacht werden, der auf eine unterschiedliche Wirkungsweise von Morphin in Kombination von *low dose* Naloxon schließen lässt (Faktor Gruppe $F[2,20]=0,43$, $p=0,65$; Faktor wiederholte Messung $F[11,198]=18,3$, $p<0,0001$;

Interaktion $F[22,198]=0,68$, $p=0,64$). Dennoch konnten die Tiere durch die 7-tägige Vorbehandlungsphase erfolgreich sensitiviert werden, wie die Statistik zwischen den Gruppen Morphin/Saline/Vorbehandlung Saline und Morphin/Saline/Vorbehandlung Morphin beweist (Faktor Gruppe: $F[1,13]=13,0$, $p=0,0036$; Faktor wiederholte Messung: $F[11,132]=15,7$, $p<0,0001$; Interaktion $F[11,132]=1,59$, $p=0,11$).

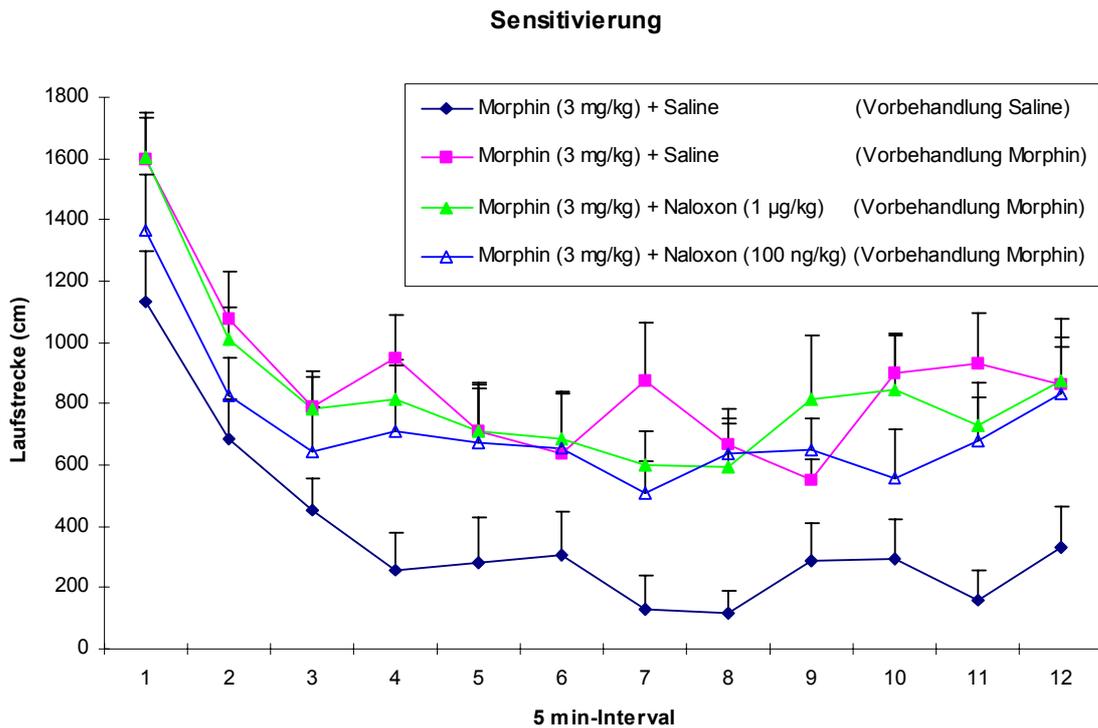


Abb. 16: Einstündige Lokomotionsmessung in sensitivierten Tieren. Die Sensitivierung erfolgte kontextspezifisch an 5 aufeinander folgenden Tagen mit 3 mg/kg Morphin s.c.. Nach 2-tägiger Pause ohne Behandlung wurde am dritten Tag die lokomotorische Antwort auf 3 mg/kg Morphin s.c. in Kombination mit Naloxon (1 µg/kg s.c. bzw. 100 ng/kg s.c.) getestet. Die Naloxoninjektion erfolgte 5 Minuten vor der Morphininjektion, Kontrolltiere erhielten physiologische Kochsalzlösung. Das Gruppendesign war folgendes: Morphin (3 mg/kg s.c.) + Saline (Vorbehandlung Saline); Morphin (3 mg/kg s.c.) + Saline (Vorbehandlung Morphin), Morphin (3 mg/kg s.c.) + Naloxon (1 µg/kg s.c.) (Vorbehandlung Morphin), Morphin (3 mg/kg s.c.) + Naloxon (100 ng/kg s.c.) (Vorbehandlung Morphin). Die Tieranzahl/Gruppe betrug jeweils n=7.

Zusammenfassend konnte in den Experimenten im *open field* kein verstärkender Effekt von *low dose* Naloxon, koappliziert mit Morphin, festgestellt werden.

Experimente in Skinnerboxen

drug discrimination:

Ziel des Experiments war die Erstellung einer Dosis-Wirkungsbeziehung für Morphin und darauf basierend die Untersuchung, ob die Koapplikation von *low dose* Naloxon eine Verschiebung dieser Dosis-Wirkungsbeziehung bewirkt. Dazu wurden futterdeprivierte Ratten in Skinnerboxen täglich über mehrere Wochen hinweg darauf trainiert, eine Salineinjektion (0,9 % s.c.) von einer Morphininjektion (3 mg/kg s.c.) zu diskriminieren.

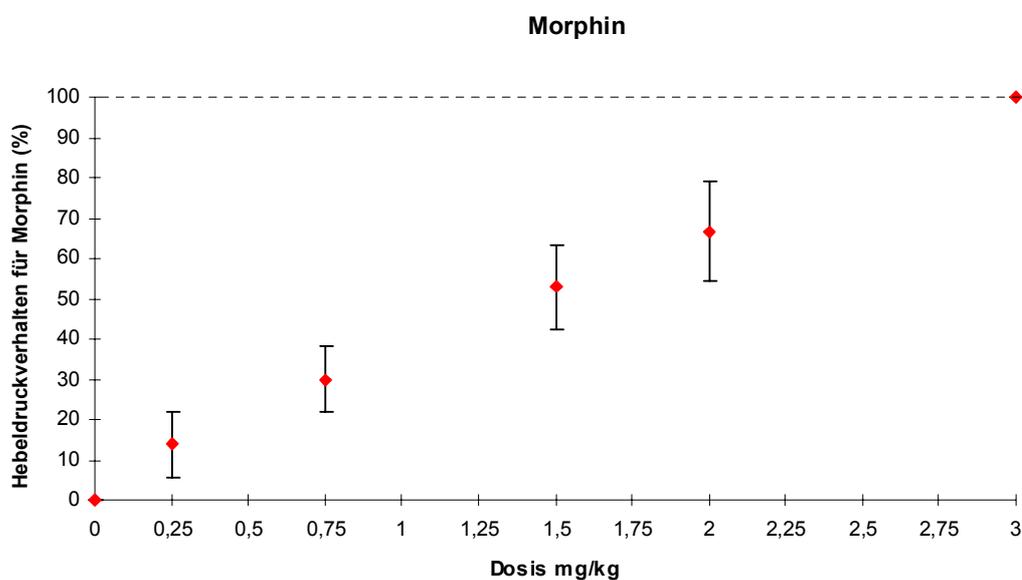


Abb. 17: *drug discrimination*: Dosis-Wirkungskurve für Morphin-HCl. Futterdeprivierte Ratten wurden trainiert, eine Salineinjektion (0,9 % s.c.) von einer Morphininjektion (3 mg/kg s.c.) zu diskriminieren (kein SEM). Die anderen Datenpunkte spiegeln im Mittel \pm SEM die Häufigkeitsverteilung der Hebeldrücke (Saline oder Morphin) der Tiere auf die verabreichte Dosis wider (0 mg/kg (n=22), 0,25 mg/kg (n=14), 0,75 mg/kg (n=22), 1,5 mg/kg (n=15), 2 mg/kg (n=12), und 3 mg/kg (n=22)). Die Versuchsreihe wurde mit den selben Tieren an mehreren Tagen im *mixed* design durchgeführt.

In Abbildung 17 ist für die Dosierung 0 mg/kg und 3 mg/kg Morphin kein Standardfehler zu verzeichnen, da dies die Trainingsdosierungen waren und nur Tiere zum Test zugelassen wurden, die diese Voraussetzung erfüllten.

Aus der linearen Beziehung wurde die Dosis von 0,75 mg/kg Morphin ausgewählt, um den Einfluss einer zusätzlichen Verabreichung von *low dose* Naloxon zu untersuchen. Die Versuche mit 1 μ g/kg Naloxon wurden nach 7 Tieren abgebrochen, da Naloxon in dieser

Dosierung die Morphinwirkung bereits zu antagonisieren vermochte (5 von 7 Tieren drückten für Saline). Auf die Berechnung einer Statistik wurde auf Grund der zu geringen Gruppenstärke (n=7 gegen n=14-22 in den anderen Gruppen) verzichtet. Dies wird in Abbildung 18 durch die unterschiedliche Darstellung des Datenpunktes zum Ausdruck gebracht. Die Statistik (ein-faktorielle ANOVA) bezieht nur die Gruppen Morphin + Saline, Morphin + Naloxon (10 ng/kg) und Morphin + Naloxon (50 ng/kg) ein und weist zwischen den drei Gruppen keinen statistischen Unterschied aus ($F[2,52]=0,48$, $p=0,62$).

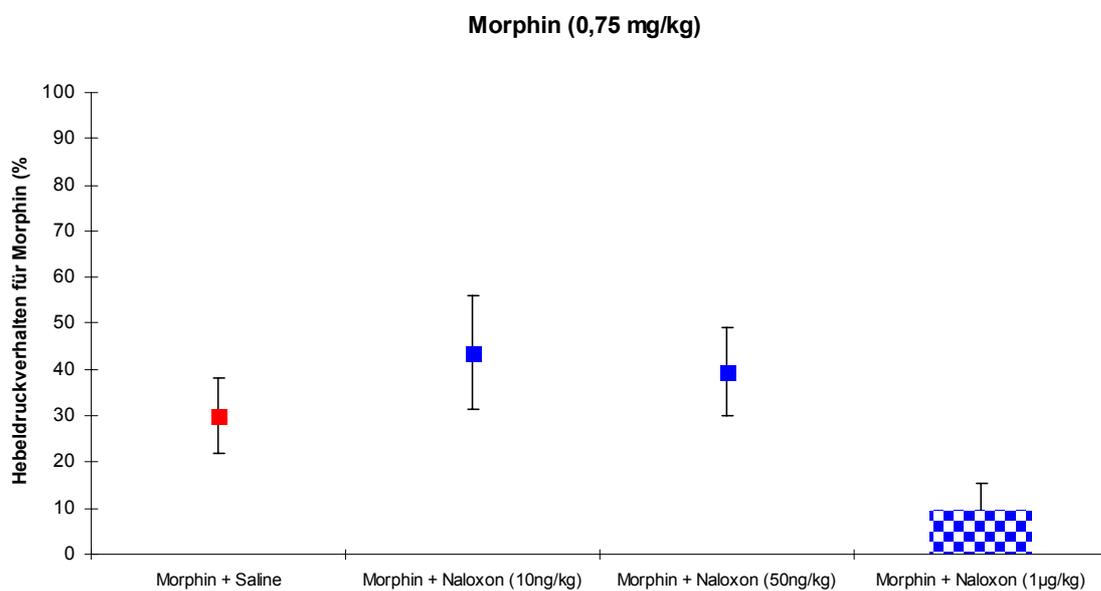


Abb. 18: *drug discrimination*: 0,75 mg/kg Morphin s.c. in Verbindung mit Saline (n=22) (rot), 10 ng/kg (n=14) und 50 ng/kg (n=19) Naloxon (blau). Die Versuche mit 1 µg/kg Naloxon (n=7) (Säule) haben in diesem Testparadigma deutlich antagonistische Wirkung, wurden deshalb nicht weiter verfolgt und gehen auch nicht in die statistische Berechnung mit ein. Dies wird durch einen Datenpunkt im Säulenformat ausgedrückt.

Ein die Morphinwirkung verstärkender Effekt von *low dose* Naloxon konnte nicht festgestellt werden. Die Sensitivität des gewählten Versuchsverfahrens steht indes außer Frage, da bereits geringste Mengen Naloxon die Morphinwirkung zu antagonisieren vermochten.

Opiatentzug in Skinnerboxen

Ziel des Experimentes war die Untersuchung, inwieweit die chronische Gabe von *low dose* Naloxon (10 ng/kg/h) während einer chronischen Morphingabe (3 Morphinpellets a 75 mg) die Ausprägung einer Entzugssymptomatik beeinflusst. Kriterium hierfür war das Absinken

der Hebeldruckleistung in Skinnerboxen bei Entzugsprovokation durch Naloxon (25 mg/kg s.c.).

Alle drei Gruppen sind statistisch hoch differenzierbar, wobei sich die Kontrollgruppe (Saline + Naloxon) signifikant von der Gruppe Morphin + Naloxon und statistisch hoch signifikant von der Gruppe *low dose* Naloxon + Naloxon unterscheidet ($F[2,21]=8,51$, $p=0,002$). Allerdings konnte trotz stärkerem Absinken der Hebeldruckleistung in der mit *low dose* Naloxon vorbehandelten Gruppe kein statistischer Unterschied zur morphinabhängigen salinevorbehandelten Gruppe (Morphin + Naloxon) ausgemacht werden (Abbildung 19).

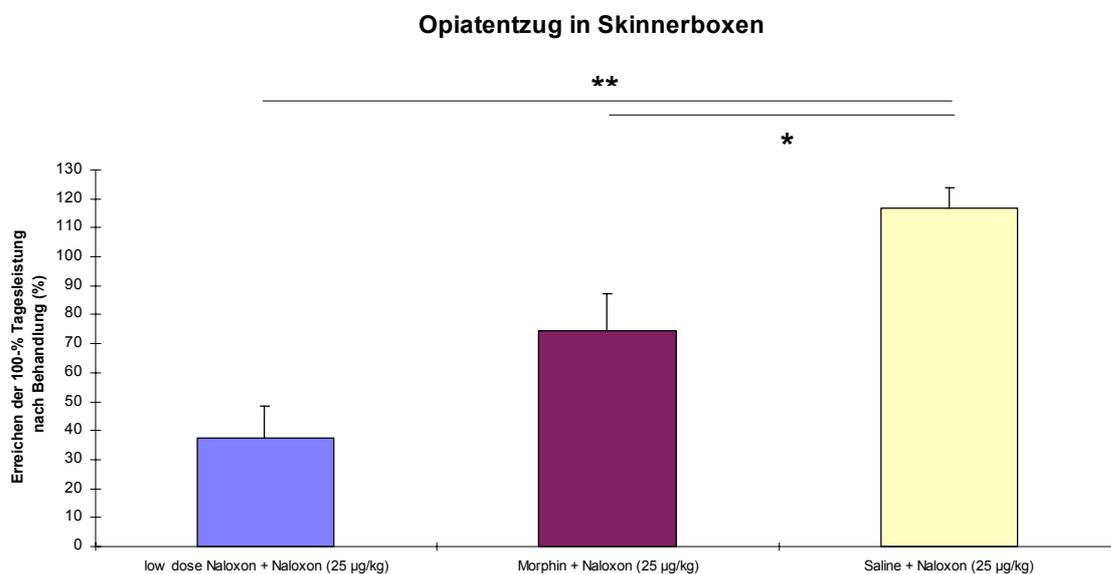


Abb. 19: Entzugsprovokation mit 25µg/kg Naloxon s.c. in morphinabhängigen Versuchstieren (3 Morphinpellets a 75 mg Morphinbase) und entsprechender Kontrollgruppe. Legendenbezeichnung „*low dose* Naloxon“ beinhaltet als Vorbehandlung die Implantation von 3 Morphinpellets (75 mg) in Kombination mit chronischer Naloxongabe (10 ng/kg/h) über eine osmotische Minipumpe, „Morphin“ bezeichnet Morphinpelletimplantation + Saline als Vorbehandlung. Die Kontrollgruppe erhielt Saline. * kennzeichnet $p<0,05$, ** $p<0,01$.

Die Verabreichung von 25 µg/kg Naloxon s.c. in Salinekontrollen bleibt ohne Einfluss auf die Hebeldruckleistung der Tiere gegenüber reinen Salinekontrollen ($F[1,10]=0,04$, $p=0,83$) (ohne Abbildung). Entzugsprovokation mit 100 µg/kg Naloxon s.c. führt zum vollständigen Abfall in der Hebeldruckleistung in pelletimplantierten Tieren (unabhängig von der zusätzlichen

Verabreichung von *low dose* Naloxon), so dass davon ausgegangen werden kann, dass in allen Tieren die Morphinabhängigkeit gleichermaßen gegeben war (ohne Abbildung).

Experiment in Beobachtungsboxen

Ziel des Experiments war die Untersuchung, ob die Gabe eines Opiatantagonisten, verabreicht in geringer Dosierung während der Induktion der Opiatabhängigkeit, die Ausprägung von Entzugssymptomen moderiert.

Der Gewichtsverlust beider Gruppen 2 Stunden nach Entzugsprovokation mit 10 mg/kg Naloxon war nahezu identisch. Ein statistischer Unterschied konnte folglich nicht ermittelt werden (Morphin + Saline $8,83 \pm 0,59$ %; Morphin + *low dose* Naltrexon $8,52 \pm 0,47$; ($F[1,11]=0,06$; $p=0,80$). Abbildung 20 zeigt die innerhalb der 30-minütigen Beobachtungsphase aufgezeichneten Entzugssymptome. Bis auf das Symptom *jumping* konnten keine Unterschiede in den Gruppen festgestellt werden. Tabelle 2 gibt die statistischen Berechnungen der einzelnen Entzugssymptome wider. Die Zusammenfassung der nach ihrer Schwere gewichteten Symptome zu einem globalen Entzugssymptom (*global withdrawal*) lässt auch hier keine Differenzierung der Gruppen zu und somit auf einen Einfluss von *low dose* Naltrexon schließen (Morphin + Saline $1,00 \pm 0,13$; Morphin + *low dose* Naltrexon $0,86 \pm 0,10$; $F[1,14]=0,38$, $p=0,54$).

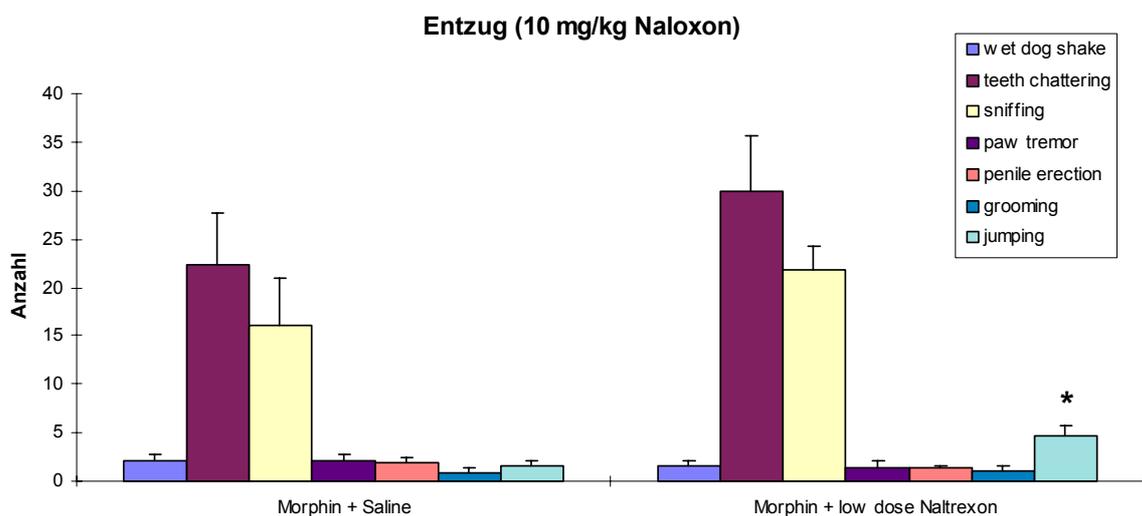


Abb. 20: Entzugssymptome (innerhalb 30 Minuten) nach Entzugsprovokation mit 10 mg/kg Naloxon s.c. in morphinabhängigen Versuchstieren (5 mg/kg bis 50 mg/kg s.c. Morphin-HCl alle 12 Stunden über 7 Tage). Gruppe Morphin + *low dose* Naltrexon bekam über 7 Tage 1 µg/kg Naltrexon 5 Minuten vor der Morphininjektion; Gruppe Morphin + Saline entsprechend eine Salineinjektion (0,9%). * kennzeichnet $p<0,05$.

wet dog shake	F[1,14]=0,19	p=0,6331
teeth chattering	F[1,14]=0,35	p=0,5617
Sniffing	F[1,14]=1,46	p=0,2469
paw tremor	F[1,14]=0,36	p=0,5577
penile erection	F[1,14]=0,78	p=0,3895
Grooming	F[1,14]=0,13	p=0,7192
Jumping	F[1,14]=4,98	p=0,0439 *

Tab. 2: Statistische Berechnung der einzelnen Entzugssymptome während der 30-minütigen Beobachtungsphase. * kennzeichnet $p < 0,05$.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass nur in wenigen Experimenten zur Untersuchung des *low dose*-Konzepts eine Tendenz zur morphinverstärkenden Wirkung von *low dose* Naloxon/Naltrexon gefunden werden konnte. Diese konnte jedoch nicht statistisch untermauert werden.

3.4. Diskussion *low dose* Naloxon-Konzept

Ausgehend von Beobachtungen, dass Naloxon, entgegen seinen pharmakologischen Eigenschaften als klassischer Opiatantagonist, sowohl bei Patienten mit chronischen Schmerzen als auch in chronischen Schmerzmodellen (Tiermodelle) analgetisch wirkt, wenn es im *low dose* -Bereich verabreicht wird (Levine et al., 1979; Kayser et al. 1981, 1988a,b; Rios et al. 1982; Tsuruoka et al. 1997), sollte dieses Phänomen auch in anderen opiatvermittelten Wirkungen untersucht werden. Ziel der im Folgenden diskutierten Experimente war, einen verstärkenden Einfluss von *low dose* Naloxon auf andere Morphinwirkungen zu untersuchen (in der Ratte als Versuchstier). Hierbei wurde untersucht, ob die lokomotorisch aktivierende Komponente akut verabreichter Morphininjektionen in drogennaiven Tieren durch *low dose* Naloxon verstärkt werden kann (*open field*). Des Weiteren sollte dieses Konzept in chronisch morphinbehandelten Tieren Anwendung finden, vor allem hinsichtlich der Modifizierung von Entzugssymptomen nach pharmakologisch provoziertem Entzug (Beobachtungsstudien, *drug discrimination*).

Die vorliegenden Ergebnisse der Experimente im *open field* konnten keine Einflussnahme von *low dose* Naloxon auf eine lokomotorisch aktivierende Morphindosis zeigen. Weder die Verabreichung in drogennaiven Tieren noch in sensitivierten Versuchstieren konnte das Lokomotionsverhalten verstärken. Die Durchführung der Versuche kann jedoch als erfolgreich bezeichnet werden, wie die Auswertung und statistische Analyse der Vergleichsgruppen ergaben.

Es stellt sich somit die Frage, welche neurochemischen Prozesse und neuroanatomischen Strukturen pharmakologisch induziertes Lokomotionsverhalten in der Ratte hervorrufen und steuern. Innerhalb der komplexen Steuerung lokomotorischer Aktivität kommt dem mesolimbischen-dopaminergen System als Auslöser stimulierender Opiatwirkungen tragende Bedeutung zu (Stinus et al., 1980; Kalivas et al., 1983). Die Beteiligung dieser mesolimbischen-dopaminergen Strukturen steht auch unmittelbar im Zusammenhang mit der Suchtentstehung. Bisherige Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, dass dieselben Strukturen, die motivationale Elemente steuern, und damit letztlich auch das Überleben einer Spezies sichern sollen, durch die positiven Verstärkereigenschaften mancher Drogen (Morphin, Nikotin, Ethanol, Kokain) genauso stimuliert werden, wie die Schlüsselreize, die das tägliche Überleben sichern (Futter, Sexualreize) (Di Chiara und Imperato, 1988; Church et al., 1987). Das mesolimbische System hat seinen Ursprung in den Somata dopaminerg

Neurone im ventralen tegmentalen Areal (VTA). Diese Neurone projizieren zum Nucleus accumbens, zur Stria terminalis, zum ventralen Globus pallidus, Teilen der Amygdala und des Hippocampus, zu den lateralen septalen Kernen, zum Cingulum und zum entorhinalen Cortex (Kandel et al., 1991). Besondere Bedeutung kommt der Projektion zum Nucleus accumbens zu. Dieses Kerngebiet ist unter anderem auch mit der Amygdala, dem Hippocampus und dem präfrontalen Cortex über glutamaterge Projektionen verbunden (Meredith et al., 1993). Weitere dopaminerge Innervation erfährt der Nucleus accumbens durch die Substantia nigra (Fallon und Moore, 1978). *In vivo* Mikrodialyseexperimente und *in vitro* Gehirnschnittpräparationen konnten die anfänglich widersprüchlichen Ergebnisse der Messungen der Dopaminfreisetzung während der akuten und chronischen Opiatverabreichung und im Entzug klären: die *akute* Opiatbehandlung hat im Nucleus accumbens und Striatum einen Anstieg des Dopaminspiegels zur Folge (Di Chiara und Imperato, 1988). Der stimulative Effekt von Morphin in den entsprechenden Gehirngebieten scheint auf einem inhibitorischen Effekt von μ - und δ -Opiatrezeptoren innerhalb der VTA zu beruhen, die ihrerseits auf inhibitorischen, GABAergen (γ -Aminobuttersäure) Interneuronen lokalisiert sind (Spanagel et al. 1992). Durch die Inhibition einer Inhibition ergibt sich letztlich eine Stimulation (Di Chiara und North, 1993). Dennoch spielen neben Dopamin und Glutamat eine Reihe weiterer Neurotransmitter und neuronale Schaltkreise eine wichtige Rolle bei der Regulation lokomotorischen Verhaltens. So konnten GABAerge Projektionen des Nucleus accumbens zum ventralen Globus pallidus und zur VTA gefunden werden (Jones und Mogenson, 1980) sowie weitere GABAerge Projektionen vom Globus pallidus zur VTA (Kalivas et al., 1993), so dass sich hier eine neuronal-funktionelle Kopplung der Gehirngebiete untereinander ergibt. Des Weiteren konnten Pei et al. 1993 eine Beteiligung Serotonins an morphininduzierter mesolimbischer Dopaminausschüttung bestätigen (Pei et al., 1993). Vor dem Hintergrund äußerst komplexer neuronaler Interaktionen erscheint es denkbar, dass ein pharmakologischer Effekt, ausgelöst durch die Verabreichung von *low dose* Naloxon in diesem System nicht zum tragen kommt. Möglicherweise handelt es sich hier um einen sehr subtilen Effekt, so dass die Anwendung des Lokomotionsparadigmas nicht sensitiv genug ist, einen derartigen Effekt zu messen.

