

# **Die Darstellung von Opiatrezeptoren im menschlichen Gehirn mittels Diprenorphin**

Ein Vergleich zwischen Rezeptor-Autoradiographie *ex vivo*  
und Positronen-Emissions-Tomographie *in vivo*

Bernd-Alexander Gebhard Hock

**Neurologische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München**

**Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Univ.-Prof. Dr. Bastian Conrad)

# **Die Darstellung von Opiatrezeptoren im menschlichen Gehirn mit Diprenorphin**

Ein Vergleich zwischen Rezeptor-Autoradiographie *ex vivo*  
und Positronen-Emissions-Tomographie *in vivo*

**Bernd-Alexander Gebhard Hock**

**Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen  
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines**

**Doktors der Medizin**

**genehmigten Dissertation.**

**Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier**

**Prüfer der Dissertation:**

- 1. Univ.-Prof. Dr. Dr. Th. R. Töle**
- 2. Univ.-Prof. Dr. J. Schlegel**

**Die Dissertation wurde am 20.10.2006 bei der Technischen Universität  
München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 23.05.2007  
angenommen.**

Meinen Kindern

**Paula, Max** (†15.04.2004) und **Ben**,

meiner Frau **Jasmin**,

und meinen **Eltern Ursula** und **Bertold Hock**

gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>	
<b>Kapitel 1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b><u>1</u></b>
1.1.	<b>Der Opiatrezeptor-Antagonist Diprenorphin (DPN)</b>	<b>1</b>
1.2.	<b>Opiatrezeptoren und Opioide</b>	<b>2</b>
1.2.1.	Opiatrezeptoren	2
1.2.2.	Opioide und Schmerzerleben	4
1.2.3.	Endogene Opioide und Opiatrezeptor-Aktivierung	4
1.3.	<b>Rezeptor-Autoradiographie</b>	<b>5</b>
1.3.1.	Prinzip der Rezeptor-Autoradiographie	5
1.3.2.	Densitometrie	7
1.4.	<b>Positronen-Emissions-Tomographie (PET)</b>	<b>8</b>
1.4.1.	Grundlagen der PET	8
1.4.2.	Aufbau des PET-Scanners	9
1.4.3.	Radioliganden-Synthese	11
1.4.4.	PET-Datenakquisition	11
1.4.5.	Quantitative kinetische Modellierung-Techniken der Liganden-PET	13
1.4.5.1.	Spektralanalyse	13
1.4.5.2.	Kompartiment-Modell-Analyse	15
1.4.6.	Weitere Bildverarbeitung der PET-Bilder	16
<b>Kapitel 2</b>	<b><u>Zielsetzung der Dissertation</u></b>	<b><u>17</u></b>
2.1.	<b><i>Ex vivo</i> [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte im menschlichen Gehirn</b>	<b>17</b>
2.2.	<b>Opiatrezeptor-Subtypen-Dichte im menschlichem Gehirn</b>	<b>19</b>
2.3.	<b><i>In vivo</i> [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung im menschlichen Gehirn</b>	<b>19</b>
2.4.	<b>Vergleich der <i>in</i> und <i>ex vivo</i> DPN-Bindung</b>	<b>19</b>
<b>Kapitel 3</b>	<b><u>Material und Methoden</u></b>	<b><u>20</u></b>
3.1.	<b>Methodik der Rezeptor-Autoradiographie</b>	<b>20</b>
3.1.1.	Verwendete Gewebe	20
3.1.2.	Versuchsprotokoll der Rezeptor-Autoradiographie	21
3.1.3.	Auswertung der Rezeptor-Autoradiographie-Daten	22
3.2.	<b>Methodik der [<sup>11</sup>C]DPN-PET</b>	<b>24</b>
3.2.1.	Probanden	24
3.2.2.	[ <sup>11</sup> C]DPN-Synthese	24
3.2.3.	Versuchsprotokoll der [ <sup>11</sup> C]DPN-PET	24
3.2.4.	Auswertung der PET-Daten	26

<b>Kapitel 4</b>	<b><u>Ergebnisse</u></b>	<b><u>30</u></b>
4.1.	<b>Ergebnisse der post mortem Rezeptor-Autoradiographie</b>	<b>30</b>
4.1.1.	[ <sup>3</sup> H]DPN-Rezeptordichte	30
4.1.2.	Opiatrezeptor-Subtypen-Dichte	34
4.2.	<b>Ergebnisse der [<sup>11</sup>C]DPN-PET</b>	<b>37</b>
4.2.1.	[ <sup>11</sup> C]DPN-Bindung	37
4.2.2.	[ <sup>11</sup> C]DPN-Delivery	42
<b>Kapitel 5</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b><u>44</u></b>
5.1.	<b><i>Ex vivo</i> Rezeptor-Autoradiographie</b>	<b>44</b>
5.1.1.	[ <sup>3</sup> H]DPN-Rezeptor-Autoradiographie	44
5.1.1.1.	Anteriorer cingulärer Kortex und Schmerzmodulation	44
5.1.1.2.	Opiatrezeptor-Nachweis im Cerebellum	44
5.1.1.3.	Basalganglien	45
5.1.2.	Autoradiographie der Opiatrezeptor-Subtypen	45
5.1.3.	Opiatrezeptor-Selektivität von DPN	46
5.2.	<b><i>In vivo</i> Rezeptor-Autoradiographie (PET) mit [<sup>11</sup>C]DPN</b>	<b>47</b>
5.2.1.	Überblick über die [ <sup>11</sup> C]DPN-Bindung	47
5.2.2.	Okzipitaler Kortex und Referenz-Regionen-Modell	48
5.3.	<b>Gegenüberstellung der <i>in</i> und <i>ex vivo</i> DPN-Bindung</b>	<b>49</b>
5.3.1.	Opiatrezeptor-Internalisierung	50
5.3.2.	Endogener opioiderger Tonus	51
5.3.3.	Endogene Opioide im anterioren cingulären Kortex	53
5.3.4.	Bedeutung des endogenen Opioid-Tonus im anterioren cingulären Kortex	54
<b>Kapitel 6</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b><u>56</u></b>
<b>Kapitel 7</b>	<b><u>Quellenverzeichnis</u></b>	<b><u>58</u></b>
<b>Kapitel 8</b>	<b><u>Danksagung</u></b>	<b><u>68</u></b>

# Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abb. 1	Strukturformel von [ <sup>11</sup> C]DPN	1
Abb. 2	Modellstruktur des μ-OR	3
Abb. 3	Sättigungsanalyse bei der Rezeptor-Autoradiographie	7
Abb. 4	Proton-Zerfall mit Positronen-Emission und Annihilation	9
Abb. 5	Detektor-Element	9
Abb. 6	Anordnung der Detektor-Elemente um den Kopf	10
Abb. 7	Koinzidenzschaltung	10
Abb. 8	Fehlerquellen der Koinzidenz-Messung	12
Abb. 9	Spektralanalyse	14
Abb. 10	Zerebrale Kodierung von Schmerzschwelle, Unangenehmheit und Intensität des Schmerzes im Gyrus cinguli	18
Abb. 11	Autoradiographie der Standards	22
Abb. 12	Kalibrierungskurve	23
Abb. 13	ECAT EXACT Positronen-Emissions-Tomograph	25
Abb. 14	VOI's im Gyrus cinguli	27
Abb. 15	VOI-Analyse im Gyrus cinguli	28
Abb. 16	[ <sup>3</sup> H]DPN-Rezeptordichte	31
Abb. 17	Autoradiographie der [ <sup>3</sup> H]DPN-Rezeptordichte des Cerebellum's	32
Abb. 18	Autoradiographie der [ <sup>3</sup> H]DPN-Rezeptordichte des Okzipitalkortex	33
Abb. 19	μ-, δ- und κ-OR-Dichte	35
Abb. 20	μ-, δ- und κ-OR-Autoradiographie von Gyrus cinguli und Basalganglien	36
Abb. 21	[ <sup>11</sup> C]DPN-Bindung	38
Abb. 22	IRF <sub>60min</sub> -Bild auf Höhe des aaACC	39
Abb. 23	IRF <sub>60min</sub> -Bild auf Höhe des aACC	39
Abb. 24	IRF <sub>60min</sub> -Bild auf Höhe des pACC	40
Abb. 25	IRF <sub>60min</sub> -Bild auf Höhe des PCC	41
Abb. 26	IRF <sub>60min</sub> -Bild auf Höhe des Putamen's und Pallidum's	42
Abb. 27	[ <sup>11</sup> C]DPN-Delivery	42
Abb. 28	Summe der μ-, δ- und κ-OR-Subtypendichte	46
Abb. 29	Normierte <i>in</i> und <i>ex vivo</i> DPN-Bindung	52

## Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1	Demographische Daten der Spender	20
Tabelle 2	Grauwerte und Radioaktivität der Standards	22
Tabelle 3	VOI-Parameter der [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-PET	27
Tabelle 4	[ $^3\text{H}$ ]DPN-Rezeptordichte	31
Tabelle 5	ANOVA der regionenspezifischen [ $^3\text{H}$ ]DPN-Rezeptordichte	32
Tabelle 6	Regionenspezifische totale, unspezifische und spezifische [ $^3\text{H}$ ]DPN-Bindung	34
Tabelle 7	$\mu$ -, $\delta$ - und $\kappa$ -OR-Dichte	35
Tabelle 8	[ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung	37
Tabelle 9	ANOVA der regionenspezifischen [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung	38
Tabelle 10	ANOVA der regionenspezifischen [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Delivery	43

## Abkürzungen

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ACC</b>	Anteriorer cingulärer Kortex
<b>aaACC</b>	Rostraler Anteil des ACC
<b>aACC</b>	Mittlerer Anteil des ACC
<b>pACC</b>	Posteriorer Anteil des ACC
<b>ANOVA</b>	Analysis of Variance
<b>BA</b>	Brodman Areal
<b>B<sub>max</sub></b>	Maximale Bindung des Radioliganden (Maß der Rezeptordichte)
<b>CG</b>	Cingulate Gyrus / Gyrus cinguli
<b>CER</b>	Cerebellum
<b>DPN</b>	Diprenorphin
<b>fCx</b>	Frontaler Kortex (BA 6)
<b>IRF</b>	Impulse Response Function
<b>NC</b>	Nucleus caudatus
<b>OC</b>	Okzipitaler Kortex
<b>OR</b>	Opiatrezeptor
<b>PALL</b>	Pallidum
<b>PCC</b>	Posteriorer cingulärer Kortex
<b>PET</b>	Positronen-Emissions-Tomographie
<b>PUT</b>	Putamen
<b>RA</b>	Rezeptor-Autoradiographie
<b>rCBF</b>	Regionaler cerebraler Blutfluss
<b>ROI</b>	Region of Interest
<b>S.</b>	Seite
<b>SA</b>	Spektralanalyse
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>VD</b>	Verteilungsvolumen
<b>VOI</b>	Volume of Interest



# Kapitel 1 Einleitung

## 1.1. Der Opiatrezeptor-Antagonist Diprenorphin (DPN)

Mit der Liganden-Positronen-Emissions-Tomographie (PET) besteht die einzigartige Möglichkeit, die Expression von Rezeptoren im menschlichen Gehirn nicht-invasiv und *in vivo* zu untersuchen. Für die Darstellung von Opiatrezeptoren (OR) stehen verschiedene Liganden für den Einsatz in der PET zur Verfügung. Dabei ist zwischen OR-Agonisten (z.B. Carfentanil) und OR-Antagonisten (z.B. Diprenorphin (DPN), Naltrindol) mit unterschiedlicher Affinität zu den verschiedenen Subtypen der OR zu unterscheiden.

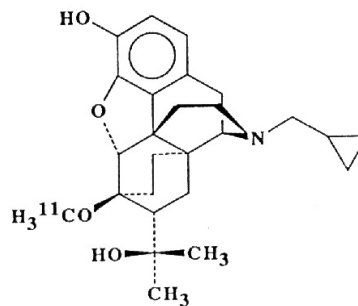


Abb. 1: Strukturformel von [<sup>11</sup>C]DPN

DPN gilt als nichtselektiver OR-Antagonist mit geringer intrinsischer Aktivität und bindet *in vitro* im subnanomolaren Bereich reversibel mit vergleichbarer Affinität an die OR-Subtypen  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\kappa$  (Wester 2000 S.1279). Für die Anwendung in der PET kann DPN mit den Isotopen [<sup>11</sup>C] (Halbwertszeit 20,4 Minuten) oder [<sup>18</sup>F] (Halbwertszeit 109,8 Minuten) markiert werden. Der Tracer [<sup>11</sup>C]DPN, dessen chemische Strukturformel in Abb. 1 dargestellt ist, lässt sich nach der Methodik von Luthra (1994 S.863-864) standardisiert synthetisieren. [<sup>18</sup>F]DPN erlaubt wegen der längeren Halbwertszeit längere und flexiblere Versuchs-Paradigmen für die Liganden-PET (Wester 2000 S.1285). Da DPN in der Liganden-PET nur in äußerst niedrigen Konzentrationen zur Anwendung kommt, wird es pharmakologisch nahezu nicht wirksam. Wegen seiner antagonistischen Eigenschaften bietet es zudem ein deutlich günstigeres Nebenwirkungsprofil als der ansonsten in der OR Liganden-PET häufig eingesetzte agonistische Ligand Carfentanil.

DPN steht auch für die *ex vivo* Rezeptor-Autoradiographie (RA) zur Verfügung (Young 1979 S.258). Zum Bindungsverhalten von DPN in *Säugetern* (Atweh 1977a S.54, Atweh 1977b S.2,

Atweh 1977c S.393, Pert 1976 S.3729) und im humanen ZNS liegen jedoch wenig oder keine systematischen *ex vivo* RA-Daten vor. Somit existiert trotz des breiten Einsatzes von DPN in der Liganden-PET keine Untersuchung, die die Grundlage der DPN-Bindung *in vivo* durch den methodischen Goldstandard einer *ex vivo* Autoradiographie evaluiert.

## 1.2. Opiatrezeptoren und Opiode

### 1.2.1. Opiatrezeptoren

Bereits 1954 wurde vermutet, dass Morphin seine analgetische Wirkung über einen spezifischen Rezeptor vermittelt (Beckett 1954, Abstract). Erst ein Vierteljahrhundert später gelang es OR nachzuweisen; dabei war die Existenz von endogenen Opioiden zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt (Pert 1973 S.1014, Simon 1973 S.1949, Terenius 1973 S.383). Der Nachweis von OR wurde mittels RA mit Radioliganden geführt, hiermit gelang auch die pharmakologische Subtypisierung des OR-Systems in  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -OR (Minami 1995 S.124-126).

Nach der erfolgreichen Klonierung der  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -OR bei Säugetieren und Menschen (Reisine 1995 S.464-465) konnte die Proteinstruktur der OR untersucht werden. OR sind membrangebundene  $G_{10}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren (Childers 1991 S.1992), die aus einem Protein mit sieben transmembranösen Domänen, drei extrazellulären und drei intrazellulären Schleifen (Abb. 2) in einer für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren klassischen dreidimensionalen Anordnung aufgebaut sind. Es bestehen nur geringe Homologien (< 30 %) zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Jordan 2000 S.6).

Die Aminosäuresequenz der geklonten OR-Subtypen stimmt in ca. 60 % überein, wobei die extrazellulären Domänen durch die höchste Variabilität mit nur 34 - 40 % Homologie charakterisiert sind. Dagegen beträgt die Homologie in der Aminosäuresequenz der sieben transmembranösen Domänen, die der Verankerung in der Zellmembran dienen, 73 - 76 % und in den intrazellulären Domänen 63 - 66 % (Minami 1995 S.123, Jordan 2000 S.6). Die Unterschiede der Aminosäuresequenz vermitteln die pharmakologischen Eigenschaften der OR-Subtypen.



### **1.2.2. Opioide und Schmerzerleben**

Synthetische Opioide sind in der klinischen Praxis von großem Nutzen; dabei sind v.a. die starke analgetische und antitussive Wirkung hervorzuheben. Zahlreiche Nebenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Atemdepression, Muskelrigidität, Hemmung der gastrointestinalen Motilität und das Abhängigkeitspotential neben einer euphorisierenden Wirkung müssen berücksichtigt werden.

Da OR eine weite Verbreitung im Gehirn aufweisen und Opioide aufgrund ihrer hohen analgetischen Potenz in der Schmerztherapie unabdingbar sind, wurde in den letzten Jahren intensiv daran gearbeitet, die Neuromatrix zu identifizieren, die für die analgetische Wirkung von Opioiden verantwortlich ist.

Dabei ist zu beachten, dass das Schmerzerleben so genannte affektiv-motivationale (z.B. subjektiv empfundene Unangenehmheit der noxischen Stimulation) und sensorisch-diskriminative Aspekte (z.B. Wahrnehmung der Lokalisation, Qualität und Intensität der noxischen Stimulation) (Weisenberg 1984 S.162, Hofbauer 2001 S.401, Sowards 2002 S.163) umfasst. Es konnte gezeigt werden, dass Opioide sowohl affektive (Price 1985 S.267, Drolet 2001 S.734, Price 1986 S.202) als auch sensorische (Price 1985 S.267, Price 1986 S.202, Gracely 1979 S.1262, Gracely 1982 S.754-755) Anteile des Schmerzerlebens lindern, wobei das genaue Ausmaß der Beeinflussung der jeweiligen Dimension von dem jeweiligen Studiendesign und der Opioid-Dosis abhängt.

### **1.2.3. Endogene Opioide und Opiatrezeptor-Aktivierung**

Endogene OR-Liganden wurden erstmals Mitte der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts entdeckt. Diese endogenen Opioide werden in drei Klassen mit unterschiedlicher Affinität für die OR-Subtypen eingeteilt:  $\beta$ -Endorphine, Enkephaline und Dynorphine (Jordan 2000 S.6).  $\beta$ -Endorphine binden hauptsächlich an  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptoren, während Enkephaline vor allem an  $\delta$ -Rezeptoren binden. Dynorphine interagieren hauptsächlich mit  $\kappa$ -OR. Zwei weitere endogene Opioide, Endomorphin-1 und -2, die nach heutigem Wissen die höchste  $\mu$ -OR-Affinität aller endogenen Opioide haben, sind erst kürzlich entdeckt worden (Zadina 1997 S.501, Horvath 2000 S.460).

Endogene Opioide sind Proteine, die aus den Vorläufer-Proteinen Proenkephalin (Enkephalin), Proopiomelanocortin (POMC) ( $\beta$ -Endorphin) und Prodynorphin (Dynorphin) enzymatisch abgespalten werden. Sie erfahren zudem eine Änderung der biologischen

Aktivität durch posttranslationelle Modifizierung, wodurch sich die oben erwähnten Opioid-Klassen weiter diversifizieren und das Wirkungsspektrum der endogenen Opiode ausgebaut wird.

Aus den Vorläufer-Proteinen können neben endogenen Opioiden auch andere Proteine abgespalten werden, die sich von den Opioiden in ihrer physiologischen Funktion unterscheiden. So entstehen durch die Spaltung von POMC u.a. die nicht-opioidergen Hormone ACTH und MSH. Für die relativ neuen endogenen Opiode Endomorphin-1 und -2 sind bisher noch keine Vorläuferproteine identifiziert worden.

Die zellulären pharmakodynamischen Auswirkungen der Rezeptorbindung von Opioiden sind vielfältig und konnten durch die Verfügbarkeit hochselektiver Opioid-Agonisten unter experimentellen Bedingungen an Zellen mit geklonten OR untersucht werden.  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioid-Agonisten inhibieren die Adenylatcyclase über die an die  $G_i$ -Proteine gekoppelten OR, sodass der intrazelluläre Second Messenger cAMP absinkt (Childers 1991 S.1992).

Die  $\mu$ - und  $\delta$ -OR-Aktivierung verursacht zudem eine erhöhte Leitfähigkeit von Kalium-Ionenkanälen. Die Folge ist eine Hyperpolarisierung und damit Inhibierung des Aufbaus eines Aktionspotentials (Knapp 1995 S.517), was zu einer Hemmung der neuronalen Transmission führt.

Zusätzlich wird über die OR-Aktivierung eine Minderung der Leitfähigkeit für Kalzium-Ionen erreicht, was zu einer Inhibierung der synaptischen Transmission führt (Knapp 1995 S.517). Es wird aber auch darüber berichtet, dass  $\kappa$ -Opiode in bestimmten Zelltypen die Leitfähigkeit der Kalzium-Ionen erhöhen können (Grudt 1993 S.11430).

## **1.3. Rezeptor-Autoradiographie**

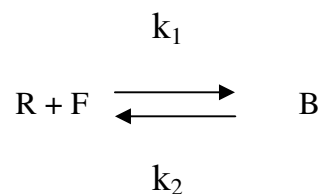
### **1.3.1. Prinzip der Rezeptor-Autoradiographie**

Das Ziel der RA ist, die *post mortem* Dichte des jeweiligen Rezeptor-Systems im menschlichen Gehirn zu charakterisieren. Hierzu lässt man Tritium ( $[^3\text{H}]$ ) -markierte Radioliganden sich an die interessierenden Rezeptoren in situ, also direkt auf Hirnschnitten, binden. Durch die  $[^3\text{H}]$ -Markierung ist anschließend eine Darstellung der Rezeptor-Expression und -Verteilung durch eine Film-Autoradiographie möglich. Es kommt dabei zu einer lokalen Belichtung der Silberbromidkristalle des Filmes durch die vom gebundenen Liganden abgegebene  $\beta$ -Strahlung. Nach anschließender Filmentwicklung erhält man ein Bild der Rezeptorexpression, das sowohl die Ortsinformation als auch über die Stärke der

Schwärzung eine quantitative Information enthält. Als digitalisierte Graustufenbilder können die Autoradiographien densitometriert (Kapitel 1.3.2.) und so die maximale spezifische Radioliganden-Bindung als Maß der *ex vivo* Rezeptordichte berechnet werden.

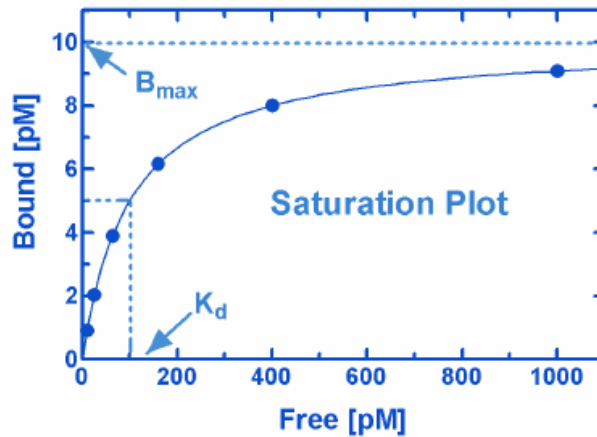
Der große Vorteil dieser Technik liegt in der sehr hohen räumlichen Auflösung, die eine genaue anatomisch-funktionelle Beurteilung der Rezeptor-Expression erlaubt. Dies ist mit der PET-Technologie nur eingeschränkt möglich ist. Zudem können hohe Radioliganden-Konzentrationen eingesetzt werden, die die komplette Sättigung aller Rezeptoren und somit die verlässliche Bestimmung der Rezeptordichte erlauben. Ein Nachteil der Methode ist der hohe Zeitaufwand der Filmbelichtung.

Im Weiteren soll auf die pharmakologischen Grundlagen der Rezeptor-Bindungsstudien eingegangen werden. Rezeptor-Bindungsstudien basieren auf einem Gleichgewicht zwischen der Menge des freien radioaktiv markierten Liganden (F) und der unbesetzten Rezeptoren (R) auf der einen Seite und dem gebildeten Liganden-Rezeptor-Komplex (B) auf der anderen Seite, wie die folgende Gleichung zeigt.



Der zu messende Parameter ist die Menge des an den Rezeptoren gebundenen radioaktiven Liganden.  $K_d$  bezeichnet die Konzentration des Liganden, die nötig ist, um 50 % der Rezeptoren zu besetzen.  $K_d$  ist ein Maß der Liganden-Affinität zu seinem Rezeptor und entspricht dem Verhältnis  $k_2/k_1$ .  $k_1$  ist die Assoziationskonstante und  $k_2$  die Dissoziationskonstante des Liganden-Rezeptor-Komplexes.  $B_{max}$  (Maximale Bindung) repräsentiert das Maß der Rezeptordichte im Gewebe und entspricht der Menge an Liganden-Rezeptor-Komplexen, wenn alle Rezeptoren durch Radioliganden besetzt sind.

