

**Aus der Universitätsklinik für Psychiatrie und  
Psychotherapie Tübingen  
Abteilung Allgemeine Psychiatrie und Psychotherapie  
mit Poliklinik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. G. Buchkremer  
Sektion Suchtforschung  
Leitung: Professor Dr. J. Wolffgramm**

**Neurochemische Befunde bei  
Wistar-Ratten  
im akuten und protrahierten  
Opiatentzug**

**Inauguraldissertation  
zur Erlangung des  
Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Folkert Juilfs  
aus  
Brake (Unterweser)**

**2005**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Professor Dr. J. Wolffgramm  
2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. Dr. Breyer-Pfaff

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1	Opiate in der Medizin . . . . .	5
1.2	Grundlagen der akuten Opiatwirkung . . . . .	5
1.2.1	Primärer Wirkort und Effektoren . . . . .	5
1.2.2	Analgesie . . . . .	7
1.2.3	Dopaminausschüttung im mesolimbischen System und Verhalten . . . . .	8
1.3	Chronische Opiatwirkungen . . . . .	10
1.3.1	Toleranz und Entzugserscheinungen . . . . .	10
1.3.2	Dopaminerge Transmission und Verhalten . . . . .	12
1.4	Eigene Fragestellung . . . . .	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1	Tiere und Haltungsbedingungen . . . . .	19
2.2	Etonitazentrinkversuch. . . . .	19
2.2.1	Präparation . . . . .	20
2.3	Neurochemische Untersuchungen . . . . .	21
2.3.1	Gewebsaufbereitung . . . . .	24
2.3.2	Proteinbestimmung . . . . .	26
2.3.3	[ <sup>3</sup> H]DAMGO-Bindung . . . . .	27
2.3.4	[ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S- Bindung . . . . .	30
2.3.5	[ <sup>3</sup> H]SCH23390-Bindung . . . . .	33
2.3.6	Adenylatzyklase-Assays . . . . .	36
2.4	Datenverarbeitung und Statistik . . . . .	41
2.4.1	Verbrauchs- und Gewichtsdaten der Tiere . . . . .	41
2.4.2	Neurochemie . . . . .	42
2.5	Chemikalien . . . . .	43
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1	Haltungs- und Einnahmedaten . . . . .	45
3.1.1	Körpergewicht . . . . .	45
3.1.2	Futtermittelverbrauch . . . . .	46
3.1.3	Flüssigkeits- und Etonitazeneinnahme . . . . .	47
3.2	Neurochemische Untersuchungen . . . . .	48
3.2.1	[ <sup>3</sup> H]DAMGO-Bindung am $\mu$ -Opioidrezeptor . . . . .	49
3.2.2	[ <sup>35</sup> S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien an G-Proteinen . . . . .	49
3.2.3	[ <sup>3</sup> H]SCH23390-Bindungsstudien am D <sub>1/5</sub> -Rezeptor . . . . .	54
3.2.4	Stimulation der Adenylatzyklase im limbischen Vorderhirn . . . . .	58
3.2.5	Inhibition der Adenylatzyklase im limbischen Vorderhirn . . . . .	60

## *Inhaltsverzeichnis*

<b>4 Diskussion</b>	<b>63</b>
4.1 Tierhaltung . . . . .	63
4.2 $\mu$ -Opioidrezeptor . . . . .	67
4.3 G-Proteine . . . . .	69
4.4 Dopamin D <sub>1/5</sub> -Rezeptor und Adenylatzyklase . . . . .	71
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>77</b>
<b>Literatur</b>	<b>79</b>
<b>Danksagung</b>	<b>101</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>103</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Opiate in der Medizin

Die medizinische Bedeutung der nativen Bestandteile des Schlafmohns (*papaver somniferum*) oder deren halb- und vollsynthetischen Derivate liegt in ihrer schmerzstillenden Wirkung. Neben der Behandlung akuter, postoperativer oder tumorbedingter Schmerzen eignen sie sich zur Therapie chronischer Schmerzen, die nicht durch maligne Erkrankungen hervorgerufen werden. Die Menge der verordneten Opioidanalgetika ist in den letzten Jahren gestiegen und besteht dabei zu einem großen Anteil aus Medikamenten, die zur Behandlung dieser so genannten nicht malignen Schmerzen eingesetzt werden (Clausen 1997). Opioide sind darüber hinaus psychoaktive Substanzen. Sie beeinflussen Denken, Wahrnehmung und Stimmung und können einen Zustand hervorrufen, der mit Euphorie beschrieben wird.

Aus klinischer Sicht interessieren die Probleme, die mit der chronischen Einnahme verbunden sein können. Beobachtet werden (wenn auch nicht zwingend im Zusammenhang mit einer Schmerztherapie) Entzugserscheinungen, notwendige Dosissteigerungen zur Erhaltung der Wirkung und Suchterkrankungen. Derartige Phänomene werden der Vorstellung nach durch adaptive Vorgänge hervorgerufen, die durch eine wiederholte Verabreichung induziert werden können. Um adaptive Vorgänge nach wiederholter Gabe eines Opioids beschreiben zu können, müssen die neurobiologischen und physiologischen Prinzipien der akuten Wirkung bekannt sein.

## 1.2 Grundlagen der akuten Opiatwirkung

### 1.2.1 Primärer Wirkort und Effektoren

Grundlegendes Prinzip der Opiatwirkung ist die Interaktion mit Opioidrezeptoren. Die natürlichen, die halb- bzw. vollsynthetischen Alkaloide und die endogenen bzw. synthetischen Opioid-Peptide (z.B.  $\beta$ -Endorphin) binden mit unterschiedlicher Affinität an Rezeptoren der Hauptklassen  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\kappa$  (Janecka u. a. 2004; Dhanwan u. a. 1996). Die Rezeptoren finden sich in großer Zahl im neuronalen und endo/exokrinen Gewebe und sind überwiegend perisynaptisch und entlang der Plasmamembran lokalisiert (Moyse 1997).

## 1 Einleitung

Die Opioidrezeptoren sind an guaninnukleotidbindende Proteine (G-Proteine) vorwiegend vom Typ  $G_i$ ,  $G_o$  und  $G_z$  gekoppelt (Connor und Christie 1999). Nach Bindung eines Agonisten bilden Rezeptor und das heterotrimere G-Protein einen Komplex, der die membranständigen G-Proteine aktiviert. Nach Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP) dissoziiert das G-Protein in die Untereinheiten  $G\alpha$  und  $G\beta\gamma$ , die weitere Effektoren beeinflussen (Dowling u. a. 2004; Harrison und Traynor 2003).

Nach Dissoziation dieser G-Proteine inhibieren die  $G\alpha$ -Untereinheiten die Aktivität der Adenylatzyklase (AC) und reduzieren die Konzentrationen des von der AC aus Adenosintriphosphat (ATP) gebildeten second messenger zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) (Gharagozlu u. a. 2003; Dessauer u. a. 2002). Der cAMP-Spiegel beeinflusst nachfolgend hyperpolarisationsaktivierte Kationenkanäle (hyperpolarization activated HCN channels) mit Veränderungen von Schrittmacherströmen ( $I_h$ ) und damit zusammenhängend der Exzitabilität von Neuronen (Frere und Luthi 2004; Antal u. a. 2004). Ist die cAMP-Synthese der Zelle und deshalb die direkte Bindung von cAMP an die HCN Kanäle reduziert (vgl. Wainger u. a. 2001), bedarf es negativerer Potentiale, um diesen Kationeneinstrom zu aktivieren (Ulens und Siegelbaum 2003; Ingram 1994).

Durch Bindung von  $\beta\gamma$ -Untereinheiten an intrazelluläre Domänen verschiedenartiger Kalziumkanäle werden diese inhibiert (Wolfe u. a. 2003). Umgekehrt können einwärtsgerichtete Kaliumkanäle (inwardly rectifying  $K^+$  channels; KIR) durch direkte Bindung der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert werden (Finley u. a. 2004). (Quillan u. a. 2002; Ulens u. a. 1999).

Durch die Beeinflussung der beschriebenen elektrochemischen Vorgänge nimmt die Erregbarkeit des betroffenen Neurons insgesamt ab. Die Aktivierung aller drei Rezeptorsubtypen führt über die beschriebenen Vorgänge zur Inhibition der Freisetzung verschiedener von der Lokalisation des Neurons abhängiger inhibitorischer oder exzitatorischer Transmitter wie Glutamat, GABA, Glycin oder Acetylcholin (Williams u. a. 2001). Eine beschriebene Folge verminderter GABA-Freisetzung ist dabei die Inhibition inhibitorischer Interneurone im Periaquäduktalen Grau des Mesenzephalon (Hahm u. a. 2004; Sharpe u. a. 1974).

Die Bindung von  $\mu$ -Rezeptoragonisten führt über die Hydrolyse membranständiger Phosphoinositide zur Aktivierung verschiedener Isoformen der Proteinkinase C, die in die Zellmembran transloziert werden und dort die Phosphorylierung des Rezeptors katalysieren (Harlan u. a. 2004; Narita u. a. 2001; Kramer und Simon 1999; Fisher u. a. 1992). Die Aktivierung und Translokation der Proteinkinase C in die Plasmamembran kann darüber hinaus durch Phosphorylierung von NMDA-Rezeptoren zur Verstärkung glutamatabhängiger exzitatorischer Ströme führen, die

## 1.2 Grundlagen der akuten Opiatwirkung

den oben beschriebenen inhibitorischen Wirkungen der Opiode entgegenstehen. (Liao u. a. 2001; Martin u. a. 1999). Dies könnte mit der zu beobachtenden Hyperalgesie nach Opioidgabe in Verbindung stehen, die auffälligerweise auch eine längere Abstinenz überdauern kann (Angst u. a. 2003; Laulin u. a. 1998).

Nach akuter Opiodeinwirkung kann es unter Einbeziehung der Phosphatidylinositol 3 Kinase zur Aktivierung einer Effektorkaskade kommen, die mit dem Zellkern in Verbindung steht (Ai u. a. 1999). Die G-Proteine aktivieren die *extracellular signal-related mitogen activated* Proteinkinase Kaskade (ERK/MAPK) (Schulz u. a. 2004; Kramer und Simon 2000). Die ERK/MAPK Kaskade hat dann u.a. Veränderungen bzw. Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB und DeltaFosB zur Folge (Nestler 2004).

Membranständige Rezeptoren, die an G-Proteine gekoppelt sind, können nach akuter Agonistenbindung vorübergehend von der Zelloberfläche entfernt werden und einem Recycling unterworfen sein. Das Phänomen lässt sich nach Opioidgabe auch im Fall der Opioidrezeptoren experimentell nachweisen. Bindung eines selektiven Agonisten kann ggf. zur Phosphorylierung des Rezeptors durch eine G-Proteinrezeptorkinase (GRK) führen. Nachfolgend kommt es zur Bindung von Arrestin und anschließend zur clathrinvermittelten Rezeptorendozytose. Nach Internalisierung des Rezeptors und Überführung in endosomale Kompartimente kann dieser später an die Zelloberfläche recycelt werden (Chen u. a. 2003). Dieses als receptor trafficking bezeichnete Phänomen lässt sich nicht nach Morphineinwirkung beobachten (He u. a. 2002; Eisinger u. a. 2002; Keith u. a. 1998). An anderer Stelle wird allerdings darauf hingewiesen, dass ein receptor trafficking durch Morphin möglicherweise selektiv im Bereich der Axone auftritt (Haberstock-Debic u. a. 2003).

### 1.2.2 Analgesie

Die analgetische Wirkung der Opiate über Aktivierung der Opioidrezeptoren wird vorwiegend durch Beeinflussung spinaler und supraspinaler Anteile des schmerzverarbeitenden Systems vermittelt. Spinal verabreicht zeigen Opiode starke analgetische Wirkung (Gerancher u. a. 1999; Yaksh und Onofrio 1987). Rezeptorbindungsstudien mit Opioidliganden offenbaren dabei eine hohe Bindungsdichte aller drei Rezeptortypen im Hinterhorn des Rückenmarks (Besse 1990). Präsynaptisch tragen die terminalen Nervenendigungen der kleinen afferenten C-Fasern (1. Neuron) Rezeptoren vom Typ  $\mu$  und  $\delta$ . Postsynaptisch besitzen die Zellkörper der Hinterhornneurone (2. Neuron) zusätzlich auch Rezeptoren vom Typ  $\kappa$ . Eine Bindung von agonistischen Opioiden an die drei Rezeptortypen auf Ebene des Hinterhorns inhibiert die weitere Schmerzverarbeitung (Yaksh 1997; Zieglängsberger und Bayerl 1976).

## 1 Einleitung

Zur Identifizierung supraspinaler Hirnareale der opioidinduzierten Analgesie dient die lokalisierte Verabreichung entsprechender Opioidagonisten durch Mikroinjektionstechniken. Nach Gabe eines Opioids werden Veränderungen spinaler Reflexe und supraspinal organisierter zentralnervöser Antworten auf aversive thermische, mechanische oder physikalische Reize (z.B. Tailflick-Test, Formalin-Test) beobachtet (Jensen 1997). Beschrieben ist u.a. die analgetische Wirkung des Agonisten Morphin im periaquäduktalen Grau (PAG), im posterioren Abschnitt des Hypothalamus (HT), im Nucleus accumbens (NAc) sowie im ventralen Tegmentum (VTA) (Manning 1994; Sharpe u. a. 1974).

### 1.2.3 Dopaminausschüttung im mesolimbischen System und Verhalten

Opioide sind als Substanzen bekannt, die als Drogen missbraucht werden. Sie teilen diese Eigenschaft mit anderen psychotropen Substanzen ganz unterschiedlicher Klassen. Eine Sucht stellt dabei ein bestimmtes zwanghaftes Einnahmeverhalten dar, das in erster Linie durch Kontrollverlust über die Einnahme gekennzeichnet ist. Ein Süchtiger kann den Konsum trotz negativer Konsequenzen z.B. im Sinne eines gesundheitlichen oder sozialen Schadens nicht einschränken, selbst wenn er dies wünscht (APA/DSM-IV). Das Verhaltensmuster scheint, so einmal etabliert, auch lange drogenfreie Intervalle zu überdauern und nur selten Tendenzen zur Remission aufzuweisen. Sucht gilt als chronische Krankheit mit hohen Rückfallquoten (Hoffman u. a. 2001; Leshner 1997).

Da diese Erkrankung durch den dauerhaften Gebrauch verschiedener Pharmaka wie Kokain, Nikotin, Cannabis oder den Opiaten hervorgerufen werden kann, galt die Aufmerksamkeit zunächst den gemeinsamen, substanzübergreifenden akuten Wirkungen. Ein solches gemeinsames Prinzip wurde in den Wirkungen auf das dopaminerge mesolimbische System gesehen. Dem mesolimbischen System, das u.a. das Ventrale Tegmentum und den Nucleus accumbens verbindet (vgl. Fiorino 1993) wird eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der Funktionen *positive Verstärkung* bzw. *Belohnung* zugerechnet.

Der ursprünglich in der behavioristischen Lernpsychologie u.a. im Zusammenhang mit Konditionierung verwendete Begriff Verstärkung (Reinforcement) (z.B. Skinner 1936) ist wertfrei und beschreibt die gesteigerte oder verringerte Wahrscheinlichkeit, dass ein bestimmtes Verhalten geäußert wird. Er ist anwendbar auf die Eigenschaften von Drogen wie Opiaten, die als positive Verstärker unmittelbar eine weitere Selbsteinnahme der Substanz stimulieren. Suchterzeugende Substanzen teilen diese Eigenschaft mit so genannten natürlichen positiven Verstärkern, zu denen Nahrungsaufnahme und Sexualität gezählt werden. Später wurde der Terminus in elektrophysiologischen Experimenten mit intrakraniellen Elektroden im



## 1.2 Grundlagen der akuten Opiatwirkung

Rattengehirn aufgegriffen (Olds und Milner 1954; Zacharko u. a. 1990).

Der Begriff *Belohnung* (reward) (Sheffield und Roby 1950; Hebb 1955), der vielfach mit Reinforcement gleichgesetzt wird, beinhaltet dagegen die Wertung, dass eine Verstärkung des Verhaltens vor allem auf die Eigenschaft zurückzuführen ist, positive affektive Zustände hervorzurufen (vgl. Chiara 1995; Wise 1996).

Der Begriff *Belohnungssystem* benennt die z.B. elektrophysiologisch identifizierten Hirnareale, die positive Verstärkung bzw. Belohnung vermitteln, und beinhaltet im Fall der Opiode vor allem mesolimbische dopaminabhängige Schaltkreise vom Ventralen Tegmentum zum Nucleus accumbens (Wise 1989). Suchterzeugende Substanzen können gruppenübergreifend akut verabreicht entweder eine mesolimbische Dopaminausschüttung bewirken und/oder zu einer Wirkungsverlängerung des Dopamins führen. Opiode und Cannabinoide verstärken die Feuerungsrate dopaminergener Neurone. Kokain verzögert die Rückaufnahme des Dopamins aus dem synaptischen Spalt und verlängert so die Wirkungszeit. Morphin bzw.  $\mu$ - und  $\delta$ -agonistische Opiode erhöhen systemisch verabreicht die Freisetzung von Dopamin vor allem in der *Shell*-Region des Nucleus accumbens, der einen Teil des limbischen Systems bildet (NAc) (Pontieri u. a. December, 1995; Chiara u. a. 1999). Im Tierexperiment wird Ähnliches durch die Präsentation eines natürlichen Verstärkers erzielt (Taber 1998).

Der Nucleus accumbens ist das Hauptprojektionsziel dopaminergener A10 Neurone, die ihren Ursprung im ventralen Tegmentum haben (VTA). Tierexperimentell lässt sich zum einen eine elektrische Selbststimulation (ICSS) dieses Hirnareals beobachten (Fiorino 1993). Zum anderen lässt sich eine Selbstverabreichung von Morphin in die VTA etablieren (Bozarth und Wise 1986). Beide Phänomene der Selbststimulation gehen mit initialer Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens einher. Opiode erzeugen diese Wirkung dabei nicht direkt, sondern durch eine de facto desinhibitorische Wirkung durch Inhibition inhibitorischer GABAerger Interneurone in der VTA (Johnson und North 1992). Der Neurotransmitter Dopamin wirkt dabei als Agonist auf Rezeptoren der Hauptgruppen D<sub>1</sub>-ähnlich (D<sub>1/5</sub>) und D<sub>2</sub>-ähnlich (D<sub>2/3/4</sub>) (Centonze u. a. 2003). Die D<sub>1/5</sub>-Rezeptoren sind überwiegend an stimulierende G<sub>s/olf</sub>-Proteine (Zhuang u. a. 2000; Sidhu 1998), die D<sub>2</sub>-ähnlichen Rezeptoren im Gegensatz dazu vorwiegend an inhibierende G<sub>i/o</sub>-Proteine gekoppelt (Ilani u. a. 2002; Zaworski u. a. 1999).

Neben dem Verhaltensphänomen *positive Verstärkung*, das im Zusammenhang mit der dopaminergen Transmission im mesolimbischen System gesehen wird, erzeugen Opiode akut, in niedrigen Dosen verabreicht, eine Steigerung des lokomotorischen Verhaltens (Ahtee 1974; Yoo und Yoo 2003). Der stimulierende Effekt wird durch eine parallele Verabreichung eines GABA<sub>B</sub>-Agonisten (Baclofen) in die

## 1 Einleitung

VTA aufgehoben (Leite-Morris 2004). Die Verabreichung reduziert dabei gleichzeitig die opioidinduzierte Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens durch direkte Inhibition der Perikarya der dopaminergen Neurone der VTA (Fadda 2003). Die opioidinduzierte lokomotorische Aktivität nach akuter Verabreichung wird deshalb ebenfalls in direkten Zusammenhang mit der dopaminergen Transmission im mesolimbischen System gebracht.

### 1.3 Chronische Opiatwirkungen

Durch eine chronische Verabreichung von Opioiden kann es zu Veränderungen der Wirkung kommen. Beobachtet werden Toleranzentwicklungen (d.h. die verminderte Wirksamkeit einer bestimmten Dosis), Entzugserscheinungen (Eddy u. a. 1959) und die oben beschriebenen Verhaltensstörungen im Sinne einer Sucht. Darüber hinaus werden Sensitisierungen beobachtet, die eine Verstärkung der Verhaltensantworten, wie Lokomotion (Kalinichev u. a. 2004) oder der neurochemischen Wirkungen (Ingram u. a. 1998) bedeuten. Auffälligerweise kann es zu Kreuzsensitisierungen kommen, die eine Sensitisierung für andere psychoaktive Substanzen nach Morphinvorbehandlung bedeuten (He und Grasing 2004; Cunningham u. a. 1997). Die Beschreibung adaptiver Prozesse auf neurobiologischer Ebene soll Korrelate dieser Phänomene identifizieren. Einbezogen in diese Untersuchungen werden der primäre Wirkort, Effektorsystem und neuronale Systeme, die an den verhaltensassoziierten Wirkungen beteiligt sind.

#### 1.3.1 Toleranz und Entzugserscheinungen

Im Zusammenhang mit Toleranz und Entzugserscheinungen wird zwischen Desensitisierungen und gegenregulatorischen Mechanismen unterschieden. Desensitisierungen bedingen Wirkungsabschwächungen. Aktive gegenregulatorische Veränderungen nach chronischer Einwirkung eines Opioids machen die Anwesenheit des Pharmakons zur Aufrechterhaltung der Homöostase notwendig und werden für Entzugserscheinungen verantwortlich gemacht (vgl. Williams u. a. 2001).

Unter dem Begriff Desensitisierung werden die Wirkungsabschwächung durch Reduktion der Rezeptoranzahl bzw. -dichte und die funktionelle Entkoppelung des Rezeptors von seinen unmittelbar nachgeschalteten Effektoren zusammengefasst. Neben Veränderungen auf Rezeptorebene lassen sich funktionelle Entkoppelungen zu G-Proteinen im Sinne einer verminderten Bindung von GTP $\gamma$ S an die G $\alpha$ -Untereinheiten nach  $\mu$ -Rezeptoragonistenbindung nachweisen (Werling u. a. 1989; Selley u. a. 1997b).

Ein akuter Opioidentzug nach chronischer Vorbehandlung führt zu Entzugerscheinungen somatischer und psychischer Natur (Wesson und Ling 2003), die eine physische Abhängigkeit repräsentieren. Postuliert werden aktive Gegenregulation durch Heraufregulation der durch Opioide inhibierten Signalübertragungswege (Williams u. a. 2001; Mamiya u. a. 2001). Diese postulierte Heraufregulation entsprechender Mechanismen ließe nach Entzug des Pharmakons eine Dysbalance entstehen. In Experimenten mit Zellkulturen und zum Teil auch mit Hirngeweben aus chronisch mit Morphin vorbehandelten Tieren lässt sich in diesem Zusammenhang eine Verstärkung des AC-Systems beschreiben (Ammer und Christ 2002). Der akute Entzug bedingt die Steigerung des cAMP-Gehalts einer Zelle, der seinerseits cAMP-abhängige Mechanismen verstärkt. Durch eine Heraufregulation des AC/cAMP-Systems kommt es im Verlauf einer chronischen Drogeneinnahme auch zur verstärkten Aktivität der induzierten Transkriptionsfaktoren. Insbesondere der Faktor CREB wird dabei für Toleranzentwicklungen und physische Abhängigkeit verantwortlich gemacht (Nestler 2004; Ma u. a. 2001; Lane-Ladd u. a. 1997). Nebeneffekt der Heraufregulation des AC/cAMP-Systems ist die verstärkte, d.h. sensibilisierte AC-abhängige Inhibierbarkeit GABAerger Neurone im Opiatentzug durch akute Gabe eines  $\mu$ -Rezeptoragonisten (Shoji u. a. 1999; Chieng und Williams 1998).

Durch Mikroinjektionstechniken lassen sich über einen lokalisierten, präzipitierten Entzug Hirnareale und neuronale Strukturen identifizieren, die an der Ausprägung von somatischen, vegetativen und psychisch-aversiven Symptomen des Opioidentzugs beteiligt sind. Dem periaquäduktalen Grau (PAG) wird im Bezug auf vegetative und somatische Zeichen des akuten Entzugs besondere Bedeutung beigemessen. Eine elektrische Stimulation dieses Gebietes ruft entzugartige Symptome hervor (Laschka u. a. 1976; Maldonado u. a. 1992). Im akuten Entzug zeigen opioidsensitive und inhibitorische GABAerge Neurone des PAG Hyperaktivität, die mit den Entzugssymptomen korreliert. Es wird von einer cAMP-abhängigen GABA-Aktivität ausgegangen (Punch u. a. 1997).

Neben der GABAergen Vermittlung des Entzugs sind noradrenerge Systeme an den somatischen und aversiven Symptomen des Entzugs beteiligt. Die Verabreichung eines  $\alpha_2$ -Adrenorezeptoragonisten (z.B. Clonidin) dämpft Entzugerscheinungen (Buccafusco u. a. 1984; Ozdogan u. a. 2003). Der Rezeptor ist an u.a. inhibitorische G-Proteine gekoppelt und wird auf opioidsensitiven Neuronen u.a. der PAG ko-exprimiert. Die gesteigerte AC-Aktivität dieser Neurone und die cAMP-abhängigen Wirkungen auf die Freisetzung von Transmittern könnten schlussfolgernd über den  $\alpha_2$ -Rezeptor blockiert werden (vgl. Williams u. a. 2001). Kontrovers wird die Rolle des noradrenergen Nucleus Locus coeruleus diskutiert. Während einerseits nach Experimenten mit kompletter Entfernung des Areals davon ausge-

## 1 Einleitung

gangen wird, dass der Kern nicht direkt am Phänomen Opioidentzug beteiligt ist (Caillé u. a. 1999), wird andererseits die gesteigerte neuronale Aktivität im präzipitierten Entzug dargestellt (Ivanov 2001).

### 1.3.2 Dopaminerge Transmission und Verhalten

Untersucht man Veränderungen der dopaminergen Transmission im mesolimbischen System nach chronischer Verabreichung von Opioiden, werden zwei Phänomene beobachtet. Zum einen kommt es im akuten Entzug zur Verminderung der basalen elektrischen Aktivität dopaminerger Neurone und der basalen Dopaminausschüttung (Rossetti u. a. 1992). Zum anderen führt die Verabreichung eines  $\mu$ -Rezeptoragonisten im Entzug zu einer gesteigerten elektrischen Aktivität im Sinne einer Sensitisierung auf die Opioidwirkung. Auch die Dopaminausschüttung im mesolimbischen System zeigt eine relative Sensitisierung im akuten Entzug (Diana u. a. 1999).

Die erniedrigte basale Feuerungsrate dopaminerger Neurone des Ventralen Tegmentums und die erniedrigte basale Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens wird mit erhöhter inhibitorischer GABA-Ausschüttung und verminderter exzitatorischer Glutamatfreisetzung durch Interneurone in Verbindung gebracht. Letzteres könnte durch verstärkte präsynaptische Inhibition der exzitatorischen Glutamatfreisetzung nach Aktivierung von GABA<sub>B</sub>- und metabotropen Glutamatrezeptoren (mGluR2/3) durch endogenes GABA induziert sein (Manzoni 1999).

Veränderungen der mesolimbischen dopaminergen Transmission scheinen bei weiterer Betrachtung abhängig vom Modus der Substanzeinnahme bzw. der Verabreichung zu sein. Dies betreffend wurde im Tierexperiment zunächst eine chronisch kontinuierliche von einer intermittierenden, d.h. in größeren Zeitabständen erzwungenen Verabreichung von Morphin (s.c. Injektionen) unterschieden. Verstärkungen der in diesem Fall elektrisch evozierbaren Dopaminfreisetzung im mesolimbischen System traten nach dreiwöchigem Entzug nur nach der intermittierenden Vorbehandlung auf (Tjon u. a. 1994). An anderer Stelle ließ sich der Effekt nach intermittierender Verabreichung nach bereits einer Entzugswoche beschreiben. Die Sensitisierung mit erhöhter Dopaminfreisetzung im Nucleus accumbens nach erneuter Morphingabe war dort nach einem Zeitraum von fünf Wochen nicht mehr nachweisbar (Ojanen 2003).

Andere trennen zwischen selbstbestimmter wiederholter Einnahme und periodischer passiver Verabreichung. In einem entsprechenden Experiment zeigte sich in beiden Gruppen der Anstieg der dopaminergen Transmission nach Selbstverabreichung bzw. passiver Behandlung. Bereits ab dem zweiten Tag des Experimentes kam es zu qualitativen Unterschieden. In der Gruppe, die die Selbstverabreichung

erfahren bzw. erlernt hatte, ging den Selbstverabreichungen ein Anstieg des elektrochemisch gemessenen dopaminergen Signals voraus. Dieser Anstieg wurde als Korrelat eines Erregungszustandes angesehen, das mit Antrieb, Anreiz oder Vorwegnahme zu vereinbaren sei (Kiyatkin u. a. 1993; Kiyatkin und Rebec 1997).

Einen erweiterten Ansatz verfolgt der Versuch, Auswirkungen einer freiwilligen Langzeiteinnahme einer potentiell suchterzeugenden Substanz auf die dopaminerge Transmission zu beschreiben. Eine solche längerfristige, d.h. viele Wochen dauernde Selbstbestimmung des Konsums einer suchterzeugenden Substanz konnte dabei als entscheidende Voraussetzung in der Ätiologie der Sucht belegt werden (Wolffgramm 1991; Wolffgramm und Heyne 1995a). Die striatale dopaminabhängige Signaltransduktion alkoholsüchtiger Versuchsratten zeigte in diesem Zusammenhang eine signifikante Reduktion der Dopamin  $D_{1/5}$ -rezeptorstimulierten AC-Aktivität (May u. a. 1995).

In dem zugrunde liegenden substanzübergreifenden Modell (vgl. Heyne und Wolffgramm 1998) wird Ratten zusätzlich zur Substanz (Alkohol, Opiat, Amphetamin) gleichzeitig reines Wasser angeboten und damit die Möglichkeit eines freiwilligen, d.h. selbstbestimmten Konsums geschaffen. Die Entstehung einer Sucht verläuft bei den selbstbestimmt konsumierenden Versuchsratten in charakteristischen Phasen. Der Beginn der Einnahme ist regelmäßig durch intraindividuell stark schwankenden und nicht vorhersagbaren Konsum gekennzeichnet. Nach wenigen Wochen wird diese *Kennenlernphase* von einem *kontrollierten* Konsum abgelöst, in dem die von Versuchstieren eingenommenen individuellen Dosen niedriger liegen und jetzt auch stabil sind. Eine Vergällung der Substanzlösungen mit extrem aversiven Bitterstoffen führt in dieser Phase zu Einschränkung des Konsums (Heyne 1996b).

Nach dieser mehrmonatigen Zeit kommt es im Fall der Opioide bei einem Teil der freiwillig konsumierenden Tiere zu einem plötzlichen und steilen Anstieg der eingenommenen Dosen (Heyne 1996a). Zu diesem Zeitpunkt wird die Substanz entzogen und die Tiere zu einer mehrmonatigen Abstinenzperiode gezwungen. Wird die Lösung im Anschluss an diese Zeit wiederum auf gleiche Weise zur Wahl gestellt (Retest), zeigen diejenigen Tiere, die die Bedarfssteigerung nicht durchgemacht hatten, wiederum hohe Einstiegsdosen. Dann allerdings reduzieren sie den Konsum sehr schnell auf niedrige Dosen. Diejenigen Tiere, die dagegen einen Anstieg gezeigt hatten, verblieben während des gesamten Retest auf hohem Einnahmehiveau. Bei ihnen hatten soziales Umfeld und der Zusatz von aversiven Geschmacksstoffen keinen Einfluss auf den Konsum (Heyne 1996a).



## 1 Einleitung

Diese als süchtig identifizierten Tiere zeigten den suchtspezifischen Kontrollverlust über die Einnahme, wie er z.B. durch die Einnahme trotz Bitterstoff repräsentiert wird, und wiesen einen Reversibilitätsverlust des Konsummusters noch nach Zeitspannen auf, die einen Großteil ihres Lebens ausmachen. Versuchsratten, die parallel zur Gruppe des selbstbestimmten Konsums ohne diese Wahlmöglichkeit forciert behandelt worden waren, wurden nicht süchtig.

Neben den neurochemischen Veränderungen wie der oben genannten veränderten dopaminergen Transmission müssen Lernvorgänge in der Ätiologie der Sucht mitberücksichtigt werden, an deren Ende ein *Suchtgedächtnis* stehen könnte, das nahezu unauslöschlich scheint und zur Wiederholung des zwanghaft unkontrollierten Suchtverhaltens führt. Vorbedingung für diese Gedächtnisbildung sind offenbar zwei Lernprozesse, die zum einen die spezifische psychoaktive Wirkung einer Substanz und zum anderen die Möglichkeit der gezielten Induktion dieser Wirkung vermitteln. Nur der selbstbestimmte Konsum ermöglicht das Erlernen des Substanzgebrauchs zur Induktion der psychotropen Wirkungen. Der erzwungene Konsum, wie ihn die Ratten der forciert behandelten Gruppe erleben, bleibt primär an die Motivation Durst gekoppelt, die für die Ratten davon untrennbar mit den psychotropen Wirkungen verknüpft ist. Da Suchtverhalten nur in der wählenden Gruppe auftritt, muss davon ausgegangen werden, dass die Lernvorgänge des kontrollierten freiwilligen Konsums Voraussetzung für die pathologischen Lernvorgänge der geschilderten Übergangsphase sind, die als Lernen des Kontrollverlustes gewertet werden könnten (Heyne u. a. 2000) (vgl. Robbins und Everitt 2002).

Im Tierexperiment zeigen sich neben der sensitisierten Dopaminausschüttung auch Sensitisierungen für die motorisch stimulierenden Wirkungen der Opiode nach Vorbehandlung (Acquas und Chiara 1992; Bartoletti u. a. 1983). Zugleich werden Sensitisierungen in Platzpräferenzkonditionierungen beobachtet, die häufig als Tiermodell der Bewertung einer Substanz und ihrer verstärkenden Eigenschaften eingesetzt werden (Contarino u. a. 1997). Opiatunerfahrene Ratten zeigen innerhalb weniger Tage Präferenz für das Kompartiment, das mit einer Verabreichung assoziiert wurde. Eine Opiatvorbehandlung führt zur Verstärkung dieser Verhaltensantwort in der Konditionierung. Dabei zeigen die opiaterfahrenen Tiere die Präferenz signifikant früher und sprechen auf niedrigere Dosen an (Shippenberg u. a. 1996).

Derartige Sensitisierungen werden oft als Zunahme der verstärkenden und belohnenden Eigenschaften einer suchterzeugenden Substanz interpretiert, die eine zukünftige Einnahme fördern und mit dem Übergang vom kontrollierten in unkontrollierten Konsum in Beziehung stehen könnten (vgl. Hunts und Lands 1992). Sensitisierungen werden als ein von Einnahme zu Einnahme zunehmendes Missbrauchspotential einer Droge angesehen (vgl. Gaiardi u. a. 1991), deren Anziehungs-

kraft sich so schrittweise vergrößern könnte, bis eine Sucht daraus entstünde. Da sie über längere Zeiträume persistieren können, werden Sensitisierungen mit Rückfällen nach Phasen der Abstinenz in Zusammenhang gebracht (Vries u. a. 1998). Das so genannte Craving ist dabei ein überwältigendes Verlangen nach der Droge, sobald es nach Abstinenzperioden zu einem erneuten Kontakt mit assoziierten Stimuli käme. Einige Autoren gehen davon aus, dass eine Drogeneinnahme in diesem Zusammenhang schrittweise zur entscheidenden Alteration von Hirnregionen führt, die Verstärkung und Motivationsanreize vermitteln und die durch die Alteration für Drogen und drogenassoziierte Stimuli überempfindlich gemacht, d.h. sensitiert werden (Robinson und Berridge 2001, 1993). Sie betonen, dass es sich bei den dopaminabhängigen Hirnregionen um Schaltkreise handelt, die nicht die hedonistischen psychologischen Aspekte einer Drogeneinnahme, sondern die Bedeutung eines Anreizes oder Stimulus (incentive salience) für motiviertes Handeln vorgeben.

Abschließend sollen an dieser Stelle mögliche Folgen einer wiederholten Opiatgabe zusammengefasst dargestellt werden. **(a)** Die längerfristige Gabe eines Opioids kann zu *transienten* Entzugserscheinungen führen. Verantwortlich dafür wäre die Entwicklung einer physischen Abhängigkeit vor allem durch neuroadaptive Vorgänge im Bereich der G-Proteine und des AC/cAMP-Systems. Unklar ist, ob solche Neuroadaptationen in jedem Fall voll reversibel sind oder einen längeren Zeitraum überdauern können, der vom akuten Entzug unterschieden werden kann. **(b)** Der wiederholte selbstbestimmte Konsum eines Opioids kann sich unterscheidbar von der passiven Aufnahme auf die dopaminerge Transmission im mesolimbischen System auswirken. **(c)** Der intermittierende Opioidkonsum kann *persistierende* Sensitisierungen des lokomotorischen bzw. motivierten Verhaltens und der dopaminergen Neurotransmission im mesolimbischen System hervorrufen. **(d)** Der selbstbestimmte Konsum eines Opioids kann *persistierend* in psychischer Abhängigkeit, d.h. in eine Suchterkrankung münden.

## 1.4 Eigene Fragestellung

In der vorliegenden tierexperimentellen Arbeit sollte geprüft werden, ob es protrahierte neuroadaptive Veränderungen nach längerfristiger Opioidaufnahme gibt, ohne dass ein süchtiges Konsummuster vorlag. Damit diese Voraussetzung erfüllt werden konnte, sollte mit nicht süchtigen Tieren gearbeitet werden. Ein zweiter Aspekt des Experimentes war der Einfluss des Einnahmemodus auf eventuelle adaptive Vorgänge. Verglichen werden sollten der selbstbestimmte und der erzwungene Konsum.

## 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit orientierte sich an dem beschriebenen Tiermodell zur Suchtentstehung (Wolffgramm und Heyne 1995b). Im Modell der oralen Aufnahme werden Trinkflaschen mit einer oral resorbierbaren Opioidlösung befüllt und in den Käfig der Versuchsratten gehängt. Es unterscheidet zwischen freiwilliger und erzwungener (*forcierter*) Substanzeinnahme. Die forciert behandelte Gruppe erhielt ausschließlich Opioidlösung und nahm aus diesem Grund bei jeder Flüssigkeitsaufnahme zwangsläufig Opioid zu sich. Eine zweite Gruppe konnte zusätzlich zur Opioidlösung auch auf reines Leitungswasser zugreifen. Durch den Zusatz von Essigsäure zur Opioidlösung sollten diese Tiere die Möglichkeit erhalten, die Lösung geschmacklich bzw. am Geruch vom Leitungswasser zu unterscheiden und damit über eine Wahlmöglichkeit verfügen. Die substanzkonsumierenden Gruppen wurden durch eine Kontrollgruppe ergänzt, die über die gesamte Versuchszeit ausschließlich Leitungswasser erhielt.