Um diesem möglichen Umstand Rechnung zu tragen, wurde auf das äußerst sensitive Hebeldruckparadigma in Skinnerboxen zurückgegriffen. Hier konnte in Ratten, die eine Saline- von einer Morphinwirkung (3 mg/kg) zu diskriminieren gelernt hatten, keine Verstärkung einer Morphinwirkung durch *low dose* Naloxon (10 ng/kg, 50 ng/kg) erzielt werden. Die Sensitivität des Versuchsverfahrens konnte indes eindrucksvoll bestätigt werden,

da bereits geringste Mengen Naloxon (1 µg/kg) die Hebeldruckleistung der morphinabhängigen Tiere in Form von Entzugsserscheinungen massiv beeinträchtigte. Auf Grund der vorliegenden Daten erscheint es höchst unwahrscheinlich, dass im Bereich von 50 ng/kg und 1 µg/kg Naloxon eine Dosierung liegt, die hinsichtlich des Anspruches einer Verstärkerfunktion von Morphin gerecht wird. Die alternativ gewählten Dosierungen von 50 ng/kg und 10 ng/kg Naloxon orientierten sich an den Arbeiten von Shen und Crain, die in diesem Dosisbereich deutliche Einflussnahmen in den von ihnen untersuchten Verhaltensparametern finden konnten: in elektrophysiologischen und verhaltenspharmakologischen Experimenten konnten sie von einer Verstärkung der analgetischen Morphinwirkung unter Koapplikation von *low dose* Naloxon unter akuten Bedingungen berichten. In diesen Arbeiten werden neben den beschriebenen akuten analgetischen Wirkungen von *low dose* Naloxon in Kombination mit Morphin auch Ergebnisse dargestellt, bei denen paradoxerweise während einer chronischen Exposition mit Morphin unter Beigabe von *low dose* Naloxon eine verminderte Toleranzentwicklung mit signifikant weniger Entzugssymptomen nach pharmakologisch induziertem Entzug dargestellt wird (Shen und Crain, 1997). Dieser Befund widerspricht dem gängigen Konzept, nach dem unter der Koverabreichung von *low dose* Naloxon unter bestimmten Voraussetzungen eine Verstärkung der Morphinwirkung zu beobachten ist. Nach Stand der Wissenschaft geht eine Verstärkung einer Opiatwirkung unter chronischer Verabreichung auch mit erhöhter Toleranzentwicklung und somit auch verstärkter Entzugssymptomatik einher. Diese Arbeit konzentrierte sich deshalb auch auf die Untersuchung dieses paradoxen, gleichwohl nicht minder interessanten Sachverhalts.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zu dieser Thematik konnten diesbezüglich keinen, beziehungsweise in Teilen einen gegenteiligen Effekt als den von Shen und Crain beschriebenen verzeichnen. Untersucht wurden ein Hebeldruckparadigma nach Baldwin und Koob, in dem der Abfall der Hebeldruckleistung nach Naloxoninjektion (25 µg/kg) in morphinabhängigen Tieren (Morphinpelletimplantate) ein Maß für die Stärke des Entzugs ist (Baldwin und Koob, 1993) sowie eine Beobachtungsstudie in morphinabhängigen Tieren nach naloxonprovoziertem Entzug (10 mg/kg). In Tieren, die während der Abhängigkeitsentwicklung *low dose* Naloxon (10 ng/kg/h) über eine osmotische Minipumpe koappliziert bekamen, ergab sich tendenziell ein stärkerer Abfall der Hebeldruckleistung gegenüber Tieren, die keine Koapplikation von Naloxon bekamen. Der stärkere Abfall der Hebeldruckleistung kann einem stärkeren Entzug gleichgesetzt werden. Gleichwohl war dieser Unterschied nicht statistisch signifikant. Dass das gewählte Experiment bezüglich des

Auslösens eines Entzugsgeschehens erfolgreich war, zeigte der statistische Unterschied gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe. Deren Hebeldruckverhalten war nach der pharmakologischen Behandlung (Salineinjektion) unverändert. Um sicherzustellen, dass der tendenzielle Unterschied in den beiden Entzugsgruppen nicht auf eine unvollständige Abhängigkeitsentwicklung zurückzuführen war, wurde mit einer höheren Naloxondosierung (100 µg/kg) Entzug provoziert: die Hebeldruckleistung fiel in allen Tieren dramatisch ab, so dass davon ausgegangen werden konnte, dass in allen Tieren eine Abhängigkeit gegeben war. Obwohl in diesem Experiment keine statistische Signifikanz zwischen den beiden Entzugsgruppen ausgewiesen werden konnte, geht die Tendenz jedoch in eine andere Richtung als von den Autoren Shen und Crain postuliert (unter Koverabreichung *low dose* Naloxon weniger Entzugserscheinungen). Deutlicher wird dies an Hand der Ergebnisse des Beobachtungsexperiments: in dieser Studie sollte der Einfluss einer gleichzeitigen Gabe von *low dose* Naltrexon während der Abhängigkeitsentwicklung auf ein nachfolgendes Entzugsgeschehen untersucht werden. Dazu wurde den Tieren zweimal täglich eine Morphininjektion verabreicht, wobei eine Hälfte der Versuchsratten jeweils 5 Minuten vor der Morphininjektion 1 µg/kg Naltrexon, die andere Hälfte Saline appliziert bekamen. Aus der Vielzahl an beobachteten Entzugssymptomen konnte einzig das Symptom *jumping* statistisch signifikant zwischen den Vergleichsgruppen differenziert werden: in der Gruppe, die während der Abhängigkeitsentwicklung zusätzlich *low dose* Naltrexon verabreicht bekam, konnte deutlich mehr entzugsbedingtes *jumping* aufgezeichnet werden. Gerade aber dieses Entzugssymptom ist in den Arbeiten von Shen und Crain als vermindert dargestellt worden. Die genaue Analyse dieser Arbeiten der genannten Autoren wirft gerade im Hinblick auf die Präsentation der entzugsrelevanten Verhaltensdaten elementare Fragen auf. Opiatentzug in Nagetieren (Ratten, Mäuse, Hamster) äußert sich in einer Vielzahl an verschiedenen Verhaltensparametern und es erscheint wenig seriös, nur eine dieser Verhaltensveränderungen im Entzug in den Vordergrund zu stellen, ohne auf weitere Symptome einzugehen. So werden keine weiteren Entzugserscheinungen in diesen Publikationen präsentiert oder diskutiert. Zweifelsohne könnte durch einseitige Konzentration auf eine Verhaltensantwort auch in Rahmen dieser Arbeit ein anderes Bild formuliert werden, als die reale Datensituation zeichnet. Auf Grund der hier vorgestellten Daten kann eben nicht von einer verminderten Entzugssituation gesprochen werden. Im Gegenteil, die Interpretation der vorliegenden Daten ließe Raum für die Hypothese, dass *low dose* Naloxon/Naltrexon die Entzugssymptomatik verstärkt. Dieses Bild würde sich stimmig in das Konzept der Wirkungsverstärkung von Morphin unter *low dose* Naloxon/Naltrexon fügen. Die Entzugssymptomatik in Ratten (in

dieser Arbeit) und Mäusen (in den Arbeiten von Shen und Crain) ist prinzipiell vergleichbar; dies konnte in einer Vielzahl an Publikationen gezeigt werden (siehe auch Maldonado et al, 1996b).

Letztendlich stellt sich bei der Betrachtung der Literatur und den Ergebnissen dieser Arbeit die zentrale Frage nach der Wirkungsweise von *low dose* Naloxon. Auffällig und unbestritten ist, dass das *low dose*-Konzept vor allem in Tieren (und auch in humanen Studien) beobachtet worden ist, bei denen *low dose* Naloxon im Zusammenhang mit chronischem Schmerz verabreicht wurde (Levine et al., 1979; Kayser et al, 1981; Crain und Shen, 2000). Gerade hier spielen neben den supraspinalen Signalverarbeitungsmechanismen auch spinale Mechanismen eine große Rolle. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Arbeiten zu dieser Thematik von Shen und Crain basieren auf Hinterwurzelganglien in Kultur, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass nur in diesen Zellen die beschriebenen Effekte zum Tragen kommen. Kritisch anzumerken ist weiterhin, dass bislang kein anderes Labor ähnliche Ergebnisse wie Crain und Shen präsentieren konnte.

Stimulatorische Eigenschaften von Opioiden sind seit längerem in der Opioidpharmakologie bekannt und beschrieben, auch wenn deren mechanistische Ursache zum Teil nur wenig aufgeklärt ist (Smart und Lambert, 1996; Harrison et al., 1998). Shen und Crain begründen paradoxen antinociceptiven Eigenschaften von *low dose* Naloxon, die verstärkende Wirkung auf Morphin und weitere Ergebnisse ihrer umfangreichen Experimente (verminderte Toleranzentwicklung) auf der Existenz von G_s -gekoppelten Opioidrezeptoren (excitatorisch), die neben den bereits bekannten $G_{i/o}$ - gekoppelten Opioidrezeptoren (inhibitorisch) in der Zellmembran lokalisiert sind (Crain und Shen, 1996; Shen und Crain, 1992, 1997). Spuren von Naloxon blocken selektiv genau diese G_s -gekoppelten Rezeptortypen, so dass die inhibitorische Komponente (durch Agonisten aktivierte $G_{i/o}$ -gekoppelte Opioidrezeptoren) verstärkt wird. Problematisch an dieser Argumentationsweise ist allerdings, dass trotz zahlreicher Hinweise die Existenz solcher G_s -gekoppelten Opioidrezeptoren noch nicht nachgewiesen werden konnte (Harrison et al., 1998). Gerade hier wäre ein Nachweis durch eine *in situ* Autoradiographie (Hybridisierung, GTP γ S-Assay) dringend notwendig, um dieses prinzipiell interessante Konzept weiter aufzuklären und voranzutreiben.

4.1. Einleitung konditionierter Entzug

Seit dem Wissen um den Zusammenhang zwischen Opiatmissbrauch und dessen Konsequenzen hat die Medizin immer wieder neue Strategien zur Entzugsbehandlung entwickelt. Wurde um die Jahrhundertwende eine bestehende Opiumsucht noch auf Grund fehlenden Wissens um die Zusammenhänge der Suchtentwicklung mit Heroin therapiert, waren Mitte der 20er Jahre vor allem Beladonnabehandlungen das Mittel der ersten Wahl, um Entzugserscheinungen zu behandeln. Es folgten Therapien wie Bromidschlafkuren, Schilddrüsenhormonsubstitutions-therapie und Eigenblutbehandlungen. Allen diesen war gemeinsam, dass sie entweder uneffektiv waren oder einen Mangel an Sicherheit (20 Prozent Mortalitätsrate unter Bromidschlafkur) aufwiesen. Kolb und Himmelsbach waren 1938 die ersten, die das Problem des Opiatentzugs zum einen wissenschaftlich analysierten und zum anderen heute noch gültige Vorschläge der Behandlung entwarfen. So liegen zum Beispiel die Wurzeln der Methadonsubstitution in den von Himmelsbach propagierten Zielsetzungen, den Entzug entweder durch einfaches Absetzen der Opiate oder durch Substitution mit Codein oder Morphin in absteigender Dosierung zu behandeln (Kolb und Himmelsbach, 1938). Eine weitere Methode dieser Zeit war die Elektrokrampfbehandlung, die wahrscheinlich eine temporäre frontale Lobotomie zur Folge hatte, so dass eine im Entzug auftretende Hyperaktivität des autonomen Nervensystems gedämpft wurde. Über Behandlungen mit antipsychotischen Pharmaka wie Chlorpromazin und Antidepressiva wie Reserpin in Kombination, wurde anfänglich positiv berichtet, aber auch hier stellten sich nach weiteren Untersuchungen Zweifel an deren Wirksamkeit ein. Weitere Behandlungsformen beschäftigten sich mit Akupunktur, Propranolol, einem β -adrenergen Rezeptorenblocker und Verabreichung extrem hoher Dosen an Vitamin C. Auch der seit einigen Jahren propagierte forcierte Entzug unter Narkose konnte die hohen Erwartungen, die in ihn gesetzt wurden, nicht erfüllen (Spanagel et al., 1998; Spanagel, 1999; Pfab et al., 1996).

Alle hier nur kurz vorgestellten Entzugsmethoden beschäftigen sich ausnahmslos mit der kurzfristigen Entzugsbehandlung. Über die langfristige Nachsorge der detoxifizierten Patienten gibt es nur eine wenige pharmakologische Ansätze. Im Fall einer überwundenen Opiatsucht besteht die einzige Nachsorge, neben psychosozialer Unterstützung, in der Verabreichung von Naltrexon als Nüchternheitshilfe, einem oral verabreichbaren, lang wirksamen Opiatantagonist (siehe auch Kap. 3.1.). Dennoch kommt es gerade auch bei detoxifizierten Opiatsuchtpatienten zu Besorgnis erregend hohen Rückfallquoten. Diese

liegen in der Regel zwischen 85 und 95 Prozent. Die Wissenschaft hat in den letzten 30 Jahren, seit der Entdeckung der Opioidrezeptoren und deren endogenen Liganden (siehe Kapitel 1), überaus große Fortschritte in der Erkenntnis der Faktoren und Mechanismen gemacht, die letztlich zu süchtigem Verhalten führen können. Im Zentrum der Suchterforschung stehen dabei Sensibilisierungs- und Konditionierungsprozesse. Diese Mechanismen können auch nach einer erfolgreichen Entzugstherapie wirksam werden und in geeigneten Situationen ein übermäßiges Verlangen nach der vormals zugeführten Droge auslösen (*craving*) und somit zum Rückfall führen (Spanagel und Zieglgänsberger, 1997). Dieser oftmals nur durch Schlüsselreize ausgelöste Rückfall wird von den meisten Suchtkranken nicht oder nur teilweise kognitiv erfasst (Zieglgänsberger und Spanagel, 1999). Sensibilisierungs- und Konditionierungsvorgänge betreffen sowohl die Wirkung der selbstverabreichten Drogen selbst, als auch Umgebungsreize, die mit der Einnahme verbunden sind. Die erstmalige Einnahme von Morphin oder Heroin (unter Laborbedingungen) initiiert oftmals Dysphorie (Jaffe und Martin, 1980; Smith und Beecher, 1962). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass sich erstmalige Opiaterfahrung in einer konditionierten Geschmacksaversion niederschlagen kann, dieselben Dosierungen allerdings eine Präferenz für den Ort schaffen, an dem die Versuchstiere diese Dosis erstmalig erfahren haben (Farber et al., 1976; LeBlanc und Cappel, 1974; Stewart und Eikelboom, 1978). Diese Experimente zeigen, dass Sensibilisierungsmechanismen positiv affektiver Morphinwirkungen schneller vonstatten gehen als aversive Wirkungen. Dabei spielt das im Kapitel 3.4. vorgestellte mesolimbische-dopaminerge System eine herausragende Rolle.

Im Laufe einer Drogenabhängigkeit können sowohl positive als auch negative Begleiterscheinungen einer Attribuierung und somit auch Konditionierung unterworfen sein. Ursächlich neutrale Umweltreize werden unabhängig vom persönlichen Willen des Drogenabhängigen mit der Drogenwirkung *per se* als auch mit drogenrelevanten Umgebungsreizen konditioniert. Klassische Konditionierung (Pavlov, 1960) stellt einen einfachen elementaren Lernvorgang dar, bei dem ein neutraler Reiz mit einem physiologisch bedeutsamen Reiz oder Zustand assoziiert, daraufhin als bedeutsam erkannt wird und eine relativ starre Verhaltensantwort generiert. Untersuchungen haben ergeben, dass die Drogeneinnahme meist in Verbindung mit bestimmten Umgebungsreizen gekoppelt ist. Diese werden mit einer positiven Drogenwirkung verbunden und darum als positive Verstärker bezeichnet. In einer Reihe von Tierexperimenten konnte bewiesen werden, dass allein die Präsentation von Umgebungsreizen, die zuvor mit der Verabreichung von Morphin verbunden waren, ausreichend war, Entzugserscheinungen zu unterdrücken (Tye und Iversen, 1975;

Roffman et al., 1973). O'Brien konnte 1974 in einer humanen Studie diese tierexperimentellen Untersuchungen bestätigen: bei einer Gruppe von Opiatabhängigen wurde in einer Doppel-Blind-Studie der Effekt des Anlegens der Injektionsnadel (gefüllt mit Placebo/Opiat) auf die Entzugssymptomatik untersucht. Alleine durch das Setzen der Injektionsnadel berichteten alle Studienteilnehmer über eine deutliche Verringerung ihrer Entzugssymptome, die in der Placebogruppe ursächlich pharmakologisch nicht gegeben sein konnte (O'Brien, 1974). Das zu erwartende Gefühl der euphorisierenden Wirkung des Opiats, repräsentiert durch die Nadel, war ausreichend um als positiver Verstärker zu wirken. In einer bestehenden Opiatabhängigkeit steht neben der anfänglich euphorisierenden Wirkung des Opiats in erster Linie die Vermeidung eines Abstinenzsymptoms (körperlicher Entzug) im Vordergrund. Die Entzugsvermeidung steht in kausalem Zusammenhang mit der Aufrechterhaltung der Drogensucht (Stewart und Eikelboom, 1984). Dennoch wird ein Opiatabhängiger immer wieder im Verlauf seiner „Drogenkarriere“ körperlichen Entzug verspüren und gerade dieser Zustand ist mit massiven körperlichen Schmerzen und Dysphorie verbunden. Neutrale Umgebungsstimuli während der Entzugerfahrung können als bedeutungstragend erfasst und somit klassisch konditioniert werden. Als Beispiel für einen negativen Verstärker konnte O'Brien den Fall eines ehemaligen Drogensüchtigen anführen, der nach Rückkehr in seine gewohnte „Drogenumgebung“, in der er zu Abhängigkeitszeiten auch Entzug verspürt hatte, nun durch konditionierte Stimuli körperlichen Entzug erlebte und rückfällig wurde (O'Brien et al., 1986):

One patient who was slowly detoxified after methadone maintenance went to visit his relatives in Los Angeles after receiving his last dose. Since he knew that he would be away from the clinic in Philadelphia for three weeks, he saved one take-home bottle of methadone in case he got sick while in California. To his surprise, he felt no sickness in his new environment and never even thought about the bottle of methadone in his suitcase. He felt healthy over the three-week, drug-free period, but as soon as he arrived in the Philadelphia airport, he began to experience craving. By the time he reached his home, there was yawning and tearing. He immediately took the methadone he had been saving and felt relieved, but the symptoms recurred the next day. After three weeks of being symptom-free in Los Angeles, he experienced regular withdrawal in Philadelphia. (O'Brien et al., 1986)

Dieser exemplarische Fall kann stellvertretend für eine Vielzahl ähnlicher Konditionierungen gesehen werden, denen allen die gemeinsame Grundstruktur zu eigen ist, dass Entzugerfahrungen während einer bestehenden Abhängigkeit mit zunächst neutralen Stimuli assoziiert werden. So können diese Stimuli lange nach vollzogener Drogenabstinenz einen

körperlichen Entzug provozieren, der ursächlich physiologisch nicht gegeben ist. Diese Konditionierung findet unabhängig vom persönlichen Willen der Einzelperson statt (O'Brien et al., 1977, 1992). Über die Bedeutung dieses als „konditionierter Entzug“ bezeichneten Phänomens besteht bezüglich des Rückfalls keine Klarheit. Obwohl der konditionierte Entzug gleichwohl als solcher erkannt und in humanmedizinischen Experimenten untersucht worden ist, ließ sich bis heute kein stringenter Nachweis führen, dass er allein verantwortlich für einen Rückfall ist (Stewart und Eikelboom, 1984). Allerdings gibt es zu dieser Thematik erstaunlich wenig Forschungsansätze. Die wissenschaftliche Beurteilung beruht auf nur wenigen Studien, die zum erheblichen Teil älter als 20 Jahre sind. Erst in den vergangenen Jahren kommt dieser Entzugsform die Aufmerksamkeit zu, die ihr auf Grund ihres Beitrages zum Rückfall möglicherweise zusteht (Childress et al., 1993). Die Sichtung der vorliegenden Studien zum konditionierten Entzug liefert zwar die Erkenntnis, dass konditionierte Entzugserscheinungen auch im humanen Bereich durchaus relevant sind, allerdings ist dieses Phänomen weder in seiner Gesamtheit ausreichend tierexperimentell untersucht worden, noch konnten Gehirnstrukturen identifiziert werden, die in einem konditionierten Entzugsgeschehen involviert sind. Gerade der tierexperimentelle Vergleich zu realen Entzugserscheinungen lässt bis heute auf sich warten. Eine sachliche Beurteilung des konditionierten Entzugs auf Grund derartiger Daten ist somit längst überfällig.

Die erste und zugleich umfangreichste tierexperimentelle Studie wurde von Wickler und Pescor in Ratten durchgeführt (Wickler und Pescor, 1967). In dieser Studie konnten konditionierte Entzugserscheinungen bis 155 Tage nach der Konditionierung festgestellt werden. Abgesehen von dieser Studie und Arbeiten am Hamster (Schnur, 1992) gibt es in der vorliegenden Literatur kein Tierversuchsmodell, das eine direkte Beobachtung konditionierter Entzugssymptomatik erlaubt. Alle bis heute verwendeten Tiermodelle zu dieser Thematik bedienen sich nicht der direkten Beobachtung von konditionierten Entzugssymptomen, sondern anderer Verhaltensparameter, wie zum Beispiel Hebeldruckverhalten in Skinnerboxen (Goldberg und Schuster, 1967; Baldwin und Koob, 1993; Schulteis et al., 1998) oder Platzpräferenzverhalten (Kratzer und Schmidt, 1998; Schulteis et al., 1998). Da Negativergebnisse in der Wissenschaft selten publiziert werden, reflektieren die fehlenden Studien einer direkten Beobachtung konditionierter Entzugserscheinungen möglicherweise nur den Tatbestand, dass Entzugssymptome nicht oder nur teilweise einer Konditionierung unterworfen werden können. Bis heute gibt es keine Reproduktion dieser sehr frühen Studie von Wickler und Pescor (1967), so dass im Rahmen dieser Arbeit der Frage nachgegangen werden sollte, inwieweit sich Entzugserscheinungen überhaupt konditionieren lassen. Die

vorliegende Studie versucht deshalb zum einen ein Tiermodell zu etablieren, in dem konditionierte Opiatentzugserscheinungen real beobachtet werden können. Parallel dazu sollte der Frage nachgegangen werden, welche Gehirnregionen an einem konditionierten Entzugsgeschehen beteiligt sind. Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die pharmakologische Beeinflussung eines konditionierten Entzugsgeschehens.

Bei der weiterführenden Charakterisierung des Tiermodells konditionierter Entzug wurden zusätzliche verhaltensbiologische Parameter (Schmerzempfinden, lokomotorische Aktivität) untersucht und klassische Stresshormone gemessen. Opiatentzug stellt sich als Anpassungsreaktion des Organismus auf veränderte Umweltbedingungen dar (hier das Absetzen der externen Opiatzufuhr) und kann somit definitionsgemäß als Stressor bezeichnet werden. Stress wird allgemein als Muster spezifischer und unspezifischer Reaktionen eines Organismus verstanden, auf Reizereignisse (Stressoren) dergestalt zu reagieren, dass die interne Homöostase wiederhergestellt wird (Zimbardo, 1988). Der hypothalamo-adenohypophysär-adrenocorticalen Achse (HPA-Achse) kommt bei der Stressbewältigung zentrale Bedeutung zu (Ur und Grossman, 1994): in den parvozellulären Neuronen des hypothalamischen Nucleus paraventricularis wird *corticotropin releasing hormon* (CRH) gebildet, axonal in die Zona externa der Eminentia mediana transportiert und dort stimulusabhängig in das Portalblut der Adenohypophyse abgegeben (Plotsky, 1991; Kovacs und Sawchenko, 1996). Corticotrope Zellen sezernieren daraufhin Adrenocorticotropin (ACTH) in den peripheren Blutkreislauf (Rivier und Vale, 1983a,b). ACTH bewirkt in der Nebennierenrinde die Freisetzung von Corticosteron (Maus, Ratte; Cortisol beim Mensch, Schwein). Corticosteron/Cortisol induziert letztlich (Erhöhung des Blutzuckerspiegels, Proteinkatabolismus, Glucoseaufnahme im Gehirn) die physiologische und verhaltensbiologische Stressreaktion. Neben der Messung dieser beiden Stresshormone (ACTH, Corticosteron) wurde die periphere NoradrenalinKonzentration als Repräsentant der sympathischen Aktivierung gemessen (Eckert, 1986).

Die neurobiologischen Korrelate des konditionierten Opiatentzugs sind bislang ungeklärt. Ausgehend von der Erkenntnis, dass es sich in der Konditionierung um einen elementaren Lernvorgang handelt, der als molekulares Korrelat eine Langzeitpotenzierung (LTP) hippocampaler Neuronen hat (Kandel und Schwartz, 1991), kann eine Beteiligung glutamaterger Neuronenverbände vermutet werden. Zeise et al. konnte 1993 einen postsynaptischen Einfluß von Ca^{2+} -acetylhomotaurinat (Acamprosat) auf N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren nachweisen. Die positiven Ergebnisse der klinischen Erprobung dieser ersten *anti-craving* Substanz zur Behandlung des konditionierten Entzugs in

der Alkoholsucht, lassen eine Anwendung dieses Wirkstoffs auch in der Opiatsucht angezeigt erscheinen. In Verbindung mit dem Wissen, daß Lernvorgänge (LTP) vor allem durch NMDA-Rezeptoren vermittelt werden, liegt der Schluß nahe, daß ein konditionierter Entzug durch eine Beeinflussung von NMDA-Rezeptoren vermieden werden kann. Eine weitere *anti-craving* Substanz aus der Alkoholsuchtforschung, 1-amino-3,5-dimethyladamantane (Memantin), stellt sich als schwach affiner NMDA-Rezeptorantagonist dar. Diese Substanz wird seit längeren in der Klinik zur Behandlung von Alzheimer eingesetzt (Kornhuber et al., 1994). Ein weitere Indikation für den Einsatz von Memantin ist bei *Morbus Parkinson* angezeigt (Merello et al., 1999). Für einen Einsatz als *anti-craving* Substanz in der Alkoholabhängigkeit sprechen die Ergebnisse von Hölter et al. (1996). In dieser Entzugsstudie konnte unter Verabreichung von Memantin ein verminderter Alkoholkonsum bei Langzeit-abhängigen Ratten dokumentiert werden. Der Transfer dieser Ergebnisse auf eine Opiatsucht fällt leichter, hat sich diese Substanz bereits in einer Studie von Popik und Danysz (1996) als wirksam erwiesen, eine, durch Naloxon hervorgerufene, aversive Platzkonditionierung in morphinabhängigen Ratten positiv zu beeinflussen. Memantin wird in der verwendeten Dosis (7,5 mg/kg i.p.) keine eigene drogenähnliche Aktivität nachgewiesen, wie die Ergebnisse der Experimente bezüglich der Platzkonditionierung und Tests auf Drogenähnlichkeit (*drug discrimination*) erbrachten. Ein kurzfristiger Einfluss auf das räumliche Erinnerungsvermögen konnte in Schwimmversuchen (*Morris water maze*) festgestellt werden; ein Effekt, der allerdings nicht persistent war und prinzipiell die Vorstellung unterstützt, dass über eine Interaktion mit NMDA-Rezeptoren Memantin ein konditioniertes Entzugssymptom zu unterdrücken vermag.

4.2. Material und Methoden konditionierter Entzug

Das vorliegende Projekt zur Untersuchung konditionierter Entzugssymptome gliedert sich in 3 Teilprojekte. Im Fokus des ersten Teils steht die Etablierung eines einfachen Tiermodells zur Messung konditionierter Entzugssymptome (Erhebung von Daten basierend auf Beobachtung) und die weiterführende Charakteristik dieses Modells. Teil 2 beinhaltet die molekular-biologische Aufarbeitung der Rattengehirne im Anschluss an das Verhaltensexperiment. Hier wurde mittels *in situ* Hybridisierung (c-fos-mRNA) der Frage nachgegangen, welche Gehirngebiete während des konditionierten Entzugs aktiviert sind. Der dritte Teil beschäftigt sich mit der pharmakologischen Intervention durch einen NMDA-Antagonisten (Memantin) auf diese spezielle Form der Entzugssymptomatik.

1. Teil: Tiermodell zur Messung konditionierter Entzugssymptome

Ziel der Experimente war die Etablierung eines Tiermodells zum konditionierten Entzug, das hinsichtlich der Datenerhebung auf Basis eines einfachen Beobachtungsexperimentes gerecht wird. Aktivitätsmessung im *open field*, Bestimmung von Stresshormonkonzentrationen und ein Analgesietest (*hot plate*) waren weitere untersuchte Parameter.

4.2.1. Tiere und Tierhaltung

Experimentell naive, männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River WIGA GmbH, Sulzfeld, Deutschland) wurden nach Anlieferung in Einzelkäfige umgesetzt und mindestens für 5 Tage an die Haltungsbedingungen habituiert. Die Raumtemperatur im Haltungsraum betrug 21 ± 2 °C bei ca. 55 % Luftfeuchtigkeit; ein künstlicher 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus (Licht an: 07.00 Uhr) wurde mittels einer Zeitschaltuhr erzeugt. Futter (Atormin, Ratten-Mäusediät) und Wasser stand den Tieren über die gesamte Versuchsdauer zur freien Verfügung bereit. Bei Anlieferung wogen die Ratten ca. 200 - 220 g. Die Konditionierungen und der Test auf konditionierten Entzug wurden in einer anderen Räumlichkeit durchgeführt,

ebenso die Experimente im *open field*. In allen Experimentalräumen herrschten die gleichen klimatischen Bedingungen.

4.2.2. Tiermodell zum konditionierten Entzug

Gruppendesign

Für das Tiermodell zum konditionierten Entzug wurden folgende 4 Gruppen als essentiell angesehen:

- gepaarte Gruppe (*paired group*): Entzugserfahrung (Provokation mittels 1 mg/kg s.c. Naloxon) ist mit speziellem Umweltreiz (Anisgeruch, Spinnrad, München) gepaart (n=15).
- ungepaarte Gruppe (*unpaired group*): Entzugserfahrung (Provokation mittels 1 mg/kg s.c. Naloxon) und spezieller Umweltreiz (Anisgeruch) sind zeitlich voneinander getrennt (n=14).
- echter Entzug (*real withdrawal group*): Behandlung wie *paired group*, allerdings wird am Testtag nochmals durch Naloxon Entzug provoziert (n=12).
- Salinekontrollen (*saline group*): Behandlung wie *paired group*. Die Tiere sind nicht morphinabhängig (n=10).