$B_{max}$  wird in einer Sättigungsanalyse bestimmt. Hierbei werden Gehirnschnitte mit ansteigender Konzentrationen des Radioliganden inkubiert, bis die Radioliganden-Konzentration erreicht ist, bei der die Menge der Liganden-Rezeptor-Komplexe trotz zunehmender angebotener freier Radioliganden-Konzentration nicht mehr wesentlich ansteigt.



**Abb. 3: Sättigungsanalyse bei der Rezeptor-Autoradiographie**  
**Ermittlung der Sättigungskurve durch einzelne RA an Hirnschnitten mit ansteigender Radioliganden-Konzentration.  $B_{\max}$  ist erreicht, wenn die Graustufen der RA-Filme, die ein Maß für die gebundenen OR (Bound) darstellen, trotz zunehmender angebotener freier Radioliganden-Konzentration (Free) nicht mehr zunehmen.**

Die  $B_{\max}$  entsprechende Konzentration des angebotenen freien Radioliganden wird ermittelt, indem die digitalisierten RA mit ihren entsprechenden Grauwerten einer Densitometrie unterzogen werden. Somit resultiert eine Sättigungskurve (Abb. 3) in Form einer Hyperbel, wobei die Konzentration des gebundenen Liganden sich asymptotisch mit ansteigender Konzentration des freien angebotenen Radioliganden an den Wert  $B_{\max}$  nähert.

### 1.3.2. Densitometrie

Bei der Densitometrie wird den Graustufen der Filmbelichtung eine Strahlungsaktivität und damit Konzentration des spezifisch gebundenen Radioliganden zugeordnet. Voraussetzung ist die Erstellung einer Kalibrierungskurve.

Dafür benötigt man so genannte Standards. In der hier vorgelegten Arbeit wurden [ $^3\text{H}$ ]-markierte Plastikplättchen mit einer definierten Strahlungsaktivität (Einheit  $\mu\text{Ci/g}$  Standard) verwendet. Sie wurden in einer ansteigenden Strahlungsaktivitätsreihe auf einem Objektträger angeordnet und zusammen mit den markierten Hirnschnitten auf den RA-Film gelegt.

Die Standards (Einheit  $\mu\text{Ci/g}$  Plastikstandard) wurden in Vorversuchen auf die Einheit „fmol [ $^3\text{H}$ ] / mg Hirngewebe“ vorkalibriert. Hierfür wurde eine gestufte Konzentrationsreihe mit [ $^3\text{H}$ ]-markierten humanen Hirn-Homogenaten (fmol [ $^3\text{H}$ ] / mg Hirngewebe) - auch „Brain Paste“ genannt - erstellt, die in zylindrischer Form eingefroren und anschließend mit dem Kryotom geschnitten werden. Die Standards werden mit den „Brain Paste“-Schnitten auf dem RA-Film ko-exponiert. Nach definierter Expositionszeit werden die Filme nach dem

Entwicklungsprozess in Form von Graustufenbildern digitalisiert und die Graustufen der einzelnen Felder der „Brain Paste“ und der Standards gemessen. Jedem Grauwert der Standards kann nun nach Berechnung der Kalibrierungskurve eine Aktivität in „fmol [<sup>3</sup>H] / mg Hirngewebe“ - basierend auf der Messung der nicht haltbaren „Brain Paste“ - zugeordnet werden.

Im Hauptversuch wurden die markierten Hirnschnitte mit den Standards ko-exponiert. Bei Auswertung der digitalisierten RA-Filme wurde die Kalibrierung computergestützt mittels der Grauwerte der Standards, welche verschiedenen Aktivitäten in fmol [<sup>3</sup>H] / mg Hirngewebe der „Brain Paste“ entsprechen, durchgeführt. So kann schließlich die *spezifische Liganden-Bindung* jedes Hirnschnittes, die der *Rezeptordichte* entspricht, mit der Einheit „fmol [<sup>3</sup>H]-markierter Radioligand/mg Hirngewebe" quantifiziert werden.

## 1.4. Positronen-Emissions-Tomographie (PET)

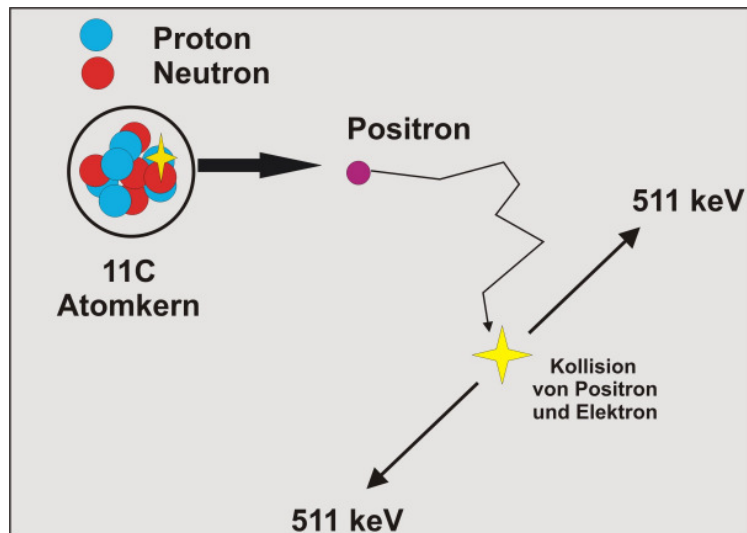
### 1.4.1. Grundlagen der PET

Mit der PET lassen sich zahlreiche physiologische zerebrale Prozesse bildlich darstellen und quantifizieren.

Hierfür werden in einem Zyklotron instabile Positronen-emittierende Radioisotope hergestellt. Anschließend wird durch Kopplung des Radioisotops an ein Trägermolekül ein so genannter Tracer synthetisiert. Es gibt eine Reihe von Radioisotopen (z.B. [<sup>11</sup>C], [<sup>13</sup>N], [<sup>15</sup>O] oder [<sup>18</sup>F]), die hierfür in Frage kommen und bei Koppelung an das Trägermolekül dessen physiologische Eigenschaften nicht verändern dürfen.

Die PET-Technologie beruht auf dem Nachweis des radioaktiven Zerfalls eines Protons im Atomkern eines instabilen Tracer-gebundenen Isotops. Dabei entstehen je ein Neutron, Positron und Neutrino. Das elektrisch neutrale Neutrino und das Positron, das ein positiv geladenes Elementarteilchen (e<sup>+</sup>) ist, verlassen den Atomkern, während das Neutron im Atomkern verbleibt. Während das massenlose Neutrino keine Wechselwirkung mit der Materie eingeht, kollidiert das emittierte Positron (e<sup>+</sup>) mit einem Elektron umliegender Atome und setzt bei der so genannten Annihilation eine Vernichtungsstrahlung mit zwei diametral divergierenden  $\gamma$ -Quanten (Energie von je 511 keV) frei (Abb. 4). Die  $\gamma$ -Quanten werden von gegenüberliegenden Detektoren des PET-Scanners als zeitlich koinzidentes Ereignis registriert.

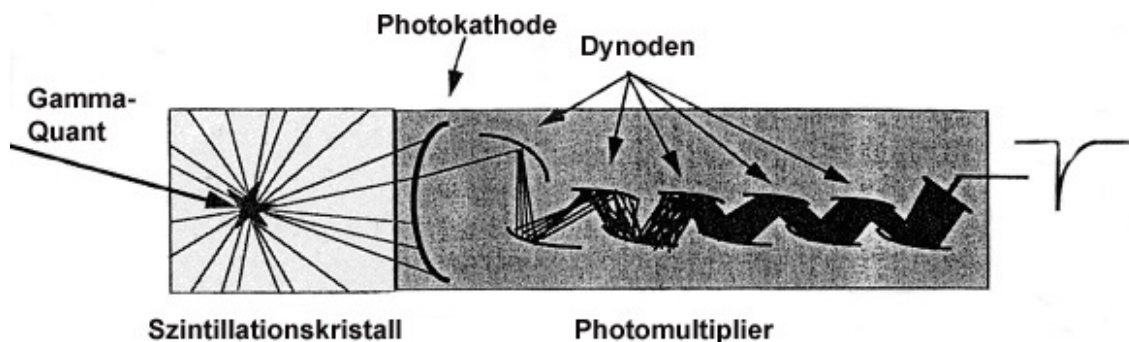




**Abb. 4:** Proton-Zerfall mit Positronen-Emission und Annihilation  
 Durch Kollision des emittierten Positrons mit einem Elektron eines benachbarten Atomkerns entsteht i.R. der Annihilation eine Vernichtungsstrahlung mit zwei divergierenden  $\gamma$ -Quanten.

### 1.4.2. Aufbau des PET-Scanners

Der Grundbaustein des PET-Scanners ist das Detektor-Element (Abb. 5), das aus Szintillationskristall, Photokathode und Photomultiplier besteht.

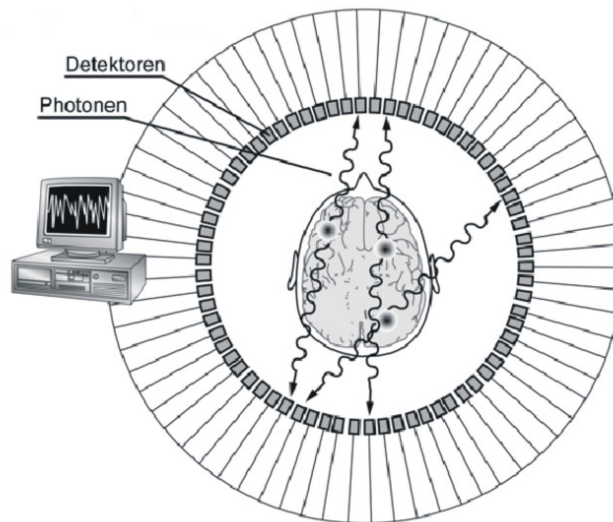


**Abb. 5:** Detektor-Element (nach Cherry 1996 S.197)

Im Szintillationskristall verursacht ein  $\gamma$ -Quant die Emission von Photonen. Diese Photonen können beim Auftreffen auf die Photokathode Elektronen freisetzen, die im gekoppelten Photomultiplier durch ein starkes elektrisches Feld beschleunigt werden.

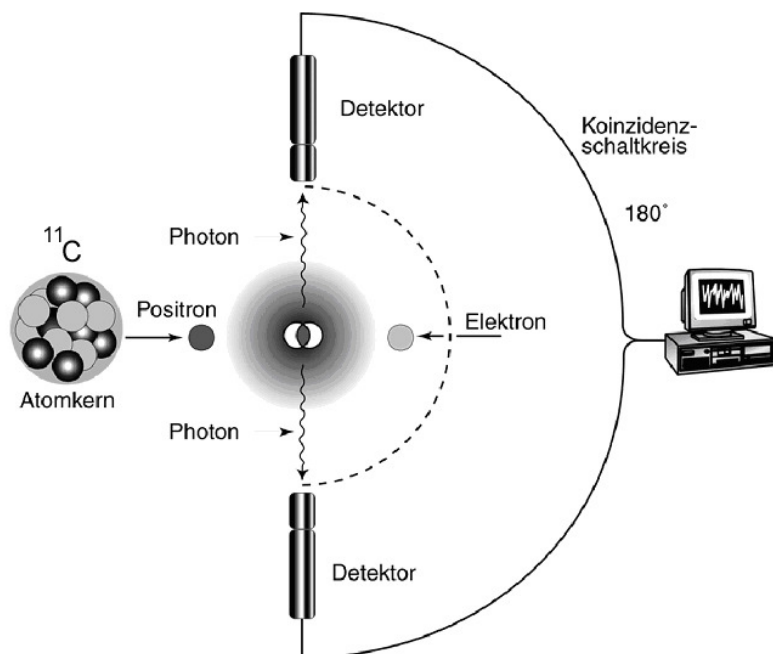
Beim Auftreffen der beschleunigten Elektronen auf die in Serie geschalteten Dynoden des Photomultipliers lösen sie wiederum mehrere Elektronen heraus. So wird jedes in der Photokathode freigesetzte Elektron am Ende des Photomultipliers ca. um den Faktor  $10^6$  vervielfacht, so dass das Ereignis letztendlich als Strompuls messbar wird.

Ein PET-Scanner setzt sich aus ringförmig angeordneten Detektor-Elementen zusammen (Abb. 6), die um die Patientenliege angeordnet sind. Es ist eine Vielzahl solcher Detektorringe parallel hintereinander angeordnet.



**Abb. 6: Anordnung der Detektor-Elemente um den Kopf**

Die Signaldetektion erfolgt in einer so genannten Koinzidenzschaltung (Abb. 7). Ein Stromsignal des einen Detektor-Elementes wird nur dann als Signal gewertet, wenn das zweite  $\gamma$ -Quant der Vernichtungsstrahlung innerhalb von  $10^{-9}$  Sekunden an dem gegenüberliegenden Detektor-Element auftrifft. Ist diese Bedingung erfüllt, so spricht man von einer Koinzidenz oder einem Count.



**Abb. 7: Koinzidenzschaltung**

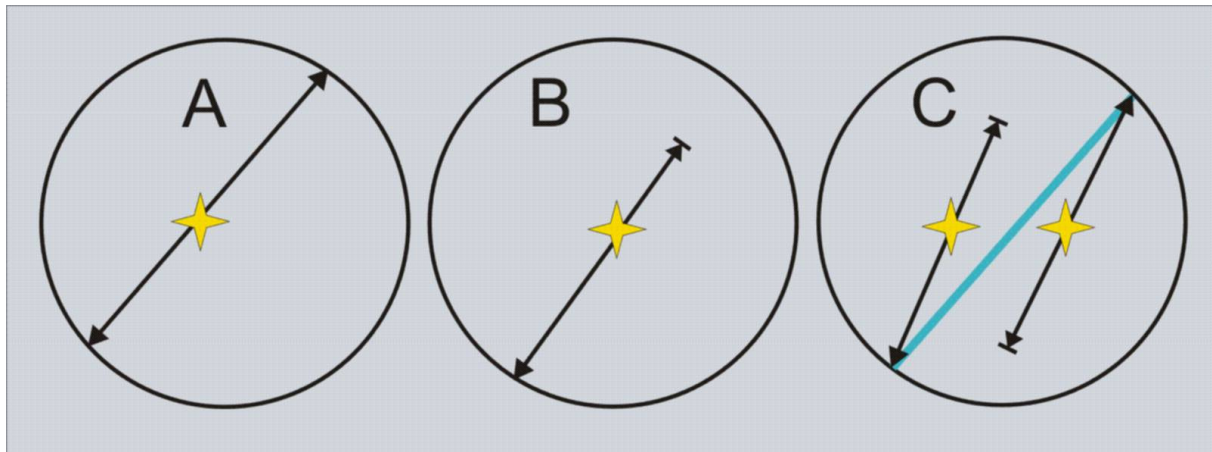
### 1.4.3. Radioliganden-Synthese

Ein Zyklotron besteht aus einer Ionenquelle, einem Hochfrequenz-Beschleunigungssystem und einem starken Magnetfeld. In dem Vakuumsystem des Zyklotrons werden negativ geladene Wasserstoffionen ( $H^-$ ) aus der zentral angebrachten Ionenquelle freigesetzt und in einer Spiralbahn durch das Magnetfeld beschleunigt, bis die erwünschte Energiestufe erreicht ist. Am Rand der Beschleunigungsspirale wird eine dünne Carbon-Folie durch die beschleunigten  $H^-$  bombardiert, wodurch Protonen freigeschlagen werden. Anschließend werden Atomkerne eines flüssigen oder gasförmigen Targets mit den Protonen beschossen, die das Zyklotron wegen des eingesetzten Magnetfeldes verlassen können. Dabei entstehen instabile Positronen-emittierende Isotope. In weiteren aufwendigen chemischen Syntheseschritten werden die Radioisotope mit den jeweiligen Trägermolekülen gekoppelt. So entsteht der Tracer, der dem Probanden intravenös appliziert werden kann.

### 1.4.4. PET-Datenakquisition

Gegenüberliegende Detektorpaare messen die Summe der Counts entlang der Koinzidenzlinien (Abb. 8A), also der Verbindungslinie der Detektorenpaare, nicht aber die genaue Lokalisation der Counts. Die Summe der gemessenen Counts entlang einer Koinzidenzlinie korreliert mit dem Linienintegral der Menge des gebundenen Radioliganden entlang dieser Koinzidenzlinie. Die durch die gesamten Detektor-Elemente gemessenen Rohdaten werden in einem Sinogramm abgebildet. Ein Sinogramm ist eine Datenstruktur, die die Anzahl der registrierten Counts in einem Diagramm speichert, an dessen x-Achse der Abstand der Koinzidenzlinie vom Zentrum des Ansichtsfeldes und an der deren y-Achse der Winkel  $\phi$  der Projektionslinie dargestellt wird (Cherry 1996 S.203). Durch Bildrekonstruktion werden die in Sinogrammen gespeicherten Daten in axiale Bilder des Gehirns konvertiert, welche die zerebrale Verteilung des Tracers abbilden. Bei diesem Vorgang müssen die im Folgenden beschriebenen wesentlichen Fehlerquellen herausgerechnet werden.

Das Hirngewebe und die Schädelkalotte resorbieren bis zu 80 % der bei der Annihilation entstandenen  $\gamma$ -Strahlen (Abb. 8B). Eine Korrektur dieses Fehlers ist erforderlich, da sich bei der Kalkulation der Bilder eine falsch niedrige Tracer-Bindung ergeben würde. Durch einen zehnminütigen Transmissionsscan mit einer um den Kopf des Probanden kreisenden Positronenquelle (Ranger 1989 S.1067) ermittelt man den individuellen Abschwächungskoeffizienten vor der Applikation des Tracers, so dass eine Korrektur mit dem Abschwächungskoeffizienten einfach durchgeführt werden kann.



**Abb. 8: Fehlerquellen der Koinzidenz-Messung**  
 Der PET-Scanner ist kreisförmig dargestellt  
 A Echte Koinzidenz mit richtiger Projektion der Koinzidenzlinie  
 B Resorption der Strahlung im Hirngewebe  
 C Zufällige Koinzidenz mit fehlerhafter Detektion der Koinzidenzlinie bei zwei gleichzeitig auftretenden Annihilationen  
Zeichenerklärung: Gelber Stern: Annihilation; Schwarzer Pfeil: Verlauf der  $\gamma$ -Quanten; Türkiser Strich: Fehlprojektion der Koinzidenzlinie

Akzidentelle Koinzidenzen werden gemessen, wenn zwei voneinander unabhängige  $\gamma$ -Quanten innerhalb des Koinzidenz-Zeitfensters auf die Detektoren treffen (Abb. 8C). Sie werden automatisch durch „Coincidence Window Technique“ des modernen PET-Scanners gemessen und subtrahiert (Cherry 1996 S.201).

Durch strukturelle Gegebenheiten des PET-Scanners müssen zwei weitere Einflussfaktoren berücksichtigt werden. Einerseits muss die leicht unterschiedliche Effizienz jedes einzelnen Detektor-Elementes durch Scannen einer gleichmäßig emittierenden Positronenquelle gemessen und korrigiert werden. Andererseits kann durch die Grenzen der Elektronik nicht jedes Ereignis aufgezeichnet werden, da das Registrieren einer Koinzidenz ein gewisses Zeitintervall – die so genannte Dead Time – in Anspruch nimmt. Man muss die Dead Time berücksichtigen, da in diesem Zeitraum eine bestimmte Anzahl von Counts, deren Größe abhängig von der Aktivitätsdosis ist, nicht registriert werden kann.

Werden alle Beeinflussungsgrößen durch mathematische Algorithmen berücksichtigt, ergibt sich ein Sinogramm-Datensatz, aus dem durch die gebräuchlichste Rekonstruktionsmethode der gefilterten Rückprojektion (Brooks 1976 S.710-713) axiale Gehirnbilder erstellt werden können. Hierbei werden die Counts eines Sinogramm-Elementes durch einen Filter entlang der Detektorpaar-Linien dargestellt. Die einzelnen Bildpunkte entstehen durch additive Überlagerung der Rückprojektionen. Dieser Filter ist in der Lage hohe Frequenzen zu unterdrücken, um Rauschartefakte zu tilgen, woraus sich aber eine Kontrastminderung ergibt

(Cherry 1996 S.13). Aus diesen Daten können durch verschiedene kinetische Modelling-Techniken parametrische Bilder für bestimmte Zeitpunkte errechnet werden.

#### **1.4.5. Quantitative kinetische Modelling-Techniken der Liganden-PET**

Es steht eine Reihe von quantitativen kinetischen Modelling-Techniken für die PET-Bildgebung zur Verfügung, welche vereinfacht in Modell- und Daten-orientierte Methoden eingeteilt werden.

##### **1.4.5.1. Spektralanalyse**

Die *Daten-orientierten* Methoden, wozu die Spektralanalyse (SA) gezählt wird, sind dadurch gekennzeichnet, dass sie a priori keiner Definition der Kompartiment-Struktur des zu untersuchenden Systems bedarf. Diese Information lässt sich aus den kinetischen Daten extrapolieren (Gunn 2002 S.2, Cunningham 1993S.15).

Die SA ist eine universell anwendbare und leicht durchzuführende Analysemethode. Sie kann mit jedem Tracer durchgeführt werden, ohne vorher entsprechende Kompartimente berücksichtigen zu müssen, in denen sich der Tracer verteilt.

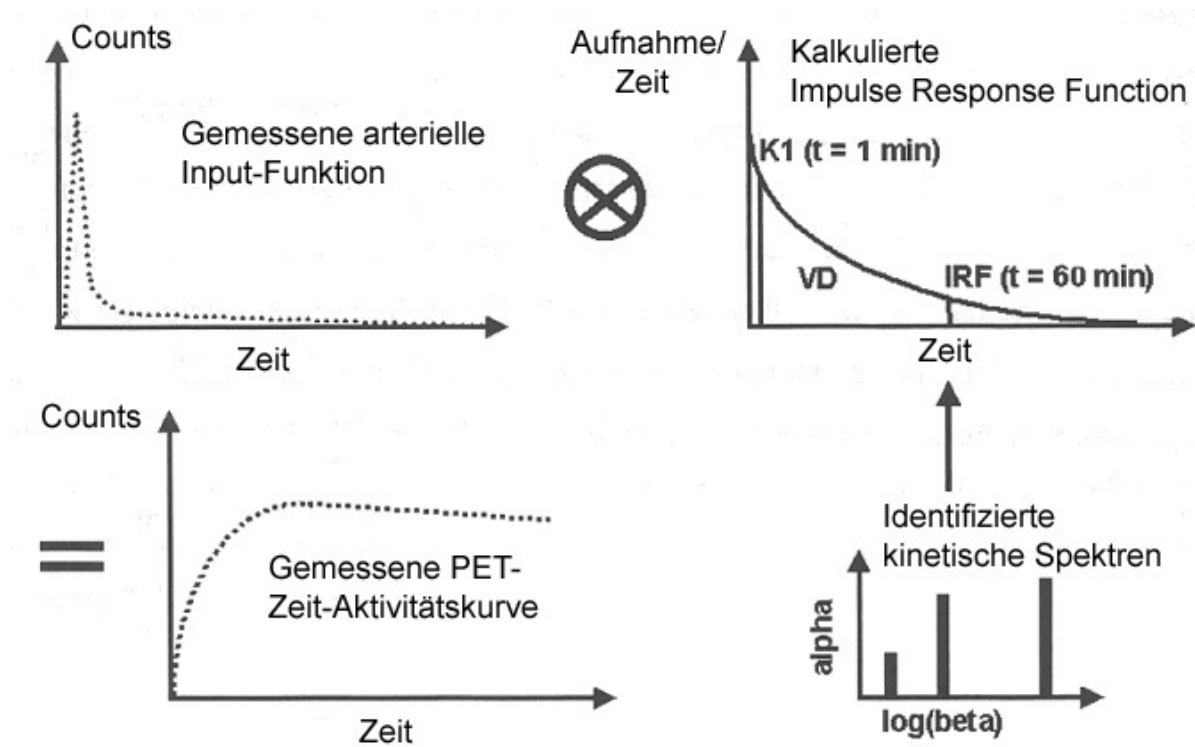
Zusammenfassend (Cunningham 1993 S.15), ohne genauer auf die mathematischen Grundlagen (Cunningham 1993 S.15-22) detailliert einzugehen, erzeugt die SA ein einfaches Spektrum kinetischer Komponenten, das die gemessene PET-Zeit-Aktivitätskurve des Gewebes in Beziehung zur gemessenen Blutaktivitätskurve (= arterielle Input-Funktion) setzt. Die arterielle Input-Funktion wird über zahlreiche arterielle Blutentnahmen an definierten Zeitpunkten ermittelt. Für einzelne Zeitpunkte lassen sich einzelne Spitzen im Spektrum kinetischer Komponenten (Abb. 9) extrahieren, wobei die intermediären Anteile des Spektrums mit der Anzahl reversibler Kompartimente des Gewebes und die niederfrequenten Anteile des Spektrums mit der irreversiblen OR-Bindung (Cunningham 1993 S.20-21) korrelieren (Abb. 9). Hochfrequente Anteile des Spektrums sind durch die Messung der Tracerkinetik in den Blutgefäßen bedingt.