Alle Ratten der selbstbestimmt einnehmenden Gruppe sollten bei Beendigung der Verabreichung ein kontrolliertes Konsumverhalten etabliert haben. Um diese Bedingung erfüllen zu können, wurde die aus den Vorversuchen bekannte Zeitcharakteristik der Suchtentwicklung beachtet. Um kontrollierten Konsum gewährleisten und Sucht auszuschließen zu können, sollten die Tiere das Opioid dementsprechend mindestens fünf Wochen höchstens aber 20 Wochen konsumieren können (Heyne 1996a). Aus praktischen Gründen wurde ein Einnahmezeitraum von insgesamt acht Wochen festgelegt.

Die *Freiwilligkeit* der Aufnahme war in den früher durchgeführten Experimenten Vorbedingung für die Entstehung der Sucht; nur die Gruppe der selbstbestimmten Einnahme zeigte Symptome des Kontrollverlustes und der Persistenz dieses Merkmals über große Zeiträume (Wolffgramm und Heyne 1995a; Heyne und Wolffgramm 1998). Verglichen mit kontrolliert trinkenden Tieren offenbarte die Gruppe darüber hinaus signifikante und irreversible Änderungen der striatalen dopaminergen Transmission (May u. a. 1995). Hier sollte untersucht werden, ob die Freiwilligkeit der Einnahme zu neuroadaptiven Effekten führen könnte, die im Gegensatz dazu bereits vor Manifestation einer Sucht auftreten würden.

Neuroadaptive Vorgänge nach chronischer Opioidaufnahme können Ausdruck einer Toleranzentwicklung bzw. physischen Abhängigkeit sein und sich *transient* im akuten Entzug offenbaren. Dagegen sollte in der eigenen Arbeit auch geprüft werden, ob es Effekte gibt, die einen *transienten* akuten Entzug überdauern. Um Ergebnisse von akuten Entzugserscheinungen unterscheiden zu können, sollten neurochemische Untersuchungen nach chronischer Einnahme einerseits im Stadium eines akuten Opioidentzugs vorgenommen und andererseits mit Untersuchungen verglichen werden, die im zeitlich ausreichenden Abstand zur Phase des akuten



Entzugs durchgeführt wurden. Zu diesem Zweck wurde den Tieren der Opioid konsumierenden Gruppen das Opioid nach der achtwöchigen Bereitstellung entzogen. Eine Hälfte der Tiere wurde nach zwei Tagen auf dem Höhepunkt des akuten Entzugs (Heyne 1996a) getötet. Die andere Hälfte bekam im Anschluss an den Entzug der Lösung Zugang zu reinem Wasser und wurde nach sechs Wochen getötet. Ein Vergleich von neurochemischen Untersuchungen an Geweben der Gruppen im akuten und protrahierten Entzug sollte es ermöglichen, transiente und protrahierte Effekte zu beschreiben und voneinander abzugrenzen.

Persistierende Sensitisierungen der dopaminergen Transmission im mesolimbischen System wurden nach Injektionen beobachtet. Es wird davon ausgegangen, dass die stressbehafteten Begleitumstände der Verabreichung einer psychoaktiven Substanz wie z.B. Nadelstiche mitentscheidend für Sensitisierungen sein könnten (Crombag u. a. 1996). Durch die beschriebene nicht invasive orale Verabreichung als Lösung sollten derartige Einflüsse vermieden werden. Als Opioid wurde Etonitazen (ETZ) verwendet, das als selektiver  $\mu$ -Rezeptoragonist (Dhawan u. a. 1996) eine im Vergleich zu Morphin 1000fach stärkere Potenz besitzt (Sala u. a. 1992; Zernig u. a. 1995) und unter Vermittlung von Essigsäure gut in Wasser lösbar und enteral resorbierbar ist.

Bei der Untersuchung evtl. neuroadaptiver Vorgänge nach längerfristiger selbstbestimmter bzw. forcierter Aufnahme eines Opioids interessierten primärer Wirkort der Opioidanalgetika ( $\mu$ -Opioidrezeptor), die transmembranäre bzw. intrazelluläre Signalübertragung (G-Proteine, AC/cAMP) und Bestandteile der dopaminergen Transmission in Hirnarealen, die mit den verstärkenden bzw. motivationellen Wirkungen der Opioiden in Verbindung gebracht werden. Zur Charakterisierung des  $\mu$ -Opioidrezeptors und der gekoppelten G-Proteine wurden standardisierte Hirnschnitte durchgeführt, die Anteile des an Bindungsstellen reichen Kortex isolieren sollten. Die Sektion des Mittelhirns schloss sich an, um u.a. das ventrale Tegmentum mit untersuchen zu können. Zur Beschreibung der dopaminabhängigen Transmission wurde ein Projektionsareal des mesolimbischen Systems präpariert, das insbesondere den Nucleus accumbens umfassen sollte. Es wurden Rezeptorbindungsstudien am  $\mu$ -Rezeptor durchgeführt, um Aufschluss über evtl. veränderte Bindungsdichte und Affinität des Rezeptors für den verwendeten Liganden zu erhalten. Bei Betrachtung der nachgeschalteten Station sollten quantitative und qualitative Aspekte einer möglicherweise veränderten Koppelung von  $\mu$ -Opioidrezeptor und G-Proteinen beachtet werden. Zur Beschreibung neuroadaptiver Vorgänge in der dopaminabhängigen Signalübertragung wurden Bindungsstudien am Dopamin D<sub>1/5</sub>-Rezeptor durchgeführt, um auch hier Aussagen über Rezeptorzahl und Affinität zum verwendeten Liganden treffen zu können. Mit Hilfe der Messung des

## 1 Einleitung

cAMP-Umsatzes nach indirekter und direkter Stimulation bzw. Inhibition der Adenylatzyklase sollten dann potentielle Veränderungen der AC-Aktivität bzw. der Signaltransduktion zum Enzym hin aufgedeckt werden. Da die transmembranäre Signaltransduktion nacheinander geschaltet vom Rezeptor über G-Proteine zur Adenylatzyklase verläuft, kann eine Beeinflussung der Enzymaktivität auf jeder dieser drei Stufen erfolgen. Eventuelle adaptive Veränderungen der einzelnen Komponenten dieser Signalkaskade einschließlich der AC selbst könnten sich so auf den Substratumsatz des Enzyms auswirken und sollten durch Messung nach gezielter Aktivierung bzw. Inhibition einzelner Stationen der Signalübertragung offen gelegt werden.

Zusammenfassend sollten in der vorliegenden Arbeit neuroadaptive Vorgänge nach chronischer Opioidvorbehandlung nachgewiesen werden. Hier galt das Interesse zum einen hypothetischen Veränderungen, die einen transienten akuten Entzug überdauern würden. Zum anderen ging es dabei um einen eventuellen Einfluss der Selbstbestimmung des (kontrollierten) Konsums gegenüber einer erzwungenen Substanzeinnahme. Aus diesem Grunde wurden in einem achtwöchigen Etonitazentrinkversuch erzwungene Einnahme und freie Wahl der Substanzeinnahme etabliert. Die Tötung der Tiere erfolgte im akuten bzw. im protrahierten Entzug. Danach schlossen sich neurochemische Untersuchungen an. Es wurde davon ausgegangen, dass Bindungsdichte und Bindungsaffinität des  $\mu$ -Opioid- bzw. des Dopamin  $D_{1/5}$ -Rezeptors, G-Proteinanzahl, G-Proteinkoppelung und Aktivität der Adenylatzyklase verändert sein könnten. Die Untersuchung erfolgte einerseits in Hirnarealen mit hoher  $\mu$ -Rezeptorbindungsdichte. Andererseits wurden Teile des mesolimbischen Systems erfasst, weil von Adaptationen der dopaminergen Transmission in einem Schaltkreis ausgegangen wurde, der substanzübergreifende Bedeutung besitzt (vgl. [May u. a. 1995](#)). Eine Veröffentlichung von Teilergebnissen der vorliegenden Arbeit erfolgte mit Genehmigung der Humboldt Universität Berlin ([May u. a. 1998, 1999](#)).

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tiere und Haltungsbedingungen**

72 männliche Wistar-Ratten, die bei Lieferung 100-120 g wogen und ca. sechs Wochen alt waren, wurden als Versuchstiere verwendet (Züchter: Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin.) Nach Ankunft in den Versuchsräumen wurden die Ratten zur Akklimatisierung für vier Wochen in Gruppen mit jeweils vier Tieren in Makrolon-Käfigen (595 x 380 x 200mm) gehalten. Im Anschluss an die vierwöchige Akklimatisation wurden die Tiere auf Makrolon-Einzelkäfige (425 x 266 x 155mm) verteilt und zunächst weitere vier Wochen ausschließlich mit Wasser und Futter (Altromin 1324-Standard-Futter, in einer Vertiefung des Käfigdeckels) versorgt. Zweimal wöchentlich erfolgte die Umsetzung der Tiere in saubere Käfige mit frischer Streu und die Bestimmung des Körpergewichts, Futter- und Flüssigkeitsverbrauchs. Dazu wurden die Tiere einzeln auf eine Standardwaage gesetzt und das aktuelle Körpergewicht in Gramm gemessen. Zusätzlich wurden Trinkflaschen und unverbrauchtes Futter gewogen. Der Flüssigkeits- und Futterverbrauch (jeweils in Gramm) wurde anschließend aus der Gewichts Differenz der Flaschen und des Futters zum vorangegangenen Mess-tag berechnet. Alle drei Parameter wurden auf einem Standard-PC in ein Verrechnungssystem eingegeben. Während der gesamten Versuchszeit betrug die Durchschnittstemperatur 22 °C bei 50 % Luftfeuchtigkeit. Die Tiere waren einem 12/12 h Hell-Dunkel-Rhythmus ausgesetzt, dessen Dunkelphase um 16:00 Uhr begann und um 4:00 Uhr endete. Bis zum Beginn des Etonitazentrinkversuchs war Wasser für alle Tiere ad libitum verfügbar.

### **2.2 Etonitazentrinkversuch.**

Für den eigentlichen achtwöchigen Etonitazentrinkversuch wurden die 72 Ratten nach vierwöchiger Haltung in Einzelkäfigen randomisiert auf drei aus jeweils 24 Tieren bestehende Versuchsgruppen verteilt. Alle Ratten verblieben für den gesamten Versuch in Einzelhaltung, damit in jeder Phase des Experimentes Individualwerte des Flüssigkeits- und Futterverbrauchs und der eingenommenen Etonitazendosis bestimmt werden konnten.

## 2 Material und Methoden

Die erste Gruppe erhielt Zugang zu drei mit Etonitazenlösungen (0.5, 1 und 2 mg/l) gefüllten Trinkflaschen und einer zusätzlichen mit Leitungswasser gefüllten Trinkflasche. Diese Gruppe konnte somit zwischen Wasser und Etonitazen *wählen* (*Wahl-Gruppe*). Die zweite Gruppe erhielt eine einzelne mit Etonitazenlösung (0.5 mg/l) gefüllte Trinkflasche. Diese forciert behandelten Tiere mussten ihren Flüssigkeitsbedarf aus der Etonitazenlösung decken (*Forcierte Gruppe*). Die Kontrollgruppe bekam ausschließlich Leitungswasser. Um eine Löslichkeit und Haltbarkeit der Substanz Etonitazen zu erreichen, beinhalteten alle drei Lösungen proportional zu den Etonitazenkonzentrationen Essigsäure in drei verschiedenen Konzentrationen (0.125, 0.25 und 0.5 ml/l). Die unterschiedlichen Essigsäurekonzentrationen sollten darüber hinaus den Tieren die Differenzierung der einzelnen Etonitazenkonzentrationen bzw. zum reinen Leitungswasser anhand des Geschmacks und des Geruchs ermöglichen (Heyne 1996a). Die Lösungen wurden alle zwei Wochen vollständig durch frische Lösung ersetzt. In der Zwischenzeit verbrauchte Flüssigkeit wurde durch die entsprechende Lösung aufgefüllt, von der ein Vorrat bei 4 °C gelagert wurde. Da bei jedem Lösungswechsel die Position der Flaschen im Rotationsverfahren verändert wurde, waren für die Tiere neben der psychotropen Wirkung Geschmack und Geruch der Essigsäure die einzigen Möglichkeiten, die Flaschen und damit die einzelnen Konzentrationen zu identifizieren.

Körpergewicht, Futter- und Flüssigkeitsverbrauch wurden auf die oben beschriebene Weise bestimmt. Aus dem entsprechenden Verbrauch aus den Flaschen mit Etonitazen konnte der Opioidverbrauch der einzelnen Tiere berechnet werden. Die Versuchsratten beider etonitazenkonsumierenden Gruppen (*Wahl* und *Forciert*) erhielten die Lösungen über einen Zeitraum von acht Wochen. Die Kontrollgruppe erhielt während dieser Zeit Leitungswasser. Im Anschluss an die Bereitstellung der Etonitazenlösungen wurde das Opioid entzogen. Jeweils eine Hälfte aller drei Gruppen (jeweils  $n = 12$ ) wurde im Anschluss nach einem zwei Tage dauernden spontanen Entzug getötet und wird im Folgenden als *akute* Gruppe bezeichnet. Die andere Hälfte bekam im Anschluss an den Trinkversuch über einen Zeitraum von sechs Wochen ausschließlich Wasser als Trinkflüssigkeit und wurde erst nach dieser Abstinenzperiode getötet. Die Tiere dieser hier als *protrahiert* bezeichneten Gruppe verblieben bis zur Tötung in Einzelhaltung. Individuelle Körpergewichte sowie Wasser- und Futterverbrauch wurden auch während der sechswöchigen Abstinenzperiode weiterhin aufgezeichnet.

### 2.2.1 Präparation

Die Tötung der Ratten erfolgte in der Dunkelphase zwischen 18:00 und 20:00 Uhr durch Dekapitation bei schwachem Rotlicht. Unmittelbar danach schlossen sich die

Dissektion des Hirns und die Präparation der einzelnen Hirnabschnitte an (Glowinski und Iversen 1966). Zunächst wurde das Rhombencephalon durch transversalen Schnitt vom Rest des Hirns getrennt. Anschließend wurde ein transversaler Schnitt in Höhe des Chiasma opticum und vorderer Kommissur vorgenommen, der das Cerebrum in Hälften teilte. Der vordere Abschnitt beinhaltete Großhirnrinde und ventrale Anteile des limbischen Systems bzw. des Striatums, die vorsichtig vom Kortex separiert wurden. Der hintere Abschnitt wurde weiter aufgeteilt, indem das Mittelhirn vom Kortex getrennt wurde. Der hier verwendete Terminus *frontaler Kortex* bezeichnet dabei den frontalen Teil der Großhirnrinde (nach dem initialen transversalen Schnitt auf Höhe des Chiasma opticum); der Terminus *parietaler Kortex* die restliche Großhirnrinde; der Terminus *Mittelhirn* umfasste Mittelhirn, den Thalamus, subthalamische Abschnitte und den Hypothalamus. Der hier als *limbisches Vorderhirn* bezeichnete Abschnitt beinhaltete ventrales Striatum (Nucleus accumbens, Tuberculum olfactorium). Das präparierte Gewebe wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und danach bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert.

## 2.3 Neurochemische Untersuchungen

Pharmaka treffen in biologischen Systemen u.a. auf transmembranär gelegene für diese Pharmaka spezifische *Erkennungsstellen*. Die Bindung an eine solche als Rezeptor bezeichnete Stelle kann durch transmembranäre und intrazelluläre Signalübertragung zu biologischen Antworten der betroffenen Zelle führen. Die pharmakologische in vitro Untersuchung von Rezeptoren benutzt synthetisierte Liganden, die mit hoher Spezifität an diese Strukturen binden. Diese Liganden gehen mit den Rezeptoren Bindungen ein, die als reversible bimolekulare Reaktionen unter Gleichgewichtsbedingungen nach dem Massenwirkungsgesetz ablaufen (Hrdina 1986). Die Liganden können zum einen intrinsische, d.h. agonistische Wirkung entfalten, indem sie eine biologische Antwort erzeugen. Zum anderen können sie als Antagonisten spezifisch und reversibel binden ohne eine Signalübermittlung ins Innere der Zelle auszulösen.

Rezeptorbindungsstudien gehen von der Annahme aus, dass ein Gewebe eine endliche Anzahl spezifischer Rezeptoren besitzt, die durch steigende Konzentrationen eines agonistischen oder antagonistischen Liganden abgesättigt werden können. Die Zugabe eines zweiten an diese Stelle spezifisch bindenden Moleküls führt dabei zur kompetitiven *Verdrängung* des Liganden von dieser Bindungsstelle. Radioaktiv markierte Liganden werden verwendet, um Aussagen über die Bindungsdichte des Rezeptors in einem Gewebe treffen zu können. Durch Bestimmung der Dissoziationskonstante unter Gleichgewichtsbedingungen soll die Affinität des Re-

## 2 Material und Methoden

zeptors für den Liganden bestimmt werden. Die spezifisch an das Gewebe gebundenen radioaktiven Liganden müssen dazu allerdings vom ungebundenen radioaktiven Liganden getrennt werden. Inkubierte Membran-Liganden-Lösungen werden deshalb zunächst über Systeme filtriert, die in der Lage sind die (markierten oder nicht markierten) Membranpartikel zurückzuhalten und nicht gebundenen Liganden passieren zu lassen. Da der Ligand zu einem gewissen Grad auch unspezifisch an Gewebsbestandteile, Filteroberflächen etc. bindet, muss darüber hinaus diese unspezifische Bindung bestimmt werden. Dazu werden zunächst in gesonderten Gewebeproben alle Bindungsstellen durch hohe Konzentrationen eines spezifischen Antagonisten/Agonisten abgesättigt und dann mit radioaktivem Liganden versetzt. In einer zweiten Probe wird die Gesamtbindung ermittelt, indem einer Gewebeprobe radioaktiver Ligand beigelegt wird. Die unspezifische Bindung ergibt sich aus der Subtraktion der Bindung nach Sättigung aller Bindungsstellen durch einen zweiten Agonisten/Antagonisten von der Gesamtbindung. Die unspezifische Bindung muss im Folgenden von der ermittelten Bindung jeder Probe abgezogen werden.

Zur Charakterisierung eines Rezeptors können u.a. Gewebehomogenate verwendet werden. Diesen kann ein radioaktiv markierter Ligand unter Bedingungen hinzugefügt werden, die den *in situ* Bedingungen möglichst nahe kommen (*pH*-Wert, Temperatur etc.) und so den höchsten Grad an spezifischer Bindung erlauben. Die Messung der Bindung erfolgte hier durch Flüssigkeitsszintillationszählung (Wood u. a. 1993). Die Impulse pro Minute (counts per minutes; cpm) konnten unter Berücksichtigung der Zählrohrbeute, d.h. nach Korrektur durch Quenchkurven, als Zerfall pro Minute (decay per minute; dpm) berechnet werden. Die ermittelte spezifische Bindung (dpm) wird im Folgenden nach kinetischen Gesichtspunkten analysiert, um maximale Bindungsdichte ( $B_{max}$ ) und Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) bestimmen zu können. Dazu können die Bindungsdaten in Sättigungskurven übertragen werden oder in so genannten linearen Scatchard-Plots mit Hilfe der Scatchard-Gleichung (Scatchard 1949) analysiert werden.

$$\frac{B}{F} = \frac{B_{max} - B}{K_d}$$

In den Sättigungskurven werden spez. Bindung (dpm) und entsprechend eingesetzte Liganden-Konzentration gegeneinander aufgetragen. Für die Darstellung in Scatchard-Plots müssen die Bindungsdaten transformiert werden, damit die Konzentration des gebundenen Liganden (B) in fmol/mg Protein gegen den Quotienten von gebundenem und freiem Liganden (B/F) aufgetragen werden kann. Hier kann die max. Bindungsdichte am Schnittpunkt der Gerade mit der X-Achse abgelesen

werden (Hrdina 1986).

In den Enzymassays zur Bestimmung der Aktivität der Adenylatzyklase unter inhibierten bzw. stimulierten Bedingungen musste der Substratumsatz gemessen werden. Dazu wird radioaktiv markiertes Substrat eingesetzt und das radioaktive Produkt der enzymatischen Reaktion im Anschluss isoliert. Die Menge des gebildeten Produktes wird mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationszählung gemessen. Die verwendete Methode macht sich in diesem Fall die Eigenschaft des hochenergetischen  $\beta$ -Strahlers  $^{32}\text{P}$  zunutze, Licht-Emissionen (Wellenlänge zw. 300 - 700 nm) als Čerenkov-Strahlung in Wasser hervorrufen zu können. Čerenkov-Strahlung entsteht, wenn sich ein geladenes Teilchen durch ein lichtdurchlässiges Medium wie z.B. Wasser mit einer höheren Geschwindigkeit als der Phasengeschwindigkeit des Lichtes in dem betreffenden Medium bewegt (Johnson und Walseth 1979).

Um Veränderungen auf Ebene der  $\mu$ -Opioidrezeptoren beschreiben zu können, wurden Rezeptorbindungsstudien mit dem selektiven  $\mu$ -Agonisten [ $^3\text{H}$ ]DAMGO im frontalen Kortex, im parietalen Kortex und im Mittelhirn durchgeführt. Dadurch sollten einerseits Areale mit zu erwartender hoher Bindungsdichte erfasst werden und andererseits Anteile mit einbezogen werden, die an den verstärkenden Eigenschaften der Opioide beteiligt sind.

G-Proteine können einerseits als Rezeptoren für Guanosinphosphate aufgefasst werden. Deshalb wurden im parietalen Kortex Bindungsstudien mit dem Liganden [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S durchgeführt. Andererseits können sie als Enzym angesehen werden, weil sie nach Aktivierung durch den  $\mu$ -Rezeptor den Austausch von GDP gegen GTP und die Hydrolyse von GTP zu GDP katalysieren. Die Bindungsdaten der G-Proteine wurden deshalb als Konzentrations-Wirkungskurven analysiert, um dem Enzymcharakter der G-Proteine Rechnung zu tragen. Es ergaben sich  $EC_{50}$  (Konzentration mit halbmaximaler Wirkung in nmol/l) und  $E_{max}$  (maximale Wirksamkeit in fmol/mg Protein). Damit die Stimulierbarkeit der [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung durch Aktivierung des Opioidrezeptors gemessen werden konnte, sollten die Bindungsstudien zusätzlich in Anwesenheit eines Opioids durchgeführt werden. Um optimale Bedingungen für die Stimulation des Austausches zu erreichen, mussten Ungleichgewichtsbedingungen durch Zugabe von GDP im Überschuss gewählt werden (Traynor und Nahorski 1995).

Adaptationen der dopaminergen Transmission wurden im *limbischen Vorderhirn* (u.a. Nucleus accumbens) untersucht, das ein Projektionsareal des Ventralen Tegmentums darstellt. Dazu wurde die Dopamin  $D_{1/5}$ -Rezeptorbindung mit Hilfe des Liganden [ $^3\text{H}$ ]SCH23390 bestimmt. Außerdem wurde sowohl die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase über  $D_{1/5}$ -Rezeptoren,  $G_{s/olf}$ -Proteine (Zhuang u. a. 2000) und den direkten Aktivator Forskolin als auch die Inhibierbarkeit der Adenylatzykla-



## 2 Material und Methoden

se über  $G_{i/o}$ -Proteine untersucht. Die Inhibierbarkeit der Adenylatzyklaseaktivität lässt sich deutlicher messen, wenn das Enzym zunächst durch Forskolin direkt stimuliert wird (Schultz und Jakobs 1986).

### 2.3.1 Gewebsaufbereitung

#### Homogenate für Bindung an $\mu$ -Rezeptor und G-Proteine

Vor Durchführung der neurochemischen Untersuchungen erfolgte die Aufarbeitung des eingefrorenen Gewebes getrennt nach einzelnen Tieren und präpariertem Hirnabschnitt im Kühlraum bei 4 °C. Sie bestand aus mehreren Homogenisations- und Inkubationsschritten.

#### Lösung:

1. Pufferlösung: Tris-HCl (50 mmol/l, pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur).

#### Arbeitsschritte:

- I. Die Regionen *frontaler Kortex*, *Mittelhirn* und *parietaler Kortex* wurden in 10 ml Pufferlösung in Glas-Teflon-Homogenisatoren bei 1.000 Umdrehungen pro Minute (UpM) mit 10 Hüben homogenisiert und anschließend für 10 Minuten bei 40.000 g zentrifugiert.
- II. Der Überstand wurde verworfen. Die Pellets wurden in 10 ml Pufferlösung mit fünf Hüben rehomogenisiert.
- III. Je 1 ml der Homogenate des *parietalen Kortex* wurden als Aliquots für die [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien abgefüllt und bis zu den Tests bei - 80 °C gelagert.
- IV. Die restlichen Homogenate für die  $\mu$ -Rezeptorbindung wurden für 30 Minuten bei 35 °C im Schüttelwasserbad zur Dissoziation und zum Abbau endogener Opioiden inkubiert und im Anschluss erneut für 10 Minuten bei 40.000 g zentrifugiert.
- V. Die Pellets aus *frontalem Kortex* oder *Mittelhirn* wurden in 3.3 ml, die Pellets aus *parietalem Kortex* in 5.7 ml Puffer rehomogenisiert und bis zur Verwendung bei - 80 °C gelagert.

#### Homogenate für die Dopamin $D_{1/5}$ -Bindung u. Adenylatzyklaseassays

Die Aufbereitung des eingefrorenen Gewebes des *limbischen Vorderhirns* für die  $D_{1/5}$ -Rezeptorbindung und die Adenylatzyklaseassays erfolgte für jedes Tier ge-



sondert bei 4 °C und bestand aus mehreren Homogenisations- und Inkubationsschritten. Für die einzelnen Arbeitsschritte wurden verschiedene Lösungen verwendet. Magnesiumchlorid wurde eingesetzt, weil es zur enzymatischen Substratumsetzung von der Adenylatzyklase benötigt wird (Schultz und Jakobs 1986). Pargylin ist ein Monoaminoxidase-Hemmstoff, der den Abbau des in den Bindungsstudien verwendeten Dopamins unterbinden sollte (May 1992). EGTA wird als Chelatbildner eingesetzt, um Kalzium zu binden, und so eine Aktivierung der AC durch Kalzium zu verhindern (vgl. Schultz und Jakobs 1986).

#### Lösungen:

1. Lösung I: EGTA (1 mmol/l) in Tris-HCl-Puffer (10 mmol/l, pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur)
2. Lösung II: EGTA (1 mmol/l), MgCl<sub>2</sub> (4 mmol/l) in Tris-HCl-Puffer bei 21 °C Raumtemperatur (10 mmol/l, pH 7.4)
3. Lösung III: EGTA (1 mmol/l) in Tris-HCl-Puffer (50 mmol/l, pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur)
4. Lösung IV: MgCl<sub>2</sub> (4 mmol/l), Pargylin (10 µmol/l) in Tris-HCl-Puffer (50 mmol/l, pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur)

#### Arbeitsschritte:

- I. Nach dem Auftauen wurde das Gewebe zunächst in 10 ml Lösung I mit 10 Hüben eines Glass-Teflon-Homogenisators bei 1000 UpM homogenisiert und für 10 Minuten bei 40.000 g zentrifugiert.
- II. Die Pellets wurden in 10 ml Lösung II mit 5 Hüben rehomogenisiert.
- III. 1 ml Homogenate für die Untersuchungen der Inhibition der Adenylatzyklase wurden in Eppendorfgefäße umgefüllt und bei - 80 °C gelagert.
- IV. Die übrigen Homogenate wurden für 15 Minuten bei 37 °C im Schüttelwasserbad zum Abbau von endogenen Monoaminen und GTP inkubiert und in 1 ml-Aliquots (Stimulation der AC) und 8 ml-Aliquots ([<sup>3</sup>H]SCH23390-Bindung) aufgeteilt.
- V. Alle Homogenate (1 ml und 8 ml) wurden anschließend erneut für 10 Minuten bei 40.000 g zentrifugiert.
- VI. Die Pellets für die Stimulation der AC wurden in 1 ml Lösung III mit 5 Hüben rehomogenisiert und bei - 80 °C bis zur Verwendung gelagert.

## 2 Material und Methoden

VII. Die Pellets für die [<sup>3</sup>H]SCH23390-Bindungsstudien wurden in 5.7 ml Pufferlösung IV rehomogenisiert, anschließend über 10 Minuten bei 37 °C im bewegten Schüttelwasserbad inkubiert und bei - 80 °C gelagert.

### 2.3.2 Proteinbestimmung

Die als Absolutwerte gemessenen Bindungsdaten und Substratumsätze in den einzelnen Proben werden erst dann aussagekräftig, wenn sie auf den tatsächlichen Proteingehalt einer Probe bezogen werden können. Nur so können Tiere und Gruppen miteinander verglichen werden. Aus diesem Grunde erfolgte die Bestimmung des Proteingehalts der Gewebshomogenate einzelner Tiere durch den BIORAD® Mikroproteinassay nach Bradford ([Bradford 1976](#)). Dazu muss eine Eichgerade hergestellt werden, die als Referenz für den Proteingehalt der Gewebshomogenate dient. Es werden definierte Mengen einer Proteinlösung mit einer definierten Menge einer färbenden Substanz (BIORAD®) versetzt, die an das Protein bindet und die Lichtabsorption der Lösung proportional zur gebundenen Menge verändert. Die Lichtabsorption der einzelnen Lösungen wird im Photometer gemessen und als Eichgerade aufgetragen. Anschließend werden die verwendeten Gewebshomogenate einzelner Tiere mit der gleichen Menge an Färbelösung angereichert und die Lichtabsorption der Proben bei identischer Wellenlänge im Photometer gemessen. Die Bestimmung des tatsächlichen Proteingehalts der Proben erfolgt nun durch Vergleich mit der Eichgerade.

#### Lösungen:

1. Rinderserumalbumin (RSA): 2 mg RSA in 20 ml H<sub>2</sub>O gelöst, entspricht 1 µg RSA in 10 µl H<sub>2</sub>O.
2. BIORAD®-Reagenz

#### Erstellung der Eichgerade:

- I. Sieben verschiedene Volumina der RSA-Lösung (10- 120 µl) wurden in Küvetten pipettiert (Triplikate) und mit H<sub>2</sub>O auf 800 µl aufgefüllt. In drei weitere Küvetten wurden 800 µl H<sub>2</sub>O pipettiert (Leerwert-Probe).
- II. In alle 24 Proben (1 ml) wurden 200 µl BIORAD® Reagenz pipettiert. Der Inhalt wurde durchmischt (Vortex) und in Küvetten transferiert.
- III. Die Absorption der farbigen RSA Proben wurden innerhalb eines Zeitraumes von 5 Minuten bis 1 Stunde ab dem Zeitpunkt der Zugabe der BIORAD® Reagenz im Photometer bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen. Die Werte wurden anschließend als Standardkurve aufgetragen.

### Proteingehalt der Homogenate:

- I. Die Homogenate wurden 10 Sekunden lang mit Ultraschall behandelt (Sonifier), um die Membranpartikel zu zerkleinern und somit besser pipettieren und photometrieren zu können. Die Proben aus Homogenaten des *frontalen Kortex*, des *Mittelhirns* und des *parietalen Kortex* (DAMGO- und GTP $\gamma$ S-Bindung) wurden dann mit H<sub>2</sub>O (Verhältnis 1:10) verdünnt. Die Proben aus Homogenaten des *limbischen Vorderhirns* ([<sup>3</sup>H]SCH23390-Bindung und Adenylatzyklaseassays) blieben unverdünnt.
- II. Pro Homogenat wurden zwei verschiedene Volumina (jeweils in Duplikaten) in Küvetten pipettiert und mit H<sub>2</sub>O auf 800  $\mu$ l aufgefüllt. Die Proben aus *frontalem Kortex* und *Mittelhirn* enthielten jeweils 30 und 60  $\mu$ l, die Proben des *parietalen Kortex* 10 und 20  $\mu$ l und die Proben des *limbischen Vorderhirns* 10 und 15  $\mu$ l (Adenylatzyklaseassays) bzw. 15 und 30  $\mu$ l ([<sup>3</sup>H]SCH23390-Bindungsstudien) Homogenat.
- III. Zu allen Proben wurden 200  $\mu$ l BIORAD®-Reagenz pipettiert.
- IV. Die Absorption der farbigen Proben wurde innerhalb eines Zeitraumes von 5 Minuten bis 1 Stunde ab dem Zeitpunkt der Zugabe der BIORAD®-Reagenz im Photometer bei 595 nm gemessen.
- V. Der Proteingehalt der Proben in  $\mu$ g wurde mit Hilfe der Eichgerade relativ zum RSA Proteingehalt bestimmt.

### 2.3.3 [<sup>3</sup>H]DAMGO-Bindung

Es wurde von der Hypothese ausgegangen, dass die Einwirkung des  $\mu$ -Agonisten zur numerischen Veränderung des primären Wirkortes im Sinne einer Rezeptor-downregulation führen könnte. Gleichzeitig wurde eine Alteration durch Entkopplung von Rezeptor zu G-Protein für möglich gehalten. Zur Charakterisierung des  $\mu$ -Opioidrezeptors sollten die Bindungseigenschaften des hochselektiven Agonisten [<sup>3</sup>H]DAMGO an Homogenaten *des frontalen Kortex*, des *Mittelhirns* (Hypothalamus beinhaltend) und des *parietalen Kortex* einzelner Tiere untersucht werden. Zur Bestimmung der maximalen Bindungsdichte ( $B_{max}$ ) und der Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) wurden die Rezeptorbindungsstudien als *homologe* Verdrängungsexperimente durchgeführt (Swillens u. a. 1995): d.h. in allen Teströhrchen lag die gleiche Konzentration des radioaktiv markierten Liganden [<sup>3</sup>H]DAMGO vor, die mit aufsteigenden Konzentrationen unmarkierten DAMGOs verdrängt wurde. Die Experimente mit Homogenaten des *parietalen Kortex* wurden zusätzlich in parallel dazu

## 2 Material und Methoden

verlaufenden Testreihen unter Zugabe einer fixen im Bereich des  $EC_{50}$  liegenden Konzentration von  $GTP\gamma S$  durchgeführt. Das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon bindet an die  $\alpha$ -Untereinheiten von G-Proteinen und führt zur Abkopplung der G-Proteinuntereinheiten vom Rezeptor. Die Zugabe von  $GTP\gamma S$  bewirkt dabei einen Übergang des  $\mu$ -Opioidrezeptors von einem hochaffinen (an das G-Protein gekoppelten) in einen niederaffinen (vom G-Protein entkoppelten) Zustand, messbar an einer Erhöhung der Dissoziationskonstanten  $K_d$  (Werling u. a. 1988; Ofri u. a. 1992). Eventuelle Unterschiede in der Erhöhung des  $K_d$ -Wertes könnten dabei auf eine veränderte Effizienz des Nukleotides auf die Entkoppelung des G-Proteins vom Rezeptor hinweisen. Zur Errechnung der spezifischen Bindung des Liganden wurde parallel die unspezifische Bindung (10 - 20 % der Gesamtbindung) durch Zugabe des  $\mu$ -Opioidrezeptorantagonisten Naloxon bestimmt und von der Gesamtbindung (Bindung ohne Naloxon) subtrahiert. Diese spezifischen Bindungswerte wurden nach weiterer Umrechnung mit der jeweiligen spezifischen Aktivität des  $[^3H]DAMGO$  (nach Zugabe von unmarkiertem DAMGO) und der eingesetzten Proteinmenge nach der Methode der kleinsten Quadrate in Sättigungskurven transferiert. In Sättigungsanalysen (one-site saturation) wurden die  $B_{max}$ - (fmol/mg Protein) und die  $K_d$ -Werte (nmol/l) errechnet.

### Lösungen:

1. Pufferlösung: Tris-HCl (50 mmol/l , pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur)
2. Naloxon (3 mmol/l)
3. DAMGO (15 - 480 nmol/l)
4.  $[^3H]DAMGO$  (9 nmol/l)
5.  $GTP\gamma S$  (15  $\mu$ mol/l)

### Arbeitsschritte Bindungsstudien im *frontalen Kortex* und *Mittelhirn* :

- I. Pro Testtag wurden sechs Gewebshomogenate einer Hirnregion von Tieren aller sechs Gruppen (Wahl *akut/protrahiert*, Forciert *akut/protrahiert*, Kontrolle *akut/protrahiert*) verwendet und unmittelbar vor den Tests aufgetaut.
- II. Es wurden jeweils 24 Teströhrchen pro Homogenat verwendet, in die 2.6 ml Pufferlösung pipettiert wurden.
- III. Für die Ansätze der Gesamtbindung (Triplikate) wurden in Röhrchen 1 - 3 weitere 100  $\mu$ l Pufferlösung pipettiert.

## 2.3 Neurochemische Untersuchungen

- IV. Für die Ansätze der unspezifischen Bindung (Triplikate) wurden in Röhrchen 4 - 6 je 100  $\mu\text{l}$  Naloxon-Lösung (100  $\mu\text{mol/l}$  im (Gesamt)ansatz, im Folgenden mit i.A. abgekürzt) pipettiert.
- V. Den Ansätzen 7 - 24 (Triplikate) wurden in absteigender Reihenfolge 6 Konzentrationen unmarkierten DAMGOs (16 - 0.5 nmol/l i.A.) hinzugefügt.
- VI. In alle Ansätze wurde 100  $\mu\text{l}$  Homogenat (179  $\pm$  5  $\mu\text{g}$  Protein aus frontalem Kortex, 159  $\pm$  7  $\mu\text{g}$  Protein aus dem Mittelhirn) pipettiert.
- VII. In alle 24 Ansätze wurden je 100  $\mu\text{l}$  der [ $^3\text{H}$ ]DAMGO-Lösung pipettiert (0.3 nmol/l i.A.).
- VIII. Alle Ansätze (3 ml) wurden bei 22 °C für 60 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert.
- IX. Anschließend wurden die Ansätze im Brandel-Zellsammler über Glasfiberfilter, die zuvor über 1 Stunde in 0.1 % Polyethyleniminlösung inkubiert worden waren, abfiltriert. Die Filter wurden zweimal mit je 5 ml eisgekühlter Pufferlösung gespült.
- X. Die trockenen Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt. Es wurden dann jeweils 4 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben und die Röhrchen anschließend über 60 Minuten geschüttelt.
- XI. Die Messung der gebundenen Radioaktivität fand danach mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationszählung im Szintillationszähler statt.