Zeitablauf

Tag 1	Pelletimplantation
Tag 2	Erholung
Tag 3	Pelletimplantation
Tag 4-7	Konditionierung
Tag 8	Erholung
Tag 9	Test auf konditionierten Entzug und Entnahme der Rattengehirne

Induktion der Opiatabhängigkeit

Die Opiatabhängigkeit wurde durch Implantation von Morphinpellets induziert. Dabei wurden am Tag 1 und Tag 3 des Versuchs je 2 in Nylon gaze eingewickelte Morphinpellets *subcutan* im Nackenbereich der Ratte implantiert. Die Herstellung der Pellets und Diffusionsverhalten dieser Pellets können aus Kapitel 3.2.2. und 3.3. (Seiten 46 und 54) ersehen werden. Sie entsprechen internationalem Standard. Den Salinekontrollen wurden Placebopellets implantiert.

Konditionierung

Am vierten Tag nach der ersten Pelletimplantation begann die Konditionierungsphase des Experiments. Die Konditionierung fand in einem vom Haltungsraum separierten Raum statt. Den Tieren der Gruppen *paired*, *real withdrawal* und *saline* wurde zur Entzugsprovokation 1 mg/kg s.c. Naloxon injiziert. Anschließend wurden alle Tiere für 15 Minuten in Beobachtungskäfige (30 x 30 x 45 cm) mit Anisduft gesetzt. Den Tieren der Gruppe *unpaired* wurde zu diesem Zeitpunkt Saline appliziert. Nach dieser 15-minütigen Konditionierungsphase wurden alle Tiere in ihren Heimkäfig zurückgebracht und erhielten 2 Stunden später eine Salineinjektion, allein die *unpaired group* erhielt nun die zur pharmakologischen Gleichbehandlung notwendige Naloxoninjektion. Diese Behandlung erfuhren die Tiere an 4 aufeinander folgenden Tagen.

Test auf konditionierten Entzug

Nach der 4-tägigen Konditionierungsphase wurde den Tieren ein Tag Erholung zugestanden. Am nächsten Tag wurde den Tieren der Gruppen *saline*, *paired* und *unpaired* Kochsalzlösung injiziert und anschließend für 30 Minuten in die mit Anisgeruch gefüllten Beobachtungsboxen gesetzt und konditionierte Entzugssymptome erfasst. Den Tieren der Gruppe *real withdrawal* wurde zu diesem Zeitpunkt Naloxon verabreicht. Diese Gruppe diente als Maßstab, welcher körperliche Entzug am Testtag zu erwarten war.

Als Entzugssymptome wurden die in Kapitel 2.2.2. beschriebenen Symptome gewertet und entsprechend ausgewertet.

Nach Ablauf der 30-minütigen Beobachtungszeit wurden die Tiere dekapitiert, die Hirne entnommen und auf Trockeneis durchgefroren (siehe Teil 2).

Entzugsverlauf während der Konditionierungsphase

Die Ausprägung der Entzugssymptomatik an den 4 Konditionierungstagen sollte mit einem separat durchgeführten Beobachtungsexperiment untersucht werden. Hierzu wurden Tiere der Gruppe *real withdrawal* (n=8) an den Konditionierungstagen während einer 30-minütigen Konditionierungsphase beobachtet. Ein Test auf konditionierten Entzug wurde in diesen Tieren nicht durchgeführt.

4.2.3. Experiment im *open field*

Als Versuchsanordnung wurde die in Kapitel 4.2.2. bereits beschriebene Versuchsanordnung verwendet. Die Konditionierung orientiert sich im Ablauf und Inhalt am Verhaltensexperiment. Auch hier wurden dieselben Vergleichsgruppen gebildet und derselbe zeitliche Ablauf angewendet. Im Unterschied zum vorherigen Experiment wurden die Tiere während der Konditionierung in die *open field*-Boxen gesetzt. Auf einen Anisgeruch als zusätzlichen Umweltreiz wurde verzichtet, da die Räumlichkeit auch als Halteraum diente. Die Gruppengröße betrug in allen Gruppen $n=8$.

4.2.4. Test auf Hyperalgesie (*hot plate*)

Erhöhtes Schmerzempfinden (Hyperalgesie) während des Entzugs lässt sich mittels einer verkürzten Reaktionszeit der Tiere auf einen Hitzereiz hin feststellen (Kayam et al., 1971). Dazu wurde eine 20x15 cm große Wärmeplatte auf 53°C aufgeheizt (Bachofer, Reutlingen, Deutschland) und mit einer Plexiglasumwandung umgeben, so dass die Tiere ständig mit der heißen Oberfläche in Berührung waren. Als Kriterium für eine Schmerzreaktion wurde das Lecken der Vorder- oder Hinterpfoten oder Herausspringen aus der Umwandung gewertet. Die Latenz bis zu einer dieser Reaktionen wurde mit einer Stoppuhr erfasst. Um Verbrennungen zu vermeiden, wurden die Tiere nicht länger als 30 Sekunden dem Hitzereiz exponiert. Das Konditionierungsprozedere entsprach der Durchführung in Kapitel 4.2.2.. Am Testtag auf konditionierten Entzug wurden die Tiere 5 Minuten nach Einsetzen in die Beobachtungsbox aus dieser wieder entnommen und sofort auf die *hot plate* gesetzt (*paired* $n=12$, *unpaired* $n=11$, *real withdrawal* und *saline* $n=8$)

4.2.5. Messung von Stresshormonen

Blutabnahme

In einer separaten Versuchsreihe wurde den Tieren bei der zweiten Morphinpelletimplantation zur Bestimmung von Stresshormonen (Noradrenalin, Corticosteron, adrenocorticotrophes Hormon (ACTH)) zusätzlich ein Jugularvenenkatheter implantiert (nach Remie et al., 1990). Über diesen kann Versuchstieren stressfrei Blut entnommen werden. Am Testtag wurde 2

Stunden vor Beginn des Tests auf konditionierten Entzug Blut zur Bestimmung des Basishormonspiegels entnommen (EDTA-beschichtete Röhrchen, 10 µl Trasylol® Bayer, Deutschland). Nach Verabreichung der entsprechenden Injektion (Saline in den Gruppen *saline, paired* und *unpaired*; Naloxon 1 mg/kg in der Gruppe *real withdrawal*) und Exposition des konditionierten Umweltreizes (Beobachtungsbox mit Anisgeruch) wurde den Tieren nach 5, 15 und 60 Minuten jeweils 0,6 ml Blut entnommen, auf Eis gekühlt, abzentrifugiert und das Plasma bis zur Analyse bei -80 °C aufbewahrt.

Stresshormonanalyse

Die Bestimmung der Stresshormonkonzentration erfolgte auf Basis eines Radioimmuno-Assays. Der Radioimmuno-Assay (RIA) stellt eine radioimmunologische Methode zur quantitativen Bestimmung kleinster Substanzmengen dar. Basis ist eine Bindungsanalyse mittels Antigen-Antikörper-Reaktion. Das zu bestimmende (nicht-markierte) Antigen (Stresshormone) und eine definierte Menge von radioaktiv-markiertem Antigen werden mit ihrem spezifischen Antikörper (mittels Tierimmunisierung gewonnen) zur Reaktion gebracht; die Bindung der beiden Antigene an den Antikörper erfolgt kompetitiv, so dass die nach angemessener Inkubationszeit vorgenommene Bestimmung der Strahlungsaktivität der aus der Lösung abgetrennten Antigen-Antikörper-Komplexe (bzw. des Rückstandes) ein Maß für die gesuchte Konzentration des Stresshormons ist.

Zur Analyse der Stresshormone wurde auf kommerziell erworbene Analysekits zurückgegriffen (DRG Instruments, Marburg, Deutschland). Auf eine Erläuterung der Durchführung dieser Assays wird deshalb hier verzichtet; es sei auf die Durchführungsvorschriften in den Analysekits verwiesen. Um eine Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse zu gewährleisten, wurde darauf geachtet, dass die internen Qualitätsnachweise der Analysekits nicht mehr als 5 Prozent voneinander abwichen.

4.2.6. Vergleich des Tiermodells mit einem Stressparadigma

Ziel des Versuches war der Vergleich der erhobenen Daten mit Verhaltensantworten aus einem konditionierten klassischen Stressparadigma. Ein Vergleich dieser Daten ließe Rückschlüsse auf den Entzugscharakter der aufgezeichneten Verhaltensantworten aus den Experimenten zum konditionierten Entzug zu. Hierzu wurden placeboimplantierte, drogennaive Versuchstiere in gleicher Weise konditioniert. Als aversiver Reiz wurden

Druckluftstöße (*air puff*) aus einer Sprühflasche verwendet (Druckluft 360, Kontakt Chemie). 5 Minuten nach Einsetzen der Tiere in die anisgerucherfüllte Beobachtungsbox wurden 3 ca. 5 Sekunden anhaltende Druckluftstöße in einem 10 cm-Abstand auf die Schnauze des Tieres abgegeben. Nach weiteren 5 Minuten wurden die Tiere aus dem Käfig entnommen. Als Kontrollen dienten Tiere, die den *air puff* in ihrem Heimkäfig erhielten. Analog dazu wurde im Experiment im *open field* verfahren. Auch in diesen Tieren wurden die Konzentrationen von Stresshormonen bestimmt.

2. Teil: *in situ* Hybridisierung

Ziel des Experiments war die Untersuchung und Darstellung der Gehirnregionen, die möglicherweise während eines konditionierten Entzugsgeschehens involviert sind. Als Marker hierzu diente der mRNA-Nachweis des *immediate early*-Gens *c-fos*. Dieses Transkriptionsprodukt wird allgemein als Indikator für unspezifische neuronale Aktivität angesehen (Edwards, 1994). In den Fokus des Interesses treten in dieser Studie besonders der Locus coeruleus, Nucleus accumbens, der zentrale Kern der Amygdala und der Hippocampus.

4.2.7. *in situ* Hybridisierung

Funktionsprinzip

Die Methode der *in situ* Hybridisierung erlaubt den Nachweis der regionalen Verteilung der Expression von Nukleinsäuresequenzen (RNA) auf zellulärer Ebene im untersuchten Gewebe. Dabei liegt ein einfaches Funktionsprinzip zu Grunde: eine markierte, einzelsträngige Nukleinsäuresequenz (Oligonukleotid), auch Sonde genannt, wird zur Hybridisation direkt mit dem zu untersuchenden Gewebe in Verbindung gebracht. Dort bildet die Sonde mit den komplementären RNA-Sequenzen der Zelle durch Basenpaarung doppelsträngige Hybride, die durch die radioaktive Markierung der Sonde sichtbar gemacht werden können.

Design und Markierung der Oligonukleotid-Sonde für c-fos-mRNA

Zum Einsatz von Oligonukleotiden in der *in situ* Hybridisierung ist die genaue Sequenz zumindest eines Abschnittes der nachzuweisenden RNA eine zwingende Voraussetzung, da diese Sonden *de novo* synthetisiert werden. Beim Design der Sonden sind einige wichtige Grundprinzipien zu beachten. So sollte eine gewisse Mindestlänge nicht unterschritten werden, um in einem zu untersuchenden Nukleinsäurepool nicht unspezifisch zu binden. Üblicherweise werden daher spezifische Oligonukleotide von 35 bis 60 Nukleotiden Länge verwendet (Wisden und Morris, 1994). Weiterhin wird es als günstig angesehen, wenn die gewählte Sonde etwa zu 40 bis 65 Prozent C- und G-Nukleotide enthält. Die Basenpaarung dieser Nukleotide erfolgt durch 3, die der A- und T-Nukleotide durch 2 Wasserstoffbrückenbindungen. Ein zu hoher Gehalt an A- und T-Nukleotiden führt daher leicht zu instabilen spezifischen Hybriden, ein zu hoher Gehalt an C- und G-Nukleotiden zu sehr festen und möglicherweise unspezifischen Bindungen der Sonde an die nachzuweisenden zellulären Nukleinsäuresequenzen. Für die *in situ* Hybridisation wurde eine Sonde mit einem CG-Gehalt von 62,2 Prozent verwendet; die Länge bestand aus 45 Nukleotiden. Die Abfolge der Nukleotide war folgende (hergestellt von MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland):

5'-GCA GCG GGA GGA TGA CGC CTC GTA GTC CGC GTT GAA ACC CGA GAA-3'
(Referenz: Erdtmann-Vourliotis et al., 1998). Diese Sonde lässt sich durch Addition von [³⁵S]-ATP (NEN, Deutschland) radioaktiv markieren. Die DNA-Polymerase Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (Boehringer, Mannheim, kurz: TdT) katalysiert diese Additionsreaktion unter Abspaltung organischer Phosphat-Gruppen aus Deoxynukleosid-Triphosphaten (hier ATP). Die obengenannte Sonde wurde mittels dieser Enzymreaktion vom 3'-Ende her mit einem radioaktiv markierten Poly-A-Schwanz versehen (sogenannte *tailing*-Reaktion). 4 µl TdT-Puffer, 1,2 µl CoCl₂ (25 mM), 11,3 µl DEPC-behandeltes Wasser, 1 µl Oligonukleotid, 1,5 µl [³⁵S]-ATP und 1 µl TdT (25 U) wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Cup (auf Eis) pipettiert und gemischt. Dieser Ansatz wurde für ca. 10 Minuten bei 38 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 30 µl TNES-Puffer und Zurücksetzen auf Eis gestoppt (TNES-Puffer: 14 ml 5 M NaCl, 10 ml 1 M Tris-HCl (pH 7,5), 5 ml 0,5 M EDTA (pH 8) 5 ml 10 % SDS, 466 ml DEPC-H₂O). Während der Inkubation wurden Chromatographiesäulen vorbereitet (Bio-Spin[®], Biorad, Deutschland). 50 µl Markierungsansatz wurden auf die Säule gegeben und bei 4 °C bei 2500 U/min zentrifugiert. Die Säule ist so beschaffen, dass sie die ungebundenen Nukleotide zurückhält, die markierten Nukleotide dagegen eluiert werden. Das Eluat wurde im Gammacounter auf Radioaktivität getestet; Zielaktivität waren ca. 650000

cpm/ μ l. Zum Schutz der Schwefelgruppen wurde dem Eluat 2 μ l 1 M DTT-Lösung hinzugegeben und bis zur Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

Hybridisierung

Kritisch bei der *in situ* Hybridisierung ist die Wahl der Temperatur. Das Aufschmelzen von Nucleinsäuren und die Ausbildung von, in diesem Fall, DNA-RNA-Hybriden sind von der Temperatur abhängige reversible Prozesse. Diese Temperatur sollte in einem Bereich liegen, in dem geringe Temperaturänderungen zum Schmelzen bzw. Hybridisieren des überwiegenden Anteils der Nucleinsäuren der zu untersuchenden Sequenz führen. Bei der vorliegenden Hybridisierung wurde mit einer Temperatur von 42 °C inkubiert.

Vor Verwendung der auf Objektträger aufgezogenen Schnitte wurden diese in 4 % Paraformaldehydlösung (5 Minuten) fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert.

Zur Hybridisierung wurden je 1 μ l der markierten Oligonukleotid-Sonde in je 100 μ l Hybridisierungspuffer und 1 μ l 1 M DTT verdünnt. Der Puffer bestand aus einer Lösung (auf 50 ml mit DEPC-H₂O auffüllen) von 25 ml 100 % Formamid (Fluka), 10 ml 20x SSC, 2,5 ml 0,5 M Na-Phosphat (pH 7,0), 0,5 ml 0,1 M Na-Pyrophosphat, 5 ml 50x Denhardt's Lösung, 2,5 ml hydrolysierte Lachssperma-DNA (4 mg/ml), 1 ml Poly-A-Säure (5 mg/ml DEPC-H₂O) und 5 g Dextransulfat. Pro Objektträger wurden 100 μ l Puffer-Sonde-Gemisch pipettiert, mit Parafilmstreifen abgedeckt und bei 42 °C inkubiert (24 Stunden).

Gewaschen wurden die Objektträger in 1x SSC bei 55 °C für 30 Minuten bei 55 °C, 3 Minuten in 1x SSC bei Raumtemperatur, 3 Minuten mit 0,1x SSC ebenfalls bei Raumtemperatur. Mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte erneut dehydriert, für mindestens 3 Stunden getrocknet und anschließend radioaktivitätssensitiven Filmen (Amersham) für 40 Tage exponiert. Die Auswertung erfolgte densitometrisch (siehe auch Kapitel 2.2.6., Seite 21). Die Daten wurden in nCi/g angegeben durch Vergleich mit einem aufgelegten [¹⁴C]-Standard. Ein Umrechnungsfaktor wurde nicht ermittelt.

3. Teil: Pharmakologische Intervention durch Memantin

Basierend auf den Ergebnissen des ersten Teils sollte die Einflussnahme von Memantin auf ein konditioniertes Entzugsgeschehen untersucht werden. Die untersuchten Parameter waren

die Reaktionszeit auf der *hot plate*, das Lokomotionsverhalten im *open field* und die Konzentrationen der Stresshormone Corticosteron und ACTH. Auf ein Beobachtungsexperiment wurde auf Grund der Datensituation aus dem ersten Teil verzichtet.

4.2.8. Intervention durch Memantin

Memantin wurde in allen Versuchen in einer Konzentration von 7,5 mg/kg verabreicht. Die Applikation erfolgte intraperitoneal 30 Minuten vor Exposition des konditionierten Stimulus (Anisgeruch und Beobachtungsbox) (*hot plate*, *open field*). Bei den Untersuchungen zur Konzentration von Stresshormonen wurde Memantin über den gelegten Jugularvenenkatheter verabreicht, um einen zusätzlichen Stressor durch die Injektion zu vermeiden. Alle anderen Gruppen erhielten zur gleichen Zeit eine Salineinjektion, die in den Experimenten *hot plate* und *open field* intraperitoneal verabreicht wurde; in den Experimenten zur Bestimmung der Stresshormonkonzentration erfolgte diese Salineinjektion über den Jugularvenenkatheter. Die Durchführungsprotokolle entsprechen in allen Versuchen denen aus Teil 1. Sie können dort eingesehen werden.

4.2.9. Auswertung und Statistik

Die Auswertung und Statistik der einzelnen Teilprojekte orientieren sich an den bereits vorgestellten Experimenten in den Kapiteln 2.2. und 3.2.. Geringfügige Abweichungen in der statistischen Behandlung der Daten werden im entsprechenden Ergebnisteil dargestellt. Auch bei den *hot plate*-Experimenten wurden die erhobenen Daten als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. Statistische Berechnungen erfolgten auch hier auf Basis einer ein-faktoriellen ANOVA.

4.3. Ergebnisse konditionierter Entzug

1. Teil: Tiermodell zur Messung konditionierter Entzugssymptome

Beobachtungsexperiment

Ziel des Experiments war die Beobachtung von konditionierten Entzugssymptomen, ausgelöst durch einen ursächlich neutralen Umweltreiz (Anisgeruch). Auf Opiatentzug konditionierte Ratten wurden am Testtag dem konditionierten Stimulus ausgesetzt. Die Entzugssymptomatik wurde innerhalb einer 30-minütigen Beobachtungsphase erfasst.

Abbildung 21 zeigt das Ergebnis dieser Beobachtungsstudie. Die Statistik weist bezüglich jedem einzelnen Symptoms signifikante, meist sogar hoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen aus (*teeth chattering* $F[3,47]=25,4$, $p<0,0001$; *wet dog shakes* $F[3,47]=12,1$,

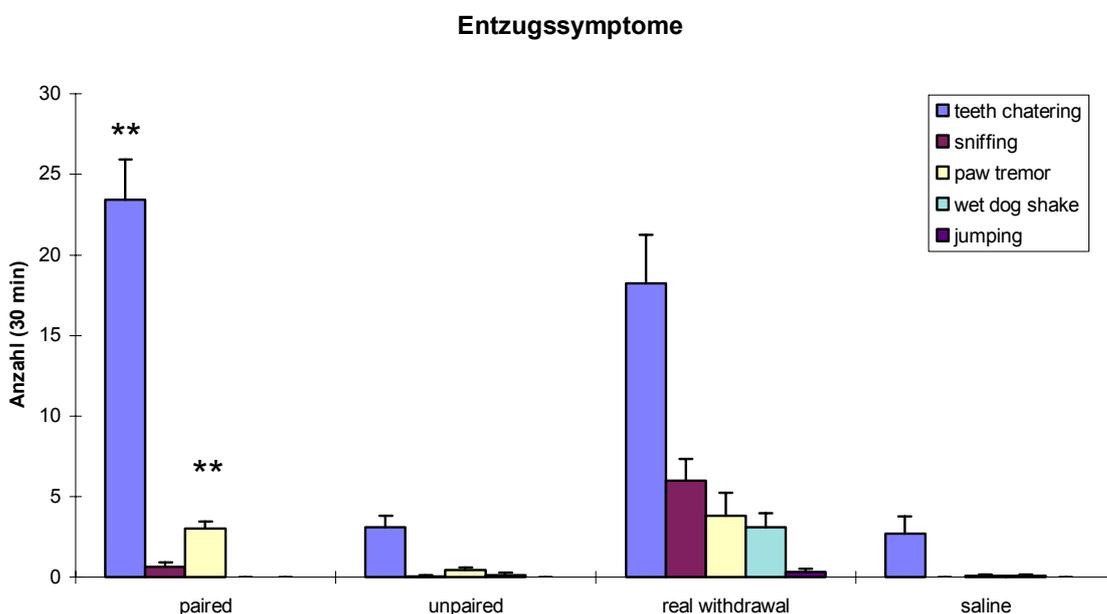


Abb. 21: Entzugssymptomatik in konditionierten Ratten, ausgelöst durch spezifischen Umgebungsreiz (Beobachtungsbox und Anisgeruch). In Tieren der Gruppen *paired* ($n=15$), *unpaired* ($n=14$) und *real withdrawal* ($n=12$) wurde mittels Pelletimplantation Morphinabhängigkeit induziert und an 4 aufeinander folgenden Tagen durch Verabreichung von 1 mg/kg s.c. Naloxon Entzug provoziert. Mit Ausnahme der Tiere in Gruppe *unpaired* erfolgte diese Entzugserfahrung kontextspezifisch (Beobachtungsbox und Anisgeruch). Salinekontrollen ($n=10$) wurden Placebopellets implantiert und der gleichen Konditionierungsprozedur unterzogen. Die in der Abbildung

dargestellten Entzugssymptome entsprechen einer allein durch Exposition der Tiere mit dem konditionierten Umweltreiz ausgelösten Entzugssymptomatik. In Tieren der Gruppe *real withdrawal* wurde zum Vergleich Entzug durch Naloxon induziert. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. ** kennzeichnet $p < 0,01$ der *paired group* gegenüber *unpaired*.

$p < 0,0001$; *paw tremor* $F[3,47]=6,39$, $p=0,001$; *sniffing* $F[3,47]=19,6$, $p < 0,0001$; *jumping* $F[3,47]=3,42$, $p=0,024$). Nachfolgende Berechnungen (Newman Keuls-Test) auf Basis dieser Statistik ergaben bezüglich der Symptome *teeth chattering* und *paw tremor* im Vergleich zwischen den Gruppen *paired* und *unpaired* hoch signifikante Unterschiede. Dies wurde in der Grafik zum Ausdruck gebracht. Abbildung 22 zeigt die Zusammenfassung der Symptome *salivation*, Ptosis, Augen- und Nasenbluten zu einem globalen Entzugssymptom (*global withdrawal*). Auch hier konnte allein durch die Gruppe *real withdrawal* statistische Signifikanz erreicht werden ($F[3,16]=4,71$, $p=0,015$). Gruppe *paired* unterscheidet sich statistisch nicht von *unpaired*.

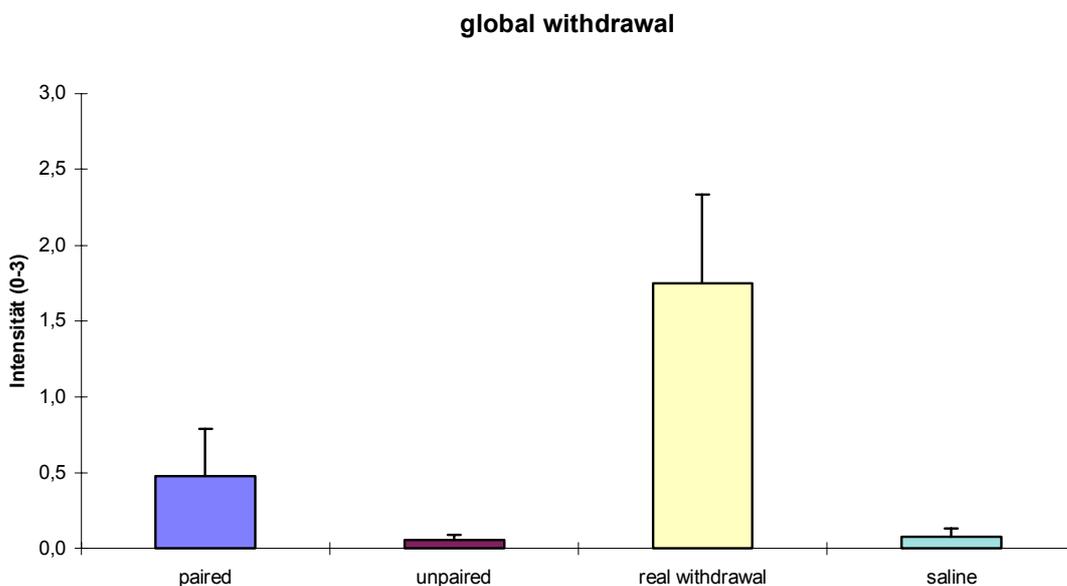


Abb. 22: Zusammenfassung der Symptome *salivation*, Ptosis, Augen- und Nasenbluten zu einem globalen Entzugssymptom (*global withdrawal*). Datenerhebung, Behandlung und Tierzahlen entsprechen denen aus Abb. 21. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Die Erfassung des Gewichtsverlustes innerhalb der 30-minütigen Beobachtungszeit ist in Abbildung 23 dargestellt. Tiere der Gruppe *paired* verlieren innerhalb dieses Zeitraumes nach

Exposition des konditionierten Stimulus deutlich an Gewicht gegenüber Tieren der Gruppe *unpaired* ($F[3,47]=84,7$, $p<0,0001$).

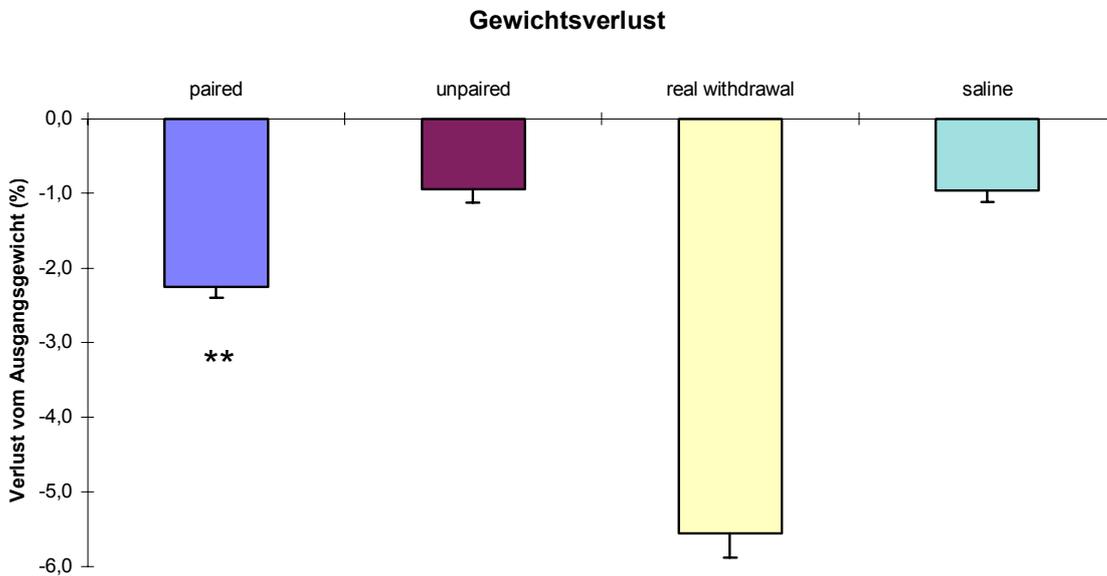


Abb. 23: Gewichtsverlust nach Exposition des konditionierten Stimulus für 30 Minuten. Ausgangsgewicht vor der Messung entspricht 100 Prozent. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. ** kennzeichnet $p<0,01$ der *paired group* gegenüber *unpaired*.