Die Dekonvolution der gemessenen PET-Zeit-Aktivitätskurve und der arteriellen Inputfunktion ergibt die „Impulse Response Function“ (IRF) des Gewebes (Abb. 9). VD, das ein Maß zum Beispiel für die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung ist, errechnet sich aus dem Integral der IRF (Abb. 9). Da VD aufgrund der langsamen Kinetik und der begrenzten Untersuchungszeit bei

der [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-PET häufig unzureichend definiert ist, kann VD für einzelne Pixel teilweise nicht ermittelt werden. Somit sind die parametrischen Bilder des VD sehr rauschanfällig. Die Werte der  $\text{IRF}_{60\text{min}}$  korrelieren hochgradig mit VD (Weeks 1997 S.947), so dass auf die Werte der  $\text{IRF}_{60\text{min}}$  zur möglichst rauscharmen Darstellung der [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung zurückgegriffen werden kann.

Mittels SA kann auch die arterielle [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Anflutung – die so genannte Delivery – quantifiziert werden. Da die Werte der  $\text{IRF}_{0\text{min}}$  durch Rauschartefakte stark überstrahlt werden, wird der numerisch stabilere Wert  $\text{IRF}_{1\text{min}}$  verwendet, der mit der Blutflusskomponente  $K_1$  des Kompartimentmodells hoch korreliert und keine spezifische OR-Bindung widerspiegelt.

Durch die voxelbasierte SA kann jedem Voxel zu jedem Zeitpunkt ein Wert der Tracer-Rezeptor-Bindung bzw. -Delivery zugeordnet werden. Aus der Summe der Voxel erhält man parametrische, axiale 2D-Bilder, die nach weiterer Bildverarbeitung quantitativ ausgewertet werden können.



**Abb. 9:** Spektralanalyse  
Die Dekonvolution der gemessenen PET-Zeit-Aktivitätskurve mit der arteriellen Inputfunktion extrahiert die „Impulse Response Function“ des Gewebes. Das Integral der IRF ergibt das „Volume of Distribution“ (VD).

### 1.4.5.2. Kompartiment-Modell-Analyse

Bei der Liganden-PET ist die *Modell-orientierte* Kompartiment-Modell-Analyse eine mögliche Basis für die mathematische kinetische Modellierung des Tracerverhaltens im menschlichen Körper. Im Folgenden soll nur in Kürze auf das Prinzip der Kompartiment-Modell-Analyse eingegangen werden, ohne auf die mathematischen Grundlagen detailliert einzugehen, die von Gunn (2001 S.635ff.) ausführlich beschrieben wurden.

Die Kompartiment-Modell-Analyse bedarf einer a priori Definition eines spezifischen Modells der Kompartiment-Struktur, welche durch biochemische und physiologische Eigenschaften des Gewebes bestimmt wird und in der sich der Tracer im Zeitverlauf verteilt. Die Rezeptorbindung des Tracers lässt sich in Form des etablierten Bindungspotentials charakterisieren. Diese Methodik erfordert eine arterielle Plasma-Input-Funktion, für deren Berechnung der Aktivitätsverlauf im arteriellen Blut bekannt sein muss. Dieser Aktivitätsverlauf lässt sich aus zahlreichen Blutentnahmen über eine arterielle Nadel berechnen.

Für die Auswertung dynamischer Neurorezeptor-Liganden-PET-Studien mit der Kompartiment-Modell-Analyse wurde das „Referenz-Regionen-Modell“ entwickelt, das den Vorteil hat, auf eine arterielle Nadel, die mit einigen Risiken wie Nachblutung, Infektion und mögliche Okklusion der Arteria radialis behaftet sein kann, verzichten zu können. Die für die Berechnung des Bindungspotentials benötigte Plasma-Input-Funktion wird durch Verwendung der Aktivitäts-Funktion der Referenz-Region ersetzt. Die Schwierigkeit liegt darin, eine geeignete Referenz-Region zu identifizieren, die im Idealfall nur eine unspezifische Tracer-Bindung ohne spezifische Rezeptorbindung aufweisen darf. Man führt eine VOI-Analyse (s.a. Kapitel 3.2.4.) der Referenz-Region in den parametrischen PET-Bildern durch, um ein Maß der unspezifischen Bindung in Form des Verteilungsvolumens  $VD_r$  der Referenz-Region zu erhalten.

Gemäß der Gleichung  $BP = (VD - VD_r) / VD_r$  errechnet sich das Bindungspotential BP aus der Differenz des voxelbasierten VD der zu untersuchenden Hirnregion und des  $VD_r$  der Referenz-Region. Dieser Term wird anschließend durch den  $VD_r$  der Referenz-Region dividiert.

#### **1.4.6. Weitere Bildverarbeitung der PET-Bilder**

Nach Errechnung parametrischer Bilder mit der SA müssen die Bilddaten durch Koregistrierung und stereotaktische Normalisierung weiterverarbeitet werden, um eine adäquate statistische Auswertung zu ermöglichen.

Die Koregistrierung umfasst die transversale und koronare Rotationskorrektur und die exakte Zentrierung der Bilddatensätze. Dies wird notwendig, weil die Probanden während der Untersuchung nicht exakt die gleiche Position im PET-Sanner beibehalten können. Dadurch wird Deckungsgleichheit der individuellen parametrischen Bilder erzielt.

Das Ziel der stereotaktischen Normalisierung ist, die koregistrierten Abbildungen an das Koordinatensystem des Hirnmodells von Talairach und Tournoux (1988 S. 5-8) anzugleichen. Das dabei häufig angewandte Programm „NEUROSTAT“ erkennt automatisch bestimmte anatomische Strukturen des Gehirns, passt die individuellen Gegebenheiten und Abweichungen an ein normalisiertes Gehirn an.



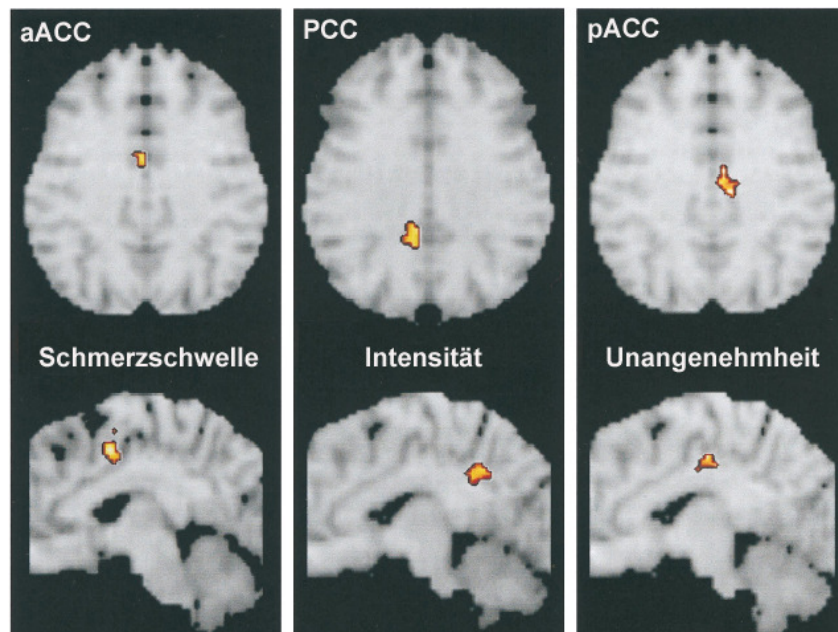
## Kapitel 2 Zielsetzung der Dissertation

### 2.1. *Ex vivo* [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte im menschlichen Gehirn

Zur *ex vivo* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung im zentralen Nervensystem von Nagern sind einige wenige RA-Studien veröffentlicht worden. Trotz der häufigen Anwendung von DPN für die Liganden-PET beim Menschen gibt es jedoch bisher keine *ex vivo* RA-Daten über die DPN-Bindung im menschlichen Gehirn. Nur diese lassen jedoch Rückschlüsse auf die OR-Dichte in verschiedenen Hirnregionen zu. Nachdem exemplarisch gezeigt werden konnte, dass sich die OR-Dichte zumindest in bestimmten Hirnregionen zwischen Nagern und Mensch (Schadrack 1999 S.624) unterscheiden kann, sind die Daten zur DPN-Bindung in Gehirnen von Tieren somit nicht unbedingt auf den Menschen übertragbar.

Mittels *post mortem* RA soll daher die maximale spezifische [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung – die [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte – im menschlichen Gehirn untersucht werden. Die Auswahl der untersuchten Hirnregionen orientiert sich zum einen an ihrer in der aktuellen Literatur diskutierten Bedeutung für die opioiderge Modulation der Schmerzverarbeitung:

Affektiv-emotionale und sensorisch-diskriminative Aspekte des Schmerzerlebens scheinen in verschiedenen Abschnitten des CG (aACC, pACC, PCC) verarbeitet zu werden; auch dem frontalen Kortex (fCx) kommt hier eine wesentliche Bedeutung zu. In einer [<sup>2</sup>H<sup>15</sup>O]PET-Studie wurde die Kodierung der Schmerzschwelle dem aACC (BA 24/32) und die der Schmerzintensität dem PCC (BA 23) zugeordnet (Tölle 1999 S.45) (Abb. 10). Die empfundene Unangenehmheit des Hitzeschmerzes dagegen korrelierte positiv mit der Aktivierung des pACC (BA 24) (Tölle 1999 S.45) (Abb. 10). Zubieta (2001 S.313-314) konnte zudem eine negative Korrelation zwischen der opioidergen Aktivierung im pACC (BA 24) und den Schmerz-bezogenen affektiven Bewertungen der Probanden nachweisen. Aus diesen Gründen wurden aACC, pACC, PCC und fCx (BA 6) in die Auswertung eingeschlossen.



**Abb. 10:** Zerebrale Kodierung von Schmerzschwelle, Unangenehmheit und Intensität des Schmerzes im Gyrus cinguli (nach Tölle 1999 S.44)  
Die rot-orangen Markierungen auf den cMRT-Bildern spiegeln rCBF-Aktivierungen wider, die mit der Kodierung der Schmerzschwelle (aACC), Intensität (PCC) und Unangenehmheit (pACC) korrelieren.

Basalganglien (NC, PUT, PALL) und Cerebellum (CER): Des Weiteren wurden für die Untersuchung der [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung NC, PUT und PALL ausgewählt. NC und PUT der Ratte haben eine hohe OR-Dichte. Es gibt Hinweise, dass die Basalganglien einen nozizeptiven Input (Chudler 1995 S.7-10) mit entsprechender Aktivierung ihres opioidergen Systems (Jones 1994 S.912) erhalten.

Im Gegensatz zur Ratte scheinen im menschlichen CER OR-Subtypen exprimiert zu werden (Schadrack 1999 S.624). Eine *in* und *ex vivo* Untersuchung des OR-Systems im humanen Cerebellum mit DPN steht derzeit aus.

Okzipitaler Kortex (OC): Bei der [<sup>11</sup>C]DPN-PET spielt der OC beim mathematischen Modellierung der OR-Bindung als Referenz-Region eine bedeutende Rolle. Bei PET-Studien mit [<sup>11</sup>C]DPN (Weeks 1997 S.944, Willoch 2004 S.215) oder [<sup>11</sup>C]Carfentanil (Zubieta 1999 S.843-844) wurde der okzipitale Kortex (OC) als Referenz-Region verwendet. Bisher geht man davon aus, dass der OC eine sehr geringe OR-Dichte und somit eine überwiegend unspezifische [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung aufweist (Piccini 1997 S.723); dies wurde jedoch bisher nicht konkret untersucht. Das Ausmaß der spezifischen und unspezifischen [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung *ex vivo* soll daher quantifiziert werden.

## 2.2. Opiatrezeptor-Subtypen-Dichte im menschlichem Gehirn

In einem zweiten Schritt soll mittels *post mortem* RA die Dichte der OR-Subtypen  $\mu$ ,  $\delta$  und  $\kappa$  in den gleichen humanen Hirnregionen wie in Kapitel 2.1. bestimmt werden. Ziel dieser Untersuchung ist es zu ermitteln, welche OR-Subtypen für eine DPN-Bindung zur Verfügung stehen. Hierfür kommen der  $\mu$ -OR-spezifische Ligand [ $^3\text{H}$ ]DAMGO, der  $\delta$ -OR-spezifische Ligand [ $^3\text{H}$ ]DPDPE und der  $\kappa$ -OR-spezifische Ligand [ $^3\text{H}$ ]U69,593 zur Anwendung.

## 2.3. *In vivo* [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung im menschlichen Gehirn

Durch Auswertung parametrischer  $\text{IRF}_{60\text{min}}$ - bzw.  $\text{IRF}_{1\text{min}}$ -Bilder der [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-PET soll die *in vivo* [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung und die arterielle Anflutung von [ $^{11}\text{C}$ ]DPN – die so genannte Delivery – in den gleichen Hirnregionen wie in Kapitel 2.1. quantifiziert werden.

## 2.4. Vergleich der *in* und *ex vivo* DPN-Bindung

Die Daten der *in vivo* [ $^{11}\text{C}$ ]DPN- (Kapitel 2.3.) und *ex vivo* [ $^3\text{H}$ ]DPN-Bindung (Kapitel 2.1.) im menschlichen Gehirn ermöglichen erstmals den direkten Vergleich der *in* und *ex vivo* OR-Bindung des gleichen OR-Liganden. Bisher belegt keine Untersuchung, dass sich die OR-Bindung eines OR-Liganden *in* und *ex vivo* gleicht.

## Kapitel 3 Material und Methoden

### 3.1. Methodik der Rezeptor-Autoradiographie

#### 3.1.1. Verwendete Gewebe

Bei insgesamt 6 Obduktionen, die zur gerichtsmedizinischen Todesursachenbestimmung durchgeführt wurden und die Präparation des Gehirns einschlossen, konnte Gewebe gewonnen werden. Die demographischen Daten (Alter, Geschlecht, post mortem Zeit bis zum Einfrieren des Gewebes und Todesursache) sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Gehirn	Alter (Jahre)	Geschlecht (M / F)	Post mortem Zeit (Stunden)	Todesursache
1	56	M	18,5	Pankreatitis
2	60	M	29,5	Kardiomyopathie
3	67	M	6	Rektum-Carcinom
4	82	F	18	Herzbeutelamponade
5	61	M	22	Lungenödem
6	58	M	7,8	Ertrinkungsunfall

Tabelle 1: Demographische Daten der Spender

Das Hirngewebe stammte von fünf männlichen und einer weiblichen Verstorbenen. Das mittlere Sterbealter betrug  $64 \pm 9,6$  Jahre (Median: 60,5 Jahre). Die mittlere post mortem Zeit bis zur Entnahme der Gehirne lag bei  $17 \pm 8$  Stunden und 50 Minuten.

Da zur Untersuchung der  $[^3\text{H}]\text{DPN-Rezeptordichte}$  von Gehirn 3 keine Basalganglien und vom Gehirn 4 kein OC zur Verfügung standen, wurden das Gehirn 3 von der  $[^3\text{H}]\text{DPN-ANOVA}$  Gruppenanalyse (Kapitel 3.1.3.) ausgeschlossen; der okzipitale Kortex wurde gesondert ausgewertet. Somit wurden 5 Gehirne in die Auswertung der  $[^3\text{H}]\text{DPN-Rezeptordichte}$  eingeschlossen.

Für die Untersuchung der *OR-Subtypen-Dichte* standen die Gehirne 1 bis 5 ( $n=5$ ), aber nicht das Gehirn 6 zur Verfügung. Das CER lag nur für die Gehirne 1-3 vor.

### 3.1.2. Versuchsprotokoll der Rezeptor-Autoradiographie

Repräsentative Gewebelöcke wurden präpariert und sofort auf Trockeneis gefroren. Für die RA wurde das Hirngewebe mit dem Kryotom „Reichert Jung Frigocut 2800 Cryostat“ in 20 µm dünne Schichten geschnitten, die anschließend nicht fixiert wurden. Zur genauen Ermittlung der Schnittebenen, die sich mit denen der [<sup>11</sup>C]DPN-PET gleichen sollten, wurde das Koordinatensystem von Talairach und Tournoux (1988 S.5-8) (Tabelle 3, Kapitel 3.2.4.) unter Berücksichtigung anatomischer Leitstrukturen angewandt.

Für die RA wurden die Gewebeschnitte über 15 Minuten bei Zimmertemperatur aufgetaut und getrocknet. In einem 50 mmol Tris-HCL Puffer (pH 7,4) wurden die Schnitte für 30 Minuten präinkubiert, um endogene Opiode aus den Schnitten herauszulösen. Die Schnitte wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur in einem Puffer (pH 7,4) mit dem jeweiligen Radioliganden inkubiert. Alle Liganden und Radioliganden wurden von NEN Perkin Elmer erworben.

Für die Messung der **totalen [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung** wurde eine Liganden-Konzentration von 2,5 nmol gewählt. Um die **totale Bindung** der **µ-, δ- und κ-spezifischen Liganden** an den Hirnschnitten zu ermitteln, wurde für die selektive µ-Bindung ein Versuchsansatz mit 4,2 nmol [<sup>3</sup>H]DAMGO ([D-Ala(2),MePhe(4),Gly-ol(5)]Enkephalin), für die selektive κ-Bindung ein Versuchsansatz mit 7,6 nmol [<sup>3</sup>H]U69,593 ((5-alpha,7-alpha,8-beta)-(+)-N-Methyl-N-[7-(1-Pyrrolidiny)-1-Oxaspiro(4,5)dec-8-yl]-Benzenacetamid) und für die selektive δ-Bindung ein Versuchsansatz mit 14,4 nmol [<sup>3</sup>H]DPDPE ((Tyrosyl-2,6-3H(N)-(2-D-Penicillamin-5-D-Penicillamin) Enkephalin) angewendet.

Nach der Inkubationsphase wurden die Schnitte zwei Minuten mit 50 mmol Tris-HCL Puffer bei 4 °C gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte über 15 Minuten bei 25 °C Warmluft getrocknet.

Die **unspezifische Bindung** der **µ-, δ- und κ-spezifischen Radioliganden** wurde ermittelt, indem zu dem oben beschriebenen Versuchsansatz zusätzlich ein 1000fach höherer Überschuss des jeweiligen nicht markierten Liganden zugefügt wurde, der den Radioliganden aus der spezifischen Bindung verdrängt: 2,5 µmol DPN, 4,2 µmol DAMGO, 7,6 µmol U69,593 oder 14,4 µmol DPDPE.

Die markierten Hirnschnitte und Densitometrie-Standards ART-123 (American Radiolabeled Chemicals, St. Louis) wurden auf dem RA-Film BIOMAX MR (Eastman Kodak, Rochester, NY) für 12 Wochen exponiert und anschließend entwickelt.

### 3.1.3. Auswertung der Rezeptor-Autoradiographie-Daten

Nach Entwicklung der RA-Filme wurden diese mit dem Scanner „Agfa SnapScan 1236“ als Graustufenbilder mit 256 Abstufungen und einer Auflösung von 600 dpi eingescannt. Die Densitometrie wurde mit der Software „Object Image“ durchgeführt.

Insgesamt standen 14 vorkalibrierte (wie unter 1.3.2. beschrieben) Standards mit definierter Strahlungsaktivität zur Verfügung. Für die Erstellung einer Kalibrierungskurve wurden die mittleren Grauwerte von zehn Standards (Abb. 11, Tabelle 2) mit ROI's gemessen. ROI ist die Abkürzung für „Region of Interest“, die aus einer Fläche einzelner Pixel gebildet wird. Die ROI's werden manuell mit entsprechender Software definiert.

Ein Standard mit geringem Grauwert wurde wegen Inhomogenität ausgeschlossen. Die drei Standards mit der höchsten Aktivität wurden aufgrund gleicher Grauwertstufen nicht in die Errechnung der Kalibrierungskurve (Abb. 12) einbezogen.

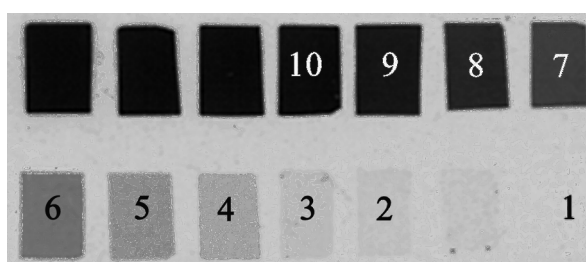
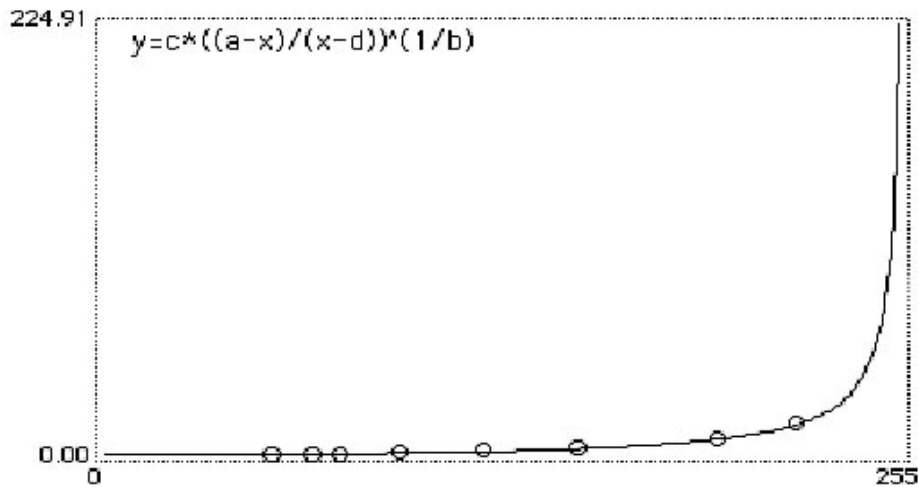


Abb. 11: Autoradiographie der Standards  
Die für die Berechnung der Kalibrierungskurve verwendeten Standards sind mit den Nummern 1 – 10 beschriftet.

Standard	Grauwerte	Radioaktivität ( $\mu\text{Ci/g}$ )
1	50	0,00
2	60	0,29
3	63	0,54
4	85	1,04
5	110	2,00
6	140	3,70
7	177	8,00
8	208	16,60
9	227	36,00
10	242	63,10

Tabelle 2: Grauwerte und Radioaktivität der Standards  
Die Nummerierung der einzelnen Standards bezieht sich auf die Abb. 11.



**Abb. 12: Kalibrierungskurve**  
 An der x-Achse sind die Graustufenwerte und an der y-Achse die korrelierende Strahlungsaktivität (fmol / mg) aufgetragen.

Die Kalibrierungskurve (Abb. 12) wurde aus den Grauwerten der Standards, welche verschiedenen Aktivitäten in fmol [<sup>3</sup>H] / mg Hirngewebe entsprechen, mit Hilfe der Rodbard-Funktion der Software „Object Image 2.08“ berechnet.

Die ROI-Analyse der digitalisierten [<sup>3</sup>H]DPN-RA-Filme erfolgte für die *totale* und *unspezifische [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung* getrennt. Die Differenz der Graustufenwerte der *totalen* und *unspezifischen [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung* ergibt für jede Hirnregion die *spezifische [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung*, die der *[<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte* entspricht. Aus der intraindividuellen *spezifischen [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte* wurden interindividuelle Mittelwerte berechnet. Analog wurden mit die μ-, δ- und κ-spezifischen RA ausgewertet.