### **Arbeitsschritte Bindung im parietalen Kortex:**

- I. Pro Testtag wurden drei Gewebshomogenate einer Hirnregion von Tieren aller sechs Gruppen (Wahl *akut/protrahiert*, Forciert *akut/protrahiert*, Kontrolle *akut/protrahiert*) verwendet und unmittelbar vor den Tests aufgetaut.
- II. Es wurden jeweils 48 Teströhrchen pro Homogenat verwendet, in die 2.6 ml Pufferlösung pipettiert wurden.
- III. Den Ansätzen 1 - 24 wurde weitere 100  $\mu\text{l}$  Pufferlösung hinzugefügt.
- IV. Den Ansätzen 25 - 48 wurde 100  $\mu\text{l}$  GTP $\gamma$ S-Lösung (500 nmol/l i.A.) hinzugefügt
- V. Für die Ansätze der Gesamtbindung (Triplikate) wurde in Röhrchen 1 - 3 und 25 - 27 weitere 100  $\mu\text{l}$  Pufferlösung pipettiert.

## 2 Material und Methoden

- VI. Für die Ansätze der unspezifischen Bindung (Triplikate) wurden in Röhrchen 4 - 6 und 28 - 30 je 100  $\mu$ l Naloxon-Lösung (1  $\mu$ mol/l i.A.) pipettiert.
- VII. Den Ansätzen 7 - 24 und 31 - 48 (Triplikate) wurde in absteigender Reihenfolge sechs Konzentrationen unmarkierten DAMGOs (16 - 0.5 nmol/l i.A.) hinzugefügt.
- VIII. In alle Ansätze wurde 100  $\mu$ l Homogenat des parietalen Kortex (2909  $\mu$ g Protein) pipettiert.
- IX. In alle 48 Ansätze wurde jetzt 100  $\mu$ l der [ $^3$ H]DAMGO-Lösung (0.3 nmol/l i.A.) pipettiert.
- X. Alle Ansätze (3 ml) wurden bei 22 °C für 60 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert.
- XI. Anschließend wurden die Ansätze im Brandel-Zellsammler über Glasfiberfiltern, die zuvor über 1 Stunde in 0.1 % Polyethyleniminlösung inkubiert worden waren, abfiltriert. Die Filter wurden zweimal mit jeweils 5 ml eisgekühlter Pufferlösung gespült.
- XII. Die trockenen Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt. Es wurden dann jeweils 4 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugefügt und die Röhrchen anschließend 60 Minuten geschüttelt.
- XIII. Die Messung der gebundenen Radioaktivität fand danach mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationszählung im Szintillationszähler statt.

### 2.3.4 [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- Bindung

Es wurde davon ausgegangen, dass die Zahl der  $G_{i/o}$ -Proteine durch längerfristige Einwirkung des Etonitazens abnehmen könnte. Gleichzeitig schien eine funktionelle Veränderung der Koppelung von Rezeptor und G-Protein z.B. im Sinne einer Abschwächung möglich .

Zur Identifizierung von Adaptationen der inhibitorischen G-Proteine wurden die Bindungseigenschaften der  $G_{\alpha(i/o)}$ -Untereinheiten in *homologen* Verdrängungsstudien (Swillens u. a. 1995) mit Gewebshomogenaten aus dem parietalen Kortex bestimmt. Als radioaktiv markierter Ligand wurden in allen Teströhrchen gleiche Konzentrationen [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S eingesetzt, das nicht hydrolysierbar ist und vor allem an die aktiven  $G_{\alpha}$ -Untereinheiten der  $G_{i/o}$ -Proteine bindet (Wieland und Jakobs 1994). Die Verdrängung der spezifischen Bindung wurde mit aufsteigenden Konzentrationen von unmarkiertem GTP $\gamma$ S untersucht.

Parallel zur basalen Bindungsaktivität des Nukleotides wurden funktionelle Veränderungen der Interaktion von  $\mu$ -Opioidrezeptor und G-Proteinen durch Bestimmung der Bindung nach Stimulation des Rezeptors durch den Agonisten DAMGO charakterisiert. Die Aktivierung des  $\mu$ -Rezeptors durch den Agonisten induziert Konformationsänderungen der  $G_{i/o}$ -Proteine und erhöht somit die Affinität von Guanosin-5'-triphosphat (GTP) bzw. von GTP $\gamma$ S für die  $G\alpha$ -Untereinheiten, so dass in den Versuchsansätzen ein vermehrter Austausch von Guanosin-5'-diphosphat (GDP) durch GTP $\gamma$ S auftritt (Selley u. a. 1997a; Sim u. a. 1996). Den Proben musste GDP im Überschuss hinzugefügt werden, um optimale Messbedingungen zu schaffen (Sim u. a. 1996).

Zur Errechnung der spezifischen Bindung des Nukleotides wurde parallel die unspezifische Bindung (3 - 9 % der Gesamtbindung) nach Zugabe von unmarkiertem GTP $\gamma$ S im Überschuss gemessen und von der Gesamtbindung (ohne GTP $\gamma$ S) abgezogen. Die spezifische Bindung wurde als Konzentrations-Wirkungskurve (one-site concentration response) analysiert, um  $EC_{50}$  (Konzentration mit halbmaximaler Wirkung in nmol/l) und  $E_{max}$  (maximale Wirksamkeit in fmol/mg Protein) berechnen zu können. Die Nettodifferenz der [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S Bindung aus der spezifischen Bindung des Nukleotides ohne bzw. mit Zugabe von DAMGO wurde eingesetzt, um  $B_{max}$  und  $K_d$ -Werte zu kalkulieren, indem die entsprechenden transformierten Bindungsdaten durch Kurvenanpassung nach dem Prinzip der kleinsten Quadrate als Sättigungskurve berechnet wurden. Mit Hilfe dieser Netto- $B_{max}$ -Werte ließ sich anschließend der so genannte Verstärkungsfaktors (*amplification factor*) berechnen. Der *amplification factor* beschreibt dabei die Anzahl der pro  $\mu$ -Opioidrezeptor aktivierten G-Proteine, indem es das Verhältnis der maximalen Bindungsdichte des  $\mu$ -Opioidrezeptors ( $B_{max}$ -Werte aus den [ $^3$ H]DAMGO-Bindungsstudien) und die stimulierte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S Bindung an den G-Proteinen berücksichtigt. Die Berechnung des *amplification factors* ergab sich aus der Division der Netto- $B_{max}$ -Werte durch die  $B_{max}$ -Werte aus den [ $^3$ H]DAMGO-Bindungsstudien.

## 2 Material und Methoden

### Lösungen:

1. Pufferlösung : 3 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 1 mmol/l EDTA in 50 mmol/ Tris-HCl, pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur
2. GDP (0.8 mmol/l)
3.  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (20  $\mu\text{mol/l}$ )
4.  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (5 nmol/l - 2  $\mu\text{mol/l}$ )
5. [ $^{35}\text{S}$ ] $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (ca. 1.1 nmol/l)
6. DAMGO (20  $\mu\text{mol/l}$  in Puffer)

### Arbeitsschritte:

1. Pro Testtag wurden 4 Gewebshomogenate verwendet. Die noch gefrorenen 1 ml- Homogenate des parietalen Kortex wurden unmittelbar vor ihrem Einsatz mit 0.5 ml Pufferlösung versetzt und aufgetaut.
2. Es wurden jeweils 48 Teströhrchen pro Homogenat verwendet, in die 1.6 ml Pufferlösung pipettiert wurden.
3. Allen Ansätzen wurde 100  $\mu\text{l}$  GDP-Lösung (40  $\mu\text{mol/l}$  i.A.) hinzugefügt.
4. In die Ansätze 1 - 24 wurden weitere 100  $\mu\text{l}$  Pufferlösung pipettiert.
5. In die Ansätze 25 - 48 wurden 100  $\mu\text{l}$  DAMGO-Lösung (1  $\mu\text{mol/l}$  i.A.) pipettiert.
6. Für die Ansätze zur Bestimmung der Gesamtbindung (Duplikate) wurde den Ansätzen 1 - 2 und 25 - 26 weitere 100  $\mu\text{l}$  Puffer hinzugefügt.
7. Für die Ansätze zur Bestimmung der unspezifischen Bindung (Duplikate) wurde den Ansätzen 3 - 4 und 27 - 28 je 100  $\mu\text{l}$  der  $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Lösung I (10  $\mu\text{mol/l}$  i.A.) hinzugefügt.
8. In die Ansätze 5 - 24 und 27 - 48 (Duplikate) wurden in absteigender Reihenfolge 10 Konzentrationen  $\text{GTP}\gamma\text{S}$  (100 - 0.25 nmol/l i.A.) pipettiert.
9. Allen Ansätzen wurde 100  $\mu\text{l}$  der [ $^{35}\text{S}$ ] $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Lösung hinzugefügt ( $56.3 \pm 1.7$  pmol/l, mit ca. 270.000 dpm).
10. In alle Ansätze wurde jetzt 10  $\mu\text{l}$  Homogenat des parietalen Kortex ( $17 \pm 0.5$   $\mu\text{g}$  Protein.) pipettiert.



11. Alle Ansätze (2 ml) wurden bei 22 °C für 60 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend im Brandel-Zellsammler über Glasfiberfilter, die zuvor 60 Minuten in Pufferlösung inkubiert worden waren, abfiltriert. Die Filter wurden zweimal mit je 5 ml eisgekühlter Pufferlösung gespült.
12. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt. Es wurden dann je 4 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben und die geschlossenen Röhrchen anschließend 60 Minuten geschüttelt.
13. Die Messung der gebundenen Radioaktivität fand danach mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationszählung im Szintillationszähler statt.

### 2.3.5 [<sup>3</sup>H]SCH23390-Bindung

Es wurde von der Hypothese ausgegangen, dass sich die Anzahl der Dopamin D<sub>1/5</sub>-Rezeptoren im mesolimbischen Systems nach längerfristiger Einnahme des Opioides Etonitazen in Richtung einer Abnahme verändern könnte.

Zur Untersuchung der Bindungseigenschaften der D<sub>1/5</sub>-Rezeptoren wurden der in der Position 9 mit Tritium markierte selektive D<sub>1/5</sub>-Antagonist R-(+)-8-Chloro-2,3,4,5-tetra-hydro-3-methyl-5-phenyl-1H-3-benzapin-7-ol ([<sup>3</sup>H]SCH23390) (Bourne 2001) in homologen Verdrängungsstudien (Swillens u. a. 1995) mit Gewebshomogenaten aus dem limbischen Vorderhirn einzelner Tiere verwendet (May u. a. 1995). Parallel zur Bestimmung der Bindungsdichte ( $B_{max}$ ) und Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) des Antagonisten [<sup>3</sup>H]SCH23390 am D<sub>1/5</sub>-Dopaminrezeptor wurde die Wirkung des Agonisten Dopamin auf die Bindungseigenschaften des Antagonisten [<sup>3</sup>H]SCH23390 gemessen. Die Zugabe von Dopamin führt in Sättigungsexperimenten zur Abnahme der Antagonistenaffinität und zur gleichzeitigen Erniedrigung der maximalen Bindungsdichte. Diese empirischen Daten einer gemischt kompetitiven und nicht kompetitiven Inhibition durch den Agonisten Dopamin werden auf molekularer Ebene damit erklärt, dass der Dopaminrezeptor in zwei Konformationszuständen vorliegen kann, für die zwar der Antagonist [<sup>3</sup>H]SCH23390 die gleiche Affinität, der Agonist Dopamin jedoch hohe oder niedrige Affinität besitzt. Eine Bindung von Dopamin an Rezeptoren, die im hochaffinen Zustand vorliegen, inhibiert demnach nicht kompetitiv die Antagonistenbindung mit Erniedrigung der maximalen Bindung des Antagonisten. Eine Überführung aller Dopaminrezeptoren in den niederaffinen Zustand z.B. durch die Zugabe von GTP verhindert den nicht kompetitiven Antagonismus an der hochaffinen Bindungsstelle und führt zu einem rein kompetitiven Antagonismus an der niederaffinen Bindungsstelle mit Erniedrigung der Affinität des Antagonisten (O'Boyle und Waddington 1992). Mögliche signifikante Effekte auf  $K_d$ -Erhöhung und  $B_{max}$ -Verringerung durch die Zugabe

## 2 Material und Methoden

von Dopamin könnten auf Veränderungen der hochaffinen bzw. der niederaffinen Bindungsstelle der Dopamin-D<sub>1/5</sub>-Rezeptoren hinweisen.

Die in den Tests verwendeten Dopaminlösungen mussten auf Grund geringer Haltbarkeit unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden. Die gewählte Dopaminkonzentration von 500 nmol/l im Ansatz ergab sich aus früheren Verdrängungsstudien, in denen eine signifikante gemischt kompetitive/nicht kompetitive Inhibition erzielt werden konnte. Die Konzentration war ca. fünfzigmal höher als die  $K_i$ -Werte (Maß der Affinität eines Rezeptors für eine kompetitiv bindende Substanz) des hochaffinen Rezeptorzustandes und entsprachen den  $K_i$ -Werten des niederaffinen Zustandes (May, 1993) (vgl. May et al. 1992).

Zur Errechnung der spezifischen Bindung des Radioliganden wurde die unspezifische Bindung (10 - 20 % der Gesamtbindung) durch Zugabe von unmarkiertem (+)SCH23390 bestimmt und von der Gesamtbindung (Bindung nur mit markiertem [<sup>3</sup>H]SCH23390) abgezogen. Um eine gleichzeitige Bindung von [<sup>3</sup>H]SCH23390 an Serotonin-Rezeptoren vom Typ 2 (5-HT<sub>2</sub>) zu verhindern, wurde allen Testansätzen der 5-HT<sub>2</sub>-Antagonist Ketanserin beigelegt (Bischoff u. a. 1986). Die spezifische Bindung wurde in Konzentration der Bindungsstellen in fmol/mg Protein umgerechnet. Durch Sättigungsanalysen (one-site saturation) konnten dann die D<sub>1/5</sub>-Bindungsdichte ( $B_{max}$ ) und Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) des Antagonisten zum Rezeptor ohne bzw. mit Zusatz von 500 nmol/l Dopamin kalkuliert werden. Aus der Differenz der  $B_{max}$ -Werte ergab sich der durch Dopamin inhibierte Anteil der Antagonistenbindung.

### Lösungen:

1. Pufferlösung I: 4mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 10 mmol/l Pargylin in 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur)
2. Pufferlösung II: 4 mmol/l MgCl<sub>2</sub> in 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur)
3. Pufferlösung III: 50 mmol/l Tris-HCl (pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur)
4. Ketanserin (1.8 µmol/l)
5. [<sup>3</sup>H]SCH23390 (3 nmol/l)
6. (+)SCH23390 (30 µmol/l) - Lösung I
7. (+)SCH23390 (3 - 96 nmol/l) - Lösung II
8. Dopamin (15 µmol/l)

Arbeitsschritte:

- I. Pro Testtag wurden 3 Gewebshomogenate des *limbischen Vorderhirns* verwendet und unmittelbar vor den Tests aufgetaut.
- II. Es wurden jeweils 48 Teströhrchen für jedes Homogenat eingesetzt, in die zunächst 2550  $\mu\text{l}$  Pufferlösung I (dadurch 8.5  $\mu\text{mol/l}$  Pargylin i.A.) pipettiert wurden.
- III. In alle Ansätze wurde 50  $\mu\text{l}$  Ketanserin-Lösung pipettiert (30 nmol/l i.A.).
- IV. Für die Bestimmung der Gesamtbindung wurde in die Ansätze (Triplikate) 1 - 3 und 25 - 27 100  $\mu\text{l}$  Pufferlösung II pipettiert.
- V. Für die Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde den Ansätzen (Triplikate) 4 - 6 und 28 - 30 je 100  $\mu\text{l}$  (+)SCH23390-Lösung I (1  $\mu\text{mol/l}$  i.A.) hinzugefügt.
- VI. Den Ansätzen 1 - 24 wurde weitere 100  $\mu\text{l}$  Pufferlösung II hinzugefügt.
- VII. In die Ansätze 24 - 48 wurde 100  $\mu\text{l}$  der Dopaminlösung (500 nmol/l i.A.) pipettiert.
- VIII. In die Ansätze 7 - 24 und 31 - 48 (Triplikate) wurden in absteigender Reihenfolge sechs Konzentrationen (+)SCH23390-Lösung II (3.2 - 0.1 nmol/l i.A.) pipettiert.
- IX. In alle Ansätze wurde 100  $\mu\text{l}$  [ $^3\text{H}$ ]SCH23390-Lösung (0.1 nmol/l i.A.) pipettiert.
- X. Allen Ansätzen wurde 100  $\mu\text{l}$  Homogenat des *limbischen Vorderhirns* ( $39 \pm 1 \mu\text{g}$  Protein) hinzugefügt.
- XI. Alle Testansätze (3 ml) wurden bei 22 °C 90 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend im Brandel-Zellsammler mit GF-B Filtern, die zuvor 60 Minuten in 0.2 % Polyethyleniminlösung inkubiert worden waren, abfiltriert. Die Filter wurden zweimal mit jeweils 5 ml eisgekühlter Pufferlösung III gespült.
- XII. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt. Es wurden dann jeweils 4 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben und die geschlossenen Röhrchen anschließend 60 Minuten geschüttelt.
- XIII. Die Messung der Radioaktivität an den einzelnen Filter fand danach mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationszählung im Szintillationszähler statt.

### 2.3.6 Adenylatzyklase-Assays

Es wurde davon ausgegangen, dass das Enzym Adenylatzyklase bzw. die Aktivität nach längerfristiger Einnahme von Etonitazen heraufreguliert wird. Das membrangebundene Enzym Adenylatzyklase unterliegt der Kontrolle stimulatorischer und inhibitorischer (rezeptorgekoppelter) G-Proteine. Die AC katalysiert die Umsetzung vom Adenosintriphosphat (ATP) zum zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP). Mögliche Adaptationen auf Ebene des Enzyms oder seiner Rezeptor/G-Protein gekoppelten Stimulierbarkeit bzw. Inhibierbarkeit nach chronischer Etonitazengabe wurden als veränderter Substratumsatz durch Stimulation über den Dopamin  $D_{1/5}$ -Agonisten Dihydroxidine, das GTP-Analogon 5'-Guanylylimidodiphosphat (GppNHp) und den direkten AC-Aktivator Forskolin sowie durch Inhibition über GTP $\gamma$ S im modifizierten Assay nach Schultz und Jakobs gemessen (Schultz und Jakobs 1986; May u. a. 1995). Da der Substratumsatz von ATP durch die Adenylatzyklase sehr klein ist (basal < 1 %), kann ein solcher Umsatz nur durch einen sehr empfindlichen Assay gemessen werden. Die im vorliegenden Experiment angewandte Tracermethode (nur ein kleiner Teil des eingesetzten ATP stammt aus einem radioaktiv markierten Pool) misst zu diesem Zweck das anfallende radioaktive Enzymprodukt [ $^{32}$ P]cAMP, das aus radioaktiv markiertem [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP gebildet wird. Vorbedingung für die Messbarkeit ist die Trennung des Produktes der Enzymreaktion vom nicht umgesetzten Substrat [ $\alpha$ - $^{32}$ P]ATP und von anderen Produkten, die in der Zelle aus ATP gebildet werden ( $P_i$ ,  $PP_i$  bzw. 5'-Nukleotiden), durch  $ZnCO_3$ -Präzipitation. Nach anschließender Zentrifugation bei 10.000 g wird dann der Überstand zur Adsorptionschromatographie in kurze Kunststoffsäulen (Bio-Rad Laboratories 731 - 1550; 0,8 x 4 cm; 10 ml Reservoir, Gesamthöhe 9 cm) mit einer Füllung aus Aluminiumoxid (Merck Aluminiumoxid 90 aktiv neutral, Aktivitätsstufe I; 0,063-0,200 mm) als stationärer Phase überführt. Abschließend erfolgt nach Messung der Čerenkov-Strahlung im Eluat die Berechnung der Produktmenge.

Zur Optimierung des Assays mussten einerseits Störungen durch den Abbau des ATPs durch verschiedene ATPasen ausgeglichen werden. Aus diesem Grund wurden den Ansätzen die ATP-regenerierenden Substanzen Kreatinkinase und Kreatinphosphat hinzugefügt. Andererseits sollte der Abbau des bereits gebildeten cAMP durch Phosphodiesterasen (PDE) gehemmt werden, indem den Testansätzen der PDE-Hemmer 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) beigelegt wurde. Zusätzlich zu dem PDE-Hemmer wurde unmarkiertes cAMP als kompetitives Substrat des Abbaus durch die Esterasen verwendet. Eine Stimulation der Adenylatzyklase via  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren wurde durch den Einsatz des  $\beta$ -Rezeptorblockers Propranolol

nolol verhindert. Durch die in allen Ansätzen zur Stimulation gleiche Konzentration des GTP-Analogons GppNHp wurde eine *basale* Enzymaktivität induziert, die dann durch eine fixe Konzentration des Aktivators Forskolin oder durch ansteigende Konzentrationen des D<sub>1/5</sub>-Rezeptoragonisten Dihydroxidine weiter stimuliert wurde. Um die inhibitorische Komponente des Signalweges zu bestimmen, wurde die inhibitorische Wirkung aufsteigender Konzentrationen des GTP-Analogons GTP $\gamma$ S bei Stimulation der Adenylatzyklase durch Forskolin gemessen.

Separat zur Bestimmung des gebildeten [<sup>32</sup>P]cAMP fand pro Testtag die Messung einer [<sup>3</sup>H]cAMP *Wiederfindung* statt. Die angewandte Methode sollte zur Korrektur der Pipettier- und Arbeitsschritte feststellen, welcher Prozentsatz einer definierten Menge radioaktiv markierten cAMPs tatsächlich nach Präzipitation und Adsorptionschromatographie in die Teströhrchen gelangt. Vier Testansätze wurden zu diesem Zweck ohne Zugabe von Homogenat mit [<sup>3</sup>H]cAMP versetzt und den Versuchsschritten Präzipitation und Adsorptionschromatographie zugeführt.

Abschließend konnte die [<sup>3</sup>H]-Aktivität der durchgelaufenen Flüssigkeit durch Flüssigkeitsszintillationsspektrometrie gemessen werden. Die *Wiederfindung* betrug demnach in allen Versuchen zwischen 85 und 95 %. Zur Korrektur von Messungenauigkeiten der [<sup>32</sup>P]-Aktivität durch Zerfallsprodukte des eingesetzten [<sup>32</sup>P]ATP, spontane, d.h. enzymunabhängige cAMP-Bildung oder natürliche Radioaktivität wurden in weiteren sechs Ansätzen alle Arbeitsschritte ohne Zugabe von Homogenat durchgeführt (so genannte Blanks oder Leerwerte). Die Werte der Blanks werden von allen Ansätzen subtrahiert, um die enzyspezifische Aktivität zu bestimmen.

### Lösungen:

1. Pufferlösung I: 1 mol/l Tris-HCl, pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur
2. Pufferlösung II: 100 mmol/l Tris-HCl, pH 7.4 bei 21 °C Raumtemperatur
3. MgCl<sub>2</sub> (1 mol/l)
4. IBMX (10 mmol/l)
5. GppNHp (100  $\mu$ mol/l)
6. Propranolol (100  $\mu$ mol/l)
7. cAMP (10 mmol/l)
8. [<sup>3</sup>H]cAMP (ca. 6 nmol/l i.A.)
9. ATP (10 mmol/l)

## 2 Material und Methoden

10. Forskolin (10 mmol/l in Ethanol)
11. Dihydroxidine (1 nmol/l - 5  $\mu$ mol/l)
12. [ $^{32}$ P]ATP (120 - 360 nmol/l i.A.)
13. Zn-Acetat (50 mmol/l)
14. Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (62 mmol/l)
15. GTP $\gamma$ S (1.5 nmol/l - 1.5  $\mu$ mol/l)
16. NaCl (1 mol/l)

Vorbereitung der Adsorbtionssäulen:

Die Säulen wurden mit je 5 ml Pufferlösung II vor und nach Beendigung des Tests gespült.

### Stimulation der Adenylatzyklase

Arbeitsschritte:

- I. Zunächst musste die Arbeitslösung hergestellt werden. Dihydroxidine, Forskolin, cAMP, ATP, IBMX, Puffer, Propranolol, GppNHp, MgCl<sub>2</sub> wurden dazu unmittelbar zuvor aufgetaut:

Kreatinphosphat	16.4 mg	(5 mmol/l i.A.)
Kreatinkinase	4 mg	(15 U i.A.)
Rinderalbumin	10 mg	(0.1 mg i.A.)
H <sub>2</sub> O	1150 $\mu$ l	
GppNHp	100 $\mu$ l	(1 $\mu$ mol/l i.A.)
Propranolol	100 $\mu$ l	(1 $\mu$ mol/l i.A.)
MgCl <sub>2</sub>	100 $\mu$ l	(10 mmol/l i.A.)
Puffer I	350 $\mu$ l	
cAMP	100 $\mu$ l	(100 $\mu$ mol/l i.A.)
ATP	100 $\mu$ l	(100 $\mu$ mol/l i.A.)
IBMX	1000 $\mu$ l	(1 mmol/l i.A.)

wurden in der angegebenen Reihenfolge in ein Becherglas pipettiert. IBMX musste zuvor kurz aufgeköcht werden, um ausreichende Löslichkeit zu erzielen.

- II. Es wurden jeweils vier Homogenate pro Testtag untersucht. Für jedes Homogenat wurden 20 Ansätze (Duplikate: 1 - 20) und parallel dazu für die Bestimmung der *Wiederfindung* insgesamt weitere 4 Teströhrchen verwendet. Sechs

### 2.3 Neurochemische Untersuchungen

zusätzliche Röhren dienten zur Korrektur der gemessenen [<sup>32</sup>P]-Aktivität (Blanks). In alle 90 Ansätze wurden zunächst 30 µl Arbeitslösung pipettiert.

- III. Den Ansätzen 1 - 2 wurden 20 µl Forskolin-Lösung (10 µmol/l i.A.) hinzugefügt.
- IV. In die Ansätze 3 - 18 wurden je 20 µl acht verschiedener Dihydroxidine Konzentrationen in absteigender Reihenfolge (1 µM-200 pM i. A.) pipettiert.
- V. In die Ansätze 19 - 20 wurden 20 µl H<sub>2</sub>O pipettiert, um die Aktivität nach basaler Stimulation durch GppNHp (in der Arbeitslösung enthalten) zu messen.
- VI. In die 4 Ansätze zur *Wiederfindung* und in die sechs Ansätze zur Korrektur der gemessenen [<sup>32</sup>P]-Aktivität wurden 50 µl H<sub>2</sub>O pipettiert.
- VII. Den Ansätzen 1 - 20 und den sechs Ansätzen zur Bestimmung der Blanks wurden 20 µl [<sup>32</sup>P]ATP-Lösung (ca 400.000 cpm) hinzugefügt.
- VIII. Den vier Ansätzen zur Wiederfindung wurden 20 µl [<sup>3</sup>H]cAMP-Lösung (ca. 40.000 dpm i.A.) hinzugefügt.
- IX. Die gefrorenen Homogenate des *limbischen Vorderhirns* wurden aufgetaut und 30 µl des Homogenates (9.8 ± 0.3 µg Protein) wurden in die Ansätze 1 - 20 pipettiert. Die Bestimmung der *Wiederfindung* und der Blanks fand ohne Zugabe von Homogenat statt.
- X. Alle Ansätze (100 µl) wurden bei 30 °C 20 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert.
- XI. Die Inkubation wurde durch Zinkcarbonatpräzipitation nach Zugabe von 400 µl Zn-Acetat-Lösung und 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung unterbrochen. Die Ansätze (1 ml) wurden im Anschluss bei 4 °C 30 Minuten gekühlt und danach drei Minuten bei 10.000 g zentrifugiert.
- XII. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Säulen zur Adsorptionschromatographie wurden mit 800 µl des Überstandes beschickt und anschließend zweimal mit 2 ml Puffer II gewaschen, um restliches [<sup>32</sup>P]cAMP zu eluieren.
- XIII. In alle Eluate, die [<sup>32</sup>P] enthielten (Ansätze 1 - 20 und sechs Röhren zur Blankbestimmung), wurden 15 ml H<sub>2</sub>O pipettiert. Den 4 [<sup>3</sup>H]cAMP-haltigen Ansätzen zur Bestimmung der *Wiederfindung* wurde 15 ml Szintillationsflüssigkeit hinzugefügt. Alle Proben wurden durchmischt (Vortex) und in einen Szintillationszähler überführt.



## 2 Material und Methoden

XIV. Im Szintillationszähler wurde die Bildung von [<sup>32</sup>P]cAMP durch Messung der Čerenkov-Strahlung bestimmt. Die Bestimmung der Wiederfindung des eingesetzten [<sup>3</sup>H]cAMP erfolgte mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationszählung.

### Inhibition der Adenylatzyklase

Arbeitsschritte:

I. Zunächst musste die konzentrierte Arbeitslösung hergestellt werden. cAMP, ATP, IBMX, Puffer, GTP $\gamma$ S und Forskolin wurden dazu unmittelbar zuvor aufgetaut:

Kreatinphosphat	18.4 mg	5 mmol/l i.A.
Kreatinkinase	4.4 mg	15 U i.A.
Rinderalbumin	11 mg	0.1 mg
H <sub>2</sub> O	1122 $\mu$ l	
NaCl	330 $\mu$ l	30 mmol/l i.A.
Forskolin	11 $\mu$ l	10 $\mu$ mol/l i.A.
Puffer I	517 $\mu$ l	
cAMP	110 $\mu$ l	100 $\mu$ mol/l i.A.
ATP	110 $\mu$ l	100 $\mu$ mol/l i.A.
IBMX	1100 $\mu$ l	1 mmol/l i.A.

wurden in der angegebenen Reihenfolge in ein Becherglas gegeben. IBMX musste zuvor kurz aufgekocht werden, um ausreichende Löslichkeit zu erzielen.

- II. Es wurden jeweils vier Homogenate pro Testtag untersucht. Für jedes Homogenat wurden 20 Ansätze (1 - 20) und parallel dazu für die Bestimmung der *Wiederfindung* insgesamt weitere 4 Teströhrchen verwendet. Sechs zusätzliche Röhrchen dienten zur Bestimmung der Blanks. In alle 90 Ansätze wurden zunächst 30  $\mu$ l Arbeitslösung pipettiert.
- III. Den Ansätzen 1 - 2/19 - 20 wurde 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O hinzugefügt. Diese Ansätze (Quadruplikate) dienten zur Messung der Stimulation der Adenylatzyklase durch Forskolin (in der Arbeitslösung enthalten, 10  $\mu$ M i. A.).
- IV. In die Ansätze 3 - 18 wurden 20  $\mu$ l acht GTP $\gamma$ S-Konzentrationen (Duplikate) in absteigender Reihenfolge (300 nmol/l - 0.3 nmol/l i. A.) pipettiert.
- V. In die 4 Ansätze zur *Wiederfindung* und in die sechs Ansätze zur Bestimmung der Blanks wurden 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O pipettiert.

- VI. Den Ansätzen 1 - 20 und den sechs Ansätzen zur Korrektur der gemessenen [<sup>32</sup>P]-Aktivität wurden 20 µl [<sup>32</sup>P]ATP-Lösung (ca. 400.000 cpm i.A.) hinzugefügt.
- VII. Den vier Ansätzen zur Wiederfindung wurden 20 µl [<sup>3</sup>H]cAMP-Lösung (ca. 40.000 dpm i.A.) hinzugefügt.
- VIII. Die gefrorenen Homogenate des *limbischen Vorderhirns* wurden aufgetaut und 30 µl des Homogenates ( $13.1 \pm 0.3 \mu\text{g}$  Protein) wurden in die Ansätze 1 - 20 pipettiert. Die Bestimmung der *Wiederfindung* und der Blanks fand ohne Zugabe von Homogenat statt.
- IX. Alle Ansätze (100 µl) wurden bei 25 °C 10 Minuten im Schüttelwasserbad inkubiert.
- X. Die Inkubation wurde durch Zinkcarbonatpräzipitation nach Zugabe von 400 µl Zn-Acetat-Lösung und 500 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung abgebrochen. Die Ansätze (1 ml) wurden im Anschluss bei 4 °C 30 Minuten gekühlt und danach drei Minuten bei 10.000 g zentrifugiert.
- XI. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Säulen zur Adsorptionschromatographie wurden mit 800 µl des Überstandes beschickt und anschließend zweimal mit 2 ml Puffer II gewaschen, um restliches [<sup>32</sup>P]cAMP zu eluieren.
- XII. Den Eluaten, die [<sup>32</sup>P] enthielten (Nr. 1 - 20 und sechs Röhrchen zur Bestimmung der Leerwerte), wurden 15 ml H<sub>2</sub>O hinzugefügt. In die vier [<sup>3</sup>H]cAMP-haltigen Testansätze zur *Wiederfindung* wurden 15 ml Szintillationsflüssigkeit pipettiert. Alle Proben wurden durchmischt (Vortex) und in einen Szintillationszähler überführt.
- XIII. Im Counter wurde die Bildung von [<sup>32</sup>P]cAMP durch Messung der Čerenkov-Strahlung bestimmt. Die Bestimmung der Wiederfindung des eingesetzten [<sup>3</sup>H]cAMP erfolgte mit Hilfe der Flüssigkeitsszintillationszählung.

## 2.4 Datenverarbeitung und Statistik

### 2.4.1 Verbrauchs- und Gewichtsdaten der Tiere

Alle Verbrauchs- und Gewichtsdaten werden in Mittelwerten mit SEM (standard error of the means) angegeben. Alle Auswertungen der Flüssigkeits-, Futter- und Körpergewichtsdaten erfolgten mit der arbeitsgruppeninternen Software ZAMPANO.

## 2 Material und Methoden

Aus den zweimal pro Woche erhobenen Messwerten ergaben sich nach linearer Interpolation äquidistante Messwert-Zeitreihen für Gewicht, Futter-, Flüssigkeit- und Etonitazenverbrauch der einzelnen Tiere. Nach zeitlicher Querschnittsbildung innerhalb der drei Gruppen (*Wahl*, *Forciert*, Kontrollen) erfolgte eine statistische Prüfung zur Identifizierung eventueller nicht zufälliger, d.h. durch die Behandlung bestimmter Unterschiede. Es wurden Verfahren der Prüfstatistik für unabhängige Stichproben angewandt.

Zum Vergleich unabhängiger Stichproben erfolgte eine monofaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA), deren Voraussetzungen Normalverteilung der Stichproben und die Homogenität der Varianzen sind. Die Prüfung auf Homogenität der Varianzen erfolgte durch den Bartlett Test. Ergaben sich nach Durchführung einer *One-way ANOVA* signifikante Unterschiede (*F*-Ratio) erfolgte ein post-hoc Detailvergleich zweier Gruppen durch einen *t*-Test mit angepassten Freiheitsgraden. Waren die Bedingungen für eine ANOVA nicht gegeben, erfolgte die Prüfung durch den Kruskal-Wallis *H*-Test. Im Fall eines signifikanten Unterschieds schloss sich Vergleich der Gruppen durch einen Mann-Whitney *U*-Test an. Die *U*-Werte wurden bei den vorliegenden Stichprobenumfängen auf die Prüfgröße *z* umgerechnet.

### 2.4.2 Neurochemie

Alle Werte werden als Mittelwerte mit SEM angegeben. Die Auswertung der unabhängigen Messwerte erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms *GraphPadPrism* (Graph Pad Software, San Diego).

Die Sättigungskurven und Konzentrations-Wirkungskurven der Etonitazen konsumierenden Gruppen und Kontrollen wurden durch zweifaktorielle Varianzanalyse (two way ANOVA) geprüft. Eventuelle Unterschiede der  $B_{max}$ -,  $K_d$ -,  $EC_{50}$ - und der  $E_{max}$ -Werte zwischen den Etonitazen konsumierenden Gruppen und den Kontrollen sollten mit Hilfe der monofaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) und ggf. nachfolgendem *post hoc t*-Test überprüft werden.

Da die berechneten relativen Werte in % nicht als normalverteilt angesehen werden konnten und damit die Voraussetzungen für dieses Verfahren nicht erfüllt wurden (s.o), musste in diesem Fall der Kruskal-Wallis *H*-Test angewandt werden. Im Fall von Unterschieden schloss sich ein Mann-Whitney *U*-Test an.

Der Effekt der Zugabe von DAMGO und GTP $\gamma$ S-Bindung auf die entsprechenden [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S- bzw. DAMGO-Bindungsdaten wurde durch einen zweiseitigen, gepaarten Student *t*-Test analysiert. Die Auswirkungen des nicht kompetitiv verdrängenden Dopamins in den [ $^3$ H]SCH23390 Bindungsstudien auf  $B_{max}$ - und  $K_d$ -Werte wurde ebenfalls durch zweiseitigen, gepaarten Student *t*-Test auf eventuelle signifikante Unterschiede geprüft.

Um eventuelle Beziehungen zum individuellem Etonitazenkonsum zu beschreiben, wurden im Fall der [<sup>3</sup>H]SCH23390-Bindungsstudien lineare Regressionsanalysen durchgeführt.

### 2.5 Chemikalien

[<sup>3</sup>H]DAMGO (48 Ci/mmol), [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S (1100 - 1300 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]SCH23390 (76 Ci/mmol), [<sup>3</sup>H]cAMP (29 Ci/mmol), [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP (20 - 35 Ci/mmol) wurden von Du-Pont (New England Nuclear), Bad Homburg bezogen. (+)SCH23390 und Forskolin stammen von Research Biochemicals International, Köln. GTP $\gamma$ S, GDP, DAMGO, ATP, cAMP kamen von der Firma Sigma, Deisenhofen. Dihydropyridine wurde von Tocris Cookson, Bristol (England) gekauft; Naloxon von RBI. Ketanserin wurde von der Firma Janssen, Beerse (Belgien) geschenkt. Das Etonitazen war ein Geschenk der Firma NOVARTIS AG, Basel (Schweiz). Alle anderen Chemikalien waren uneingeschränkt verfügbar.