Abbildung 24 gibt Aufschluss über den Verlauf und Schwere der Entzugssymptomatik während der Konditionierungsphase. Auffallend dabei ist, dass die Kardinalsymptome in ihrer Anzahl über die Konditionierungstage abnehmen, manche sogar ganz in den Hintergrund treten. Eine ein-faktorielle ANOVA für wiederholte Messungen ergab bezüglich der Symptome *teeth chattering*, *wet dog shakes* und *jumping* einen statistisch signifikanten Abfall während der Konditionierungstage (*teeth chattering* $F[3,27]=8,41$, $p=0,001$; *wet dog shakes* $F[3,27]=3,58$, $p=0,034$; *jumping* $F[3,27]=3,27$, $p=0,045$). *Paw tremor*, *writhing*, *sniffing* und die Zusammenfassung mehrerer Entzugssparameter zu einem globalen Entzugssymptom (ohne Abbildung) veränderten sich nicht oder nur geringfügig (*paw tremor* $F[3,27]=0,06$, $p=0,97$; *writhing* $F[3,27]=1,91$, $p=0,16$; *sniffing* $F[3,27]=0,05$, $p=0,98$; *global withdrawal* $F[3,15]=3,00$, $p=0,085$).

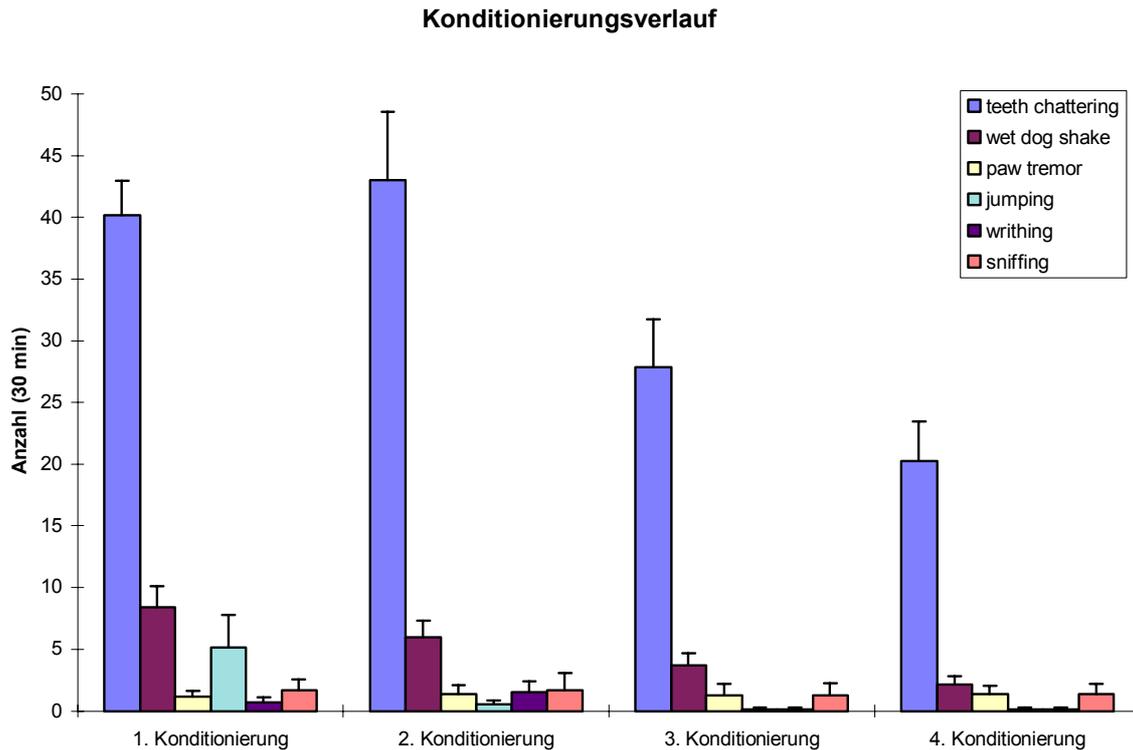


Abb. 24: Verlauf und Schwere der Entzugssymptomatik während der Konditionierungsphase beobachtet in Tieren der Gruppe *real withdrawal* (n=8). Entzugsprovokation mit 1 mg/kg s.c. Naloxon gemäß Protokoll. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Auch hinsichtlich des Gewichtsverlustes ergaben sich statistisch keine Unterschiede an den Konditionierungstagen (ohne Abbildung) ($F[3,27]=1,77$, $p=0,19$).

hot plate

Das Reaktionsverhalten der Versuchstiere nach Exposition des konditionierten Stimulus auf der *hot plate* war Gegenstand dieses Versuches.

Abbildung 25 illustriert das unterschiedliche Reaktionsverhalten der Tiere in den untersuchten Gruppen. Die statistische Überprüfung bestätigt hoch signifikante Unterschiede der Vergleichsgruppen ($F[3,36]=17,2$, $p<0,0001$). Ein nachgeschalteter Newman-Keuls Test weist die Gruppe *paired* als hoch signifikant differenzierbar zu allen anderen Gruppen aus.

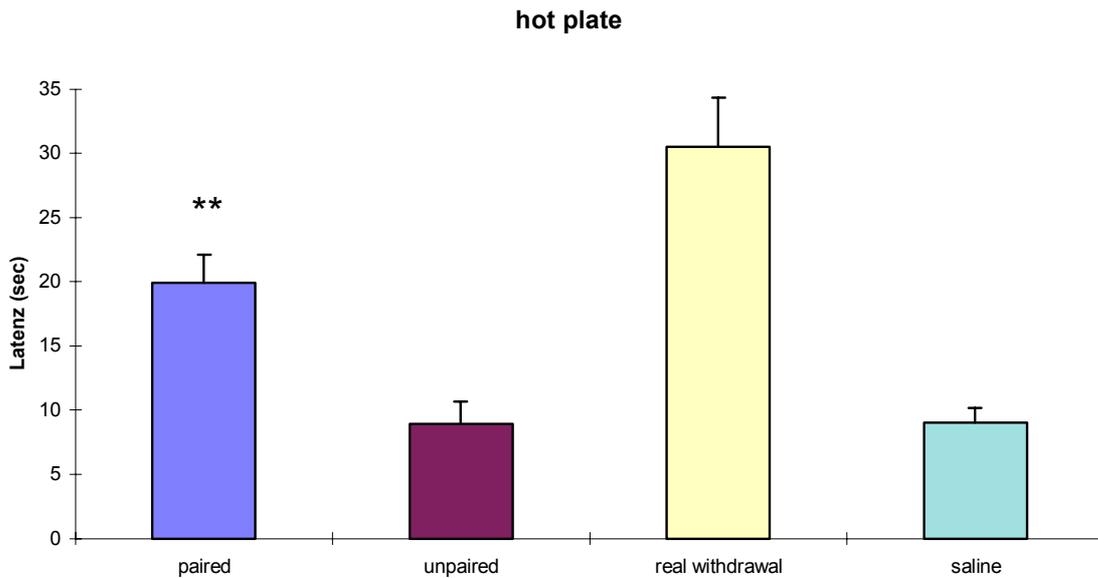


Abb. 25: Reaktionszeiten konditionierter Tiere und Kontrollen auf der *hot plate* (*paired* n=12, *unpaired* n=11, *real withdrawal* und *saline* n=8). Behandlung entspricht der aus Abb. 21, wobei die Versuchstiere nach 5 Minuten wieder aus der Box entnommen wurden und die Schmerzreaktion gemessen wurde. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. ** kennzeichnet $p < 0,01$ der *paired group* gegenüber allen anderen Gruppen.

open field

Mittels dieses Verhaltensparadigmas sollte das Lokomotionsverhalten konditionierter Tiere und entsprechender Kontrollen untersucht werden (Abbildung 26).

Eine zwei-faktorielle ANOVA für wiederholte Messungen über alle Gruppen errechnet sowohl für beide Faktoren, als auch für die Interaktion statistisch hoch signifikante Unterschiede (Faktor Gruppe $F[3,31]=20,4$, $p < 0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[14,42]=3,92$, $p < 0,0001$; Interaktion $F[14,392]=2,42$, $p < 0,0001$). Ein weitergehender statistischer Vergleich zwischen den Gruppen *paired* und *unpaired* erbrachte auch hier statistisch hoch signifikante Unterschiede (Faktor Gruppe $F[1,15]=14,0$, $p=0,002$; Faktor wiederholte Messung $F[14,14]=1,88$, $p=0,029$; Interaktion $F[14,196]=3,46$, $p < 0,0001$). Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen *paired* und *real withdrawal* lässt darauf schließen, dass beide Gruppen schwer von einander differenzierbar sind (Faktor Gruppe $F[1,15]=4,57$, $p=0,051$; Faktor wiederholte Messung $F[14,14]=0,83$; $p=0,63$; Interaktion $F[14,196]=0,97$, $p=0,48$).

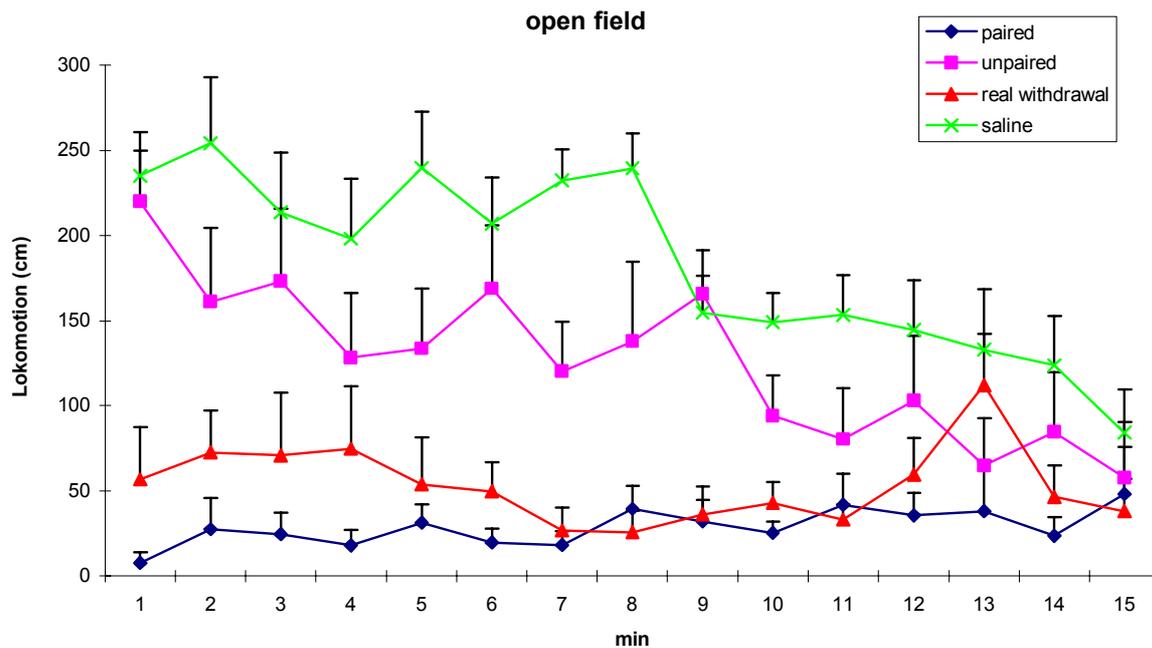


Abb. 26: 15-minütige Lokomotionsmessung im *open field* in konditionierten Versuchstieren (n=8) und entsprechenden Kontrollen (n=8) im Test auf konditionierten Entzug. Versuchsdesign und Durchführung entspricht prinzipiell der in Abb. 21. Auf Zugabe eines Anisgeruchs wurde auf Grund der räumlichen Gegebenheiten verzichtet. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Stresshormonkonzentrationen

Über einen gelegten Jugularvenenkatheter konnte den Versuchsratten stressfrei Blut entnommen werden. Ziel war die Bestimmung der Konzentrationen von ACTH, Corticosteron und Noradrenalin vor und während des Tests auf konditionierten Entzug.

Abbildung 27 zeigt die ACTH-Konzentrationen der Tiere in den Vergleichsgruppen. Die statistische Berechnung über alle Gruppen erbrachte hinsichtlich beider Faktoren und Interaktion hoch signifikante Unterschiede (Faktor Gruppe $F[3,42]=30,4$; $p<0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[3,117]=100$, $p<0,0001$; Interaktion $F[9,117]=9,27$, $p<0,0001$). Die weiterführende Statistik und Konzentration auf den Vergleich der Gruppen *paired* und *unpaired* weist auch hier auf deutliche Unterschiede (Faktor Gruppe $F[1,22]=26,4$, $p<0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[3,63]=62,0$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,63]=7,35$, $p=0,003$). Eine statistische Differenzierung der Gruppen *paired* und *real withdrawal* gelang nur hinsichtlich des Faktors wiederholte Messung ($F[3,54]=69,2$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,54]=2,72$, $p=0,053$), ein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht festgestellt werden (Faktor Gruppe $F[1,19]=1,23$, $p=0,28$). Unter basalen Bedingungen (ein-faktorielle ANOVA) unterscheiden sich die Gruppen nicht ($F[3,39]=0,56$, $p=0,64$).

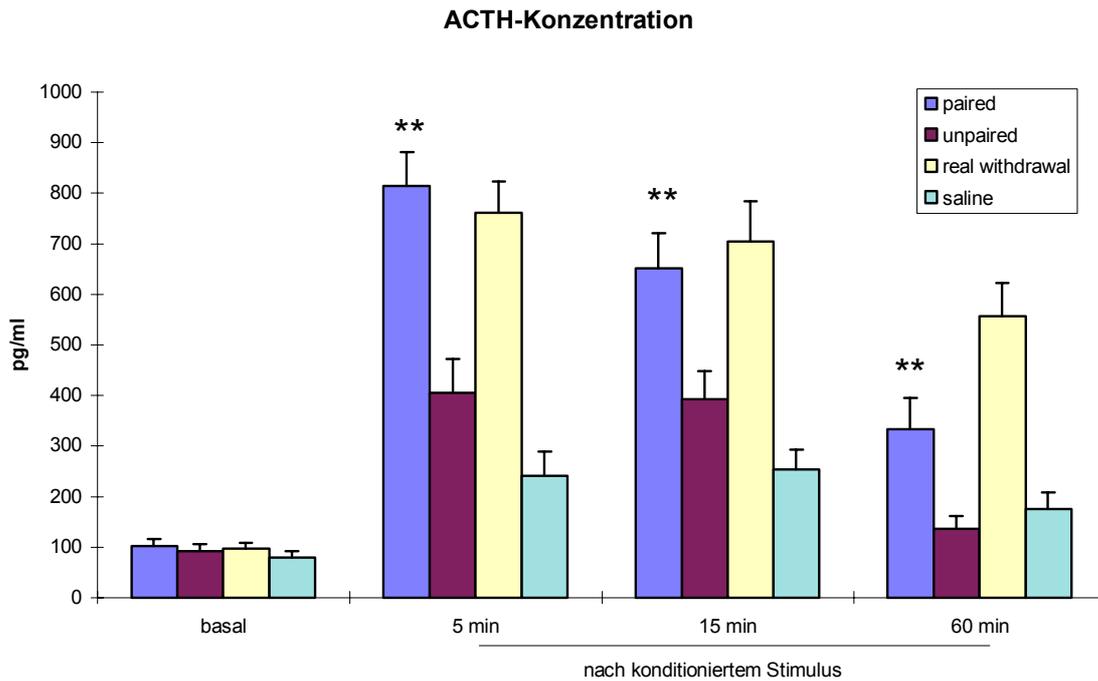


Abb. 27: ACTH-Konzentrationen in konditionierten Ratten nach Exposition des spezifischen Umgebungsreizes (Beobachtungsbox und Anisgeruch). Basale Werte wurden durch Blutentnahme 2 Stunden vor dem Test auf konditionierten Entzug im Heimkäfig ermittelt. Weitere Blutentnahmen erfolgten 5, 15 und 60 Minuten nach Exposition des konditionierten Stimulus. Blutproben der Gruppen *paired* (n=15), *unpaired* (n=14), *real withdrawal* (n=12) und *saline* (n=10) wurden mittels Radioimmuno-Assay bestimmt. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. ** kennzeichnet $p < 0,01$ der *paired group* gegenüber *unpaired*.

In Abbildung 28 sind die Corticosteron-Konzentrationen unter basalen Bedingungen und nach Exposition des konditionierten Stimulus wiedergegeben. Statistische Unterschiede konnten hinsichtlich beider Faktoren berechnet werden (Faktor Gruppe $F[3,41]=18,7$, $p < 0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[3,114]=97,3$, $p < 0,0001$; Interaktion $F[9,114]=5,91$, $p < 0,0001$). Eine darauf basierende weitergehende Untersuchung zwischen den Gruppen *paired* und *unpaired* konnte keine Differenzierung beider Gruppen erkennen lassen (Faktor Gruppe $F[1,21]=3,87$, $p=0,063$; Faktor wiederholte Messung $F[3,60]=35,2$, $p < 0,0001$; Interaktion $F[3,60]=0,82$, $p=0,48$). Basale Corticosteron-Konzentrationen (ein-faktorielle ANOVA) waren in allen Gruppen nicht unterschiedlich ($F[3,38]=0,15$; $p=0,9233$)

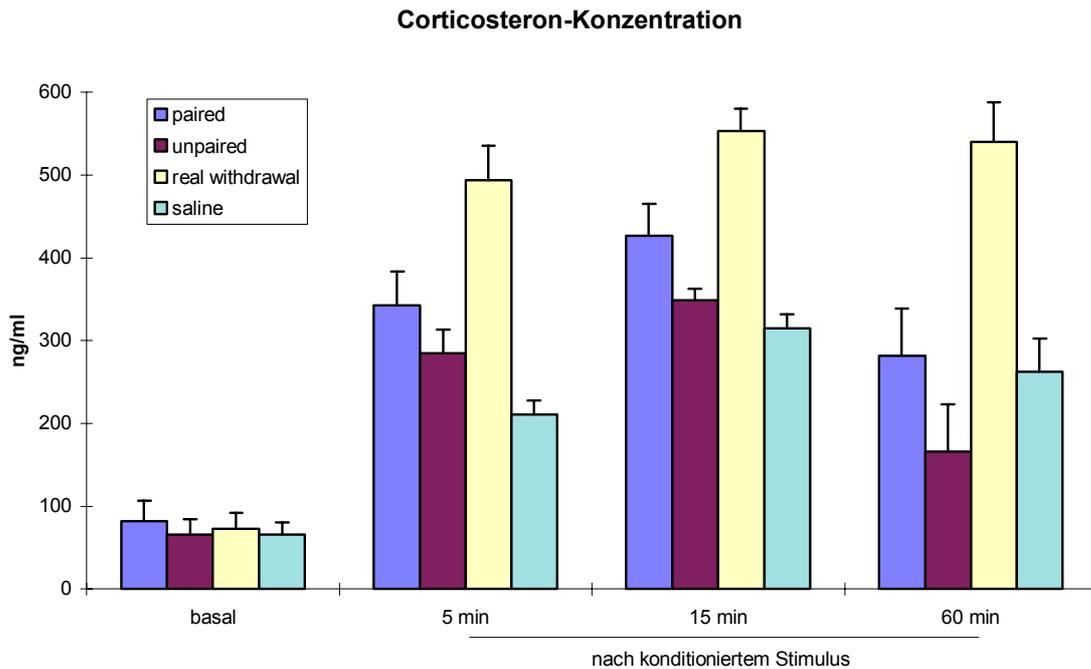


Abb. 28: Corticosteron-Konzentrationen in konditionierten Ratten nach Exposition des spezifischen Umgebungsreizes (Beobachtungsbox und Anisgeruch). Versuchsdurchführung und Gruppengröße entsprechen der aus Abb. 27. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Aus Abbildung 29 können die Werte der Noradrenalin-Konzentration der Vergleichsgruppen nach konditioniertem Stimulus entnommen werden. Berechnungen auf Basis einer zweifaktoriellen ANOVA zeigten signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Faktor Gruppe $F[3,38]=3,07$, $p=0,040$; Faktor wiederholte Messung $F[3,105]=4,56$, $p=0,0048$; Interaktion $F[9,105]=2,46$, $p=0,013$). Der Gruppenvergleich zwischen *paired* und *unpaired* weist zwischen den Gruppen keinen Unterschied aus, ein nachgeschalteter Newman-Keuls Test kann aber zum Zeitpunkt „5 min“ auf $p<0,05$ -Niveau zwischen den beiden Gruppen unterscheiden (Faktor Gruppe $F[1,22]=1,84$, $p=0,19$; Faktor wiederholte Messung $F[3,63]=2,76$, $p=0,049$; Interaktion $F[3,63]=2,76$, $p=0,049$). Zwischen den Gruppen *paired* und *real withdrawal* kann auf Grund der statistischen Berechnungen nicht unterschieden werden (Faktor Gruppe $F[1,19]=0,30$, $p=0,59$; Faktor wiederholte Messung $F[3,54]=7,58$, $p=0,0003$; Interaktion $F[3,54]=0,78$; $p=0,51$). Unter basalen Bedingungen, 2 Stunden vor dem Test auf konditionierten Entzug (einfaktorielle ANOVA), konnte auch in der Noradrenalin-Konzentration kein Unterschied zwischen den verglichenen Gruppen ausgemacht werden ($F[3,35]=0,15$, $p=0,92$).

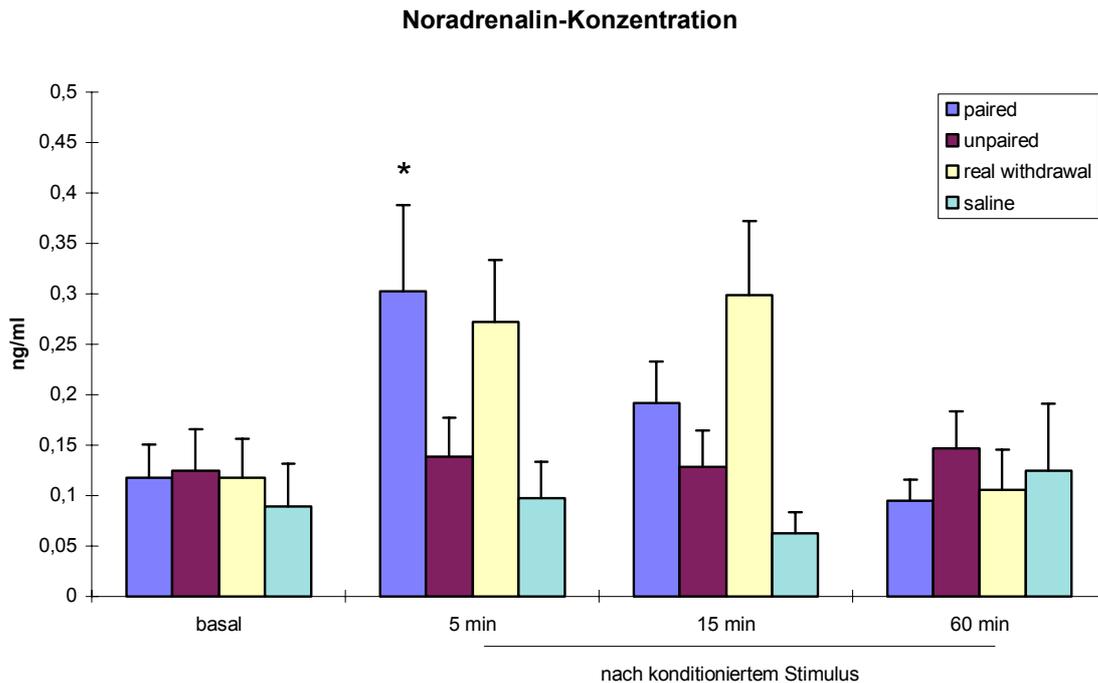


Abb. 29: Noradrenalin-Konzentrationen in konditionierten Ratten nach Exposition des spezifischen Umgebungsreizes (Beobachtungsbox und Anisgeruch). Versuchsdurchführung und Gruppengröße entsprechen der aus Abb. 27. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. * kennzeichnet $p < 0,05$ der *paired group* gegenüber *unpaired*.

In Zusammenfassung aller vorliegenden Daten zum Tiermodell zum konditionierten Entzug kann festgehalten werden, dass es möglich war, in fast allen untersuchten Parametern einen statistischen Unterschied der *paired group* zu den entsprechenden Kontrollen zu finden.

Vergleich des Tiermodells mit einem Stressparadigma

Ziel des Versuches war der Vergleich der erhobenen Daten mit Verhaltensantworten aus einem konditionierten Stressparadigma. Placeboimplantierte, drogennaive Versuchstiere wurden in gleicher Weise konditioniert. Als aversiver Reiz wurden Druckluftstöße (*air puff*) aus einer Druckluftflasche verwendet.

Abbildung 30 zeigt die Verhaltensdaten der Tiere innerhalb 30 Minuten nach Exposition des konditionierten Umweltreizes (Beobachtungsbox und Anisgeruch). Die statistische Analyse aller Gruppen weist für alle beobachteten Verhaltensparameter signifikante Unterschiede aus (*teeth chattering* $F[3,45]=31,9$, $p < 0,0001$; *paw tremor* $F[3,45]=22,7$, $p < 0,0001$; *sniffing* $F[3,47]=3,51$, $p=0,022$). Darauf basierende *post hoc*-Tests ergaben allerdings keine Unterschiede zwischen den Gruppen *paired air puff* und *unpaired air puff*. Die hohe statistische Signifikanz ist

somit auf die *paired group* zurückzuführen. Weitere Verhaltensauffälligkeiten wurden nicht beobachtet.

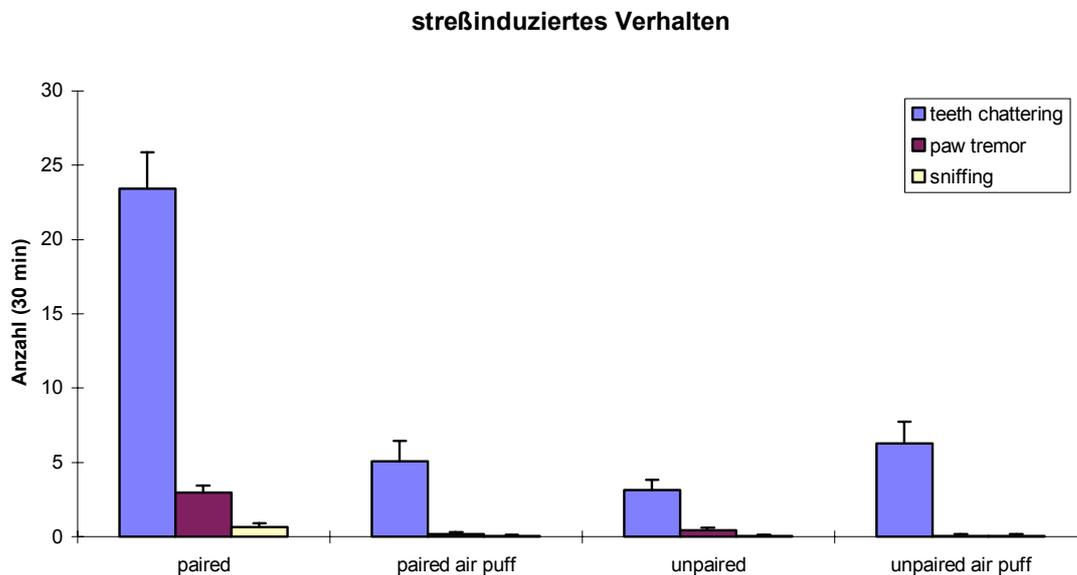


Abb. 30: Vergleich der erhobenen Daten aus Abb. 21 mit Verhaltensantworten aus einem konditionierten Stressparadigma (*air puff*) ($n=10$). Versuchsdurchführung entspricht der aus Abb. 21. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Abbildung 31 illustriert den Gewichtsverlust der beobachteten Tiere nach Präsentation des konditionierten Stimulus. Auch hier kann zwischen den Gruppen *paired air puff* und *unpaired air puff* nicht differenziert werden, allein die Gruppe *paired* ist für die hohe statistische Signifikanz verantwortlich ($F[3,45]=13,8, p<0,0001$).