Um die *[<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte* der Hirnregionen mit Ausnahme des OC (Kapitel 3.1.1.) auf signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde die „Repeated Measures ANOVA“ mit dem „Tukey-Kramer Multiple Comparison Test“ angewandt. Dabei kam das Biostatistikprogramm GraphPad PRISM® (GraphPad Software, San Diego, USA) zur Anwendung.

## **3.2. Methodik der [<sup>11</sup>C]DPN-PET**

### **3.2.1. Probanden**

Das Kollektiv bestand aus 10 männlichen rechtshändigen Probanden. Keiner der Probanden litt oder hatte jemals an einer manifesten neurologischen oder psychiatrischen Erkrankung gelitten; ein Drogenkonsum oder eine regelmäßige Analgetikaeinnahme ließen sich jeweils ausschließen. Das mittlere Alter betrug  $41 \pm 16,5$  Jahre (Median: 37,5 Jahre); der älteste Proband war 66 Jahre, der jüngste 22 Jahre. Zum Zeitpunkt der Untersuchung wurden keine Opiate eingenommen. Kein Proband litt unter einer ernsten internistischen Erkrankung oder chronischen Schmerzen.

### **3.2.2. [<sup>11</sup>C]DPN-Synthese**

In einem automatisierten Synthesesystem des Radioisotopenlabors der nuklearmedizinischen Abteilung des Klinikums München rechts der Isar wurde [6-O-Methyl-<sup>11</sup>C]DPN (Luthra 1994 S.858-864) – im Weiteren als [<sup>11</sup>C]DPN bezeichnet - aus der Vorstufe [3-O-trityl,6-O-desmethyl]DPN (ABX GmbH advanced biochemical compounds, Dresden, Germany) synthetisiert. Die dafür benötigten [<sup>11</sup>C]CO<sub>2</sub>-Moleküle wurden mit einem MRC Scanditronix MC 40 (Mark II) Cyclotron produziert.

Die Synthese liefert durchschnittlich 1,2 - 2,5 GBq [<sup>11</sup>C]DPN (Reinheitsgrad > 96 %) und eine spezifische Aktivität von 4 - 20 GBq/μmol kurz vor der Injektion, also ca. 40 - 50 Minuten nach Ende des Protonenbeschusses (Willoch 2004 S.214). Der Reinheitsgrad wird durch HPLC (high-pressure liquid chromatography) garantiert. Vor der i.v. Applikation wurde [<sup>11</sup>C]DPN-Dosis in 0,9 %iger NaCl-Lösung entsprechend verdünnt, gefiltert und mit Natriumbikarbonat gepuffert (pH 8) in ein steriles Fläschchen abgefüllt.

### **3.2.3. Versuchsprotokoll der [<sup>11</sup>C]DPN-PET**

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der Technischen Universität München genehmigt. Die i.v. Applikation von [<sup>11</sup>C]DPN wurde vom Bundesamt für Strahlenschutz zugelassen. Alle Probanden gaben nach eingehender schriftlicher und mündlicher Aufklärung über die Studie und die möglichen Komplikationen eine schriftliche Einverständniserklärung zur Studien-Teilnahme. Die PET-Studie dauerte jeweils 90 Minuten.



Alle PET Scans wurden in 2D-Mode mit einem ECAT EXACT Scanner (CTI, Knoxville TN, USA) (Abb. 13) aufgezeichnet, der aus 24 hintereinander parallel angeordneten Detektorringen zusammengesetzt ist.

Vor der [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Applikation (jeweils 370 MBq) wurde der Abschwächungskoeffizient durch einen zehnminütigen Transmissions-Scan mit einer um den Kopf des Probanden kreisenden, im PET-Scanner integrierten Positronen-Quelle ( $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ -Ring) bestimmt.



**Abb. 13:** ECAT EXACT Positronen-Emissions-Tomograph

Die so genannte arterielle Input-Funktion wurde parallel zum PET-Scan bestimmt. Hierfür wurde jedem Probanden unter Lokalanästhesie ein arterieller Zugang in die Arteria radialis durch einen erfahrenen Anästhesisten gelegt und aus diesem während des Scans sequenziell ca. 50 Blutproben („dynamisches arterielles Sampling“) entnommen.

Die arterielle Input-Funktion wurde zudem einer Metaboliten-Korrektur unterworfen. Nach Zugabe von nicht markiertem DPN, das das an Serumproteine gebundene [ $^{11}\text{C}$ ]DPN von der Eiweißbindung löst, erfolgte die Metabolitenbestimmung in 7 arteriellen Blutproben, die direkt sowie 2, 5, 10, 15, 25 und 45 Minuten nach [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Injektion (Bartenstein 1993 S.1296) abgenommen wurden. Aus diesen Werten wurde durch nicht-lineare Regressionsanalyse eine Metaboliten-Datei erstellt, die als Funktion der Rate des nicht-metabolisierten Tracers und der Zeit post injectionem in die Spektralanalyse einfließt.

Alle Daten-Sätze wurden durch eine gefilterte Back-Projektion mit einem ramp filter (cut-off 0,3 cycles / projection element) und 2D-Smoothing rekonstruiert, so dass sich eine Auflösung von ca. 10 mm ergibt.

Die Spektralanalyse sowie die weitere Bildverarbeitung wurden mit dem Programmkomplex „NEUROSTAT“ (Professor Satoshi Minoshima, MD, Division of Nuclear Medicine, PET/Cyclotron Facility Department of Internal Medicine, University of Michigan, U.S.A) und verschiedener hausinterner Computer-Routinen durchgeführt.

Letztendlich resultiert ein Datensatz mit definierter Voxelgröße von 2,25 mm und parametrischen  $IRF_{1min}$ - und  $IRF_{60min}$ -Bildern mit 60 axialen Ebenen in einer Matrix von 128 x 128 Pixel, die anschließend in sagittale bzw. koronare Ebenen konvertiert wurden.

### **3.2.4. Auswertung der PET-Daten**

Es wurde eine VOI-Analyse der parametrischen PET-Bilder ( $IRF_{60min}$  /  $IRF_{1min}$ ) durchgeführt. „VOI“ bedeutet „Volume of Interest“ und beschreibt ein definiertes Hirnvolumen. Dieses besteht aus der Summe der Voxel, die in planaren Schnitten die Fläche so genannter ROI's („Region of Interest“) bilden.

Unter Berücksichtigung des Koordinaten-Systems nach Talairach und Tournoux (1988 S.5-8), das die Grundlage der stereotaktischen Normalisierung der parametrischen PET-Bilder darstellt, wurden die ROI's manuell an dem normalisierten kranialen Magnetresonanztomographie-Gehirn des Programmkomplexes „NEUROSTAT“ mit einem Cursor markiert (Abb. 15 A). Dabei kam das Programm ECAT Imagetool 6.4 D (Siemens/CTI, Illinois, USA) zur Anwendung. Nach Definition der ROI's der rechten Hemisphäre wurden diese auf die linke gespiegelt, um eine identische Lokalisation der ROI's auf beiden Hemisphären zu garantieren. Anschließend wurden die ROI-Sätze der einzelnen Hirnregionen als VOI's abgespeichert. Die Maße und Koordinaten der VOI's am Beispiel des CG sind in Tabelle 3 und Abb. 14 aufgeführt.

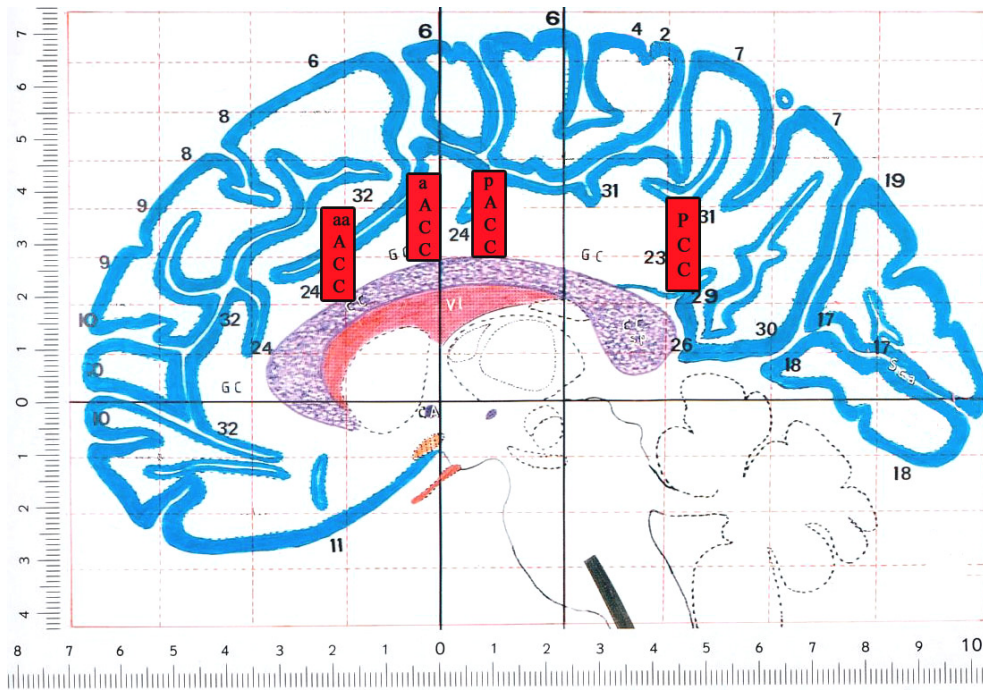


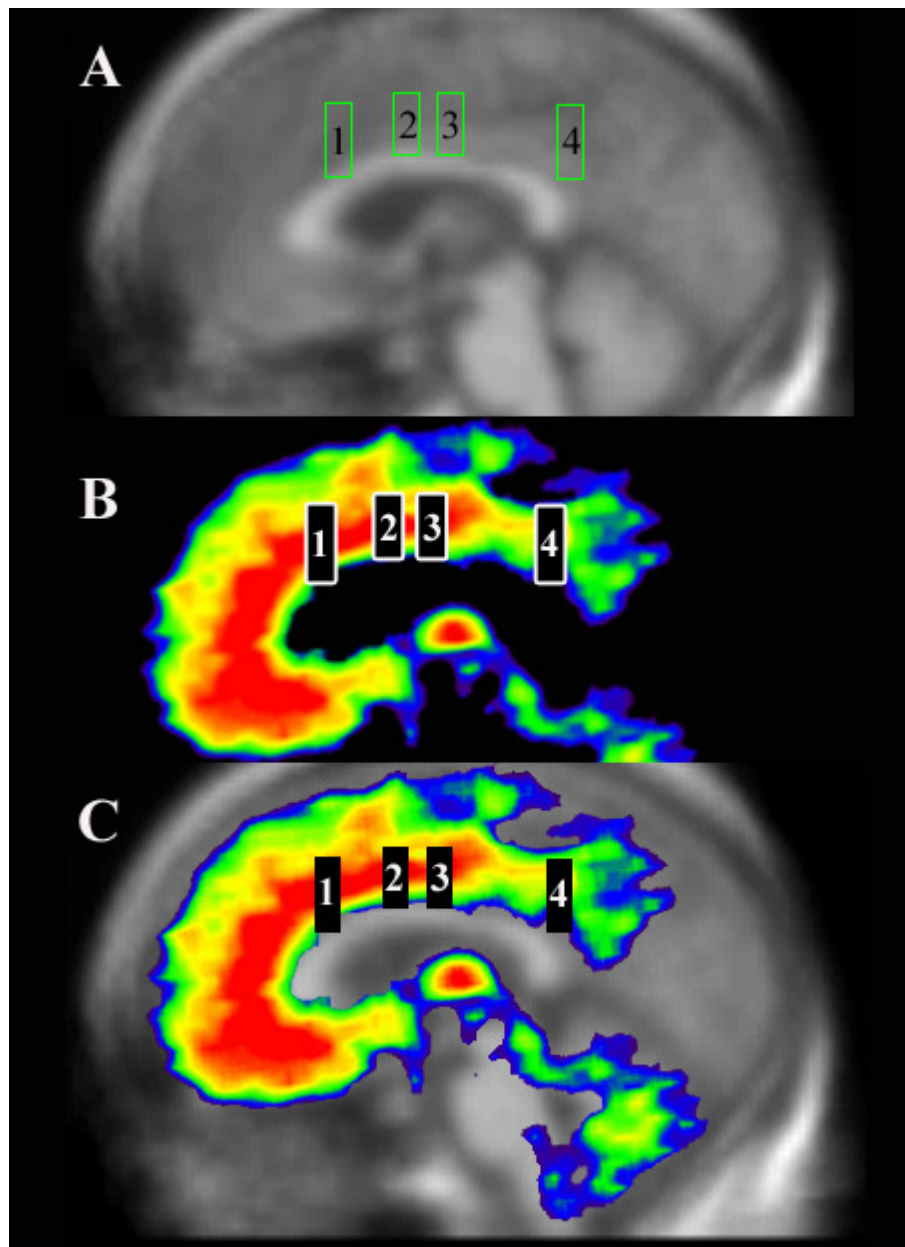
Abb. 14: VOI's (rot) im Gyrus cinguli (CG) (nach Talairach und Tournoux 1988 S.43)

Um die DPN-Bindung der  $[^{11}\text{C}]\text{DPN-PET}$  mit der der  $[^3\text{H}]\text{DPN-RA}$  vergleichen zu können, wurden die gleichen Koordinaten (Tabelle 3) für beide Methoden verwendet. Allerdings wurden bei der  $[^{11}\text{C}]\text{DPN-PET}$  je nach Größe der Struktur und unter Verwendung der reinen Zielkoordinaten nach Talairach und Tournoux (1988 S.5-8) mehrere ROIs gemessen, während bei der  $[^3\text{H}]\text{DPN-RA}$  die Definition nur jeweils einer ROI nach makro- und mikroskopischen Kriterien individuell erfolgte.

Region	Talairach-Koordinaten (x/y/z)	ROI's	ROI-Maße (cm)	Ebene
aaACC	$\pm 6 / 22 / 30$	3	1,8 x 0,5	koronar
aACC	$\pm 6 / 3 / 37$	3	1,5 x 0,5	koronar
pACC	$\pm 6 / - 9 / 37$	3	1,5 x 0,5	koronar
PCC	$\pm 8 / - 47 / 31$	3	1,8 x 0,5	koronar
NC	$\pm 7 / 9 / 10$	4	A.d.	koronar
PUT	$\pm 22 / 4 / 3$	7	A.d.	koronar
PALL	$\pm 14 / 0 / 1$	3	A.d.	koronar
fCx	$\pm 8 / 3 / 67$	3	1,0 x 0,5	koronar
CER	$\pm 25 / - 76 / - 32$	4	2,0 x 3,0	axial
OC	$\pm 20 / - 98 / 0$	3	0,5 x 2,0	sagittal

Tabelle 3: VOI-Parameter der  $[^{11}\text{C}]\text{DPN-PET}$  (A.d.: Anatomisch definiert)

Die ROI's wurden zunächst über die parametrischen  $IRF_{1min}$ -Bilder – ein Abbild der intravaskulären Tracer-Verteilung des Kortex bzw. der Basalganglien – projiziert, die den Vorteil haben, eine hohe anatomische Information zu beinhalten. Dies ist v.a. bei der VOI-Analyse der Basalganglien als Kontrolle der richtigen ROI-Lokalisation wichtig. Da die  $IRF_{60min}$ -Bilder eine geringe OR-Bindung im PALL aufweisen und somit das PALL kaum sichtbar ist, ist diese Prozedur sehr hilfreich. Nach diesem Vorgang konnten die ROI's auf die  $IRF_{60min}$ -Bilder übertragen werden (Abb. 15 B).



**Abb. 15:** VOI-Analyse im Gyrus cinguli  
**A:** ROI-Definition auf normiertem cMRT. Zur Veranschaulichung sind die VOI's in sagittaler Ausrichtung und nicht die ROI's in koronarer Ebene dargestellt.  
**B:** ROI-Projektion auf  $IRF_{60min}$ -Bild  
**C:** Overlay von normiertem cMRT und  $IRF_{60min}$ -Bild mit den ROI's

Unter Anwendung des Programms „MPI Tool“ (Max-Planck-Institut für neurologische Forschung, Köln) wurde zudem ein Overlay jedes normalisierten PET-Gehirns mit dem normalisierten kranialen Magnetresonanztomographie-Atlas nach Satoshi durchgeführt (Abb. 15 C), um zusätzlich eine visuelle Lagekontrolle neben der exakten Koordinaten-orientierten ROI-Lokalisation durchzuführen.

Aus der VOI-Analyse erhält man die seitengetrennte intraindividuelle [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung der VOI's. Nachdem der statistische Vergleich (T-Test) der intraindividuellen [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung der getrennten Seiten keinen signifikanten Unterschied erbrachte, wurde die intraindividuelle [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung seitengemittelt und anschließend die mittlere interindividuelle [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung errechnet. Die [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung wird als Bindungsaktivität (IRF) / Minute angegeben.

Um die [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung der Hirnregionen auf statistisch signifikante Unterschiede zu untersuchen, wurde das statistische Verfahren der „Repeated Measures ANOVA“ (Analysis of Variance) mit dem „Tukey-Kramer Multiple Comparison Test“ angewandt. Dabei kam das Biostatistikprogramm GraphPad PRISM® (GraphPad Software, San Diego, USA) zur Anwendung. Wie bei der [ $^3\text{H}$ ]DPN-RA (Kapitel 3.1.1.) wurde der OC aus der ANOVA-Analyse ausgeschlossen, um eine identische Statistik zwischen [ $^3\text{H}$ ]DPN-RA und [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-PET zu gewährleisten.

## Kapitel 4 Ergebnisse

### 4.1. Ergebnisse der post mortem Rezeptor-Autoradiographie

Im Folgenden sind die Ergebnisse der *post mortem* RA mit [<sup>3</sup>H]DPN, [<sup>3</sup>H]DAMGO, [<sup>3</sup>H]DPDPE und [<sup>3</sup>H]U69,593 zusammengefasst. Die Einheit ist „fmol gebundener Radioligand / mg Hirngewebe“ (fmol/mg).

#### 4.1.1. [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte

Die *spezifische [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung* der einzelnen Hirnregionen, im Weiteren als [<sup>3</sup>H]DPN-*Rezeptordichte* bezeichnet, ist in Tabelle 4 und Abb. 16 zusammengefasst. Mit dem Tukey-Kramer-Test der „Repeated Measures ANOVA“ wurden die einzelnen Hirnregionen auf signifikante Unterschiede untersucht (Tabelle 5).

Die höchste [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte aller ausgewerteten Hirnregionen zeigt sich im **aACC** mit 101,97±24,66 fmol/mg. Sie ist im Vergleich zum PCC (p<0,001), aber nicht zum pACC und fCx signifikant höher. Signifikante Unterschiede zeigen sich auch beim Vergleich der [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte des aACC mit NC (p<0,01), PUT, PALL bzw. CER (p<0,001).

Im **pACC** besteht eine [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte von 83,93±22,40 fmol/mg. Im Vergleich zum aACC, fCx, PUT bzw. NC ist kein signifikanter Unterschied zu ermitteln. Die [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte im pACC ist signifikant höher als im PCC (p<0,01), PALL (p<0,001) und CER (p<0,001).

Der **PCC** hat eine [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte von 50,47±13,16 fmol/mg. Sie ist signifikant geringer als im aACC (p<0,001) bzw. pACC (p<0,01). Die Unterschiede zwischen PCC und fCx, PALL bzw. CER sind ebenfalls signifikant (p < 0,05). Es bestehen keine signifikanten Unterschiede zwischen PCC und NC bzw. PUT.

Die [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte des **fCx** unterscheidet sich mit 78,11±15,17 fmol/mg nicht signifikant von aACC, pACC, NC bzw. PUT, aber von PCC (p<0,05), CER und PALL (p<0,001).

Die **Basalganglien** weisen in NC und PUT eine ähnliche [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte mit 65,14±7,82 bzw. 60,23±13,26 fmol/mg ohne statistisch signifikanten Unterschied auf. Das PALL (18,79±13,46 fmol/mg) hat zusammen mit dem CER die niedrigste [<sup>3</sup>H]DPN-

Rezeptordichte; diese ist signifikant niedriger ( $p < 0,001$ ) als die von PUT bzw. NC. NC und PUT haben im Vergleich zum aACC ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ) eine signifikant niedrigere [ $^3\text{H}$ ]DPN-Rezeptordichte. Beim Paarvergleich des NC bzw. des PUT mit dem pACC oder PCC ergeben sich keine signifikanten Unterschiede. Die übrigen ANOVA-Vergleiche der Basalganglien sind in Tabelle 5 dargestellt.

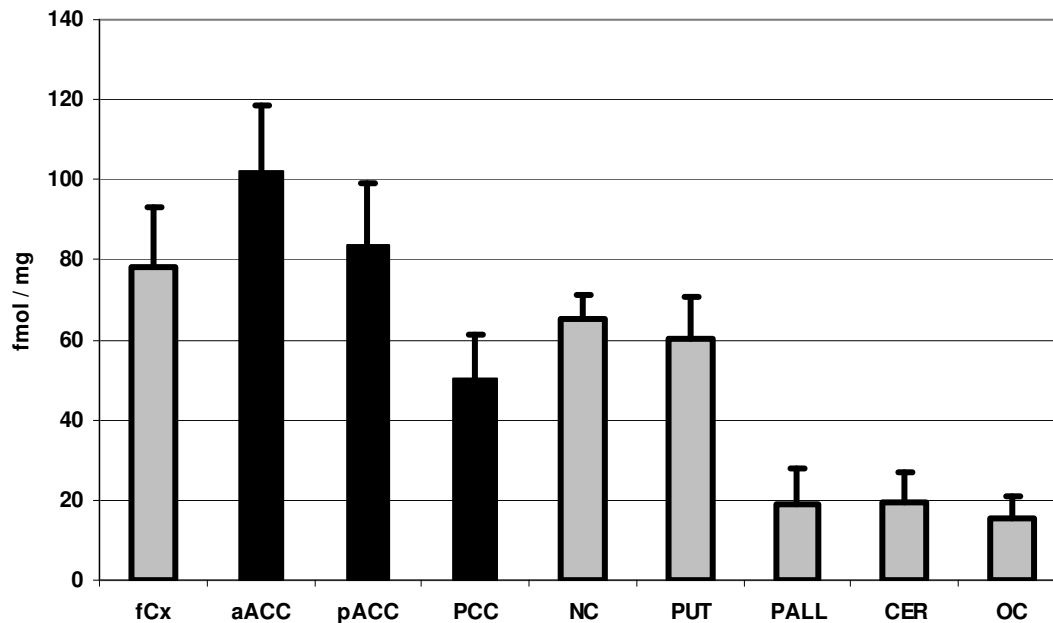


Abb. 16: [ $^3\text{H}$ ]DPN-Rezeptordichte mit Angabe des „Standard Error of MEAN“. Die drei CG-Ebenen sind schwarz gekennzeichnet.

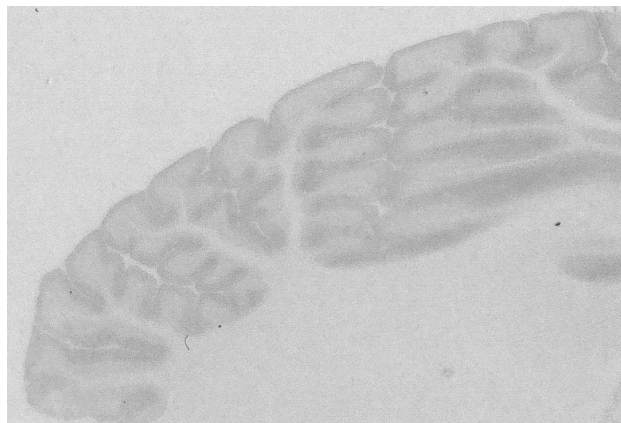
Region	Talairach-Koordinaten (x/y/z)	[ $^3\text{H}$ ]DPN-Rezeptordichte $\pm$ SD (fmol/mg)
aACC	$\pm 6 / 3 / 37$	$101,97 \pm 24,66$
pACC	$\pm 6 / - 9 / 37$	$83,93 \pm 22,40$
PCC	$\pm 8 / - 47 / 31$	$50,47 \pm 13,16$
fCx	$\pm 8 / 3 / 67$	$78,11 \pm 15,17$
NC	$\pm 7 / 9 / 10$	$65,14 \pm 7,82$
PUT	$\pm 22 / 4 / 3$	$60,23 \pm 13,26$
PALL	$\pm 14 / 0 / 1$	$18,79 \pm 13,46$
CER	$\pm 25 / - 76 / - 32$	$19,58 \pm 9,14$
OC	$\pm 20 / - 98 / 0$	$18,66 \pm 7,63$

Tabelle 4: [ $^3\text{H}$ ]DPN-Rezeptordichte

<b>ANOVA</b>	<b>aACC</b>							
<b>aACC</b>	-	<b>pACC</b>						
<b>pACC</b>	∅	-	<b>PCC</b>					
<b>PCC</b>	< 0,001	< 0,01	-	<b>fCx</b>				
<b>fCx</b>	∅	∅	< 0,05	-	<b>NC</b>			
<b>NC</b>	< 0,01	∅	∅	∅	-	<b>PUT</b>		
<b>PUT</b>	< 0,001	∅	∅	∅	∅	-	<b>PALL</b>	
<b>PALL</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	<b>CER</b>
<b>CER</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,001	∅	-

**Tabelle 5:** ANOVA der regionenspezifischen [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte  
 Es sind die p-Werte für jeden Paarvergleich aufgeführt; p-Werte < 0,05 zeigen statistisch signifikante Unterschiede an. ∅ bedeutet statistisch nicht signifikant.