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Haltungs- und Einnahmedaten

Die Aufzeichnung individueller Werte des Körpergewichts, Futterverbrauchs und täglicher Flüssigkeitseinnahme wurde vier Wochen vor dem eigentlichen Etonitazentrinkversuch begonnen und im Folgenden bis zum Abschluss des Experimentes zweimal wöchentlich durchgeführt. Aus den Flüssigkeitsmengen wurden die durchschnittlichen individuellen Etonitazendosen berechnet ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ ). Im Anschluss an den achtwöchigen Trinkversuch wurde das Etonitazen entzogen. Es erfolgte die Einteilung in die Gruppen des zweitägigen Entzugs (*akut*) und der sechswöchigen Abstinenz (*protrahiert*).

#### 3.1.1 Körpergewicht

Ein Vergleich der drei Versuchsgruppen ergab in den vier Wochen vor Beginn der Etonitazeneinnahme keine signifikanten Unterschiede der Körpergewichte; Woche 1 - 2:  $F(2,69) = 0.69$ ,  $p > 0.05$ ; Woche 3 - 4:  $F(2,69) = 0.35$ ,  $p > 0.05$ ; one way ANOVA, (Tab. 3.1).

Auch während der achtwöchigen Etonitazeneinnahme konnten bzgl. des Körpergewichts keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden; Woche 1 - 2:  $F(2,69) = 0.76$ ,  $p > 0.05$ ; Woche 7 - 8:  $F(2,69) = 0.31$ ,  $p > 0.05$ ; one way ANOVA, (Tab. 3.1).

Der Vergleich im zweitägigen Entzug ( $N = 36$ : Kontrollen, *Wahl* u. *Forciert akut*) und im sechswöchigen Entzug ( $N = 36$ : Kontrollen, *Wahl* u. *Forciert protrahiert*) ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen; *akut*, d.h. zweitägiger Entzug:  $F(2,69) = 0.23$ ,  $p > 0.05$ ; *protrahiert*: Woche 1 - 2:  $F(2,69) = 1.41$ ,  $p > 0.05$ ; Woche 5 - 6:  $F(2,69) = 1.47$ ,  $p > 0.05$ ; one way ANOVA, (Tab.3.1).

Zusammenfassend ergaben sich nach zufälliger Verteilung der Tiere auf die einzelnen Gruppen vor Beginn des eigentlichen Experimentes keine Unterschiede in Bezug auf das Körpergewicht. Auch während des Versuchs, im akuten Entzug bzw. nach sechswöchiger Abstinenz ließen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Merkmals Gewicht darstellen.

### 3 Ergebnisse

	Gewicht(g)			Futter (g/d)		
	<i>Wahl</i>	<i>Forciert</i>	Kontr.	<i>Wahl</i>	<i>Forciert</i>	Kontr.
<b>vor ETZ</b>						
1./2. Wo.	304 ± 4	398 ± 4	299 ± 4	26.9 ± 0.3	27.0 ± 0.6	26.5 ± 0.6
3./4. Wo.	348 ± 6	341 ± 5	343 ± 6	26.5 ± 0.7	26.9 ± 0.6	26.4 ± 0.6
<b>mit ETZ</b>						
1./2. Wo.	382 ± 6	371 ± 5	377 ± 7	26.3 ± 0.7	26.4 ± 0.6	26.0 ± 0.6
3./4. Wo.	408 ± 7	394 ± 6	401 ± 8	26.9 ± 0.8	27.2 ± 0.7 <sup>++</sup>	24.6 ± 0.3
5./6. Wo.	423 ± 7	411 ± 7	416 ± 8	26.6 ± 0.7	27.8 ± 0.7	26.3 ± 0.6
7./8. Wo.	432 ± 7	424 ± 8	426 ± 8	25.6 ± 0.5	27.9 ± 0.6 <sup>**</sup>	26.0 ± 0.5
<b>nach ETZ</b>						
1./2. Wo.	452 ± 11	459 ± 14	432 ± 10	26.3 ± 0.7	28.7 ± 1.1 <sup>*</sup>	25.7 ± 0.8
3./4. Wo.	470 ± 9	473 ± 14	443 ± 11	26.6 ± 0.6	28.0 ± 0.9	25.8 ± 0.7
5./6. Wo.	476 ± 11	480 ± 16	452 ± 11	26.3 ± 0.6	27.2 ± 0.9	25.8 ± 0.5

**Tabelle 3.1:** Körpergewichtswerte (g) und Futtermittelverbrauchswerte (g/d) der einzelnen Gruppen vor und während des Etonitazentrinkversuchs (jeweils  $n = 24$ ), bzw. im *protrahierten* Entzug (jeweils  $n = 12$ ). Die Ergebnisse werden in Mittelwerten mit Angabe des SEM dargestellt. <sup>++</sup>  $p < 0.01$  im Vergleich zu den Kontrollen des gleichen Zeitraumes (Mann-Whitney *U*-Test nach Kruskal-Wallis *H*-Test). <sup>\*</sup>  $p < 0.05$ . <sup>\*\*</sup>  $p < 0.01$  vs. *Wahl*-Gruppe/Kontrollen des gleichen Zeitraumes (ANOVA gefolgt von post-hoc *t*-Test). Kontr. = Kontrollen.

#### 3.1.2 Futtermittelverbrauch

In den vier Wochen vor Beginn der Etonitazeneinnahme konnten im Vergleich zwischen den Gruppen (*Wahl*, *Forciert* und Kontrollen) keine signifikanten Unterschiede im Futtermittelverbrauch festgestellt werden; Woche 1 - 2:  $F(2,69) = 0.20$ ,  $p > 0.05$ ; Woche 3 - 4:  $F(2,69) = 0.19$ ,  $p > 0.05$ ; one way ANOVA, (Tab. 3.1).

Auch in den ersten zwei Wochen des Etonitazenenkonsums ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen; Woche 1 - 2:  $F(2,69) = 0.12$ ,  $p > 0.05$ ; one way ANOVA, (Tab. 3.1). In den Wochen drei und vier lag der Futtermittelverbrauch der *forciert* behandelten Gruppe dann im Vergleich mit den Kontrollen signifikant höher. Woche 3 - 4:  $z = 2.577$ ,  $p < 0.01$ ; wegen Inhomogenität der Varianzen im Bartlett Test Kruskal-Wallis *H*-Test und Mann-Whitney *U*-Test, (Tab. 3.1).

Ein erhöhter Futtermittelverbrauch der *forciert* behandelten Gruppe im Vergleich mit Kontrollen und *Wahl*-Gruppe konnte anschließend in den letzten Wochen des Etonitazentrinkversuchs nachgewiesen werden; Woche 5 - 6:  $F(2,69) = 1.51$ ,  $p > 0.05$ ; Woche 7 - 8:  $t(69) = 3.19$ ,  $p < 0.01$ ; ANOVA und post hoc *t*-Test, (Tab. 3.1).

Ein Vergleich des Parameters Futtermittelverbrauch im zweitägigen Entzug (Kontrollen u. *Wahl* /*Forciert akut*,  $N = 36$ ) ergab dagegen keine signifikanten Unterschiede



zwischen den Versuchsgruppen (Zweitageswerte:  $F(2,33) = 1.31$ ,  $p > 0.05$ ; one way ANOVA). Im protrahierten Entzug war ein signifikant höherer Futterverbrauch der forciert behandelten Gruppe im Vergleich mit *Wahl*-Gruppe und Kontrollen in den ersten beiden Wochen feststellbar; Woche 1 - 2:  $F(2,33) = 3.28$ ;  $t(33) = 2.50$ ,  $p < 0.05$ ; ANOVA und post hoc *t*-Test. Im weiteren Verlauf ließen sich die Unterschiede nicht mehr nachweisen; Woche 3 - 4;  $F(2,33) = 2.04$ ,  $p > 0.05$ ; Woche 5 - 6:  $F(2,33) = 1.11$ ,  $p > 0.05$ ; one way ANOVA, (Tab. 3.1).

Zusammenfassend war der Futterverbrauch vor Beginn des eigentlichen Experiments in allen Gruppen gleich. In der dritten und vierten bzw. in der siebten und achten Woche des Etonitazentrinkversuchs war der Futterverbrauch der forciert behandelten Tiere signifikant erhöht. Der akute Entzug hatte keinen unterscheidbaren Effekt auf die drei Gruppen. Zu Beginn der sechswöchigen Abstinenzperiode verbrauchten die forciert behandelten Tiere allerdings größere Futtermengen, bevor sie sich im weiteren Verlauf wieder den anderen Gruppen anglichen.

#### 3.1.3 Flüssigkeits- und Etonitazeneinnahme

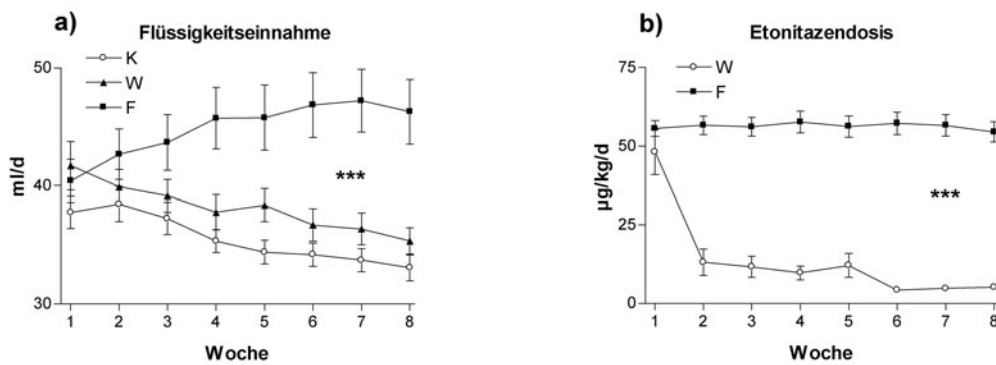
Im Vergleich der drei Versuchsgruppen (*Wahl*, *Forciert* und Kontrollen) zeigten sich vor Beginn des Etonitazentrinkversuchs keine signifikanten Unterschiede in der täglichen Flüssigkeitseinnahme; Woche 1 - 2:  $F(2,69) = 0.38$ ,  $p > 0.05$ ; Woche 3 - 4:  $F(2,69) = 0.53$ ,  $p > 0.05$ ; one way ANOVA.

Zu Beginn des Trinkversuchs ließen sich zunächst keine Unterschiede nachweisen; Woche 1 - 2:  $F(2,69) = 1.12$ ,  $p > 0.05$ ; one way ANOVA. Ab der dritten Wochen lag der Flüssigkeitsverbrauch der *Forciert*-Gruppe deutlich über dem der Kontrollen. Woche 3 - 4:  $z = 2.30$ ,  $p < 0.05$ . Woche 5 - 6:  $z = 4.14$ ,  $p < 0.001$ ; Woche 7 - 8:  $z = 4.37$ .  $p < 0.001$ ; wegen Inhomogenität der Varianzen im Bartlett Test jeweils Kruskal-Wallis *H*-Test und Mann-Whitney *U*-Test, (vgl. Abb.3.1a).

Durch die erhöhte Flüssigkeitsaufnahme der forciert behandelten Gruppe lagen die durchschnittlichen Etonitazentagesdosen weit über denen der *Wahl*-Gruppe. Die durchschnittliche Etonitazentagesdosis in der forciert behandelten Gruppe ( $56 \pm 3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ ) unterschied sich signifikant von der selbstbestimmt konsumierenden Gruppe ( $14 \pm 3 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ );  $p < 0.001$ . (vgl. Abb.3.1b).

Nach zweitägigem Entzug zeigte die Gruppe der forciert behandelten Tiere einen im Vergleich mit *Wahl*- und Kontrollgruppe deutlich und signifikant erhöhten Flüssigkeitsbedarf; zweitägiger Entzug:  $n = 36$ ,  $F(2,33) = 4.53$ ,  $t(33) = 2.99$ ,  $p < 0.01$  (ANOVA u. post hoc *t*-Test). In der Phase des sechswöchigen Entzugs waren signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nicht mehr feststellbar;  $n = 36$ , Woche 1 - 2:  $p > 0.05$ ; Woche 5 - 6:  $p > 0.05$  (one way ANOVA).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.1:** (a) Individuelle Flüssigkeitseinnahmewerte in den behandelten Gruppen und der Kontrollgruppe während des Etonitazentrinkversuchs (jeweils  $n = 24$ ). (b) Vergleich der Etonitazenaufnahme in den behandelten Gruppen während des achtwöchigen Etonitazentrinkversuchs ( $n = 24$ ). Die forciert behandelte Gruppe zeigt einen über die gesamte Zeit kontinuierlichen Verbrauch, während die Wahl Gruppe nach hohen Einstiegsdosen in der ersten Woche auf ein im Vergleich mit der forcierten Gruppe sehr viel niedrigeres Niveau zurückfällt. K = Kontrollen, W = Wahl Gruppe, F = Forcierte Gruppe. Die Kurven unterscheiden sich signifikant voneinander; \*\*\* $p < 0.001$  (two way ANOVA).

Zusammenfassend bestand vor Beginn des Experimentes kein Unterschied in Bezug auf die verbrauchten Flüssigkeits- bzw. Wassermengen. Mit Beginn der Etonitazendosis kam es zu langsamen Veränderungen der täglichen Flüssigkeitseinnahme. Die *forcierte* Gruppe, die mit der Flüssigkeit zwangsweise Opioid einnahm, steigerte den Flüssigkeitsverbrauch und verbrauchte deutlich höhere Mengen. Wurden aus den täglich verbrauchten Flüssigkeitsmengen die eingenommenen Etonitazendosen berechnet, ergab sich das aus den Vorexperimenten der Arbeitsgruppe bekannte Muster. Die selbstbestimmt konsumierenden Tiere zeigten zu Beginn Werte, die denen der forciert behandelten Gruppe glichen. Nach ein bis zwei Wochen reduzierten sich die Etonitazendosen der *Wahl*-Gruppe deutlich, bevor sie für den Rest des Trinkversuchs auf niedrigerem, signifikant von der *forcierten* Gruppe unterscheidbaren Niveau stabil verblieben. Die zwangsweise behandelten Tiere nahmen insgesamt Dosen des  $\mu$ -Rezeptoragonisten zu sich, die im Vergleich mit der *Wahl*-Gruppe durchschnittlich um das Vierfache höher lagen.

### 3.2 Neurochemische Untersuchungen

Nach Dekapitation der Tiere und Präparation der Gewebeproben schlossen sich die verschiedenen Rezeptorbindungsstudien bzw. die Enzymassays an.

### 3.2.1 [<sup>3</sup>H]DAMGO-Bindung am $\mu$ -Opioidrezeptor

Um Veränderungen der  $\mu$ -Rezeptordichte bzw. der Affinität für einen hochselektiven Agonisten beschreiben zu können, wurden Bindungsstudien mit dem radioaktiv markierten Liganden [<sup>3</sup>H]DAMGO durchgeführt. Sättigungsanalysen der Bindung zeigten in keiner der drei untersuchten Hirnregionen (*frontaler Kortex*, *Mittelhirn* und *parietaler Kortex*) Unterschiede bei  $K_d$ - und  $B_{max}$ -Werten zwischen Kontrollen und den Gruppen mit Etonitazeneinnahme; (Tab.3.2, Abb.3.2).

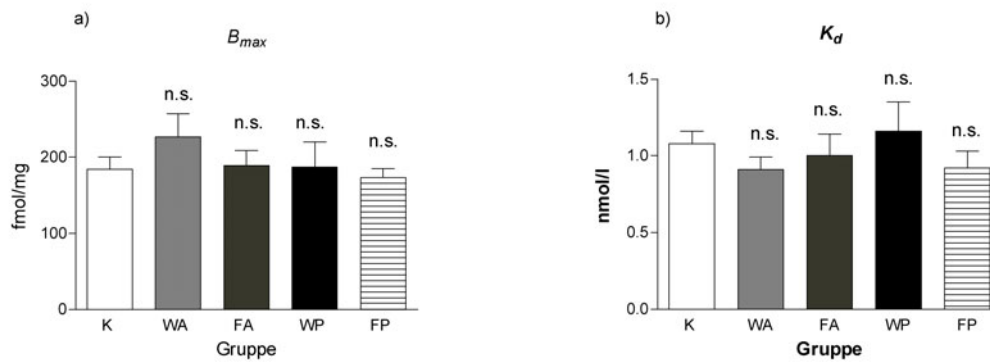
Um Aussagen über Veränderungen der Koppelung des  $\mu$ -Opioidrezeptors an die  $G_{i/o}$ -Proteine durch Behandlung mit Etonitazen treffen zu können, sollte die Bindung von [<sup>3</sup>H]DAMGO im *parietalen Kortex* in Anwesenheit des nicht hydrolysierbaren GTP-Analogons GTP $\gamma$ S bestimmt werden. GTP $\gamma$ S bindet irreversibel an die  $\alpha$ -Untereinheiten inhibitorischer G-Proteine, die nachfolgend dissoziieren und vom Rezeptor entkoppeln. Die Affinität des  $\mu$ -Rezeptors nimmt im entkoppelten Zustand ab und ist durch erhöhte  $K_d$ -Werte messbar. Die Zugabe von 500 nmol/l GTP $\gamma$ S führte zu einem 3.3 - 4.1 fachen Anstieg der  $K_d$ -Werte in allen Gruppen ( $n = 8 - 12$ ,  $p < 0.001$  vs. entsprechende Bindung ohne GTP $\gamma$ S; gepaarter Student  $t$ -Test). Allerdings waren die  $K_d$ -Werte in den etonitazenerfahrenen Gruppen im akuten Entzug (*Wahl akut* und *Forciert akut*) signifikant niedriger im Vergleich mit den Kontrollen ( $p < 0.01$  vs. Kontrollen; ANOVA und post hoc  $t$ -Test). Die Anwesenheit des GTP-Analogons hatte keinen signifikanten Einfluss auf die  $B_{max}$ -Werte.

Zusammenfassend kam es in keiner der etonitazenkonsumierenden Gruppen zur Veränderung der Bindungsdichte oder Affinität des  $\mu$ -Rezeptors. Die Entkoppelung des G-Proteins vom  $\mu$ -Rezeptor durch Zugabe des GTP-Analogons fiel nur in den etonitazenerfahrenen Gruppen im akuten Entzug relativ zur Kontrollgruppe signifikant schwächer aus. Insgesamt ließen sich in den [<sup>3</sup>H]DAMGO-Bindungsstudien weder Unterschiede zwischen dem selbstbestimmten und forcierten Etonitazenkonsument noch protrahierte, d.h. nach sechswöchiger Abstinenz nachweisbare Effekte zeigen.

### 3.2.2 [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien an G-Proteinen

Zur Bestimmung quantitativer oder qualitativer Veränderungen der  $G_{i/o}$ -Proteine wurden [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien an den  $\alpha$ -Untereinheiten durchgeführt. Da die G-Proteine den Austausch von GDP mit [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S im Sinne einer Enzymreaktion katalysieren, wurden die Daten als Konzentrations-Wirkungskurven analysiert. In den entsprechenden Kurven, die aus [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Bindungsdaten der Experimente im *parietalen Kortex* erstellt wurden, zeigten sich im Vergleich mit den Kontrollen signifikant höhere  $E_{max}$ -Werte bei den etonitazenerfahrenen Gruppen

### 3 Ergebnisse



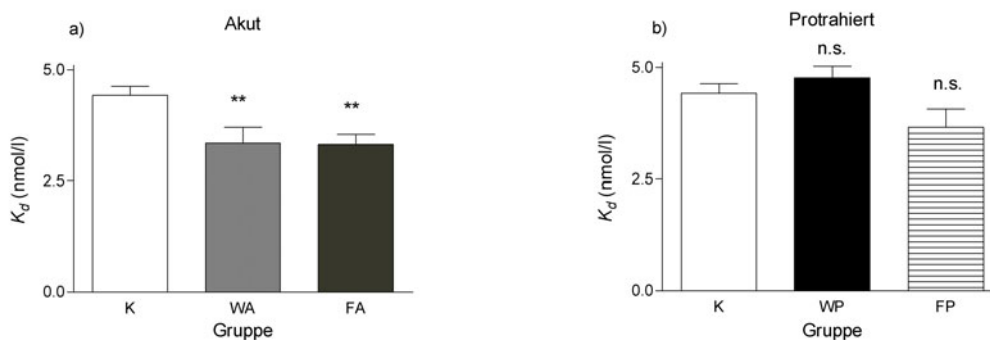
**Abbildung 3.2:** Ergebnisse aus Sättigungsanalysen der [ $^3\text{H}$ ]DAMGO-Bindung in Gewebshomogenaten des **parietalen Kortex**. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von  $100\mu\text{mol/l}$  Naloxon bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. **(a)** Gegenüberstellung der  $B_{max}$ -Werte der Gruppen im zweitägigen (akuten) und sechswöchigen (protrahierten) Entzug. Die etonitazenerfahrenen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant von den Kontrollen. **(b)** Gegenüberstellung der  $K_d$ -Werte der Gruppen im zweitägigen (akuten) und sechswöchigen (protrahierten) Entzug. Die etonitazenerfahrenen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant von den Kontrollen.  $n = 8 - 12$ ; K = Kontrollen, WA = *Wahl* akut, FA = *Forciert* akut, WP = *Wahl* protrahiert, FP = *Forciert* protrahiert.

Gruppe	Frontaler Kortex		Mittelhirn	
	$B_{max}$ (fmol/mg)	$K_d$ (nM)	$B_{max}$ (fmol/mg)	$K_d$ (nM)
<b>Kontrollen</b>	$322 \pm 28$	$1.07 \pm 0.09$	$408 \pm 16$	$1.62 \pm 0.12$
<b>Akut:</b>				
<i>Wahl</i>	$333 \pm 15$	$1.08 \pm 0.17$	$416 \pm 30$	$1.40 \pm 0.16$
<i>Forciert</i>	$312 \pm 24$	$0.95 \pm 0.14$	$342 \pm 33$	$1.20 \pm 0.28$
<b>Protrahiert:</b>				
<i>Wahl</i>	$281 \pm 16$	$0.95 \pm 0.19$	$391 \pm 35$	$1.41 \pm 0.17$
<i>Forciert</i>	$308 \pm 26$	$0.99 \pm 0.10$	$389 \pm 25$	$1.74 \pm 0.15$

**Tabelle 3.2:** Ergebnisse der Sättigungsanalysen aus Bindungsdaten der homologen Verdrängung von [ $^3\text{H}$ ]DAMGO ( $0.305 \pm 0.002$  nM) mit sechs Konzentrationen unmarkiertem DAMGO ( $0.5 - 16$  nM) in Gewebshomogenaten des **frontalen Kortex** und des **Mittelhirns**. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von  $1\mu\text{M}$  Naloxon bestimmt. Die Gewebepräparation erfolgte im zweitägigen (akuten) und im sechswöchigen (protrahierten) Entzug. Dargestellt sind Mittelwerte unter Angabe des SEM;  $n = 8 - 12$ . Die Gruppen mit Etonitazenerfahrung (*Wahl* und *Forciert*) unterscheiden sich nicht signifikant von den Kontrollen.

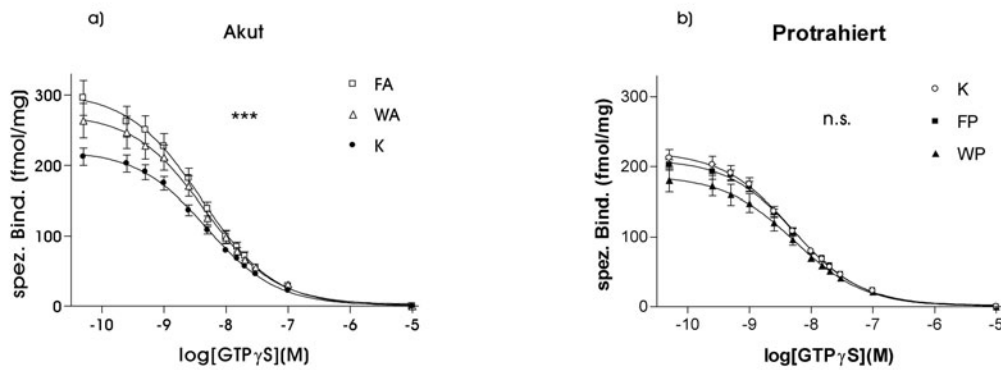
im akuten Entzug. Die  $E_{max}$ -Werte lagen dabei um 31 % (*Wahl akut*) bzw. um 34 % (*Forciert akut*) über denen der Kontrollgruppe ( $p < 0.01$  vs. Kontrollen; ANOVA und post hoc  $t$ -Test). Signifikante Unterschiede in den  $EC_{50}$ -Werten konnten nicht nachgewiesen werden. Die etonitazenerfahrenen Gruppen im protrahierten Entzug unterschieden sich nicht von den Kontrollen (Abb.3.4).

Zusätzlich zur basalen Bindungsdichte und Affinität der  $G_{i\alpha}$ -Untereinheiten für [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S sollte die Stimulierbarkeit der Bindung durch DAMGO untersucht werden. Die Bindung des Liganden an den  $\mu$ -Rezeptor aktiviert die G-Proteine, die nachfolgend im Gegensatz zum Ruhezustand verstärkt GDP durch das radioaktiv markierte nicht hydrolysierbare GTP $\gamma$ S austauschen. Die Anwesenheit von DAMGO führte innerhalb aller Gruppen wie erwartet zu signifikanten Zunahmen der  $E_{max}$ -Werte. Die Werte der etonitazenerfahrenen Gruppen im akuten Entzug lagen allerdings im Vergleich mit den Kontrollen um 26 % (*Wahl akut*,  $p < 0.05$  vs. Kontrollen; ANOVA und post hoc  $t$ -Test) bzw. 35 % (*Forciert akut*,  $p < 0.01$  vs. Kontrollen; ANOVA und post hoc  $t$ -Test) höher. Die Zugabe des  $\mu$ -Rezeptoragonisten bewirkte eine signifikante Erniedrigung der  $EC_{50}$ -Werte in allen Gruppen im Vergleich mit den korrespondierenden Daten vor Zusatz von DAMGO mit Ausnahme der freiwillig konsumierenden Gruppe im akuten Entzug (Abb.3.5).

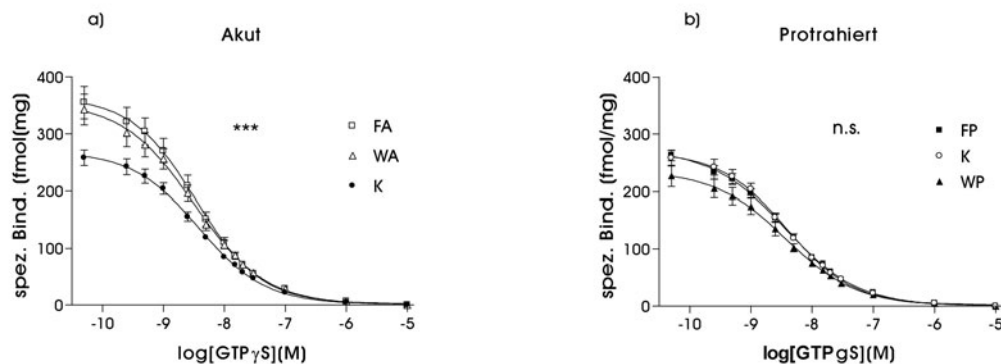


**Abbildung 3.3:** G-Proteintkoppelung vom  $\mu$ -Rezeptor durch GTP $\gamma$ S. Darstellung der  $K_d$ -Werte aus Sättigungsanalysen der [ $^3$ H]DAMGO-Bindung im parietalen Kortex bei Anwesenheit von 500 nmol/l GTP $\gamma$ S. Die nicht spezifische Bindung wurde bei Zugabe von 100  $\mu$ mol/l Naloxon bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. (a) Gegenüberstellung der  $K_d$ -Werte in den Gruppen im zweitägigen (akuten) Entzug. \*\* $P < 0,01$  vs. Kontrollen (ANOVA mit anschließendem post hoc  $t$ -Test). (b) Darstellung der  $K_d$ -Werte in den Gruppen im sechswöchigen (protrahierten) Entzug. Die etonitazenerfahrenen Gruppen unterscheiden sich nicht mehr von den Kontrollen.  $n = 8 - 12$ ; K = Kontrollen, WA = *Wahl akut*, FA = *Forciert akut*, WP = *Wahl protrahiert*, FP = *Forciert protrahiert*.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.4:** Die  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsdaten im parietalen Kortex (ohne Zugabe von DAMGO) wurden als Konzentrations-Wirkungskurven analysiert um  $E_{max}$ - und  $EC_{50}$ -Werte bestimmen zu können. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von  $10\ \mu\text{M}$  GTP $\gamma\text{S}$  bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. **(a)** Konzentrations-Wirkungskurven der Gruppen im zweitägigen (akuten) Entzug. Die Kurven unterscheiden sich signifikant von denen der Kontroll-Gruppe, \*\*\*  $p < 0.001$  (two way ANOVA). **(b)** Konzentrations-Wirkungskurven der Gruppen im sechswöchigen (protrahierten) Entzug. ( $n = 8 - 12$ ); K = Kontrollen, WA = Wahl akut, FA = Forciert akut, WP = Wahl protrahiert, FP = Forciert protrahiert.

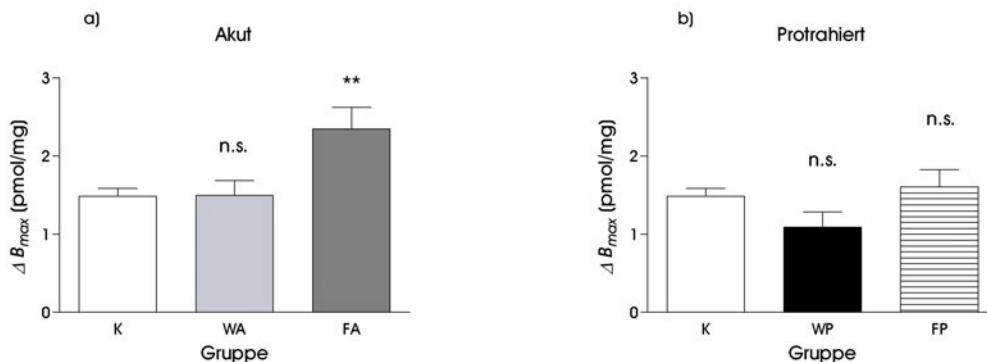


**Abbildung 3.5:** Die  $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindungsdaten im parietalen Kortex (mit Zugabe von DAMGO) wurden als Konzentrations-Wirkungskurven analysiert, um  $E_{max}$ - und  $EC_{50}$ -Werte bestimmen zu können. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von  $10\ \mu\text{M}$  GTP $\gamma\text{S}$  bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. **(a)** Konzentrations-Wirkungskurven der Gruppen im zweitägigen (akuten) Entzug. Die Kurven unterscheiden sich signifikant von denen der Kontrollen, \*\*\*  $P < 0.001$  (two way ANOVA). **(b)** Konzentrations-Wirkungskurven der Gruppen im sechswöchigen (protrahierten) Entzug.  $n = 8 - 12$ ; K = Kontrollen, WA = Wahl akut, FA = Forciert akut, WP = Wahl protrahiert, FP = Forciert protrahiert.

Damit Aussagen über die intrinsische Effizienz des  $\mu$ -Rezeptoragonisten zur Aktivierung der G-Proteine getroffen werden konnten, wurden mit Hilfe von Scatchardanalysen aus den durch DAMGO stimulierten [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Nettobindungsdaten (Bindung nach Zugabe von DAMGO minus basaler Bindung ohne DAMGO) maximale Bindungsdichte ( $B_{max}$ ) und Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_d$ ) berechnet. Dabei zeigte nur die Gruppe mit erzwungenem Etonitazekonsum im akuten Entzug (*forcierte Gruppe*) im Vergleich mit den Kontrollen eine erhöhte DAMGO stimulierte (netto-)Bindung mit einem um 58 % erhöhten  $B_{max}$ -Wert ( $n = 8 - 12$ ;  $p < 0.01$  vs. Kontrollen; ANOVA und post hoc  $t$ -Test) (Abb. 3.6). Es ließen sich keine Veränderungen nach sechswöchiger Abstinenz nachweisen.

Die Netto- $B_{max}$ -Werte (stimulierte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung) wurden durch die  $B_{max}$ -Werte der [ $^3$ H]DAMGO-Bindung dividiert, um den *amplification factor* als Maß für die Anzahl der pro  $\mu$ -Opioidrezeptor aktivierten G-Proteine zu bestimmen. Die forciert behandelte Gruppe zeigte im akuten Entzug im Vergleich mit den Kontrollen einen um 53 % erhöhten *amplification factor* ( $p < 0.05$  vs. Kontrollen, ANOVA und post hoc  $t$ -Test). Alle übrigen Gruppen einschließlich der protrahiert abstinenten zeigten keine signifikanten Unterschiede (Abb. 3.7).

Zusammenfassend führte die Vorbehandlung mit Etonitazen im akuten Entzug zu einem signifikant erhöhten basalen Substratumsatz durch die G-Proteine mit erhöhter [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung nach Austausch von GDP. Die Stimulierbarkeit der



**Abbildung 3.6:** Aus transformierten Bindungsdaten der (DAMGO-stimulierten) Netto- $[^{35}\text{S}]$ GTP $\gamma$ S-Bindung im **parietalen Kortex** wurden mit Hilfe von Scatchardanalysen  $\Delta B_{max}$ -Werte in pmol/mg Protein bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. **(a)** Gegenüberstellung der  $\Delta B_{max}$ -Werte der Gruppen im zweitägigen (akuten) Entzug. **\*\***  $p < 0,01$ , (ANOVA und post-hoc  $t$ -Test). **(b)**  $\Delta B_{max}$ -Werte der Gruppen im sechswöchigen (protrahierten) Entzug. Die Gruppen mit Etonitazenerfahrung unterscheiden sich nicht von den Kontrollen.  $n = 8 - 12$ ; K = Kontrollen, WA = Wahl akut, FA = Forciert akut, WP = Wahl protrahiert, FP = Forciert protrahiert.

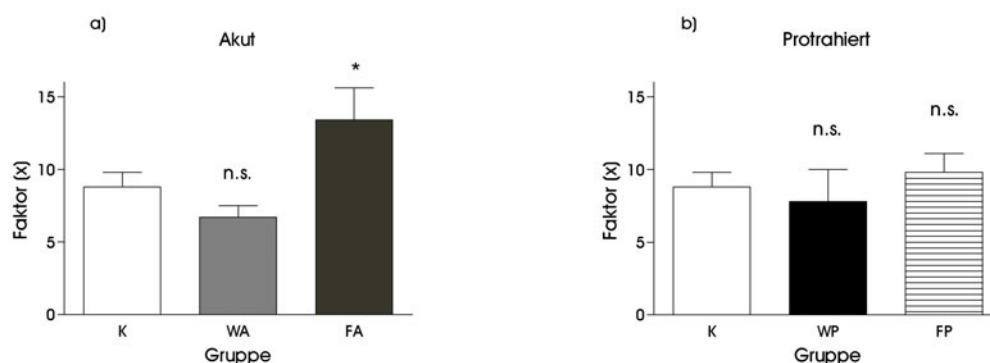


### 3 Ergebnisse

Bindung durch den Agonisten DAMGO war in allen etonitazenerfahrenen Gruppen des akuten Entzugs ebenfalls signifikant erhöht. Die relative Steigerung der Bindung durch DAMGO Stimulation als Ausdruck der Effizienz des Agonisten zur Aktivierung der G-Proteine war dagegen nur in der forciert behandelten Gruppe des akuten Entzugs signifikant erhöht. Die [<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsstudien ergaben insgesamt keine protrahierten bzw. nach sechswöchiger Abstinenz nachweisbaren Effekte.

#### 3.2.3 [<sup>3</sup>H]SCH23390-Bindungsstudien am D<sub>1/5</sub>-Rezeptor

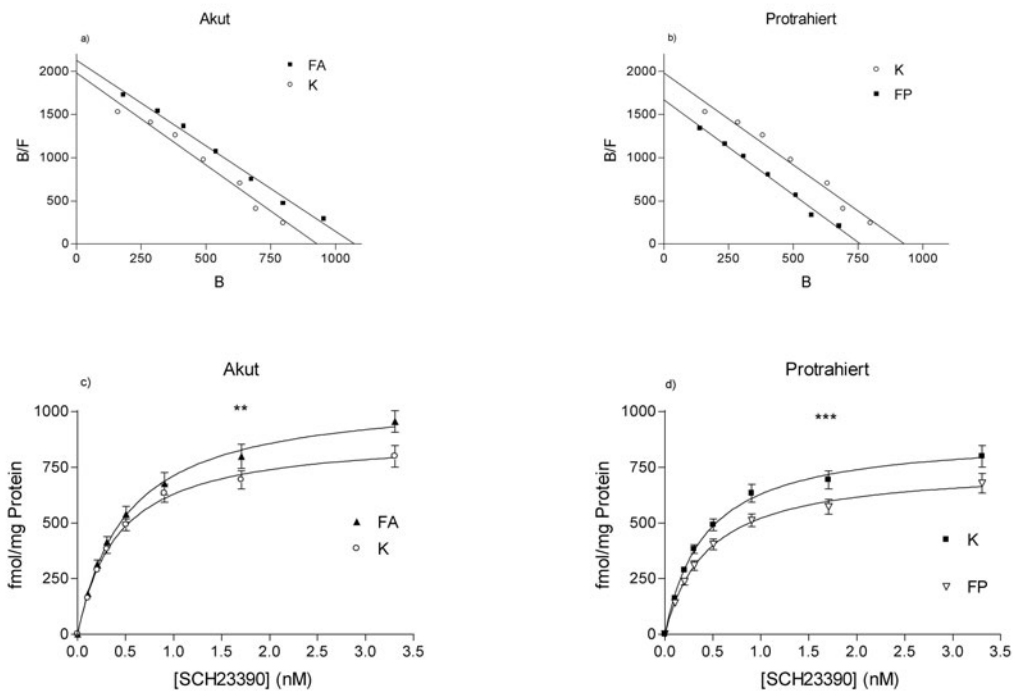
Mit dem Dopamin D<sub>1/5</sub>-Rezeptorantagonisten [<sup>3</sup>H]SCH23390 sollten Bindungsstudien an der Antagonistenbindungsstelle des Rezeptors durchgeführt werden. Sättigungsanalysen der Bindungsdaten zeigten im Vergleich mit den Kontrollen signifikante Unterschiede der maximalen Bindungsdichte ( $B_{max}$ ) in beiden Gruppen des erzwungenen chronischen Etonitazenenkonsums. Die  $B_{max}$ -Werte lagen im akuten Entzug um 19 % höher (*Forciert akut*,  $p < 0.05$  vs. Kontrollen; ANOVA und post hoc  $t$ -Test) und im protrahierten Entzug um 17 % niedriger (*Forciert protrahiert*,  $p < 0.05$  vs. Kontrollen; ANOVA und post hoc  $t$ -Test) als die Werte der Kontrollgruppe (Abb.3.8a-b). Die Sättigungskurven der forciert behandelten Gruppen unterschieden sich signifikant von denen der Kontrollgruppe (Abb.3.8c-d).