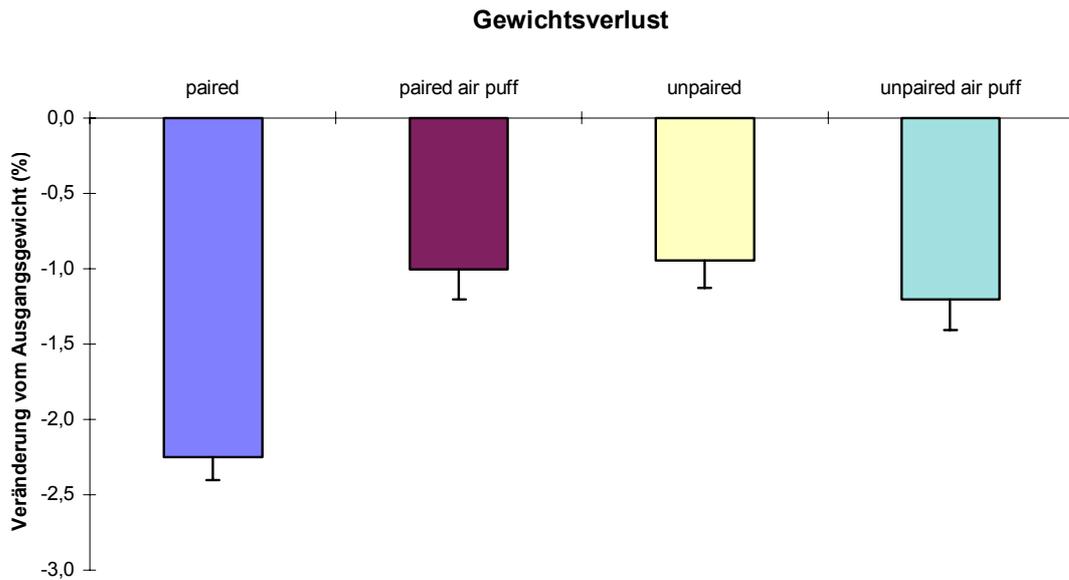


Abb. 31: Gewichtsverlust die Tiere aus einem konditionierten Stressparadigma (*air puff*) (n=10) im Vergleich mit Tieren aus dem Experiment zum konditionierten Entzug. Versuchsdurchführung entspricht der aus Abb. 21. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Die Abbildung 32 reflektiert die Konzentrationen von ACTH und Corticosteron. Für die ACTH-Konzentration kann folgende Statistik angegeben werden: Faktor Gruppe $F[3,41]=19,7$, $p<0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[3,114]=63,3$, $p<0,0001$; Interaktion $F[9,114]=8,53$, $p<0,0001$. Der Vergleich zwischen den Gruppen *paired* und *paired air puff* (Faktor Gruppe $F[1,18]=31,7$, $p<0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[3,51]=31,7$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,51]=12,4$, $p<0,0001$) fällt statistisch hoch signifikant aus, allerdings kann auch hier kein Unterschied in den *air puff*-behandelten Tieren ausgemacht werden (Faktor Gruppe $F[1,18]=0,01$, $p=0,89$; Faktor wiederholte Messung $F[3,51]=14,0$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,51]=80,7$, $p=0,51$). In basalen ACTH-Konzentrationen (ein-faktorielle ANOVA) unterscheiden sich die Gruppen nicht ($F[3,38]=1,90$, $p=0,14$).

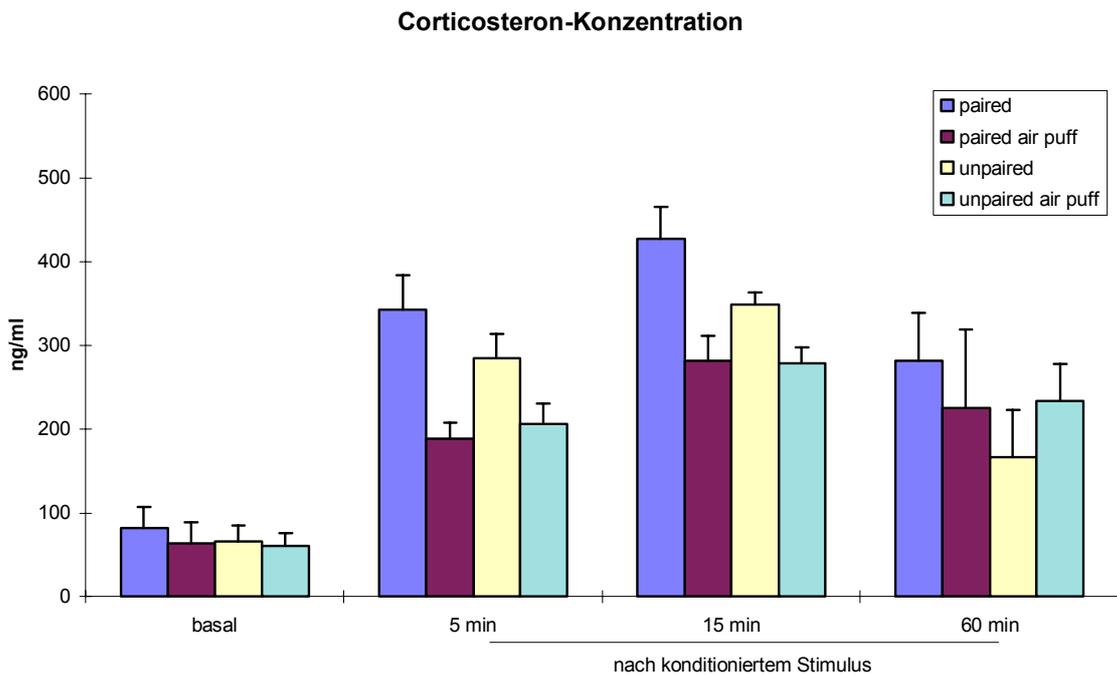
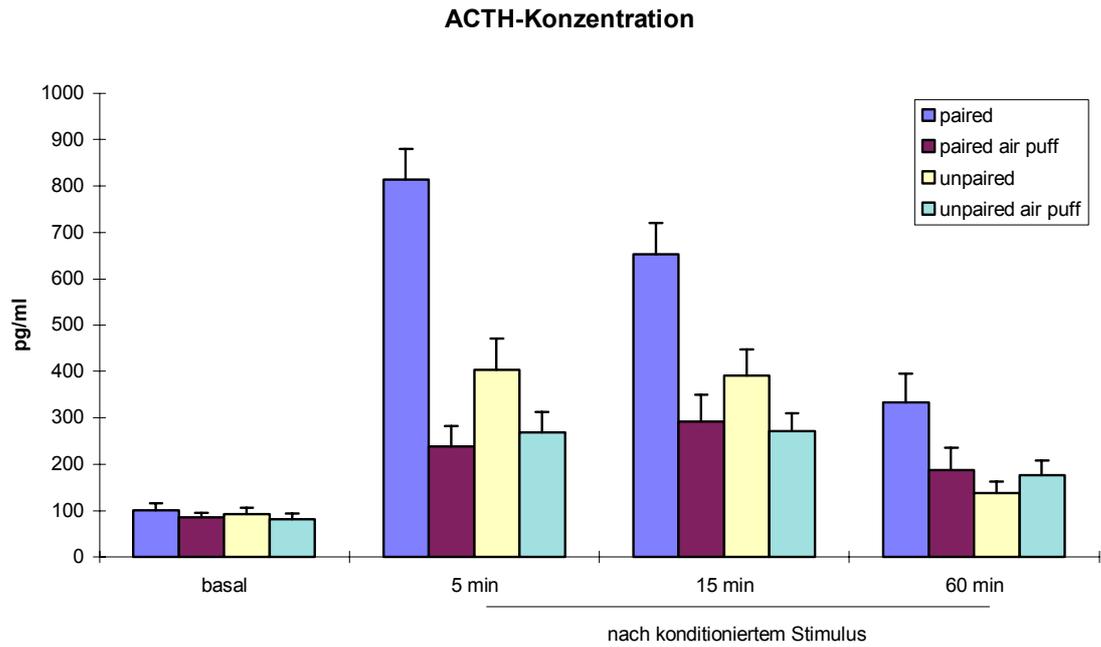


Abb. 32.: ACTH- und Corticosteron-Konzentrationen in konditionierten Ratten nach Exposition des spezifischen Umgebungsreizes (Beobachtungsbox und Anisgeruch). Versuchsdurchführung und Gruppengröße entsprechen der aus Abb. 27. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Die Konzentrationen von Corticosteron *air puff*-behandelter Versuchstiere sind nach statistischer Überprüfung nicht unterschiedlich (Faktor Gruppe $F[1,18]=0,02$, $p=0,88$; Faktor wiederholte

Messung $F[3,51]=16,5$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,51]=0,05$, $p=0,98$; alle Gruppen: Faktor Gruppe $F[3,39]=3,48$, $p=0,025$; Faktor wiederholte Messung $F[3,108]=47,6$, $p<0,0001$; Interaktion $F[9,108]=1,55$, $p=0,14$). Im Einzelvergleich der Gruppen *paired* und *paired air puff* kann zwischen den Gruppen differenziert werden (Faktor Gruppe $F[1,17]=4,69$, $p=0,046$; Faktor wiederholte Messung $F[3,48]=20,4$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,48]=1,38$, $p=0,26$). Auch hier sind basale Werte zwischen allen Gruppen statistisch nicht unterschiedlich ($F[3,36]=0,16$, $p=0,92$). Auf die Bestimmung der Noradrenalin-Konzentrationen in diesen Tieren musste auf Grund limitierter Probenanzahl verzichtet werden.

Abbildung 33 zeigt das Lokomotionsverhalten der unterschiedlich konditionierten Vergleichsgruppen und Kontrollen.

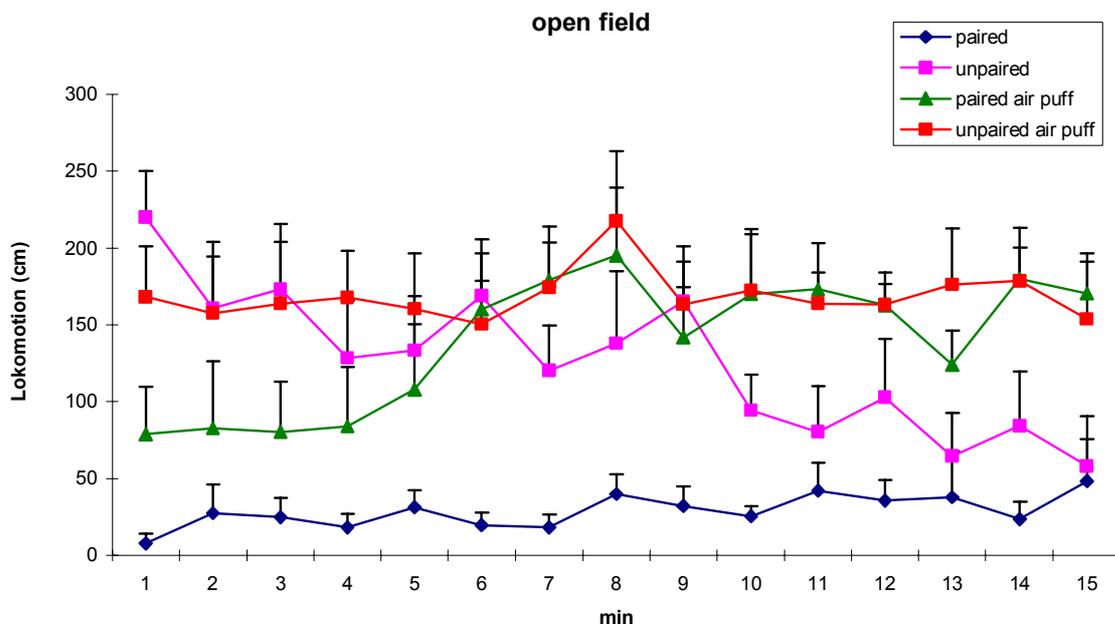


Abb. 33: Lokomotionsverhalten der unterschiedlich konditionierten Vergleichsgruppen und Kontrollen. Versuchsdurchführung und Gruppengröße entspricht der aus Abb. 26. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Die statistische Berechnung unter Einbeziehung aller Gruppen erbrachte hinsichtlich beider Faktoren hoch signifikante Unterschiede (Faktor Gruppe $F[3,31]=10,8$, $p<0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[14,392]=0,85$, $p=0,60$; Interaktion $F[42,392]=0,89$, $p=0,001$). Der Einzelvergleich zwischen beiden *paired*-Gruppen (*paired*, *paired air puff*) erbrachte hohe statistische Signifikanz bezüglich des Faktors Gruppe: $F[1,15]=28,0$, $p=0,0001$ (Faktor wiederholte Messung $F[14,196]=2,26$, $p=0,0069$; Interaktion $F[14,196]=1,47$, $p=0,12$). Beide *air*

puff-behandelten Gruppen (*paired air puff*, *unpaired air puff*) unterscheiden sich auch in diesem experimentellen Design nicht (Faktor Gruppe $F[1,15]=1,27$, $p=0,28$; Faktor wiederholte Messung $F[14,196]=1,42$, $p=0,14$; Interaktion $F[14,196]=0,87$, $p=0,59$).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass sich in fast allen untersuchten Parametern die *paired group* von der *paired air puff*-Gruppe unterscheidet. Die dazugehörige Kontrollgruppe *unpaired air puff* lässt sich aber statistisch nicht von *paired air puff* differenzieren. Die Konditionierung war folglich nicht ausreichend, um ein deutlich verändertes Verhaltensrepertoire und eine erhöhte Stresshormonausschüttung zu bewirken.

2. Teil: *in situ* Hybridisierung

Ziel des Experiments war die Untersuchung von *c-fos*-mRNA als Nachweis neuronaler Aktivität in konditionierten Versuchstieren und entsprechenden Kontrollen. Die Gehirnentnahme erfolgte 30 Minuten nach Exposition des konditionierten Stimulus.

in situ Hybridisierung

Abbildung 34 zeigt die *c-fos*-mRNA-Expression nach Auswertung der Autoradiographiefilme durch Desitometrie und durch Vergleich mit einem [C^{14}]-Standard. Die Darstellung von Signifikanzen beschränkt sich in den Abbildungen auf den statistischen Unterschied zwischen den Gruppen *paired* und *unpaired*. Basis dieser Kennzeichnung war die statistische Berechnung mittels ein-faktorieller ANOVA und nachfolgendem *post hoc*-Test (Newman-Keuls Test). Die statistische Berechnung der Daten für den Locus coeruleus weist zwischen den Vergleichsgruppen einen hohen statistischen Unterschied aus ($F[1,16]= 20,5$, $p<0,0001$). Dabei unterscheidet sich die *paired group* sowohl von der *unpaired group*, als auch von der Salinekontrolle signifikant. Beide letzteren Gruppen unterschieden sich nicht. Die Gruppe *real withdrawal* unterscheidet sich zu allen anderen Gruppen hoch signifikant.

in situ Hybridisierung (c-fos)

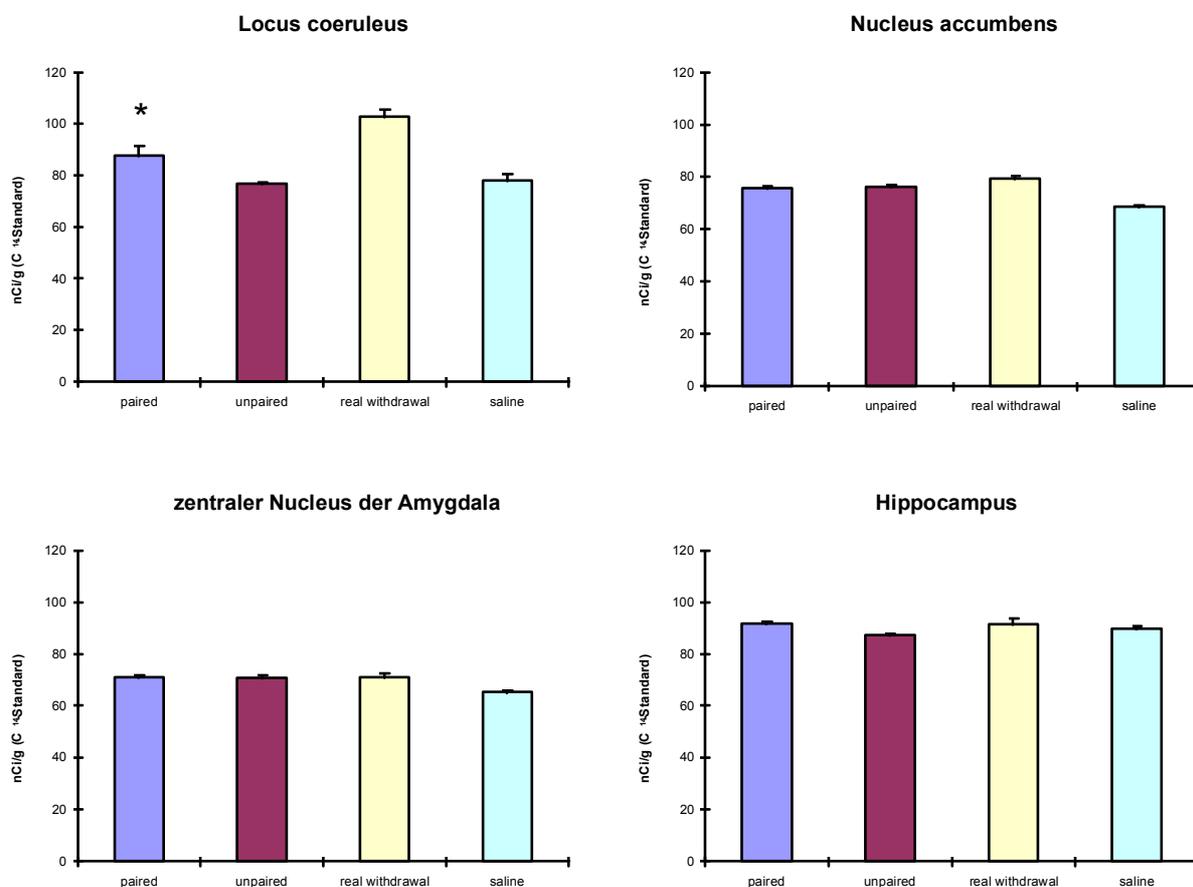


Abb. 34: c-fos-mRNA nach densitometrischer Auswertung und Vergleich mit einem [C^{14}]-Standard in konditionierten Versuchstieren und entsprechenden Kontrollen (jeweils $n=6$). Design und Durchführung des Experimentes entsprechen der aus Abb. 21 und Kap 4.2.2.. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben. *kennzeichnet $p < 0,05$ der *paired group* gegenüber *unpaired*.

In Nucleus accumbens kann kein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen *paired* und *unpaired* berechnet werden, wohl aber unterschieden sich die Salinekontrollen hoch signifikant von allen anderen Gruppen ($F[3,19]=32,1$, $p < 0,0001$). Tiere der Gruppe *real withdrawal* unterscheiden sich signifikant von den anderen Gruppen. Im zentralen Kern der Amygdala basiert die hohe statistische Signifikanz auf dem Unterschied der *saline group* gegenüber den anderen Gruppen, die untereinander nicht weiter differenzierbar waren ($F[3,17]=8,51$, $p=0,001$). Ein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen konnte im Hippocampus nicht gefunden werden ($F[3,16]=2,76$, $p=0,075$). Abbildung 35 zeigt exemplarisch ein Autoradiogramm jeder Gruppe im Bereich des Locus coeruleus.

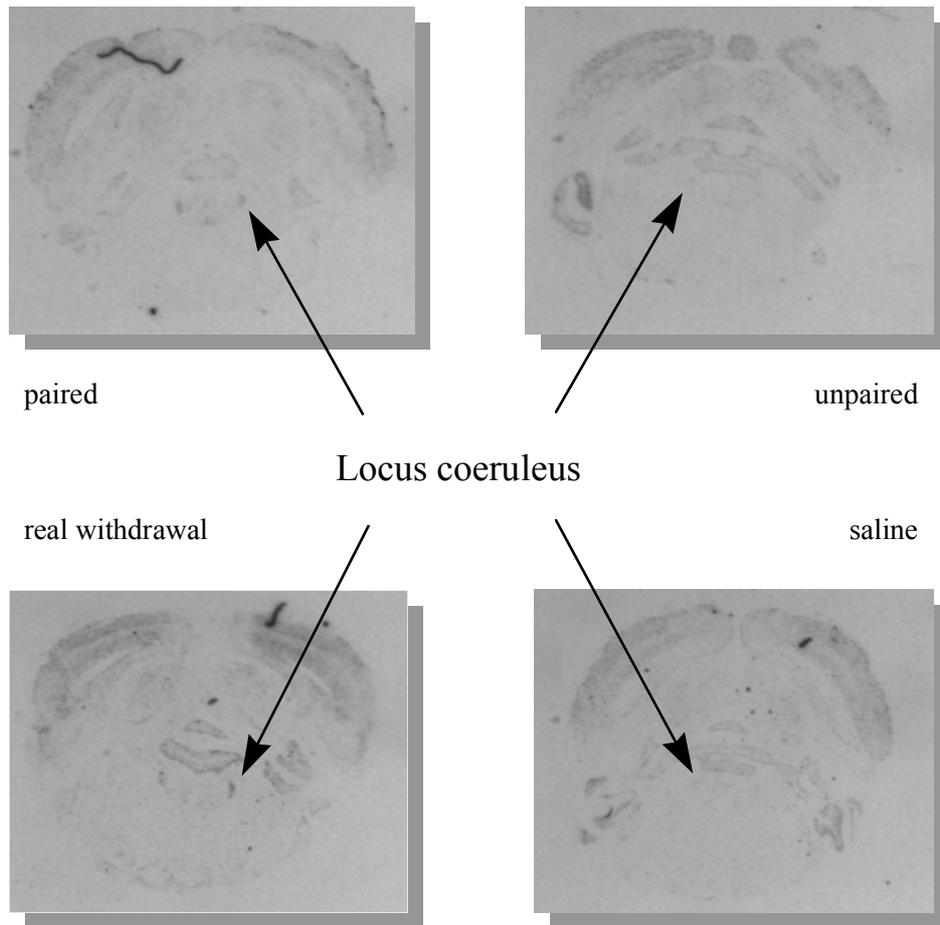


Abb. 35: Autoradiogramme der *in situ* Hybridisierung. Vor Verwendung der Schnitte wurden diese in 4 % Paraformaldehydlösung (5 Minuten) fixiert und dehydriert. Zur Hybridisierung wurde die markierte Oligonukleotid-Sonde in Hybridisierungspuffer verdünnt. Der Puffer bestand aus einer Lösung 100 % Formamid, 20x SSC, 0,5 M Na-Phosphat, 0,1 M Na-Pyrophosphat, 50x Denhardt's Lösung, hydrolysierte Lachssperma-DNA (4 mg/ml), Poly-A-Säure) und Dextransulfat. Auf die Objektträger wurde das Puffer-Sonde-Gemisch pipettiert, mit Parafilmstreifen abgedeckt und über Nacht bei 42 °C inkubiert (24 Stunden). Nach Waschung wurden die Objektträger radioaktivitätssensitiven Filmen (Amersham) für 40 Tage exponiert. Die Auswertung erfolgte densitometrisch (siehe auch Kap. 2.2.6., Seite 21). Die Daten wurden in nCi/g angegeben durch Vergleich mit einem aufgelegten [C^{14}]-Standard.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der konditionierte Stimulus in der *paired group* allein im Locus coeruleus eine erhöhte c-fos-Expression gegenüber der *unpaired group* auslösen konnte. In diesem Kerngebiet sowie im Nucleus accumbens lagen die Werte für Tiere der *real withdrawal group* sogar noch deutlich darüber.

3. Teil: Pharmakologische Intervention durch Memantin

Die Untersuchung der Einflussnahme von Memantin auf ein konditioniertes Entzugsgeschehen war Ziel der nachfolgenden Experimente. Die untersuchten Parameter waren das Lokomotionsverhalten im *open field*, die Reaktionszeit auf der *hot plate* und die Konzentrationen der Stresshormone Noradrenalin, Corticosteron und ACTH. Auf ein Beobachtungsexperiment wurde verzichtet.

open field

Statistische Berechnungen der im *open field* erhobenen Daten erfolgten auf Basis einer zweifaktoriellen AVOVA für wiederholte Messungen. Die Berechnung über alle Gruppen ergab für den Faktor Gruppe als auch für die Interaktion hoch signifikante Unterschiede. Für den Faktor wiederholte Messung errechnete sich keine Signifikanz (Faktor Gruppe $F[5,45]=120$, $p<0,0001$, Faktor wiederholte Messung $F[14,560]=1,42$, $p=0,13$; Interaktion $F[70,560]=2,00$, $p<0,0001$). Ein Einzelvergleich erfolgte deshalb zwischen den Gruppen *paired/paired-memantine*, *real withdrawal/real withdrawal-memantine* und *saline/saline-memantine*.

Ein Einfluss von Memantin in Tieren der Gruppe *paired-memantine* kann auf Grund dieses statistischen Einzelvergleiches ausgeschlossen werden, die Gruppen *paired/paired-memantine* sind statistisch in keinem der beiden Faktoren zu unterscheiden (Faktor Gruppe $F[1,15]=2,16$, $p=0,16$; Faktor wiederholte Messung $F[14,196]=1,43$, $p=0,13$; Interaktion $F[14,196]=0,64$, $p=0,82$). Das Lokomotionsverhalten dieser Gruppen ist in Abbildung 36 dargestellt.

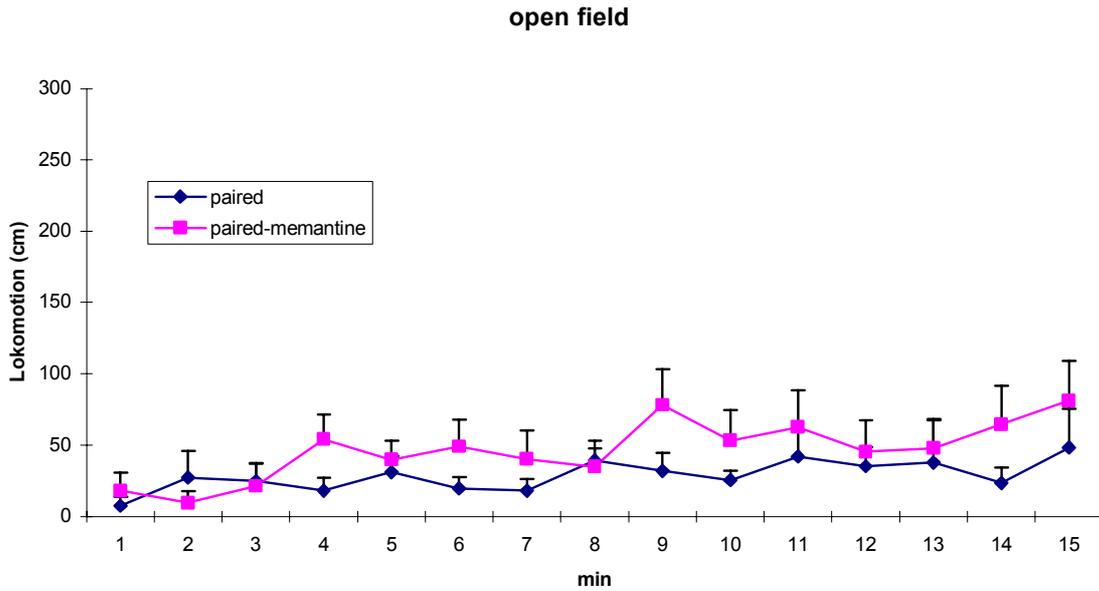


Abb. 36: Lokomotionsverhalten der Gruppen *paired* (n=10) und *paired-memantine* (n=10). Die Verabreichung von Memantin (7,5 mg/kg) erfolgte 30 Minuten vor dem Test auf konditionierten Entzug intraperitoneal. Versuchsdurchführung entspricht der aus Abb. 21 und Kap 4.2.2.. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

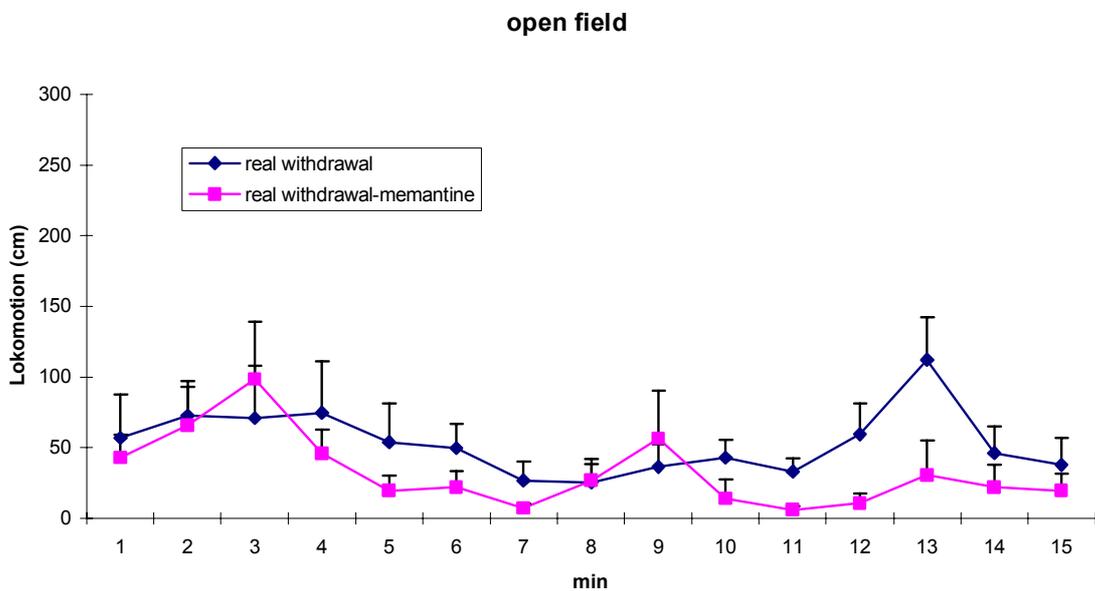


Abb. 37: Lokomotionsverhalten der Gruppen *real withdrawal* (n=10) und *real withdrawal-memantine* (n=10). Die Verabreichung von Memantin (7,5 mg/kg) erfolgte 30 Minuten vor dem Test auf konditionierten Entzug intraperitoneal. Die Versuchsdurchführung entspricht der aus Abb. 21 und Kap. 4.2.2.. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Abbildung 37 stellt die Gruppen *real withdrawal* und *real withdrawal-memantine* dar. Auch hier konnte die Verabreichung von Memantin keinen Gruppenunterschied erzeugen (Faktor Gruppe $F[1,14]=3,31$, $p=0,091$; Faktor wiederholte Messung $F[14,182]=1,82$, $p=0,038$; Interaktion $F[14,182]=0,76$, $p=0,70$). In Salinekontrollen (Abbildung 38) stellt sich die Statistik wie folgt dar: Faktor Gruppe $F[1,14]=0,32$, $p=0,57$; Faktor wiederholte Messung $F[14,182]=3,21$, $p=0,0001$; Interaktion $F[14,182]=1,89$, $p=0,029$.