Das **CER** (Abb. 17) (19,58±9,15 fmol/mg) weist zusammen mit dem PALL und OC die niedrigste [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte auf. Die [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte des CER ist im Vergleich zu allen analysierten Hirnregionen mit Ausnahme des PALL statistisch signifikant niedriger.



**Abb. 17:** Autoradiographie der [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte des Cerebellum's (CER)



Entsprechend der Zielsetzung der Arbeit (s.a. Kapitel 2.1.) erfolgt für den **OC** nicht nur die Angabe der *spezifischen* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung (= [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte, Abb. 18), sondern auch die Angabe der *totalen* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung und *unspezifischen* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung. Die *totale* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung im **OC** beträgt 25,31±9,65 fmol/mg und setzt sich aus einer *spezifischen* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung (= [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte) mit 18,66±7,63 fmol/mg und einer *unspezifischen* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung mit **6,65±10,62** fmol/mg zusammen. Die hohe Standardabweichung der *unspezifischen* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung im OC erklärt sich durch einen einzigen sehr hohen Wert der *unspezifischen* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung im Gehirn 2.

Nur 26,3 % der *totalen* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung im **OC** ist durch *unspezifische* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung bedingt, währenddessen 73,7 % der *totalen* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung auf eine *spezifische* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung (= [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte) zurückzuführen ist.



**Abb. 18:** Autoradiographie der [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte des Okzipitalkortex (OC)

Ergänzend zu den in diesem Kapitel aufgelisteten Daten sind in Tabelle 6 für alle untersuchten Regionen die *totale*, *unspezifische* und *spezifische* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung aufgelistet.

Regionen	Totale [ <sup>3</sup> H]DPN-Bindung	Unspezifische [ <sup>3</sup> H]DPN-Bindung	Spezifische [ <sup>3</sup> H]DPN-Bindung
aACC	104,09±24,37	2,12±0,61	101,97±47,11
pACC	86,01±22,53	2,08±0,57	83,93±13,16
PCC	52,84±13,15	2,37±1,07	50,47±13,16
fCx	80,23±16,30	2,12 ±1,29	78,11±22,22
NC	68,42±9,12	3,28±1,68	65,14±7,82
PUT	63,14±14,45	2,91±1,53	60,23±13,26
PALL	21,24±14,70	2,45±1,33	18,79±13,46
CER	21,12±9,18	1,54±0,24	19,58±9,14
OC	25,32±9,65	6,65±10,12	18,66±7,63

Tabelle 6: Regionenspezifische totale, unspezifische und spezifische [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung (Einheit: fmol/mg)

#### 4.1.2. Opiatrezeptor-Subtypen-Dichte

Die *spezifische Bindung* des  $\mu$ -spezifischen Liganden [<sup>3</sup>H]DAMGO, des  $\delta$ -spezifischen Liganden [<sup>3</sup>H]DPDPE und des  $\kappa$ -spezifischen Liganden [<sup>3</sup>H]JU69,593 in den einzelnen Hirnregionen, im Weiteren als  $\mu$ -,  $\delta$  oder  $\kappa$ -OR-Dichte bezeichnet, ist in Tabelle 7 und Abb. 19 zusammengefasst. In Abb. 20 sind die digitalisierten  $\mu$ -,  $\delta$ -, und  $\kappa$ -spezifischen RA des CG (aACC, pACC und PCC) und der Basalganglien abgebildet.

Im aACC beträgt die  $\mu$ -OR-Dichte 32,83±11,39, die  $\delta$ -OR-Dichte 28,20±11,75 und die  $\kappa$ -OR-Dichte 24,34±12,51 fmol/mg. Im pACC ist die  $\mu$ -OR-Dichte mit 38,69±12,50 fmol/mg und die  $\delta$ -OR-Dichte mit 47,13±15,46 fmol/mg höher als im aACC, währenddessen die  $\kappa$ -OR-Dichte mit 19,78±8,72 fmol/mg geringer als im aACC ist. Dagegen wurde im PCC eine geringere  $\mu$ -OR-Dichte mit 22,88±8,10 fmol/mg als im aACC und pACC gemessen. Die  $\delta$ -OR-Dichte im PCC war mit 32,68±17,10 fmol/mg höher als im aACC, aber deutlich niedriger als im pACC. Dagegen ließ sich im CG eine stetig nach dorsal abnehmende Dichte der  $\kappa$ -OR mit dem niedrigsten Bindungswert von 11,59±2,08 fmol/mg im PCC beobachten.

Im fCx ließ sich eine ähnliche  $\mu$ - ( $31,50 \pm 8,61$  fmol/mg) und  $\delta$ -OR-Dichte ( $25,77 \pm 4,96$  fmol/mg) wie im aACC messen. Die  $\kappa$ -OR-Dichte ist mit  $13,27 \pm 4,48$  fmol/mg geringer als im aACC.

Regionen	$\mu$ -OR-Dichte ([ <sup>3</sup> H]DAMGO)	$\delta$ -OR-Dichte ([ <sup>3</sup> H]DPDPE)	$\kappa$ -OR-Dichte ([ <sup>3</sup> H]U69,593)
aACC	$32,83 \pm 11,39$	$28,20 \pm 11,75$	$24,34 \pm 12,51$
pACC	$38,69 \pm 12,50$	$47,13 \pm 15,46$	$19,78 \pm 8,72$
PCC	$22,88 \pm 8,10$	$32,68 \pm 17,10$	$11,59 \pm 2,08$
fCx	$31,50 \pm 8,61$	$25,77 \pm 4,96$	$13,27 \pm 4,48$
NC	$23,32 \pm 10,74$	$10,20 \pm 4,74$	$4,61 \pm 2,23$
PUT	$16,65 \pm 7,81$	$11,85 \pm 2,48$	$5,32 \pm 1,95$
PALL	$5,15 \pm 3,56$	$2,60 \pm 1,10$	$5,58 \pm 1,74$
CER	$8,76 \pm 1,96$	$0,60 \pm 0,88$	$2,01 \pm 0,53$

Tabelle 7:  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -OR-Dichte (Einheit: fmol/mg)

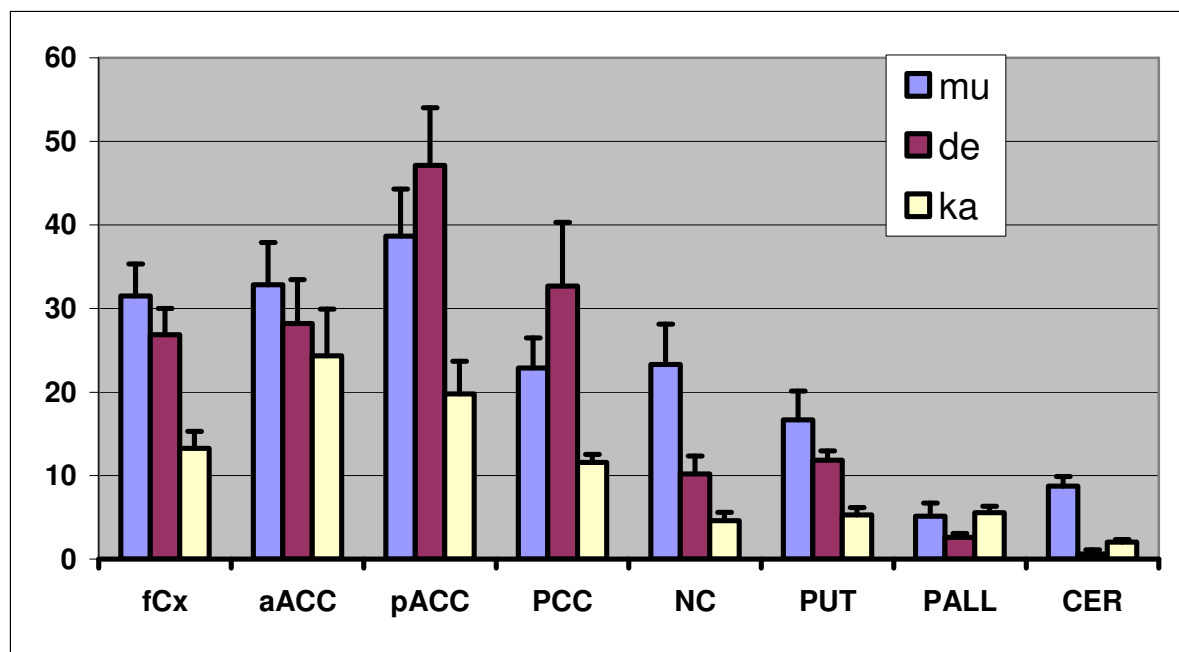
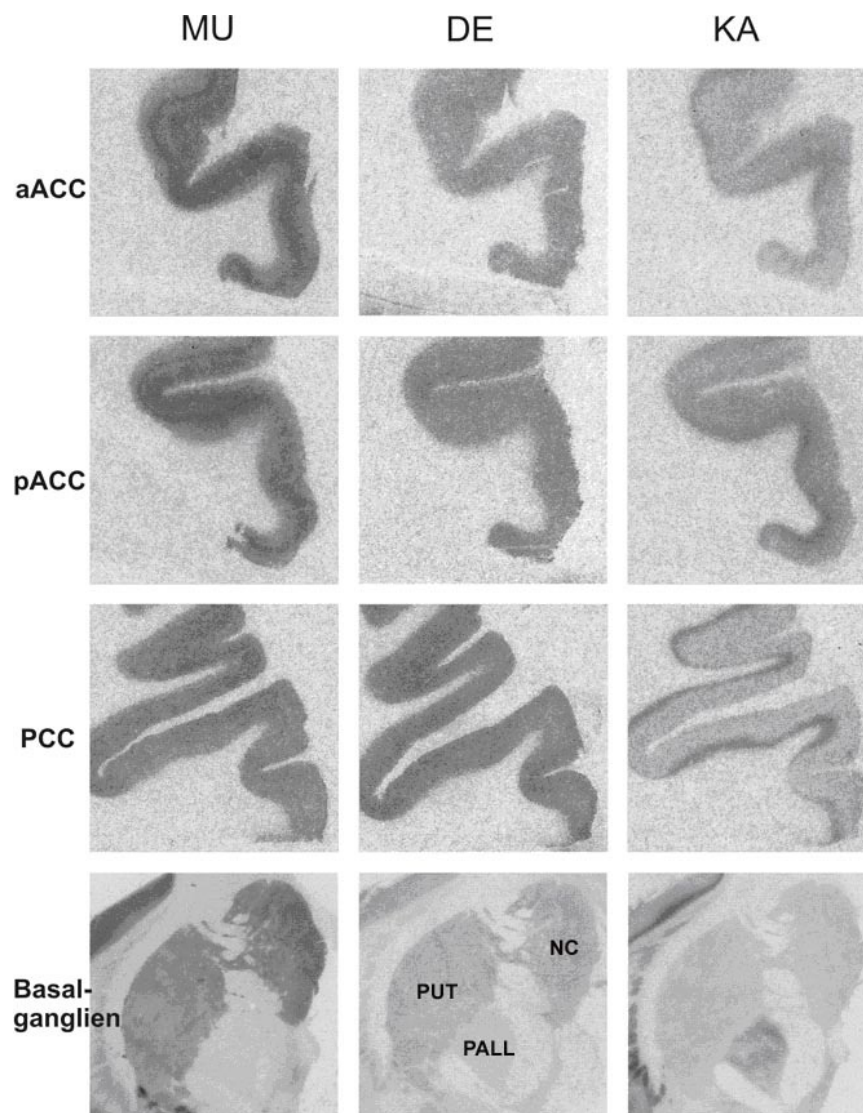


Abb. 19:  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -OR-Dichte (Einheit: fmol/mg) mit Angabe des „Standard Error of MEAN“

In den **Basalganglien** (Abb. 20) zeigte sich eine sehr differenzierte Verteilung der OR-Subtypen. Die  $\mu$ -OR-Dichte ist im NC  $23,32 \pm 10,74$  fmol/mg, im PUT  $16,65 \pm 7,81$  fmol/mg und im PALL nur  $5,15 \pm 3,56$  fmol/mg. Die  $\delta$ -OR-Dichte beträgt im NC  $10,20 \pm 4,74$  fmol/mg, im PUT  $11,85 \pm 2,48$  fmol/mg und im PALL nur  $2,60 \pm 1,10$  fmol/mg. Die  $\kappa$ -OR-Dichte ist mit  $4,61 \pm 2,23$  fmol/mg im NC,  $5,32 \pm 1,95$  fmol/mg im PUT und  $5,58 \pm 1,74$  fmol/mg im PALL relativ ausgeglichen.

Im **CER** betrug die  $\mu$ -OR-Dichte  $8,76 \pm 1,96$  fmol/mg; die  $\delta$ - ( $0,60 \pm 0,88$  fmol/mg) und  $\kappa$ -OR-Dichte ( $2,01 \pm 0,53$  fmol/mg) war sehr niedrig.

Aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der [ $^3$ H]DPN-Rezeptordichte- (Kapitel 4.1.1.) und OR-Subtypen-Dichte-Gruppen (Kapitel 4.1.2.) wurde auf eine ANOVA der regionenspezifischen OR-Subtypen-Dichte verzichtet (Kapitel 3.1.1.).



**Abb. 20:**  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -spezifische OR-Autoradiographie von Gyrus cinguli (CG) und Basalganglien

## 4.2. Ergebnisse der [<sup>11</sup>C]DPN-PET

### 4.2.1. [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung

Die *in vivo* [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung (Einheit: IRF<sub>60min</sub>/min) der einzelnen Hirnregionen ist in Tabelle 8 und Abb. 21 zusammengefasst. Mit dem Tukey-Kramer-Test der „Repeated Measures ANOVA“ wurden die einzelnen Hirnregionen auf signifikante Unterschiede untersucht (Tabelle 9).

Bei der Auswertung der *in vivo* [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung war es möglich, den anterioren CG differenziert in drei Abschnitten, dem rostralen (aaACC) und mittleren (aACC) und posterioren (pACC) Abschnitt, zu untersuchen. Dies war insofern von Interesse, als dem aaACC eine herausragende Funktion bei der Verarbeitung affektiver Komponenten des Schmerzerlebens zugeschrieben wird (Rainville 1997 S.970). So korreliert in der [<sup>18</sup>F]DPN-PET die opioiderge aaACC-Aktivierung unter Hitzeschmerz negativ mit subjektiven Bewertungen über die Unangenehmheit des Schmerzreizes (Sprenger 2004 S.3).

Regionen	Talairach-Koordinaten (x/y/z)	[ <sup>11</sup> C]DPN-Bindung ± SD
aaACC	± 6 / 22 / 30	0,142 ± 0,030
aACC	± 6 / 3 / 37	0,131 ± 0,031
pACC	± 6 / - 9 / 37	0,124 ± 0,032
PCC	± 8 / - 47 / 31	0,105 ± 0,032
fCx	± 8 / 3 / 67	0,126 ± 0,031
NC	± 7 / 9 / 10	0,150 ± 0,043
PUT	± 22 / 4 / 3	0,155 ± 0,045
PALL	± 14 / 0 / 1	0,125 ± 0,033
CER	± 25 / - 76 / - 32	0,080 ± 0,032
OC	± 20 / - 98 / 0	0,029 ± 0,012

Tabelle 8: [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung (Einheit: IRF<sub>60min</sub>/min)

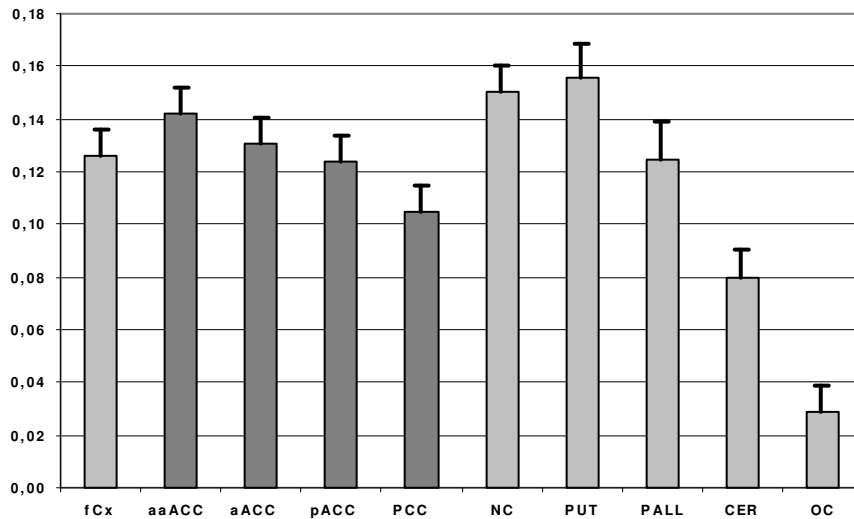
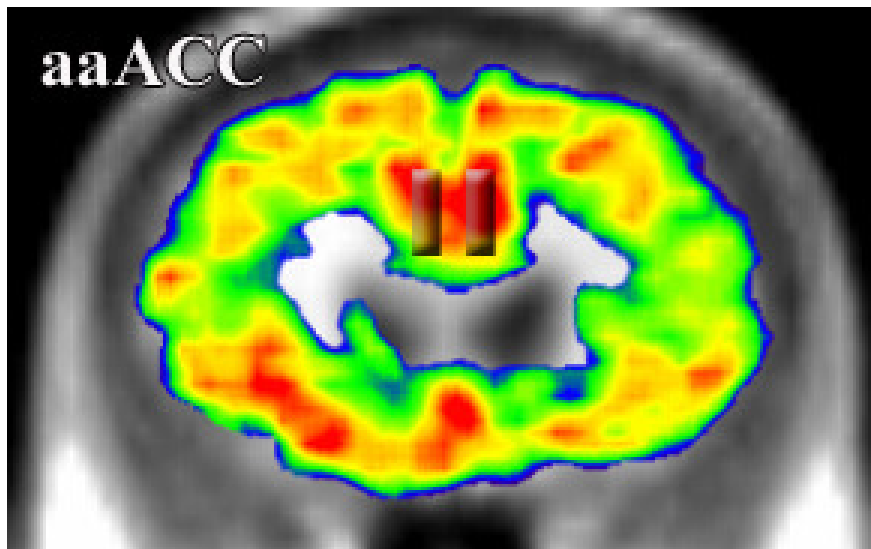


Abb. 21: [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung (Einheit: IRF<sub>60min</sub>/min) mit Angabe des „Standard Error of MEAN“. Die CG-Regionen sind als dunkelgraue Balken eingezeichnet.

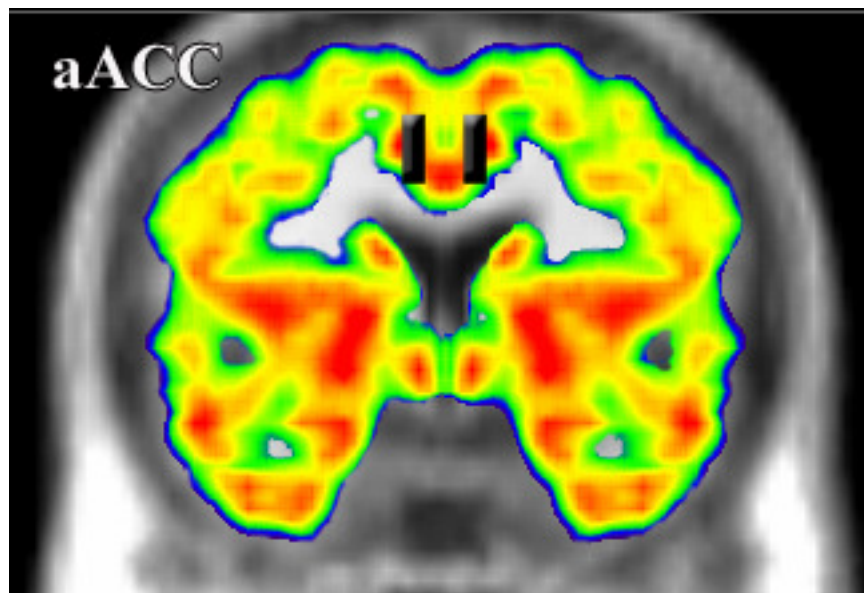
ANOVA	aaACC									
aaACC	-	aACC								
aACC	∅	-	pACC							
pACC	< 0,05	∅	-	PCC						
PCC	< 0,001	< 0,001	< 0,05	-	fCx					
fCx	∅	∅	∅	< 0,01	-	NC				
NC	∅	< 0,05	< 0,001	< 0,001	< 0,01	-	PUT			
PUT	∅	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	∅	-	PALL		
PALL	∅	∅	∅	< 0,05	∅	< 0,001	< 0,001	-	CER	
CER	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	

Tabelle 9: ANOVA der regionenspezifischen [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung  
Es sind die p-Werte für jeden Paarvergleich aufgeführt; p-Werte < 0,05 zeigen statistisch signifikante Unterschiede an. ∅ bedeutet statistisch nicht signifikant.

Der **aaACC** (Abb. 22) hat eine [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung von  $0,142 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ . Sie ist im Vergleich zum PCC ( $p < 0,001$ ), pACC ( $p < 0,05$ ) und Cerebellum ( $p < 0,001$ ) signifikant höher. Keine signifikanten Unterschiede bestehen zwischen aaACC und den folgenden Hirnregionen: aACC, NC, PUT, PALL und fCx.



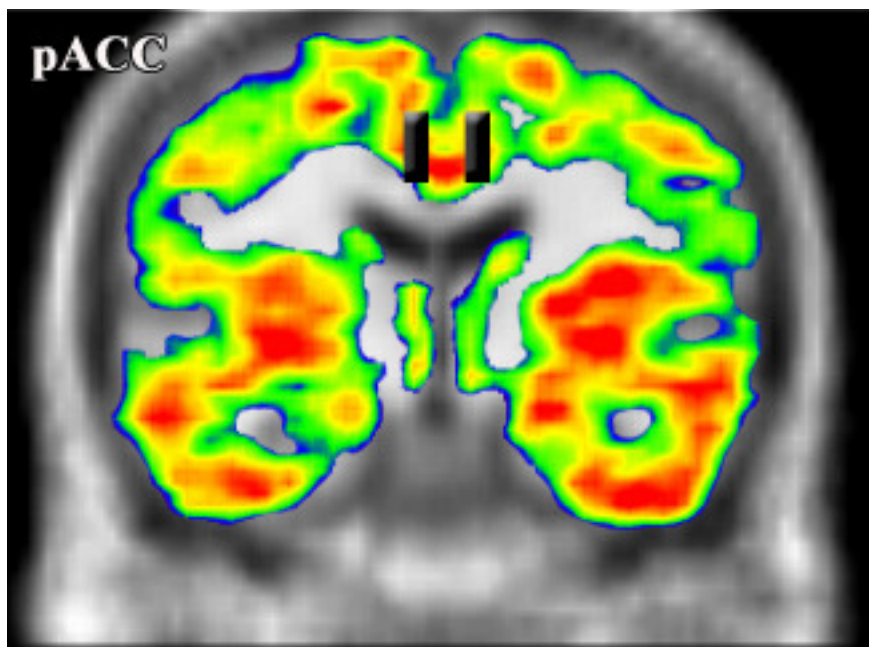
**Abb. 22:** IRF<sub>60min</sub>-Bild auf Höhe des aaACC  
Die ROI's des aaACC sind rechteckig eingezeichnet.