**Abbildung 3.7:** Der *amplification factor* wurde per Division der  $\Delta B_{max}$ -Werte aus den Netto-[<sup>35</sup>S]GTPγS-Bindungsdaten durch die  $B_{max}$ -Werte der [<sup>3</sup>H]DAMGO-Bindung im *parietalen Kortex* berechnet. Er gilt als Maß der pro  $\mu$ -Opioidrezeptor stimulierten Anzahl von G-Proteinen. Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. **(a)** Gegenüberstellung des *amplification factor* der Gruppen im zweitägigen (akuten) Entzug. \*  $p < 0.05$  (ANOVA und post hoc  $t$ -Test) **(b)** *Amplification factor* in den Gruppen im sechswöchigen (protrahierten) Entzug. Die etonitazenerfahrenen Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant von den Kontrollen.  $n = 8 - 12$ ; K = Kontrollen, WA = *Wahl akut*, FA = *Forciert akut*, WP = *Wahl protrahiert*, FP = *Forciert protrahiert*.



## 3.2 Neurochemische Untersuchungen

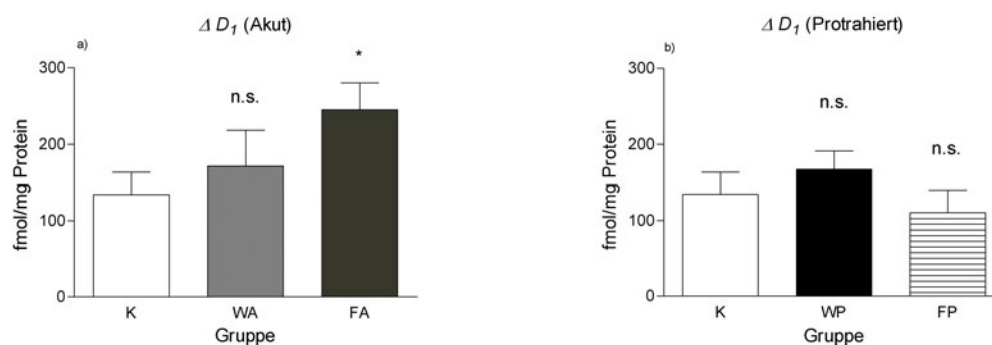


**Abbildung 3.8:** Scatchard-Plots (oben) und Sättigungskurven (unten) der Bindung des Dopamin  $D_1/D_5$ -Dopaminrezeptorantagonisten  $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$  im *limbischen Vorderhirn*. Die Bestimmung der unspezifischen Bindung fand in Anwesenheit von  $1 \mu\text{M}$  (+)SCH23390 statt. Alle Werte sind Mittelwerte; die Werte in (c) und (d) sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. **(a)** Darstellung der transformierten Bindungsdaten der forciert behandelten Gruppe im zwei-tägigen (akuten) Entzug und der entsprechenden Kontrollen als Scatchard-Plot. Die  $B_{max}$ -Werte der *forcierten* Gruppe liegen im Vergleich mit den Kontrollen signifikant höher ( $p < 0.05$  vs Kontrollen; ANOVA und post hoc  $t$ -Test). **(b)** Transformierte Bindungsdaten der forciert behandelten Gruppe im sechswöchigen (protrahierten) Entzug und der Kontrollen als Scatchard-Plot. Die  $B_{max}$ -Werte der *forcierten* Gruppe liegen im Vergleich mit den Kontrollen signifikant niedriger ( $p < 0.05$  vs. Kontrollen; ANOVA und post hoc  $t$ -Test). **(c)** Sättigungskurven der Bindungsdaten der forciert behandelten Gruppe im zwei-tägigen Entzug im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen. **(d)** Sättigungskurven der Bindungsdaten der forciert behandelten Gruppe im sechswöchigen Entzug im Vergleich mit den entsprechenden Kontrollen.

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (two way ANOVA). K = Kontrollen ( $n = 11$ ), FA = Forciert akut ( $n = 6$ ), FP = Forciert protrahiert ( $n = 6$ ).

Anschließend wurden die Experimente nach Zusatz des Agonisten Dopamin wiederholt, um Aussagen über mögliche Veränderungen der hoch- bzw. niederaffinen Bindungsstellen des Dopamin  $D_{1/5}$ -Rezeptors treffen zu können. Dopamin inhibiert im hochaffinen Zustand des Rezeptors nicht kompetitiv die Bindung des Antagonisten  $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$  und verringert dessen maximale Bindungsdichte  $B_{max}$ . Im

### 3 Ergebnisse



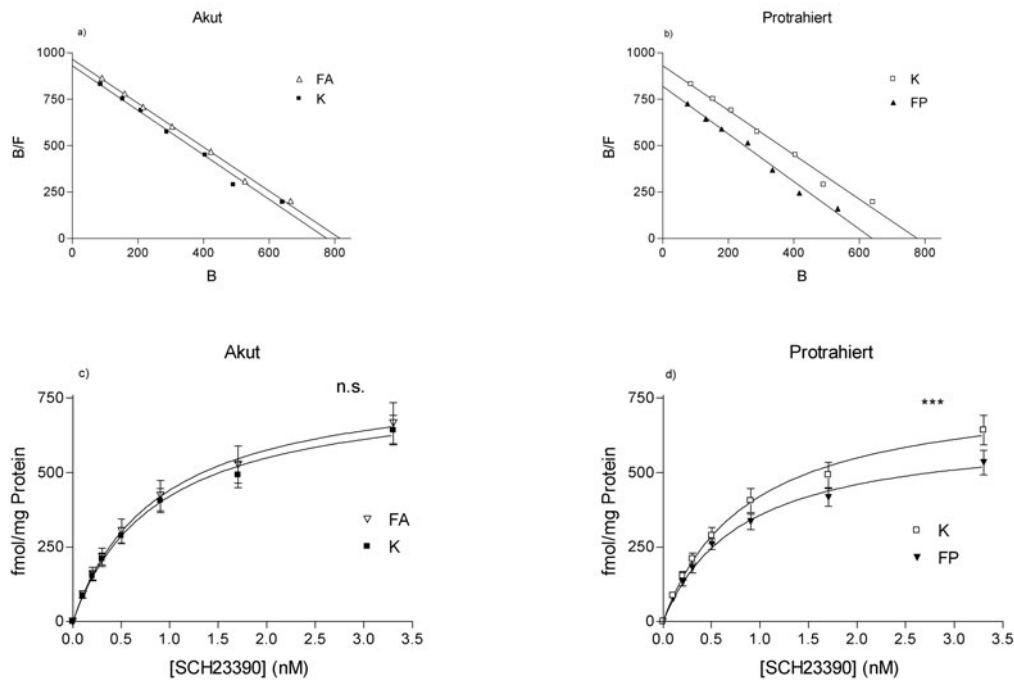
**Abbildung 3.9:** Darstellung der Differenz ( $\Delta D_1$ ) von maximaler Bindungsdichte der Antagonistenbindung ( $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ ) vor und nach nicht kompetitiver Inhibition durch Dopamin an der hochaffinen Bindungsstelle. Alle Werte als Mittelwert mit Angabe des SEM. **(a)**  $\Delta D_1$  liegt in der forcierten Gruppe im akuten Entzug ( $245 \pm 35$  fmol/l) im Vergleich mit der Kontrollgruppe ( $134 \pm 29$  fmol/l) um 83 % signifikant höher. \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen (ANOVA mit nachfolgendem post hoc  $t$ -Test). **(b)** Nach sechswöchiger Abstinenz ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. K = Kontrollen  $n = 11$ , FA = Forciert akut ( $n = 6$ ), FP = Forciert protrahiert ( $n = 6$ ).

niederaffinen Zustand des Rezeptors (z.B. Entkoppelung vom G-Protein) kommt es zum kompetitiven Antagonismus mit Erniedrigung der Affinität des Antagonisten. Die Anwesenheit von Dopamin führte deshalb in allen fünf Gruppen zum Anstieg der  $K_d$ -Werte (60 - 105 %,  $p < 0.001$  vs korrespondierende Daten ohne Dopamin; gepaarter Student  $t$ -Test) und zum Abfall der  $B_{max}$ -Werte (15 - 23 %,  $p < 0.001$  vs. korrespondierende Daten ohne Dopamin; gepaarter Student  $t$ -Test). Im Vergleich der Gruppen zeigten sich diesbezüglich keine Unterschiede.

Durch Berechnung der Differenz der  $B_{max}$ -Werte vor und nach Zusatz von Dopamin (im Folgenden als  $\Delta D_1$  bezeichnet) sollten weitere Aussagen über die hochaffine Bindungsstelle möglich werden. Der durch den nicht kompetitiven Antagonismus des Dopamins inhibierte Anteil der  $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ -Bindung am  $D_{1/5}$ -Rezeptor ( $\Delta D_1$ ) lag im Vergleich mit der Kontrollgruppe in der Gruppe der forciert behandelten Tiere im akuten Entzug deutlich höher (Vergleich der Absolutwerte, 83 % Forciert akut vs. Kontrollen,  $p < 0.05$ ; ANOVA und post hoc  $t$ -Test). (Abb. 3.9).

Durch lineare Regressionsanalysen wurde der individuelle Etonitazekenkonsum mit dem durch Dopamin inhibierten Anteil der maximalen Bindung des Antagonisten  $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$  ( $\Delta D_1$ ) verglichen. Hier zeigte sich zum einen eine positive Korrelation von durchschnittlicher Etonitazendosis ( $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ ) und dem inhibierten Anteil im zweitägigen Entzug ( $r = 0.65$ ,  $p < 0.01$ ,  $N = 17$ ) und zum anderen eine negative Korrelation nach sechswöchiger Abstinenz ( $r = -0.62$ ,  $p < 0.01$ ,  $N = 17$ ).

### 3.2 Neurochemische Untersuchungen



**Abbildung 3.10:** Sättigungsanalysen und Scatchard-Plots der Bindungsdaten von  $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$  im limbischen Vorderhirn nach nicht kompetitiver Hemmung durch 500 nmol/l Dopamin. Es sollte die hochaffine Bindung des  $\text{D}_{1/5}$ -Rezeptors untersucht werden. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 1  $\mu\text{mol/l}$  (+)SCH23390 bestimmt. Alle Werte sind Mittelwerte; Die Werte in (c) und (d) sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. Zur Verdeutlichung der Unterschiede werden nur Kontrollen und forciert behandelte Gruppen dargestellt. **(a)**  $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ -Bindung der forciert behandelten Gruppe im zehntägigen (akuten) Entzug und der entsprechenden Kontrollen als Scatchard-Plot. **(b)** Antagonisten-Bindung der forciert behandelten Gruppe im sechswöchigen (protrahierten) Entzug und der entsprechenden Kontrollen als Scatchard-Plot. **(c)** Sättigungskurven der forciert behandelten Gruppe im zehntägigen (akuten) Entzug und der entsprechenden Kontrollen. Die Kurven unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. **(d)** Sättigungskurven der forciert behandelten Gruppe im sechswöchigen (protrahierten) Entzug und der entsprechenden Kontrollen. \*\*\*  $p < 0.001$  (two way ANOVA). K = Kontrollen ( $n = 12$ ), FA = Forciert akut ( $n = 6$ ), FP = Forciert protrahiert ( $n = 6$ ).

Im Vergleich der Sättigungskurven der  $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ -Bindung nach Zusatz von Dopamin unterschied sich nur die Gruppe der forciert behandelten Tiere nach sechswöchiger protrahierter Abstinenz signifikant von der Kontrolle;  $p < 0.001$  vs. Kontrollen, two way ANOVA (Abb. 3.10).

Zusammenfassend zeigten sich in der forciert behandelten Gruppe entgegengesetzte akute und persistierende Effekte in den Bindungsstudien mit  $[^3\text{H}]\text{SCH23390}$ . Während die maximale Bindung des Antagonisten in der forciert behandelten Grup-

### 3 Ergebnisse

pe nach zweitägigem Entzug signifikant höher lag, war sie nach sechswöchiger Abstinenz deutlich erniedrigt. Im akuten Entzug war der nicht kompetitive Antagonismus durch Dopamin signifikant verstärkt. Darüber hinaus bestand im akuten Entzug ein positiver linearer Zusammenhang bzw. im protrahierten Entzug ein negativer linearer Zusammenhang von Etonitazendosis und der nicht kompetitiven Inhibition durch Dopamin. Die Analyse der Sättigungskurven nach Zusatz von Dopamin zeigte einen von der Kontrollgruppe unterscheidbaren Effekt nach sechswöchiger Abstinenz mit deutlich flacherer Kurve.

#### 3.2.4 Stimulation der Adenylatzyklase im limbischen Vorderhirn

Der  $D_{1/5}$ -Rezeptor ist an G-Proteine vom Typ  $G_{s/olf}$  gekoppelt, die nach Aktivierung über den Rezeptor die Adenylatzyklase zum Substratumsatz stimulieren. Eine *in vitro* Stimulation des Enzyms lässt sich über Rezeptoragonisten, durch Beeinflussung des  $G_{s/olf}$  Proteins und durch direkte Stimulation erzielen. Eventuelle unterscheidbare Effekte sollten Aufschluss über Veränderungen der jeweils getesteten Ebene der Signalkette Rezeptor  $\rightarrow$  cAMP geben.

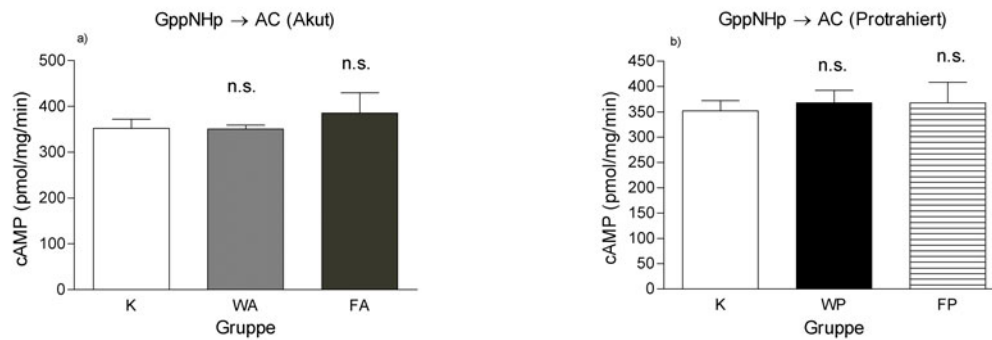
Der Substratumsatz der Adenylatzyklase nach Stimulation durch das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GppNHp und durch direkte Anregung durch Forskolin zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den etonitazenerfahrenen Gruppen (*Wahl akut/protrahiert*; *Forciert akut/protrahiert*) und den Kontrollen (Abb. 3.11 u. 3.12).

Im Gegensatz dazu zeigten die Konzentrations-Wirkungskurven nach Stimulation der Adenylatzyklase durch den  $D_{1/5}$ -Rezeptoragonisten Dihydroxidine signifikante Unterschiede bei den  $E_{max}$ -Werten in allen etonitazenerfahrenen Gruppen (*Wahl akut/protrahiert* und *Forciert akut/protrahiert*) im Vergleich mit den Kontrollen. Die  $E_{max}$ -Werte waren dabei um 23 - 37 % niedriger als die der Kontrollen, ohne dass sich Unterschiede zwischen den forciert behandelten und den freiwillig konsumierenden Gruppen ergaben ( $p < 0.05$  *Wahl/Forciert akut* u. *Wahl protrahiert* vs. Kontrollen bzw.  $p < 0.01$  *Forciert protrahiert* vs. Kontrollen; ANOVA mit nachfolgendem post hoc *t*-Test). (Abb. 3.13).

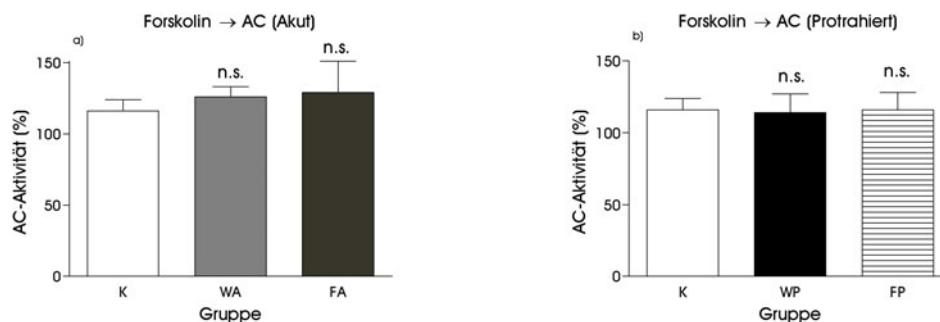
Lineare Regressionsanalysen zeigten darüber hinaus eine negative Korrelation der durchschnittlich konsumierten Etonitazendosis mit den  $E_{max}$  Werten nach Stimulation durch Dihydroxidine im zweitägigen Entzug ( $r = -0.62$ ,  $p < 0.01$ ,  $n = 18$ ) und nach sechswöchiger Abstinenz ( $r = -0.53$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 17$ ). Im Gegensatz zu den  $E_{max}$ -Werten hatte die Etonitazenvorbehandlung keinen Einfluss auf die  $EC_{50}$ -Werte.

Zusammenfassend stellten sich in den Stimulationsexperimenten der Adenylatzyklase akute und persistierende Veränderungen der maximalen Wirkung auf Ebe-

### 3.2 Neurochemische Untersuchungen



**Abbildung 3.11:** Substratumsatz der Adenylatzyklase (gebildetes cAMP in pmol/mg pro Minute) in Gewebshomogenaten des limbischen Vorderhirns in Anwesenheit von 1 µM GppNHp. Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. **(a)** Enzymaktivität in den etonitazenerfahrenen Gruppen im zweitägigen Entzug und der entsprechenden Kontrollen. Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. **(b)** AC-Aktivität in den behandelten Gruppen im sechswöchigen Entzug und der Kontrollen. Die vorbehandelten Gruppen unterscheiden sich nicht von den Kontrollen. K = Kontrollen ( $n = 12$ ), WA = *Wahl akut* ( $n = 6$ ), FA = *Forciert akut* ( $n = 6$ ), WP = *Wahl protrahiert* ( $n = 6$ ), FP = *Forciert protrahiert* ( $n = 6$ ).



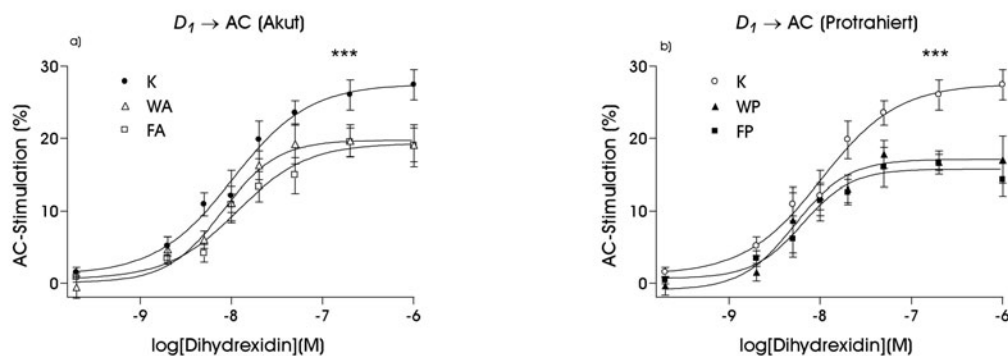
**Abbildung 3.12:** Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität durch 10 µM Forskolin im limbischen Vorderhirn. Dargestellt sind prozentuale Steigerungen bezogen auf die basale Enzymaktivität (in Anwesenheit von 1 µM GppNHp). Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. **(a)** Prozentuale Steigerung der AC-Aktivität in den Gruppen im zweitägigen (akuten) Entzug und der Kontrollen. Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. **(b)** Prozentuale Steigerung der Enzymaktivität in den vorbehandelten Gruppen im sechswöchigen (protrahierten) Entzug und der Kontrollen. Die Gruppen unterscheiden sich nicht signifikant voneinander. K = Kontrollen ( $n = 12$ ), WA = *Wahl akut* ( $n = 6$ ), FA = *Forciert akut* ( $n = 6$ ), WP = *Wahl protrahiert* ( $n = 6$ ), FP = *Forciert protrahiert* ( $n = 6$ ).

### 3 Ergebnisse

ne des Dopamin  $D_{1/5}$ -Rezeptors dar. Der maximale Substratumsatz nach Zusatz von Dihydrxidine war unabhängig vom Einnahmemuster im zweitägigen Entzug und nach sechswöchiger Abstinenz signifikant erniedrigt. Zwischen Etonitazendosis und Abschwächung des Substratumsatzes bestand ein linearer Zusammenhang. Die pharmakologische Potenz der stimulierenden Agenzien war nicht verändert. Die Stimulation durch G-Proteinuntereinheiten bzw. die direkte Stimulation des Enzyms zeigten weder Abnahme in der maximalen Wirkung ( $E_{max}$ ) noch Veränderungen der Potenz ( $EC_{50}$ ). Insgesamt lässt sich somit eine die sechswöchige Abstinenz überdauernde Abschwächung der Signalkette  $D_{1/5}$ -Rezeptor  $\rightarrow$  AC/cAMP auf Ebene des  $D_{1/5}$ -Rezeptors konstatieren.

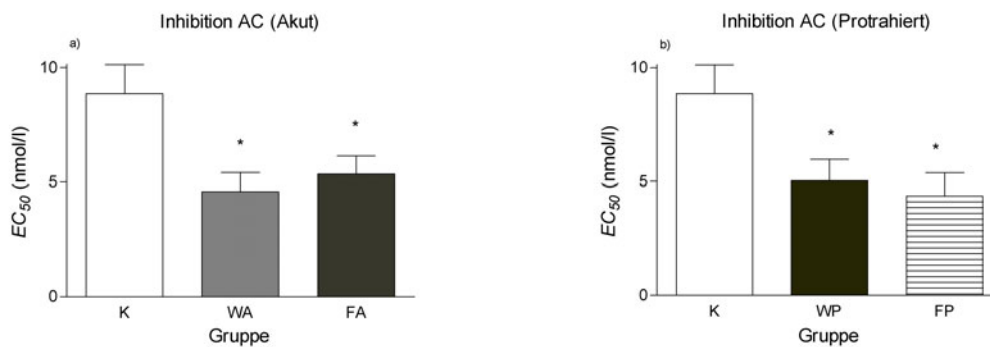
#### 3.2.5 Inhibition der Adenylatzyklase im limbischen Vorderhirn

Zusätzlich zu den Dopamin  $D_{1/5}$ -Rezeptor und  $G_{s/olf}$ -proteinabhängigen stimulatorischen Einflüssen auf das Enzym Adenylatzyklase sollten mögliche Veränderungen auf Ebene inhibitorischer  $G_{i/o}$ -Proteine im Areal des *limbischen Vorderhirns*



**Abbildung 3.13:** Stimulation der Adenylatzyklaseaktivität durch den  $D_1/D_5$ -Dopaminrezeptoragonisten Dihydrxidine (200 pM - 1  $\mu$ M) im *limbischen Vorderhirn* als Konzentrations-Wirkungskurven. Dargestellt sind die prozentuale Steigerung bezogen auf die basale Aktivität in Anwesenheit von 1  $\mu$ M Gpp-NH $\beta$ . Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. (a) Prozentuale Steigerung der Aktivität in den etonitazenerfahrenen Gruppen des zweitägigen (akuten) Entzugs und der Kontrollen in Abhängigkeit von der eingesetzten Agonistenkonzentration. Die Kurven unterscheiden sich signifikant voneinander; \*\*\*  $p < 0.001$  (two way ANOVA). (b) Prozentuale Steigerung der Aktivität in den behandelten Gruppen des sechswöchigen (protrahierten) Entzugs und der Kontrollen in Abhängigkeit von der eingesetzten Agonistenkonzentration. Die Kurven unterscheiden sich signifikant voneinander; \*\*\*  $p < 0.001$  (two way ANOVA). K = Kontrollen ( $n = 11$ ), WA = *Wahl akut* ( $n = 6$ ), FA = *Forciert akut* ( $n = 6$ ), WP = *Wahl protrahiert* ( $n = 6$ ), FP = *Forciert protrahiert* ( $n = 6$ ).

### 3.2 Neurochemische Untersuchungen



**Abbildung 3.14:** Inhibition der forskolinstimulierten AC-Aktivität durch GTP $\gamma$ S (acht Konzentrationen: 300 pM - 300 nmol/l) in Gewebshomogenaten des limbischen Vorderhirns. Darstellung der EC<sub>50</sub>-Werte aus Konzentrations-Wirkungskurven. Alle Werte sind Mittelwerte mit Angabe des SEM. **(a)** EC<sub>50</sub>-Werte der AC-Inhibition in den behandelten Gruppen im zweitägigen (akuten) Entzug (n = 6) und der Kontrollen (n = 12). **(b)** EC<sub>50</sub>-Werte der AC-Inhibition in den behandelten Gruppen im sechswöchigen (protrahierten) Entzug (n = 6) und der Kontrollen (n = 12). \*  $p < 0.05$  vs. Kontrollen (ANOVA und post hoc  $t$ -Test). K = Kontrollen (n = 12), WA = Wahl akut (n = 6), FA = Forciert akut (n = 6), WP = Wahl protrahiert (n = 6), FP = Forciert protrahiert (n = 6).

(den Nucleus accumbens beinhaltend) untersucht werden. Neben  $\mu$ -Rezeptoren sind auch die Dopamin D<sub>2/3</sub>-Rezeptoren an inhibitorische G<sub>i/o</sub> Proteine gekoppelt. Eventuelle unterscheidbare Effekte der Etonitazenvorbehandlung auf die Inhibierbarkeit der AC sollten Hinweise auf Veränderungen der inhibitorischen (u.a. Dopamin D<sub>2/3</sub>-rezeptorgekoppelten) G-Proteine geben. Die Experimente wurden nach initialer direkter Stimulation des Enzyms durchgeführt. Zur Inhibition der Aktivität wurde das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GTP $\gamma$ S verwendet.

Die Stimulation der AC durch 10  $\mu$ M Forskolin zeigte wie oben beschrieben keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontrollen und etonitazenerfahrenen Tieren. Aus den Konzentrations-Wirkungskurven der Inhibition der Adenylatzyklase (nach Stimulation durch 10  $\mu$ M Forskolin) ergaben sich zunächst keine signifikanten Unterschiede der maximalen Wirksamkeit ( $E_{max}$ ) und der maximalen Inhibition (in %) zwischen Kontrollen und etonitazenerfahrenen Tieren.

Dagegen gab es signifikante Veränderungen der pharmakologischen Potenz des eingesetzten GTP $\gamma$ S in allen vier etonitazenerfahrenen Gruppen. Die EC<sub>50</sub>-Werte der Inhibition des Enzyms durch aufsteigende Konzentrationen von GTP $\gamma$ S (in Anwesenheit des stimulierenden Forskolin) lagen im Vergleich mit den Kontrollen signifikant niedriger ( $p < 0.05$  vs. Kontrollen; ANOVA mit nachfolgendem post hoc  $t$ -Test) (Abb. 3.14).

### 3 Ergebnisse

Im Vergleich mit den Stimulationswerten der Dihydropyridine-AC/cAMP Assays ergab sich zusätzlich eine positive lineare Beziehung zwischen einerseits individuellen  $EC_{50}$ -Werten bzw.  $E_{max}$ -Werten nach Stimulation der AC und andererseits den  $EC_{50}$ -Werten nach Inhibition des Enzyms. Die positive Korrelation zeigte sich im zweitägigen Entzug ( $r = 0.61, p < 0.05, n = 17$ ) und überdauerte die sechswöchige Abstinenz ( $r = 0.60, p < 0.05, n = 17$ ).

Zusammenfassend war die pharmakologische Potenz des eingesetzten GTP $\gamma$ S zur Inhibition der Adenylatzyklase über  $G_{i/o}$ -Proteine kurzfristig und persistierend in allen etonitazenerfahrenen Gruppen unabhängig vom Einnahmemuster erhöht. Veränderungen der maximalen Wirksamkeit des Inhibitors gab es nicht. Es bestand ein positiver linearer Zusammenhang zwischen  $D_{1/5}$ -rezeptorvermittelter halbmaximaler bzw. maximaler Stimulation und der veränderten Inhibierbarkeit über  $G_{i/o}$ -Proteine.



## 4 Diskussion

### 4.1 Tierhaltungsdaten

Die vorliegende tierexperimentelle Arbeit untersuchte den Einfluss einer längerfristigen Opiateinnahme auf neurobiologische Parameter. Die Rahmenbedingungen der Tierhaltung unterschieden zwischen einem erzwungenen Konsum und einer selbstbestimmten Einnahme des Opioids Etonitazen. In den zuvor durchgeführten Experimenten der Arbeitsgruppe bedingten die Einnahmemuster qualitativ unterscheidbare Effekte in Bezug auf das Einnahmeverhalten. In den Gruppen des selbstbestimmten Konsums konnten im längerfristigen Verlauf substanzübergreifend Konsummuster beobachtet werden, die den DSM IV Kriterien ([American Psychiatric Association/DSM-IV, 1994](#)) eines süchtigen Substanzgebrauchs entsprachen. Die Gruppen des erzwungenen Konsums nahmen im Vergleich über einen großen Zeitraum vielfach höhere Dosen zu sich ([Wolffgramm und Heyne 1995b](#)).

Die Betrachtung der hier vorliegenden achtwöchigen Flüssigkeits- und Etonitazenverbrauchswerte zeigte ein qualitatives und quantitatives Muster, das in den vergleichbaren Zeitabschnitten der vorangegangenen Experimente gleichermaßen beschrieben werden konnte. Zu Beginn des Trinkversuchs wiesen beide Gruppen vergleichbare Etonitazeneinstiegsdosen auf. Nach einem zweiwöchigen Zeitraum fiel der Konsum der *Wahl*-Gruppe steil ab und verblieb während der restlichen Zeit auf stabil niedrigem Niveau. Die forciert konsumierende Gruppe steigerte dagegen ihren Flüssigkeitskonsum und damit den Etonitazenverbrauch, um während des gesamten Versuchs ungleich höhere Wasser- und Etonitazendosen zu verbrauchen. Insgesamt nahmen die Tiere der *forcierten* Gruppe Etonitazemengen ein, die um das Vierfache über denen der *Wahl*-Gruppe liegen.

In der Gruppe des erzwungenen Opioidkonsums wurde dem lebensnotwendigen Wasser die analgetische und psychoaktive  $\mu$ -rezeptorselektive Substanz Etonitazen zugesetzt. Die Tiere nahmen mit jeder Wasseraufnahme zusätzlich Substanz zu sich. Sie hatten zu keiner Zeit die Möglichkeit neutrales Wasser oder Substanzlösung neben bzw. unabhängig von Wasser einzunehmen. Die primäre Motivation zur Flüssigkeitseinnahme war somit an den Zustand Durst gebunden und davon untrennbar mit den substanzspezifischen Wirkungen des Opioids verknüpft.

Aus dem Vergleich der Kurven der Flüssigkeitsaufnahme ergab sich somit zu-

#### 4 Diskussion

nächst die Frage nach den Gründen für einen deutlich gesteigerten Konsum bzw. ein möglicherweise gesteigertes Durstgefühl innerhalb der *forcierten* Gruppe. Eine hinreichende Erklärung des deutlich erhöhten und im Verlauf steigenden Flüssigkeitsverbrauchs durch eine nur marginal und nicht konstant erhöhte Futtermenge scheint nicht gegeben. Da wegen des Zeitaufwands weder Hämatokrit, Serumelektrolyte noch Urinalysen in Bezug auf Osmolalität und der Elektrolyte bzw. auf die Urinausscheidung gemessen wurden, lässt sich die Frage eines vermehrten Durstgefühls in Folge einer Exsikkose oder Polyurie nicht abschließend klären. Frühere Untersuchungen hatten in diesem Zusammenhang sowohl eine tendenziell antidiuretische als auch diuretische Wirkung des partiellen  $\mu$ -Rezeptoragonisten Morphin gezeigt (Gutkowska u. a. 1993; Michel u. a. 1986). Der Vergleich der Körpergewichte, der keine signifikanten Unterschiede zeigte, könnte in diesem Zusammenhang als fehlender Hinweis auf eine Exsikkose gewertet werden.

Andere Erklärungsansätze für den auffällig gesteigerten Flüssigkeitskonsum der *forcierten* Gruppe lassen sich aus den pharmakologischen Eigenschaften der Substanz Etonitazen ableiten. Bedingt durch eine sehr kurze Halbwertszeit von ein bis zwei Stunden könnten die Tiere dieser Gruppe des zwangsläufig hohen Opioidkonsums frühzeitig in wiederholte Entzugszustände geraten (*on-off* Phänomene) (vgl. Savage 1996). Nach einer Periode, in der die Ratten den Zusammenhang zwischen Linderung aversiver Entzugszustände und der Flüssigkeitseinnahme erfahren, käme es zu dem beobachteten ansteigenden Konsum der Substanz. Frühere Beobachtungen zeigten tatsächlich zeitlich ausgedehntere Perioden der Inaktivität ohne Flüssigkeits- bzw. Substanzeinnahme der *forcierten* Gruppe, die beginnende Entzugserscheinungen ermöglichen würden (Heyne 1996a). Da im Hinblick auf den technischen bzw. zeitlichen Aufwand und zur Verhinderung unerwünschter neurochemischer Sondereffekte keine direkte Messung eines Entzugssyndroms (z.B. Schmerzreize, Verhalten) während des Trinkversuchs unternommen werden konnte, ist keine abschließende Beurteilung dieses Faktors möglich.

Es wurde bereits zuvor gefolgert (vgl. Heyne u. a. 2000), dass substanzspezifische Veränderungen des motorischen Verhaltens verantwortlich für die Unterschiede im Konsumverhalten sein könnten. Opioide führen insbesondere bei zeitlich intermittierendem Konsummuster mit starken Schwankungen des Plasmaspiegels im Gegensatz zur chronisch kontinuierlichen Verabreichung früh zur Sensibilisierung für die lokomotorisch stimulierenden Eigenschaften (Vanderschuren u. a. 1997; Vanderschuren 2001). Obwohl im Fall der *forcierten* Gruppe zunächst von einem tendenziell chronisch kontinuierlichen Muster ausgegangen wurde, zeigten die Aufzeichnungen des Verhaltens in den vorangegangenen Experimenten nahezu vollständige Trinkpausen während der Hell-Periode, die unter Berücksichtigung der kurzen

Halbwertszeit zu schwankenden Plasmaspiegeln führen. Da somit die Bedingungen für ein intermittierendes Schema gegeben waren, mussten sensitisierungsbedingte Veränderungen angenommen werden. Die parallel beobachtete deutlich gesteigerte nächtliche motorische Aktivität forciert behandelter Tiere schien mit der hohen Flüssigkeitseinnahme zusammenzuhängen (Heyne u. a. 2000). Auch im vorliegenden Experiment mussten sensitisierungsbedingte Veränderungen vermutet werden, die über eine verstärkte Lokomotion zur gesteigerten Flüssigkeitsaufnahme in der forciert behandelten Gruppe geführt haben.

Ein weiterer Aspekt der pharmakologischen Eigenschaften der Substanz Etonitazen liegt möglicherweise in der bei den Opioiden zu beobachtenden Induktion einer Hyperalgesie durch  $\mu$ -Rezeptoragonisten (Li u. a. 2001b; Angst u. a. 2003) (vgl. Freye und Latasch 2003). Eine solche Hyperalgesie entwickelt sich im Tierversuch parallel zur Ausbildung einer pharmakologischen Toleranz insbesondere durch intermittierende Verabreichungsschemata über die Verstärkung der exzitatorischen Signaltransduktion des NMDA-Rezeptors (Mao u. a. 1994; Li u. a. 2001a).

Die chronische Opiateinwirkung bedingt eine Translokation der Proteinkinase C (PKC) in die Plasmamembran. Deren phosphorylierende Aktivität kann über direkte Enzymblockade gemindert werden (Makimura u. a. 1997; Granados-Soto u. a. 2000). Die entsprechende Blockade der PKC verhindert im Modell des neuropathischen Schmerzes Hyperalgesie und spontanes Schmerzverhalten (Mayer u. a. 1995). Zusätzlich kommt es während der chronischen Opiatgabe zur vermehrten Expression der NO-Synthase (NOS) (Wong u. a. 2000), deren Produkt Stickstoffmonoxid u.a. die NMDA-Rezeptorfunktion vermittelt (Hall u. a. 1996). Toleranzentwicklungen gegenüber der analgetischen Wirkung eines Opiates scheinen zum Teil von der Expression der Synthase abhängig zu sein (Elliott u. a. 1994; Heinzen und Pollack 2004). Eine Blockade der NOS reduziert im Modell die Ausbildung einer opiatinduzierten Hyperalgesie (Li u. a. 2001a). Die Tiere des erzwungenen Konsums könnten diesen Vorstellungen zufolge dosisabhängig im Verlauf des Versuchs schmerzempfindlicher werden und müssten dies nach der oben erwähnten Lernperiode durch erhöhten Substanzkonsum ausgleichen. Hyperalgesie und Dosissteigerungen nach hyperalgetischen Zuständen während einer Opiattherapie sind in diesem Zusammenhang beim Menschen beschrieben worden (Compton u. a. 2003; Koppert 2004; Wilson 2003) und gelten als Determinante der Toleranzentwicklung (vgl. Ballantyne und Mao 2003).