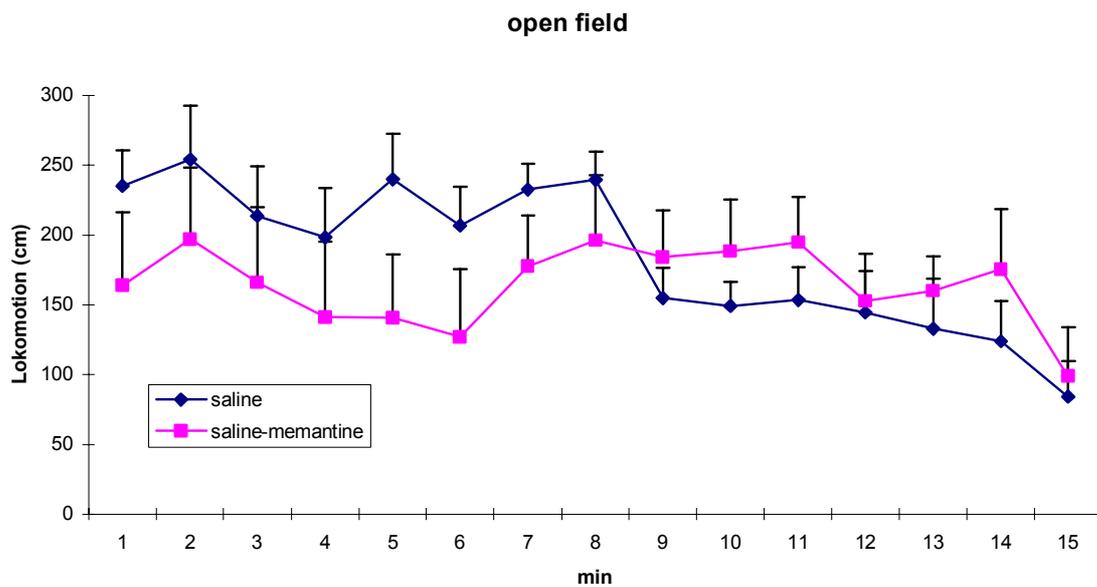


Abb. 38: Lokomotionsverhalten der Gruppen *saline* ($n=10$) und *saline-memantine* ($n=10$). Die Verabreichung von Memantin ($7,5$ mg/kg) erfolgte 30 Minuten vor dem Test auf konditionierten Entzug intraperitoneal. Die Versuchsdurchführung entspricht der aus Abb. 21 und Kap. 4.2.2.. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Verabreichung des NMDA-Rezeptor-antagonisten Memantin keinen Einfluß auf die untersuchten Gruppen hat. Lediglich in Salinekontrolltieren vermag Memantin das Lokomotionsmuster innerhalb der 15-minütigen Aufzeichnungsphase zu verändern, ohne jedoch dabei einen Gruppenunterschied herbeizuführen.

hot plate

Die statistische Überprüfung der auf der *hot plate* erhobenen Daten (Abbildung 39) konnte zwar hinsichtlich aller untersuchter Gruppen hohe signifikante Unterschiede feststellen ($F[5,50]=12,9$, $p<0,0001$), eine darauf basierende weiterführende Berechnung mittels Newman-Keuls Test konnte jedoch zwischen den einzelnen Paarungen keine Signifikanzen feststellen und somit keinen Einfluss von Memantin. Dennoch kann festgehalten werden, dass Tiere der Gruppe *real withdrawal* signifikante Latenzen zu anderen Tieren auf der *hot plate* aufweisen. Ebenso Tiere der gepaarten Gruppe. Das Experiment konnte zwar somit keinen Einfluss von Memantin in der verabreichten Dosierung nachweisen, die Ergebnisse konnten jedoch reproduziert werden.

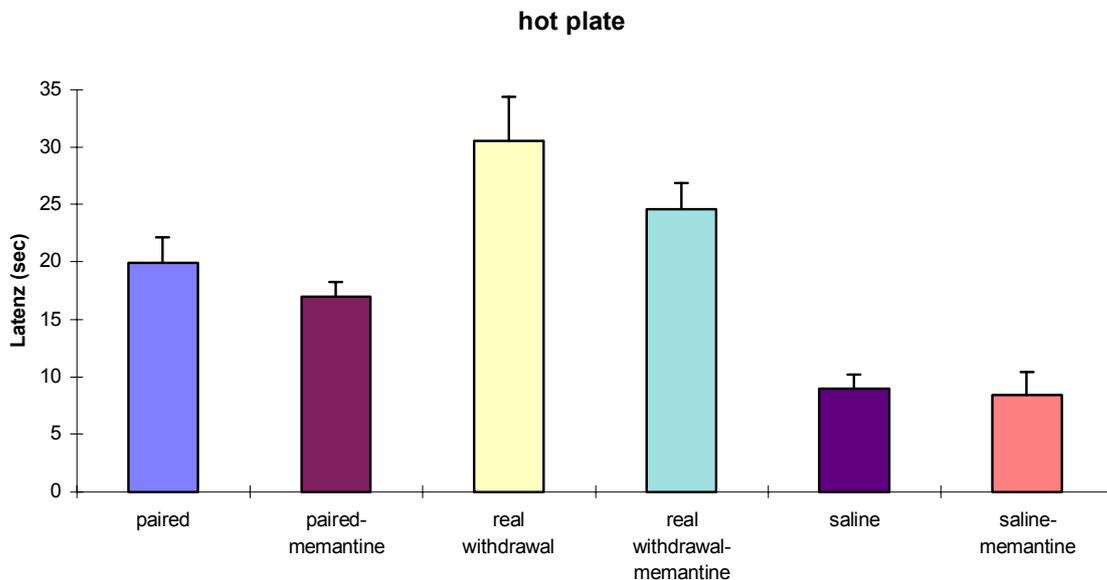


Abb. 39: Reaktionszeiten konditionierter Tiere und Kontrollen auf der *hot plate* (jeweils $n=10$). Versuchsführung und Design entsprechen der aus Abb. 21, wobei die Versuchstiere nach 5 Minuten wieder aus der Box entnommen wurden und die Schmerzreaktion gemessen wurde. Die Verabreichung von Memantin (7,5 mg/kg) erfolgte 30 Minuten vor dem Test auf konditionierten Entzug intraperitoneal. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Stresshormonkonzentration

Abbildung 40 und 41 geben die Konzentrationen von ACTH und Corticosteron wieder. Die statistische Berechnung der ACTH-Werte über alle Gruppen ergab hohe signifikante Unterschiede (Faktor Gruppe $F[2,12]=31,4$, $p<0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[3,147]=187$, $p<0,0001$; Interaktion $F[15,147]=11,8$, $p<0,0001$) Die weitergehende statistische Bewertung erfolgte auf Einzelvergleichen der korrespondierenden Gruppen mit und ohne vorherige Behandlung mit Memantin. Für den Paarvergleich zwischen *paired/paired-memantine* konnte kein Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen ermittelt werden (Faktor Gruppe $F[1,21]=1,30$, $p=0,27$; Faktor wiederholte Messung $F[3,60]=60,8$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,60]=1,30$, $p=0,28$). Die Gruppen *real withdrawal/real withdrawal-memantine* unterscheiden sich hingegen in beiden Faktoren voneinander (Faktor Gruppe $F[1,15]=23,02$, $p=0,0003$; Faktor wiederholte Messung $F[3,42]=77,9$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,42]=7,72$, $p=0,0003$).

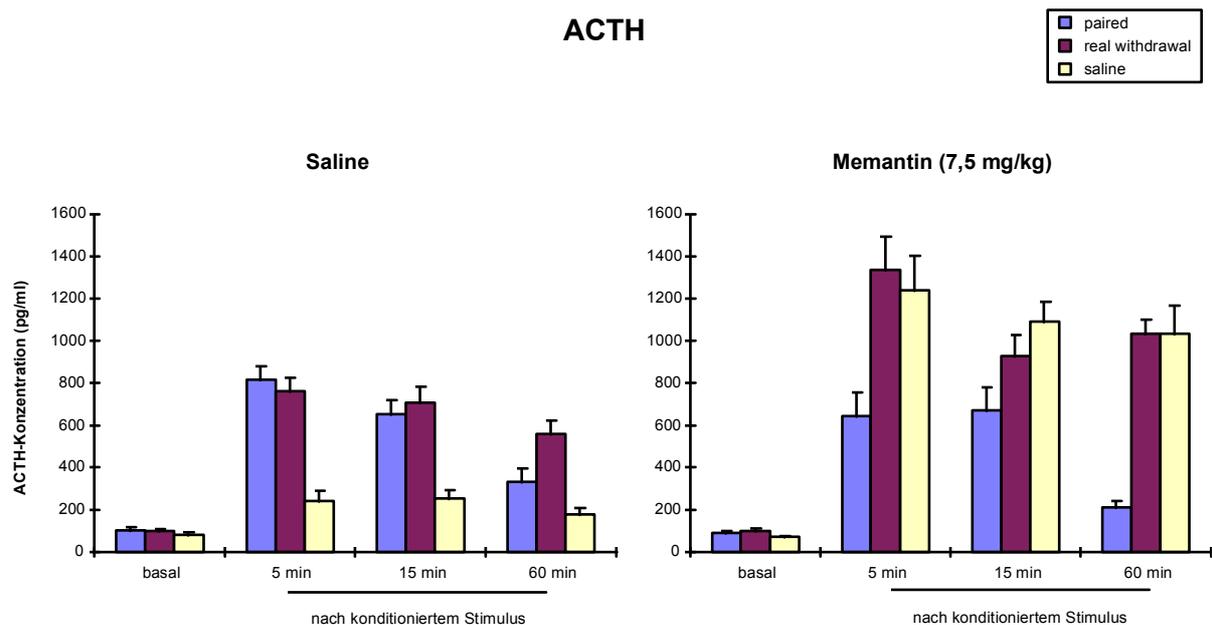


Abb. 40: ACTH-Konzentrationen im Vergleich nach Verabreichung von Saline oder Memantin (7,5 mg/kg) in konditionierten Versuchstieren ($n=8$) und entsprechenden Kontrollen ($n=8$). Die Versuchsdurchführung und Blutabnahme entsprechen der aus Abb. 21. Die Verabreichung von Memantin erfolgte 30 Minuten vor dem Test auf konditionierten Entzug über den gelegten Jugularvenenkatheter. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Die Verabreichung von Memantin in Salinekontrollen hat einen Anstieg von ACTH zu Folge. Dies wird durch die Statistik untermauert (Faktor Gruppe $F[1,16]=107$, $p<0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[3,45]=74,1$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,45]=42,2$, $p<0,0001$).

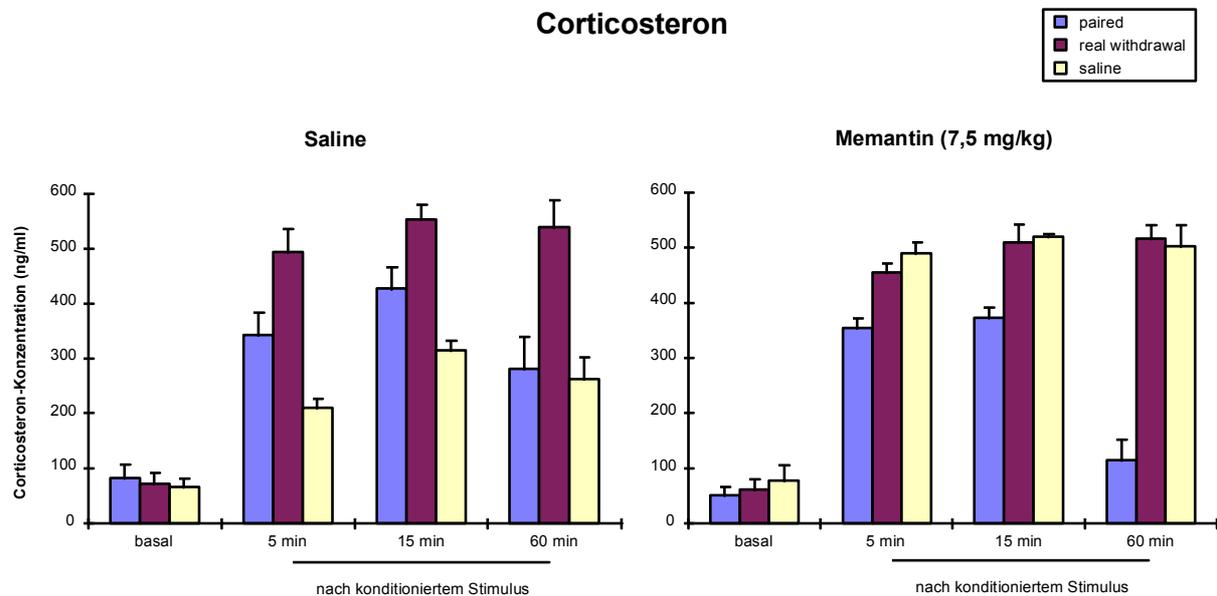


Abb. 41: Corticosteron-Konzentrationen im Vergleich nach Verabreichung von Saline oder Memantin (7,5 mg/kg) in konditionierten Versuchstieren (n=8) und entsprechenden Kontrollen(n=8). Die Versuchsdurchführung und Blutabnahme entsprechen der aus Abb. 21. Die Verabreichung von Memantin erfolgte 30 Minuten vor dem Test auf konditionierten Entzug über den gelegten Jugularvenenkatheter. Werte sind als Gruppenmittelwert \pm SEM angegeben.

Die Überprüfung auf statistische Unterschiede zwischen allen Gruppen konnte hohe Signifikanzen errechnen (Faktor Gruppe $F[5,53]=18,4$, $p<0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[3,144]=227$, $p<0,0001$; Interaktion $F[15,144]=7,94$, $p<0,0001$). Die Daten der statistischen Auswertung der Paarvergleiche werden im Folgenden angegeben: *paired/paired-memantine*: Faktor Gruppe $F[1,2]=3,24$, $p=0,0877$; Faktor wiederholte Messung $F[3,57]=56,6$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,57]=3,58$, $p=0,019$; *real withdrawal/real withdrawal-memantine*: Faktor Gruppe $F[1,15]=1,13$, $p=0,30$; Faktor wiederholte Messung $F[3,42]=181$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,42]=0,20$, $p=0,89$; *saline/saline-memantine*: Faktor Gruppe $F[1,16]=60,9$, $p<0,0001$; Faktor wiederholte Messung $F[3,45]=62,9$, $p<0,0001$; Interaktion $F[3,45]=8,88$, $p<0,0001$. Unter basalen Bedingungen konnte in keinem der Vergleichspaare ein statistischer Unterschied gefunden werden.

Unter Berücksichtigung aller vorliegenden Daten kann festgehalten werden, dass auf keinem der untersuchten Verhaltensparameter ein Einfluss von Memantin gemessen werden konnte. Die Untersuchung der Stresshormonkonzentrationen in diesen Tieren deutet aber auf einen zu diskutierenden Effekt durch Memantin hin. Vor allem in drogennaiven Salinekontrollen konnte ein überaus deutlicher Effekt von Memantin auf die Stresshormonsekretion gefunden werden.

4.4. Diskussion konditionierter Entzug

Die vorliegende Studie beschäftigte sich mit mehreren Fragestellungen. Zum Ersten sollte der Frage nachgegangen werden, inwieweit sich Opiatentzugserscheinungen klassisch konditionieren lassen. Hintergrund war der augenscheinlich eklatante Mangel an Publikationen, in denen konditionierte Entzugserscheinungen direkt beobachtet werden. Ziel war es, ein Tiermodell zu entwickeln und begleitend weitere Untersuchungen durchzuführen, die eine weiterführende Charakterisierung des Zustandes konditionierter Opiatentzug zulassen (1. Teil). Der nächste Untersuchungsgegenstand war die Identifizierung der Gehirnregionen, die in einem konditionierten Entzugserleben involviert sind. Als Methode diente der Nachweis von c-fos-mRNA mittels *in situ* Hybridisierung (2. Teil). An Hand der Ergebnisse aus dem ersten Teil der Studie wurde zuletzt untersucht, ob der NMDA-Rezeptorantagonist Memantin geeignet ist, konditionierte Entzugssymptome zu unterdrücken oder abzuschwächen (3. Teil). Die Ergebnisse der Teilprojekte werden im Folgenden einzeln diskutiert.

1. Teil

Hauptintention dieses ersten Teils war die Untersuchung der Fragestellung, welche Entzugssymptome in der Ratte klassisch konditioniert werden können und in welcher Intensität diese auf den konditionierten Stimulus ausgelöst werden. Die Ergebnisse des Beobachtungsexperimentes (Abb. 21, Abb. 22) und der Gewichtsmessung (Abb. 23) lassen eine deutliche Konditionierung einzelner Entzugsparameter erkennen, allerdings konnten weitere wichtige Entzugssymptome, wie sie als bedeutungstragend von Bläsig et al. (1973) beschrieben worden sind, nicht konditioniert werden (*wet dog shakes, writhing, stretching*). Da zu diesem Experiment keine publizierten Studien vorliegen, können diese Ergebnisse nur an Hand der Vorexperimente diskutiert werden. Das gesamte Konditionierungsprozedere stand zwischen dem Zielkonflikt von hoher Opiatabhängigkeit, dem daraus resultierenden starken Entzug und der durch Naloxon ausgelösten Entzugsintensität und Entzugsdauer. Durch zahlreiche Vorversuche konnte die Erkenntnis gewonnen werden, dass sich die durch Naloxon-provozierten Entzugserscheinungen möglichst auf den Zeitraum beschränken sollten, in dem die Versuchstiere auch den zu konditionierenden Stimulus (Anisgeruch) erlebten. Versuche mit hohen Naloxondosierungen hatten zur Folge, dass die Tiere über längere Zeit Entzugserscheinungen im *home cage* erlebten. Dies wirkte sich nachteilig auf die

konditionierte Antwort am Tag auf konditionierten Entzug aus. Konditionierungszeiten länger als 45 Minuten hatten keine Konditionierung zur Folge, so dass die Naloxondosierung so gewählt werden musste, dass die Tiere Entzugserscheinungen möglichst nur in den Konditionierungsboxen (für max. 30 Minuten) hatten. Diesen Zielkonflikt mit einer niedrigeren Morphindosis zu umgehen, war insofern erfolglos, da die Tiere während der Konditionierungsphase keinen ausreichend starken Entzug hatten. Auf die Möglichkeit, den Entzug durch die Verabreichung einer zusätzlichen Morphininjektion im Heimkäfig zu unterbinden, wurde bewusst verzichtet, um nicht eine weitere bedeutungstragende Injektion einzuführen. Diese Injektion, als positiver Verstärker, könnte mit der Verabreichung der Entzugsprovokationsinjektion interagieren. Die Zeitpunkte der Morphinpelletimplantation und der anschließend stringente Ablauf der Konditionierungsprozedur wurden bewusst gewählt, um sicherzustellen, dass keine spontanen Entzugserscheinungen auftraten. Die Konditionierungsprozedur erfolgte somit zu einem Zeitpunkt, als sich der Morphinplasmaspiegel noch im Anfluten befand. Dass dies auf die Entzugssymptomatik während der Konditionierungsphase deutlich negativen Einfluss hatte, konnte gezeigt werden. Vor allem die Entzugssymptome *wet dog shakes* und *jumping*, am ersten Konditionierungstag deutlich hervortretend, konnten gegen Ende der viertägigen Konditionierungsprozedur nur noch minimal erfasst werden. Ob eine Verkürzung der Konditionierungsdauer, ein anderer Zeitablauf in der Konditionierungsphase oder ein moderates Absenken des Morphinplasmaspiegels die Verhaltensantworten am Testtag auf konditionierten Entzug verstärken, muss einer weiteren Versuchsreihe vorbehalten bleiben.

Auf Basis der durchgeführten Konditionierungsprozedur konnte in weiteren Verhaltenstests (*hot plate, open field*) eine deutliche Differenzierung der *paired group* festgestellt werden, die auch einer statistischen Überprüfung der Daten standhielt. Die Experimente im *open field* dokumentieren eine deutliche Verminderung der lokomotorischen Aktivität der konditionierten Versuchstiere, die auch in den Beobachtungsboxen verzeichnet werden konnte. Die lokomotorische Aktivität der konditionierten Tiere lag auf dem Niveau der Tiere, die realen Entzug durchlebten. Reduzierte Lokomotion während spontanem oder auch Naloxon-provoziertem Entzug hat sich über die Jahre hinweg als Entzugsparameter bestätigt (Brady and Holtzman, 1981; van der Laan und de Groot, 1988; van der Laan et al., 1991). So liegt auch hier die Interpretation nahe, dass der konditionierte Stimulus ausreichend war, in diesen Tieren einen entzugsähnlichen Zustand zu erzeugen.

Die auf der *hot plate* erhobenen Daten lassen einen eindeutigen, entzugsrelevanten Effekt der Konditionierungsprozedur erkennen. Der Vergleich zwischen den salinebehandelten Tieren

und Tieren der Gruppe *unpaired* lässt auf eine ausgeprägte Toleranz gegenüber der analgetischen Wirkung von Morphin schließen. Die in den Tieren der Gruppen *paired* und *real withdrawal* gemessene Hypoalgesie kann somit auf endogene Opiate und nicht auf die Morphinwirkung der implantierten Pellets zurückgeführt werden. Die Messung auf der *hot plate* erfolgte zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Exposition des konditionierten Stimulus (5 Minuten). Die *hot plate*-Daten müssen deshalb im engen Zusammenhang mit den ACTH-Werten betrachtet werden: die adenohipophysäre Sekretion von ACTH hat auf Grund des gemeinsamen Vorläufermoleküls Proopiomelanocortin (Akil et al., 1998) auch eine Sekretion von β -Endorphin zur Folge (Guillemin et al., 1977; Höllt et al., 1982; Mousa et al., 1983). Opiatentzug geht mit einer deutlichen Aktivierung der HPA-Achse einher (Martinez et al., 1990; Gonzalves et al., 1994; Vargas et al., 1997), vermutlich durch eine Überexpression von *corticotropin releasing hormon* (CRH) (Milanes et al., 1998). Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass das Einsetzen sowohl der realen wie auch der konditionierten Entzugssymptomatik (zu diesem sehr frühen Zeitpunkt) neben ACTH auch eine Ausschüttung von β -Endorphin zur Folge hat. Die gemessene Analgesie ist somit stressinduziert. Die Ergebnisse auf der *hot plate* durchgeführten Versuche stehen nach den ausgeführten Erklärungen nicht im Widerspruch mit publizierten Daten, wonach Versuchstiere im Opiatentzug auf Schmerzreize hyperalgetisch reagieren (Kayan et al., 1971; Kaplan et al., 1991). Messungen auf der *hot plate*, 30 Minuten nach Naloxon-provoziertem Entzug (nicht im Ergebnisteil dargestellt), tendierten zu der in der Literatur beschriebenen Hyperalgesie unter Opiatentzug, so dass sich hier keine Unvereinbarkeit ergibt.

Die ACTH-Werte in Tieren der Gruppe *paired* lagen während der gesamten Messdauer auf dem Niveau der Tiere, die realen Opiatentzug erlebten; darüber hinaus unterschieden sie sich zu jedem Messpunkt signifikant zu Tieren der *unpaired group*. Der konditionierte Stimulus allein war ausreichend um in (auf Opiatentzug) konditionierten Tieren ein Stressereignis mit Entzugscharakter auszulösen. Die durch ACTH induzierten Corticosteronwerte konnten hingegen keine Differenzierung der Vergleichsgruppen *paired* und *unpaired* erbringen, allerdings lagen die Corticosteronwerte in Tieren der Gruppe *real withdrawal* deutlich über allen anderen Vergleichsgruppen. Die Umsetzungsrelation von ACTH und Corticosteron an der Nebennierenrinde erfolgt nicht 1:1, da hier auch noch andere Parameter Einfluss auf die Corticosteronsekretion nehmen können, zum Beispiel die Innervation durch das autonome Nervensystem. Die Messung der Noradrenalkonzentration, als Repräsentant der sympathischen Innervation des Nebennierenmarks, kann dies untermauern. In konditionierten Tieren führt der Stimulus in den ersten Minuten zu einem Anstieg der

Noradrenalin-Konzentration, die sich nicht von Konzentrationen unterscheidet, wie sie bei Tieren gemessen werden können, die realen Entzug durchleben. Die Konzentrationen von Salinekontrollen und Tieren der Gruppe *unpaired* unterscheiden sich hingegen nicht von basalen Werten, so dass hier eindrucksvoll deutlich wird, dass allein der konditionierte Stimulus für einen Anstieg der Noradrenalin-Konzentration verantwortlich ist. Konditionierte Versuchstiere zeigten somit neben der Aktivierung der HPA-Achse auch eine gesteigerte Aktivität des sympathischen Nervensystems.

Der Vergleich mit einem konditionierten, klassischen Stressparadigma kann auf Grund der hierzu vorliegenden Daten nicht gezogen werden, da eine Konditionierung des gewählten Stressors (*air puff*) nicht gelang. Dieser Umstand zeigt umso deutlicher, dass eine augenscheinlich einfache Konditionierungsprozedur sich als nicht trivial erweist. Vor diesem Hintergrund sollten die wenigen, beobachteten konditionierten Entzugssymptome betrachtet werden. Der gewählte Stressor *air puff* war zu schwach, um in den Tieren deutlich konditionierte Verhaltensveränderungen auszulösen, die durch ein Beobachtungsexperiment hätten erfasst werden können. Möglicherweise hätte sich ein weißes Rauschen als geeigneter Stressor erwiesen. Der Vergleich der hier erhobenen Daten mit Daten aus einem klassischen Stressparadigma hätte allerdings helfen können, die Gewichtung einzelner Verhaltensparameter als entzugsbedingt zu charakterisieren. Zielsetzung war nicht, unterschiedliche Stressoren auf ihre Konditionierungsfähigkeit zu untersuchen, sondern einzuschätzen, inwiefern die Bandbreite aufgezeichneter Entzugssymptome sich von der konditionierten Stresssymptome unterscheidet. Dabei darf nicht außer Acht gelassen werden, dass es sich bei Entzugserfahrung auch um ein Stressereignis handelt.

Auch wenn wichtige Entzugssymptome als Einzelsymptome nicht beobachtet werden konnten, eine Konditionierung derselben somit fraglich erscheint, kann dennoch unter Bezugnahme aller vorliegenden Daten davon ausgegangen werden, dass konditionierte Versuchstiere deutlich entzugsassoziierte Veränderungen sowohl ihres Verhaltensrepertoires als auch ihrer endokrinen Funktionen aufwiesen.