**Abb. 23:** IRF<sub>60min</sub>-Bild auf Höhe des aACC  
Die ROI's des aACC sind rechteckig eingezeichnet.

Im **aACC** (Abb. 23) beträgt die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung  $0,131 \pm 0,031 \text{ min}^{-1}$ . Sie ist signifikant höher als im PCC bzw. CER ( $p < 0,001$ ). Im aACC wurde eine signifikant niedrigere [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung als im NC ( $p < 0,05$ ) und PUT ( $p < 0,001$ ) gemessen. Keine signifikanten Unterschiede bestehen zwischen aACC und den folgenden Regionen: aaACC, pACC, PALL und fCx.

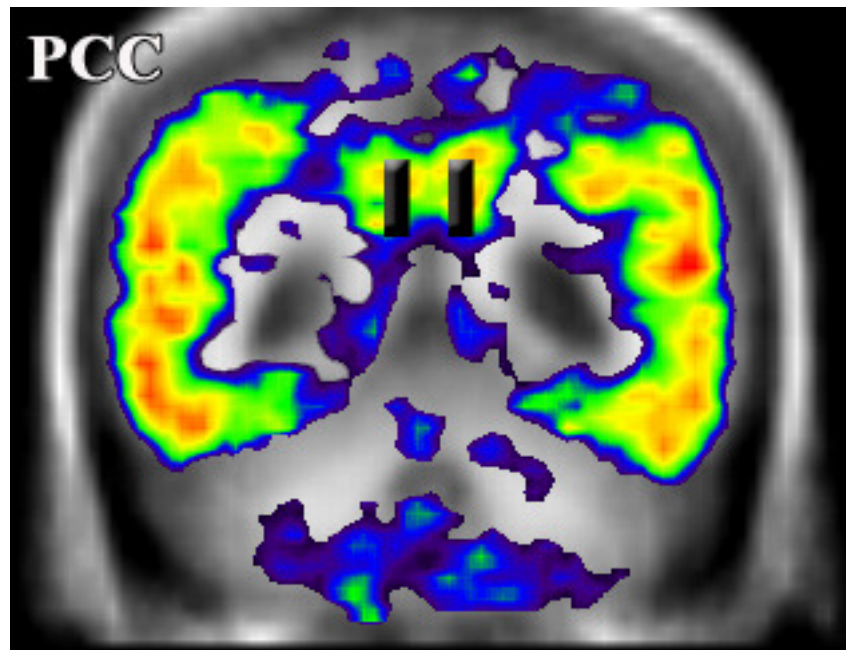
Der **pACC** (Abb. 24) weist eine [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung von  $0,124 \pm 0,032 \text{ min}^{-1}$  auf. Sie ist signifikant höher als im PCC ( $p < 0,05$ ) und CER ( $p < 0,001$ ). Im aaACC ( $p < 0,05$ ), NC ( $p < 0,001$ ) und PUT ( $p < 0,001$ ) besteht eine signifikant höhere [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung als im pACC. Die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung des pACC unterscheidet sich nicht signifikant von aACC, PALL bzw. und fCx.



**Abb. 24:** IRF<sub>60min</sub>-Bild auf Höhe des pACC  
Die ROI's des pACC sind rechteckig eingezeichnet.

Die niedrigste [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung innerhalb des CG wurde für das **PCC** (Abb. 25) mit  $0,105 \pm 0,032 \text{ min}^{-1}$  nachgewiesen. Sie ist signifikant niedriger als im aaACC, aACC, NC und PUT (jeweils  $p < 0,001$ ), pACC ( $p < 0,05$ ) und fCx ( $p < 0,01$ ). Die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung im PCC ist signifikant höher als im CER ( $p < 0,001$ ).





**Abb. 25:** IRF<sub>60min</sub>-Bild auf Höhe des PCC  
Die ROI's des PCC sind rechteckig eingezeichnet.

Im **fCx** beträgt die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung  $0,126 \pm 0,031 \text{ min}^{-1}$ . Sie ist signifikant höher als im CER ( $p < 0,001$ ) und PCC ( $p < 0,01$ ), jedoch signifikant niedriger als im PUT ( $p < 0,001$ ) und NC ( $p < 0,01$ ). Keine signifikanten Unterschiede ergeben sich beim Vergleich des fCx mit aaACC, aACC, pACC bzw. PALL.

Im Striatum (Abb. 26) wurde die höchste [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung aller ausgewerteten Hirnareale nachgewiesen:  $0,155 \pm 0,045 \text{ min}^{-1}$  im **PUT** und  $0,150 \pm 0,043 \text{ min}^{-1}$  im **NC**. Im **PALL** wurde eine geringere [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung von  $0,125 \pm 0,033 \text{ min}^{-1}$  ermittelt. Die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung im NC und PUT ( $p < 0,001$ ) ist signifikant höher als im PALL. Die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung von PUT und NC unterscheidet sich nicht signifikant voneinander.

Das **CER** hat die signifikant niedrigste [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung mit  $0,080 \pm 0,032 \text{ min}^{-1}$  ( $p < 0,001$ ).

Die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung im **OC** beträgt  $0,029 \pm 0,012 \text{ min}^{-1}$ . Wie in Kapitel 3.1.1. beschrieben, wurde der OC nicht in die ANOVA-Auswertung eingeschlossen.

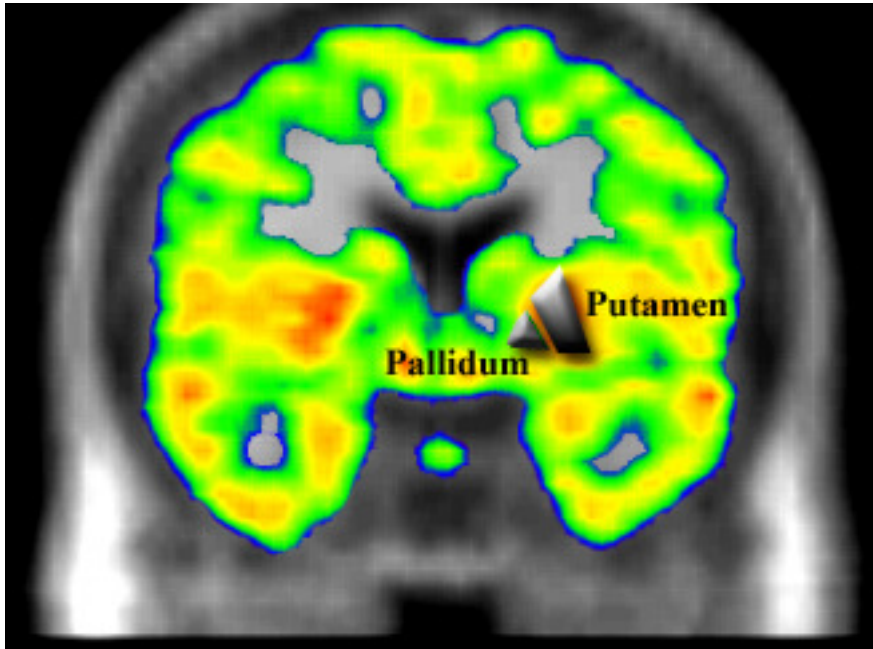


Abb. 26:  $IRF_{60min}$ -Bild auf Höhe des Putamen's und Pallidum's  
Die ROI's für das Putamen und Pallidum sind grau eingezeichnet.

#### 4.2.2. [ $^{11}C$ ]DPN-Delivery

In Abb. 27 ist die [ $^{11}C$ ]DPN-Delivery ( $IRF_{1min}/min$ ) der Hirnregionen zusammengefasst. Die „Repeated Measures ANOVA“ (Tabelle 10) der [ $^{11}C$ ]DPN-Delivery zeigt, dass das **PALL** eine signifikant niedrigere [ $^{11}C$ ]DPN-Delivery als die anderen Hirnregionen ( $p < 0,001$ ) aufweist. Da sich die übrigen Hirnregionen bezüglich ihrer Delivery nicht signifikant unterscheiden, wurde das PALL in der *weiteren Diskussion* nicht berücksichtigt.

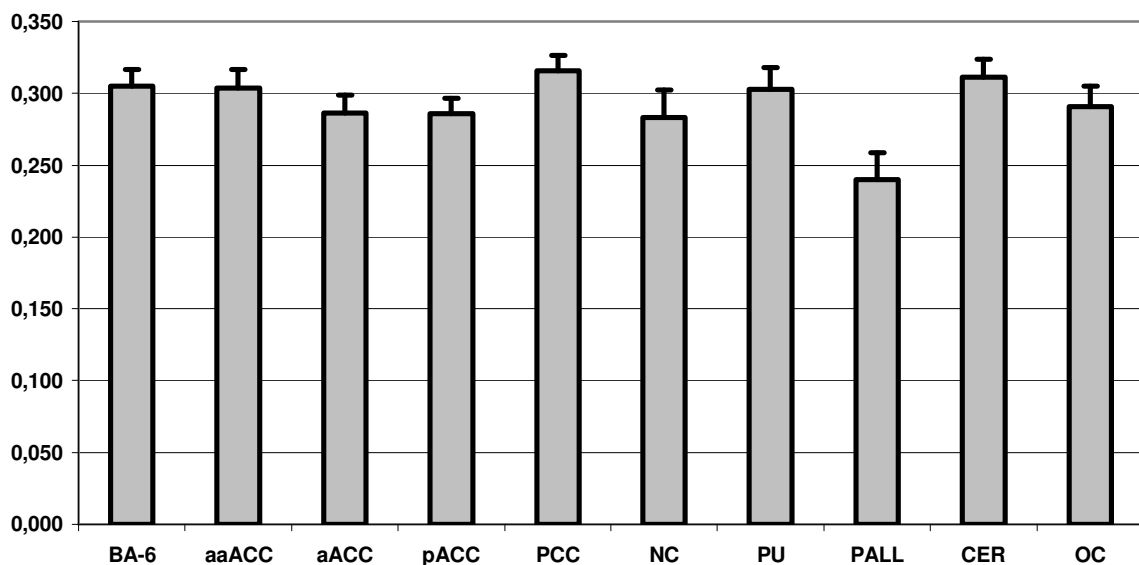


Abb. 27: [ $^{11}C$ ]DPN-Delivery mit Angabe des „Standard Error of MEAN“

<b>ANOVA</b>	<b>aaACC</b>									
<b>aaACC</b>	-	<b>aACC</b>								
<b>aACC</b>	∅	-	<b>pACC</b>							
<b>pACC</b>	∅	∅	-	<b>PCC</b>						
<b>PCC</b>	∅	∅	∅	-	<b>fCx</b>					
<b>fCx</b>	∅	∅	∅	∅	-	<b>NC</b>				
<b>NC</b>	∅	∅	∅	∅	∅	-	<b>PUT</b>			
<b>PUT</b>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	-	<b>PALL</b>		
<b>PALL</b>	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	-	<b>CER</b>	
<b>CER</b>	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	< 0,001	-	

**Tabelle 10:** ANOVA der regionenspezifischen [<sup>11</sup>C]DPN-Delivery  
 Es sind die p-Werte für jeden Paarvergleich aufgeführt.  
 Zeichenerklärung: ∅ (statistisch nicht signifikant)

## Kapitel 5 Diskussion

### 5.1. *Ex vivo* Rezeptor-Autoradiographie

#### 5.1.1. [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptor-Autoradiographie

##### 5.1.1.1. Anteriorer cingulärer Kortex und Schmerzmodulation

Opioide lindern affektive (Kupers 1991 S.10, Price 1985 S.267, Drolet 2001 S.734, Price 1986 S.202) und sensorische (Price 1985 S.267, Price 1986 S.202, Gracely 1979 S.1262, Gracely 1982 S.754-755) Dimensionen des Schmerzerlebens, wobei das genaue Ausmaß der Beeinflussung der Dimensionen von dem Studiendesign und der Opioid-Dosis abhängt. Diese Dimensionen werden zerebral im so genannten medialen und lateralen Schmerzsystem repräsentiert. Das laterale Schmerzsystem ist mit der sensorisch-diskriminativen Schmerzwahrnehmung, das mediale Schmerzsystem vor allem mit affektiv-motivationale Aspekten des Schmerzes befasst (Wiech 2001 S.8, Sowards 2002 S.163).

Wie aus Kapitel 4.1.1. (Abb. 16, Tabelle 4) hervorgeht, wurde die höchste *ex vivo* [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte im aACC und pACC – also Strukturen des medialen Schmerzsystems – gemessen. Innerhalb des CG nimmt die *ex vivo* [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte vom aACC bis zum PCC, der nicht mehr zum medialen Schmerzsystem gezählt wird, signifikant ab (aACC vs. PCC,  $p < 0,001$ ). Zudem ist die *ex vivo* [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte im aACC signifikant höher als im Neostriatum (NC, PUT).

Die in dieser Arbeit nachgewiesene hohe [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte im ACC und die negative Korrelation zwischen Aktivierung des  $\mu$ -Opioid-Systems und affektiver Schmerzbewertung bei einer [<sup>11</sup>C]Carfentanil-PET-Studie (Zubieta 2001 S.313-314) sprechen dafür, dass das endogene opioide System vor allem darauf ausgelegt ist, im ACC affektiv-emotionale Dimensionen des Schmerzerlebens zu modulieren.

##### 5.1.1.2. Opiatrezeptor-Nachweis im Cerebellum

Wie in Kapitel 4.1.1. (Abb. 16, Tabelle 4) aufgeführt, ließ sich im humanen CER *ex vivo* eine niedrige, aber spezifische [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung nachweisen. Auch in der [<sup>11</sup>C]DPN-PET gelang der Nachweis einer [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung im CER (Kapitel 4.2.1.)

Dies bestätigt die Aussage von Schadrack (1999 S.623), der erstmals die Existenz von OR mittels [<sup>11</sup>C]DPN-PET, mRNA Expression und RA im humanen CER eindeutig belegte. Vor dieser Arbeit bestand die Meinung, dass es wie bei Nagern im humanen CER keine OR gibt.

Gerade diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der *post mortem* Opiatrezeptor-Autoradiographie an menschlichen Gehirnen, da offensichtlich Ergebnisse von Rezeptor-Studien von Tieren nicht auf den Menschen übertragbar sind.

### 5.1.1.3. Basalganglien

PUT und NC (PUT vs. NC  $p > 0,05$ ), die zusammen das Striatum bilden, haben (Kapitel 4.1.1.) eine moderate, im Vergleich zum aACC (PUT vs. aACC  $p < 0,001$ ; NC vs. aACC  $p < 0,01$ ) signifikant niedrigere [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte. Das PALL weist zusammen mit OC und CER eine niedrige [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte auf (PALL vs. NC bzw. PUT  $p < 0,001$ ). Die im Vergleich zum Striatum niedrigere [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung im PALL wurde bereits bei Ratten beschrieben (Pert 1976 S.3731).

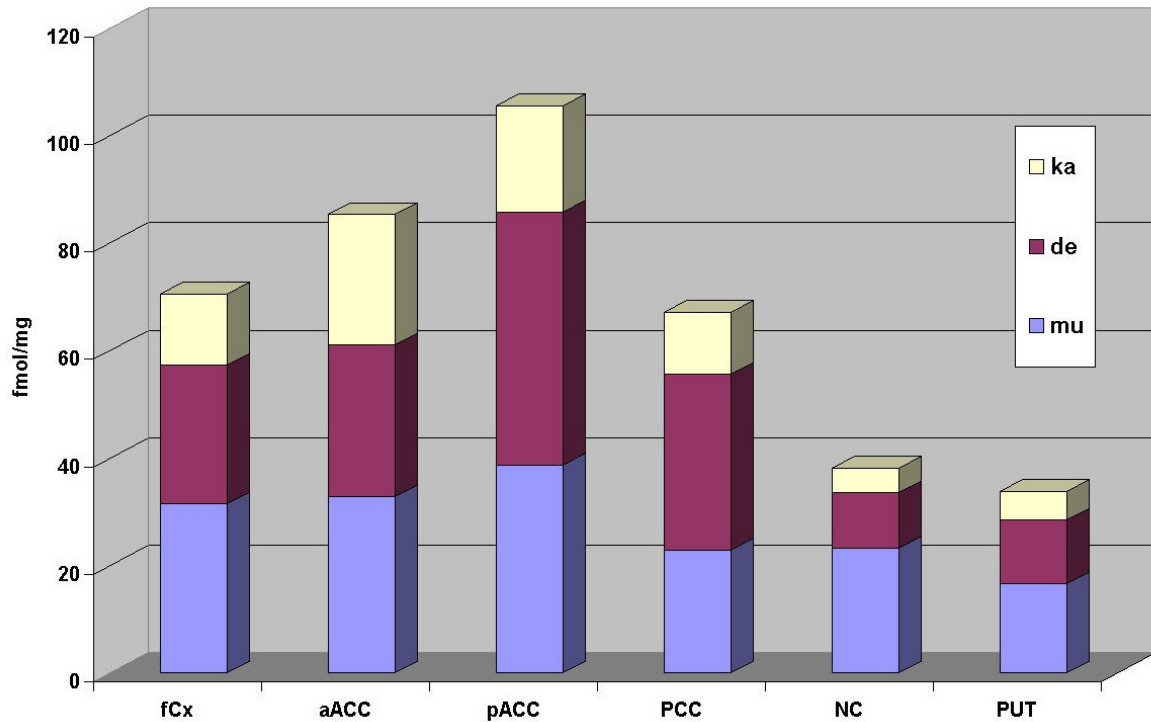
PUT, NC und PALL erhalten nozizeptive Impulse und scheinen die Schmerzverarbeitung zum Beispiel im Sinne der sensomotorischen Integration von noxischen Stimuli und der entsprechenden motorischen Reaktion zu beeinflussen (Chudler 1995 S.11-12). Welchen Einfluss hier Opiatrezeptoren auf die funktionelle Verarbeitung der nozizeptiven Informationen bzw. das Schmerzerleben haben, ist aber bislang noch weitgehend ungeklärt.

### 5.1.2. Autoradiographie der Opiatrezeptor-Subtypen

DPN gilt als ein unspezifischer OR-Ligand. Zur weiteren funktionellen Interpretation der DPN-Bindungsdichte ist es daher notwendig, die OR-Subtypen-Verteilung in den drei untersuchten CG-Abschnitten (aACC, pACC, PCC) zu quantifizieren. Hierzu wurden autoradiographische Untersuchungen mit für die drei klassischen OR-Subtypen spezifischen Liganden durchgeführt (Kapitel 4.1.2.). Abb. 28 zeigt die summierten Expressionen der einzelnen Subtypen, differenziert nach Regionen.

Ein interessanter Befund ergab sich insbesondere im Gyrus cinguli (CG) (Abb. 28). Der *pACC* weist die höchste **Summe der OR-Subtypen-Dichte** im CG auf. Im pACC haben die  $\delta$ -Rezeptoren die höchste Dichte, gefolgt von  $\mu$ - und zuletzt  $\kappa$ -OR. Im aACC ist die Summe der  $\mu$ - und  $\kappa$ -OR-Dichte vergleichbar mit dem pACC, während die Expression von  $\delta$ -OR deutlich

geringer als im pACC ist. Der PCC hat eine deutlich geringere  $\mu$ - und  $\kappa$ -OR-Dichte als der ACC; die  $\delta$ -OR-Dichte im PCC ist dagegen höher als im aACC.



**Abb. 28:** Summe der  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -OR-Subtypendichte

Demnach zeigt sich ein differenziertes Expressionsmuster der OR-Subtypen im CG. Dies lässt die Hypothese zu, dass die differentielle Wirkung von OR-Subtyp spezifischen Pharmaka auf die unterschiedlichen Aspekte des Schmerzerlebens eine rein lokal funktionell-anatomische Ursache hat: Die Beobachtungen, dass zum einen eine negative Korrelation zwischen der Aktivierung des endogenen  $\mu$ -opioidergen Systems und der subjektiven affektiven Schmerzbewertung (Zubieta 2001 S.313-314) im pACC besteht und zum anderen der selektive  $\mu$ -OR-Agonist Fentanyl die affektive Komponente des Schmerzes wirkungsvoll hemmt (Casey 2000 S.529), ließen sich damit auf die hohe  $\mu$ -OR-Dichte im pACC zurückführen.

### 5.1.3. Opiatrezeptor-Selektivität von DPN

Vergleicht man das Muster der mittels [ $^3$ H]DPN dargestellten Rezeptordichte mit den Subtypen-spezifischen Autoradiographien, ergibt sich ein diskrepanter Befund im rostralen

ACC: Gemessen mit [<sup>3</sup>H]DPN ergibt sich die höchste Rezeptordichte im aACC (Kapitel 4.1.1., Tabelle 4, Abb. 16), gemessen mit Subtyp-spezifischen Liganden ergibt sich die höchste Rezeptordichte dagegen im pACC (Kapitel 4.1.2, Tabelle 7, Abb. 19).

OR-Agonisten und -Antagonisten haben trotz ihrer häufig beträchtlichen strukturellen Ähnlichkeiten deutlich unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften. So ist DPN als ein unspezifischer OR-Antagonist zu bewerten, weil DPN an alle drei OR-Subtypen bindet. Die Affinität von DPN zu den unterschiedlichen Subtypen ist jedoch nicht gleich. Die maximale *post mortem* [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung darf daher nicht mit der Summe der maximalen Subtypenspezifischen Liganden-Bindung gleichgesetzt werden, sondern muss um den K<sub>d</sub>-Wert (Kapitel 1.3.1.) des DPN für die einzelnen OR-Subtypen korrigiert werden.

Raynor (1993) untersuchte das pharmakologische Bindungsverhalten zahlreicher OR-Liganden – darunter auch DPN – an geklonten μ-, δ- und κ-OR. Dabei wurde festgestellt, dass DPN vor allem an μ- und κ-Rezeptoren, aber kaum an δ-OR bindet (Raynor 1993 S.33).

Diese *in vitro* Daten lassen sich nun auf die hier präsentierten autoradiographischen Daten übertragen. Dass die mit DPN gemessene Rezeptordichte im aACC - und nicht im pACC - am höchsten ist, ließe sich durch eine präferentielle Bindung des DPN an μ- und κ-OR erklären, die im Vergleich zum pACC im aACC überwiegen. Da δ-OR im pACC fast die Hälfte aller OR ausmachen (Kapitel 5.1.2., Abb. 28), scheint DPN also auch *ex vivo* kaum an δ-OR zu binden.

## 5.2. *In vivo* Rezeptor-Autoradiographie (PET) mit [<sup>11</sup>C]DPN

### 5.2.1. Überblick über die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung

Wie aus Kapitel 4.2.1. (Tabelle 8, Abb. 21) hervorgeht, haben ACC und PCC wiederum eine hohe [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung. Die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung im fCx unterscheidet sich nicht signifikant von aACC bzw. pACC (p>0,005), ist aber signifikant höher als im PCC (fCx vs. PCC p<0,01). Wie in der [<sup>3</sup>H]DPN-RA (Kapitel 4.1.1.) besteht eine signifikante kontinuierliche Abnahme der [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung im CG von rostral nach kaudal, wie es *in vivo* bereits von Vogt (1995 S.7-8) beschrieben wurde.

Die höchste [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung zeigt sich aber - anders als in der [<sup>3</sup>H]DPN-RA - im PUT und NC (PUT vs. NC p>0,05). Im Vergleich zum Striatum weist das PALL (PALL vs. NC bzw. PUT p<0,001) eine moderate, aber signifikant niedrigere [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung auf.

Das CER weist die geringste [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung (p<0,001) der in der ANOVA eingeschlossenen Regionen auf. Somit gelang - wie bei Schadrack (1999) - der *in vivo* Nachweis einer [<sup>11</sup>C]DPN -Bindung an OR des humanen CER (s.a. Kapitel 5.1.1.2.).