Im Gegensatz zur forciert behandelten Gruppe, in der die Wasseraufnahme untrennbar mit Etonitazenkonsument verbunden war, bekam die Gruppe des selbstbestimmten Konsums neben den Wasserflaschen Substanzlösung in verschiedenen Konzentrationen. Eine Unterscheidung zwischen Wasser und Etonitazen bzw. in-

#### 4 Diskussion

nerhalb der einzelnen Etonitazenlösungen wurde möglich durch die Zugabe von Essigsäure in verschiedenen Konzentrationen. Theoretisch sollte dadurch die Wahlmöglichkeit zwischen Flüssigkeitsaufnahme allein zur Deckung des Wasserbedarfs und der Beeinflussung des Befindens durch das Opioid etabliert werden. Im vorliegenden Versuch zeigt sich das aus den vorangegangenen Versuchen bekannte zeitliche Muster der hohen Einstiegsdosen und des innerhalb von zwei Wochen auf ein konstant niedriges Niveau abfallenden Etonitazenkonsums. Das Muster wird dahingehend interpretiert, dass die Tiere der *Wahl*-Gruppe ihr Konsumverhalten im Rahmen eines Lernvorgangs modifizieren (vgl. [White 1996](#); [White und McDonald 2002](#)). Dieser Vorstellung zufolge sehen sich die Tiere zunächst mit den Substanzwirkungen konfrontiert und müssen lernen, diese den einzelnen am Geruch identifizierbaren Lösungen zuzuordnen. Sie lernen die Unterscheidung zwischen Flüssigkeitsaufnahme und Substanzwirkung. Der Abfall auf ein niedriges aber konstantes Einnahmenniveau ist demnach der Ausdruck des Lernvorgangs und eines letztlich optimierten Konsums, der eine gezielte Beeinflussung des Befindens durch das konsumierende Versuchstier ermöglicht.

Die etablierte Wahlmöglichkeit führte in den früheren Experimenten zu einer bis zu 25 Wochen dauernden Phase eines konstanten und vergleichsweise niedrigen Substanzkonsums (vgl. [Heyne 1996a](#)). Unvermittelt kam es in einem Teil der Gruppe zu einem Anstieg des Konsums auf vielfache Dosen. Dieses Muster überdauerte lange erzwungene Abstinenzperioden und konnte durch Vergällung mit Bitterstoffen nicht gedämpft werden. Nach der offensichtlich sehr lange währenden Phase eines kontrollierten Konsums mussten die Diagnosekriterien eines süchtigen Konsums konstatiert werden. Im hier vorliegenden Experiment zeigte sich innerhalb des vergleichsweise kurzen Einnahmezeitraums von acht Wochen in der *Wahl*-Gruppe das dort beobachtete Muster des kontrollierten Konsums. Anzeichen für einen Wechsel des Konsummusters in Richtung eines süchtigen Verhaltens ergaben sich nicht.

Zusammenfassend bedingten die verschiedenen in der Arbeitsgruppe etablierten Einnahmemuster im Etonitazentrinkversuch zum einen die qualitative Trennung in hoch und niedrig dosierten Konsum. Der hochdosierte Konsum der *forcierteren* Gruppe steht in Zusammenhang mit vermuteter sensitisierungsbedingter verstärkter lokomotorischer Aktivität, möglichen intermittierenden Entzugszuständen und/oder einer opiatbedingten Hyperalgesie. Die Modi der Substanzeinnahme induzierten zum anderen differenzierbare Lernvorgänge. Innerhalb der *Wahl*-Gruppe ermöglichten sie den selbstbestimmten und kontrollierten Konsum des Opioids. Die Entstehung eines süchtigen Konsums wurde nicht beobachtet. In der *forcierteren* Gruppe wurde von der Möglichkeit ausgegangen, dass die Tiere den Zusam-

menhang von Substanzeinnahme und der Linderung von Entzugserscheinungen respektive einer Hyperalgesie erlernten. Der vorliegende Versuch ging in diesem Zusammenhang davon aus, in erster Linie dosisabhängig in beiden Gruppen physische Abhängigkeit zu produzieren (Heyne 1996a). Ein Test während des Versuchs, im akuten Entzug bzw. nach sechswöchiger Abstinenz wurde wegen des Arbeitsaufwandes und zur Verhinderung störender neurochemischer Sondereffekte nicht durchgeführt.

## 4.2 $\mu$ -Opioidrezeptor

Nach Beendigung des Etonitazentrinkversuchs wurde die Substanz entzogen und die Präparation der entsprechenden Hirnareale nach zweitägigem Entzug respektive nach sechswöchiger Abstinenz durchgeführt. Zur Identifikation eventueller Neuroadaptationen wurden zunächst der primäre Wirkort innerhalb des parieto-occipitalen bzw. frontalen Kortex und des Mittelhirns untersucht. Die Rezeptorbindungsstudien mit dem Liganden [<sup>3</sup>H]DAMGO zeigten weder Veränderungen der maximalen Bindungsdichte noch der Rezeptoraffinität für den hochselektiven Liganden.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) können bereits Minuten nach Bindung des Agonisten von der Plasmazellmembran entfernt und nachfolgend in Lysosomen überführt werden. Im Zellkompartiment der Lysosomen werden die Rezeptormoleküle durch Proteolyse abgebaut. Die Lyse führt demnach zu einer Abnahme der membranständigen Rezeptorbindungsichte im Sinne einer Downregulation (Law u. a. 1984). Aus früheren Studien zur Rezeptorbindungsichte nach chronischer Opioidvorbehandlung von Ratten war ein uneinheitliches Bild bekannt. Im Fall des Agonisten Morphin wurden sowohl ähnliche Ergebnisse im Sinne fehlender Auswirkungen (Chen 1996; Stafford u. a. 2001; Gomes u. a. 2002) als auch eine signifikante  $\mu$ -Rezeptordownregulation (Liu und Prather 2001) beschrieben. In einigen Untersuchungen bedingte die Wahl des eingesetzten Agonisten innerhalb der Studie differente Ergebnisse mit Downregulation durch Etorphin bzw. fehlende Änderungen der Bindungsdichte durch Morphin (Yoburn u. a. 2003; Yabaluri und Medzihradsky 1997).

Erster Schritt einer Rezeptordownregulation ist die Phosphorylierung des Rezeptors nach Agonistenbindung (Deng u. a. 2000; Chakrabarti u. a. 1997; Pak u. a. 1999). Der Rezeptor-Liganden-Komplex unterliegt nachfolgend einer u.a.  $\beta$ -Arrestin vermittelten Endozytose nach Entkoppelung vom G-Protein (Grady u. a. 1997; Whistler und von Zastrow 1998). Morphin ist im Gegensatz zu Etonitazen in Experimenten mit Zellkulturen nicht oder nur sehr schwach in der Lage, eine bereits weni-

#### 4 Diskussion

ge Minuten nach Agonistenbindung auftretende Internalisierung bzw. Endozytose auszulösen (Keith u. a. 1998; Zaki u. a. 2000; Whistler und von Zastrow 1998). Morphin kann zudem die internalisierenden Eigenschaften anderer Opioider über Veränderung des  $\beta$ -Arrestins blockieren (Eisinger u. a. 2002). Über ähnliche Veränderungen durch längerfristige Etonitazeneinnahme ist nichts bekannt. Da trotz der bekannten Eigenschaft der Substanz Etonitazen zur frühen Internalisierung die Rezeptorbindungsichte im eigenen Experiment unverändert schien, könnten Veränderungen phosphorylierender Vorgänge bzw. Adaptationen auf Ebene der  $\beta$ -Arrestine oder anderer *trafficking* Proteine vermutet werden (Patel u. a. 2002; Sever u. a. 2000).

Abhängig vom Rezeptortyp innerhalb der Gruppe der GPCR werden in der Zelle nach Internalisation/Endozytose verschiedene weiterführende Wege beschritten, die nur zum Teil in Lysosomen enden (Whistler u. a. 2002). Die Verteilung auf die verschiedenen Wege ist hochkomplex und neben bestimmten Proteinkaskaden (z.B. *vacuolar protein system*) (Hislop u. a. 2004) auch vom molekularen Aufbau des entsprechenden GPCRs abhängig (Tanowitz und von Zastrow 2003; Gage u. a. 2001). Internalisierte Rezeptoren können über bestimmte Effektorwege am Recycling teilnehmen (Tsao und von Zastrow 2000). Nach Trennung des Liganden vom Rezeptor kann letzterer innerhalb weniger Minuten wieder in die Plasmamembran transloziert werden (Law u. a. 2000; Chen u. a. 2003). Die vorliegenden Rezeptorbindungsstudien lassen in diesem Zusammenhang keine Aussagen über Vorgänge zu, die offenbar sehr früh in der Kaskade möglicher Adaptationen auftreten (vgl. Borgland 2001) und darüber hinaus zum Teil kurzfristig reversibel sind. Veränderungen der Rezeptorbindungsichte während des Trinkversuchs hätten sich in den zwei Tagen des Entzugs insbesondere vor dem Hintergrund der kurzen Halbwertszeit über (a) Redistributionen im Rahmen eines schnellen Recyclings und (b) de novo Synthese des Rezeptormoleküls zurückbilden können.

Zusammenfassend zeigte die Etonitazenvorbehandlung keine mit der Rezeptorbindungsstudie messbaren Unterschiede nach minimal zweitägigem Entzug. Abschließende Aussagen zur Veränderung des zu vermutenden *receptor trafficking* bzw. eines Rezeptorrecyclings sind allerdings nicht möglich. Dies sind dynamische Vorgänge, die zeitnah zur Agonistengabe stattfinden und kurzfristig reversibel sein können. Nicht auszuschließen sind Veränderungen der internalisierenden Eigenschaften des Etonitazens, die im Verlauf des Versuchs eine Veränderung der Rezeptordichte in Richtung einer Downregulation verhindern. Es wird in diesem Zusammenhang darauf hingewiesen, dass eine fehlende Rezeptorinternalisation bzw. Endozytose mit Toleranzentwicklung im Zusammenhang stehen könnte (Finn und Whistler 2001). Demzufolge bedeutete der Vorgang Internalisierung einen Mecha-



nismus, der gegenregulatorische und toleranzerzeugende Adaptationen der nachgeschalteten Signalkomponenten verhindert. Eine fehlende Endozytose zöge eine abnormal verlängerte  $\mu$ -Rezeptorsignalübertragung nach sich.

### 4.3 G-Proteine

Der  $\mu$ -Rezeptor ist vor allem an inhibitorische  $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelt. Die hier durchgeführten [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien an den  $G_{\alpha(i/o)}$ -Untereinheiten (Wieland und Jakobs 1994) des parieto-occipitalen Cortex zeigten nach zweitägigem Entzug aller opiatfernahen Gruppen (*forciert/Wahl*) signifikant erhöhte  $E_{max}$ -Werte, die als erhöhte basale Bindung des Nukleotides gewertet wurden. Ähnliche Ergebnisse konnten nach chronischer Verabreichung von Morphin (Heyliger u. a. 2000) oder Vorbehandlung mit DAMGO (Liu und Prather 2001) demonstriert werden. Andere Autoren berichteten dem widersprechend von unveränderten basalen Bindungsdaten nach chronischer Morphingabe (Kirschke u. a. 2002; Xu u. a. 2003).

Die erhöhte basale Bindung könnte durch eine rein quantitative Verstärkung des G-Proteinpools interpretiert werden. Entsprechende Veränderungen mit erhöhter Immunoreaktivität der  $G_{\alpha(i/o)}$ - und der  $G_{\beta}$ -Untereinheiten wurden nach chronischer Vorbehandlung mit Morphin und anderen  $\mu$ -Rezeptoragonisten wie Heroin und Methadon beschrieben (Ventayol u. a. 1997; Fabian u. a. 2002). Einen anderen Aspekt beinhaltet die dynamisch-funktionelle Betrachtung einer basalen, d.h. nicht durch einen Agonisten stimulierten [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung. Demzufolge existieren in einem System konstitutionell, d.h. ohne Einwirkung eines Agonisten aktive Rezeptor-G-Protein-Komplexe, die im Austausch von GDP [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S binden können (Wang u. a. 1994; Burford u. a. 2000). Eine wiederholte Verabreichung eines  $\mu$ -Rezeptoragonisten hatte in verschiedenen Experimenten eine signifikante Verstärkung der basalen [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung zufolge (Liu u. a. 2001; Wang u. a. 2004). Die Ergebnisse wurden als Zunahme des Anteils der konstitutiv aktiven  $\mu$ -Rezeptoren interpretiert. Die hier dargestellten Ergebnisse stünden damit in Übereinstimmung.

Die durch Zugabe von DAMGO stimulierte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung war in allen etonitazenerfahrenen Gruppen nach zweitägigem Entzug entsprechend dem  $E_{max}$ -Wert ohne Veränderungen der  $EC_{50}$ -Werte ( $K_d$ ) signifikant erhöht. Die daraus errechneten Netto-Bindungsdaten ( $\Delta B_{max}$ ) und die pro Rezeptor aktivierte Zahl an G-Proteinen (*amplification factor*) als Maß der intrinsischen Aktivität des Agonisten zeigten nur bei den forciert behandelten Tieren des akuten Entzugs signifikante Steigerungen. Eine erhöhte stimulierte [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Bindung ließe sich in Übereinstimmung mit der oben zunächst angeführten Interpretationsmöglichkeit der basalen Bindung als quantitative Veränderung der vorhandenen G-Proteinmenge deu-

#### 4 Diskussion

ten. Vergleichbare Erhöhungen der stimulierten Bindung wurden zuvor beschrieben und standen dort im Zusammenhang mit Verhaltenssensibilisierungen (Vigano u. a. 2003). Allerdings scheint sich mit den ausschließlich auf die forciert behandelte Gruppe im zweitägigen Entzug beschränkten Effekten einer erhöhten Nettobindung und eines erhöhten *amplification factor* eine qualitative Veränderung anzudeuten (Tao u. a. 1993). Die genannte intrinsische Fähigkeit des Agonisten zur G-Proteinkoppelung wurde an anderer Stelle durch veränderte Phosphorylierungen nach Entfernung von Tyrosinresten des intrazellulären Rezeptoranteils reguliert (McLaughlin und Chavkin 2001). Somit ließen sich die hier beschriebenen Veränderungen der zunehmenden intrinsischen Aktivität ausschließlich in der *forcierten* Gruppe (im akuten Entzug) im Rahmen einer dosisabhängigen veränderten Phosphorylierung des Rezeptors deuten.

Weitere Hinweise für veränderte Phosphorylierungen ergeben sich aus der Betrachtung der [<sup>3</sup>H]DAMGO Bindungsdaten nach Zusatz des nicht hydrolysierbare GTP-Analogons GTP $\gamma$ S. Erwartungsgemäß nahm die Affinität des  $\mu$ -Rezeptors für den Liganden DAMGO durch das Nukleotid deutlich ab. Allerdings war das relative Ausmaß der  $K_d$  Erhöhung in den etonitazenerfahrenen Gruppen des zweitägigen Entzugs signifikant niedriger. Die Entkoppelung des  $\mu$ -Rezeptors vom G-Protein mit nachfolgender Überführung in einen niederaffinen Zustand war demnach in den Gruppen *Forciert* und *Wahl* im zweitägigen Entzug erschwert. Da die Entkoppelung durch Phosphorylierungen initiiert wird (Kovoor u. a. 1998; Celver u. a. 2004), könnte somit eine Adaptation auf dieser Ebene postuliert werden.

Zusammenfassend zeigten sich in den Untersuchungen der inhibitorischen G-Proteine und der  $\mu$ -Rezeptorkoppelung ausschließlich Effekte im akuten Etonitazenentzug. Es bestand möglicherweise ein vergrößerter G-Proteinpool. Zugleich ergaben sich Hinweise für eine erschwerte  $\mu$ -Rezeptor-G-Protein-Entkoppelung in beiden etonitazenenkonsumierenden Gruppen. Veränderung der regulierenden Phosphorylierungen innerhalb der forciert behandelten Gruppe könnte die dort beobachtete Verstärkung der intrinsischen Aktivität des Liganden bewirken. Die Veränderungen sprechen für eine Verstärkung der Signaltransduktion auf Ebene der G-Proteinkoppelung. Unklar bleibt an dieser Stelle, ob diese Verstärkung einer *de facto* Sensibilisierung des inhibitorischen  $G_{i/o}$ -Proteinwegs gleichkommt. Neuere Studien lassen auf grundlegende Veränderungen der Signalweiterleitung durch die verschiedenen G-Proteinuntereinheiten schließen. Im Laufe der Opioidbehandlung kam es zur Umstellung des Signalweges von vorherrschender Inhibition durch  $G_{\alpha(i)}$  zur Stimulation durch  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten im Rahmen veränderter Phosphorylierungen (Chakrabarti und Gintzler 2003; Gintzler und Chakrabarti 2000). Die stimulierende Wirkung dieser  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten könnte über unterschiedlich rea-



gierende AC-Isoformen realisiert werden (Yoshimura u. a. 1996; Nevo u. a. 2000). Zusätzlich ist der  $\mu$ -Rezeptor offensichtlich auch an stimulierende G<sub>s</sub>-Proteine gekoppelt, deren Wirkungen während einer Opioidbehandlung Alterationen unterworfen sind (Szucs u. a. 2004).

#### 4.4 Dopamin D<sub>1/5</sub>-Rezeptor und Adenylatzyklase

Nach den Rezeptorbindungsstudien am  $\mu$ -Rezeptor bzw. an den gekoppelten G-Proteinen im parieto-occipitalen Kortex schlossen sich die Bindungsstudien mit dem selektiven Dopamin D<sub>1/5</sub>-Antagonisten SCH23390 im *limbischen Vorderhirn* einschließlich des Nucleus accumbens an. Gleichzeitig sollte der Dopamin D<sub>1/5</sub>-rezeptorvermittelte stimulierende G<sub>s/olf</sub>-Protein- und der inhibitorische G<sub>i/o</sub> Proteinweg in dieser Hirnregion untersucht werden.

Die maximale Gesamtbindungsichte ( $B_{max}$ ) des Rezeptors war zunächst nach zweitägigem Entzug des Opioids in der forciert behandelten Gruppe signifikant erhöht. Auch der Sättigungskurvenvergleich ergab deutliche signifikante Unterschiede (zur Kontrollgruppe). Ähnliche Veränderungen der maximalen Bindungsdichte wurden bereits beschrieben (Bhargava und Gulati 1990; Elwan und Soliman 1995), ohne von anderer Seite bestätigt werden zu können (Deslandes u. a. 2002; Georges u. a. 1999). Erklären ließe sich eine Heraufregulation der Rezeptorbindungsichte in dieser Hirnregion durch die zuvor im akuten Opiatentzug bzw. während intermittierender Behandlungen beobachtete erniedrigte basale mesolimbische Dopaminausschüttung der in den Nucleus accumbens projizierenden A10 Neurone der VTA (Tjon u. a. 1994; Diana u. a. 1999; Gerrits u. a. 2002). Die erniedrigte basale Dopaminausschüttung im akuten Entzug wird u.a. von hypotrophen morphologischen Veränderungen dopaminerger VTA Neurone im akuten Opioidentzug begleitet (Sklair-Tavron u. a. 1996; Spiga u. a. 2003).

Einhergehend mit der quantitativen Heraufregulation des D<sub>1/5</sub>-Rezeptors zeigten sich in den SCH23390-Experimenten signifikante Unterschiede nach Zusatz des Agonisten Dopamin. In der forciert behandelten Gruppe war dessen nicht kompetitiv verdrängende Wirkung signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Darüber hinaus ergab sich eine positive Korrelation von individuellem Etonitazekonsum aller konsumierenden Tiere einschließlich der *Wahl*-Gruppe und dem Ausmaß der Verdrängung. Die Ergebnisse wurden in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen als Adaptationen der hochaffinen Rezeptorbindungsstelle interpretiert. Demnach scheint eine proportionale Zunahme der hochaffinen Bindungsstelle (May 1992), als auch eine qualitative Verstärkung im Sinne effizienterer Verdrängung durch den Agonisten bzw. eine erhöhte Affinität der Bindungsstelle (May und

## 4 Diskussion

Sugawa 1993) möglich. Da in der Bindungsstudie nur eine einzige Dopaminkonzentration verwendet und keine komplette Verdrängungsstudie durchgeführt wurde, ist allerdings eine abschließende Festlegung nicht möglich.

Fasst man die Ergebnisse der SCH23390-Bindung im zweitägigen Entzug zusammen, ergibt sich eine signifikante Heraufregulation der Bindungsdichte in der forciert behandelten Gruppe, die von einer Verstärkung der hochaffinen Bindung begleitet wurde. Letzteres zeigt einen gruppenübergreifenden Zusammenhang zur individuell eingenommenen Etonitazendosis. Die durch die veränderte Dopaminausschüttung zu erklärenden Veränderungen sind auffälligerweise von einer Desensibilisierung des Dopamin  $D_{1/5}$ -Rezeptors im Sinne einer Abschwächung der  $D_{1/5}$ -rezeptorvermittelten AC-Stimulation begleitet. Die in allen etonitazenzehrenden Gruppen nach zweitägigem Entzug erniedrigten  $E_{max}$ -Werte nach Stimulation durch Dihydroxydine korrelierten zudem negativ mit den individuellen Etonitazendosen. Da die Stimulierbarkeit durch GppNHp ( $G_{\alpha(s/olf)}$ ) und Forskolin (AC direkt) nicht verändert war, musste von einer funktionellen Entkoppelung des Rezeptors von den  $G_{s/olf}$ -Proteinen ausgegangen werden, die der Heraufregulation des Rezeptors entgegenstand.

Die Desensibilisierung des Dopamin  $D_{1/5}$ -Rezeptors im Sinne einer verminderten AC-Stimulation ist ein Vorgang, der innerhalb weniger Minuten nach Agonisteneinwirkung eintritt. Sie ist ein komplexer Vorgang, der von Phosphorylierungen eingeleitet wird, die die Bindung von Arrestin an zytoplasmatische Schleifen des Rezeptors ermöglichen (Kim u. a. 2004; Jiang und Sibley 1999). Da das *receptor trafficking* ein von der Desensibilisierung unabhängig verlaufender Mechanismus zu sein scheint (Ng u. a. 1995), wären die hier präsentierten Ergebnisse von Desensibilisierung und gleichzeitiger Heraufregulation der Bindungsdichte damit vereinbar. Die funktionelle Entkoppelung könnte als gegenregulatorische Reaktion auf die erhöhte Rezeptorbindungsichte aufgefasst werden. Interessanterweise wurden ähnliche  $D_{1/5}$ -Rezeptordesensibilisierungen im Zusammenhang mit chronischem Amphetamingegebrauch beim Menschen in post mortem Studien beobachtet und dort mit einem Entzugssyndrom in Verbindung gebracht (Tong u. a. 2003). Da Opioide und Amphetamin die Eigenschaft teilen, akut verabreicht zu einer erhöhten Dopaminkonzentration im Nucleus accumbens zu führen, ließen sich hier substanzübergreifende Adaptationen postulieren.

Die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase über  $G_{\alpha(s/olf)}$ -Proteine und den direkten Aktivator Forskolin erschien im zweitägigen Entzug nicht verändert. Dies steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu der in der Literatur vielfach beschriebenen gegenregulatorischen Überaktivität der AC bzw. der cAMP-Produktion nach Entzug des Opioids (Fang u. a. 2000; Kaplan u. a. 1998). Bei genauerer Betrachtung han-

#### 4.4 Dopamin $D_{1/5}$ -Rezeptor und Adenylatzyklase

delt es sich um einen Effekt, der im Zellmodell Reversibilität aufweist, sich innerhalb von wenigen Stunden zurückbildet und somit im zweitägigen Entzug nicht entdeckt werden könnte (Sharma u. a. 1975; Avidor-Reiss u. a. 1995, 1997). Spekulativ wäre die Annahme selektiver Adaptationen möglicher Forskolin- oder  $G_{\alpha(s/olf)}$ -insensitiver AC-Isoformen (vgl. Ammer und Christ 2002; Al-Hakim u. a. 2004; Watts u. a. 2001).

Die Inhibierbarkeit der Adenylatzyklase über den  $G_{\alpha(i/o)}$ -Weg war im zweitägigen Entzug in allen substanzkonsumierenden Gruppen im Sinne einer Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve für das GTP-Analogon GTP $\gamma$ S sensibilisiert. Im Vergleich von Inhibierbarkeit ( $EC_{50}$ ) und  $D_{1/5}$ -rezeptorvermittelter Stimulierbarkeit ( $E_{max}$ ) ergab sich zudem eine positive Korrelation, die eine Interdependenz andeutet. Letzteres ließe sich mit der Fähigkeit der an die inhibitorischen G-Proteine gekoppelten Rezeptoren wie z.B. Dopamin  $D_{2/3}$  (Ilani u. a. 2002; Zaworski u. a. 1999) zur gleichzeitigen Stimulation der AC-Isoformen II, IV und VII (Nevo u. a. 1998) erklären. Umgekehrt können die Isoformen V/VI über  $G\beta\gamma$ -Untereinheiten inhibiert werden (Bayewitch u. a. 1998), so dass eine gemeinsame Nutzung dieser Untereinheiten durch konkurrierende Rezeptoren in der vorliegenden Studie möglich scheint (vgl. Sunahara u. a. 1996).

Möglicherweise stellt die Sensibilisierung der inhibierenden  $G_{\alpha(i/o)}$ -Proteine in Verbindung mit der verstärkten intrinsischen Aktivität des Agonisten DAMGO bzw. der erschwerten Entkoppelung der G-Proteine vom  $\mu$ -Rezeptor (siehe S. 70) im frühen Stadium des Entzugs ein zelluläres Korrelat einer zuvor beschriebenen verstärkten inhibitorischen Opioidwirkung auf cAMP-Bildung (Chen 1996) bzw. auf Transmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt im akuten Entzug dar (Chieng und Williams 1998).

Die  $D_{1/5}$ -Rezeptorbindungsichte war nach sechswöchiger Abstinenz in der *forcierten* Gruppe signifikant erniedrigt. Zusätzlich gab es jetzt zur Kontrollgruppe unterschiedliche Sättigungskurven nach nicht kompetitiver Verdrängung des Antagonisten SCH23390 durch Dopamin. Die Rezeptordownregulation und die beobachtete Abschwächung der hochaffinen Bindung des Rezeptors könnten als Gegenregulation gegen die im Laufe eines Opioidentzugs nach intermittierenden Schemata zu beobachtenden verstärkten stimulierten Dopaminausschüttung im Bereich des Nucleus accumbens erklärt werden. Diese tritt insbesondere nach intermittierender Vorbehandlung im protrahierten Entzug als Ausdruck einer Sensitisierung der dopaminergen Transmission in diesem Hirnareal auf (Tjon u. a. 1994; Vanderschuren 2001). Die inhibierenden  $G_{i/o}$ -vermittelten und die  $D_{1/5}$ -rezeptorabhängigen Adenylatzyklaseassays im protrahierten Entzug zeigten dagegen keine entgegengesetzte Dynamik und verblieben auch nach sechswöchigem Entzug sensibilisiert re-

#### 4 Diskussion

spektive abgeschwächt. Die Stimulation der  $G\alpha_{(s/olf)}$ -Proteine durch GppNHp und Forskolin zeigte auch weiterhin keine signifikanten Unterschiede. Offensichtlich hatte die Entwicklung der  $D_{1/5}$ -Rezeptorbindungsdichte hin zur Downregulation keinen weiteren Einfluss auf die nachgeschaltete Instanz der stimulierenden  $G_{s/olf}$ -Proteine. Die beschriebene funktionelle Entkoppelung blieb bestehen. Die Ergebnisse repräsentieren eine persistierende Dysbalance zwischen *Dopamin* $D_{1/5}$ - und u.a. Dopamin  $D_2$ -rezeptorabhängiger Signaltransduktion mit Potenzierung des inhibierenden  $G\alpha_{(i/o)}$ -Weges im *limbischen Vorderhirn*. Möglicherweise entsprechen die Veränderungen zusammengenommen langanhaltenden Adaptationen zur Gegenregulation einer sensitisierten Dopaminausschüttung im Nucleus accumbens (vgl. [Koob und Moal 1997, 2001](#)). In einem vorangegangenen Experiment der eigenen Arbeitsgruppe, in dem das Opioid forciert über einen Zeitraum von 30 Wochen verabreicht wurde, konnte eine abgeschwächte AC-Stimulierbarkeit über den  $D_{1/5}$ -Agonisten SKF82958 nach 33-wöchiger Abstinenz beobachtet werden ([Heyne u. a. 2000](#)). Die Suppression der AC-Stimulierbarkeit im *limbischen Vorderhirn* nach Opioidentzug könnte möglicherweise irreversibel sein.

Neben der Annahme aktiver Adaptationen als Erklärung für persistierende Veränderungen nach längerfristigem Entzug muss die Möglichkeit erwogen werden, dass es sich um rein degenerative Prozesse handeln könnte. Es wird z.B. vielfach auf eine neurotoxische Wirkung des Dopamins über Induktion der Apoptose bzw. subapoptotischer Prozesse hingewiesen ([Song u. a. 2004](#); [Oliveira u. a. 2003](#); [Clement u. a. 2002](#)). Da einer  $\mu$ -Rezeptoraktivierung zytoprotektive Wirkung über Phosphatidylinositol 3-Kinase abhängige Prozesse zugeschrieben ([Iglesias u. a. 2003](#)) und gleichzeitig beobachtet wird, dass eine Expression apoptoseinduzierender Gene im protrahierten Morphinentzug auftritt ([Fan u. a. 2003](#)), wären sogar neurodegenerative Vorgänge, die durch den Opiatentzug provoziert werden, nicht ausgeschlossen. Letzteres könnte durch grundsätzliche Erkenntnisse aus Experimenten bestätigt werden, in denen neurodegenerative Enzymkaskaden durch Entfernung eines Liganden vom Rezeptor aktiviert werden (vgl. [Bredesen u. a. 2004](#); [Mehlen und Bredesen 2004](#)). Weitere Erklärungsansätze gehen von einem Zusammenhang von neurotoxischen Veränderungen durch oxidativen Stress und erhöhter GABAerger Neurotransmission aus, wie sie im Alkohol- aber auch im Opiatentzug beobachtet werden kann ([Tsai u. a. 1998](#); [Bonci und Williams 1997](#)). Vielleicht ließen sich derartige degenerative Vorgänge als das somatische Korrelat des an anderer Stelle eingeführten Begriffs *funktionelle Neurotoxizität* auffassen, der u.a. die Dysregulation des *Belohnungssystems* durch den Entzug potentiell suchterzeugender Substanz beschreiben soll ([Pulvirenti 1993](#); [Weiss und Koob 2001](#)).

#### 4.4 Dopamin $D_{1/5}$ -Rezeptor und Adenylatzyklase

Unabhängig von der Frage, ob es sich um degenerative oder adaptive Veränderungen handelt, ergaben sich aus den hier dargestellten Ergebnissen dosisabhängige Effekte, die vor allem in der forciert behandelten Gruppe auftraten und zum Teil einen Zeitraum von 30 Tagen überdauerten. Es zeigten sich nach einem Zeitraum von achtwöchiger Substanzeinnahme dagegen keinerlei grundsätzlich andersartige Effekte bei selbstbestimmter Einnahme. Es ließe sich folgern, dass die Adaptationen mit der Erfahrung des zeitlich intermittierenden Einnahmemusters bzw. den Schwankungen des Plasmaspiegels zusammenhängen könnten, die abgesehen von der quantitativen Ausprägung in beiden Gruppen vorhanden waren. Weil einige Effekte nur in der forciert behandelten Gruppe auftraten, ist allerdings ein Beeinflussung durch das Merkmal des erzwungenen Konsums nicht vollständig auszuschließen. Die Entkoppelung von  $D_{1/5}$ -Rezeptor und  $G_{\alpha(s/olf)}$ -Proteinen und gleichzeitige Sensibilisierung des inhibitorischen  $G_{\alpha(i/o)}$ -Signalwegs könnten als strukturelle Langzeitfolgen auf Plasmamembran bzw. Zelle durch längerfristige Selbsteinnahme aufgefasst werden (vgl. Williams u. a. 2001). Auffälligerweise zeigte der primäre Wirkort des  $\mu$ -Rezeptors und dessen direkte Koppelung an G-Proteine im Bereich des untersuchten Gewebes keine solchen langfristigen Veränderungen. Die festgestellten persistierenden Veränderungen fanden sich in einem Hirnareal, das mit den verstärkenden Eigenschaften der Opioide und anderer suchterzeugender Substanzen verknüpft bzw. Teil des Belohnungssystems ist.

Alterationen der Signalübertragung in Teilen des mesolimbischen Systems könnten zu Maladaptationen führen, die mit motiviertem Verhalten in Verbindung stehen (vgl. Fasano und Brambilla 2002; Kauer 2004). Morphinvorerfahrungen können z.B. die verstärkenden Eigenschaften dieser Substanz verstärken und Drogensuchverhalten von Ratten beeinflussen (Steinfels und Young 1981; Harris und Aston-Jones 2003b; He u. a. 2004). Interessanterweise waren gerade solche mit Platzpräferenzkonditionierungen beschriebenen Veränderungen der verstärkenden Eigenschaften des Morphins (Mucha u. a. 1982; Carboni und Vacca 2003) mit Lerndefiziten und abgeschwächter Platzpräferenz für den natürlichen Verstärker Nahrungsmittel verknüpft (Harris und Aston-Jones 2003a). Eine Opioidvorerfahrung kann darüber hinaus zur verstärkten Platzpräferenz für andere potentiell suchterzeugende Substanzen mit Beziehung zum mesolimbischen System führen (z.B. Amphetamin) (Cunningham und Kelley 1992). Umgekehrt können Substanzen wie z.B. Nikotin die diesbezüglichen Eigenschaften eines Opiates verstärken (Shippenberg u. a. 1996). Die hier beschriebenen langfristigen Neuroadaptationen im Sinne einer persistierenden Dysbalance von  $D_{1/5}$ -Rezeptor und  $G_{i/o}$ -Proteinweg ließe sich als substanzübergreifender Bestandteil solcher Verhaltensänderungen postulieren. Solche Adaptationen sind offenbar nicht an eine freiwillige und potentiell suchterzeugen-

#### *4 Diskussion*

de Einnahme gebunden. Vielmehr könnte das intermittierende Einnahmeschema mit größeren Amplituden des Plasmaspiegels von besonderer Bedeutung sein. Da keine gesonderten Effekte der selbstbestimmten Einnahme gefunden und gleichzeitig die Etablierung eines kontrollierten Konsums beschrieben wurde, ließe sich folgern, dass die untersuchten neurobiologischen Stationen von diesem Lernvorgang nicht persistierend verändert werden.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob die achtwöchige orale Einnahme des Opioides Etonitazen durch Wistar-Ratten neben kurzfristigen Veränderungen zu protrahierten Adaptationen neurochemischer Strukturen der Signaltransduktion führen kann. Zugleich wurde gefragt, ob sich innerhalb dieses Zeitraumes ein freiwilliger Konsum des Opioides unterscheidbar von einem erzwungenen (forcierten) Konsummuster abbilden würde. Einem Teil der in Einzelhaltung lebenden Tiere wurde die Wahl zwischen Etonitazenlösung und Wasser ermöglicht. Eine zweite Gruppe bekam ausschließlich Etonitazenlösung zur Deckung des Flüssigkeitsbedarfs. Die Gruppe des wählenden Konsums reduzierte den Verbrauch im Verlauf auf signifikant niedrigere Mengen. Die Reduktion wurde als Etablierung eines kontrollierten Konsums interpretiert, der einen optimierten Gebrauch zur Induktion der psychotropen Wirkungen darstellen könnte. Die forciert behandelten Tiere zeigten einen hochdosierten Konsum, für den in erster Linie eine vermutete Sensibilisierung des nächtlichen lokomotorischen Verhaltens verantwortlich gemacht wurde. Die Tötung der Tiere und die Gewebepräparation erfolgten im zweitägigen Entzug respektive nach sechswöchiger Abstinenz.

Bei der Untersuchung des  $\mu$ -Opioidrezeptors (MOR) wurden keine Veränderungen der maximalen Bindungsdichte oder Rezeptoraffinität gemessen. Die max. Bindungsdichte der MOR-gekoppelten  $G_{i/o}$ -Proteine war im akuten Entzug in beiden konsumierenden Gruppen erhöht, während die intrinsische Fähigkeit des MOR-Agonisten DAMGO zur G-Proteinaktivierung in der forciert behandelten Gruppe im gleichen Zeitraum verstärkt war. Insgesamt war die Entkoppelung der  $G_{i/o}$ -Proteine vom MOR im akuten Entzug erschwert. Die Ergebnisse deuten auf eine vor allem dosisabhängige Erhöhung des G-Proteinpools und Verstärkung der G-Proteinaktivierbarkeit im akuten Entzug hin.

Im akuten Entzug zeigten sich eine erhöhte Dichte des Dopamin  $D_{1/5}$ -Rezeptors und eine Verstärkung der hochaffinen Bindungsstelle innerhalb der forciert behandelten Gruppe im *limbischen Vorderhirn* (inkl. Nucleus accumbens). Dem gegenüber war die Bindungsdichte nach sechswöchiger Abstinenz erniedrigt und die hochaffine Bindungsstelle abgeschwächt. Die gemessene Erhöhung bzw. Erniedrigung der max.  $D_{1/5}$ -Bindungsdichte und die Verstärkung bzw. Abschwächung der hochaffinen Bindungsstelle könnten als Gegenregulation zu einer vermuteten verminder-



## 5 Zusammenfassung

ten basalen Dopaminausschüttung im akuten bzw. einer sensitisierten Dopaminausschüttung im protrahierten Entzug aufgefasst werden. Die Stimulierbarkeit der Adenylatzyklase (AC) über Aktivierung des Dopamin  $D_{1/5}$ -Rezeptors war gleichzeitig im *limbischen Vorderhirn* im akuten Entzug und nach sechswöchiger Abstinenz in allen substanzerfahrenen Gruppen erniedrigt. Aus den Messungen ergab sich eine funktionelle Entkoppelung von  $D_{1/5}$ -Rezeptor und stimulatorischen G-Proteinen.

Die pharmakologische Potenz von  $GTP\gamma S$  zur Inhibition der AC war im *limbischen Vorderhirn* im akuten Entzug und nach sechswöchiger Abstinenz in allen substanzerfahrenen Gruppen signifikant verstärkt. Die signifikant erniedrigten  $EC_{50}$ -Werte wurden als persistierende Sensitisierung des inhibitorischen G-Proteinwegs interpretiert.

Die persistierende funktionelle Entkoppelung von  $D_{1/5}$ -Rezeptor und stimulatorischen G-Proteinen während gleichzeitiger Sensitisierung des inhibitorischen u.a.  $D_2$ -rezeptorgekoppelten G-Proteinwegs wurde als persistierende Dysbalance gewertet, die in einem Hirnareal auftrat, dass mit den verstärkenden und verhaltensmodulierenden Wirkungen der Opioide verknüpft ist. Möglicherweise sind diese Langzeitfolgen einer oralen Etonitazenselbsteinnahme mit Adaptationen des motivierten Verhaltens verbunden.