2. Teil

Untersuchungsgegenstand des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung der Gehirnregionen, die in einem konditionierten Entzugserleben involviert sind. Als Methode diente der Nachweis von c-fos-mRNA mittels *in situ* Hybridisierung. Die untersuchten Gehirnregionen waren der Locus coeruleus, der Nucleus accumbens, der zentrale Kern der Amygdala und der Hippocampus. Hayward et al. (1990) konnte in einer umfangreichen

Studie c-fos-mRNA-Levels im Opiatentzug in einer Vielzahl von Gehirngebieten bestimmen. Die Quantifizierung erfolgte mittels *northern blotting*, einer Untersuchungsmethode, die sensitiver als die hier in diese Arbeit durchgeführte *in situ* Hybridisierung erscheint. In dieser Studie konnte im Hippocampus keine Veränderung detektiert werden, im Locus coeruleus, Nucleus accumbens und Amygdala hingegen eine deutliche Steigerung der c-fos-mRNA-Menge. Die hier vorliegenden Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung decken sich bezüglich des Hippocampus und Locus coeruleus mit den Experimenten von Hayward et al.; im Nucleus accumbens und im zentralen Kern der Amygdala konnte das Ergebnis nicht verifiziert werden. Die Auswertung der Autoradiographie entsprach anerkanntem wissenschaftlichem Standard (Miller JA, 1991). Dennoch erscheint eine weiterentwickelte Variante der *in situ* Hybridisierung hier angezeigt, die eine Auflösung auf zellulärer Ebene erlaubt: durch Beschichtung der hybridisierten Objektträger mit flüssiger Fotoemulsion (*dipping*) können nach Entwicklung und Gegenfärbung Silberkornaggregationen auf zellulärer Ebene ausgewertet werden. Im Locus coeruleus konnte dennoch mit der konventionell durchgeführten und ausgewerteten *in situ* Hybridisierung ein deutlicher Anstieg von c-fos-mRNA in real entzogenen und *paired* Tieren gemessen werden. Der Locus coeruleus hat sich über die Jahre hinweg als der zentrale entzugsauslösende Kern im Gehirn etabliert, diese Erkenntnis ist durch ein Vielzahl an Studien hinreichend gesichert (Aghajanian, 1978; Nestler et al., 1988a, 1992; Maldonado et al., 1992b). Die Aktivität noradrenerger Neurone des Locus coeruleus ist in hohem Maße auch von unterschiedlichen Stressstimuli gesteuert. So konnte in Experimenten mit *foot shock* oder konditionierten Stimuli eine erhöhte Aktivität des Locus coeruleus nachgewiesen werden, so wie auch ein erhöhter Noradrenalinumsatz in den Gehirngebieten, die von Locus coeruleus innerviert werden (Cassens et al., 1980; Lehnert et al., 1984, 1998). Darüber hinaus konnte eine Aktivierung von Locus coeruleus Neuronen durch CRH in stressbedingten Situationen nachgewiesen werden (Lehnert et al., 1998). Die erhöhte Aktivität des Locus coeruleus in Tieren der Gruppe *paired* deutet somit auf ein durch den konditionierten Stimulus allein ausgelöstes Stressereignis hin. Inwieweit auch Gehirnregionen davon betroffen sind, die in einer aversiven Beurteilung dieses „Entzugsgeschehens“ involviert sind, muss einer weiteren Studie vorbehalten bleiben, in der auf zellulärer Ebene ein Nachweis von c-fos-mRNA erfolgt. In einer Studie von Schulteis et al. (2000) konnte der basolaterale Teil der Amygdala als essentiell für die Ausprägung eines konditionierten Entzugssymptoms erkannt werden. Dieser Teil des Mandelkerns hat intensive Verbindungen zu einer Struktur, die als *extended amygdala* bezeichnet wird. Diese wird aus dem Nucleus accumbens, dem *bed nucleus of the stria terminalis* und dem zentralen Kern der

Amygdala gebildet. Der *extended amygdala* wird die positive oder negative Attribuierung von Drogenwirkungen zugeschrieben (Schulteis und Koob, 1996; Koob et al., 1989b; Whitelaw et al., 1996). In der vorliegenden Studie konnte auf Grund unzureichender Auflösung der Autoradiographiefilme der *bed nucleus of the stria terminalis* nicht ausgewertet werden. Auch hier erscheint in einer weiteren Versuchsreihe eine Beschichtung der hybridisierten Objektträger mit Fotoemulsion angezeigt, so dass eine Auswertung unter dem Mikroskop auf zellulärer Ebene erfolgen kann.

3. Teil

In diesem Teil der Studie sollte untersucht werden inwieweit der NMDA-Rezeptorantagonist Memantin geeignet ist, konditionierte Entzugssymptome zu unterdrücken oder abzuschwächen. Auf Grund der unzureichenden Konditionierung von wichtigen visuell erfassbaren Entzugssymptomen wurde der Einfluss von Memantin auf die Lokomotion nach Exposition des konditionierten Stimulus, das Schmerzempfinden auf der *hot plate* und die Streßhormonkonzentration gemessen. Eine Vielzahl an Studien beschäftigen sich mit den Zusammenhängen von NMDA-Rezeptoren und den Phänomenen, die im Umfeld von Drogenmissbrauch auftreten. So konnte bisher ein Einfluss von NMDA-Antagonisten auf die durch Alkohol hervorgerufene Lokomotion gemessen werden (Khanna et al., 1993), auf die Toleranzentwicklung verschiedener Barbiturate (Khanna et al., 1998) und auf verschiedene Opiatwirkungen (Elliott et al., 1994; Trujillo und Akil, 1991). Insbesondere die Reduktion von physischen als auch emotionalen Aspekten der Ausprägung von Morphinabhängigkeit und Entzug durch NMDA-Antagonisten konnte von einer Reihe von Studien nachgewiesen werden (Cappendijk et al., 1993; Higgins et al., 1992; Popik und Skolnick, 1996; Trujillo und Akil, 1991). In einer umfangreichen Studie konnten Popik und Danysz (1996) zeigen, dass Memantin aversiv konditionierte Opiatentzugerscheinungen (gemessen in einem Platzkonditionierungsparadigma) positiv zu beeinflussen vermag. Die Dosierung von Memantin in der vorliegenden Arbeit (7,5 mg/kg i.p.) orientiert sich an dieser Arbeit von Popik und Danysz.

Ein Einfluss von Memantin konnte weder in der lokomotorischen Aktivität konditionierter Versuchstiere noch in der Schmerzempfindlichkeit auf der *hot plate* nachgewiesen werden. Der Vergleich mit den Stresshormonmessungen in Bezug auf die Daten, gemessen auf der *hot plate*, erscheint auf den ersten Blick widersprüchlich. Die ACTH- und Corticosteronkonzentrationen waren nach der Verabreichung vom Memantin außerordentlich hoch, so dass auch hier eine stressinduzierte Analgesie vermutet werden könnte, die sich allerdings in den

hot plate-Daten nicht widerspiegelt. Grund hierfür liegt in einer Unzulänglichkeit des Versuchsprotokolls Die Verabreichung der gewählten Dosis von Memantin (7,5 mg/kg) über den Jugularvenenkatheter (bei der Messung der Stresshormonkonzentrationen) hat den Charakter einer Bolusinjektion. Darüber hinaus hätte hier eine Dosisanpassung (Reduzierung) erfolgen müssen, da diese Verabreichungsform nicht dem hepatischen Metabolismus unterworfen ist. Die überschießenden Stresshormonkonzentrationen auf die massive Memantindosis können folglich nur als Stressor *per se* interpretiert werden, da kein pharmakodynamischer Hintergrund von Memantin auf derartige Hormonsekretionen gegeben ist.

Zusammenfassung

Unter Bezugnahme aller vorliegenden Daten zum konditionierten Entzug kann festgehalten werden, dass nur teilweise wichtige Entzugssymptome konditioniert werden konnten. Dieses Resultat allein rechtfertigt die Vermutung, dass eine Konditionierung von Entzugssymptomen nur teilweise möglich ist. Das Hinzuziehen aller weiterer untersuchter Parameter deutet aber dennoch auf ein deutliches Stressereignis, das unter den gegebenen Umständen durchaus als entzugsrelevant bezeichnet werden kann. Opiatentzug stellt für den Organismus ein bedeutendes Stressereignis dar. Aus diesem Blickwinkel kann das vorgestellte Tiermodell zum konditionierten Entzugs als erfolgreich bezeichnet werden.

5. Schlussbetrachtung

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit verschiedenartigen Aspekten zum Thema Opiatentzug. Dabei wurde die Funktionalität μ -Opioidrezeptor-gekoppelter G-Proteine in der intrazellulären Signaltransduktionskaskade im Entzug und unter chronischer Opiatverabreichung untersucht. Als Ergebnis dieser Studie, die mittels einer *in situ* [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie durchgeführt wurde, konnte die Erkenntnis bestätigt werden, nach der eine Adaption auf extern zugeführte Opioide nicht auf einer Veränderung von Rezeptoren oder deren Interaktion mit G-Proteinen beruht (Kapitel 2). Vielmehr scheinen intrazelluläre, durch Genexpression gesteuerte Mechanismen für eine erfolgreiche Adaption an veränderte Umweltbedingungen ausschlaggebend zu sein. Hierbei spielt eine veränderte Transkription von CREB und somit in Folge eine erhöhte Transkription der Adenylatcyclase eine tragende Rolle. Eine weitere Studie beschäftigte sich mit einem neuartigen Konzept zur Verstärkung von opioidagonistischen Wirkungen durch die Zugabe von Opioidantagonisten in geringer Dosierung (*low dose* Naloxon-Konzept, Kapitel 3). Hier konnte in verhaltensbiologischen Untersuchungen kein Effekt nachgewiesen werden. Insbesondere konnte nicht nachgewiesen werden, dass die Koverabreichung von *low dose* Naloxon während der Abhängigkeitsentwicklung Entzugserscheinungen moduliert. Beide Studien beschäftigen sich direkt und indirekt mit der in der Wissenschaft intensiv diskutierten Frage der Existenz von G_s -Protein-gekoppelten Opioidrezeptoren, die neben den bereits bekannten $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelten Opioidrezeptoren in der Zellmembran lokalisiert sind. Ein autoradiographischer Nachweis hierzu steht bislang aus. Abhilfe könnte eine weiterentwickelte [S^{35}]-GTP γ S-Autoradiographie schaffen, in der durch selektive Blockade der $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelten Opioidrezeptoren durch Pertussistoxin ein Nachweis G_s -Protein-gekoppelter Opioidrezeptoren *in situ* möglich sein müsste. Ein direkter Nachweis dieser Kopplung eröffnet völlig neuartige Perspektiven in der modernen Opioidpharmakologie, da durch selektive Liganden dieser G_s -Protein-gekoppelten Rezeptoren die Opiatwirkung in der klinischen Anwendung verstärkt werden könnte. Möglicherweise findet dieses Wirkprinzip bereits unbeabsichtigt seit Jahren Anwendung: der Opiatagonist Tilidin (Valoron N[®]) kommt bei der Behandlung mittelschwerer bis schwerer Schmerzen zum Einsatz. Als Besonderheit ist diesem Präparat der Opiatantagonist Naloxon im Verhältnis 1:12,5 (Einzeldosis: 4 mg Naloxon/50 mg Tilidin) beigemischt, um eine missbräuchliche Anwendung zu unterbinden. Bei normaler therapeutischer Dosierung unterliegt der Naloxonanteil einem intensiven

hepatischen Abbau, so dass Tilidin voll wirksam ist. Bei missbräuchlicher Einnahme hoher Dosen durch Opiatabhängige wird der Naloxonanteil nicht vollständig metabolisiert; Entzugssymptome werden provoziert oder bereits bestehende werden verstärkt. Tilidin selbst wird in der Leber zu Nortilidin und Binortilidin metabolisiert, wobei Nortilidin als der eigentliche Opiatagonist am Rezeptor angesehen wird (Schulz et al. 1978). Möglicherweise passieren aber geringste Spuren von Naloxon bei normalem therapeutischen Einsatz die Leber und könnten folglich im *low dose* -Bereich wirksam werden. Über die Wirkungsweise *low dose* Naloxon-vermittelter Verstärkung der analgetischen Wirkung von Opiaten können nur rein hypothetische Ansätze formuliert werden. Neben den bereits diskutierten G_s-Protein gekoppelten Opioidrezeptoren könnte auch ein Einfluss auf die Internalisierung von Opioidrezeptoren möglich sein. Hier steht, neben dem dringend nötigen Nachweis G_s-Protein gekoppelter Opioidrezeptoren, ein völlig neuartiges Forschungsgebiet der Opioidpharmakologie offen.

Im letzten Teil der vorliegenden Arbeit konnte erstmals das Phänomen konditionierter Opiatentzug näher charakterisiert werden (Kapitel 4). Auch wenn es nicht gelang, aus der Vielzahl an Entzugsserscheinungen die wichtigsten Kardinalsymptome zu konditionieren, so besteht dennoch kein Zweifel, dass Entzugssymptome ausreichend konditioniert werden können und dass diese konditionierten Symptome mit einer Aktivierung von Stressmechanismen verbunden sind. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass mit der Präsentation des konditionierten Stimulus eine massive neuronale Aktivität im Locus coeruleus ausgelöst wird. Dieses Kerngebiet ist seit Jahren ohne Zweifel für die Ausbildung der meisten körperlichen Entzugssymptome während eines Opiatentzugs verantwortlich (Aghajanian, 1978; Maldonado et al., 1992b). Gerade in den letzten Jahren kommt dem konditionierten Entzug die Aufmerksamkeit zu, die ihm möglicherweise in seiner Bedeutung im Rückfallverhalten zusteht. Neueste Studien (Schulteis et al., 2000) zeigen deutlich, dass konditionierte Entzugsserscheinungen mit dem Kerngebiet assoziiert werden, die für die hedonistische Beurteilung eines Ereignisses ausschlaggebend sind. Obwohl in frühen Studien durch Befragung von Abhängigen kein Einfluss konditionierter Entzugsserscheinungen auf Rückfallverhalten nachgewiesen werden konnte (McAuliffe, 1982), stellt sich berechtigterweise die Frage, ob von Drogensüchtigen bzw. entzogenen Patienten der Reflexbogen, der zum Rückfall führte, überhaupt als solcher erkannt und benannt werden kann. Gerade das stereotype Ablaufen suchtrevanter Konditionierungs- und Sensibilisierungsmechanismen entzieht sich oftmals dem Bewusstsein des Suchtkranken (Zieglängsberger und Spanagel, 1999). In frühen tierexperimentellen Studien waren

Versuchstiere nicht in der Lage, die im konditionierten Entzug auftretenden Entzugserscheinungen durch Trinken von opioidagonistischer Lösung zu lindern (Stewart et al., 1984). Dabei stellt gerade die orale Verabreichung von z.B. Morphin auf Grund der schlechten Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt eine schlechte Art der Verabreichung von Opiaten dar (Gellert und Holtzman, 1978). In einem konditionierten Entzugsgeschehen kommt daher der schnellen intravenösen Verabreichung von Opiaten tragende Bedeutung zu. Opiatsucht stellt sich als komplexes Krankheitsbild dar, zumal die Patienten nicht nur von einem Opiat abhängig sind, sondern meist Polytoxikomanen sind. Dennoch erscheint gerade der konditionierte Entzug als ein wichtiges Element im Rückfallverhalten, möglicherweise eben nur im Zusammenspiel anderer suchtrelevanter Parameter. Aufschluss inwieweit hier konditionierte Entzugserscheinungen eine tragende Rolle spielen, könnte ein Tierexperiment darstellen, in dem auf Entzug konditionierte Versuchstiere gelernt haben, sich über eine intracerebroventriculare Injektion Morphin zuzuführen. Nur ein schneller, unmittelbarer Wirkungseintritt von Morphin greift in den Reflexbogen ein, der von den meisten Patienten im Rückfall nicht kognitiv wahrgenommen wird.

Kein anderer Stoff begleitet die Menschheit so lange wie der Saft der Kapseln des Schlafmohns und bei keinem anderen Stoff liegen Wohl und Wehe so eng beisammen. Opium und seine in der modernen Medizin angewandten Derivate stellen nach wie vor die potentesten Schmerzmittel dar. Bis heute gibt es keine vergleichbaren Analgetika. Die erstaunliche Kongruenz zwischen speziellen Rezeptoren im Gehirn und einem sekundären Pflanzenalkaloid bringt die moderne Opioidpharmakologie immer wieder in den Konflikt zwischen maximaler Schmerzlinderung und den fatalen Folgen dieser Therapie, die in Toleranz, Abhängigkeit und Entzug münden kann. Dennoch bemühten sich seit Menschengedenken Ärzte und Wissenschaftler um die Vorteile dieses Prinzips und so sollte es eines Tages gelingen, die schmerzlindernde Komponente der Opiate von den negativen Auswirkungen abzukoppeln.

Eine göttliche Aufgabe ist es, den Schmerz zu lindern.

Hippokrates

6. Literaturverzeichnis

Aghajanian GK (1978). Tolerance of locus coeruleus neurons to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine. *Nature* 276: 186-187.

Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S (1998). Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alc Depend* 51: 127-140.

Allen CN, Jiang ZG, Teshima K, Darland T, Ikeda M, Nelson CS, Quigley DI, Yoshioka T, Allen RG, Rea MA, Grandy DK (1999). Orphanin-FQ/nociceptin (OFQ/N) modulates the activity of suprachiasmatic nucleus neurons. *J Neurosci* 19: 2152-2160.

Baldwin H, Koob G (1993). Rapid induction of conditioned opiate withdrawal in the rat. *Neuropsychopharmacol* 8: 15-21.

Barrett RW, Vaught JL (1982). The effects of receptor selective opioid peptides on morphine-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 80: 427-430.

Befort K, Mattei MG, Roeckel N, Kieffer B (1994). Chromosomal localization of the delta opioid receptor gene to human 1p34.3-p36.1 and mouse 4D bands by in situ hybridization. *Genomics* 20: 143-145.

Berkowitz BA, Cerreta KV, Spector S (1974). The influence of physiologic and pharmacologic factors on the disposition of morphine as determined by radioimmunoassay. *J Pharmacol Exp Ther* 191: 527-534

Bhargava H (1977). Rapid induction and quantitation of morphine dependence in the rat by pellet implantation. *Psychopharmacol* 52: 55-62.

Bläsing J, Herz A, Reinhold K, Zieglgänsberger S (1973). Development of physical dependence on morphine in respect to time and dosage and quantification of the precipitated withdrawal syndrome in rats. *Psychopharmacologia* 33: 19-38.

Bloom FE, Rossier J, Battenberg E (1978). Beta-endorphin: cellular localization, electrophysiological and behavioral effects. *Adv Biochem Psychopharmacol: The endorphins* 18: 89-109.

Brady LS, Holtzman SG (1981). Locomotor activity in morphine-dependent and post-dependent rats. *Pharmacol Biochem Behav* 14: 361-370.

Brady LS, Herkenham M, Long JB, Rothman RB (1989). Chronic morphine increases μ -opiate receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 477: 382-386.

Brase DA (1986). Unequal opiate cross-tolerance to morphine in the locomotor-activation model in the mouse. *Neuropharmacol* 25: 297-304.

- Brewer C, Rezae H, Bailey C (1988). Opioid withdrawal and naltrexone induction in 48-72 hours with minimal drop-out, using a modification of the naltrexone-clonidine technique. *Br J Psych* 135: 340-343.
- Browne RG, Segal DS, (1980). Behavioral activating effects of opiates and opioid peptides. *Biol Psych* 15: 77-86.
- Buchsbaum MS, Davis GC, Bunney WE Jr (1977). Naloxone alters pain perception and somatosensory evoked potentials in normal subjects. *Nature* 270: 620-622.
- Bunzow JR, Saez C, Mortrud M, Bouvier C, Williams JT, Low M, Grandy DK (1994). Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type. *FEBS Lett* 347: 284-288.
- Cappendijk SL, de Vries R, Dzoljic MR (1993). Excitatory amino acid receptor antagonists and naloxone-precipitated withdrawal syndrome in morphine-dependent mice. *Eur Neuropsychopharmacol* 3: 111-116.
- Cassens G, Roffman M, Kuruc A, Orsulak PJ, Schildkraut JJ (1980). Alterations in brain norepinephrine metabolism induced by environmental stimuli previously paired with inescapable shock. *Science* 209: 1138-1140.
- Chesher GB, Chan B (1977). Footshock induced analgesia in mice: its reversal by naloxone and cross tolerance with morphine. *Life Sci* 21: 1569-1574.
- Childers SR (1991). Opioid receptor-coupled second messengers. *Life Sci* 48: 1991-2003.
- Childress AR, Hole AV, Ehrman RN, Robbins SJ, McLellan AT, O'Brien CP (1993). Cue reactivity and cue reactivity interventions in drug dependence. *NIDA Res Monograph* 137: 73-95.
- Christie MJ, Williams JT, North RA (1987). Cellular mechanisms of opioid tolerance: studies in single brain neurons. *Mol Pharmacol* 32: 633-638.
- Church WH, Justice JB, Neill DB (1987). Detecting behaviorally relevant changes in extracellular dopamine with microdialysis. *Brain Res* 412: 397-399.
- Cicero TJ, Meyer ER (1973). Morphine pellet implantation in rats: Quantitative assessment of tolerance and dependence. *J Pharmacol Exp Ther* 184: 404-408.
- Clark JA, Liu L, Price M, Hersh B, Edelson M, Pasternak GW (1989). Kappa opiate receptor multiplicity: evidence for two u50488-selective κ_1 subtypes and a novel κ_3 subtype. *J Pharmacol Exper Ther* 251: 461-468.
- Cowan A, Zhu XZ, Mosberg HI, Omnaas JR, Porreca F (1988). Direct dependence studies in rats with agents selective for different types of opioid receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 246: 950-955.
- Crain SM, Shen KF (1996). Modulatory effects of Gs-coupled excitatory opioid receptor functions on opioid analgesia, tolerance, and dependence. *Neurochem Res* 21: 1347-1351.

- Crain SM, Shen KF (2000). Antagonists of excitatory opioid receptor functions enhance morphine's analgesic potency and attenuate opioid tolerance/dependence liability. *Pain* 84: 121-131.
- Cvejic S, Devi LA (1997). Dimerization of the delta opioid receptor: implication for a role in receptor internalization. *J Biol Chem* 272: 26959-26964.
- Dhawan BN, Raghbir R, Hamon M (1998). Opioid receptors. *Iuphar Receptor Compendium*: 218-226.
- Di Chiara G, Imperato A, (1988). Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci* 85: 5274-5278.
- Di Chiara G, North RA (1993). Neurobiology of drug abuse. *Trends Pharmacol Sci* 13: 185-193.
- Dickenson AH, Le Bars D, Besson JM (1981). Endogenous opiates and nociception: a possible functional role in both pain inhibition and detection as revealed by intrathecal naloxone. *Neurosci Letters* 24: 161-164.
- Eckert R (1986). *Tierphysiologie*. Thieme, Stuttgart.
- Edwards DR (1994). Cell signalling and the control of gene transcription. *Trends Pharmacol Sci* 15: 239-244.
- Elliott K, Minami N, Kolesnikov YA, Pasternak GW, Inturrisi CE (1994). The NMDA receptor antagonists, LY274614 and MK-801, and the nitric oxide synthase inhibitor, NG-nitro-L-arginine, attenuate analgesic tolerance to the mu-opioid morphine but not to kappa opioids. *Pain* 56: 69-75.
- El-Sobky A, Dostrovsky JO, Wall PD (1976). Lack of effect of naloxone on pain perception in humans. *Nature* 263: 783-784.
- Erdtmann-Vourliotis M, Mayer P, Riechert U, Grecksch G, Holtt V (1998). Identification of brain regions that are markedly activated by morphine in tolerant but not in naive rats. *Brain Res Mol Brain Res* 61:51-61.
- Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992). Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258: 1952-1955.
- Fallon JH, Moore RY (1978). Catecholamine innervation of basal forebrain. IV. Topography of the dopamine projection to the basal forebrain and striatum. *J Comp Neurol* 180: 545-580.
- Farber PD, Gorman JE, Reid LD (1976). Morphine injections in the taste aversion paradigm. *Physiol Psych* 4: 365-368.
- Frederickson RC, Burgis V, Edwards JD (1977). Hyperalgesia induced by naloxone follows diurnal rhythm in responsivity to painful stimuli. *Science* 198: 756-758.

Gellert VF, Sparber SB (1977). A comparison of the effects of naloxone upon body weight loss and suppression of fixed-ratio operant behavior in morphine-dependent rats. *J Pharmacol Exp Ther* 201: 44-54.

Gellert VF, Holtzman SG (1978). Development and maintenance of morphine tolerance and dependence in the rat by scheduled access to morphine drinking solutions. *J Pharmacol Exper Ther* 205: 536-546.

George SR, Fan T, Xie Z, Tse R, Tam V, Varghese G, O'Dowd BF (2000). Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties. *J Biol Chem* 275: 26128-26135.

Gibson RD, Tingstad JE (1970). Formulation of a morphine implantation pellet suitable for tolerance-physical dependence studies in mice. *J Pharmacol Sci* 59: 426-427.

Gilbert PE, Martin WR (1976). The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the non-dependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exper Ther* 198: 66-82.

Goldberg SR, Schuster CR (1967). Conditioned suppression by a stimulus associated with nalorphine in morphine dependent monkeys. *J Exp Ana. Behav* 10: 235-242.

Gonzales JP, Brodgen RN (1988). Naltrexone. A review of pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy in the management of opioid dependence. *Drugs* 35: 192-213

González ML, Milanés MV, Martínez-Piñero MG, Marín MT, Vargas ML (1994). Effects of intracerebroventricular clonidine on the hypothalamic noradrenaline and plasma corticosterone levels of opiate naïve rats and after naloxone-induced withdrawal. *Brain Res* 647: 199-203.

Grevert P, Goldstein A (1978). Endorphins: naloxone fails to alter experimental pain or mood in humans. *Science* 199: 1093-1095.

Grung M, Skurtveit S, Aasmundstad TA, Handal M, Alkana RL, Morland J (1998). Morphine-6-glucuronide-induced locomotor stimulation in mice: role of opioid receptors. *Pharmacol Toxicol* 82: 3-10.

Guillemin R, Vargo T, Rossier J, Minick S, Ling N, Rivier C, Vale W, Bloom F (1977). beta-Endorphin and adrenocorticotropin are selected concomitantly by the pituitary gland. *Science* 197: 1367-1369.

Guitart X, Nestler EJ (1989). Identification of morphine- and cyclic AMP-regulated phosphoproteins (MARPPs) in the locus coeruleus and other regions of rat brain: regulation by acute and chronic morphine. *J Neurosci* 9: 4371-4387.

Guitart X, Thompson MA, Mirante CK, Greenberg ME, Nestler EJ (1992). Regulation of CERB phosphorylation by acute and chronic morphine administration in the rat locus coeruleus. *J Neurochem* 58: 1168-1171.

- Harrison C, Smart D, Lambert DG (1998). Stimulatory effects of opioids. *Br J Pharmacol* 81: 20-28.
- Harrison L, Kasten AL, Zadina JE (1998). Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins and antiopiates. *Peptides* 19: 1603-1630.
- Hayward MD, Duman RS, Nestler EJ (1990). Induction of the c-fos proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of the rat brain. *Brain Res* 525: 256-266.
- Higgins GA, Nguyen P, Sellers EM (1992). The NMDA antagonist dizocilpine (MK801) attenuates motivational as well as somatic aspects of naloxone precipitated opioid withdrawal. *Life Sci* 50: 167-172.
- Himmelsbach CK (1942). Clinical studies of drug addiction: physical dependence, withdrawal and recovery. *Arch Intern Med* 69: 766-772.
- Hökfelt T, Ljungdahl A, Terenius L, Elde R, Nilsson C (1977). The distribution of enkephalin-immunoreactive cell bodies in the rat central nervous system. *Neurosci Lett* 5: 25-31.
- Höllt V, Dum J, Bläsing J, Schabert P, Herz A (1975). Comparison of in vivo and in vitro parameters of opiate receptor binding in naive and tolerant/dependent rodents. *Life Sci* 16: 1823-1828.
- Höllt V, Haarmann I, Seizinger BR, Herz A (1982). Chronic haloperidol treatment increases the level of in vitro translatable messenger ribonucleic acid coding for the beta-endorphin/adrenocorticotropin precursor proopiomelanocortin in the pars intermedia of the rat pituitary. *Endocrinology* 110: 1885-1891.
- Hölter S, Danysz W, Spanagel R (1996). Evidence for alcohol anti-craving properties of memantine. *Eur J Pharmacol* 314, R1-R2.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579.
- Jaffe JH, Martin WR (1980). Opioid analgetics and antagonists. In: Goodman and Gilman's pharmacological basis of therapeutics (eds. Gilman AG, Goodman LS, Gilman A). Macmillan, New York.
- Ji RR, Zhang Q, Law PY, Low HH, Elde R, Hökfelt T (1995). Expression of μ -, κ -, and δ -opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci* 15: 8156-8166.
- Jones DL, Mogenson GJ (1980). Nucleus accumbens to globus pallidus GABA projection: electrophysiological and iontophoretic investigations. *Brain Res* 188: 93-105.
- Jordan BA, Devi LA (1999). G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 399: 697-700.