### 5.2.2. Okzipitaler Kortex und Referenz-Regionen-Modell

In einigen OR-Liganden-PET-Studien (Weeks 1997 S.944, Willoch 2004 S.215) wurde der humane OC als Referenz-Region für das kinetische Modellierung angewandt. Bisher ging man davon aus, dass der OC eine sehr geringe OR-Dichte aufweist und in der [<sup>11</sup>C]DPN-Liganden-PET den Liganden fast ausschließlich unspezifisch bindet (Piccini 1997 S.723). Sadzot (1991 S.215) berichtete, dass *in vivo* B<sub>max</sub> von [<sup>11</sup>C]DPN und das [<sup>11</sup>C]DPN-Bindungspotential im humanen OC nur ca. 10 % der B<sub>max</sub> im Thalamus und NC beträgt, womit Rinne (1995 S.571) die Verwendung des OC als *in vivo* Referenz-Region mit überwiegend unspezifischer DPN-Bindung begründete. Allerdings gab es bisher keine *post mortem* Untersuchung, die belegt, dass die DPN-Bindung im OC tatsächlich überwiegend unspezifisch ist.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass der *post mortem* OC eine relativ geringe **unspezifische** [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung von 26,27 % und eine hohe **spezifische** [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung (= [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte) von 73,73 % der totalen [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung (Summe aus spezifischer und unspezifischer [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung) aufweist (Kapitel 4.1.1.). Somit scheint die *in vivo* [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung des OC (Kapitel 4.2.1.) überwiegend spezifisch zu sein. Die *in vivo* [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung im OC ist mit 19,3 % des im NC gemessenen Wertes, der neben dem PUT die höchste [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung zeigte, außerdem deutlich höher, als von Sadzot (1991) publiziert wurde. *Ex vivo* waren die absoluten Werte der spezifischen [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung zwar niedrig, jedoch durchaus vergleichbar mit der OR-Expression im CER und PALL.

Beim Referenz-Regionen-Modell, das voraussetzt, dass die Referenz-Region keine spezifische Bindung zeigt, führt somit die Subtraktion der VD-Werte des OC von den VD-Werten der übrigen Hirnregionen zu einer falsch niedrigen [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung und damit zu einem nicht zu vernachlässigenden systematischen Fehler.

Zur korrekten Anwendung des Referenz-Regionen-Modells bedarf es folglich einer alternativen Referenz-Region, die tatsächlich eine zu vernachlässigende OR-Dichte und eine überwiegend unspezifische [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung aufweist. Die weiße Substanz des Gehirns könnte diese geforderten Kriterien erfüllen. Hierbei wäre nicht sicher auszuschließen, dass die weiße Substanz von der kortikalen und subkortikalen [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung überstrahlt wird und



so ebenfalls eine falsch hohe „unspezifische“ [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung bestimmt werden würde. Wegen der weit verbreiteten und starken Expression der OR im menschlichen Gehirn scheint auch keine andere kortikale oder subkortikale Struktur als Referenz-Region geeignet zu sein.

Aus den oben genannten Gründen muss daher bei der DPN-PET vom Referenz-Regionen-Modell nicht nur im speziellen (i.e. Verwendung des OC als Referenz) sondern ganz grundsätzlich abgeraten werden, so dass momentan die SA oder die Kompartiment-Modell-Analyse unter Berücksichtigung der arteriellen Input-Funktion besser für das kinetische Modelling der DPN- PET geeignet zu sein scheint.

### 5.3. Gegenüberstellung der *in* und *ex vivo* DPN-Bindung

Bisher gibt es keine Studie, die die OR-Bindung eines OR-Radioliganden *in* und *ex vivo* systematisch gegenübergestellt hat und eine vergleichbare OR-Bindung des identischen OR-Liganden *in* und *ex vivo* belegen konnte.

Vergleicht man nun die in dieser Arbeit erhobenen *in*- und *ex vivo* Daten, zeigt sich dass der ACC (aACC und pACC) in der post mortem [ $^3\text{H}$ ]DPN-RA (Kapitel 4.1.1.) die höchste *ex vivo* [ $^3\text{H}$ ]DPN-Rezeptordichte aller untersuchten Hirnareale aufweist. Interessanterweise ist trotz der höchsten *ex vivo* [ $^3\text{H}$ ]DPN-Rezeptordichte im ACC die *in vivo* [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung im ACC (Kapitel 4.2.1.) signifikant niedriger als im Striatum (NC, PUT); der Struktur, die *in vivo* die höchste [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung aufweist.

Als Ursache dieser überraschenden Diskrepanz sind zunächst methodische Einflüsse zu diskutieren. Dabei müssen artifizielle Veränderungen der DPN-Bindung in humanen post mortem Gehirnen bedacht werden. Eine verlängerte *post mortem* Zeit verursacht eine erhöhte Rezeptor-Bindung des Benzodiazepins Flunitrazepam bei Ratten (Whitehouse 1984 S.557). Dieser Effekt übertragen auf die *post mortem* [ $^3\text{H}$ ]DPN-Bindung würde eine höhere *ex vivo* Bindung im ACC und fCx erklären. Dabei müsste es sich aber um einen systematischen Fehler handeln, der sich in allen Hirnregionen in ähnlicher Stärke auswirkt. Außerdem sind die Befunde zu Auswirkung der post mortem Zeit auf die Rezeptoraffinität nicht einheitlich. Paul (1997 S.1995) konnte z.B. zeigen, dass die Bindungsaffinität von  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -spezifischen Radioliganden in Rattengehirnen mit zunehmender post mortem Zeit eher abgeschwächt wird.

Als zweiter methodischer Einflussfaktor muss diskutiert werden, das die so genannte Delivery des Tracers – also die unterschiedliche Durchblutung und arterielle Anlieferung von

[<sup>11</sup>C]DPN – zu Unterschieden in der *in vivo* DPN-Bindung in bestimmten Hirnregionen führen kann. Nach Auswertung der IRF<sub>1min</sub>-Daten lässt sich nur für das PALL, nicht jedoch für aACC, pACC, PCC, fCx und auch das Striatum (PUT, NC) ein statistisch signifikanter Unterschied der [<sup>11</sup>C]DPN-Delivery ermitteln (Kapitel 4.2.2.). Somit scheidet die [<sup>11</sup>C]DPN-Delivery als Ursache für die unterschiedlichen *in* und *ex vivo* DPN-Bindungsmuster in ACC und Striatum aus.

Ein direkter quantitativer Vergleich der *in* und *ex vivo* DPN-Bindung ist leider nicht möglich, da die Daten der PET (Einheit: IRF / min) nicht in die absoluten Werte der [<sup>3</sup>H]DPN-RA (fmol/mg) konvertierbar sind. Es kann also nicht gesagt werden, in welcher Region und unter welcher Kondition die Verfügbarkeit der OR tatsächlich höher oder niedriger ist. Grundsätzlich lassen die *in*- und *ex vivo* unterschiedlichen DPN-Bindungsmuster in ACC und Striatum zwei Interpretationen zu:

- a) in bestimmten Hirnregionen ist die Verfügbarkeit von OR *in vivo* höher als *ex vivo*; bzw.
- b) in bestimmten Hirnregionen ist die Verfügbarkeit von OR *in vivo* niedriger als *ex vivo*.

### 5.3.1. Opiatrezeptor-Internalisierung

Zur Hypothese a) (Kapitel 5.3.) lässt sich folgende Überlegung anstellen: Es ist vorstellbar, dass die *in vivo* Methode zu einer intrazellulären Ansammlung von Tracern führt. Dies könnte auf eine Rezeptor-Internalisierung zurückzuführen sein.

Die Interaktion von Opioidagonisten mit OR löst eine Signaltransduktionskaskade aus, die unter anderem zu einer OR-Endozytose führen kann. Immunfluoreszenz-markierte *synthetische*  $\mu$ - und  $\delta$ -OR-Agonisten verursachen eine Internalisierung der OR in primären kortikalen Rattenneuronen (Lee 2002 S.108). Eine OR-Internalisierung bei Nierenzellen des Menschen (Burford 1998 S.125) und Darmneuronen der Ratte (McConalogue 1999 S.1056) kann auch durch *endogene*  $\mu$ -OR-Agonisten wie Endomorphin 1 und 2 induziert werden. Die Fähigkeit *endogener* Opiode, an menschlichen Nervenzellen *in vivo* eine OR-Internalisierung auszulösen, ist aber noch nicht belegt.

Eine primäre Bindung von DPN an internalisierte, in Endosomen eingeschlossene Rezeptoren gilt als unwahrscheinlich, weil nach OR-Internalisierung intrazellulär die G<sub>O/R</sub>-Proteine der OR durch Arrestine funktionell inaktiviert werden (Borgland 2001 S.149). Es wird angenommen, dass es hierbei zu einer Konformationsänderung des Rezeptors kommt, der die Affinität der Opiode zu den internalisierten OR deutlich reduziert.

Aus diesem Grunde ist auszuschließen, dass in der *post mortem* [<sup>3</sup>H]DPN-Autoradiographie internalisierte OR gebunden werden, auch wenn diese in ihrem intrazellulären Kompartiment durch das Schneiden des Gewebes prinzipiell einer Bindung zugänglich gemacht werden. Die [<sup>3</sup>H]DPN-RA bildet also nur Zellmembran-gebundene, funktionell intakte OR, jedoch keine endozytierten OR ab.

Bei der PET ist es dagegen vorstellbar, dass an der Membran mit [<sup>11</sup>C]DPN markierte OR während der Scan-Zeit internalisiert werden und somit den Liganden intrazellulär sequestrieren. Endozytierte OR werden typischerweise „recycled“, also wieder als funktionelle Rezeptoren auf der Membran exprimiert. Dies könnte zu einer zunehmenden intrazellulären Akkumulation von [<sup>11</sup>C]DPN führen und damit zu einer gegenüber der *ex vivo* Autoradiographie höheren Konzentration des darstellbaren Ligandens. Tatsächlich liegt der mit den OR endozytierte Ligand jedoch intrazellulär in freier Form vor, da sich die Bindungseigenschaften des OR ändern (s.o.). Man geht nun davon aus, dass diese freien Liganden die Zelle wieder verlassen, es also zu keiner endozytose-bedingten intrazellulären Anreicherung von PET-Liganden *in vivo* kommt.

### 5.3.2. Endogener opioiderger Tonus

Zur Hypothese b) (Kapitel 5.3.) - nämlich dass in bestimmten Hirnregionen die Verfügbarkeit von OR *in vivo* niedriger als *ex vivo* - gilt folgende Überlegung:

Werden *in vivo* OR durch ausgeschüttete endogene Opioide besetzt, wird der exogen hinzugegebene Ligand [<sup>11</sup>C]DPN von einer Bindung an OR kompetitiv abgehalten. Dies führt zu einer reduzierten *in vivo* [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung, die sich in „falsch“ niedrigen Werten ausdrückt. Tatsächlich wird dieser Mechanismus der Verdrängung von PET-Tracern durch endogene Liganden in so genannten Kompetitionparadigmen bereits zur Darstellung einer endogenen Ligandenausschüttung mittels Liganden-PET genutzt (Sprenger 2004 S.3-4, Zubieta 2001 S.311, Jones 1994 S.913, Jones 1999 S.806).

Bei der *ex vivo* [<sup>3</sup>H]DPN-Autoradiographie greift dieser Mechanismus wahrscheinlich nicht. Zum einen werden durch den Waschvorgang der Hirnschnitte gebundene endogene Opioide herausgelöst; zum anderen führt die in der *ex vivo* Autoradiographie eingesetzte hohe [<sup>3</sup>H]DPN-Konzentration zu einer Verdrängung der gebundenen endogenen Opioide.

Zusammenfassend erscheint die Hypothese einer Kompetition exogener und endogener Liganden um die Bindung an OR *in vivo* am plausibelsten. Unter Annahme dieser Hypothese

und um zumindest einen indirekten Vergleich der *in* und *ex vivo* DPN-Bindung zu ermöglichen, wurde daher eine Normierung durchgeführt. Hierzu wurde das PUT als Referenz-Region ausgewählt, das *in vivo* die höchste [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung aufweist. Durch Normierung der *in* und *ex vivo* DPN-Bindung auf die des PUT erhält man für jede Hirnregion relative Bindungswerte (Prozent der absoluten [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung des PUT) (Abb. 29).

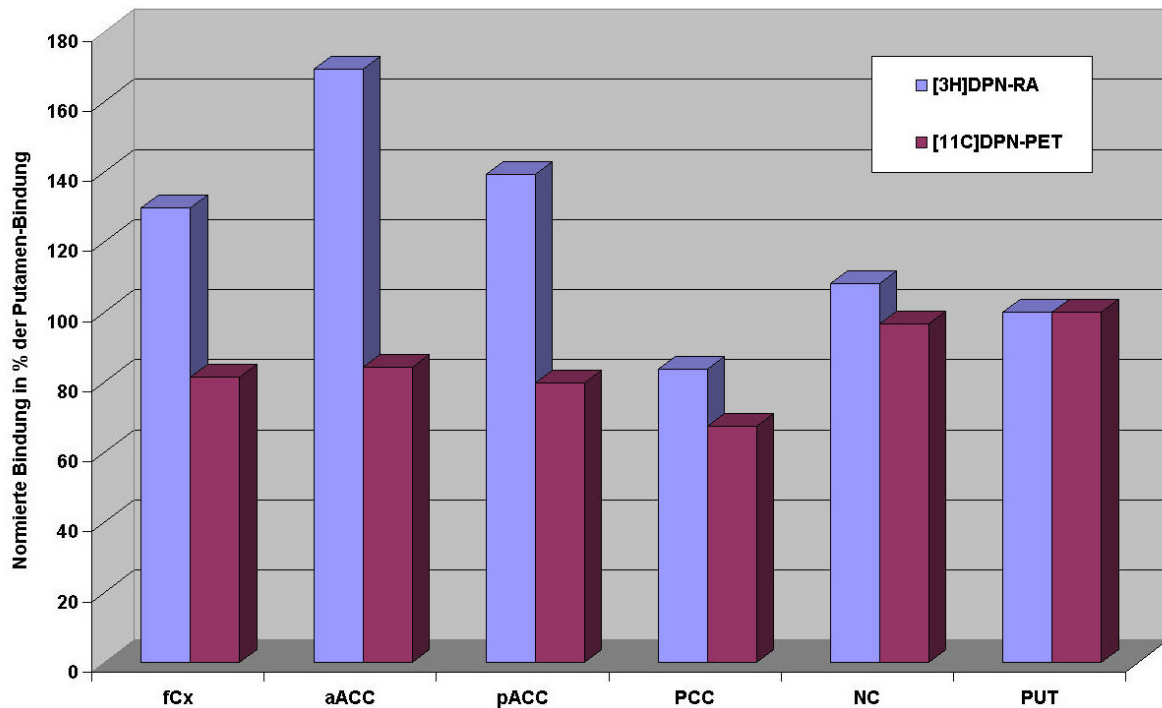


Abb. 29: Normierte *in*- und *ex vivo* DPN-Bindung

Die grafische Darstellung der normierten *in* und *ex vivo* DPN-Bindung (Abb. 29) zeigt eine deutlich geringere relative *in vivo* DPN-Bindung im ACC und fCx als *ex vivo*. Unter der bevorzugten Hypothese wäre dieser Befund so zu interpretieren, dass diese Strukturen einer *tonischen* Aktivierung durch endogene Opioide unterliegen.

Bei Hinweisen für einen endogenen Opioid-Tonus im ACC und fCx kann bei Normierung der DPN-Bindung auf das PUT eine tonische Ausschüttung von endogenen Opioiden auch im Striatum nicht ausgeschlossen werden; der mutmaßliche Opioid-Tonus ist im limbischen ACC jedoch deutlich höher als im Striatum. Im PUT wurde eine erhöhte Ausschüttung von endogenen Opioiden bei unbehandelten Patienten mit Trigeminusneuralgie bereits diskutiert (Jones 1999), weil nach erfolgreicher operativer Therapie die zerebrale [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung an OR wieder zunahm. Zudem induziert Stress im NC und PALL von Ratten, denen *in vivo*

[<sup>3</sup>H]DPN i.v. appliziert wurde, eine signifikante Abnahme der [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung (Seeger 1984 S.306-307).

Es ist also wahrscheinlich, dass der Opioid-Tonus sich nicht auf den ACC beschränkt, sondern in weiteren Hirnregionen in unterschiedlichem Maße wirksam ist. Darauf weist zum einen die weite kortikale und subkortikale Verbreitung der OR, zum anderen aber auch die diskrepante *in* und *ex vivo* DPN-Bindung im fCx hin.

### 5.3.3. Endogene Opiode im anterioren cingulären Kortex

In verschiedenen Liganden-PET-Studien (Sprenger 2004 S.3-4, Zubieta 2001 S.311, Jones 1994 S.913, Jones 1999 S.806) wird eine endogene Schmerz-assoziierte Opioid-Ausschüttung unter anderem im ACC *indirekt* über eine reduzierte OR-Bindung des Tracers diskutiert.

Es gibt aber auch *direkte* Hinweise für eine Schmerz-assoziierte Ausschüttung endogener Opiode im Gehirn von Tieren. An Ratten mit experimentell induzierter Arthritis wurde die erhöhte zerebrale Ausschüttung der endogenen Opiode [Met]Enkephalin (Panerai 1987 S.1287, Spetea 2002 S.250) und Dynorphin B (Spetea 2002 S.250) belegt.

Der Unterschied der *in* und *ex vivo* DPN-Bindung im humanen ACC und die oben aufgeführten Arbeiten vermitteln, dass ein endogener Opioid-Tonus *physiologisch* auf den ACC einwirkt und *Schmerz-assoziiert* in bestimmten Hirnarealen (z.B. ACC) moduliert wird. Beim Menschen ist allerdings nur wenig über die Expression endogener Opiode in kortikalen Arealen bekannt.

Da DPN vor allem an  $\mu$ - oder  $\kappa$ -OR bindet (Kapitel 5.1.3.), scheinen endogene Opiode mit entsprechender Affinität zu  $\mu$ - oder  $\kappa$ -OR durch Konkurrenz mit [<sup>11</sup>C]DPN für die niedrigere *in vivo* DPN-Bindung im ACC (Kapitel 5.3.) verantwortlich zu sein.

Möglicherweise verursacht  $\beta$ -Endorphin *in vivo* die niedrigere DPN-Bindung im ACC. Die  $\beta$ -Endorphin- bzw. Met-Enkephalin-Innervation des humanen Kortex gilt zwar als gering (Gramsch 1979 S.267). Von Bernstein (1996 S.35) wurde jedoch die höchste „endorphinerge“ Innervation des humanen Kortex im CG mit immunzytochemischen Methoden lokalisiert.  $\beta$ -Endorphin ist im gleichen Masse selektiv für  $\mu$ - und  $\delta$ -OR (Raynor 1993 S.333) und kann durch nozizeptive Reize im Hypothalamus von Ratten ausgeschüttet werden (Zangen 1998 S.661). Auf eine Beteiligung von  $\beta$ -Endorphin an der zentralen Modulation des Schmerzerlebens lässt die Tatsache schließen, dass spinal oder

zentral appliziertes  $\beta$ -Endorphin beim Menschen eine prolongierte Analgesie (Foley 1979 S.5380, Oyama 1980 S.123) auslöst.

Es kommen natürlich auch andere endogene Opioide mit entsprechender Affinität zu  $\mu$ - oder  $\kappa$ -OR für einen endogenen Opioid-Tonus in Frage. Eine abschließende Klärung der Frage, welches endogene Opioid für eine physiologisch niedrigere [ $^{11}\text{C}$ ]DPN-Bindung im ACC *in vivo* verantwortlich sein könnte, steht aus.

#### 5.3.4. Bedeutung des endogenen Opioid-Tonus im anterioren cingulären Kortex

Es stellt sich die Frage, welche physiologische Funktion ein endogener Opioid-Tonus im ACC haben könnte. Es scheint eine direkte funktionelle Verbindung zwischen der Regionenspezifischen Verarbeitung affektiver Dimensionen des Schmerzes, dem OR-System und dem Einfluss endogener und exogener Opioide im ACC zu bestehen. Die Verarbeitung affektiv-emotionaler Dimensionen des Schmerzerlebens wird relativ weit verbreitet im rostralen, mittleren und posterioren ACC lokalisiert (Peyron 2000 S.270).

Bei **akuten Schmerzen** könnte der endogene Opioid-Tonus im ACC eine regulierende Filterfunktion auf nozizeptive Afferenzen ausüben, was zu einer Modulation der affektiven Schmerzverarbeitung führt. Der Opioid-Tonus wird im Falle eines akuten Schmerzreizes durch zusätzliche Ausschüttung von endogenen Opioiden unter anderem im ACC erhöht (Zubieta 2001 S.313-314). Das hat einen praktischen Nutzen: Der akute Schmerz behält seine sensorisch-diskriminative Alarmfunktion, und das Individuum ist in der Lage, schnell, adäquat und effizient auf eine schmerzhaft Bedrohung von außen reagieren zu können, ohne durch „kontraproduktive ablenkende aversive Affekte“ von einer Fluchtreaktion, die den Körper vor weiterem Schaden schützen soll, abgelenkt zu werden.

Anders könnte es sich bei **chronischen Schmerzen** verhalten, die mit einer deutlich erhöhten aversiven affektiv-emotionalen Komponente des Schmerzerlebens einhergehen. Ursache der Zunahme der empfundenen Unangenehmheit chronischer Schmerzen könnte eine Toleranz gegen vermehrt ausgeschüttete endogene Opioide im ACC sein, die auf experimentell belegte Mechanismen wie OR-Internalisierung (McConlogue 1999 S.1056), Downregulation (Afify 2002 S.85) und verminderte OR-Biosynthese (Afify 2002 S.86) basieren könnte. Eine unzureichende Aktivierung oder „Erschöpfung“ endogener Opioide ist jedoch nicht sicher auszuschließen.

Gegen die Auslösung einer Toleranz gegen endogene Opioide durch eine *OR-Internalisierung* spricht, dass bei Ratten nach vierwöchiger experimentell induzierter Arthritis keine Reduktion der zellulären OR-Dichte trotz erhöhter Ausschüttung endogener Opioide in zahlreichen Hirnarealen wie frontalem Kortex, Hypothalamus und Hippokampus nachgewiesen werden konnte (Spetea 2002 S.350). Außerdem bewirkt chronisch appliziertes Morphin, das in der klinischen Praxis sehr wohl eine Toleranz auslöst, keine OR-Internalisierung (Stafford 2001 S.236).

Eine pharmakologisch induzierte Toleranz gegen Etorphin, das über mehrere Tage appliziert wurde, bewirkt im Gehirn von Mäusen eine Downregulation von  $\mu$ -OR (Stafford 2001 S.236). Folglich könnten die unter chronischen Schmerzen vermehrt ausgeschütteten endogenen Opioide aufgrund der verminderten OR-Zahl im ACC die Suppression aversiver, affektiv-emotionaler Aspekte des Schmerzerlebens nicht mehr in dem Maße bewirken, wie es unter den physiologischen Bedingungen des akuten Schmerzes möglich ist.

Ein weiterer Mechanismus hierfür ist die Opioidagonisten-induzierte Desensibilisierung von OR, die von ihrem G-Protein abkoppelt und inaktiviert werden (Freye 2003 S.18). Zusätzlich wird über die Möglichkeit diskutiert, ob Opioide über eine entsprechende Signaltransduktionskaskade die Synthese von OR-mRNA reduzieren können, was die Menge an OR an der Zelloberfläche reduzieren könnte (Freye 2003 S.18).

Auf molekularbiologischer Rezeptorebene könnte die sich unter chronischen Schmerzen entwickelnde Toleranz gegen einen dauerhaft erhöhten Opioid-Tonus im ACC, in dem affektiv-emotionale Dimensionen des Schmerzerlebens verarbeitet werden, ein Erklärungsansatz für die zunehmende affektiv-emotionale Belastung, den Leidensdruck bei chronischen Schmerzpatienten und den Bedarf höherer synthetischer Opioid-Dosen zur effizienten Schmerzlinderung neuropathischer Schmerzen sein.

## Kapitel 6 Zusammenfassung

Der Ligand Diprenorphin (DPN) - ein unspezifischer OR-Antagonist - wird seit einigen Jahren zur nicht-invasiven *in vivo* Darstellung des humanen Opiatrezeptor-Systems im Rahmen von Liganden-PET-Studien verwendet. Dabei fällt auf, dass Untersuchungen, die die [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptorbindung *ex vivo* als Maß der tatsächlichen Opiatrezeptor-Dichte mittels [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptor-Autoradiographie im menschlichen Gehirn quantifizieren, fehlen - und somit eine wichtige Grundlage für die Anwendung des Tracers in nicht-invasiven bildgebenden Methoden.

In dieser Arbeit wurde die DPN-Bindung des menschlichen Gehirns (unter anderem Gyrus cinguli, Basalganglien, Cerebellum und okzipitaler Kortex) *ex vivo* ([<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptor-Autoradiographie) (n=5) und *in vivo* ([<sup>11</sup>C]DPN-PET) (n=10) mit dem gleichen Radioliganden untersucht, so dass erstmals ein direkter Vergleich der *in* und *ex vivo* Opiatrezeptor-Bindung von DPN möglich wurde. Zudem wurde *ex vivo* die  $\mu$ - ([<sup>3</sup>H]DAMGO),  $\delta$ - ([<sup>3</sup>H]DPDPE) und  $\kappa$ - ([<sup>3</sup>H]U69,593) Opiatrezeptor-Subtypen-Dichte mittels Rezeptor-Autoradiographie quantifiziert, um zu ermitteln, welche Opiatrezeptor-Subtypen für eine DPN-Bindung zur Verfügung stehen.

Ein für die Auswerterroutinen der PET sehr wichtiger Befund ergab sich in der Untersuchung der DPN-Bindung des okzipitalen Kortex. Zur Bestimmung der *in vivo* Bindungswerte wird in der PET häufig das so genannte Referenz-Regionen-Modell angewendet. Unter der Annahme einer überwiegend unspezifischen [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung wurde dabei bisher der okzipitale Kortex als Referenz-Region gewählt. Die *ex vivo* nachzuweisende [<sup>3</sup>H]DPN-Bindung ist aber zu 73,7 % *spezifisch*. *In vivo* macht die [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung des okzipitalen Kortex immerhin fast 20 % der des Nucleus caudatus aus, der Region mit der höchsten *in vivo* [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung überhaupt. Der okzipitale Kortex erfüllt folglich nicht die Voraussetzungen an eine für die Anwendung des Referenz-Regionen-Modell tauglichen Struktur.

Aufgrund technischer Grenzen der PET und der verbreiteten und starken Expression von Opiatrezeptoren im menschlichen Gehirn scheint keine andere kortikale oder subkortikale Struktur als Referenz-Region geeignet zu sein. Folglich ist die Anwendung des Referenz-Regionen-Modells bei der DPN-PET grundsätzlich kritisch zu bewerten. Für das kinetische Modellierung der DPN-PET-Daten ist stattdessen die Spektralanalyse oder die Kompartment-



Modell-Analyse unter Berücksichtigung der arteriellen Input-Funktion als Methode der Wahl anzusehen.

Im Vergleich der DPN-Bindungsmuster *in vivo* und *ex vivo* ergab sich zudem ein funktionell sehr interessanter und wichtiger Befund: Überraschenderweise stimmen die Bindungsmuster *in* und *ex vivo* nicht überein. *Ex vivo* weist der anteriore Gyrus cinguli (ACC) die höchste [<sup>3</sup>H]DPN-Rezeptordichte auf, während *in vivo* das Striatum (Nucleus caudatus, Putamen) die höchste [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung zeigt. Nach einer hilfsweisen Normierung der regionenspezifischen DPN-Bindung auf das Putamen, der Region mit der *in vivo* höchsten [<sup>11</sup>C]DPN-Bindung, erscheint die Annahme gerechtfertigt, dass es die DPN-Bindung im ACC und frontalen Kortex *in vivo* deutlich niedriger als *ex vivo* ist.

Nachdem als Grund hierfür methodische Einflüsse und eine Opioid-induzierte OR-Internalisierung unwahrscheinlich sind, lässt sich als Ursache der Diskrepanz zwischen *in* und *ex vivo* DPN-Bindung ein **endogener Opioid-Tonus** postulieren, der zum Beispiel im ACC aufgrund der Opiatrezeptorsubtypen-spezifischen DPN-Affinität auf  $\mu$ - und  $\kappa$ -Opiatrezeptoren einwirken muss.

Endogene Opioide werden verschiedenen PET-Studien zufolge beim *akuten* Schmerzreiz unter anderem im ACC ausgeschüttet; dabei besteht eine negative Korrelation zwischen dem Ausmaß dieser Ausschüttung und der subjektiv empfundenen Unangenehmheit von Schmerzen. Opioide im ACC scheinen somit in bedeutendem Maße affektiv-emotionale Dimensionen des akuten Schmerzerlebens zu beeinflussen.

*Chronische* Schmerzen sind im Vergleich zu akuten Schmerzen mit einer deutlich stärkeren aversiven affektiv-emotionalen Komponente verbunden. Ursache der Zunahme der empfundenen Unangenehmheit bei chronischen Schmerzen könnte dabei sowohl eine Toleranz gegen dauerhaft vermehrt ausgeschüttete endogene Opioide sein; eine unzureichende Aktivierung oder „Erschöpfung“ endogener Opioide ist jedoch ebenso denkbar.

Der hier postulierte physiologische endogene Opioid-Tonus, der nicht auf das ACC alleine beschränkt ist, könnte insofern in der physiologischen Regulation des Schmerzerlebens, aber auch für die bisher noch weitgehend unverstandenen Mechanismen der Schmerzchronifizierung bedeutsam sein, da er eine Aktivität des endogenen opioidergen Systems bereits unter „Ruhebedingungen“ nahe legt.

## **Kapitel 7      Literatur**

Afify, E.A. Turnover of  $\mu$ -opioid receptors in neuroblastoma cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.*, 106 (2002) 83-87

Atweh, S.F., Kuhar, M.J. Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. I. Spinal cord and lower medulla. *Brain Res.* 124 (1977a) 53-67

Atweh, S.F., Kuhar, M.J. Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. II. The brain stem. *Brain Res.* 129 (1977b) 1-12

Atweh, S.F., Kuhar M.J. Autoradiographic localization of opiate receptors in rat brain. III. The telencephalon. *Brain Res.* 134 (1977c) 393-405

Bartenstein, P.A., Duncan, J.S., Preveet, M.C., Cunningham, V.J., Fish D.R., Jones, A.K., Luthra, S.K., Sawle, G.V., Brooks, D.J. Investigation of the opioid system in absence seizures with positron emission tomography. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 56 (1993) 1295-1302

Beckett, A.H., Casey, A.F. Synthetic analgesics, stereochemical considerations. *J. Pharm. Pharmacol.* 6 (1954) 986-991

Bernstein, H.G., Henning, H., Seliger, N., Baumann, B., Bogerts, B. Remarkable  $\beta$ -endophinergic innervation of human cerebral cortex als revealed by immunohistochemistry. *Neurosci. Lett.* 215 (1996) 33-36

Borgland, S.L. Acute opioid receptor desensitization and tolerance: Is there a link? *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 28 (2001) 147-154

Brooks, R.A., Di Chiro, G. Principles of computer assisted tomography (CAT) in radiographic and radioisotopic imaging. *Phys. Med. Biol.* 21 (1976) 689-732

Burford, N.T., Tolbert, L.M., Sadee, W. Specific G protein activation and  $\mu$ -opioid receptor internalization caused by morphine, DAMGO and endomorphin I. *Eur. J. Pharmacol.* 342 (1998) 123-126

Casey, K.L., Svensson, P., Morrow, T.J., Raz, J., Jone, C., Minoshima, S. Selective opiate modulation of nociceptive processing in the human brain. *J. Neurophysiol.* 84 (2000) 525-533

Cherry, S.R., Phelps, M.E. Imaging Brain Function with Positron Emission Tomography. In "Brain Mapping: The Methods", Toga, A.W., Mazziotta, J.C. (Ed.), Academic Press, New York, 1996, 191-221

Childers, S.R. Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci.* 48 (1991) 1991-2003

Chudler, E.H., Dong, W.K. The role of the basal ganglia in nociception and pain. *Pain.* 60 (1995) 3-38

Cunningham, V.J., Jones, T. Spectral Analysis of Dynamic PET Studies, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13 (1993) 15-23

Cvejic, S., Devi, L.A. Dimerization of the  $\delta$  opioid receptor: Implication for a role in receptor internalization. *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 26959-26964

Drolet, G., Dumont, E.C., Gosselin, I., Kinkead, R., Laforest, S., Trottier, J.-F. Role of endogenous opioid system in the regulation of the stress response. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 25 (2001) 729-741

Foley, K.M., Kourides, I.A., Inturrisi, C.E., Kaiko, R.F., Zaroulis, C.G., Posner, J.B., Houde, R.W., Li, C.H.  $\beta$ -endorphin: analgesic and hormonal effects in humans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76 (1979) 5377-5381

Freye, E., Latasch, L. Toleranzentwicklung unter Opioidgabe - Molekulare Mechanismen und klinische Bedeutung. Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 38 (2003) 14-26

Gracely, R.H., Dubner, R., McGrath, P.A. Narcotic analgesia: Fentanyl reduces the intensity but not the unpleasantness of painful tooth pulp sensations. Science. 203 (1979) 1261-1263

Gracely, R.H., Dubner, R., McGrath, P.A. Fentanyl reduces the intensity of painful tooth pulp sensations: Controlling for detection of active drugs. Anesth. Analg. 61 (1982) 751-755

Gramsch, C., Höllt, V., Mehraein, P., Pasi, A., Herz, A. Regional distribution of methionine-enkephalin- and beta-endorphin-like immunoreactivity in human brain and pituitary. Brain Res. 171 (1979) 261-270

Grudt, T.J., Williams, J.T.  $\kappa$ -Opioid receptors also increase potassium conductance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90 (1993) 11429-11432

Gunn, R.N., Gunn, S.R., Cunningham, V.J. Positron emission tomography compartmental models. J. Cereb. Blood Flow Metab. 21 (2001) 635-652

Gunn, R.N., Gunn, S.R., Turkheimer, F.E., Aston, J.A., Cunningham, V.J. Positron emission tomography compartmental models: a basis pursuit strategy for kinetic modeling. J. Cereb. Blood Flow Metab. 22 (2002) 1425-1439

Hofbauer, R.K., Rainville, P., Duncan, G.H., Bushnell, M.C. Cortical representation of the sensory dimension of pain. J. Neurophysiol. 86 (2001) 402-411

Horvath, G. Endomorphin-1 and endomorphin-2: pharmacology of the selective endogenous  $\mu$ -opioid receptor agonists. *Pharmacol. Ther.* 88 (2000) 437-463

Jones, A.K., Cunningham, V.J., Ha-Kawa, S., Fujiwara, T., Luthra, S.K., Silva, S., Derbyshire, S., Jones, T. Changes in central opioid receptor binding in relation to inflammation and pain in patients with rheumatoid arthritis. *Br. J. Rheumatol.* 33 (1994) 909-916

Jones, A.K.P., Kitchen, N.D., Watabe, H., Cunningham, V.J., Jones, T., Luthra, S.K., Thomas, D.G.T. Measurement of changes in opioid receptor binding in vivo during trigeminal neuralgic pain using [ $^{11}\text{C}$ ] diprenorphine and positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19 (1999) 803-808

Jordan, B.A., Cvejic, S., Devi, L.A. Opioids and their complicated receptor complexes. *Neuropsychopharmacology.* 23 (2000) 5-18

Jordan, B.A., Trapaidze, N., Gomes, I., Nivarthi, R., Devi, L.A. Oligomerization of opioid receptors with  $\beta$ 2-adrenergic receptors: A role in trafficking and mitogen-activated protein kinase activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98 (2001) 343-348

Knapp, R.J., Malatynska, E., Collins, N., Fang, L., Wang, J.Y., Hruby, V.J., Roeske, W.R., Yamamura, H.I. Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *FASEB.* 9 (1995) 516-525

Kupers, R.C., Konings, H., Adriaensen, H., Gybels, J.M. Morphine differentially affects the sensory and affective pain ratings in neurogenic and idiopathic form of pain. *Pain.* 47 (1991) 5-12

Lee, M.C., Cahill, C.M., Vincent, J.P., Beaudet, A. Internalization and trafficking of opioid receptor ligands in rat cortical neurons. *Synapse.* 43 (2002) 102-111

Levac, B.A.R., O'Dowd, B.F., George, S.R. Oligomerization of opioid receptors: Generation of novel signaling units. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2 (2002) 76-81

Luthra, S.K., Brady, F., Turton, D.R., Brown, D.J., Douwsett, K., Walters, S.L., Jones, A.K.P., Matthews, R.W., Crowder, J.C. Automated radiosynthesis of [6-O-Methyl-<sup>11</sup>C]diprenorphine and [6-O-Methyl-<sup>11</sup>C]buprenorphine from 3-O-trityl protected precursors. *Appl. Radiat. Isot.* 45 (1994) 857-873

McConlogue, K., Grady, E.F., Minnis, J., Balestra, B., Tonini, M., Brecha, N.C., Bunnett, N.W., Sternini, C. Activation and internalization of the  $\mu$ -opioid-receptor by the newly discovered agonists, endomorphin-1 and endomorphin-2. *Neuroscience.* 90 (1999) 1051-1059

Minami, M., Satoh, M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci. Res.* 23 (1995) 121-145

Oyama, T., Jin, T., Yamaya, R., Ling, L., Guillemin, R. Profound analgesic effects of  $\beta$ -endorphin in man. *Lancet.* 1 (1980) 122-124

Panerai, A.E., Sacerdote, P., Bianchi, M., Brini, A., Mantegazza, P. Brain and spinal cord neuropeptides in adjuvant induced arthritis in rats. *Life Sci.* 41 (1987) 1297-1303

Pasternak, G.W., Wood, P.J. Multiple mu opiate receptors. *Life Sci.* 38 (1986) 1889-1898

Paul, D., Gauthier, C.A., Minor, L.D., Gonzales, G.R. The effect of postmortem delay on mu, delta and kappa opioid receptor subtypes in rat brain and guinea pig cerebellum evaluated by radioligand receptor binding. *Life Sci.* 20 (1997) 1993-1998

Pert, C.B., Snyder, S.H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science.* 179 (1973) 1011-1014

Pert, C.B., Kuhar, M.J., Snyder, S.H. Opiate receptor: Autoradiographic localization in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73 (1976) 3729-3733

Peyron, R., Laurent, B., García-Larrea, L. Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis. *Neurophysiol. Clin.* 30 (2000) 263-288

Pfeiffer, M., Koch, T., Schroder, H., Laugsch, M., Holtt, V., Schulz, S. Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization and desensitization. *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 19762-19772

Piccini, P., Weeks, R.A., Brooks, D.J. Alterations in opioid receptor binding in Parkinson's disease patients with levodopa-induced dyskinesias. *Ann. Neurol.* 42 (1997) 720-726

Portoghese, P.S., Sultana, M., Nagase, H., Takemori, A.E. A highly selective  $\delta_1$ -opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone. *Eur. J. Pharmacol.* 218 (1992) 195-196

Price, D.D., Von der Gruen, A., Miller, J., Rafii, A., Price, C. A psychophysical analysis of morphine analgesia. *Pain.* 22 (1985) 261-269

Price, D.D., Harkins, S.W., Rafii, A., Price, C. A simultaneous comparison of fentanyl's analgesic effects on experimental and clinical pain. *Pain.* 24 (1986) 197-203

Rainville, P., Duncan, G.H., Price, D.D., Carrier, B., Bushnell, M.C. Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex. *Science.* 277 (1997) 968-971

Ranger, N.T., Thompson, C.J., Evans, A.C. The application of a masked orbiting transmission source for attenuation correction in PET. *J. Nucl. Med.* 30 (1989) 1056-1068

Raynor, K., Kong, H., Chen, Y., Yasuda, K., Yu, L., Bell, G.I., Reisine, T.. Pharmacological characterization of the cloned  $\kappa$ -,  $\delta$ -, and  $\mu$ -opioid receptors. *Mol. Pharm.* 45 (1993) 330-334

Reisine, T. Opiate receptors. *Neuropharmacol.* 34 (1995) 463-472

Rinne, J.O., Burn, D.J., Mathias, C.J., Quinn, N.P., Marsden, C.D., Brooks, D.J. Positron emission tomography studies on the dopaminergic system and striatal opioid binding in the olivopontocerebellar atrophy variant of multiple system atrophy. *Ann. Neurol.* 37 (1995) 568-573

Rossi, G.C., Brown, G.P., Leventhal, L., Yang, K., Pasternak, G.W. Novel receptor mechanisms for heroin and morphine-6 $\beta$ -glucuronide analgesia. *Neurosci. Lett.* 216 (1996) 1-4

Sadzot, B., Price, J.C., Mayberg, H.S., Douglass, K.H., Dannals, R.F., Lever, J.R., Ravert, H.T., Wilson, A.A., Wagner, H.N. Jr., Feldman, M.A., Frost, J.J. Quantification of human opiate receptor concentration and affinity using high and low specific activity [ $^{11}\text{C}$ ]diprenorphine and positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 11 (1991) 204-219

Schadrack, J., Willoch, F., Platzer, S., Bartenstein, P., Mahal, B., Dworzak, D., Wester, H.J., Zieglgansberger, W., Tölle, T.R., Opioid receptors in the human cerebellum: evidence from [ $^{11}\text{C}$ ]diprenorphine PET, mRNA expression and autoradiography. *Neuroreport.* 10 (1999) 619-624

Seeger, T.F., Sforzo, G.A., Pert, C.B., Pert, A. In vivo autoradiography: Visualization of stress-induced changes in opiate receptor occupancy in the rat brain. *Brain Res.* 305 (1984) 303-311



Sewards, T.V., Sewards, M.A. The medial pain system: Neuronal representations of the motivational aspect of pain. *Brain Res. Bull.* 59 (2002) 163-180

Simon, E.J., Hiller, J.M., Edelman, I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [<sup>3</sup>H]etorphine to rat-brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 70 (1973) 1947-1949

Spetea, M., Rydelius, G., Nylander, I., Ahmed, M., Bileviciute-Ljungar, I., Lundeberg, T., Svensson, S., Kreicbergs, A. Alteration in endogenous opioid systems due to chronic inflammatory pain conditions. *Eur. J. Pharmacol.* 435 (2002) 245-252

Sprenger, T., Valet, M., Boecker, H., Henriksen, G., Willoch, F., Wagner, K., Schwaiger, M., Conrad, B., Tölle, T.R. Heat pain triggers [<sup>18</sup>F]-diprenorphine displacement in the limbic system. (2004) 1-5 submitted

Stafford, K., Gomes, A.B., Shen, J., Yoburn, B.C.  $\mu$ -opioid receptor downregulation contributes to opioid tolerance in vivo. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 69 (2001) 233-237

Talairach, J., Tournoux, P. (Ed.) In "Co-planar stereotactic atlas of the human brain", Georg Thieme Verlag, New York, 1988, 1-122

Terenius, L. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 33 (1973) 377-384

Tölle, T.R., Kaufmann, T., Siessmeier, T., Lautenbacher, S., Berthele, A., Munz, F., Zieglgänsberger, W., Willoch, F., Schwaiger, M., Conrad, B., Bartenstein, P. Region-specific encoding of sensory and affective components of pain in the human brain: a positron emission tomography correlation analysis. *Ann. Neurol.* 45 (1999) 40-47

Vogt, B.A., Watanabe, H., Grootenk, S., Jones, A.K.P. Topography of diprenorphine binding in human cingulate gyrus and adjacent cortex derived from coregistered PET and MR images. *Human Brain Mapping*. 3 (1995) 1-12

Weeks, R.A., Cunningham, V.J., Piccini, P., Waters, S., Hardin, A.E., Brooks, D.J. <sup>11</sup>C-Diprenorphine Binding in Huntington`s Disease: A Comparision of Region of Interest Analysis with Statistical Parametric Mapping. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 (1997) 943-949

Weisenberg, M. Cognitive aspects of pain. In “Textbook of Pain”, Wall, P.D., Melzack, R. (Ed), Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York, 1984, 162-172

Wester, H.J., Willoch, F., Tölle, T.R., Munz, F., Herz, M., Oye, I., Schadrack, J., Schwaiger, M., Bartenstein, P. 6-O-(2-[<sup>18</sup>F]fluoroethyl)-6-O-desmethyldiprenorphine ([<sup>18</sup>F]DPN): synthesis, biologic evaluation, and comparison with [<sup>11</sup>C]DPN in humans. *J. Nucl. Med.* 41 (2000) 1279-1286

Whitehouse, P.J., Lynch, D., Kuhar, M.J. Effects of postmortem delay and temperature on neurotransmitter receptor binding in a rat model of the human autopsy process. *J. Neurochem.* 43 (1984) 553-559

Wiech, K., Preißl, H., Birbaumer, N. Neuronale Netzwerke und Schmerzverarbeitung: Ergebnisse bildgebender Verfahren. *Anaesthesist*. 50 (2001) 2-12

Willoch, F., Schindler, F., Wester, H.J., Empl, M., Straube, A., Schwaiger, M., Conrad, B., Tölle, T.R. Central poststroke pain and reduced opioid receptor binding within pain processing circuitries: a <sup>11</sup>C-diprenorphine PET study. *Pain*. 108 (2004) 213-220

Wolozin, B.L., Pasternak, G.W. Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78 (1981) 6181-6185

Young, W.S., Kuhar, M.J., A new method for receptor autoradiography: [<sup>3</sup>H]Opioid receptors in rat brain. *Brain Res.* 179 (1979) 255-270

Zadina, J.E., Hackler, L., Ge, L.J., Kastin, A.J. A potent and selective endogenous agonist for the  $\mu$ -opiate receptor. *Nature.* 386 (1997) 499-502

Zangen, A., Herzberg, U., Vogel, Z., Yadid, G. Nociceptive stimulus induces release of endogenous  $\beta$ -endorphin in the rat brain. *Neuroscience.* 85 (1998) 659-662

Zubieta, J.K., Dannals, R.F., Frost, J.J. Gender and age influences on human brain mu-opioid receptor binding measured by PET. *Am. J. Psychiatry.* 156 (1999) 842-848

Zubieta, J.K., Smith, Y.R., Bueller, J.A., Xu, Y., Kilbourn, M.R., Jewett, D.M., Meyer, C., Koeppe, R.A., Stohler, C.S. Regional Mu Opioid Receptor Regulation of Sensory and Affective Dimensions of Pain. *Science.* 293 (2001) 311 – 315

## Kapitel 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn *Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. T.R. Tölle* für die interessante Themenstellung meiner Doktorarbeit sowie die freundschaftliche Aufnahme in das Team der Schmerzforschung im Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München bedanken.

Ich danke Herrn *Prof. Dr. B. Conrad* und Herrn *Prof. Dr. M. Schwaiger* für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in der Neurologischen und Nuklearmedizinischen Klinik am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München durchführen zu können.

Besonders großer Dank gilt Herrn *PD Dr. med. Achim Berthele*, der für mich als Betreuer meiner Doktorarbeit jederzeit ansprechbar war und mir bei der Daten-Auswertung, deren Interpretation und dem Zusammenschreiben der Arbeit enorm geholfen hat.

Dies gilt auch für Herrn *Dr. med. S. Platzer*, insbesondere für seine enorme Hilfe bei der post mortem Rezeptorautoradiographie, deren Auswertung und Interpretation.

Ich danke Herrn *Dr. med. F. Willoch* für die Einführung in das Themengebiet der Positronen-Emissions-Tomographie und die anfängliche Betreuung des nuklearmedizinischen Teils der Doktorarbeit.

Ich danke Herrn *Prof. Dr. med. H.-J. Wester* und seinem Team für die aufwendige Synthese von [ $^{11}\text{C}$ ]DPN.

Vielen Dank auch meinem Mitdoktoranden *F. Schindler* für die Hilfe bei der PET-Datenanalyse.

Danke an die radiologisch-technischen Assistentinnen des PET-Labors Frau *B. Dzewas* und *C. Kruschke*, die bei der praktischen Durchführung der Experimente sehr hilfreich waren.

Danke allen *Mitarbeitern* der Neurologischen und Nuklearmedizinischen Klinik, die direkt oder indirekt an der Erstellung dieser Dissertation beteiligt waren

Danke an alle *Probanden* für die Teilnahme an der Studie.

Herzlichen Dank an meine *Eltern*, die mir das Studium und somit diese Doktorarbeit ermöglicht haben.

Zuletzt herzlichen Dank an meine Frau *Jasmin* für die phantastischen gemeinsamen Jahre und die Unterstützung in dieser Zeit.