Insgesamt ließen sich keine gesonderten Effekte des freiwilligen Konsummusters auf neurochemische Adaptationen nachweisen. Es wird hier in erster Linie von dosisabhängigen Veränderungen im Rahmen eines intermittierenden Verabreichungsschemas ausgegangen. Da sich innerhalb der wählenden Gruppe ein kontrollierter Konsum entwickelte, musste von Lernvorgängen ausgegangen werden, die sich nicht in den untersuchten Stationen der Signaltransduktion innerhalb der untersuchten Hirnregionen manifestieren.

Grundsätzlich sind neben aktiven adaptiven Vorgängen neurodegenerative Prozesse durch Agonisteneinwirkung oder Entzug als Ursache für persistierende neurochemische Veränderungen nicht auszuschließen.



## Literatur

- Acquas und Chiara 1992** ACQUAS, E. ; CHIARA, G. D.: Depression of mesolimbic dopamine transmission and sensitization to morphine during opiate abstinence. In: *J Neurochem* 58 (1992), Nr. 5, S. 1620–5 [14](#)
- Ahtee 1974** AHTEE, L.: Catalepsy and stereotypies in rats treated with methadone; relation to striatal dopamine. In: *Eur J Pharmacol* 27 (1974), Nr. 2, S. 221–30 [9](#)
- Ai u. a. 1999** AI, W ; GONG, J ; YU, L: MAP kinase activation by mu opioid receptor involves phosphatidylinositol 3-kinase but not the cAMP/PKA pathway. In: *FEBS Lett* 456 (1999), Jul, Nr. 1, S. 196–200 [7](#)
- Al-Hakim u. a. 2004** AL-HAKIM, A. ; RUI, X. ; TSAO, J. ; ALBERT, P. R. ; SCHIMMER, B. P.: Forskolin-resistant Y1 adrenal cell mutants are deficient in adenylyl cyclase type 4. In: *Mol Cell Endocrinol* 214 (2004), Nr. 1-2, S. 155–65 [73](#)
- Ammer und Christ 2002** AMMER, H. ; CHRIST, T. E.: Identity of adenylyl cyclase isoform determines the G protein mediating chronic opioid-induced adenylyl cyclase supersensitivity. In: *J Neurochem* 83 (2002), Nr. 4, S. 818–27 [11](#), [73](#)
- Angst u. a. 2003** ANGST, M.S. ; KOPPERT, W. ; PAHL, I. ; CLARK, D.J. ; SCHMELZ, M.: Short-Term Infusion of the Mu-Opioid Agonist Remifentanyl in Humans Causes Hyperalgesia During Withdrawal. In: *Pain* 106 (1-2) (2003), S. 49–57 [7](#), [65](#)
- Antal u. a. 2004** ANTAL, S. ; PAPP, O. ; BAHAEERGULI, Niyazi ; VERESS ; VEREB: Expression of hyperpolarization-activated and cyclic nucleotide-gated cation channel subunit 2 in axon terminals of peptidergic nociceptive primary sensory neurons in the superficial spinal dorsal horn of rats. In: *Eur J Neurosci* 19 (2004), Mar, Nr. 5, S. 1336–42 [6](#)
- APA 1994** APA: *Diagnostik and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV)*, 4.th edition. Washington DC : American Psychiatric Assoziation, 1994 [8](#), [63](#)
- Avidor-Reiss u. a. 1995** AVIDOR-REISS, T. ; BAYEWITCH, M. ; LEVY, R. ; MATUSLEIBOVITCH, N. ; NEVO, I.: Adenylylcyclase supersensitization in mu-opioid receptor-transfected Chinese hamster ovary cells following chronic opioid treatment. In: *J Biol Chem* 270 (1995), Nr. 50, S. 29732–8 [73](#)
- Avidor-Reiss u. a. 1997** AVIDOR-REISS, T. ; NEVO, I. ; SAYA, D. ; BAYEWITCH, M. ; VOGEL, Z.: Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 8, S. 5040–7 [73](#)
- Ballantyne und Mao 2003** BALLANTYNE, J C. ; MAO, J: Opioid Therapy for Chronic Pain. In: *N Engl J Med* 349 (2003), Nr. 20, S. 1943–1953 [65](#)

- Bartoletti u. a. 1983** BARTOLETTI, M. ; GAIARDI, M. ; GUBELLINI, G. ; BACCHI, A. ; BABBINI, M.: Long-term sensitization to the excitatory effects of morphine. A motility study in post-dependent rats. In: *Neuropharmacology* 22 (1983), Nr. 10, S. 1193–6 [14](#)
- Bayewitch u. a. 1998** BAYEWITCH, M. L. ; AVIDOR-REISS, T. ; LEVY, R. ; PFEUFFER, T. ; NEVO, I. ; SIMONDS, W. F. ; VOGEL, Z.: Inhibition of adenylyl cyclase isoforms V and VI by various Gbetagamma subunits. In: *Faseb J* 12 (1998), Nr. 11, S. 1019–25 [73](#)
- Besse 1990** BESSE, D.: Pre- and Postsynaptic Distribution of Mu, Delta and Kappa Opioid Receptors in the Superficial Layers of the Cervical Dorsal Horn of the Rat Spinal Cord. In: *Brain Res* 521 (1-2) (1990), S. 15–22 [7](#)
- Bhargava und Gulati 1990** BHARGAVA, H. N. ; GULATI, A.: Down-regulation of brain and spinal cord mu-opiate receptors in morphine tolerant-dependent rats. In: *Eur J Pharmacol* 190 (1990), Nr. 3, S. 305–11 [71](#)
- Bischoff u. a. 1986** BISCHOFF, S. ; HEINRICH, M. ; SONNTAG, J. M. ; KRAUSS, J.: The D-1 dopamine receptor antagonist SCH 23390 also interacts potently with brain serotonin (5-HT<sub>2</sub>) receptors. In: *Eur J Pharmacol* 129 (1986), Nr. 3, S. 367–70 [34](#)
- Bonci und Williams 1997** BONCI, A. ; WILLIAMS, J. T.: Increased probability of GABA release during withdrawal from morphine. In: *J Neurosci* 17 (1997), Nr. 2, S. 796–803 [74](#)
- Borgland 2001** BORGLAND, S. L.: Acute opioid receptor desensitization and tolerance: is there a link? In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28 (2001), Nr. 3, S. 147–54 [68](#)
- Bourne 2001** BOURNE, J. A.: SCH 23390: the first selective dopamine D1-like receptor antagonist. In: *CNS Drug Rev* 7 (2001), Nr. 4, S. 399–414 [33](#)
- Bozarth und Wise 1986** BOZARTH, M. A. ; WISE, R. A.: Involvement of the ventral tegmental dopamine system in opioid and psychomotor stimulant reinforcement. In: *NIDA Res Monogr* 67 (1986), S. 190–6 [9](#)
- Bradford 1976** BRADFORD, MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal Biochem* 72 (1976), May, S. 248–54 [26](#)
- Bredesen u. a. 2004** BREDESEN, D. E. ; MEHLEN, P. ; RABIZADEH, S.: Apoptosis and dependence receptors: a molecular basis for cellular addiction. In: *Physiol Rev* 84 (2004), Nr. 2, S. 411–30 [74](#)
- Buccafusco u. a. 1984** BUCCAFUSCO, JJ ; MARSHALL, DC ; TURNER, RM: A comparison of the inhibitory effects of clonidine and guanfacine on the behavioral and autonomic components of morphine withdrawal in rats. In: *Life Sci* 35 (1984), Sep, Nr. 13, S. 1401–8 [11](#)

- Burford u. a. 2000** BURFORD, N. T. ; WANG, D. ; SADEE, W.: G-protein coupling of mu-opioid receptors (OP3): elevated basal signalling activity. In: *Biochem J* 348 Pt 3 (2000), S. 531–7 [69](#)
- Caillé u. a. 1999** CAILLÉ, S ; ESPEJO, EF ; RENERIC, JP ; CADOR, M ; KOOB, GF ; STINUS, L: Total neurochemical lesion of noradrenergic neurons of the locus ceruleus does not alter either naloxone-precipitated or spontaneous opiate withdrawal nor does it influence ability of clonidine to reverse opiate withdrawal. In: *J Pharmacol Exp Ther* 290 (1999), Aug, Nr. 2, S. 881–92 [12](#)
- Carboni und Vacca 2003** CARBONI, E ; VACCA, C: Conditioned place preference. A simple method for investigating reinforcing properties in laboratory animals. In: *Methods Mol Med* 79 (2003), S. 481–98 [75](#)
- Celver u. a. 2004** CELVER, J. ; XU, M. ; JIN, W. ; LOWE, J. ; CHAVKIN, C.: Distinct domains of the mu-opioid receptor control uncoupling and internalization. In: *Mol Pharmacol* 65 (2004), Nr. 3, S. 528–37 [70](#)
- Centonze u. a. 2003** CENTONZE, D ; GRANDE, C ; USIELLO, A ; GUBELLINI, P ; ERBS, E ; MARTIN, A B. ; PISANI, A ; TOGNAZZI, N ; BERNARDI, G ; MORATALLA, R ; BORRELLI, E ; CALABRESI, P: Receptor subtypes involved in the presynaptic and postsynaptic actions of dopamine on striatal interneurons. In: *J Neurosci* 23 (2003), Jul, Nr. 15, S. 6245–54 [9](#)
- Chakrabarti und Gintzler 2003** CHAKRABARTI, S. ; GINTZLER, A. R.: Phosphorylation of Gbeta is augmented by chronic morphine and enhances Gbetagamma stimulation of adenylyl cyclase activity. In: *Brain Res Mol Brain Res* 119 (2003), Nr. 2, S. 144–51 [70](#)
- Chakrabarti u. a. 1997** CHAKRABARTI, S. ; YANG, W. ; LAW, P. Y. ; LOH, H. H.: The mu-opioid receptor down-regulates differently from the delta-opioid receptor: requirement of a high affinity receptor/G protein complex formation. In: *Mol Pharmacol* 52 (1997), Nr. 1, S. 105–13 [67](#)
- Chen u. a. 2003** CHEN, L. E. ; GAO, C. ; CHEN, J. ; XU, X. J. ; ZHOU, D. H. ; CHI, Z. Q.: Internalization and recycling of human mu opioid receptors expressed in Sf9 insect cells. In: *Life Sci* 73 (2003), Nr. 1, S. 115–28 [7, 68](#)
- Chen 1996** CHEN, Y.: Functional Coupling of a Mu Opioid Receptor to G Proteins and Adenylyl Cyclase: Modulation by Chronic Morphine Treatment. In: *Addict Biol* 1 (1) (1996), S. 49–59 [67, 73](#)
- Chiara 1995** CHIARA, G. D.: The role of dopamine in drug abuse viewed from the perspective of its role in motivation [published erratum appears in *Drug Alcohol Depend* 1995 Aug;39(2):155]. In: *Drug Alcohol Depend* 38 (1995), Nr. 2, S. 95–137 [9](#)
- Chiara u. a. 1999** CHIARA, G. D. ; TANDA, G. ; BASSAREO, V. ; PONTIERI, F. ; ACQUAS, E. ; FENU, S. ; CADONI, C. ; CARBONI, E.: Drug addiction as a disorder of associative learning. Role of nucleus accumbens shell/extended amygdala dopamine. In: *Ann N Y Acad Sci* 877 (1999), S. 461–85 [9](#)

- Chieng und Williams 1998** CHIENG, B. ; WILLIAMS, J. T.: Increased opioid inhibition of GABA release in nucleus accumbens during morphine withdrawal. In: *J Neurosci* 18 (1998), Nr. 17, S. 7033–9 [11](#), [73](#)
- Clausen 1997** CLAUSEN, TG: International Opioid Consumption. In: *Acta Anaesthesiol Scand* 41 (1997), S. 162–5 [5](#)
- Clement u. a. 2002** CLEMENT, M. V. ; LONG, L. H. ; RAMALINGAM, J. ; HALLIWELL, B.: The cytotoxicity of dopamine may be an artefact of cell culture. In: *J Neurochem* 81 (2002), Nr. 3, S. 414–21 [74](#)
- Compton u. a. 2003** COMPTON, P. ; ATHANASOS, P. ; ELASHOFF, D.: Withdrawal Hyperalgesia After Acute Opioid Physical Dependence in Nonaddicted Humans: A Preliminary Study. In: *J Pain* 4 (9) (2003), S. 511–9 [65](#)
- Connor und Christie 1999** CONNOR, M ; CHRISTIE, MD: Opioid receptor signaling mechanisms. In: *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26 (1999), Jul, Nr. 7, S. 493–9 [6](#)
- Contarino u. a. 1997** CONTARINO, A. ; DRAGO ZANOTTI, A. und ; NATOLINO, F. ; LIPARTITI, M. ; GIUSTI, P.: Conditioned Place Preference: No Tolerance to the Rewarding Properties of Morphine. In: *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 355 (1997), S. 589–594 [14](#)
- Crombag u. a. 1996** CROMBAG, H. S. ; BADIANI, A. ; ROBINSON, T. E.: Signalled versus Unsignalled Intravenous Amphetamine: Large Differences in the Acute Psychomotor Response and Sensitization. In: *Brain Res* 722 (1996), S. 227–231 [17](#)
- Cunningham u. a. 1997** CUNNINGHAM, ST ; FINN, M ; KELLEY, AE: Sensitization of the locomotor response to psychostimulants after repeated opiate exposure: role of the nucleus accumbens. In: *Neuropsychopharmacology* 16 (1997), Feb, Nr. 2, S. 147–55 [10](#)
- Cunningham und Kelley 1992** CUNNINGHAM, ST ; KELLEY, AE: Evidence for opiate-dopamine cross-sensitization in nucleus accumbens: studies of conditioned reward. In: *Brain Res Bull* 29 (1992), Nov, Nr. 5, S. 675–80 [75](#)
- Deng u. a. 2000** DENG, H. B. ; YU, Y. ; PAK, Y. ; O'DOWD, B. F. ; GEORGE, S. R. ; SURRATT, C. K. ; UHL, G. R. ; WANG, J. B.: Role for the C-terminus in agonist-induced mu opioid receptor phosphorylation and desensitization. In: *Biochemistry* 39 (2000), Nr. 18, S. 5492–9 [67](#)
- Deslandes u. a. 2002** DESLANDES, P. N. ; PACHE, D. M. ; BUCKLAND, P. ; SEWELL, R. D.: Morphine, cocaine and antidepressant induced motivational activity and midbrain dopaminergic neurotransmission. In: *Eur J Pharmacol* 453 (2002), Nr. 2-3, S. 223–9 [71](#)
- Dessauer u. a. 2002** DESSAUER, C. W. ; CHEN-GOODSPEED, M. ; CHEN, J.: Mechanism of Galpha i-mediated inhibition of type V adenylyl cyclase. In: *J Biol Chem* 277 (2002), Nr. 32, S. 28823–9 [6](#)

- Dhawan u. a. 1996** DHAWAN, B. N. ; CESSÉLIN, F. ; RAGHUBIR, R. ; REISINE, T. ; BRADLEY, P. B. ; PORTOGHESE, P. S. ; HAMON, M.: International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. In: *Pharmacol Rev* 48 (1996), Nr. 4, S. 567–92 [5](#), [17](#)
- Diana u. a. 1999** DIANA, M. ; MUNTONI, A. L. ; PISTIS, M. ; MELIS, M. ; GESSA, G. L.: Lasting reduction in mesolimbic dopamine neuronal activity after morphine withdrawal. In: *Eur J Neurosci* 11 (1999), Nr. 3, S. 1037–41 [12](#), [71](#)
- Dowling u. a. 2004** DOWLING, M R. ; NAHORSKI, S R. ; CHALLISS, R A J.: Measurement of agonist-stimulated [35S]GTPgammaS binding to assess total G-protein and Galpha-subtype-specific activation by G-protein-coupled receptors. In: *Methods Mol Biol* 259 (2004), S. 197–206 [6](#)
- Eddy u. a. 1959** EDDY, N. B. ; LEE, L. E. ; HARRIS, C.: [Physical dependence and tolerance in relation to various analgesics in patients suffering from chronic pains; comparison between morphine, oxymorphone and anileridine]. In: *Bull World Health Organ* 20 (1959), S. 1245–56 [10](#)
- Eisinger u. a. 2002** EISINGER, D. A. ; AMMER, H. ; SCHULZ, R.: Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization. In: *J Neurosci* 22 (2002), Nr. 23, S. 10192–200 [7](#), [68](#)
- Elliott u. a. 1994** ELLIOTT, K. ; MINAMI, N. ; KOLESNIKOV, Y. A. ; PASTERNAK, G. W. ; INTURRISI, C. E.: 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. In: *Pain* 56 (1994), Nr. 1, S. 69–75 [65](#)
- Elwan und Soliman 1995** ELWAN, M. A. ; SOLIMAN, M. R.: Alteration of D1 and D2 dopaminergic receptor kinetics in specific rat brain regions following repeated administration of opiates. In: *Pharmacology* 51 (1995), Nr. 2, S. 73–83 [71](#)
- Fabian u. a. 2002** FABIAN, G. ; BOZO, B. ; SZIKSZAY, M. ; HORVATH, G. ; COSCIA, C. J. ; SZUCS, M.: Chronic morphine-induced changes in mu-opioid receptors and G proteins of different subcellular loci in rat brain. In: *J Pharmacol Exp Ther* 302 (2002), Nr. 2, S. 774–80 [69](#)
- Fadda 2003** FADDA, P.: Baclofen Antagonizes Nicotine-, Cocaine-, and Morphine-Induced Dopamine Release in the Nucleus Accumbens of Rat. In: *Synapse* 50 (1) (2003), S. 1–6 [10](#)
- Fan u. a. 2003** FAN, X. L. ; ZHANG, J. S. ; ZHANG, X. Q. ; MA, L.: Chronic morphine treatment and withdrawal induce up-regulation of c-Jun N-terminal kinase 3 gene expression in rat brain. In: *Neuroscience* 122 (2003), Nr. 4, S. 997–1002 [74](#)
- Fang u. a. 2000** FANG, F. ; WANG, Q. ; CAO, Q. ; LIU, J.: [Changes of AC/cAMP system and phosphorylation regulation of adenylate cyclase activity in brain regions from morphine-dependent mice]. In: *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 22 (2000), Nr. 1, S. 14–9 [72](#)



- Fasano und Brambilla 2002** FASANO, S. ; BRAMBILLA, R.: Cellular mechanisms of striatum-dependent behavioral plasticity and drug addiction. In: *Curr Mol Med* 2 (2002), Nr. 7, S. 649–65 75
- Finley u. a. 2004** FINLEY, M ; ARRABIT, C ; FOWLER, C ; SUEN, K F. ; SLESINGER, P A.: betaL-betaM loop in the C-terminal domain of G protein-activated inwardly rectifying K(+) channels is important for G(beta gamma) subunit activation. In: *J Physiol* 555 (2004), Mar, Nr. Pt 3, S. 643–57 6
- Finn und Whistler 2001** FINN, A. K. ; WHISTLER, J. L.: Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. In: *Neuron* 32 (2001), Nr. 5, S. 829–39 68
- Fiorino 1993** FIORINO, D.F.: Electrical Stimulation of Reward Sites in the Ventral Tegmental Area Increases Dopamine Transmission in the Nucleus Accumbens of the Rat. In: *Behav Brain Res* 55 (2) (1993), S. 131–41 8, 9
- Fisher u. a. 1992** FISHER, SK ; HEACOCK, AM ; AGRANOFF, BW: Inositol lipids and signal transduction in the nervous system: an update. In: *J Neurochem* 58 (1992), Jan, Nr. 1, S. 18–38 6
- Frere und Luthi 2004** FRERE, S.G. ; LUTHI, A.: Pacemaker channels in mouse thalamocortical neurones are regulated by distinct pathways of cAMP synthesis. In: *J Physiol* 554 (2004), Jan, Nr. Pt 1, S. 111–25 6
- Freye und Latasch 2003** FREYE, E. ; LATASCH, L.: [Development of opioid tolerance – molecular mechanisms and clinical consequences]. In: *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 38 (2003), Nr. 1, S. 14–26 65
- Gage u. a. 2001** GAGE, R. M. ; KIM, K. A. ; CAO, T. T. ; ZASTROW, M. von: A transplantable sorting signal that is sufficient to mediate rapid recycling of G protein-coupled receptors. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 48, S. 44712–20 68
- Gaiardi u. a. 1991** GAIARDI, M ; BARTOLETTI, M ; BACCHI, A ; GUBELLINI, C ; COSTA, M ; BABBINI, M: Role of repeated exposure to morphine in determining its affective properties: place and taste conditioning studies in rats. In: *Psychopharmacology (Berl)* 103 (1991), Nr. 2, S. 183–6 14
- Georges u. a. 1999** GEORGES, F. ; STINUS, L. ; BLOCH, B. ; MOINE, C. L.: Chronic morphine exposure and spontaneous withdrawal are associated with modifications of dopamine receptor and neuropeptide gene expression in the rat striatum. In: *Eur J Neurosci* 11 (1999), Nr. 2, S. 481–90 71
- Gerancher u. a. 1999** GERANCHER, JC ; FLOYD, H ; EISENACH, J: Determination of an effective dose of intrathecal morphine for pain relief after cesarean delivery. In: *Anesth Analg* 88 (1999), Feb, Nr. 2, S. 346–51 7
- Gerrits u. a. 2002** GERRITS, M. A. ; PETROMILLI, P. ; WESTENBERG, H. G. ; CHIARA, G. D. ; REE, J. M. van: Decrease in basal dopamine levels in the nucleus accumbens shell during daily drug-seeking behaviour in rats. In: *Brain Res* 924 (2002), Nr. 2, S. 141–50 71

- Gharagozlou u. a. 2003** GHARAGOZLOU, P ; DEMIRCI, H ; CLARK, J D. ; LAMEH, J: Activity of opioid ligands in cells expressing cloned mu opioid receptors. In: *BMC Pharmacol* 3 (2003), Jan, Nr. 1, S. 1–6
- Gintzler und Chakrabarti 2000** GINTZLER, A. R. ; CHAKRABARTI, S.: Opioid tolerance and the emergence of new opioid receptor-coupled signaling. In: *Mol Neurobiol* 21 (2000), Nr. 1-2, S. 21–33
- Glowinski und Iversen 1966** GLOWINSKI, J ; IVERSEN, LL: Regional studies of catecholamines in the rat brain. I. The disposition of [3H]norepinephrine, [3H]dopamine and [3H]dopa in various regions of the brain. In: *J Neurochem* 13 (1966), Aug, Nr. 8, S. 655–69
- Gomes u. a. 2002** GOMES, B. A. ; SHEN, J. ; STAFFORD, K. ; PATEL, M. ; YOBURN, B. C.: Mu-opioid receptor down-regulation and tolerance are not equally dependent upon G-protein signaling. In: *Pharmacol Biochem Behav* 72 (2002), Nr. 1-2, S. 273–8
- Grady u. a. 1997** GRADY, E. F. ; BOHM, S. K. ; BUNNETT, N. W.: Turning off the signal: mechanisms that attenuate signaling by G protein-coupled receptors. In: *Am J Physiol* 273 (1997), Nr. 3 Pt 1, S. G586–601
- Granados-Soto u. a. 2000** GRANADOS-SOTO, V. ; KALCHEVA, I. ; HUA, X. ; NEWTON, A. ; YAKSH, T. L.: Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion. In: *Pain* 85 (2000), Nr. 3, S. 395–404
- Gutkowska u. a. 1993** GUTKOWSKA, J. ; STRICK, D. M. ; PAN, L. ; MCCANN, S. M.: Effect of morphine on urine output: possible role of atrial natriuretic factor. In: *Eur J Pharmacol* 242 (1993), Nr. 1, S. 7–13
- Haberstock-Debic u. a. 2003** HABERSTOCK-DEBIC, H. ; WEIN, M. ; BARROT, M. ; COLAGO, E. E. ; RAHMAN, Z. ; NEVE, R. L. ; PICKEL, V. M. ; NESTLER, E. J. ; ZASTROW, M. von ; SVINGOS, A. L.: Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. In: *J Neurosci* 23 (2003), Nr. 10, S. 4324–32
- Hahm u. a. 2004** HAHM, ET ; LEE, JJ ; MIN, BI ; CHO, YW: Opioid inhibition of GABAergic neurotransmission in mechanically isolated rat periaqueductal gray neurons. In: *Neurosci Res* 50 (2004), 11, Nr. 3, S. 343–354
- Hall u. a. 1996** HALL, S. ; MILNE, B. ; JHAMANDAS, K.: Nitric oxide synthase inhibitors attenuate acute and chronic morphine withdrawal response in the rat locus coeruleus: an in vivo voltammetric study. In: *Brain Res* 739 (1996), Nr. 1-2, S. 182–91
- Harlan u. a. 2004** HARLAN, R E. ; KAILAS, S R. ; TAGOE, C E F. ; GARCIA, M M.: Morphine actions in the rat forebrain: role of protein kinase C. In: *Brain Res Bull* 62 (2004), Jan, Nr. 4, S. 285–95

- Harris und Aston-Jones 2003a** HARRIS, G C. ; ASTON-JONES, G: Altered motivation and learning following opiate withdrawal: evidence for prolonged dysregulation of reward processing. In: *Neuropsychopharmacology* 28 (2003), May, Nr. 5, S. 865–71 [75](#)
- Harris und Aston-Jones 2003b** HARRIS, G C. ; ASTON-JONES, G: Enhanced morphine preference following prolonged abstinence: association with increased Fos expression in the extended amygdala. In: *Neuropsychopharmacology* 28 (2003), Feb, Nr. 2, S. 292–9 [75](#)
- Harrison und Traynor 2003** HARRISON, C ; TRAYNOR, JR: The [<sup>35</sup>S]GTPgammaS binding assay: approaches and applications in pharmacology. In: *Life Sci* 74 (2003), Dec, Nr. 4, S. 489–508 [6](#)
- He u. a. 2002** HE, L. ; FONG, J. ; ZASTROW, M. von ; WHISTLER, J. L.: Regulation of opioid receptor trafficking and morphine tolerance by receptor oligomerization. In: *Cell* 108 (2002), Nr. 2, S. 271–82 [7](#)
- He und Grasing 2004** HE, S ; GRASING, K: Chronic opiate treatment enhances both cocaine-reinforced and cocaine-seeking behaviors following opiate withdrawal. In: *Drug Alcohol Depend* 75 (2004), Aug, Nr. 2, S. 215–21 [10](#)
- He u. a. 2004** HE, S ; LI, N ; GRASING, K: Long-term opiate effects on amphetamine-induced dopamine release in the nucleus accumbens core and conditioned place preference. In: *Pharmacol Biochem Behav* 77 (2004), Feb, Nr. 2, S. 327–35 [75](#)
- Hebb 1955** HEBB, D. O.: Drives and the C.N.S. (conceptual nervous system). In: *Psychol Rev* 62 (1955), Nr. 4, S. 243–54 [9](#)
- Heinzen und Pollack 2004** HEINZEN, E. L. ; POLLACK, G. M.: The development of morphine antinociceptive tolerance in nitric oxide synthase-deficient mice. In: *Biochem Pharmacol* 67 (2004), Nr. 4, S. 735–41 [65](#)
- Heyliger u. a. 2000** HEYLIGER, S. O. ; NI, Q. ; ROTHMAN, R. B.: Resolution of two [(<sup>35</sup>S)]GTP-gamma-S binding sites and their response to chronic morphine treatment: a binding surface analysis. In: *Brain Res Bull* 51 (2000), Nr. 4, S. 357–62 [69](#)
- Heyne 1996a** HEYNE, A: The development of opiate addiction in the rat. In: *Pharmacol Biochem Behav* 53 (1996), Nr. 1, S. 11–25 [13](#), [16](#), [17](#), [20](#), [64](#), [66](#), [67](#)
- Heyne 1996b** HEYNE, A.: *Die Selbstbestimmte Einnahme Eines Opiates Durch Wistar-ratten*. Hamburg : Verlag Dr. Kovac, 1996 [13](#)
- Heyne u. a. 2000** HEYNE, A. ; MAY, T. ; GOLL, P. ; WOLFFGRAMM, J.: Persisting consequences of drug intake: towards a memory of addiction. In: *J Neural Transm* 107 (2000), Nr. 6, S. 613–38 [14](#), [64](#), [65](#), [74](#)
- Heyne und Wolffgramm 1998** HEYNE, A. ; WOLFFGRAMM, J.: The development of addiction to d-amphetamine in an animal model: same principles as for alcohol and opiate. In: *Psychopharmacology (Berl)* 140 (1998), Nr. 4, S. 510–8 [13](#), [16](#)



- Hislop u. a. 2004** HISLOP, J. N. ; MARLEY, A. ; ZASTROW, M. V.: Role of Mammalian Vacuolar Protein-sorting Proteins in Endocytic Trafficking of a Non-ubiquitinated G Protein-coupled Receptor to Lysosomes. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 21, S. 22522–31 [68](#)
- Hoffman u. a. 2001** HOFFMAN, EH ; BLACKBURN, C ; CULLARI, S: Brief residential treatment for nicotine addiction: a five-year follow-up study. In: *Psychol Rep* 89 (2001), Aug, Nr. 1, S. 99–105 [8](#)
- Hrdina 1986** HRDINA, P. D.: *Neuromethods, chap. General Principles of Receptor Binding*. Humana press, 1986. – 1–21 S [21](#), [23](#)
- Hunts und Lands 1992** HUNTS, WA ; LANDS, WE: A Role for Behavioral Sensitization in Uncontrolled Ethanol Intake. In: *Alcohol* 9 (1992), Nr. 4, S. 327–8 [14](#)
- Iglesias u. a. 2003** IGLESIAS, M. ; SEGURA, M. F. ; COMELLA, J. X. ; OLMOS, G.: Mu-opioid receptor activation prevents apoptosis following serum withdrawal in differentiated SH-SY5Y cells and cortical neurons via phosphatidylinositol 3-kinase. In: *Neuropharmacology* 44 (2003), Nr. 4, S. 482–92 [74](#)
- Ilani u. a. 2002** ILANI, Tal ; FISHBURN, C S. ; LEVAVI-SIVAN, Berta ; CARMON, Shari ; RAVEH, Lily ; FUCHS, Sara: Coupling of dopamine receptors to G proteins: studies with chimeric D2/D3 dopamine receptors. In: *Cell Mol Neurobiol* 22 (2002), Feb, Nr. 1, S. 47–56 [9](#), [73](#)
- Ingram 1994** INGRAM, S.L.: Opioid Inhibition of I<sub>h</sub> Via Adenylyl Cyclase. In: *Neuron* 13 (1) (1994), S. 179–86 [6](#)
- Ingram u. a. 1998** INGRAM, SL ; VAUGHAN, CW ; BAGLEY, EE ; CONNOR, M ; CHRISTIE, MJ: Enhanced opioid efficacy in opioid dependence is caused by an altered signal transduction pathway. In: *J Neurosci* 18 (1998), Dec, Nr. 24, S. 10269–76 [10](#)
- Ivanov 2001** IVANOV, A.: Local Opiate Withdrawal in Locus Coeruleus Neurons in Vitro. In: *J Neurophysiol* 85 (6) (2001), S. 2388–97 [12](#)
- Janecka u. a. 2004** JANECKA, A ; FICHNA, J ; JANECKI, T: Opioid receptors and their ligands. In: *Curr Top Med Chem* 4 (2004), Nr. 1, S. 1–17 [5](#)
- Jensen 1997** JENSEN, T. S.: Opioids in the brain: supraspinal mechanisms in pain control. In: *Acta Anaesthesiol Scand* 41 (1997), Nr. 1 Pt 2, S. 123–32 [8](#)
- Jiang und Sibley 1999** JIANG, D. ; SIBLEY, D. R.: Regulation of D(1) dopamine receptors with mutations of protein kinase phosphorylation sites: attenuation of the rate of agonist-induced desensitization. In: *Mol Pharmacol* 56 (1999), Nr. 4, S. 675–83 [72](#)
- Johnson und Walseth 1979** JOHNSON, RA ; WALSETH, TF: The enzymatic preparation of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]ATP, [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP, [<sup>32</sup>P]cAMP, and [<sup>32</sup>P]cGMP, and their use in the assay of adenylate and guanylate cyclases and cyclic nucleotide phosphodiesterases. In: *Adv Cyclic Nucleotide Res* 10 (1979), S. 135–67 [23](#)

- Johnson und North 1992** JOHNSON, S.W. ; NORTH, R.A.: Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons. In: *J Neurosci* 12 (1992), Nr. 2, S. 483–8 [9](#)
- Kalinichev u. a. 2004** KALINICHEV, M ; WHITE, D A. ; HOLTZMAN, S G.: Individual differences in locomotor reactivity to a novel environment and sensitivity to opioid drugs in the rat. I. Expression of morphine-induced locomotor sensitization. In: *Psychopharmacology (Berl)* (2004), Aug [10](#)
- Kaplan u. a. 1998** KAPLAN, G. B. ; SETHI, R. K. ; MCCLELLAND, E. G. ; LEITE-MORRIS, K. A.: Regulation of G protein-mediated adenylyl cyclase in striatum and cortex of opiate-dependent and opiate withdrawing mice. In: *Brain Res* 788 (1998), Nr. 1-2, S. 104–10 [72](#)
- Kauer 2004** KAUER, J A.: Learning mechanisms in addiction: synaptic plasticity in the ventral tegmental area as a result of exposure to drugs of abuse. In: *Annu Rev Physiol* 66 (2004), S. 447–75 [75](#)
- Keith u. a. 1998** KEITH, D. E. ; ANTON, B. ; MURRAY, S. R. ; ZAKI, P. A. ; CHU, P. C. ; LISSIN, D. V. ; MONTEILLET-AGIUS, G. ; STEWART, P. L. ; EVANS, C. J. ; ZASTROW, M. von: mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. In: *Mol Pharmacol* 53 (1998), Nr. 3, S. 377–84 [7](#), [68](#)
- Kim u. a. 2004** KIM, O. J. ; GARDNER, B. R. ; WILLIAMS, D. B. ; MARINEC, P. S. ; CABRERA, D. M. ; PETERS, J. D. ; MAK, C. C. ; KIM, K. M. ; SIBLEY, D. R.: The role of phosphorylation in D1 dopamine receptor desensitization: evidence for a novel mechanism of arrestin association. In: *J Biol Chem* 279 (2004), Nr. 9, S. 7999–8010 [72](#)
- Kirschke u. a. 2002** KIRSCHKE, C. ; SCHADRACK, J. ; ZIEGLGANSBERGER, W. ; SPANAGEL, R.: Effects of morphine withdrawal on micro-opioid receptor-stimulated guanylyl 5'-[gamma-[35S]thio]-triphosphate autoradiography in rat brain. In: *Eur J Pharmacol* 446 (2002), Nr. 1-3, S. 43–51 [69](#)
- Kiyatkin und Rebec 1997** KIYATKIN, E. A. ; REBEC, G. V.: Activity of presumed dopamine neurons in the ventral tegmental area during heroin self-administration. In: *Neuroreport* 8 (1997), Nr. 11, S. 2581–5 [13](#)
- Kiyatkin u. a. 1993** KIYATKIN, E. A. ; WISE, R. A. ; GRATTON, A.: Drug- and behavior-associated changes in dopamine-related electrochemical signals during intravenous heroin self-administration in rats. In: *Synapse* 14 (1993), Nr. 1, S. 60–72 [13](#)
- Koob und Moal 1997** KOOB, GF ; MOAL, M L.: Drug abuse: hedonic homeostatic dysregulation. In: *Science* 278 (1997), Oct, Nr. 5335, S. 52–8 [74](#)
- Koob und Moal 2001** KOOB, GF ; MOAL, M L.: Drug addiction, dysregulation of reward, and allostasis. In: *Neuropsychopharmacology* 24 (2001), Feb, Nr. 2, S. 97–129 [74](#)

- Koppert 2004** KOPPERT, W.: Opioid-Induced Hyperalgesia. Pathophysiology and Clinical Relevance. In: *Anaesthetist* (2004) 65
- Kovoor u. a. 1998** KOVOOR, A. ; CELVER, J. P. ; WU, A. ; CHAVKIN, C.: Agonist induced homologous desensitization of mu-opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy. In: *Mol Pharmacol* 54 (1998), Nr. 4, S. 704–11 70
- Kramer und Simon 1999** KRAMER, HK ; SIMON, EJ: Role of protein kinase C (PKC) in agonist-induced mu-opioid receptor down-regulation: I. PKC translocation to the membrane of SH-SY5Y neuroblastoma cells is induced by mu-opioid agonists. In: *J Neurochem* 72 (1999), Feb, Nr. 2, S. 585–93 6
- Kramer und Simon 2000** KRAMER, HK ; SIMON, EJ: mu and delta-opioid receptor agonists induce mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the absence of receptor internalization. In: *Neuropharmacology* 39 (2000), Jul, Nr. 10, S. 1707–19 7
- Lane-Ladd u. a. 1997** LANE-LADD, SB ; PINEDA, J ; BOUNDY, VA ; PFEUFFER, T ; KRUPINSKI, J ; AGHAJANIAN, GK ; NESTLER, EJ: CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence. In: *J Neurosci* 17 (1997), Oct, Nr. 20, S. 7890–901 11
- Laschka u. a. 1976** LASCHKA, E. ; TESCHEMACHER, H. ; MEHRAEIN, P. ; HERZ, A.: Sites of action of morphine involved in the development of physical dependence in rats. II. Morphine withdrawal precipitated by application of morphine antagonists into restricted parts of the ventricular system and by microinjection into various brain areas. In: *Psychopharmacologia* 46 (1976), S. 141–7 11
- Laulin u. a. 1998** LAULIN, JP ; LARCHER, A ; CÉLÉRIER, E ; MOAL, M L. ; SIMONNET, G: Long-lasting increased pain sensitivity in rat following exposure to heroin for the first time. In: *Eur J Neurosci* 10 (1998), Feb, Nr. 2, S. 782–5 7
- Law u. a. 2000** LAW, P. Y. ; ERICKSON, L. J. ; EL-KOUHEN, R. ; DICKER, L. ; SOLBERG, J. ; WANG, W. ; MILLER, E. ; BURD, A. L. ; LOH, H. H.: Receptor density and recycling affect the rate of agonist-induced desensitization of mu-opioid receptor. In: *Mol Pharmacol* 58 (2000), Nr. 2, S. 388–98 68
- Law u. a. 1984** LAW, P. Y. ; HOM, D. S. ; LOH, H. H.: Down-regulation of opiate receptor in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells. Chloroquine promotes accumulation of tritiated enkephalin in the lysosomes. In: *J Biol Chem* 259 (1984), Nr. 7, S. 4096–104 67
- Leite-Morris 2004** LEITE-MORRIS, K.A.: GABA(B) Receptor Activation in the Ventral Tegmental Area Inhibits the Acquisition and Expression of Opiate-Induced Motor Sensitization. In: *J Pharmacol Exp Ther* 308 (2) (2004), S. 667–78 10
- Leshner 1997** LESHNER, A. I.: Addiction is a Brain Disease, and It Matters. In: *Science* 278 (1997), Nr. 5335, S. 45–7 8

- Li u. a. 2001a** LI, X. ; ANGST, M. S. ; CLARK, J. D.: A murine model of opioid-induced hyperalgesia. In: *Brain Res Mol Brain Res* 86 (2001), Nr. 1-2, S. 56–62 65
- Li u. a. 2001b** LI, X. ; ANGST, M.S. ; CLARK, J.D.: Opioid-Induced Hyperalgesia and Incisional Pain. In: *Anesth Analg* 93 (1) (2001), S. 204–9 65
- Liao u. a. 2001** LIAO, GY ; WAGNER, DA ; HSU, MH ; LEONARD, JP: Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current. In: *Mol Pharmacol* 59 (2001), May, Nr. 5, S. 960–4 7
- Liu und Prather 2001** LIU, J. G. ; PRATHER, P. L.: Chronic exposure to mu-opioid agonists produces constitutive activation of mu-opioid receptors in direct proportion to the efficacy of the agonist used for pretreatment. In: *Mol Pharmacol* 60 (2001), Nr. 1, S. 53–62 67, 69
- Liu u. a. 2001** LIU, J. G. ; RUCKLE, M. B. ; PRATHER, P. L.: Constitutively active mu-opioid receptors inhibit adenylyl cyclase activity in intact cells and activate G-proteins differently than the agonist [D-Ala<sup>2</sup>,N-MePhe<sup>4</sup>,Gly-ol<sup>5</sup>]enkephalin. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 41, S. 37779–86 69
- Ma u. a. 2001** MA, W ; ZHENG, WH ; POWELL, K ; JHAMANDAS, K ; QUIRION, R: Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. In: *Eur J Neurosci* 14 (2001), Oct, Nr. 7, S. 1091–104 11
- Makimura u. a. 1997** MAKIMURA, M. ; IWAI, M. ; SUGIMOTO, H. ; FUKUDA, H.: Effect of NMDA Receptor Antagonists on Protein Kinase Activated by Chronic Morphine Treatment. In: *J Toxicol Sci* 22 (1) (1997), S. 57–64 65
- Maldonado u. a. 1992** MALDONADO, R ; STINUS, L ; GOLD, LH ; KOOB, GF: Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome. In: *J Pharmacol Exp Ther* 261 (1992), May, Nr. 2, S. 669–77 11
- Mamiya u. a. 2001** MAMIYA, T. ; NODA, Y. ; REN, X. ; HAMDY, M. ; FURUKAWA, S. ; KAMEYAMA, T. ; YAMADA, K. ; NABESHIMA, T.: Involvement of cyclic AMP systems in morphine physical dependence in mice: prevention of development of morphine dependence by rolipram, a phosphodiesterase 4 inhibitor. In: *Br J Pharmacol* 132 (2001), Nr. 5, S. 1111–7 11
- Manning 1994** MANNING, B.H.: Morphine Analgesia in the Formalin Test: Evidence for Forebrain and Midbrain Sites of Action. In: *Neuroscience* 63 (1) (1994), S. 289–94 8
- Manzoni 1999** MANZONI, O.J.: Presynaptic Regulation of Glutamate Release in the Ventral Tegmental Area During Morphine Withdrawal. In: *J Neurosci* 19 (15) (1999), S. 6629–36 12
- Mao u. a. 1994** MAO, J. ; PRICE, D. D. ; MAYER, D. J.: Thermal hyperalgesia in association with the development of morphine tolerance in rats: roles of excitatory amino acid receptors and protein kinase C. In: *J Neurosci* 14 (1994), Nr. 4, S. 2301–12 65

- Martin u. a. 1999** MARTIN, G ; AHMED, SH ; BLANK, T ; SPIESS, J ; KOOB, GF ; SIGGINS, GR: Chronic morphine treatment alters NMDA receptor-mediated synaptic transmission in the nucleus accumbens. In: *J Neurosci* 19 (1999), Oct, Nr. 20, S. 9081–97
- May 1992** MAY, T.: Striatal Dopamine  $D_1$ -Like Receptors Have Higher Affinity for Dopamine in Ethanol-Treated Rats. In: *European journal of pharmacology* 215 (1992), S. 313–316 25, 71
- May u. a. 1998** MAY, T. ; JUILFS, F. ; WOLFFGRAMM, J.: Long-lasting effects of chronic mu-opioid intake on the signal transmission via dopamine  $D_1$  receptors in the limbic forebrain of drug deprived rats. In: *Neuropharmacology* 37 (1998), Nr. 8, S. 997–1006 18
- May u. a. 1999** MAY, T. ; JUILFS, F. ; WOLFFGRAMM, J.: Effects of etonitazene consumption and abstinence on the signal transmission of mu-opioid receptors in brain membranes of rats. In: *Neurosci Lett* 275 (1999), Nr. 2, S. 109–112 18
- May und Sugawa 1993** MAY, T. ; SUGAWA, M.: Altered dopamine receptor mediated signal transmission in the striatum of aged rats. In: *Brain Res* 604 (1993), Nr. 1-2, S. 106–111 71
- May u. a. 1995** MAY, T. ; WOLF, U. ; WOLFFGRAMM, J.: Striatal dopamine receptors and adenylyl cyclase activity in a rat model of alcohol addiction: effects of ethanol and lisuride treatment. In: *J Pharmacol Exp Ther* 275 (1995), Nr. 3, S. 1195–1203 13, 16, 18, 33, 36
- Mayer u. a. 1995** MAYER, D. J. ; MAO, J. ; PRICE, D. D.: The association of neuropathic pain, morphine tolerance and dependence, and the translocation of protein kinase C. In: *NIDA Res Monogr* 147 (1995), S. 269–98 65
- McLaughlin und Chavkin 2001** MCLAUGHLIN, J. P. ; CHAVKIN, C.: Tyrosine phosphorylation of the mu-opioid receptor regulates agonist intrinsic efficacy. In: *Mol Pharmacol* 59 (2001), Nr. 6, S. 1360–8 70
- Mehlen und Bredesen 2004** MEHLEN, P. ; BREDESEN, D. E.: The dependence receptor hypothesis. In: *Apoptosis* 9 (2004), Nr. 1, S. 37–49 74
- Michel u. a. 1986** MICHEL, C. ; MONTASTRUC, J. L. ; VALDIGUIE, P. ; MONTASTRUC, P.: Effects of morphine on urine flow in rats. Involvement of vasopressin. In: *J Pharmacol* 17 (1986), Nr. 3, S. 316–22 64
- Moyse 1997** MOYSE, E.: Electron Microscopic Distribution of Mu Opioid Receptors on Noradrenergic Neurons of the Locus Coeruleus. In: *Eur J Neurosci.* 9 (1) (1997), S. 128–39 5
- Mucha u. a. 1982** MUCHA, RF ; KOOY, D van der ; O'SHAUGHNESSY, M ; BUCE-NIEKS, P: Drug reinforcement studied by the use of place conditioning in rat. In: *Brain Res* 243 (1982), Jul, Nr. 1, S. 91–105 75



- Narita u. a. 2001** NARITA, M. ; MIZOGUCHI, H. ; NAGASE, H. ; SUZUKI, T. ; TSENG, L. F.: Up-regulation of spinal mu-opioid receptor function to activate G-protein by chronic naloxone treatment. In: *Brain Res* 913 (2001), Nr. 2, S. 170–32 [6](#)
- Nestler 2004** NESTLER, EJ: Molecular mechanisms of drug addiction. In: *Neuropharmacology* 47 Suppl 1 (2004), S. 24–32 [7](#), [11](#)
- Nevo u. a. 1998** NEVO, I. ; AVIDOR-REISS, T. ; LEVY, R. ; BAYEWITCH, M. ; HELDMAN, E. ; VOGEL, Z.: Regulation of adenylyl cyclase isozymes on acute and chronic activation of inhibitory receptors. In: *Mol Pharmacol* 54 (1998), Nr. 2, S. 419–26 [73](#)
- Nevo u. a. 2000** NEVO, I. ; AVIDOR-REISS, T. ; LEVY, R. ; BAYEWITCH, M. ; VOGEL, Z.: Acute and chronic activation of the mu-opioid receptor with the endogenous ligand endomorphin differentially regulates adenylyl cyclase isozymes. In: *Neuropharmacology* 39 (2000), Nr. 3, S. 364–71 [71](#)
- Ng u. a. 1995** NG, G. Y. ; TROGADIS, J. ; STEVENS, J. ; BOUVIER, M. ; O'DOWD, B. F. ; GEORGE, S. R.: Agonist-induced desensitization of dopamine D1 receptor-stimulated adenylyl cyclase activity is temporally and biochemically separated from D1 receptor internalization. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995), Nr. 22, S. 10157–61 [72](#)
- O'Boyle und Waddington 1992** O'BOYLE, K. M. ; WADDINGTON, J. L.: Agonist and antagonist interactions with D1 dopamine receptors: agonist-induced masking of D1 receptors depends on intrinsic activity. In: *Neuropharmacology* 31 (1992), Nr. 2, S. 177–83 [33](#)
- Ofri u. a. 1992** OFRI, D. ; RITTER, A. M. ; LIU, Y. F. ; GIOANNINI, T. L. ; HILLER, J. M. ; SIMON, E. J.: Characterization of solubilized opioid receptors: reconstitution and uncoupling of guanine nucleotide-sensitive agonist binding. In: *J Neurochem* 58 (1992), Nr. 2, S. 628–35 [28](#)
- Ojanen 2003** OJANEN, S.: Differential Behavioural Sensitization to Intermittent Morphine Treatment in Alcohol-Preferring AA and Alcohol-Avoiding ANA Rats: Role of Mesolimbic Dopamine. In: *Eur J Neurosci* 17 (8) (2003), S. 1655–63 [12](#)
- Olds und Milner 1954** OLDS, J. ; MILNER, P.: Positive reinforcement produced by electrical stimulation of septal area and other regions of rat brain. In: *J Comp Physiol Psychol* 47 (1954), Nr. 6, S. 419–27 [9](#)
- Oliveira u. a. 2003** OLIVEIRA, M. T. ; REGO, A. C. ; MACEDO, T. R. ; OLIVEIRA, C. R.: Drugs of abuse induce apoptotic features in PC12 cells. In: *Ann N Y Acad Sci* 1010 (2003), S. 667–70 [74](#)
- Ozdogan u. a. 2003** OZDOGAN, U K. ; LÄHDESMÄKI, J ; SCHEININ, M: Influence of prazosin and clonidine on morphine analgesia, tolerance and withdrawal in mice. In: *Eur J Pharmacol* 460 (2003), Jan, Nr. 2-3, S. 127–34 [11](#)

- Pak u. a. 1999** PAK, Y. ; O'DOWD, B. F. ; WANG, J. B. ; GEORGE, S. R.: Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down-regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 39, S. 27610–6 [67](#)
- Patel u. a. 2002** PATEL, M. B. ; PATEL, C. N. ; RAJASHEKARA, V. ; YOBURN, B. C.: Opioid agonists differentially regulate mu-opioid receptors and trafficking proteins in vivo. In: *Mol Pharmacol* 62 (2002), Nr. 6, S. 1464–70 [68](#)
- Pontieri u. a. December, 1995** PONTIERI, F.E. ; TANDA, G. ; CHIARA, G. D.: Intravenous Cocaine, Morphine, and Amphetamine Preferentially Increase Extracellular Dopamine in the Shell as Compared with the Core of the Rat Nucleus Accumbens. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 (December, 1995), S. 12304–12308 [9](#)
- Pulvirenti 1993** PULVIRENTI, L: Functional neurotoxicity of drugs of abuse. In: *Funct Neurol* 8 (1993), Nr. 6, S. 433–40 [74](#)
- Punch u. a. 1997** PUNCH, LJ ; SELF, DW ; NESTLER, EJ ; TAYLOR, JR: Opposite modulation of opiate withdrawal behaviors on microinfusion of a protein kinase A inhibitor versus activator into the locus coeruleus or periaqueductal gray. In: *J Neurosci* 17 (1997), Nov, Nr. 21, S. 8520–7 [11](#)
- Quillan u. a. 2002** QUILLAN, J M. ; CARLSON, K W. ; SONG, C ; WANG, D: Differential effects of mu-opioid receptor ligands on Ca(2+) signaling. In: *J Pharmacol Exp Ther* 302 (2002), Sep, Nr. 3, S. 1002–12 [6](#)
- Robbins und Everitt 2002** ROBBINS, TW ; EVERITT, BJ: Limbic-striatal memory systems and drug addiction. In: *Neurobiol Learn Mem* 78 (2002), Nov, Nr. 3, S. 625–36 [14](#)
- Robinson und Berridge 1993** ROBINSON, T. E. ; BERRIDGE, K. C.: The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. In: *Brain Res Brain Res Rev* 18 (1993), Nr. 3, S. 247–91 [15](#)
- Robinson und Berridge 2001** ROBINSON, TE ; BERRIDGE, KC: Incentive-sensitization and addiction. In: *Addiction* 96 (2001), Jan, Nr. 1, S. 103–14 [15](#)
- Rossetti u. a. 1992** ROSSETTI, ZL ; HMAIDAN, Y ; GESSA, GL: Marked inhibition of mesolimbic dopamine release: a common feature of ethanol, morphine, cocaine and amphetamine abstinence in rats. In: *Eur J Pharmacol* 221 (1992), Oct, Nr. 2-3, S. 227–34 [12](#)
- Sala u. a. 1992** SALA, M. ; BRAIDA, D. ; CALCATERRA, P. ; LEONE, M. P. ; GORI, E.: Dose-dependent conditioned place preference produced by etonitazene and morphine. In: *Eur J Pharmacol* 217 (1992), Nr. 1, S. 37–41 [17](#)
- Savage 1996** SAVAGE, S. R.: Long-term opioid therapy: assessment of consequences and risks. In: *J Pain Symptom Manage* 11 (1996), Nr. 5, S. 274–86 [64](#)
- Scatchard 1949** SCATCHARD, G.: The attraction of proteins for small molecules and ions. In: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51 (1949), S. 660–672 [22](#)

- Schultz und Jakobs 1986** SCHULTZ, S. ; JAKOBS, K.H.: *Adenylate Cyclase*. Verlag Chemie, 1986 (Methods of Enzymatic Analysis) 24, 25, 36
- Schulz u. a. 2004** SCHULZ, R. ; DANIELA, A. E. ; WEHMEYER, Andrea: Opioid control of MAP kinase cascade. In: *Eur J Pharmacol* 500 (2004), 10, Nr. 1-3, S. 487–497 7
- Selley u. a. 1997a** SELLEY, D. E. ; SIM, L. J. ; XIAO, R. ; LIU, Q. ; CHILDERS, S. R.: mu-Opioid receptor-stimulated guanosine-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in rat thalamus and cultured cell lines: signal transduction mechanisms underlying agonist efficacy. In: *Mol Pharmacol* 51 (1997), Nr. 1, S. 87–96 31
- Selley u. a. 1997b** SELLEY, DE ; NESTLER, EJ ; BREIVOGEL, CS ; CHILDERS, SR: Opioid receptor-coupled G-proteins in rat locus coeruleus membranes: decrease in activity after chronic morphine treatment. In: *Brain Res* 746 (1997), Jan, Nr. 1-2, S. 10–8 10
- Sever u. a. 2000** SEVER, S. ; DAMKE, H. ; SCHMID, S. L.: Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. In: *J Cell Biol* 150 (2000), Nr. 5, S. 1137–48 68
- Sharma u. a. 1975** SHARMA, S. K. ; KLEE, W. A. ; NIRENBERG, M.: Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 72 (1975), Nr. 8, S. 3092–6 73
- Sharpe u. a. 1974** SHARPE, L. G. ; GARNETT, J. E. ; CICERO, T. J.: Analgesia and hyperreactivity produced by intracranial microinjections of morphine into the periaqueductal gray matter of the rat. In: *Behav Biol* 11 (1974), Nr. 3, S. 303–13 6, 8
- Sheffield und Roby 1950** SHEFFIELD, F. D. ; ROBY, T. B.: Reward value of a non-nutritive sweet-taste. In: *J Comp Physiol Psychol* 43 (1950), Nr. 6, S. 471–81 9
- Shippenberg u. a. 1996** SHIPPENBERG, T.S. ; HEIDBREDER, C. ; LEFEVOUR, A.: Sensitization to the conditioned rewarding effects of morphine: pharmacology and temporal characteristics. In: *Eur J Pharmacol* 299 (1996), Nr. 1-3, S. 33–9 14, 75
- Shoji u. a. 1999** SHOJI, Y ; DELFS, J ; WILLIAMS, JT: Presynaptic inhibition of GABA(B)-mediated synaptic potentials in the ventral tegmental area during morphine withdrawal. In: *J Neurosci* 19 (1999), Mar, Nr. 6, S. 2347–55 11
- Sidhu 1998** SIDHU, A: Coupling of D1 and D5 dopamine receptors to multiple G proteins: Implications for understanding the diversity in receptor-G protein coupling. In: *Mol Neurobiol* 16 (1998), Apr, Nr. 2, S. 125–34 9
- Sim u. a. 1996** SIM, L. J. ; SELLEY, D. E. ; XIAO, R. ; CHILDERS, S. R.: Differences in G-protein activation by mu- and delta-opioid, and cannabinoid, receptors in rat striatum. In: *Eur J Pharmacol* 307 (1996), Nr. 1, S. 97–105 31
- Skinner 1936** SKINNER, B. F.: The reinforcing effect of a differentiating stimulus. In: *Journal of General Psychology* 14 (1936), S. 263–78 8



- Sklair-Tavron u. a. 1996** SKLAIR-TAVRON, L. ; SHI, W. X. ; LANE, S. B. ; HARRIS, H. W. ; BUNNEY, B. S. ; NESTLER, E. J.: Chronic morphine induces visible changes in the morphology of mesolimbic dopamine neurons. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (1996), Nr. 20, S. 11202–7 [71](#)
- Song u. a. 2004** SONG, J. H. ; SLOT, A. J. ; RYAN, R. W. ; ROSS, G. M.: Dopamine-induced death of PC12 cells is prevented by a substituted tetrahydronaphthalene. In: *Neuropharmacology* 46 (2004), Nr. 7, S. 984–93 [74](#)
- Spiga u. a. 2003** SPIGA, S. ; SERRA, G. P. ; PUDDU, M. C. ; FODDAI, M. ; DIANA, M.: Morphine withdrawal-induced abnormalities in the VTA: confocal laser scanning microscopy. In: *Eur J Neurosci* 17 (2003), Nr. 3, S. 605–12 [71](#)
- Stafford u. a. 2001** STAFFORD, K. ; GOMES, A. B. ; SHEN, J. ; YOBURN, B. C.: mu-Opioid receptor downregulation contributes to opioid tolerance in vivo. In: *Pharmacol Biochem Behav* 69 (2001), Nr. 1-2, S. 233–7 [67](#)
- Steinfels und Young 1981** STEINFELS, GF ; YOUNG, GA: Effects of narcotic abstinence on schedule-controlled behavior in dependent rats. In: *Pharmacol Biochem Behav* 14 (1981), Mar, Nr. 3, S. 393–5 [75](#)
- Sunahara u. a. 1996** SUNAHARA, R. K. ; DESSAUER, C. W. ; GILMAN, A. G.: Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. In: *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36 (1996), S. 461–80 [73](#)
- Swillens u. a. 1995** SWILLENS, S. ; WAELBROECK, M. ; CHAMPEIL, P.: Does a radiolabelled ligand bind to a homogeneous population of non-interacting receptor sites? [see comments]. In: *Trends Pharmacol Sci* 16 (1995), Nr. 5, S. 151–5 [27](#), [30](#), [33](#)
- Szucs u. a. 2004** SZUCS, M. ; BODA, K. ; GINTZLER, A. R.: Dual effects of Tyr-D-Ala-Gly-(NMe)Phe-Gly-ol (DAMGO) and D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub> (CTAP) on adenylyl cyclase activity; implications for micro-opioid receptor Gs coupling. In: *J Pharmacol Exp Ther* (2004) [71](#)
- Taber 1998** TABER, M.T.: Opioid Receptor Modulation of Feeding-Evoked Dopamine Release in the Rat Nucleus Accumbens. In: *Brain Res* 785 (1) (1998), S. 24–30 [9](#)
- Tanowitz und von Zastrow 2003** TANOWITZ, M. ; ZASTROW, M. von: A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors. In: *J Biol Chem* 278 (2003), Nr. 46, S. 45978–86 [68](#)
- Tao u. a. 1993** TAO, P. L. ; LEE, C. R. ; LAW, P. Y. ; LOH, H. H.: The interaction of the mu-opioid receptor and G protein is altered after chronic morphine treatment in rats. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 348 (1993), Nr. 5, S. 504–8 [70](#)
- Tjon u. a. 1994** TJON, G. H. ; VRIES, T. J. D. ; RONKEN, E. ; HOGENBOOM, F. ; WARDEH, G. ; MULDER, A. H. ; SCHOFFELMEER, A. N.: Repeated and chronic morphine administration causes differential long-lasting changes in dopaminergic neurotransmission in rat striatum without changing its delta- and kappa-opioid receptor regulation. In: *Eur J Pharmacol* 252 (1994), Nr. 2, S. 205–12 [12](#), [71](#), [73](#)

- Tong u. a. 2003** TONG, J. ; ROSS, B. M. ; SCHMUNK, G. A. ; PERETTI, F. J. ; KALASINSKY, K. S. ; FURUKAWA, Y. ; ANG, L. C. ; AIKEN, S. S. ; WICKHAM, D. J. ; KISH, S. J.: Decreased striatal dopamine D1 receptor-stimulated adenylyl cyclase activity in human methamphetamine users. In: *Am J Psychiatry* 160 (2003), Nr. 5, S. 896–903 72
- Traynor und Nahorski 1995** TRAYNOR, J.R. ; NAHORSKI, S.R.: Modulation by  $\mu$ -Opioid Agonists of Guanosin-5'-O-([<sup>35</sup>]3-Thio)Triphosphat to Membranes from Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells. In: *molecular pharmacology* 47 (1995), S. 848–854 23
- Tsai u. a. 1998** TSAI, GE ; RAGAN, P ; CHANG, R ; CHEN, S ; LINNOILA, VM ; COYLE, JT: Increased glutamatergic neurotransmission and oxidative stress after alcohol withdrawal. In: *Am J Psychiatry* 155 (1998), Jun, Nr. 6, S. 726–32 74
- Tsao und von Zastrow 2000** TSAO, P. I. ; ZASTROW, M. von: Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 15, S. 11130–40 68
- Ulens u. a. 1999** ULENS, C ; DAENENS, P ; TYTGAT, J: The dual modulation of GIRK1/GIRK2 channels by opioid receptor ligands. In: *Eur J Pharmacol* 385 (1999), Dec, Nr. 2-3, S. 239–45 6
- Ulens und Siegelbaum 2003** ULENS, C ; SIEGELBAUM, S A.: Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry. In: *Neuron* 40 (2003), Dec, Nr. 5, S. 959–70 6
- Vanderschuren u. a. 1997** VANDERSCHUREN, L. J. ; TJON, G. H. ; NESTBY, P. ; MULDER, A. H. ; SCHOFFELMEER, A. N. ; VRIES, T. J. D.: Morphine-induced long-term sensitization to the locomotor effects of morphine and amphetamine depends on the temporal pattern of the pretreatment regimen. In: *Psychopharmacology (Berl)* 131 (1997), Nr. 2, S. 115–22 64
- Vanderschuren 2001** VANDERSCHUREN, L.J.: A Single Exposure to Morphine Induces Long-Lasting Behavioural and Neurochemical Sensitization in Rats. In: *Eur J Neurosci* 14 (9) (2001), S. 1533–8 64, 73
- Ventayol u. a. 1997** VENTAYOL, P. ; BUSQUETS, X. ; GARCIA-SEVILLA, J. A.: Modulation of immunoreactive protein kinase C-alpha and beta isoforms and G proteins by acute and chronic treatments with morphine and other opiate drugs in rat brain. In: *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 355 (1997), Nr. 4, S. 491–500 69
- Vigano u. a. 2003** VIGANO, D. ; RUBINO, T. ; CHIARA, G. D. ; ASCARI, I. ; MASSI, P. ; PAROLARO, D.: Mu opioid receptor signaling in morphine sensitization. In: *Neuroscience* 117 (2003), Nr. 4, S. 921–9 70
- Vries u. a. 1998** VRIES, T. J. D. ; SCHOFFELMEER, A. N. ; BINNEKADE, R. ; MULDER, A. H. ; VANDERSCHUREN, L. J.: Drug-induced reinstatement of heroin- and

- cocaine-seeking behaviour following long-term extinction is associated with expression of behavioural sensitization. In: *Eur J Neurosci* 10 (1998), Nr. 11, S. 3565–71 15
- Wainger u. a. 2001** WAINGER, BJ ; DEGENNARO, M ; SANTORO, B ; SIEGELBAUM, SA ; TIBBS, GR: Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. In: *Nature* 411 (2001), Jun, Nr. 6839, S. 805–10 6
- Wang u. a. 2004** WANG, D. ; RAEHAL, K. M. ; LIN, E. T. ; LOWERY, J. J. ; KIEFFER, B. L. ; BILSKY, E. J. ; SADEE, W.: Basal signaling activity of mu opioid receptor in mouse brain: role in narcotic dependence. In: *J Pharmacol Exp Ther* 308 (2004), Nr. 2, S. 512–20 69
- Wang u. a. 1994** WANG, Z. ; BILSKY, E. J. ; PORRECA, F. ; SADEE, W.: Constitutive mu opioid receptor activation as a regulatory mechanism underlying narcotic tolerance and dependence. In: *Life Sci* 54 (1994), Nr. 20, S. PL339–50 69
- Watts u. a. 2001** WATTS, V. J. ; TAUSSIG, R. ; NEVE, R. L. ; NEVE, K. A.: Dopamine D2 receptor-induced heterologous sensitization of adenylyl cyclase requires Galphas: characterization of Galphas-insensitive mutants of adenylyl cyclase V. In: *Mol Pharmacol* 60 (2001), Nr. 6, S. 1168–72 73
- Weiss und Koob 2001** WEISS, F ; KOOB, GF: Drug addiction: functional neurotoxicity of the brain reward systems. In: *Neurotox Res* 3 (2001), Jan, Nr. 1, S. 145–56 74
- Werling u. a. 1988** WERLING, L. L. ; PUTTFARCKEN, P. S. ; COX, B. M.: Multiple agonist-affinity states of opioid receptors: regulation of binding by guanyl nucleotides in guinea pig cortical, NG108-15, and 7315c cell membranes. In: *Mol Pharmacol* 33 (1988), Nr. 4, S. 423–31 28
- Werling u. a. 1989** WERLING, LL ; MCMAHON, PN ; COX, BM: Selective changes in mu opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989), Aug, Nr. 16, S. 6393–7 10
- Wesson und Ling 2003** WESSON, D R. ; LING, W: The Clinical Opiate Withdrawal Scale (COWS). In: *J Psychoactive Drugs* 35 (2003), Nr. 2, S. 253–9 11
- Whistler u. a. 2002** WHISTLER, J. L. ; ENQUIST, J. ; MARLEY, A. ; FONG, J. ; GLADHER, F. ; TSURUDA, P. ; MURRAY, S. R. ; ZASTROW, M. V.: Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors. In: *Science* 297 (2002), Nr. 5581, S. 615–20 68
- Whistler und von Zastrow 1998** WHISTLER, J. L. ; ZASTROW, M. von: Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 17, S. 9914–9 67, 68
- White 1996** WHITE, N. M.: Addictive drugs as reinforcers: multiple partial actions on memory systems. In: *Addiction* 91 (1996), Nr. 7, S. 921–49; discussion 951–65 66

- White und McDonald 2002** WHITE, N. M. ; MCDONALD, R. J.: Multiple parallel memory systems in the brain of the rat. In: *Neurobiol Learn Mem* 77 (2002), Nr. 2, S. 125–84 [66](#)
- Wieland und Jakobs 1994** WIELAND, T. ; JAKOBS, K.H.: Measurement of Receptor-Stimulated Guanosine 5'-O-(Gamma-Thio)Triphosphate Binding by G Proteins. In: *Methods Enzymol* (1994), S. 3–13 [30](#), [69](#)
- Williams u. a. 2001** WILLIAMS, J. T. ; CHRISTIE, M. J. ; MANZONI, O.: Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. In: *Physiol Rev* 81 (2001), Nr. 1, S. 299–343 [6](#), [10](#), [11](#), [75](#)
- Wilson 2003** WILSON, G.R.: Morphine Hyperalgesia: A Case Report. In: *Am J Hosp Palliat Care*. 20 (2003), S. 459–61 [65](#)
- Wise 1989** WISE, RA: Opiate reward: sites and substrates. In: *Neurosci Biobehav Rev* 13 (1989), Nr. 2-3, S. 129–33 [9](#)
- Wise 1996** WISE, R.A.: Neurobiology in Addiction. In: *Current Opinion in Neurobiology* 6 (1996), S. 243–251 [9](#)
- Wolfe u. a. 2003** WOLFE, J T. ; WANG, H ; HOWARD, J ; GARRISON, J C. ; BARRETT, P Q.: T-type calcium channel regulation by specific G-protein betagamma subunits. In: *Nature* 424 (2003), Jul, Nr. 6945, S. 209–13 [6](#)
- Wolffgramm 1991** WOLFFGRAMM, J.: An Ethopharmacological Approach to the Development of Drug Addiction. In: *Neurosci biobehav rev* 15 (1991), Nr. 4, S. 515–519 [13](#)
- Wolffgramm und Heyne 1995a** WOLFFGRAMM, J. ; HEYNE, A.: From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. In: *Behav Brain Resga* 70 (1995), Nr. 1, S. 77–94 [13](#), [16](#)
- Wolffgramm und Heyne 1995b** WOLFFGRAMM, J ; HEYNE, A: From controlled drug intake to loss of control: the irreversible development of drug addiction in the rat. In: *Behav Brain Res* 70 (1995), Sep, Nr. 1, S. 77–94 [16](#), [63](#)
- Wong u. a. 2000** WONG, C. S. ; HSU, M. M. ; CHOU, Y. Y. ; TAO, P. L. ; TUNG, C. S.: Morphine tolerance increases [3H]MK-801 binding affinity and constitutive neuronal nitric oxide synthase expression in rat spinal cord. In: *Br J Anaesth* 85 (2000), Nr. 4, S. 587–91 [65](#)
- Wood u. a. 1993** WOOD, MJ ; MCELROY, RG ; SURETTE, RA ; BROWN, RM: Tritium sampling and measurement. In: *Health Phys* 65 (1993), Dec, Nr. 6, S. 610–27 [22](#)
- Xu u. a. 2003** XU, H. ; LU, Y. F. ; ROTHMAN, R. B.: Opioid peptide receptor studies. 16. Chronic morphine alters G-protein function in cells expressing the cloned mu opioid receptor. In: *Synapse* 47 (2003), Nr. 1, S. 1–9 [69](#)
- Yabaluri und Medzihradsky 1997** YABALURI, N. ; MEDZIHRADESKY, F.: Down-regulation of mu-opioid receptor by full but not partial agonists is independent of G protein coupling. In: *Mol Pharmacol* 52 (1997), Nr. 5, S. 896–902 [67](#)

- Yaksh 1997** YAKSH, T. L.: Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. In: *Acta Anaesthesiol Scand* 41 (1997), Nr. 1 Pt 2, S. 94–111 7
- Yaksh und Onofrio 1987** YAKSH, T. L. ; ONOFRIO, B. M.: Retrospective consideration of the doses of morphine given intrathecally by chronic infusion in 163 patients by 19 physicians. In: *Pain* 31 (1987), Nr. 2, S. 211–23 7
- Yoburn u. a. 2003** YOBURN, B. C. ; GOMES, B. A. ; RAJASHEKARA, V. ; PATEL, C. ; PATEL, M.: Role of G(i)alpha2-protein in opioid tolerance and mu-opioid receptor downregulation in vivo. In: *Synapse* 47 (2003), Nr. 2, S. 109–16 67
- Yoo und Yoo 2003** YOO, J.H. ; YOO, Yang: Differential Effects of Morphine and Cocaine on Locomotor Activity and Sensitization in Mu-Opioid Receptor Knockout Mice. In: *Neurosci Lett* 344 (1) (2003), S. 37–40 9
- Yoshimura u. a. 1996** YOSHIMURA, M. ; IKEDA, H. ; TABAKOFF, B.: mu-Opioid receptors inhibit dopamine-stimulated activity of type V adenylyl cyclase but enhance dopamine-stimulated activity of type VII adenylyl cyclase. In: *Mol Pharmacol* 50 (1996), Nr. 1, S. 43–51 71
- Zacharko u. a. 1990** ZACHARKO, RM ; KASIAN, M ; IRWIN, J ; ZALCMAN, S ; LALONDE, G ; MACNEIL, G ; ANISMAN, H: Behavioral characterization of intracranial self-stimulation from mesolimbic, mesocortical, nigrostriatal, hypothalamic and extra-hypothalamic sites in the non-inbred CD-1 mouse strain. In: *Behav Brain Res* 36 (1990), Jan, Nr. 3, S. 251–81 9
- Zaki u. a. 2000** ZAKI, P. A. ; KEITH, D. E. ; BRINE, G. A. ; CARROLL, F. I. ; EVANS, C. J.: Ligand-induced changes in surface mu-opioid receptor number: relationship to G protein activation? In: *J Pharmacol Exp Ther* 292 (2000), Nr. 3, S. 1127–34 68
- Zaworski u. a. 1999** ZAWORSKI, PG ; ALBERTS, GL ; PREGENZER, JF ; IM, WB ; SLIGHTOM, JL ; GILL, GS: Efficient functional coupling of the human D3 dopamine receptor to G(o) subtype of G proteins in SH-SY5Y cells. In: *Br J Pharmacol* 128 (1999), Nov, Nr. 6, S. 1181–8 9, 73
- Zernig u. a. 1995** ZERNIG, G. ; ISSAEVITCH, T. ; BROADBEAR, J. H. ; BURKE, T. F. ; LEWIS, J. W. ; BRINE, G. A. ; WOODS, J. H.: Receptor reserve and affinity of mu opioid agonists in mouse antinociception: correlation with receptor binding. In: *Life Sci* 57 (1995), Nr. 23, S. 2113–25 17
- Zhuang u. a. 2000** ZHUANG, X. ; BELLUSCIO, L. ; HEN, R.: G(olf)alpha mediates dopamine D1 receptor signaling. In: *J Neurosci* 20 (2000), Nr. 16, S. RC91 9, 23
- Zieglgänsberger und Bayerl 1976** ZIEGLGÄNSBERGER, W. ; BAYERL, H.: The mechanism of inhibition of neuronal activity by opiates in the spinal cord of cat. In: *Brain Res* 115 (1976), Nr. 1, S. 111–28 7



## Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Dr. Jochen Wolffgramm nicht nur für die Überlassung des Themas danken, sondern auch für die unendliche Geduld und das beständige Interesse an meiner Arbeit. Ohne seine hervorragende Betreuung und seine Nachsichtigkeit wäre die Dissertation nicht zu Stande gekommen. Herrn Dr. Torsten May danke ich für die maßgebliche Betreuung des neurochemischen Teils der Arbeit. Dank gebührt darüber hinaus Frau Diplombiologin Petra Goll, die mir in allen Belangen eine besondere Hilfe war. Ihre Anregungen waren mir immer sehr wichtig. Herr Dr. Andreas Haemisch leistete entscheidende Hilfe bei der Gewebepräparation. Dafür und für seinen entscheidenden Rat in wichtigen Fragen möchte ich ihm danken. Frau Dr. Andrea Heyne danke ich für ihre Hilfe bei der Planung, für die Unterstützung bzw. Organisation der zeitraubenden Tierhaltung und ihre Hilfe bei der Literaturrecherche. Dank an alle Mitglieder der Arbeitsgruppe, die die Arbeit direkt oder indirekt begleitet haben, insbesondere Steffen Luther und Andrea Maltz für die technische Hilfe. Und nicht zuletzt an meine lieben Eltern.

Die Studie wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 515-96) und vom Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (FO 2.1-68503-201) unterstützt.





# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Folkert Juilfs  
geb. am 31. Mai 1967  
in Brake (Unterweser)  
Staatsangehörigkeit deutsch;  
ev. luth.;  
ledig.

## Schulbildung

1974 - 1987      Grundschule; Abitur an der IGS Aurich-West (Ostfriesland).  
1984 - 1985      Jackson High School (North Canton, Ohio; USA).

## Zivildienst

1987 - 1989      Pflegeheim Dr. Wilkening (Hannover) und Werkstätten für Behinderte (Aurich/Ostfriesland).

## Studium

1989 - 1992      Germanistik und Geschichte an der Freien Universität Berlin.  
1992 - 1999      Studium der Humanmedizin; Humboldt Universität Berlin.  
02.12.1999      3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.

## Famulaturen

1994              Innere Medizin (Infektiologie): KH Prenzlauer Berg, Berlin.  
1997              Chirurgie: Hadassah Hospital und Augusta Viktoria Hospital in Jerusalem, Israel.  
1997              Dermatologie: Praxis Dr. Klemm, Berlin.

## **Praktisches Jahr**

- I. 1998-99            Innere Medizin: Robert-Rössle Klinik, Berlin.
- II. 1999              Chirurgie: Klinikum Buch, Berlin.
- III. 1999             Dermatologie: Klinikum Ernst v. Bergmann, Potsdam.

## **Arzt im Praktikum**

- 8/2000 - 3/2001    Kreiskrankenhaus Belzig, (Brandenburg); Innere Abteilung, CA Dr. Heßler.
- 4/2001 - 1/2002    DRK Krankenhaus Mark Brandenburg (Berlin); Innere Abteilung, CA Prof. Dr. Dorow.

## **Assistenzarzt**

- 3/2002 - 2/2004    Fachklinik für Lungenheilkunde u. Thoraxchirurgie Berlin Buch, CA Prof. Dr. Lichey; Innere Abteilung.
- seit 1/2005         Werner Forßmann Krankenhaus Eberswalde, Frau Dr. med. P. Wacker; Kardiologie.