- Kalivas PW, Widerlov E, Stanley D, Breese G, Prange AJ (1983). Enkephalin action on the mesolimbic system: a dopamine-dependent and a dopamine-independent increase in locomotor activity. *J Pharmacol Exper Ther* 227: 229-237.
- Kalivas PW, Churchill L, Klitenick MA (1993). GABA and enkephalin projection from the nucleus accumbens and VP to VTA. *Neuroscience* 57: 1047-1060.
- Kandel ER, Schwartz JH (1991). *Principles of neural science* (3th ed.). Connecticut, Appleton and Lange: 1009-1031.
- Kaplan H, Fields HL (1991). Hyperalgesia during acute opioid abstinence: evidence for a nociceptive facilitating function of the rostral ventromedial medulla. *J Neurosci* 11: 1433-1439.
- Kayan S, Woods LA, Mitchell CL, (1971). Morphine-induced hyperalgesia in rats tested on the hot plate. *J Pharmacol Exp. Ther.* 177: 509-513.
- Kayser V, Guilbaud (1981). Dose-dependent analgesic and hyperalgesic effects of systemic naloxone in arthritic rats. *Brain Res* 226: 344-348.
- Kayser V, Benoist JM, Neil A, Gautron M, Guilbaud G (1988a). Behavioural and electrophysiological studies on the paradoxical antinociceptive effects of an extremely low dose of naloxone in an animal model of acute and localized inflammation. *Exp Brain Res* 73: 402-410.
- Kayser V, Besson JM, Guilbaud G (1988b). Paradoxical effects of low doses of naloxone in experimental models of inflammatory pain. *Prog Brain Res* 77: 301-312.
- Kayser V, Guilbaud (1990). Differential effects of various doses of morphine and naloxone on two nociceptive test thresholds in arthritic and normal rats. *Pain* 41: 353-363.
- Khanna JM, Kalant H, Shah G, Chau A (1993). Effect of D-cycloserine on rapid tolerance to ethanol. *Pharmacol Biochem Behav* 45: 983-986.
- Khanna JM, Kalant H, Chau A, Shah G (1998). Effect of NMDA antagonists on development of rapid tolerance to various barbiturates. *Alcohol* 15: 9-18.
- Kieffer B, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth C (1992). The delta opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci* 89: 12048-12052.
- Kleber HD (1985). Naltrexone. *J Subst Abuse Treatment*: 117-122
- Kolb L, Himmelsbach CK (1938). Clinical studies of drug addiction. III. A critical review of the withdrawal treatment with method of evaluating abstinence syndromes. *Am J Psych* 94: 759-799.
- Koob GF, Bloom FE (1988). Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242: 715-723.

Koob C.P, Stinus FL, Le Moal M, Bloom FE (1989a). Opponent process theory of motivation: neurobiological evidence from studies of opiate dependence. *Neurosci Biobehav Rev* 13: 135-140.

Koob GF, Wall TL, Bloom FE (1989b). Nucleus accumbens as a substrate for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. *Psychopharmacol* 98: 530-534.

Kornhuber J, Weller M, Schoppmeyer, K, Riederer P (1994). Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. *J Neural Transm Suppl* 43: 91.

Kovacs KJ, Sawchenko PE (1986). Sequence of stress-induced alternations in indices of synaptic and transcriptional activation in parvocellular neurosecretory neurons. *J Neurosci* 16: 262-273.

Kratzer U, Schmidt WJ (1998). The anti-craving drug acamprosate inhibits the conditioned place aversion induced by naloxone-precipitated morphine withdrawal in rats. *Neurosci Lett* 252: 53-56.

Kreutel M (1987). *Die Opiumsucht*. Knauer, München.

Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinsky J, Aghajanian GK, Nestler EJ (1997). CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological and behavioral evidence for a role in opiate dependence. *J Neurosci* 17: 7890-7901.

Lasagna L (1965). Drug interaction in the field of analgesic drugs. *Proc roy Soc Med* 58: 978-983.

LeBlanc AE, Cappel H (1974). Attenuation of punishing effects of morphine and amphetamine by prior chronic treatment. *J Comp Physiol Psych* 87: 691-698.

Lehnert H, Reinstein DK, Strowbridge BW, Wurtman RJ (1984). Neurochemical and behavioral consequences of acute, uncontrollable stress: effects of dietary tyrosine. *Brain Res* 303: 215-223.

Lehnert H, Schulz C, Dieterich K (1998). Physiological and neurochemical aspects of corticotropin-releasing factor actions in the brain: the role of the locus coeruleus. *Neurochem Res* 23: 1039-1052.

Levine JD, Gordon NC, Jones RT, Fields HL (1978a). The narcotic antagonist naloxone enhances clinical pain. *Nature*. 272: 826-827.

Levine JD, Gordon NC, Fields HL (1978b). The mechanism of placebo analgesia. *Lancet* 2: 654-657.

Levine JD, Gordon NC, Fields HL (1979). Naloxone dose dependently produces analgesia and hyperalgesia in postoperative pain. *Nature* 278: 740-741.

Liu M, Yu B, Nakanishi O, Wieland T, Simon M (1997). The Ca²⁺-dependent binding of calmodulin to an N-terminal motif of the heterotrimeric G protein beta subunit. *J Biol Chem* 272: 18801-18807.

Loh HH, Smith AP (1990). Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30: 123-147.

Lord JAH, Waterfield AA, Hughes J, Losterlitz HW (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499.

Maldonado R, Negus S, Koob GF (1992a). Precipitation of morphine withdrawal syndrome in rats by administration of mu-, delta- and kappa-selective opioid antagonists. *Neuropharmacol* 31: 1231-1241.

Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF (1992b). Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. *J Pharmacol Exp Ther* 261: 669-677.

Maldonado R, Stinus L, Koob GF (1996a). Neurobiological mechanisms of opiate withdrawal. Springer, Heidelberg, Germany. pp 13-15.

Maldonado R, Stinus L, Koob GF (1996b). Neurobiological mechanisms of opiate withdrawal. Springer, Heidelberg, Germany. pp 12-34.

Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J (1996c). Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* 273: 657-659.

Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE (1976). The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the non-dependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exper Ther* 197: 517-532.

Martínez JA, Vargas ML, Fuente T, del Río-García J, Milanés MV (1990). Plasma-endorphin and cortisol levels in morphine-tolerant rats and in naloxone-induced withdrawal. *Eur J Pharmacol* 182: 117-123.

Matsuoka I, Maldonado R, Defer N, Noel F, Hanoune J, Roques BP (1994). Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA. *Eur J Pharmacol* 268: 215-221.

Matthes HW, Smadja C, Valverde O, Vonesch JL, Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubie M, Severini C, Negri L, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL (1998). Activity of the δ -opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the kappa-receptor is maintained in mice lacking the μ -receptor. *J Neurosci* 18: 7285-7295.

McAuliffe WE (1982). A test of Wicker's theory of relapse: the frequency of relapse due to conditioned withdrawal sickness. *Inter J Addict* 17: 19-33.

Meredith GE, Pennartz CMA, Groenewegen HJ (1993). The cellular framework for chemical signalling in the nucleus accumbens. *Prog Brain Res* 99: 3-24.

Merello M, Nouzeilles MI, Cammarota A, Leiguarda R (1999). Effect of memantine (NMDA antagonist) on Parkinson's disease: a double-blind crossover randomized study. *Clin Neuropharmacol* 22: 273-276.

- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B (1995). Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature* 377: 532-535.
- Milanés MV, Laorden, ML, Chapleur-Château M, Burlet A (1998). Alternations in corticotropin-releasing Factor and vasopressin content in rat brain during morphine withdrawal: correlation with hypothalamic noradrenergic activity and pituitary-adrenal response. *J Pharmacol Exp Ther* 285: 700-706.
- Miller JA (1991). The calibration of ³⁵S or ³²P with ¹⁴C-labeled brain paste or ¹⁴C-plastic standards for quantitative autoradiography using LKB Ultrofilm or Amersham Hyperfilm. *Neurosci Lett* 121: 211-214.
- Minakami R, Jinnai N, Sugiyama H (1997). Phosphorylation and calmodulin binding of the metabotropic glutamate receptor subtype 5 (mGluR5) are antagonistic in vitro. *J Biol Chem* 272: 20291-20298.
- Minami M, Toya T, Katao Y, Maekawa K, Nakamura S, Onogi T, Kaneko S, Satoh M (1993). Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor. *FEBS Lett* 329: 291-295.
- Minami M, Satoh M (1996). Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res* 23: 121-145.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC (1994). ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett* 341: 33-38.
- Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier J-C, Parmentier M (1996). Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci* 93: 8666-8670.
- Mousa S, Miller CH Jr, Couri D (1983). Dexamethasone and stress-induced analgesia. *Psychopharmacol* 79: 199-202.
- Nakanishi S, Inoue A, Kita T (1979). Nucleotide sequence of clones cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor. *Nature* 278: 423.
- Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson SJJr (1999). Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neuro* 406: 503-547.
- Nestler EJ, Tallman JF (1988a). Chronic morphine treatment increases cyclic AMP-dependent protein kinase activity in the rat locus coeruleus. *Mol Pharmacol* 33: 127-132.
- Nestler EJ, Erdos JJ, Terwilliger R, Duman RS, Tallmann JF (1988b). Regulation of G proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Brain Res* 476: 230-239.
- Nestler EJ, Erdos JJ, Terwilliger R (1989). Regulation of G-proteins by chronic morphine in the rat locus coeruleus. *Brain Res* 476: 230-239.

- Nestler EJ (1992). Molecular mechanisms of drug addiction. *J Neurosci* 12: 2439-2450.
- Nestler EJ, Hope BT, Widnell KL (1993). Drug addiction: a model for the molecular basis of neural plasticity. *Neuron* 11: 995-1006.
- Nestler EJ, Aghajanian GK (1997). Molecular and cellular basis of addiction. *Science* 278: 58-63.
- Ng GY, George SR, Zastawny RL, Caron M, Bouvier M, Dennis M, O'Dowd BF (1993). Human serotonin_{1B} receptor expression in Sf9 cells: phosphorylation, palmitoylation, and adenylyl cyclase inhibition. *Biochem* 32: 11727-11733.
- Ng GY, Mouillac B, George SR, Caron M, Dennis M, Bouvier M, O'Dowd BF (1994). Desensitization, phosphorylation and palmitoylation of the human dopamine D1 receptor. *Eur J Pharmacol* 267: 7-19.
- Nothacker HP, Reinscheid RK, Mansour A, Henningsen RA, Ardati A, Monsma Jr FJ, Watson SJ, Civelli O (1996). Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci* 93: 8677-8682.
- O'Brien CP (1974). „Needle freaks:“ Psychological dependence on shooting up. In: *Med World News, Psychiatry Annual*. Mc Graw Hill, New York.
- O'Brien CP, Testa J, O'Brien TJ, Brady JP, Wells B (1977). Conditioned narcotic withdrawal in humans. *Science* 195: 1000-1002.
- O'Brien CP, Ehrmann RN, Ternes J.M., (1986). Classical conditioning in human opioid dependence. In Goldberg, S.R., Stolerman, I.P., eds. *Behavioural analysis of drug dependence*. Academic press, London: 329-356.
- O'Brien CP, Childress AR, McLellan AT, Ehrmann RN (1992). Classical conditioning in drug-dependent humans. *An NY Acad Sci* 654: 400-416.
- O'Brien CP (1995). Opioid addiction. In: *Opioids* (ed. Herz, A), Springer, Berlin, 803-825
- Overton DA (1987). Applications and limitations of the drug discrimination method for the study of drug abuse. In: *Methods of assessing the reinforcing properties of abused drugs* (ed. Bozarth MA), Springer, New York: 291-340.
- Pan YX, Xu J, Pasternak GW (1996). Cloning and expression of a cDNA encoding a mouse brain orphanin FQ/nociceptin precursor. *Biochem J* 315: 11-13.
- Pasternak GW, Wood JP (1986). Multiple mu opiate receptors. *Life Sci* 38: 1889-1898.
- Pavlov IP (1969). Conditioned reflexes. In: Anrep GV (ed. and trans.). Dover, New York. (original work published 1927).
- Paxinos G, Watson C (1998). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic press, Sydney.

- Pei Q, Zetterström T, Leslie RA, Grahame-Smith DG (1993). 5-TH₃ receptor antagonists inhibit morphine-induced stimulation of mesolimbic dopamine release and function in the rat. *Eur J Pharmacol* 230: 63-68.
- Pert C, Snyder S (1973). Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014.
- Pfab R, Hirtl C, Hibler A, Felgenhauer N, Chlistalla J, Zilker T (1996). Der Antagonist-induzierte-Narkose-gestützte Opiat-Schnellentzug (AINOS) - riskant und Vorteile nicht bewiesen. *Münch Med Wschr* 138: 781-786.
- Plotsky PM (1991). Pathways to the secretion of adrenocorticotropin: a view from the portal. *J Neuroendocrinol* 3: 1-9.
- Popik P, Danysz W (1996). Inhibition of reinforcing effects of morphine and motivational aspects of naloxone-precipitated opioid withdrawal by NMDA receptor antagonist, memantine. *Pharm Exp Ther* 280: 1-11.
- Popik P, Skolnick P (1996). The NMDA antagonist memantine blocks the expression and maintenance of morphine dependence. *Pharmacol Biochem Behav* 53: 791-797.
- Portoghese PS, Sultana M, Nagaze H, Takemori AE (1992). A highly selective delta1-opioid receptor antagonist: 7-bezylidenenaltrexone. *Eur J Pharmacol* 218: 195-196.
- Rasmussen K, Beitner-Johnson D, Krystal JH, Aghajanian GK, Nestler EJ (1990). Opiate withdrawal and the rat locus coeruleus: behavioral, electrophysiological and biochemical correlates. *J Neurosci* 10: 2308-2317.
- Ray O, Ksir C (1993). *Drugs, society and human behaviour*. 6th edition, St. Louis: Mosby, pp 314-315.
- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T (1994). Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol* 45: 330-334.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O (1995). Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science* 270: 792-794.
- Remie R, Van Dongen JJ, Rensema JW (1990). Permanent cannulation of the jugular vein (acc. to Steffens). In: *Manual of microsurgery on the laboratory rat, Part I* (eds. Van Dongen JJ, Remie R, Rensema JW, Van Wunnik GHJ) Elsevier, Amsterdam: 159-168.
- Rios L, Jacob JJ (1982). Inhibition of inflammatory pain by naloxone and its N methyl quaternary analogue. *Life Sci* 31: 1209-12012.
- Rios L, Jacob JJ (1983). Local inhibition of inflammatory pain by naloxone and its N-methyl quaternary analogue. *Eur J Pharmacol* 96: 277-283.
- Rivier C, Vale W (1983a). Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* 305: 325-327.

Rivier C, Vale W (1983b). Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology* 113: 939-942.

Roffman M, Reddy C, Lal H (1973). Control of morphine-withdrawal hypothermia by conditioned stimuli. *Psychopharmacol* 29: 197-201.

Rothman RB, Holaday JW, Porreca F (1993). Allosteric coupling among opioid receptors: evidence for an opioid receptor complex. *Handbook of Experimental Pharmacology* (Herz, A., ed), Vol. 104, Springer, Berlin: 217-237.

Schnur P (1992). Conditioned morphine withdrawal in the hamster. *Psychopharmacol* 107: 517-522.

Schoffelmer ANM, Yao YH, Gioannini TL, Hiller JM, Ofri D, Roques BP, Simon EJ (1990). Cross-linking of human [¹²⁵I] -endorphin to opioid receptors in rat striatal membranes: biochemical evidence for the existence of mu/delta opioid receptor complex. *J Pharmacol Exp Ther* 253: 419-426.

Schröder B (1993). Heroin. Rowohlt, Reinbeck

Schulteis G, Ahmed SH, Morse AC, Koob GF, Everitt BJ (2000). Conditioning and opiate withdrawal. *Nature* 405: 1013-1014.

Schulteis G, Koob GF (1996). Reinforcement processes in opiate addiction: a homeostatic model. *Neurochem Res* 21: 1437-1454.

Schulteis G, Stinus L, Risbrough VB, Koob GF (1998). Clonidine blocks acquisition but not expression of conditioned opiate withdrawal in rats. *Neuropsychopharmacol* 19: 406-416.

Schulteis G, Ahmed SH, Morse AC, Koob GF, Everitt BJ (2000). Conditioning and opiate withdrawal. *Nature* 405: 1013-1014.

Schulz R, Bläsing J, Wüster M, Herz A (1978). The opiate-like action of tilidine is mediated by metabolites. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 304: 89-93.

Seefeldter M (1996). *Opium: Eine Kulturgeschichte*. Nikol, Hamburg

Selley DE, Nestler EJ, Breivogel CS, Childers SR (1997). Opioid receptor-coupled G-proteins in rat locus coeruleus membranes: decrease in activity after chronic morphine treatment. *Brain Res* 746: 10-18.

Shen KF, Crain SM (1992). Chronic selective activation of excitatory opioid receptor functions in sensory neurons results in opioid dependence without tolerance. *Brain Res* 597: 74-83.

Shen KF, Crain SM (1997). Ultra-low doses of naltrexone or etorphine increase morphine's antinociceptive potency and attenuate tolerance/dependence in mice. *Brain Res* 757: 176-192.

- Sim LJ, Selley DE, Childers SR (1995). In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[γ - ^{35}S]thio]-triphosphate binding. *Proc Natl Acad Sci* 92: 7242-7246.
- Sim LJ, Selley DE, Dworkin SI, Childers SR (1996). Effects of morphine administration on μ opioid receptor-stimulated [^{35}S]GTP γ S autoradiography in rat brain. *J Neurosci* 16: 2684-2692.
- Simon, E, Hiller J, Edelman I (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic H^3 -etorphine to rat brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci* 70: 1947-1949.
- Smart D, Lambert DG (1996) The stimulatory effects of opioids and their possible role in the development of tolerance. *Trends Pharmacol Sci* 17: 264-269.
- Smith GM, Beecher HK (1962). Subjective effects of heroin and morphine in normal subjects. *J Pharmacol Exper Ther* 136: 47-52.
- Spanagel R, Herz A, Shippenberg TS (1992). Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway. *Proc Natl Acad Sci* 89: 2046-2050.
- Spanagel R, Shoaib M (1994). Involvement of mesolimbic kappa-opioid systems in the discriminative stimulus effects of morphine. *Neurosci* 63: 797-804.
- Spanagel R, Zieglgansberger W (1997). Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes. *Trends Pharmacol Sci* 18: 54-59.
- Spanagel R, Kirschke C, Tretter F, Holsboer F (1998). Forced opioid withdrawal under anaesthesia augments and prolongs the occurrence of withdrawal signs in rats. *Drug Alc Depend* 52: 251-256.
- Spanagel R (1999). Is there a pharmacological basis for therapy with rapid opioid detoxification? *Lancet*. 354:2017-2018.
- Stewart J, de Wit H, Eikelboom R (1984). Role of unconditioned and conditioned drug effects in the self-administration of opiates and stimulants. *Psych Rev* 91: 251-268.
- Stinus L, Koob GF, Ling N, Bloom FE, LeMoal M (1980). Locomotor activation induced by infusion of endorphin into the ventral tegemental area: evidence for opiate-dopamine interactions. *Proc Natl Acad Sci* 77: 2323-2327.
- Stinus L, Le Moal M, Koob GF (1990). Nucleus accumbens and amygdala are possible substrates for the aversive stimulus effects of opiate withdrawal. *Neuroscience* 37: 767-773.
- Taiwo YO, Basbaum AI, Perry F, Levine JD (1989). Paradoxical analgesia produced by low doses of the opiate-antagonist naloxone is mediated by interaction at a site with characteristics of the delta opioid receptor. *J Pharmacol Exper Ther* 249: 97-100.
- Tao PL, Law PY, Loh HH (1987). Decrease in δ and μ opioid receptor binding capacity in rat brain after chronic etorphine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 240: 809-816.

Tao PL, Lee CR, Law PY, Loh HH (1993). The interaction of the mu-opioid receptor and G protein is altered after chronic morphine treatment in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 348: 504-508.

ter Riet G, de Craen AJ, de Boer A, Kessels AG (1998). Is placebo analgesia mediated by endogenous opioids? A systematic review. *Pain* 76: 273-275.

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

Trujillo KA, Akil H (1991). Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* 251: 85-87.

Tsuruoka M, Hiruma Y, Willis WD (1997). The subnucleus reticularis dorsalis is involved in antinociception produced by a low dose of naloxone during carrageenan-induced inflammation. *Brain Res* 762: 264-268.

Tye NC, Iversen SD (1975). Some behavioral signs of morphine withdrawal blocked by conditioned stimuli. *Nature* 255: 416-418.

Ueda H, Fukushima N, Kitao T, Ge M, Takagi H (1986). Low doses of naloxone produce analgesia in the mouse brain by blocking presynaptic autoinhibition of enkephalin release. *Neurosci Letters* 65: 247-252.

Ur E, Grossman A (1994). The neuroregulation of corticotropin secretion. In: *The pituitary gland* (2nd ed.)(ed. Imura H), Raven press, New York: 309-330.

van der Laan JW, de Groot G (1988). Changes in locomotor-activity patterns as a measure of spontaneous morphine withdrawal: no effect of clonidine. *Drug Alc Depend* 22: 133-140.

van der Laan JW, van 't Land CJ, Loeber JG, de Groot G (1991). Validation of spontaneous morphine withdrawal symptoms in rats. *Arch Inter Pharm Ther* 311: 32-45.

Van Vliet BJ, Van Rijswijk AL, Wardeh G, Mulder AH, Schoffelmeer AN (1993). Adaptive changes in the number of G_s- and G_i-proteins underlie adenylyl cyclase sensitization in morphine-treated rat striatal neurons. *Eur J Pharmacol* 245(1), 23-29.

Vargas ML, Martínez-Piñero MG and Milanés MV (1997). Neurochemical activity of noradrenergic neurons and pituitary-adrenal response after naloxone-induced withdrawal: the role of calcium channels. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355: 501-506.

Vaught JL, Rothman RB, Westfall TC (1982). Mu and delta receptors: their role in analgesia and in the differential effects of opioid peptides in analgesia. *Life Sci* 30: 1443-1445.

Wang D, Sadee W, Quillan JM (1999). Calmodulin binding to G protein-coupling domain of opioid receptors. *J Biol Chem* 274: 22081-22088.

Wang D, Surratt CK, Sadee W (2000). Calmodulin regulation of basal and agonist-stimulated G protein coupling by the mu-opioid receptor (OP(3)) in morphine-pretreated cell. *J Neurochem* 75: 763-771.

- Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR (1993). Mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci* 90: 10230-10234.
- Wang JB, Johnson PS, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Uhl GR (1994). Human mu opiate receptor. cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett* 338: 217-222.
- Wang YY, Aghajanian GK (1990). Excitation of locus coeruleus neurons by vasoactive intestinal peptide: role of cAMP and protein kinase. *A J Neurosci* 10: 3335-3343.
- Whitelaw RB, Markou A, Robbins TW, Everitt BJ (1996). Excitotoxic lesions of the basolateral amygdala impair the acquisition of cocaine-seeking behaviour under a second-order schedule of reinforcement. *Psychopharmacol* 127: 213-224.
- Wickler A, Pescor FT (1967). Classical conditioning of a morphine abstinence phenomenon, reinforcement of opioid-drinking behavior and „relapse“ in morphin-addicted rats. *Psychopharmacol* 10: 255-284.
- Wisden W, Morris BJ (1994). In situ hybridisation with synthetic oligonucleotide probes. In: *in situ hybridisation protocols for the brain* (eds. Wisden W, Morris BJ). Academic press, London: 1-34.
- Woolf CJ (1980). Analgesia and hyperalgesia produced in the rat by intrathecal naloxone. *Brain Res* 189: 593-597.
- Yasuda K, Espinosa R 3rd, Takeda J, Le Beau MM, Bell GI (1994). Localization of the kappa opioid receptor gene to human chromosome band 8q11.2. *Genomics* 19: 596-597.
- Yoburn BC, Chen J, Huang T Inturrisi CE (1990). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous morphine pellets in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 235: 282-286.
- Zawarynski P, Tallericco T, Seeman P, Lee SP, O'Dowd BF, George SR (1998). Dopamine D2 receptor dimers in human and rat brain. *FEBS Lett* 441: 383-386.
- Zeise ML, Kasparov S, Capogna M, Zieglgänsberger W (1993). Acamprosate (calciumacetylhomotaurinat) decreases postsynaptic potentials in the rat neocortex: possible involvement of excitatory amino acid receptors. *Eur J Pharmacol* 231: 47-52.
- Zhu X, Wess J (1998). Truncated V2 vasopressin receptors as negative regulators of wild-type V2 receptor function. *Biochem* 37: 15773-15784.
- Zieglgänsberger W, Spanagel R (1999). Molekularbiologie der Sucht. In: *Handbuch der molekularen Medizin, Band 5: Erkrankungen des Zentralnervensystems* (Hrsg. Ganten D, Ruckpaul K). Springer, Heidelberg.
- Zimbardo PG (1988). *Psychology and life* (12th ed.). Scott, Foresman and Company, Illinois.
- Zukin RS, Eghbali M, Olive D, Unterwald EM, Tempel A (1988). Characterization and visualization of rat and guinea pig brain kappa opioid receptors: evidence for kappa 1 and kappa 2 opioid receptors. *Proc Nat Acad Sci* 85: 4061-4065.

Danksagung

Herrn Prof. Florian Holsboer danke ich, die Einrichtungen des Max-Planck-Instituts benützt haben zu dürfen.

Herrn Prof. Walter Zieglgänsberger sei für die Bereitstellung der Laborräume und finanzielle Unterstützung gedankt.

Herrn Prof. Rainer Landgraf danke ich für das Erstgutachten, Herrn Prof. Peter Schlegel für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Meinen Betreuern Herrn Prof. Rainer Spanagel und Dr. Jan Schadrack danke ich für viele gute Ratschläge und vor allem für rege Diskussionen.

Ohne die tatkräftige und moralische Unterstützung von Christine Bartl und Christine Hilf wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Eine Aufzählung der vielen kleinen und großen Hilfestellungen und würde hier zu weit führen. Danke!

Bei Dr. Sandra Wigger und Dr. Inge Sillaber möchte ich mich für so manchen Geistesblitz und dessen schnelle Umsetzung bedanken.

Meinem „Rettungsanker“ in schwierigen Stunden, Dr. Verena Laschinger, kann ich nicht genug danken; es bleibt der Wunsch, selbiges eines Tages zurückzugeben.

Herrn Wolfgang Angermaier sei für seine Hilfe bei der Herstellung der Morphinpellets gedankt, ohne ihn wären Teile der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen.

Ansonsten danke ich folgenden Freunden, Mitarbeitern und Kollegen, die mir geholfen haben, meine Launen ertragen haben oder auch nur ein offenes Ohr hatten: Dr. Shahnaz Azad, Dr. Matthias Eder, Barbara Hauger, Markus Henniger, Dr. Sabine Hölter, Dr. Beatrice Mahal, Gabi Kohl, den Mitarbeitern des Tierstalles, Dr. Carsten Wotjak, Ursula Genning, Jutta Wunder, Helmut Stein, Jutta Thomas, Stefan Platzer, Dr. Anett Winkler, Franz Schemera, Frank Lachmann und nicht zuletzt Manfred Snatschke.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern. Ohne deren Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Lebenslauf

08/1997 - dato	Promotion in Biologie, Schwerpunkt Neuropharmakologie (Suchtforschung) am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München. Rigorosum voraussichtlich 11/2001
06/1997 - 07/1997	Sprachkurs am St. Giles College, San Francisco, USA
07/1996 - 05/1997	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München. Note 1,0
11/1990 - 07/1996	Studium der Biologie, Hauptfach Neurobiologie, Nebenfächer Pharmakologie, Psychologie sowie Zoologie an der Ludwig-Maximilian-Universität, München. Gesamtnote 1,1
04/1989 - 06/1990	Zivildienst im Kreiskrankenhaus Pfaffenhofen a. d. Ilm
09/1987 - 02/1988	Zivildienst in der Werkstatt für Behinderte, Opmtedastraße, München
1977 - 1987	Gymnasium Fürstenried und Theresiengymnasium, München. Abitur

Berufliche Tätigkeiten

07/2001 - dato	Wissenschaftlicher Angestellter am Zentralinstitut für seelische Gesundheit, Mannheim (AG Psychopharmakologie)
04/1995 - dato	Selbständige Tätigkeit als Teppichreinigungsunternehmen (Einzelunternehmen), eingetragen in der Handwerkskammer für München und Oberbayern
08/1997 - 12/2000	Wissenschaftlicher Angestellter am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München (AG Suchtforschung und AG klinische Neuropharmakologie)

10/1995	Projektbezogene Aushilfe am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
07/1993 - 11/1994	Mitarbeiter bei Firma Hennig, Fachhandel für Reinigungsbedarf, München
11/1990 - 08/1993	Beschäftigter in der Gaststätte Rothmund, München
03/1991 - 04/1991	Aushilfsangestellter am Kreiskrankenhaus Pfaffenhofen a. d. Ilm
07/1990 - 10/1990	Aushilfsangestellter am Kreiskrankenhaus Pfaffenhofen a. d. Ilm
04/1988 - 03/1989	Beschäftigter im Ingenieurbüro Hergenröder, München

Persönliche Daten

Geburtsdatum	22. Dezember 1966
Geburtsort	Gräfelfing bei München
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch