

**Aus dem Fachbereich Pharmakologie  
der Präklinischen Forschung  
der Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co. KG, Karlsruhe**

**eingereicht über das  
Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Entwicklung und pharmakologische  
Charakterisierung eines experimentellen Modells für  
somatoforme und funktionelle Schmerzsyndrome**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Enrico Schramm  
Tierarzt  
aus Zeitz**

**Berlin 2013**

**Journal-Nr.: 3612**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink  
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Michael Habs  
Dritter Gutachter: PD Dr. Kerstin Müller

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

pharmacology, stress, stress condition, pain, corticosterone, receptors,  
somatoform disorders, animal testing alternatives, immobilization, ketamine,  
methadone, non-steroidal antiinflammatory agents, antidepressants

Tag der Promotion: 12.06.2013

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-327-1

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Coverbild vorne © intheskies - Fotolia.com

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2013

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – [www.menschundbuch.de](http://www.menschundbuch.de)

**In tiefer Dankbarkeit für meine Eltern**



<b>I.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>II.</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>III.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XII</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Literaturübersicht .....</b>	<b>2</b>
<b>2.1.</b>	<b>Stress .....</b>	<b>2</b>
2.1.1.	Stress und Stresstheorien.....	2
2.1.2.	Neuroanatomische und neuroendokrinologische Grundlagen.....	3
2.1.3.	Neurotransmitter im Zusammenhang mit Stress .....	5
2.1.3.1.	Corticotropin-Releasing-Hormon.....	5
2.1.3.2.	Adrenokorticotrophes Hormon .....	6
2.1.3.3.	Glucocorticoide.....	6
2.1.3.4.	Noradrenalin und Adrenalin .....	7
2.1.4.	Biorhythmik der HPA-Achse .....	8
2.1.5.	Systemische Stresswirkungen .....	10
2.1.6.	Chronizität des Stressses.....	11
2.1.7.	Experimentelle Stressmodelle .....	12
2.1.7.1.	Milde Stressoren.....	12
2.1.7.2.	Immobilisationsstress .....	13
2.1.7.3.	Kältestress.....	13
2.1.7.4.	Schmerzstress.....	14
2.1.7.5.	Schwimmstress .....	14
2.1.7.6.	Elektro-Schockstress .....	14
2.1.7.7.	Sozialer Stress .....	15
2.1.7.8.	Isolationsstress.....	15
2.1.7.9.	Jäger-Beute-Stress.....	16
2.1.7.10.	Lärmstress.....	16
2.1.7.11.	Kombination von Stressoren.....	16
2.1.7.12.	Unvorhersehbarer Stress.....	16
<b>2.2.</b>	<b>Nozizeptives System .....</b>	<b>17</b>
2.2.1.	Definition Schmerz und Nozizeption .....	17
2.2.2.	Neuroanatomische Grundlagen .....	17
2.2.3.	Rezeptoren und Neurotransmitter.....	20
2.2.3.1.	Transiente Rezeptorpotentialkanäle .....	20
2.2.3.2.	Glutamat und NMDA-Rezeptoren .....	20
2.2.4.	Hyperalgesie.....	21
2.2.4.1.	Hyperalgesieformen.....	21
2.2.4.2.	Periphere Sensibilisierung von Nozizeptoren.....	22
2.2.4.3.	Verstärkung der synaptischen Übertragung.....	22

2.2.4.4.	Hemmung der spinalen Interneurone.....	23
2.2.4.5.	Spinale Mikrogliazellen .....	24
2.2.4.6.	Hemmung der supraspinalen Steuerung.....	24
2.2.5.	Messung des Schmerzes.....	24
2.2.5.1.	Tests basierend auf elektrischer Stimulation.....	25
2.2.5.2.	Tests basierend auf mechanischer Stimulation.....	26
2.2.5.3.	Tests basierend auf thermischer Stimulation .....	26
2.2.5.4.	Tests basierend auf chemischer Reizung .....	28
<b>2.3.</b>	<b>Auswirkung von Stress auf die Nozizeption.....</b>	<b>29</b>
2.3.1.	Allgemein.....	29
2.3.2.	Mechanismen .....	29
2.3.2.1.	Stress-induzierte Analgesie .....	29
2.3.2.2.	Stress-induzierte Hyperalgesie .....	30
2.3.3.	Tiermodelle der Stress-induzierten Analgesie.....	30
2.3.3.1.	Akute Stress-induzierte Analgesie .....	30
2.3.4.	Tiermodelle der Stress-induzierten Hyperalgesie.....	31
2.3.4.1.	Akute Stress-induzierte Hyperalgesie .....	31
2.3.4.2.	Wiederholte Schwimmstress-induzierte Hyperalgesie.....	31
2.3.4.3.	Wiederholte Sozialstress-induzierte Hyperalgesie .....	32
2.3.4.4.	Chronische Immobilisationsstress-induzierte Hyperalgesie.....	32
2.3.4.5.	Wiederholte Neuigkeitsstress-induzierte Hyperalgesie .....	33
2.3.4.6.	Wiederholte Lärmstress-induzierte Hyperalgesie.....	33
2.3.4.7.	Chronische Kältestress-induzierte Hyperalgesie.....	33
2.3.4.8.	Stress-induzierte viszerale Hyperalgesie .....	34
<b>2.4.</b>	<b>Somatoforme und funktionelle Schmerzsyndrome des Menschen .....</b>	<b>36</b>
2.4.1.	Allgemein.....	36
2.4.2.	Fibromyalgie .....	37
2.4.2.1.	Definition, Symptome und Epidemiologie.....	37
2.4.2.2.	Pathomechanismen .....	37
2.4.2.3.	Rolle von Stress bei Fibromyalgie-Patienten.....	38
2.4.2.4.	Therapiemöglichkeiten.....	39
2.4.3.	Reizdarmsyndrom .....	40
2.4.3.1.	Definition, Symptome und Prävalenz .....	40
2.4.3.2.	Pathomechanismen und Beteiligung von Stress .....	40
2.4.3.3.	Therapiemöglichkeiten.....	40
2.4.4.	Chronischer Spannungskopfschmerz .....	41
2.4.4.1.	Definition, Symptome.....	41
2.4.4.2.	Pathomechanismen und Beteiligung von Stress .....	41
2.4.4.3.	Therapiemöglichkeiten.....	41
<b>3.</b>	<b>Zielsetzungen und Versuchsabschnitte.....</b>	<b>42</b>

<b>4.</b>	<b>Eigene Untersuchungen.....</b>	<b>44</b>
<b>4.1.</b>	<b>Einfluss des Stressverlaufs auf die Nozizeption .....</b>	<b>44</b>
4.1.1.	Einleitung.....	44
4.1.2.	Material und Methoden .....	45
4.1.2.1.	Versuchstiere.....	45
4.1.2.2.	Stressmethodik.....	46
4.1.2.3.	Nozizeptionsmessungen.....	47
4.1.2.4.	Versuchsablauf.....	49
4.1.2.5.	Statistische Auswertung .....	51
4.1.3.	Ergebnisse .....	52
4.1.3.1.	Einfluss von einmaligem Immobilisationsstress auf die Nozizeption .....	52
4.1.3.2.	Einfluss von 7-maligem Immobilisationsstress auf die Nozizeption .....	54
4.1.3.3.	Einfluss von 14-maligem Immobilisationsstress auf die Nozizeption .....	56
4.1.4.	Diskussion .....	59
<b>4.2.</b>	<b>Charakterisierung der Stressreaktion und -wirkung von 14-maligen Immobilisationsstress .....</b>	<b>62</b>
4.2.1.	Einleitung.....	62
4.2.2.	Material und Methoden .....	63
4.2.2.1.	Versuchsablauf.....	63
4.2.2.2.	Klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungen.....	64
4.2.2.3.	Bestimmung des Nebennierengewichts .....	64
4.2.2.4.	Statistische Auswertung .....	64
4.2.3.	Ergebnisse .....	65
4.2.3.1.	Einfluss auf das Körpergewicht.....	65
4.2.3.2.	Einfluss auf die Nebennierengewichte .....	66
4.2.3.3.	Einfluss auf den Futter- und Trinkwasserverbrauch .....	67
4.2.3.4.	Einfluss auf die klinisch-chemischen Blutwerte .....	68
4.2.3.5.	Einfluss auf das rote Blutbild.....	69
4.2.3.6.	Einfluss auf das weiße Blutbild .....	71
4.2.4.	Diskussion .....	73
<b>4.3.</b>	<b>Vergleichende Untersuchungen von Immobilisationsstress und oraler Corticosteron-Aufnahme.....</b>	<b>77</b>
4.3.1.	Einleitung.....	77
4.3.2.	Material und Methoden .....	78
4.3.2.1.	Versuchsbedingungen .....	78
4.3.2.2.	Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser .....	79
4.3.2.3.	Klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungen.....	79
4.3.2.4.	Nebennierengewinnung und -konservierung.....	80
4.3.2.5.	Histologische Untersuchung der Nebennieren .....	80
4.3.2.6.	Versuchsablauf.....	81

4.3.2.7.	Statistische Auswertung .....	82
4.3.3.	Ergebnisse .....	83
4.3.3.1.	Einfluss auf die mechanische Schmerzwahrnehmung .....	83
4.3.3.2.	Einfluss auf das Körpergewicht.....	85
4.3.3.3.	Einfluss auf den Futter- und Trinkwasserverbrauch .....	86
4.3.3.4.	Einfluss auf die Nebennierengewichte .....	89
4.3.3.5.	Einfluss auf die Nebennierenhistologie .....	90
4.3.3.6.	Einfluss auf klinisch-chemische Blutwerte.....	96
4.3.3.7.	Einfluss auf das rote Blutbild.....	100
4.3.3.8.	Einfluss auf das weiße Blutbild .....	102
4.3.4.	Diskussion .....	106
<b>4.4.</b>	<b>Einfluss von Immobilisationsstress und oraler Corticosteron-Aufnahme auf die Glucocorticoid-Rezeptoren .....</b>	<b>112</b>
4.4.1.	Einleitung.....	112
4.4.2.	Material und Methoden .....	114
4.4.2.1.	Versuchsaufbau.....	114
4.4.2.2.	Gewinnung und Kultivierung von Milz-Lymphozyten .....	114
4.4.2.3.	Lymphozytentransformationstest .....	117
4.4.2.4.	Durchflusszytometrie .....	117
4.4.2.5.	Proteinbestimmung.....	118
4.4.2.6.	Gel-Elektrophorese.....	118
4.4.2.7.	Western-Blot mit Immunfärbung .....	119
4.4.2.8.	Statistische Auswertung .....	120
4.4.3.	Ergebnisse .....	121
4.4.3.1.	Bestätigung der mechanischen Hyperalgesie .....	121
4.4.3.2.	Einfluss auf die Hemmung der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation.....	123
4.4.3.3.	Einfluss auf die Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte von Milz-Lymphozyten .....	125
4.4.4.	Diskussion .....	128
<b>4.5.</b>	<b>Pharmakologische Beeinflussung der induzierten Hyperalgesie .....</b>	<b>132</b>
4.5.1.	Einleitung.....	132
4.5.2.	Material und Methoden .....	133
4.5.2.1.	Versuchsbedingungen .....	133
4.5.2.2.	Pharmakologische Substanzen .....	133
4.5.2.3.	Versuchsaufbau.....	134
4.5.2.4.	Statistische Auswertung .....	135
4.5.3.	Ergebnisse .....	136
4.5.3.1.	Nozizeptionsmessungen bei Behandlung und Immobilisationsstress.....	136
4.5.3.2.	Nozizeptionsmessungen bei Behandlung und Corticosteron-Aufnahme .....	140
4.5.3.9.	AUC der Substanzwirkungen im Zeitraum von 4 h nach Applikation.....	144
4.5.4.	Diskussion .....	146

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>148</b>
<b>6.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>150</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturangaben .....</b>	<b>152</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>176</b>
8.1.	Verwendete Lösungen.....	176
8.2.	Vorveröffentlichungen.....	178
8.3.	Danksagung .....	179
8.4.	Eigenständigkeitserklärung.....	180

# I. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Zentrale Strukturen der Stressreaktion.....	5
<b>Abb. 2:</b> Konzentrationsabhängigkeit der Glucocorticoid-Rezeptor-Wirkungen .....	9
<b>Abb. 3:</b> Zentrale Strukturen des Schmerzsystems .....	19
<b>Abb. 4:</b> Mögliche Mechanismen der Stress-induzierten Hyperalgesie.....	35
<b>Abb. 5:</b> Plexiglasröhre mit Verschluss vom Typ „Brome Rodent Restrainer“ .....	46
<b>Abb. 6:</b> Randall-Selitto-Apparat .....	47
<b>Abb. 7:</b> Tail-Flick-Gerät.....	48
<b>Abb. 8:</b> Versuchsablauf zum Einfluss des Stressverlaufs auf die Nozizeption.....	50
<b>Abb. 9:</b> Reaktionsschwellen im Randall-Selitto-Test (einmaliger Immobilisationsstress)....	52
<b>Abb. 10:</b> Reaktionszeiten im Tail-Flick-Test (einmaliger Immobilisationsstress).....	53
<b>Abb. 11:</b> Reaktionsschwellen im Randall-Selitto-Test (7-maliger Immobilisationsstress). ...	54
<b>Abb. 12:</b> Reaktionszeiten im Tail-Flick-Test (7-maliger Immobilisationsstress). .....	55
<b>Abb. 13:</b> Reaktionsschwellen im Randall-Selitto-Test (14-maliger Immobilisationsstress) ..	56
<b>Abb. 14:</b> Reaktionszeiten im Tail-Flick-Test (14-maliger Immobilisationsstress). .....	57
<b>Abb. 15:</b> Vergleich der Veränderungen der Schmerzschwellen .....	58
<b>Abb. 16:</b> Versuchsablauf zur Charakterisierung der Stressreaktion und -wirkung .....	63
<b>Abb. 17:</b> Verlauf der Körpergewichtsentwicklung. ....	65
<b>Abb. 18:</b> Absolute Gewichte von beiden Nebennieren. ....	66
<b>Abb. 19:</b> Absolutes Gewicht der verbrauchten Futter- und Trinkwassermenge .....	67

<b>Abb. 20:</b> Relatives Gewicht (g/g) der verbrauchten Trinkwasser- und Futtermenge.....	68
<b>Abb. 21:</b> Blut-Glucose-Spiegel.....	69
<b>Abb. 22:</b> Erythrozytengehalt, Hämoglobingehalt, Hämatokritgehalt im EDTA-Vollblut.....	70
<b>Abb. 23:</b> Leukozyten- und Lymphozytengehalt im EDTA-Vollblut.....	71
<b>Abb. 24:</b> Gehalt an eosinophilen- und basophilen Granulozyten im EDTA-Vollblut.....	72
<b>Abb. 25:</b> Gehalt an neutrophilen Granulozyten und Monozyten im EDTA-Vollblut .....	72
<b>Abb. 26:</b> Versuchsablauf zum Vergleich von Immobilisationsstress & Corticosteron.....	82
<b>Abb. 27:</b> Reaktionsschwellen im Randall-Selitto-Test .....	83
<b>Abb. 28:</b> Reaktionsschwellen-Differenzen im Randall-Selitto-Test.....	84
<b>Abb. 29:</b> Verlauf der Körpergewichtsentwicklung .....	85
<b>Abb. 30:</b> Absolutes Gewicht der verbrauchten Futtermenge .....	86
<b>Abb. 31:</b> Absolutes Gewicht der verbrauchten Trinkwassermenge. ....	87
<b>Abb. 32:</b> Relatives Gewicht der verbrauchten Futtermenge/Tiergewicht. ....	88
<b>Abb. 33:</b> Relatives Gewicht der verbrauchten Trinkwassermenge/Tiergewicht. ....	88
<b>Abb. 34:</b> Absolute Gewichte von beiden Nebennieren. ....	89
<b>Abb. 35:</b> Relative Gewichte von beiden Nebennieren. ....	90
<b>Abb. 36:</b> Übersicht der Nebennierenquerschnitte.....	92
<b>Abb. 37:</b> Nebennierenrinde eines Wasser-Kontrolltieres.....	93
<b>Abb. 38:</b> Nebennierenrinde eines Ethanol-Kontrolltieres.....	93
<b>Abb. 39:</b> Nebennierenrinde eines Tieres aus der Corticosteron-50-Gruppe. ....	94

<b>Abb. 40:</b> Nebennierenrinde eines Tieres aus der Corticosteron-150-Gruppe. ....	94
<b>Abb. 41:</b> Nebennierenrinde eines Tieres aus der Corticosteron-400-Gruppe. ....	95
<b>Abb. 42:</b> Nebennierenrinde eines Tieres aus der Immobilisationsstress-Gruppe. ....	95
<b>Abb. 43:</b> Corticosteron-Gehalts im EDTA-Plasma.....	96
<b>Abb. 44:</b> ACTH-Konzentration im EDTA-Plasma. ....	97
<b>Abb. 45:</b> Glucose-Gehalts im Vollblut. ....	98
<b>Abb. 46:</b> Insulin-Gehalt im EDTA-Plasma. ....	99
<b>Abb. 47:</b> Erythrozytengehalt im EDTA-Vollblut.....	100
<b>Abb. 48:</b> Hämoglobin-Gehalt im EDTA-Vollblut.....	101
<b>Abb. 49:</b> Hämatokrit-Gehalt im EDTA-Vollblut .....	101
<b>Abb. 50:</b> Leukozyten-Gehalt im EDTA-Vollblut.....	102
<b>Abb. 51:</b> Lymphozyten-Gehalts im EDTA-Vollblut.....	103
<b>Abb. 52:</b> Monozyten-Gehalt im EDTA-Vollblut .....	103
<b>Abb. 53:</b> Gehalt an basophilen Granulozyten im EDTA-Vollblut. ....	104
<b>Abb. 54:</b> Gehalts an eosinophilen Granulozytenim EDTA-Vollblut .....	105
<b>Abb. 55:</b> Gehalts an neutrophilen Granulozyten im EDTA-Vollblut.....	105
<b>Abb. 56:</b> Prinzip des Lymphozytentransformationstest.....	113
<b>Abb. 57:</b> Versuchsablauf zur Untersuchung des Glucocorticoid-Rezeptors.....	115
<b>Abb. 58:</b> Reaktionsschwellen (Immobilisationsstress) zur GR-Sensitivitätsbestimmung. ...	121
<b>Abb. 59:</b> Reaktionsschwellen (Corticosteron) zur GR-Sensitivitätsbestimmung .....	122

<b>Abb. 60:</b> Reaktionsschwellen (Immobilisationsstress) zur GR-Dichtebestimmung.. .....	122
<b>Abb. 61:</b> Reaktionsschwellen (Corticosteron) zur GR-Dichtebestimmung.....	123
<b>Abb. 62:</b> Relative Proliferationsveränderung der Lymphozyten (LPS/Corticosteron).....	124
<b>Abb. 63:</b> Relative Proliferationsveränderung der Lymphozyten (ConA/Corticosteron).....	124
<b>Abb. 64:</b> Mittlere Fluoreszenzintensität der GR nach Immobilisationsstress. ....	125
<b>Abb. 65:</b> Mittlere Fluoreszenzintensität der GR nach Corticosteron-Aufnahme.....	126
<b>Abb. 66:</b> Protein-Banden von GR und $\beta$ -Actin nach Immobilisationsstress. ....	127
<b>Abb. 67:</b> Graustufen-Intensität der Protein-Banden nach Immobilisationsstress. ....	127
<b>Abb. 68:</b> Protein-Banden von GR und $\beta$ -Actin nach Corticosteron-Aufnahme.....	128
<b>Abb. 69:</b> Graustufen-Intensität der Protein-Banden nach Corticosteron-Aufnahme.....	128
<b>Abb. 70:</b> Versuchsablauf zur pharmakologischen Beeinflussung der Hyperalgesie .....	134
<b>Abb. 71:</b> Reaktionsschwellen (Handling-Kontrolle) bei Behandlung mit Agar.....	137
<b>Abb. 72:</b> Reaktionsschwellen (Immobilisationsstress) bei Behandlung mit Agar. ....	138
<b>Abb. 73:</b> Reaktionsschwellen (Immobilisationsstress) bei Behandlung mit Diclofenac .....	138
<b>Abb. 74:</b> Reaktionsschwellen (Immobilisationsstress) bei Behandlung mit Ketamin.....	139
<b>Abb. 75:</b> Reaktionsschwellen (Immobilisationsstress) bei Levomethadon-Behandlung.....	139
<b>Abb. 76:</b> Reaktionsschwellen (Immobilisationsstress) bei Behandlung mit Milnacipran.....	140
<b>Abb. 77:</b> Reaktionsschwellen (Ethanol-Kontrolle) bei Behandlung mit Agar.....	141
<b>Abb. 78:</b> Reaktionsschwellen (Corticosteron) bei Behandlung mit Agar.....	142
<b>Abb. 79:</b> Reaktionsschwellen (Corticosteron) bei Behandlung mit Diclofenac.....	142

**Abb. 80:** Reaktionsschwellen (Corticosteron) bei Behandlung mit Ketamin. ....143

**Abb. 81:** Reaktionsschwellen (Corticosteron) bei Levomethadon-Behandlung.....143

**Abb. 82:** Reaktionsschwellen (Corticosteron) bei Behandlung mit Milnacipran. ....144

**Abb. 83:** AUC der Reaktionsschwellen (Immobilisationsstress). ....145

**Abb. 84:** AUC der Reaktionsschwellen (Corticosteron).....145

## II. Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Zusammenfassung der Auswirkungen von Stress auf einen Organismus .....	10
<b>Tab. 2:</b> Übersicht der Versuchsgruppen von Versuchsabschnitt 1 .....	49
<b>Tab. 3:</b> Übersicht der Versuchsgruppen von Versuchsabschnitt 3 .....	81
<b>Tab. 4:</b> Übersicht der Gewichtsdaten der abgebildeten Nebennieren.....	91
<b>Tab. 5:</b> Übersicht der Versuchsteile und -gruppen von Versuchsabschnitt 4 .....	116
<b>Tab. 6:</b> Übersicht der angewandten pharmakologischen Substanzen .....	134
<b>Tab. 7:</b> Übersicht der Versuchsgruppen von Versuchsabschnitt 5a.....	135
<b>Tab. 8:</b> Übersicht der Versuchsgruppen von Versuchsabschnitt 5b.....	135

### III. Abkürzungsverzeichnis

5-HT	Serotonin
Ach	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
ADR	Adrenalin
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure
Amy	Amygdala
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of variance)
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Fläche unter der Kurve (Area under the curve)
AVP	Arginin-Vasopressin
BDNF	Brain derived neurotrophic factor
BG	Bindegewebe
BST	Bed-Kern des Stria Terminalis
cAMP	cyclo-Adenosinmonophosphat
CB	Cannabinoid
CGRP	Calcitonin gene related peptide
CiH	Corticosteron-induzierte Hyperalgesie
CLIA	Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assay
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
ConA	Concanavalin-A
CPM	Zerfälle pro Minute (Counts per minute)
CRH	Corticotropin-releasing-Hormone
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNIC	Diffuse noxious inhibitory control
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay
EPSP	Exzitatorisches postsynaptisches Potential
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FDA	Food and drug administration
FR	Formatio reticularis
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GC	Glucocorticoide

Glut	Glutamat
GR	Glucocorticoid-Rezeptor
GRE	Glucocorticoid-response-element
GyC	Gyrus cinguli
HBSS	Hank's balanced salt solution
HC	Hippocampus
HE	Hämatoxylin-Eosin
HP	Hypophyse
HPA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebenniere
IASP	International Association for the Study of Pain
LC	Locus Coeruleus
ldTK	laterale dorsale Tegmentum-Kerne
Limb	Limbisches System
LPS	Lipopolysaccharid
LTP	Langzeitpotenzierung (Long-term potentiation)
LTT	Lymphozyten-Transformations-Test
MAO	Monoaminoxidase
mGlutR	metabotroper Glutamatrezeptor
mpfC	medialer präfrontaler Cortex
MR	Mineralocorticoid-Rezeptor
MW	Arithmetisches Mittel
NA	Noradrenalin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NP	Nucleus parabrachialis
p	Wahrscheinlichkeit
pfC	prefrontaler Cortex
p.o.	per os
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
pH	pondus Hydrogenii
POMC	Proopiomelanocortin
PVN	Paraventriculäres Kerngebiet
RIA	Radio-Immuno-Assay
RK	Raphe Kerne
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

RS	Restraint-Stress
RVM	Rostrale ventromediale Medulla
SD	Standardabweichung
SNRI	Serotonine-noradrenaline reuptake inhibitor
ssC	sekundärer somatosensorischer Cortex
ST	Stria Terminalis
Th	Thalamus
TBST	Tris-Buffered Saline Tween-20
TRP	Transienter Rezeptorpotentialkanal
US	Untersuchung
WB	Western-Blot
WDR	Wide Dynamic Range
ZG	Zentrales Höhlengrau

# 1. Einleitung

Jeder Organismus befindet sich in einem dynamischen Gleichgewichtszustand. Wird diese Homöostase durch aversive Stimuli (Stressoren) gestört, so empfindet der Körper dies als Stress. Die Einwirkung von Stress auf den Körper kann zu einer Beeinflussung der Schmerzperzeption und -verarbeitung führen. Je nach Art des Stressors, der Stressdauer und Methode der Schmerzerfassung können Analgesie (verminderte Schmerzsensitivität) oder Hyperalgesie (gesteigerte Schmerzsensitivität) auftreten. Es ist bekannt, dass eine Hyperalgesie vor allem durch chronische Stresseinwirkung ausgelöst werden kann. Wiederholter Stress stellt eine erhebliche Belastung des Organismus dar und verursacht Dysfunktionen an einer Reihe von Organsystemen. Solche Fehlregulationen spielen vermutlich eine wichtige Rolle im Zusammenhang mit der gestörten Schmerzverarbeitung bei somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen, wie z. B. der Fibromyalgie, dem Reizdarmsyndrom oder dem chronischen Spannungskopfschmerz.

Momentan wird angenommen, dass präklinische Tiermodelle der Stress-induzierten Hyperalgesie die beste Approximation zur Grundlagenuntersuchung dieser somatoformen Schmerzsyndrome darstellen. Allerdings sind die verantwortlichen Mechanismen sowohl in diesen Tiermodellen als auch erst recht im Menschen noch größtenteils unverstanden. Weiterhin existieren auch nur begrenzte therapeutische Möglichkeiten zur Behandlung von Patienten mit solchen somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen.

Zum besseren Verständnis des Krankheitsgeschehens und für die Entwicklung wirksamerer und verträglicherer neuer Arzneimittel zur Therapie von Schmerzsyndrompatienten sind deshalb validierte Tiermodelle erforderlich.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb die Entwicklung eines Versuchsmodells, bei dem durch wiederholte Stresseinwirkung ein hyperalgetischer Zustand hervorgerufen wird und das gleichzeitig zur pharmakologischen Prüfung und Charakterisierung von Pharmaka zur Behandlung von somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen verwendet werden kann.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1. Stress

#### 2.1.1. Stress und Stresstheorien

Stress, eine Reaktion der Körpers auf aversive Stimuli, ist bei der Betrachtung aus unterschiedlichen medizinisch-wissenschaftlichen Perspektiven sehr schwierig (Carrasco & Van De Kar, 2003) zu definieren. Die ersten Versuche zu einer Definition gehen auf Walter Cannon im Jahr 1929 zurück, obwohl er den Begriff Stress nie benutzte. Er griff das Konzept des inneren Milieus von Bernard von 1865 auf und entwickelte daraus das Prinzip der Homöostase. Dabei sollen sich bestimmte Körpersysteme selbst regulieren, wenn äußere Einflüsse auf den Organismus treffen. Gleichzeitig prägte Cannon dazu die „Fight or Flight“-Reaktion, bei welcher über eine sympathoadrenerge Aktivierung reflexartig Ausgleichsmaßnahmen und Anpassungen des inneren Milieus erfolgen, die die Wahrscheinlichkeit des Überlebens erhöhen sollen. Er beschrieb weiterhin, dass Adrenalin (ADR) über die Nebenniere und das sympathischen Nervensystems sezerniert wird (Le Moal, 2007).

Hans Selye, der Pionier der Stressforschung, bezeichnete Stress als eine unspezifische Antwort des Körpers auf jegliche Anforderung. Diese Reaktion stellte er als „Stress-Syndrom“ dar, welches durch eine „pathologische Trias“ (Nebennierenvergrößerung, gastrointestinale Blutungen und lymphatische Involution) gekennzeichnet ist (Selye, 1936). Diese Stressreaktion (generelle Anpassungsreaktion) unterteilte er weiterhin in 3 Phasen: Alarmreaktion, Resistenzphase und Erschöpfungsphase (Tod). Die Alarmreaktion entspricht der bereits erwähnten „Fight oder Flight“-Reaktion (Goldstein & Kopin, 2007). Er sprach dabei schon von einer sogenannten „Adaptationsenergie“, die jeder Organismus hat, gleichzeitig aber begrenzt ist und durch „genetische Faktoren“ unterschiedlich groß ist. Neben dieser allgemeinen Anpassung verursacht jeder Stressor zusätzliche, spezifische Reaktionen, welche aber seiner Meinung nach per se keine Reaktion auf den Stress darstellen. Die generelle Anpassungsreaktion steht unter den hormonellen Einfluss der Hypophysen-Nebennieren-Achse, über die das adrenocorticotrophe Hormon, Glucocorticoide und Vasopressin sezerniert werden. Das sympathoadrenerge System mit (Nor)Adrenalin besitzt dagegen in der Alarmphase eine Bedeutung (Selye, 1973). Weiterhin wird deutlich, dass die „Fight or Flight“-Reaktion bzw. die Alarmreaktion einen eher physiologischen Stress widerspiegeln, während mit andauernder Anpassungsreaktion ein eher pathologischer Zustand erreicht wird, durch den sogenannte „Anpassungskrankheiten“ auftreten können (Le Moal, 2007).

Selyes Theorie der unspezifischen Antwort hatte viele Kritiker und es konnte gezeigt werden, dass je nach Stressor unterschiedlichste endokrine Reaktionen hervorgerufen werden, Angst und Furcht jedoch als die Hauptfaktoren der unspezifischen Stressantwort gelten (Mason, 1971; 1975; Munck et al., 1984; Goldstein, 1995).

Einen völlig neuen Ansatz der Stresstheorie stellt das transaktionale Stressmodell von Lazarus (1974) dar. Statt wie bisher von der objektiven Beschaffenheit der Reize ausgehend, betrachtet er die Stresswirkung von der subjektiven Bewertung her. Diese beiden unterschiedlichen Betrachtungsweisen verknüpften Hennessy & Levine (1979) erstmals im psychoendokrिनologischen Stressmodell. Weitere Entdeckungen wie die des Corticotropin-Releasing-Hormons (CRH, Vale et al., 1981), der Nachweis von Corticosteron-Rezeptoren im Gehirn (Reul & de Kloet, 1985) und das erneute Aufgreifen der Homöostase-Doktrin prägen die aktuellen Definitionsansätze von Stress.

Jeder Organismus befindet sich danach in einem dynamischen Gleichgewicht, wird diese Homöostase durch physische oder psychische Stressoren bedroht, so empfindet dies der Körper unbewusst oder auch bewusst als Stress. Neurohumoral werden sowohl unspezifische als auch spezifische adaptive Reaktionen hervorgerufen, welche diese Homöostase wiederherstellen sollen. Die Reaktionen selbst sind dabei abhängig von der subjektiven Wahrnehmung, der kognitiven Verarbeitung und genetischen Polymorphismen (Goldstein & Kopin, 2007; Chrousos & Gold, 1992; Chrousos, 1998; 2009; de Kloet et al., 2005). Der Wiederherstellungsprozess des dynamischen Gleichgewichts wird dabei „Allostase“ genannt, die Überanspruchung dieser Wiederherstellung als „allostatische Belastung“ (McEwen, 2004; 2007).

## **2.1.2. Neuroanatomische und neuroendokrिनologische Grundlagen**

Potentiell stressvolle Stimuli werden je nach Art über spezifische periphere Rezeptoren perzipiert und über somato- bzw. viszerosensorische Bahnen weitergeleitet. Dabei kann einerseits eine initiale Reflexreaktion auf spinaler Ebene ausgelöst werden oder/und es erfolgt eine Weiterleitung zu supraspinalen Zentren, dem Hirnstamm bzw. dem limbischen System, was eine komplexe Stressreaktion verursacht. Das limbische System (Limb) und der mediale präfrontale Cortex (mpfC) nehmen dabei mit den wichtigen Strukturen wie der Amygdala (Amy), dem Stria Terminalis (ST), dem Hippocampus (HC) und dem Thalamus (Th) eine besondere Rolle ein (Abb. 1).

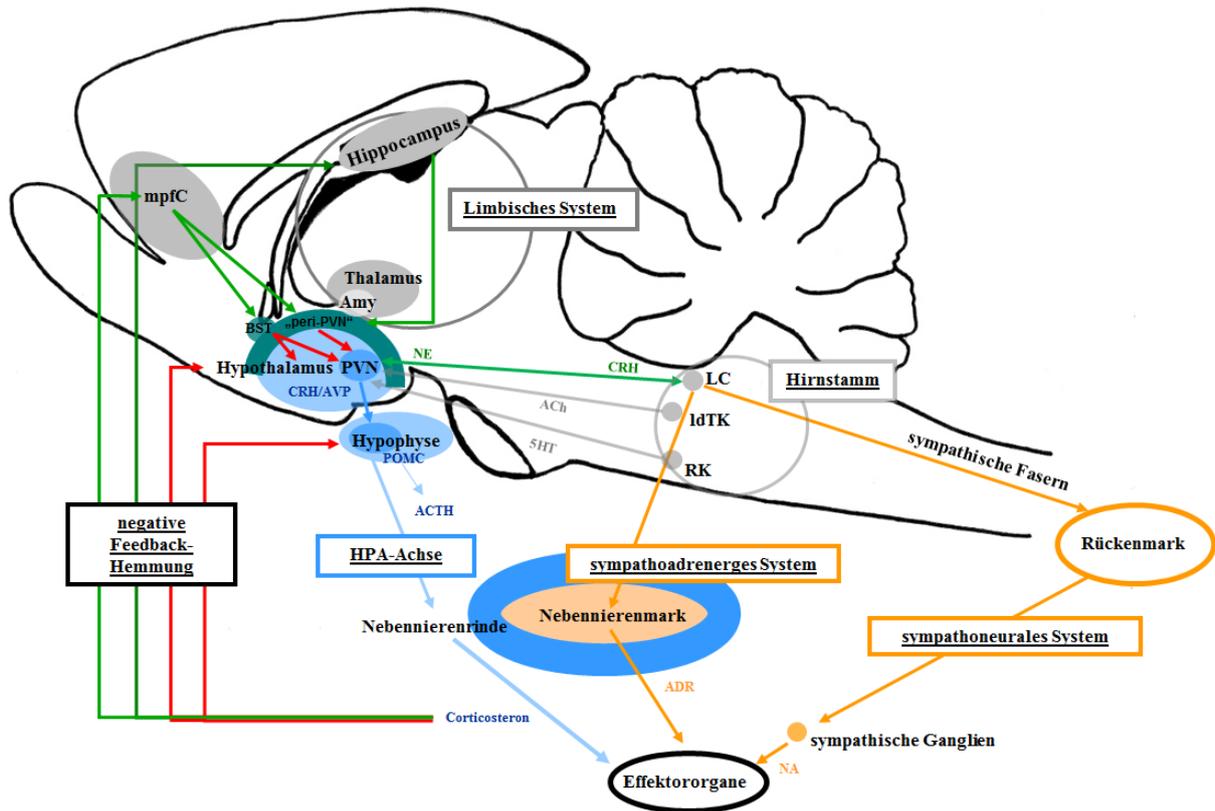
Die Amygdala hat eine wichtige Gedächtnisfunktion in Bezug auf vergangene Stressoren (Berretta, 2005) und wirkt über hemmende Verbindungen auf den Bed-Kern des Stria Terminalis (BST) (Herman et al., 2003). Die Amygdala erfährt dabei innerhalb des Vorderhirns modulierende Innervationen vom Hippocampus, medialen präfrontalen Cortex, (Berretta, 2005), Thalamus (Moga et al., 1995) und von den noradrenergen Kernen im Hirnstamm (Petrov et al., 1993).

Auch der Hippocampus erhält Innervationen von diesen noradrenergen Kernen (Loughlin et al., 1986) und vermittelt eine stressorspezifische indirekte Hemmwirkung auf die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HPA)-Achse (Herman & Cullinan, 1997), wodurch er sehr wichtig für die Anpassung an wiederholten Stress ist (Joëls et al., 2007). Dieselbe hemmende Wirkung hat auch der mediale präfrontale Cortex (Herman & Cullinan, 1997), der mit dem Hippocampus in Verbindung steht (Arnsten, 2009) und mit ihm glutamaterge

Afferenzen zu wiederum hemmenden Neuronen um das paraventriculäre Kerngebiet (PVN) des Hypothalamus (peri-PVN-Gebiet) besitzt (Herman et al., 2003).

Der mediale präfrontale Cortex steht zusätzlich mit der Amygdala in Verbindung und ist ebenso an Gedächtnisfunktionen beteiligt (Berretta, 2005). Der Bed-Kern des Stria Terminalis, bestimmte Kerngruppen des Hypothalamus (Kvetnansky et al., 2009) und das peri-PVN-Gebiet bilden somit ein wichtiges Relais (Ulrich-Lai & Herman, 2009) und vermitteln hemmende oder aktivierende Wirkungen auf den paraventriculären Nucleus des Hypothalamus. Dieser stellt die zentrale anatomische Struktur der Stressantwort dar und vermittelt seine Wirkung sowohl neuronal durch Aktivierung von sympathischen Rückenmarksneuronen (Morrison, 2001; Kvetnansky et al., 2009) als auch humoral durch Hypophysen-Nebennieren-Achsen-Aktivierung. Letzteres führt zur CRH- und Arginin-Vasopressin (AVP)-Sekretion in den portalen Venenplexus der Adenohypophyse, wodurch die Synthese und Ausschüttung von Proopiomelanocortin (POMC) induziert wird, aus dem wiederum das adrenocorticotrophe Hormon (ACTH) entsteht. Dieses gelangt dabei über den Blutkreislauf zur Nebennierenrinde, wo es die Synthese und Ausschüttung von Glucocorticoiden (GC) bewirkt, welche über das periphere Blut ubiquitär an ihren Effektororganen wirken. Bei hohen Blutspiegeln bedingen sie eine negative Feedback-Hemmung der HPA-Achse auf Ebene des Hypothalamus, der Hypophyse (HP) und indirekt vermittelt durch den Hippocampus und den medialen präfrontalen Cortex (Diorio et al., 1993).

Die ebenfalls für die Stressreaktion wichtigen Kerngebiete im Hirnstamm (Locus Coeruleus (LC), Raphe Kerne (RK), laterale dorsale Tegmentum-Kerne (ldTK), Abb. 1) reagieren dagegen beispielsweise auf zu starke Schwankungen des Gleichgewichtszustands (Ulrich-Lai & Herman, 2009) und üben über monoaminerge (Sawchenko et al., 1983) bzw. cholinerge Verschaltungen (Ruggiero et al., 1990) zum paraventriculären Kerngebiet des Hypothalamus eine modulierende Funktion aus (Carrasco & Van De Kar, 2003). Eine besondere Bedeutung kommt dabei den (nor)adrenergen Kerngebieten zu, welche eine Vielzahl von Verschaltungen untereinander aufweisen. Die größte Ansammlung von noradrenergen Neuronen befindet sich im LC. Diese Kerne erfahren über die paraventriculären CRH-Neurone eine gegenseitige Co-Aktivierung (Pacák & Palkovits, 2001) und werden in ihrer Funktion durch Verbindungen zum limbischen System und zum medialen präfrontalen Cortex (McDonald et al., 1996) moduliert. In einer schnellen Reaktion (Flight-or-Fight) werden vom Locus Coeruleus (Strack et al., 1989) und von den noradrenergen Kerngruppen A7 und A5 ausgehend über sympathische Fasern (Morrison, 2001) sowohl das sympathoadrenerge als auch das sympathoneurale System aktiviert (Kvetnansky et al., 2009). Im Nebennierenmark führt dies primär zur Ausschüttung von Adrenalin und von geringen Mengen Noradrenalin (NA), während die sympathischen postganglionären Fasern hauptsächlich Noradrenalin sezernieren. Beide Hormone vermitteln an den Effektororganen die spezifischen Stressreaktionen.



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der komplexen zentralen Strukturen der Stressreaktion. Dabei stellen rote Pfeile hemmende, grüne Pfeile aktivierende und graue Pfeile modulierende Einflüsse dar. Eine wichtige modulierende Funktion haben ebenso Zwischenschaltungen um den PVN, die aus dem peri-PVN-Gebiet, dem Bed-Kern des Stria terminalis und bestimmten Kerngruppen des Hypothalamus bestehen. Die Hauptneurotransmitter bei diesen Verschaltungen stellen  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Glutamat (Glut) dar. Vom PVN ausgehend wird die HPA-Achse (blau) aktiviert, die sich über eine negative Feedback-Hemmung selbst reguliert und periphere Stresswirkungen vermittelt, wie auch das sympathische System (orange) ausgehend vom LC.

## 2.1.3. Neurotransmitter im Zusammenhang mit Stress

### 2.1.3.1. Corticotropin-Releasing-Hormon

Das Corticotropin-Releasing-Hormon ist ein Neuropeptid, welches hauptsächlich in den paraventriculären Kernen des Hypothalamus synthetisiert und in den portalen Venenplexus freigesetzt wird. Es vermittelt seine Wirkung präferenziell über G-Protein gekoppelten CRH-1-Rezeptoren (Bale & Vale, 2004), was durch die Aktivierung der HPA-Achse und der noradrenergen Kerne im Locus Coeruleus eine initiale und schnelle Reaktion auf die Stresseinwirkung auslöst. Die verwandten Urokortine II und III binden dagegen selektiver an CRH-2-Rezeptoren und sollen eine wichtige Rolle für den Stress-Erholungs-Prozess darstellen (Neufeld-Cohen et al., 2010).

### 2.1.3.2. Adrenokorticotropes Hormon

Durch das Corticotropin-Releasing-Hormon induziert, kommt es im Hypophysenvorderlappen zur Synthese des Pro-Peptids Proopiomelanocortin, welches gewebsspezifisch durch posttranslationale Prozessierung zum adrenokorticotropen Hormon, Melanotropin und  $\beta$ -Lipotropin gespalten wird, wobei aus dem letzteren das  $\beta$ -Endorphin abgespalten werden kann. Das ACTH wird darauf in das Blut sezerniert und gelangt zur Zona fasciculata der Nebennierenrinde. Dort aktiviert es Melanocortin-2-Rezeptoren (auch ACTH-Rezeptor genannt), welche wiederum über eine verstärkte Adenylatcyclase-Aktivität und einen cyclo-Adenosinmonophosphat (cAMP)-Transduktionsweg (Elias & Clark, 2000) die Synthese und Ausschüttung von Cortisol (Mensch) und Corticosteron (Mensch und Nager) bewirken.

### 2.1.3.3. Glucocorticoide

Die steroidalen Glucocorticoide Corticosteron und Cortisol sind von den Hormonen der HPA-Achse am besten charakterisiert. Sie werden nach Stimulation durch ACTH in den Zellen der Zona fasciculata der Nebennierenrinde synthetisiert und wirken über Typ I Glucocorticoid-Rezeptoren (GR) oder Typ II Mineralocorticoid-Rezeptoren (MR, Reul & de Kloet, 1985). Sie weisen eine 3-teilige Struktur auf: eine N-terminale Domäne für die Transkriptionsregulation, einen zentralen Bereich für die Interaktion mit der Desoxyribonukleinsäure (DNA) und eine C-terminale Domäne für die Bindung des Liganden. Dabei unterscheiden sich die Aminosäuremuster der beiden Glucocorticoid-Rezeptoren teilweise sehr unterschiedlich: Die N-terminale Domäne weist nur eine Homologie von 15 % auf, der zentrale Abschnitt dagegen 94 % und die C-terminale Domäne 57 % (Rozeboom, 2008). Durch diese Struktur erklärt sich einerseits die wesentlich höhere Affinität (10-fach) der Glucocorticoide zu den Mineralocorticoid-Rezeptoren (Reul et al., 2000) und die wesentlich niedrigere Affinität der Mineralocorticoiden zu den Glucocorticoid-Rezeptoren, andererseits aber auch die Tatsache, dass sich sowohl MR als auch GR an dieselben Glucocorticoid-Response-Elemente (GRE) anlagern können.

Die Glucocorticoid-Rezeptoren werden ubiquitär im Körper exprimiert, im Gehirn kommen sie vor allem im paraventriculären Kerngebiet des Hypothalamus und im Hippocampus vor. Dagegen kommen die Mineralocorticoid-Rezeptoren im Hirn lediglich im limbischen System vor. Dabei weisen die Amygdala und der präfrontale Cortex eine moderate Verteilung auf, wohingegen der Hippocampus eine hohe MR-Dichte besitzt (Reul & de Kloet, 1985). Ansonsten kommen die Mineralocorticoid-Rezeptoren im Körper noch in Niere, Dickdarm, Herzmuskelzellen und Gefäßwänden vor (Fuller & Young, 2005).

Aufgrund ihres lipophilen Charakters können Corticosteroide frei über die Plasmamembran in die Zelle diffundieren und an die zytoplasmatischen Mineralocorticoid- und Glucocorticoid-Rezeptoren binden, die im Zytosol als Multimer-Komplexe vorliegen, bestehend aus dem Rezeptor selbst, einem Hitzeschockprotein-90-Dimer, einem „p23“- und einem „TRP“-Protein

(Heitzer et al., 2007). Nach Bindung der Glucocorticoide kommt es zur Abspaltung dieser Proteine vom Rezeptor und zur Translokation in den Kern über ein Microtubulus-Netzwerk (Galigniana et al., 1998), wo der Rezeptor als Monomer verbleibt oder dimerisieren kann. In Zellen, in denen entweder nur Mineralocorticoid-Rezeptoren oder Glucocorticoid-Rezeptoren vorliegen, bilden sich daraufhin Homodimere. Wenn beide Rezeptorpopulationen vorkommen wie z. B. in bestimmten Kerngruppen des Hippocampus oder medialen präfrontalen Cortex, dann können zusätzlich auch Heterodimere entstehen (Datson et al., 2001). Die Rezeptormonomere oder -dimere binden im Kern an die bereits erwähnten GRE, die sich in Promotorregionen von spezifischen Genen befinden, worüber die Transkription dieser Gene gehemmt oder verstärkt werden kann. Die aktivierten Glucocorticoid-Rezeptoren können aber auch direkt und indirekt mit (bereits gebundenen) Transkriptionsfaktoren interagieren und so deren Wirkung beeinflussen (De Bosscher et al., 2003; Datson et al., 2008).

Glucocorticoid-Wirkungen, die auf Veränderung der Gentranskription beruhen, manifestieren sich frühestens nach 20-30 Minuten, wohingegen die Wirkung bis Tage andauern kann (Heitzer et al., 2007). Schnelle Reaktionen auf eine Stresswirkung können mit so langsam reagierenden zytosolischen Rezeptoren nicht erreicht werden, was zur Entdeckung von membranständigen Glucocorticoid-Rezeptoren im paraventriculären Kerngebiet des Hypothalamus, in der Hypophyse, in der Amygdala, im Hippocampus und im medialen präfrontalen Cortex geführt hat (Atkinson et al., 2008; Evanson et al., 2010). Man vermutet, dass es sich hierbei um zytoplasmatische Glucocorticoid-Rezeptoren handelt, die vorher posttranslational modifiziert und in die Membran transloziert wurden, allerdings sind die genauen Mechanismen dazu noch unbekannt (Riedemann et al., 2010; Groeneweg et al., 2011). Diese Rezeptoren sollen für die vermehrte Bildung und Sezernierung von Endocannabinoiden verantwortlich sein (Di et al., 2009; Evanson et al., 2010).

Die Beendigung der Glucocorticoid-Rezeptorwirkung an der DNA geschieht durch das Abdissoziieren und eine nachfolgende proteosomale Degradierung (Wang et al., 2002b). Derselbe Mechanismus wird auch für die Deaktivierung der Mineralocorticoid-Rezeptoren angenommen (Yokota et al., 2004). Die Glucocorticoid-Rezeptoren dissoziieren allerdings schneller von der DNA ab, was auch mit auf die geringere Corticosteron-Affinität zu den GR zurückzuführen ist (Conway-Campbell et al., 2007).

#### **2.1.3.4. Noradrenalin und Adrenalin**

Auch die noradrenergen und adrenergen Neurone sind direkt an der zentralen Verarbeitung von Stressreaktionen und der peripheren Übertragung auf die Effektororgane beteiligt (Kvetnansky et al., 2009; Abb. 1). Die Catecholamine Adrenalin und Noradrenalin werden aus der Aminosäure L-Tyrosin in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks und den catecholaminergen Nervenendigungen synthetisiert und in Vesikeln gespeichert. Die Adrenalin-Freisetzung erfolgt über eine Acetylcholin (ACh) induzierte, durch Calcium-Ionen

vermittelte Exozytose. Sowohl die Biosynthese, als auch die Freisetzung der Catecholamine sind beim Auftreten eines Stressors stark erhöht (Kvetnansky et al., 2009).

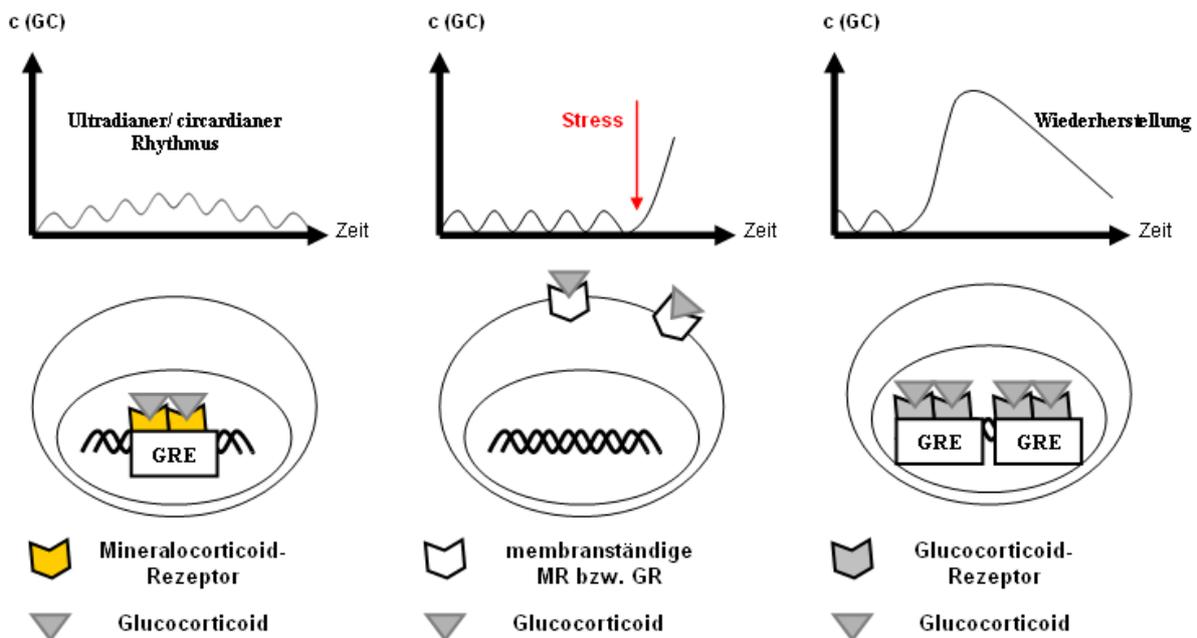
Noradrenalin und Adrenalin wirken über die ubiquitär verteilten  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren an Zielzellen. Die  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren werden nochmals in  $G_q$ -Protein gekoppelte A, B, und D-Subtypen unterteilt, die durch Erhöhung von cAMP die Phospholipase C-Kaskade aktivieren. Von den  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren wurden bisher die A, B, C und D-Subtypen gefunden (Ruuskanen et al., 2004). Diese Rezeptoren sind  $G_i$ -Protein gekoppelt und vermindern u. a. den intrazellulären cAMP-Spiegel durch die Hemmung der Adenylatcyclase. Innerhalb der  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren werden  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ -Subtypen unterschieden. Bis auf die  $\beta_2$ -Adrenorezeptoren sind alle  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren  $G_s$ -Protein gekoppelt (Chen-Izu et al., 2000), über die der intrazelluläre cAMP-Spiegel erhöht und u. a. die Proteinkinase A aktiviert werden.

Die Adrenozeptoraktivierung wird durch den enzymatischen Abbau und/oder die Wiederaufnahme der Catecholamine in die Präsynapse beendet. Neuronal wird dieser Abbauvorgang primär durch die Monoaminoxidasen (MAO), peripher durch die Catechol-O-Methyltransferasen (COMT) vermittelt. Über die detaillierten Aktivierungsmechanismen der catecholaminergen Systeme durch spezifische Stressoren liegen allerdings noch keine Informationen vor. Ebenso wird auch die Funktion der dopaminergen Neurone bei der Stressverarbeitung diskutiert (Kvetnansky et al., 2009).

#### **2.1.4. Biorhythmik der HPA-Achse**

Glucocorticoide werden in Abhängigkeit von der vorhandenen Konzentration im Blut pulsatil (wellenförmig) sezerniert. Eine kurzzeitige Corticosteron-Ausschüttung führt auf Grund der Rückkopplung zu einer schnelle Hemmung dieser Sezernierung. Durch die hohe renale Ausscheidungsrate (Woodward et al., 1991) verringert sich zusätzlich die Konzentration der im Blut vorhandenen Glucocorticoide. Dieser Konzentrationsabfall wiederum führt zu einer erneuten Ausschüttung von Corticosteron, so dass die Konzentration im Blut wieder ansteigt. Diese pulsatile Corticosteron-Ausschüttung weist sowohl eine circadiane als auch eine ultradiane (Windle et al., 1998) Rhythmik auf (Abb. 2, links). Es wird vermutet, dass die pulsatile Ausschüttung von ACTH (Spiga et al., 2011) in Verbindung mit der negativen Feedback-Funktion der Glucocorticoide auf Ebene der Hypophyse dafür verantwortlich ist (Walker et al., 2010). Für den circadiären Rhythmus ist der suprachiasmatische Kern des Hypothalamus verantwortlich, welcher zugleich sämtliche tagesrhythmische Prozesse im Körper reguliert (Reppert & Weaver, 2002). Innerhalb des basalen Rhythmus aktivieren bereits geringe Glucocorticoid-Konzentrationen aufgrund der erhöhten Affinität die zentralnervösen Mineralocorticoid-Rezeptoren (Reul & de Kloet, 1985). Mit dieser Grundwirkung soll die Reaktionsfähigkeit der limbischen Systeme erhalten bleiben (Joëls et al., 2007). Im Falle einer Stresseinwirkung wird die Pulsatilität der HPA-Achse unterbrochen und es kommt zu einem schnellen Anstieg der Glucocorticoid-Konzentration (3 bis 7 Minuten) im Blut, wodurch initial die membranständigen Glucocorticoid-Rezeptoren im

Gehirn aktiviert werden (Evanson et al., 2010), die in Kombination mit den nach wenigen Sekunden sezernierten Adrenalin und Noradrenalin (Morilak et al., 2005) eine schnelle Stressreaktionen vermitteln (de Kloet et al., 2005). Gleichzeitig sollen diese membranständigen Glucocorticoid- bzw. Mineralocorticoid-Rezeptoren (Abb. 2, Mitte) eine initiale und schnelle Hemmung der HPA-Achse bewirken (Evanson et al., 2010). Mit weiter ansteigenden Glucocorticoid-Konzentrationen werden schließlich auch die zytoplasmatischen Glucocorticoid-Rezeptoren aktiviert (Abb. 2, rechts). Diese vermitteln eine langfristige und verzögerte Hemmung der HPA-Achse durch eine veränderte Gentranskription auf Ebene des Hypothalamus und der Hypophyse (Joëls et al., 2007). Dies geschieht durch Hemmung der Transkription bzw. der Transkriptionsfaktoren von POMC und CRH (Drouin et al., 1993; Malkoski & Dorin, 1999; Martens et al., 2005).



**Abb. 2:** Darstellung der unterschiedlichen GR-Wirkung in Abhängigkeit von der Glucocorticoid-Konzentration im Blut. Während des ultradianen bzw. circadianen Rhythmus werden basal nur die Mineralocorticoid-Rezeptoren aktiviert (links). Nach Stresseinwirkung und schneller Glucocorticoidausschüttung werden initial die membranständigen Glucocorticoid-Rezeptoren aktiviert (Mitte). Dadurch wird die schnelle Reaktion des Körpers auf den Stressor vermittelt sowie die initiale Hemmung der HPA-Achse. Durch die hohen GC-Spiegel werden auch die schwach affinen zytoplasmatischen Glucocorticoid-Rezeptoren aktiviert, die langfristige Körperreaktionen vermitteln und über die negative Feedback-Rückkopplung die HPA-Achse anhaltend hemmen (rechts). Dies führt zu sinkenden GC-Konzentrationen, bis der basale Rhythmus wiederhergestellt ist.

Diese Reaktionen sollen vor allem der Anpassung und Wiederherstellung der Homöostase nach Stresseinwirkung (Allostase) und dem Schutz die HPA-Achse vor überschießenden Reaktionen dienen. Gleichzeitig sind diese Reaktionen im Rahmen der negativen Rückkopplungs-Mechanismen mit einem abfallenden Glucocorticoid-Spiegel assoziiert (Joëls et al., 2007; McEwen, 2007; de Kloet et al., 2008). Nach wenigen Stunden erreicht die Glucocorticoid-Konzentration wieder das basale Niveau, woraufhin sich wieder die natürliche pulsatile Rhythmik einstellt. Diese Dynamik ist somit essentiell für die Reaktionsfähigkeit von Stress-sensitivem Gewebe auf Corticosteroid-Peaks (Lightman & Conway-Campbell, 2010). Es konnte diesbezüglich auch gezeigt werden, dass eine milde Stresswirkung während eines nicht abfallenden Peaks zu einer sofortigen Reaktion auf den Stressor durch Erhöhung des Corticosteron-Spiegels führte. Wirkt der Stressor allerdings im Verlauf eines abfallenden Peaks auf den Organismus ein, so konnte keine oder nur eine schwache Erhöhung der Corticosteron-Konzentration im Plasma festgestellt werden (Windle et al., 1998). Dasselbe Phänomen zeigt sich bei den ACTH-Spiegeln, für deren Anstieg nach Stresswirkung ebenso eine Corticosteron-Pulsatilität notwendig ist (Sarabdjitsingh et al., 2010a).

### 2.1.5. Systemische Stresswirkungen

Aufgrund ihres ubiquitären Verteilungsmusters vermitteln die Adrenozeptoren und die Glucocorticoid-Rezeptoren eine Vielzahl von Wirkungen im Organismus, die der Koordination von Gehirn- und Körperfunktionen im Zusammenhang mit der Reaktion auf Stress dienen (Tab. 1). Dabei steht die sofortige Steigerung der Energieproduktion und -bereitstellung im Vordergrund, während parallel dazu Körperfunktionen gehemmt werden, welche nicht unmittelbar zur Überwindung der stressvollen Situation benötigt werden (McEwen, 2007).

**Tab. 1:** Zusammenfassung der peripheren und systemischen Auswirkungen von Stress auf einen Organismus (Chrousos, 2009)

<b>Systemische und periphere Stresswirkungen</b>
Verbesserung von Aufmerksamkeit, Wachsamkeit, Kognition
Steigerung der Aggressivität
Steigerung der Herz-Kreislauf-Tätigkeit und der Atemleistung
Verstärkung der Durchblutung von Gehirn, Herz- und Skelettmuskulatur
Steigerung des Sauerstoffumsatzes
Umstellung auf einen katabolen Stoffwechsel
Verbesserung der Entgiftungsfunktion von Leber und Nieren
Aktivierung von hemmenden Rückkopplungsmechanismen (auf die HPA-Achse)
Suppression des Immunsystems
Hemmung vegetativer Funktionen (z. B. Nahrungsaufnahme, Wachstum)

## 2.1.6. Chronizität des Stresses

Ein chronischer Stress bezeichnet das aufeinanderfolgende Auftreten von akuten Stressoren über einen längeren Zeitraum (Tage/Wochen/Monate). Im Gegensatz zum akuten Stress kann dieses wiederholte Auftreten sowohl die Morphologie als auch die Funktionalität von zentralen Strukturen wie der HPA-Achse und/oder des sympathischen Systems nachhaltig und sehr komplex verändern (Ulrich-Lai & Herman, 2009).

Im medialen präfrontalen Cortex wurde nach chronischem Stress eine verminderte Expression von zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptoren festgestellt, jedoch war die Anzahl der nukleären Glucocorticoid-Rezeptoren unverändert (Mizoguchi et al., 2003; Chen et al., 2008). Ebenso konnte eine Verringerung des Verzweigungsgrads dendritischer Verschaltungen nachgewiesen werden (Wellman, 2001).

Dagegen zeigen bisherige Untersuchungen über die Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte an den paraventriculären Kerngruppen des Hypothalamus ein inkonsistentes Bild. Mizoguchi et al. (2003) stellten keine Veränderungen nach chronischem Stress fest, während andere Untersuchungsergebnisse eine verminderte Anzahl von Glucocorticoid-Rezeptoren ergaben (Herman et al., 1995; Adzic et al., 2009). Unterschiedliche Ergebnisse hinsichtlich der Glucocorticoid-Rezeptor-Verteilung zeigen sich weiterhin auch am Hippocampus. Nach chronischem Stress wurde vermehrt GR-RNA in Hippocampus-Neuronen gefunden (Chen et al., 2008), während andere Untersuchungen eine erhöhte Expression von zytosolischen und nukleären Glucocorticoid-Rezeptoren ergaben (Mizoguchi et al., 2003). Zusätzlich trat im Hippocampus eine Volumenverringerng im Neuropil auf, was mit einem stärkeren Verlust von Dendriten und synaptischen Verschaltungen assoziiert ist (Tata & Anderson, 2010) und zu einer Verringerung der Signalleitung durch den Hippocampus führt. Das wird als Ursache für eine verminderte Lernfähigkeit und Informationsspeicherung angenommen (Krugers et al., 2010).

Im Gegensatz dazu weisen die basolateralen Kerne der Amygdala nach einem chronischen Stress einen eher stärkeren Verzweigungsgrad der Dendriten auf (Vyas et al., 2002), was u. a. mit einer Verstärkung des Angstverhalten assoziiert wird (Mitra & Sapolsky, 2008).

Die veränderte Expression von Glucocorticoid-Rezeptoren im medialen präfrontalen Cortex, Hippocampus und im paraventriculären Kerngebiet des Hypothalamus und die damit verbundene veränderte Expression von CRH und POMC lässt auf ein vermindertes Ansprechen der negativen Rückkopplungsmechanismen schließen (Mizoguchi et al., 2003; Martens et al., 2005). Dies wurde bestätigt durch das selektive Ausschalten des Hippocampus, woraufhin sich keine Auswirkungen auf die HPA-Aktivität bei wiederholten Stresszuständen zeigten (Ostrander et al., 2006).

Die durch chronischen Stress induzierte Verminderung der negativen Feedbackhemmung und die zusätzliche stimulierende Wirkung ausgehend von den basolateralen Kerngruppen der Amygdala können eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Aktivität des paraventriculären Kerngebiets des Hypothalamus und somit der HPA auf Stress sein. Eine solche verstärkte Reaktion der HPA-Achse nach chronischem Stress konnten Bhatnagar & Dallman (1998) zeigen. Wurden jedoch Läsionen an den paraventriculären Kerngruppen des

Hypothalamus induziert, so führte der chronische Stress im Gegensatz zum akuten Stress nicht mehr zu einer verstärkten HPA-Achsen-Reaktion (Bhatnagar & Dallman, 1998).

Durch die verstärkte Aktivierung des Locus Coeruleus und die Verschaltungen vom paraventriculären Kerngebiet des Hypothalamus tritt ebenso eine vermehrte Erregbarkeit des sympathischen Systems nach chronischem Stress auf (Ulrich-Lai & Herman, 2009), was durch eine erhöhte Syntheseleistung innerhalb der (nor)adrenergen Neurone (Mamalaki et al., 1992; Kvetnansky et al., 2009) gekennzeichnet ist. Die erhöhte Erregbarkeit der HPA-Achse und des sympathischen Systems auf Stress verbunden mit dem Ausfall der negativen Rückkopplungsmechanismen bringen den Organismus in einen Zustand der „allostatischen Überlastung“ (McEwen, 2004; 2007), in welchem er eine erhöhte Anfälligkeit für verschiedene somatoforme und funktionelle Syndrome aufweisen kann (Abschnitt 2.4.).

### **2.1.7. Experimentelle Stressmodelle**

Es sind in der Literatur viele verschiedene experimentelle Modelle beschrieben, um im (Versuchs)-Tier eine Stressreaktion hervorzurufen und die Auswirkung von Stress auf bestimmte Körperkompartimente festzustellen. Bisher kann jedoch keines dieser Modelle die Stresswirkung auf den Menschen vollständig widerspiegeln (Jaggi et al., 2011). Gerade bei wiederholter Anwendung findet bei vielen Stressoren eine Anpassung statt. Die Versuchstiere zeigen dadurch nur noch eine verminderte oder keine Stress-induzierten Veränderungen (wie z. B. einen erhöhten Corticosteron-Spiegel). Vor allem bei milden Stressoren sowie bei zu vielen Wiederholungen oder bei einer zu langen Stressdauer zeigen Tiere schnell eine Adaptation an die stressvolle Situation. Dagegen findet bei starken Stressoren in Verbindung mit wenigen Wiederholungen oder einer kurzen Stressdauer keine oder nur eine geringe Anpassungsreaktion statt. Die experimentellen Stressmodelle weisen neben der unterschiedlichen Stressanpassungsfähigkeit noch weitere Unterschiede hinsichtlich ihrer Stressreaktion und -wirkung im Tier auf (Ottenweller, 2000; Jaggi et al., 2011). Daher wird nachfolgend eine Auswahl von wichtigen präklinischen Stressmodellen kurz dargestellt:

#### **2.1.7.1. Milde Stressoren**

Als milde Stressoren gelten Handlingstress (z. B. Versuchstier wird in die Hand genommen), Separationsstress (alleiniges kurzzeitiges Zurückbleiben eines Tieres nach Entfernung seiner Käfigpartner), Neuigkeitsstress (das Verbringen eines Tieres in eine neue Umgebung oder ein neuer Gegenstand im Käfig) sowie Vibrationsstress (das kurzzeitige Verbringen des Versuchstieres auf eine vibrierende Platte). Solche milde Stressoren bewirken akut einen leichten Anstieg der Corticosteron- und/oder Noradrenalin/Adrenalin-Plasmaspiegel der Versuchstiere (Kvetnansky et al., 2009; Ferland & Schrader, 2011). Erfolgt jedoch vorher das

Training der Tiere an diese Stressoren, so zeigen diese Tiere im Rahmen ihrer Anpassung keine Veränderungen ihrer Stresshormonspiegel (Ottenweller, 2000).

### **2.1.7.2. Immobilisationsstress**

Die Immobilisation von Versuchstieren zählt zu den potentesten und häufig angewandten Stressoren, die zur Erzeugung einer Stressreaktion eingesetzt werden (Kvetnansky et al., 2009). Dabei werden die Tiere mit fixierenden Bändern komplett immobilisiert oder in Restrainern wie z. B. Plexiglasröhren („Restraint“-Stress) eingeeengt. Im Gegensatz zur vollständigen Immobilisation mit Bändern werden den Tieren bei Letzterem in geringen Maße Fuß- oder Kopfbewegungen ermöglicht. Diese Form des Immobilisationsstress erzeugt jedoch eine geringere Stressreaktion im Vergleich zu den fixierenden Bändern (Kvetnansky et al., 2009; Jaggi et al., 2011). In sehr vielfältiger Weise kann über die Immobilisation von Versuchstieren ein oxidativer Stress erzeugt werden sowie die Schmerzwahrnehmung, das Immunsystem, der Kreislauf und der Magen-Darm-Trakt beeinflusst werden (Glavin et al., 1994; Buynitsky & Mostofsky, 2009). Immobilisationsstress führt zu einer starken Aktivierung der HPA-Achse und zum Anstieg des Noradrenalin-/Adrenalingehalts im Plasma durch eine vermehrte Synthese und Freisetzung (Buynitsky & Mostofsky, 2009; Kvetnansky et al., 2009). Es existieren sowohl akute Modelle, die einmalig bis zu 6 Stunden andauern, als auch chronische Modelle, in denen die Tiere täglich 1-2 Stunden für bis zu 40 Tage gestresst werden (Glavin et al., 1994; Gameiro et al., 2006). Auch hier tritt bei andauerndem Stress eine gewisse Adaptation ein, die sich nach 4 Wochen in geringeren Anstiegen von Corticosteron- und Monoamingehalten im Plasma als beim akuten Immobilisationsstress ausdrückt (Kvetnansky et al., 2009). Die Vorteile von Immobilisationsstress sind die gute Charakterisierung der Stressreaktion und -wirkung, die geringe bzw. verspätete Anpassung der Tiere sowie die gute Vergleichbarkeit zu humanen Stresssituationen, da die Immobilisation von Tieren als ein physikalischer und psychologischer Stressor gilt (Ottenweller, 2000). Nachteilig ist jedoch die hohe Belastung für die Tiere, wenn diese mit fixierenden Bändern immobilisiert werden.

### **2.1.7.3. Kältestress**

Das Verbringen der Tiere innerhalb ihres Käfigs in eine kühle Umgebung (z. B. 4 °C) stellt eine einfache und effektive Methode dar, um einen Kältestress auszulösen. Bei noch geringeren Temperaturen von -8 °C führt der schnelle Temperaturabfall akut zu einem starken Anstieg von Corticosteron und Adrenalin/Noradrenalin im Plasma (Kvetnansky et al., 2009). Zur Erzeugung eines akuten Stresses werden die Tiere bis zu 15 Minuten in der kühlen Umgebung gehalten. Um eine chronische Stresswirkung und -reaktion zu erhalten, müssen die Tiere dagegen täglich bis zu 10 Tage lang dem Stressor ausgesetzt werden, (Jaggi et al., 2011). Somit stellt der Kältestress ein schnelles und einfaches Verfahren dar,

um im Tier eine akute Stresswirkung zu erhalten. Allerdings findet auch hier eine schnelle Anpassung statt und es muss zusätzlich beachtet werden, dass auch physiologische Thermoregulationsmechanismen aktiviert werden, die einen Einfluss auf die Stress-induzierten Veränderungen haben können (Ottenweller, 2000).

#### **2.1.7.4. Schmerzstress**

Auch Schmerzreize können als akute Stressoren genutzt werden, indem sie z. B. durch eine subkutane Injektion von Formalin erzeugt werden. Dieser Schmerzreiz führt zur Aktivierung der HPA-Achse und zur Ausschüttung von Noradrenalin aus den sympathischen Nervenendigungen, jedoch nicht aus dem Nebennierenmark (Pan et al., 1999; Kvetnansky et al., 2009). Wird dagegen ein Schmerzreiz zur Messung der Schmerzschwelle zugeführt (Abschnitt 2.2.5.), so gilt dies als milder akuter Stressor, dessen Intensität ebenso durch vorheriges Training und die Anpassung der Tiere an die Messmethode reduziert werden kann (Taiwo et al., 1989). Beobachtet wird in diesem Zusammenhang auch die Aktivierung des „Diffuse noxious inhibitory controls“ (DNIC)-Effekts was zur Verminderung der nachfolgenden Schmerzreize führt (Abschnitt 2.3.3.1.).

#### **2.1.7.5. Schwimmstress**

Zur Induzierung eines Schwimmstresses werden die Tiere einzeln in einen mit Wasser gefüllten Glaszylinder gesetzt. Als Auslöser der Stressreaktion wird vermutet, dass sich die Tiere durch diese neue Situation bedroht fühlen und dabei erkennen, dass die Flucht durch Schwimmbewegungen aussichtslos ist (Jaggi et al., 2011). Es existieren sowohl akute (einmalig 10-20 min), als auch andauernde Schwimmstress-Protokolle (täglich für 3 Tage) (Suarez-Roca et al., 2006a; 2006b). Die Induktion eines Schwimmstresses kann bei Ratten auch als Depressionsmodell (Porsolt-Test) verwendet werden. Nachteilig sind dabei jedoch die schnelle Anpassung und die hohe Variabilität (Armario et al., 1995).

#### **2.1.7.6. Elektroschockstress**

In einer abgegrenzten Kammer mit elektrifiziertem Boden erhalten die Tiere elektrische Schocks von milder Intensität (z. B. 2 mA, 0,2 Hz, 1 s) über einen Zeitraum von bis zu 30 min, die bei Versuchsnagern eine starke Stressreaktion auslöst. Aufgrund der hohen Belastung an das Tier ist dieses Modell jedoch abzulehnen (Ottenweller, 2000).

### 2.1.7.7. Sozialer Stress

Sozialer Stress zählt ebenso zu den häufig angewandten Stressarten. Neben dem „Social defeat“-Stress kommen noch Gruppenstress und Stress durch Änderung der Sozialstruktur zum Einsatz. Beim „Social defeat“ wird ein männliches Tier auf ein zyklisierendes Weibchen innerhalb eines Käfigs geprägt. Wird das Weibchen entfernt und ein weiteres männliches Tier in den Käfig verbracht, so kommt es zu einer kurzen aggressiven Konfrontation zwischen dem zugesetzten Eindringling und dem Reviertier, dessen Territorial- und Aggressionsverhalten durch das Weibchen zuvor verstärkt wurde. Das unterlegende Tier zeigt dabei ein Defensivverhalten wie Immobilität, Flucht oder Unterwürfigkeit (Blanchard et al., 2001). Beim Stress innerhalb einer sozialen Gruppe wird eine Tierkolonie von 4 oder mehr männlichen Tieren und 2 weiblichen Tieren gebildet. Ähnlich wie beim „Social defeat“ zeigen die durch die weiblichen Tiere dominant geprägten Männchen ein Aggressionsverhalten gegenüber den untergeordneten männlichen Tieren (Koolhaas et al., 2005). Wird ständig die Gruppenzusammensetzung mit sich vorher unbekanntem Tieren neu verändert, so muss sich jedes Mal eine neue Rangordnung herausbilden, verbunden mit Dominanzkämpfen. Bei den Sozialstress-Modellen weisen die unterlegenen Tieren eine erhöhte Herzfrequenz und Temperatur sowie einen Anstieg von Catecholaminen und Corticosteron im Plasma auf (Blanchard et al., 2001; Koolhaas et al., 2005). „Social defeat“-Stress kann akut einmalig über eine Dauer von 20 min durchgeführt werden, jedoch existieren auch chronische Modelle, bei denen die Exposition 5-mal täglich für 3-6 Tage stattfindet (Blanchard et al., 2001). Durch die natürlichen Stressoren weisen die Modelle eine hohe Ähnlichkeit zu humanen Stressformen auf, jedoch wird für diese Modelle eine hohe Tieranzahl benötigt. Dazu kann das Monitoring bei Koloniehaltung nur relativ eingeschränkt stattfinden (Jaggi et al., 2011).

### 2.1.7.8. Isolationsstress

Wird der erwähnte milde Separationsstress auf bis zu 24 h ausgedehnt, so spricht man von einem akuten Isolationsstress, welcher ebenso einen nur milden Stressor darstellt. Auch eine chronische Isolation von bis zu 42 Tagen ist beschrieben (Conrad et al., 2011). Da dieser Stressor jedoch ebenso eine schnelle Adaptation verursacht, wird häufig der neonatale andauernde Isolationsstress angewandt. 2 Tage alte juvenile Tiere werden dafür täglich 1 h vom Muttertier 8 Tage lang getrennt. Die juvenilen Tiere weisen eine verstärkte HPA-Achsen-Aktivität sowie veränderte Monoamin-Konzentrationen im Gehirn auf. Ebenso treten bei diesen Tieren morphologische Veränderungen am Hippocampus und eine fehlerhafte negative Rückkopplung auf (Kosten et al., 2005).

Dieses Modell eignet sich gut zur Untersuchung von frühen Stresseinflüssen auf die post-junvenile Informationsverarbeitung und Gedächtnisfunktionen. Weiterhin sind beim neonatalen Isolationsstress keine Adaptationsprozesse bekannt. Negativ zu bewerten ist jedoch die lange Versuchsdauer (Jaggi et al., 2011).

### **2.1.7.9. Jäger-Beute-Stress**

Als Stressor dient ein natürlicher Fressfeind für die Versuchstiere, indem sie diesem direkt in einer schützenden Box ausgesetzt werden oder dessen Geruch wahrnehmen. Nach Kontakt zeigen die Tiere im Rahmen einer „Fight or Flight“-Reaktion eine schnelle Aktivierung des Sympathikus (Blanchard & Blanchard, 1989). Dieses Modell eignet sich somit gut zur Erzeugung einer akuten Stresssituation, jedoch ist es aufgrund der schnellen Anpassung nicht chronisch einsetzbar.

### **2.1.7.10. Lärmstress**

Versuchsnager nehmen laute Geräusche über 90 dB als einen Stressor wahr. Über einen Lärmgenerator, mit dem entweder nur der Käfig oder eine ganze Gruppe beschallt wird, werden diese lauten Rauschgeräusche generiert. Akut (30 min) führt dieser Lärm zur Aktivierung sympathischer Systeme und der HPA-Achse (Burow et al., 2005; Kvetnansky et al., 2009). Wird dieser Stress wiederholt (4 Tage) eingesetzt, so tritt jedoch wie bei den meisten anderen Stressoren eine schnelle Adaptation ein (Ottenweller, 2000).

### **2.1.7.11. Kombination von Stressoren**

Neben den einzelnen Stressoren werden beispielsweise beim Kälte-Schwimmstress oder beim Kälte-Immobilisationsstress mehrere Stressoren miteinander kombiniert. Diese haben den Vorteil, dass sie stärkere Stressreaktionen bei gleichzeitig geringerer Anpassung wie die einzelnen Stressoren hervorrufen. Jedoch stellen diese Modelle höhere Belastungen an das Tier dar und gerade bei Kälte-Schwimmstress kann durch das zusätzlich kalte Wasser (bis 4 °C) die Gefahr des Ertrinkens auftreten (Retana-Márquez et al., 2003; Jaggi et al., 2011).

### **2.1.7.12. Unvorhersehbarer Stress**

Wie bereits beschrieben, tritt bei chronischem Stress oftmals eine Anpassung der Tiere an den Stressor auf. Um einer solchen Adaptation vorzubeugen, werden verschiedene täglich wechselnde Stressoren genutzt, um im Versuchstier eine andauernde Stressreaktion zu erzeugen. Als Stressoren kommen dabei hauptsächlich die Modelle zum Einsatz, die vorher kurz erläutert wurden. Der Ablauf eines solchen 10-tägigen Stressmodells findet sich in der Veröffentlichung von Marin et al. (2007). Die Tiere, die einem unvorhergesehenen Stress ausgesetzt werden, zeigen dauerhaft erhöhte Corticosteron-Spiegel. Jedoch bedarf es eines hohen Aufwands, um diese Modelle zu realisieren.

## 2.2. Nozizeptives System

### 2.2.1. Definition Schmerz und Nozizeption

Schmerz ist nach der „International Association for the Study of Pain“ (IASP) ein unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis, das mit tatsächlicher oder potentieller Gewebsschädigung assoziiert ist oder als eine solche Schädigung beschrieben wird (IASP Taxonomy Working Group, 2011). Schmerz ist somit eine bewusste Empfindung, die aus der kognitiven und emotionalen Bewertung der Informationen des nozizeptiven Systems entsteht. Das nozizeptive System wiederum ist ein spezialisierter Teil des somatosensorischen Systems, das für die Detektion und Verarbeitung von noxischen (schädlichen) Reizen durch spezifische Rezeptoren (Nozizeptoren) verantwortlich ist (Magerl & Treede, 2010). Dieser Vorgang der Detektion und Verarbeitung wird Nozizeption genannt (Willis, 1985).

Die Reaktion auf Schmerz lässt sich in 4 Komponenten unterteilen. Die sensorisch-diskriminative Komponente identifiziert den Ort und die Art sowie die Intensität und Qualität des noxischen Reizes. Die kognitive Komponente bewertet den Schmerz und vergleicht ihn mit vorherigen Schmerzereignissen, wohingegen die affektiv-emotionale Komponente die Bewertung hinsichtlich der individuellen Emotionalität vornimmt. Durch die vegetative Komponente erfolgen die Reaktionen des sympathischen Nervensystems auf den noxischen Reiz (Price, 2000; Magerl & Treede, 2010).

Hinsichtlich ihrer Qualität unterscheidet man zwischen verschiedenen Schmerzformen. Der physiologische nozizeptive Schmerz hat eine protektive Wirkung zur Vermeidung einer Gewebserstörung. Der entzündliche Schmerz tritt dagegen nach Entzündungen und Gewebsschädigungen durch die Sensibilisierung des (peripheren) nozizeptiven Systems auf. Kommt es zu Dysfunktionen im peripheren und zentralen Nervensystem, so kommt es ebenso zur Sensibilisierung des nozizeptiven Systems, jedoch treten dabei andere Mechanismen auf als beim entzündlichen Schmerz. Man spricht hier von neuropathischen Schmerzen (Schmidtke et al., 2009). Daneben wird noch ein psychogener Schmerz beschrieben, für den keine nachweisbare organische Ursache ermittelt werden kann (Covington, 2000).

### 2.2.2. Neuroanatomische Grundlagen

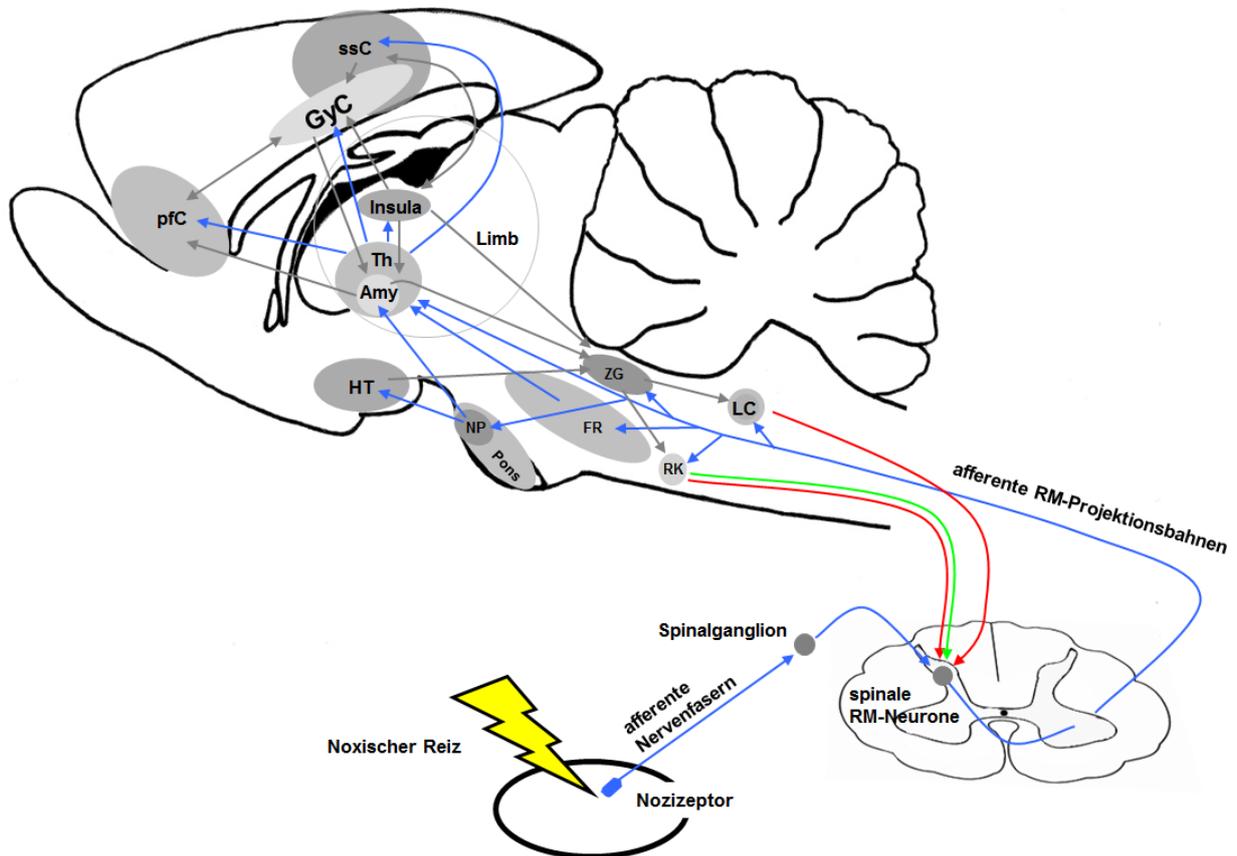
Nozizeptoren sind freie Nervenendigungen, die somatosensorische, schädliche Reize in Generatorpotentiale umwandeln und als Aktionspotentialfolgen afferent weiterleiten. Dabei besitzen diese Rezeptoren eine Polymodalität hinsichtlich chemischer, thermischer oder mechanischer Reize (Woolf & Ma, 2007; Dubin & Patapoutian, 2010). Diese Nervenendigungen sind mit einer Vielzahl von sensorischen Rezeptoren ausgestattet, die noxische Reize in depolarisierende Sensorpotentiale umwandeln. Die Prototypen dieser Rezeptoren stellen die transienten Rezeptorpotentialkanäle (TRP) dar, die je nach Typ sowohl auf Hitze

bzw. Kälte, als auch auf chemische und mechanische Reizung reagieren (Woolf & Ma, 2007). Die nozizeptiven Nervenendigungen kommen in Haut, Schleimhaut, Teilen des Bewegungsapparates, Gefäßen und Eingeweiden vor und weisen dabei entweder eine Myelinisierung auf (A- $\delta$  Fasern) oder sind unmyelinisiert (C-Fasern). Die Leitungsgeschwindigkeit der C-Fasern ist wesentlich geringer als die der A- $\delta$  Fasern, die deswegen eine wichtige Bedeutung für schnelle reflektorische Antworten haben (z. B. für den Wegziehreflex). Zusätzlich können diese Fasern nochmals hinsichtlich ihrer leitenden Schmerzqualität (mechanisch, chemisch, thermisch) unterteilt werden (Dubin & Patapoutian, 2010).

Die Perikarya der Nozizeptoren befinden sich in den Spinalganglien, von dort laufen die afferenten Fasern über die Hinterwurzeln der Spinalnerven zum Hinterhorn des Rückenmarks. Dieses ist in verschiedene Laminae gegliedert, wobei die afferenten Axone der A- $\delta$ -Fasern hauptsächlich in den Laminae I und V, die C-Fasern dagegen hauptsächlich in der Lamina II enden (Basbaum et al., 2009). Dort bilden die Fasern synaptische Kontakte zu den spinalen nozizeptiven Neuronen aus. Der Hauptneurotransmitter innerhalb dieser Synapsen ist Glutamat (Glut). Diese ersten spinalen nozizeptiven Neurone projizieren als Interneurone entweder auf weitere spinale Neurone im Bereich des Vorderhorns bzw. des Seitenhorns für motorische bzw. vegetative Reflexbögen oder stellen direkt Projektionsneurone zu supraspinalen Zentren dar. Über kollaterale Verschaltungen erhalten die nozizeptiven Rückenmarksneurone auch Input von sogenannten „Wide Dynamic Range“ (WDR)-Neuronen, die sowohl niedrige bzw. nicht noxische als auch hohe noxische Reizintensitäten weiterleiten können. Die WDR-Neurone stehen somit hauptsächlich im Zusammenhang mit einer zentralnervösen Sensibilisierung, da sie unter Normalbedingungen eher inaktiv sind (Magerl & Treede, 2010).

Von den Projektionsneuronen im Rückenmark ausgehend existieren mehrere afferente Bahnen hauptsächlich im Vorderseitenstrang zu verschiedenen supraspinalen Zentren (Basbaum et al., 2009). Über den Tractus spinothalamicus erreichen die Afferenzen den Thalamus, welcher durch sein laterales System für die sensorisch-diskriminative sowie durch sein mediales System für die emotional-affektive Schmerzkomponente zuständig sein soll (Price, 2000). Über eine weitere Bahn, den Tractus spinoreticularis erreichen nozizeptive Afferenzen die Formatio reticularis (FR) und die Pons (Basbaum et al., 2009; Magerl & Treede, 2010). Auf diesem Weg können Schmerzreize das aufsteigende retikuläre Aktivierungssystem initialisieren, über das die nozizeptiven Reize den Wach-Zyklus und die Aufmerksamkeit beeinflussen können. Dabei ist noch ein weiterer indirekter Projektionsweg von der Formatio reticularis zu den medialen Thalamuskernen beschrieben. Im Tractus spinomesencephalicus bzw. im Tractus spinoparabrachialis verlaufen die nozizeptiven Afferenzen zum zentralen Höhlengrau (ZG) und Nucleus parabrachialis (NP) der Pons (Millan, 2002). Diese Strukturen spielen eine wichtige Rolle in der absteigenden Schmerzmodulierung. Vom Nucleus parabrachialis ausgehend gibt es noch Verschaltungen hin zur Amygdala und zum Hypothalamus (Millan, 2002), die den Schmerzsignalen die vegetative bzw. endokrine Komponente hinzufügen. Vor allem der laterale Anteil der Amygdala erhält hauptsächlich Afferenzen ausgehend von nozizeptiven Neuronen, somit

spielt der Mandelkern eine wichtige Rolle bei der Integration von nozizeptiven, sensorischen und affektiven Reizen. Weitere wichtige spinale nozizeptive Projektionen bestehen zu den catecholaminergen Kerngebieten des Hirnstamms. Diese üben retrograd durch hemmende bzw. bahnende Einflüsse auf die spinalen nozizeptiven Neurone eine wichtige modulierende Funktion aus (Millan, 2002; Ossipov et al., 2010).



**Abb. 3:** Darstellung der Komplexität der zentralen Strukturen des Schmerzsystems. Dabei stellen die blauen Pfeile das afferente Schmerz-Projektions-System dar. Die grauen Pfeile weisen auf modulierende Wirkungen hin und zeigen die starke Vernetzung der zentralen Strukturen der Schmerzverarbeitung, die auch als Schmerzmatrix bezeichnet wird (Apkarian et al., 2005; Magerl & Treede, 2010). In rot sind dagegen hemmende, in grün aktivierende Einflüsse dargestellt. Eine wichtige hemmende/bahnende Funktion auf die spinalen Rückenmarksneurone haben vor allem die catecholaminergen Kerngebiete im Hirnstamm. Vor allem über Noradrenalin via  $\alpha_2$ -Rezeptoren und Serotonin (5-HT) via  $5\text{-HT}_{1A}$ ,  $5\text{-HT}_2$ ,  $5\text{-HT}_7$ -Rezeptoren wird ein inhibitorischer Effekt ausgeübt, wohingegen Serotonin über  $5\text{-HT}_3$ -Rezeptoren auch bahnende Effekte haben kann (Baba et al., 2000a; 2000b; Millan, 2002; Li et al., 2002; Pan et al., 2002; Suzuki et al., 2002). Diese Effekte werden auch über Interneurone vermittelt, die wiederum über Glycin oder GABA hemmende Wirkungen auf die spinalen Rückenmarksneurone ausüben.

Vom Thalamus ausgehend erreichen die nozizeptiven Fasern schließlich die kortikalen Anteile des Gehirns, hauptsächlich den primären bzw. sekundären somatosensorischen Cortex (ssC), die Inselrinde und den Gyrus cinguli (GyC). Zusammen mit dem Thalamus und Anteilen des präfrontalen Cortex (pfC) bilden sie ein komplexes Netzwerk, das regelmäßig bei nozizeptiven Stimuli aktiviert wird (Apkarian et al., 2005). Durch diese Komplexität wird dieses Netzwerk auch als Schmerzmatrix bezeichnet. Funktionell ist diese Matrix allerdings noch sehr lückenhaft untersucht (Magerl & Treede, 2010). Ebenso wird ihr Vorhandensein kontrovers diskutiert, da diese Matrix zwar hauptsächlich bei Schmerzreizen aktiviert wird, jedoch keine Spezifität für noxische Reize gegeben ist (Iannetti & Mouraux, 2010).

Die somatosensorischen Anteile der Schmerzmatrix sollen u. a. der Koordinierung Schmerzassoziierter motorischer Programme dienen und sind gleichzeitig auch mit sensorischen und affektiven Aspekten des Schmerzes verbunden (Price, 2000). Die Inselrinde und der Gyrus cinguli spielen ebenso eine Rolle bei affektiven Aspekten, sind aber zusätzlich auch für Kognition und Aufmerksamkeit wichtig (Seminowicz et al., 2004; Ohara et al., 2005).

## **2.2.3. Rezeptoren und Neurotransmitter**

### **2.2.3.1. Transiente Rezeptorpotentialkanäle**

Die transienten Rezeptorpotentialkanäle bilden eine Superfamilie von polymodalen Transmembranrezeptoren mit 7 Unterfamilien (Montell, 2005). Hinsichtlich der unterschiedlichen Schmerzqualitäten wird der Hitzeschmerz durch die TRPV1-4-Rezeptoren detektiert, der Kälteschmerz dagegen von TRPM8- und TRPA1-Rezeptoren (Dhaka et al., 2009). Für die Wahrnehmung von mechanischen Schmerzen wird die Beteiligung der TRPV4-, der TRPA1- und der TRPC1-Rezeptoren angenommen (Petrus et al., 2007; Dubin & Patapoutian, 2010). Sie gelten deswegen als polymodal, weil sich einige von ihnen zusätzlich chemisch durch spezifische Substanzen aktivieren lassen. Beispielsweise wird der TRPV1-Rezeptor zusätzlich durch Capsaicin (Caterina et al., 1997) oder durch Piperin (McNamara et al., 2005) aktiviert. Auch viele Entzündungsmediatoren wie Bradykinin, Histamin, Prostaglandine können den TRPV1-Rezeptor indirekt über ihre jeweiligen Rezeptoren sensibilisieren, was im Zusammenhang mit dem lokalen Entzündungsschmerz steht (Hwang & Oh, 2007; Woolf & Ma, 2007). Nach Aktivierung der TRP-Rezeptoren kommt es zum Einstrom von Calcium- und Natrium-Ionen, die eine Depolarisierung hervorrufen und ein Rezeptorpotential generieren, welches in Richtung des Zellkörpers des nozizeptiven Neurons weitergeleitet wird.

### **2.2.3.2. Glutamat und NMDA-Rezeptoren**

Glutamat ist eine exzitatorisch wirkende Aminosäure im gesamten zentralen Nervensystem, die über ionotrope  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionsäure (AMPA)-, Kaniat-,

N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) und metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGluR) wirkt. AMPA-Rezeptoren bestehen unterschiedlich aus 4 Subeinheiten (GluR1-4) und verursachen hauptsächlich einen Einstrom von Natrium-Ionen. Für den Fall, dass die GluR2-Untereinheit vorhanden ist, kommt es zusätzlich zu einem Einstrom von Calcium-Ionen (Hollmann et al., 1997). Eine ähnliche Wirkung haben auch die Kainat-Rezeptoren, die aus 5 Untereinheiten bestehen. Die NMDA-Rezeptoren bestehen aus 3 NR (1-3)-Untereinheiten, wobei 2 NR1-Untereinheiten einen Kanal darstellen, der hauptsächlich für Calcium-Ionen durchlässig ist und die NR2-Subeinheit modulierende Wirkungen auf diesen Kanal besitzt (Lau et al., 2010). Die metabotropen Glutamat-Rezeptoren mGlu1-8 aktivieren dagegen intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden (Abe et al., 1992). Im nozizeptiven System übertragen afferente A- $\delta$ -Fasern initial ihre Erregung durch Glutamat-Ausschüttung an der präsynaptischen Membran auf spinale nozizeptive Neurone. Glutamat diffundiert über den synaptischen Spalt und aktiviert an der Postsynapse ionotrope AMPA- und Kainatrezeptoren (D’Mello & Dickenson, 2008) sowie metabotrope Glutamat-Rezeptoren (Fagni et al., 2000). Durch den Kationeneinstrom bilden sich unterschwellige exzitatorische postsynaptische Potentiale (EPSP) aus. Bei mehrfacher Summation dieser Potentiale kann sich ein Aktionspotential ausbilden, durch welches der einzelne Schmerzreiz an nachfolgende nozizeptive Neurone geleitet wird (Basbaum et al., 2009). Mit steigender Potentialdifferenz werden sukzessiv auch die NMDA-Rezeptoren aktiviert, da die den Kanal blockierenden Magnesium-Ionen potentialabhängig entfernt werden (Mayer et al., 1984).

## **2.2.4. Hyperalgesie**

Die Wahrnehmung von Schmerzen kann im Organismus verändert sein. Im Falle einer verminderten Schmerzsensibilität spricht man von einer Analgesie, die genauer definiert ist als eine Schmerzfreiheit auf einen Reiz, der normalerweise schmerzhaft sein müsste (IASP Taxonomy Working Group, 2011). Besitzt dagegen ein Organismus eine erhöhte Schmerzsensibilität, so liegt der Zustand der Hyperalgesie vor (IASP Taxonomy Working Group, 2011). Im Gegensatz zu dieser generell erhöhten Schmerzsensibilität beschreibt die Allodynie nur einen schmerzhaften Zustand nach einem üblicherweise nicht schmerzhaften Reiz (IASP Taxonomy Working Group, 2011). Im Nachfolgenden wird besonders auf die Hyperalgesie eingegangen, da sie von besonderer Bedeutung für das Thema dieser Dissertation ist.

### **2.2.4.1. Hyperalgesieformen**

Hinsichtlich ihrer Lokalisierung werden 2 Formen der Hyperalgesie unterschieden. Eine primäre Hyperalgesie tritt nur im Bereich des Reizortes auf, während die sekundäre Hyperalgesie um den Bereich der primären Hyperalgesie herum vorkommt.

Vom Mechanismus her wird von einer primären Hyperalgesie gesprochen, wenn die Verminderung der Schmerzschwelle durch die Sensibilisierung der nozizeptiven Endigungen bedingt ist, wobei zusätzliche zentrale Mechanismen nicht ausgeschlossen werden können (Sandkühler, 2009a). Eine sekundäre Hyperalgesie ist dagegen nur durch eine erhöhte Empfindlichkeit der zentralen nozizeptiven Neuronen bedingt, was in einer verstärkten Verarbeitung der nozizeptiven Signale resultiert (Sandkühler, 2009a).

Die Hyperalgesie ist eigentlich als Symptom per se nicht pathologisch, sondern dient nach einem Trauma als Schutzmechanismus vor weiterer Gewebszerstörung. Sie kann allerdings auch krankhaft auftreten, wenn der hyperalgetische Zustand noch anhält, obwohl die Verletzung schon längst abgeklungen ist oder dafür keine primäre Ursache gefunden werden kann. Letzteres ist der Fall bei zentralen Sensibilisierungsstörungen, wie z. B. der Fibromyalgie (Yunus, 2008; Smith et al., 2011a; 2011b). Die Fibromyalgie und weitere Krankheitskomplexe im Zusammenhang mit dem Vorliegen eines hyperalgetischen Zustands werden in Abschnitt 2.4.2. näher erläutert.

Die Sensibilisierung der Schmerzwahrnehmung kann entweder peripher an den Nozizeptoren oder zentral an den spinalen und supraspinalen Zentren erfolgen. Spinal werden dabei die erhöhte synaptische Wirksamkeit der Schmerzreizübertragung, die Abschwächung der spinalen Schmerzhemmung sowie die Mitbeteiligung der spinalen Mikrogliazellen genannt. Supraspinal wird der Ausfall der übergeordneten modulierenden nozizeptiven Neurone diskutiert (Sandkühler, 2009a; 2009b; Latremoliere & Woolf, 2009). Diese Mechanismen werden nachfolgend genauer erläutert.

#### **2.2.4.2. Periphere Sensibilisierung von Nozizeptoren**

Periphere Nozizeptoren wie der bereits beschriebene TRPV1-Rezeptor können durch Gewebshormone und Entzündungsmediatoren wie z. B. ATP, Histamin, Bradykinin, Serotonin, Prostaglandine oder Interleukine sensibilisiert werden (Basbaum et al., 2009). Sie induzieren einen verstärkten Einwärtsstrom von Kationen an der Membran des Nozizeptors, was zum Absinken der Schmerzschwelle führt. Somit können vermehrt Aktionspotentiale ausgebildet werden, was zu einer verstärkten Schmerzweiterleitung an spinale nozizeptive Neuronen führt. Dabei spielt auch die Rekrutierung von bisher inaktiven (stummen) Nozizeptoren eine Rolle (Magerl & Treede, 2010), die ebenso zur verstärkten peripheren Nozizeption beitragen.

#### **2.2.4.2. Verstärkung der synaptischen Übertragung**

Eine lang andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung zwischen zwei Neuronen wird als Langzeitpotenzierung (LTP) bezeichnet. Klassischerweise wird diese LTP hauptsächlich im Zusammenhang mit der Gedächtnisleistung im Hippocampus genannt (Ji et al., 2003; Latremoliere & Woolf, 2009), jedoch kann diese Bezeichnung auch im Rückenmark

bei Übertragung der nozizeptiven Signale auf spinale nozizeptive Neurone angewendet werden (Ji et al., 2003; Sandkühler, 2007; Ruscheweyh et al., 2011).

Diese lang andauernde Verstärkung der synaptischen Übertragung wird dadurch erreicht, dass der Calcium-Einstrom in die Postsynapse nochmals gesteigert wird, was zur Verstärkung des Schmerzreizes führt. Von besonderer Bedeutung sind dabei die bereits beschriebenen Glutamat-Rezeptoren, vor allem aber die NMDA-Rezeptoren (Azkue et al., 2003; Sandkühler, 2007).

Diese vermitteln den grundlegenden Calcium-Einstrom durch die postsynaptische Membran, was zur Aktivierung von spannungsabhängigen Calcium-Kanälen vom T-Typ führt, die ihrerseits den Einstrom von Calcium-Ionen verstärken (Ikeda et al., 2003). Daneben führt das intrazelluläre Calcium zur Aktivierung von Proteinasen (A, C, M $\zeta$ ), der Phospholipase C und einer Vielzahl weiterer Kinasen (Ruscheweyh et al., 2011). Über diese werden unter anderem intrazelluläre Calcium-Speicher geöffnet, die Aktivität der Glutamat-Rezeptoren verstärkt sowie weitere Kinasen aktiviert, die zur Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels beitragen (Fagni et al., 2000; Salter & Kalia, 2004; Ruscheweyh et al., 2011).

Neben der Glutamatwirkung wird der postsynaptische Calcium-Einstrom auch noch durch weitere Neurotransmitter wie Substanz P, „Calcitonin gene related peptide“ (CGRP), „Brain derived neurotrophic factor“ (BDNF) und Stickstoffmonoxid verstärkt (Ruscheweyh et al., 2011).

Diese verbesserte Signalübertragung führt zu einer Verstärkung der nozizeptiven Informationen und kann somit zur einer zentralen Sensibilisierung der Schmerzwahrnehmung führen (Ikeda & Murase, 2004; Sandkühler, 2007; 2009a; 2009b; Drdla & Sandkühler, 2008; Ruscheweyh et al., 2011).

### **2.2.4.3. Hemmung der spinalen Interneurone**

Im Rückenmark findet sich eine Vielzahl von Interneuronen, die überschießende Reizweiterleitungen durch die nozizeptiven Neurone nach Schmerzreizen verhindern und diese bei nicht schmerzhaften Reizen abschalten (Sandkühler, 2009a). Die Interneurone hemmen die spinalen nozizeptiven Neurone durch Ausschüttung der inhibitorischen Neurotransmitter Glycin und GABA. An der postsynaptischen Membran der nozizeptiven Neurone aktivieren diese Chlorid-permeable, ionotrope GABA-A- und Glycin-Rezeptoren oder metabotrope G-Protein gekoppelte GABA-B-Rezeptoren (Jonas et al., 1998). Dadurch kommt es zu einem hyperpolarisierenden Einstrom von Chlorid-Ionen in die Zelle, was die Auslösung eines Aktionspotentials erschwert (Sivilotti & Wolff, 1994). Durch komplexe Verschaltungen können die spinalen Interneurone über GABA-A Rezeptoren an der Präsynapse von nozizeptiven Neuronen die Glutamat-Ausschüttung hemmen bzw. an glycinergen Interneuronen die Freisetzung von Glycin inhibieren (Choi et al., 2008). Werden diese hemmenden GABAergen und glycinergen Interneurone selektiv ausgeschaltet, so kommt es zu einer Erhöhung der Schmerzsensitivität (Zeilhofer & Zeilhofer, 2008; Basbaum et al., 2009; Latremoliere & Woolf, 2009; Sandkühler, 2009a).

#### 2.2.4.4. Spinale Mikrogliazellen

Im Gegensatz zu den Interneuronen wirken die spinalen Mikrogliazellen verstärkend auf die Signalübertragung der nozizeptiven Rückenmarksneurone, indem sie BDNF und inflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  und Interleukin-6 ausschütten (Coull et al., 2005; Tsuda et al., 2005). Werden diese Mikroglia wiederum selektiv gehemmt, so tritt eine Attenuierung der induzierten thermischen bzw. mechanischen Hyperalgesie auf (Milligan et al., 2003).

#### 2.2.4.5. Hemmung der supraspinalen Steuerung

Die supraspinale Modulation der Signalübertragung von nozizeptiven spinalen Neuronen geht vom zentralen Höhlengrau des Gehirns aus. Von dort verlaufen efferente Verbindungen zu den noradrenergen Kernen im Hirnstamm (Locus Coeruleus) bzw. zu den serotoninerger Kernen (Raphe Kerne) in der rostralen ventromedialen Medulla (RVM; Millan, 2002; Magerl & Treede, 2010). Diese Neurone werden dort in neutrale und ON- bzw. OFF-Neurone eingeteilt (Heinricher et al., 1989) und vermitteln jeweils verstärkende bzw. hemmende Einflüsse auf die spinalen nozizeptiven Neurone (Millan, 2002; Heinricher et al., 2009; Abb. 3). Dabei stellen Serotonin und Noradrenalin die wichtigsten vermittelnden Neurotransmitter dar. Serotonin besitzt über die 5-HT<sub>1A</sub>-, 5-HT<sub>2</sub>- bzw. über 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren eine hemmende, über 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren dagegen auch eine bahnende Wirkung auf die nozizeptiven spinalen Neurone (Millan, 2002; Li et al., 2002; Suzuki et al., 2002). Die serotoninerger Rezeptoren befinden sich dabei hauptsächlich auf den hemmenden Interneuronen. Auf diesen kommen auch die adrenerger  $\alpha$ 2-Rezeptoren vor, über die Noradrenalin vor allem die hemmenden glycinergen Interneurone aktiviert (Pan et al., 2002; Baba et al., 2000a; 2000b).

Werden diese supraspinalen Zentren ausgeschaltet, so kann es zur Sensibilisierung von spinalen nozizeptiven Neuronen und damit zu einer vermehrten Schmerzwahrnehmung kommen (Millan 2002; Heinricher et al., 2009; Martenson et al., 2009; Sandkühler, 2009a; 2009b).

#### 2.2.5. Messung des Schmerzes

Da keine direkte Messung des Schmerzempfindens möglich ist, können nur indirekte Messungen von nozizeptiven Schmerzschwellen durchgeführt werden (Le Bars et al., 2001; Sandkühler, 2009b). Zur Überschreitung dieser Schmerzschwelle müssen den Tieren adäquate Stimuli zugeführt werden, die gleichzeitig quantifizierbar, reproduzierbar und nach Möglichkeit nicht invasiv sind (Lineberry, 1981).

Diese Reize können dabei phasische oder tonische Reaktionen hervorrufen. Wird die Schmerzschwelle nur kurzzeitig überschritten, so entsteht ein kurzer stechender Schmerz, was eine phasische Reaktion auslöst. Solche ebenso kurzen Reaktionen können durch

elektrische, mechanische oder thermische aversive Stimuli ausgelöst werden. Dauert dagegen der schmerzvolle Stimulus an, so löst dies eine tonische Schmerzreaktion aus. Wird beispielsweise chemisch ein andauernder Schmerzreiz ausgelöst, so wird dieser Bereich durch eine anhaltende Kontraktion der Muskulatur versucht zu entlasten (Le Bars et al., 2001).

Die Reaktionen auf solche Reize sind tierartunterschiedlich und lassen sich wiederum nach der Verarbeitung in komplexe und weniger komplexe Reaktionen unterscheiden. Letztere laufen hauptsächlich in relativ „niedrigen“ zentralen nozizeptiven Strukturen wie dem Rückenmark ab. Allerdings wird wie bei vielen anderen spinalen Prozessen auch eine deszendierende supraspinale Beeinflussung diskutiert (Le Bars et al., 2001). Das Überschreiten der Schmerzschwelle wird dabei je nach Reiz durch reflexartige Reaktionen wie Hüpfen, Wegziehen oder Vokalisation zum Ausdruck gebracht. Allerdings muss beachtet werden, dass diese Reaktionen nicht immer durch schmerzhaft Reize ausgelöst werden müssen, sondern auch andere Umgebungsreize dafür verantwortlich sein können (Schouenborg & Sjölund, 1983).

Komplexe Reaktionen erfordern dagegen die Verarbeitung innerhalb der supraspinalen Strukturen des nozizeptiven Systems. Durch wiederholtes Lernen zeigen die Tiere nach konditionierten schmerzhaften Reizen ein typisches Verhalten wie die Immobilität in schmerzfreien Ruhepositionen, Schmerzvermeidungsreaktionen oder eine erhöhte Aggressivität gegenüber dem aversiven Stimulus. Diese komplexen Reaktionen haben jedoch oftmals den Nachteil, dass sie schwierig zu interpretieren sind (Le Bars et al., 2001).

Ziel dieser Messungen ist die Bestimmung der Latenz (Zeit oder Gewicht) zwischen dem Stimulusbeginn und der Reaktion des Tieres. Ist diese Latenz vergrößert, so liegt der Zustand der Analgesie vor. Ist diese Spanne im Gegensatz dazu verkleinert, so wird dies einer Hyperalgesie gleichgesetzt.

Nachfolgend werden die möglichen Tiermodelle zur Messung des nozizeptiven Verhaltens nach der Art des Stimulus unterteilt und kurz erläutert.

### **2.2.5.1. Tests basierend auf elektrischer Stimulation**

Elektrische noxische Reize können dem Tier entweder über eine subkutane Elektrode (Levine et al., 1984) oder über einen elektrifizierten Boden verabreicht werden. Dabei kann der Reiz entweder an Schwanz, Pfote oder Muskulatur erzeugt werden. Die Reizung selbst erfolgt mit einem einzelnen elektrischen Schock oder mit einer Serie von elektrischen Stößen. Die Tiere reagieren darauf mit Zuckungen, Fluchtverhalten, Vokalisation oder mit Aggressionsverhalten wie dem Beißen in die Elektroden (Le Bars et al., 2001).

Die Vorteile solcher Reize liegen in der guten Quantifizier- und Reproduzierbarkeit sowie der geringen Invasivität. Allerdings stellen die elektrischen Ströme einerseits keinen natürlichen Schmerzreiz dar, andererseits werden dadurch alle peripheren Neuronen aktiviert und somit sind alle Nervenfasertypen involviert - also auch die, die nicht spezifisch den Schmerz leiten (Le Bars et al., 2001).

### **2.2.5.2. Tests basierend auf mechanischer Stimulation**

Die mechanische Reizung basiert auf der Erzeugung eines Druckschmerzes, der meistens an Intensität progressiv zunimmt. Dieser Reiz wird beim Versuchstier hauptsächlich an der Hinterpfote oder am Schwanz induziert.

Vorteilhaft ist dabei, dass es sich um einen physiologischen Schmerzreiz handelt und eine erhöhte Druckschmerzhaftigkeit auch häufig beim Menschen vorkommt. Jedoch kann mit einer anhaltenden und/oder zu häufigen Stimulierung eine entzündliche Gewebsreizung erfolgen, so dass eine periphere Sensibilisierung stattfinden kann. Dadurch wird die Schmerzschwelle schneller erreicht, womit diese Messungen nur bedingt quantifizier- bzw. reproduzierbar sind (Le Bars et al., 2001).

Basierend auf einer mechanischen Stimulation kommen zur Ermittlung der Schmerzschwelle vor allem 2 Testverfahren besonders häufig zum Einsatz: Der Randall-Selitto-Test oder die Von-Frey-Filamente (Le Bars et al., 2001; Lambert et al., 2009). Beim Test von Randall & Selitto (1957) wird über einen konisch zulaufenden Stift ein zunehmender Druck auf die Hinterpfote der Ratte ausgeübt, bis die Tiere die Pfote wegziehen. Dies ist oftmals verbunden mit Abwehrreaktionen und Lautgebung, was für die Involvierung supraspinaler Zentren bei der Reaktion auf den mechanischen Druckschmerz spricht (Le Bars et al., 2001). Nachteilig ist dagegen jedoch die Fixierung der Tiere im Rahmen der Messung, was ohne vorheriges Training zu einem akuten Stress führen kann, der die Schmerzschwelle beeinflussen kann (Abschnitt 2.1.7.4.).

Bei der Bestimmung der mechanischen Schmerzschwelle mittels der Von-Frey-Filamente werden die Tiere in einen speziellen Käfig mit einem Gitterboden verbracht, in dem sie sich frei bewegen können. Von unterhalb des Gitterbodens wird mit einem Filament auf die Pfütenunterseite ein kontinuierlich ansteigender Druck ausgeübt. Wird die Schmerzschwelle überschritten, zieht das Tier die Pfote weg und die Latenz bis dahin wird erfasst (Lambert et al., 2009). Die Tiere müssen für diese Messung nicht fixiert werden, was jedoch die Messung aufgrund von spontanen Veränderungen der Fußposition erschwert.

### **2.2.5.3. Tests basierend auf thermischer Stimulation**

Eine thermische Stimulation von Nozizeptoren kann entweder über einen (Infrarot-) Hitzestrahler oder heißes Wasser erfolgen. Diese Reizung wird dabei hauptsächlich an der Pfote oder am Schwanz des Tieres durchgeführt.

Die Vorteile einer solchen thermischen Reizung liegen in der Erzeugung eines physiologisch in der Natur vorkommenden Schmerzes sowie der selektiven Stimulierung von cutanen Nozizeptoren bzw. Nervenfasern.

Jedoch ist die Eindringgeschwindigkeit in die Haut geringer als die Leitungsgeschwindigkeit von Schmerzreizen, so dass die peripheren und zentralen Neuronen nur ungleichmäßig aktiviert werden (Le Bars et al., 2001).

Außerdem erhöht sich mit einer wiederholten bzw. einer andauernden Reizung die Hauttemperatur, wodurch die Schmerzschwelle schneller durch thermische Stimulation erreicht wird, was die Quantifizier- und Reproduzierbarkeit einschränkt (Le Bars et al., 2001; Carrive et al., 2011). Thermische Detektionssysteme von Schmerzschwellen werden sehr häufig eingesetzt. Die am meisten genutzten Verfahren stellen dabei der Tail-Flick-Test, der Test nach Hargreaves und der Hot-Plate-Test dar (Le Bars et al., 2001).

Der Tail-Flick-Test basiert auf einer Hitzeeinstrahlung auf den Schwanz eines Tieres oder dem Eintauchen des Schwanzes in heißes Wasser, bis es diesen nach Überschreitung der Schmerzschwelle in einer reflexartigen Reaktion von der Stimulationsquelle wegzieht (Smith et al., 1943). Der Tail-Flick-Test beruht auf spinalen Reflexmechanismen, die jedoch von supraspinalen Zentren gesteuert werden (Douglas & Carstens, 1997; Le Bars et al., 2001). Dieser Test hat den Vorteil, dass er sehr leicht durchzuführen ist und die Reaktion des Tieres nach Erreichen der Schmerzschwelle sehr gut gedeutet werden kann. Als Nachteil wirkt sich jedoch die Fixierung der Tiere zum Messen aus sowie die Anpassung der Tiere an die Messungen, wenn diese zu häufig wiederholt werden oder die Pausen zwischen den Messungen zu klein sind (Carstens & Wilson, 1993).

Das Besondere am Hargreaves- („Fuß-Wegzieh“)-Test ist, dass vor der eigentlichen Messung den Tieren zusätzlich unilateral eine die Nozizeptoren sensibilisierende Substanz (z. B. Carrageenan oder Formalin) subkutan in die Hinterpfote injiziert werden kann (Hargreaves et al., 1988). Daraufhin wird auf diese Stelle ein Hitzestrahler gerichtet und die Latenzzeit gemessen, bis das Tier diesen Fuß wegzieht. Wie auch bei den Von-Frey-Filamenten wird für die Messung keine zusätzliche Fixierung der Tiere benötigt, was jedoch auf Grund der spontanen Veränderungen der Fußposition die Messung erschwert.

Beim sogenannten Hot-Plate-Test werden die Tiere auf eine heiße Metall-Platte gesetzt, die sich unterhalb eines Plexiglaszylinders befindet und aus dem die Tiere nicht entkommen können. Die Hitze an den Pfoten führt dazu, dass die Tiere entweder hoch springen, um der aversiven Umgebung zu entkommen oder sich die Füße lecken. Diese beiden Verhaltensweisen werden als Schmerzreaktionen gedeutet (Carter, 1991). Im Gegensatz zum Tail-Flick-Test wird dieses Verhalten hauptsächlich supraspinal gesteuert (Langerman et al., 1995).

Der Vorteil dieses Tests liegt darin, dass die Schmerzen supraspinal verarbeitet werden und sich nicht in reflexartigen Reaktionen äußern. Das ist jedoch bei Ratten auch von Nachteil, da diese neben den beiden beschriebenen Verhaltensweisen (Lecken und Springen) noch eine Vielzahl anderer stereotypischer Reaktionen zeigen, wie z. B. Aufrichten, Aufstampfen mit den Pfoten und Defäkation (Espejo & Mir, 1993). Durch dieses unterschiedliche Verhalten gestaltet sich die Interpretation schwierig, ob die Reaktion im Zusammenhang mit dem wahrgenommenen Schmerz steht. Ebenso sind auch hier Anpassungsreaktionen beschrieben, was bei zu frequentierter Anwendung zu einer Vergrößerung der Latenz führt (Plone et al., 1996).

Auch Kälte kann eingesetzt werden, um einen Schmerzreiz zu induzieren. Jedoch wird dieses Verfahren bis auf die Allodynietests bei neuropathischen Schmerzen sehr selten

eingesetzt (Le Bars et al., 2001). Das Prinzip des Cold-Plate-Tests gleicht dem der Hot-Plate, nur dass anstatt der heißen eine kalte Metallplatte verwendet wird.

#### **2.2.5.4. Tests basierend auf chemischer Reizung**

Also nozizeptiver Stimulus werden den Tieren Substanzen appliziert, die eine reizende und Schmerz auslösende Wirkung haben und eine lokale chemische Hyperalgesie auslösen. Dies stellt im Vergleich zu den zuvor beschriebenen Stimuli eine langsame, jedoch andauernde Art der nozizeptiven Reizung dar (Le Bars et al., 2001). Der Mechanismus dazu basiert auf der Sensibilisierung der TRP-Kanäle (Hwang & Oh, 2007; Woolf & Ma, 2007, Abschnitt 2.2.3.1.). Auch das Schmerzverhalten der Tiere ist unterschiedlich zu den kurz induzierten noxischen Reizen, da die Tiere dem Schmerz nicht durch Flucht- oder Abwehrreaktionen entkommen können. Die Tiere können nur versuchen, die schmerzhafteste Stelle z. B. durch Bewegung oder Muskelanspannung zu entlasten (Le Bars et al., 2001). Typische Reflexreaktionen können somit nicht ausgelöst werden, allerdings kann die Schwelle bis zum Auslösen durch einen weiteren noxischen Reiz vermindert werden, wie es beim Test nach Hargreaves angewendet wird (Hargreaves et al., 1988).

Die Injektion der Substanzen kann intradermal, intraperitoneal oder direkt in die Hohlgänge erfolgen (Lariviere & Melzack, 1996; Le Bars et al., 2001). Das hat den Vorteil, dass somit neben den somatischen Schmerzen auch viszerale Schmerzen messbar sind. Nachteilig ist dabei aber die Dauer der Schmerzen, da diese nur bis zu wenigen Stunden anhalten und dieses Modell schwer bei chronischen Schmerzuntersuchungen einsetzbar ist. Auch die Tatsache, dass die Hyperalgesie bereits durch reizende Substanzen ausgelöst wurde, kann sich nachteilig auf die Untersuchung anderer hyperalgetischer Induktionsmöglichkeiten auswirken (Le Bars et al., 2001).

Für die intradermale Injektion wird am häufigsten Formalin genutzt, jedoch können auch andere Substanzen wie Freund'sche Adjuvanz, Capsaicin oder Bienengift verwendet werden (Lariviere & Melzack, 1996; Le Bars et al., 2001). Beim Formalin-Schmerztest wird den Tieren unilateral Formalin subplantar in die Hinterpfote injiziert und das ausgelöste Schmerzverhalten (Lecken, Schütteln oder Drehen der Pfote) analysiert.

Dagegen erfolgt beim sogenannten „Writhing-Test“ die Behandlung der Tiere mit einem reizenden Agens intraperitoneal. Das stereotypische Verhalten der Tiere reicht dabei von abdominalen Kontraktionen über das Zittern der Muskeln bis hin zu einer verminderten motorischen Aktivität (Le Bars et al., 2001).

## **2.3. Auswirkung von Stress auf die Nozizeption**

### **2.3.1. Allgemein**

Schon an den anatomischen Verhältnissen kann man erkennen, dass zentrale Strukturen des Schmerz- und nozizeptiven Systems eng miteinander verknüpft sind (Abschnitte 2.1.2. und 2.2.2.). Dies stellt die Grundlage für die Beeinflussung der Nozizeption durch Stress dar. Ob ein Stressor jedoch eine Analgesie oder eine Hyperalgesie auslösen kann, hängt von verschiedenen Einflüssen ab. In diesem Zusammenhang wird die Emotionalität und Erregung der Tiere, die Art, Dauer und Intensität des Stresses sowie die Messmethodik zur Erfassung der Nozizeption genannt (Vidal & Jacob, 1986; King et al., 2003; Geerse et al., 2006; Imbe et al., 2006). Daneben spielen auch der Tierstamm und das Geschlecht der Tiere eine Rolle (Urca et al., 1985; Vendruscolo et al., 2004; Devall et al., 2009).

Hinsichtlich des emotionalen Status konnte sowohl im Tier- als auch im Humanmodell gezeigt werden, dass sich Angst (Reaktion auf eine unbestimmte Gefahr) und Furcht (Reaktion auf eine bestimmte Gefahr) unterschiedlich auf die Schmerzsensibilität auswirken. Während Angstverhalten eher mit einer Hyperalgesie einhergeht (Rhydy & Meagher, 2000; Ploghaus et al., 2001; Devall et al., 2009), wird die Furcht mit einem Zustand der Analgesie assoziiert (Fanselow, 1986; Meagher et al., 1996). Voruntersuchungen bei gestressten Tieren mittels Aktivitäts- bzw. Erregungsmessungen in „Open-field“-Experimenten zeigten, dass eine hohe Aktivität eher mit einer Analgesie verknüpft ist während niedrige Aktivitäten dagegen bei hyperalgetischen Veränderungen auftreten (Vidal & Jacob, 1986, Geerse et al., 2006).

Wird das Tier dem Stressor nur akut ausgesetzt, so kann sich die Schmerzsensibilität vermindern, um dem Tier eine „Flight-or-Fight“-Situation zu ermöglichen. Wird dagegen ein andauernder, chronischer Stress appliziert, so kommt es hauptsächlich zur Verstärkung der Schmerzwahrnehmung (Imbe et al., 2006; Bilsky et al., 2011; Nagakura et al., 2011).

Das weiterhin auch die Art der nozizeptiven Messung entscheidend ist (Pilcher & Browne, 1983; King et al., 2003), zeigt sich am Beispiel eines akuten Immobilisationsstresses: Bei der Messung der thermischen Nozizeption waren die einfachen Schmerzreflexe (Lecken) vermindert, was als analgetische Wirkung gedeutet wurde. Gleichzeitig zeigten die Tiere in einem komplexeren Test basierend auf der Vermeidung von mechanischen Schmerzen ein verstärktes Fluchtverhalten, was als Hyperalgesie interpretiert wurde (King et al., 2003; Vierck et al., 2009).

### **2.3.2. Mechanismen**

#### **2.3.2.1. Stress-induzierte Analgesie**

Wird ein Stressreiz durch kognitive Prozesse im Gehirn als Gefahr eingestuft, löst dies eine Furcht vor diesem möglicherweise schmerzhaften oder aversiven Ereignis aus (Vidal &

Jacob, 1986, Imbe et al., 2006). Eine schützende Reaktion darauf soll dabei die Verminderung der Schmerzsensibilität darstellen (Fanselow, 1986; Meagher et al., 1996; Rhydy & Meagher, 2000). Dies wird über die Ausschüttung von endogenen Opioiden, Endocannabinoiden sowie Noradrenalin und Serotonin erreicht, die die lokalen spinalen Interneurone bzw. supraspinalen deszendierenden Hemmzentren aktivieren, was auf Rückenmarksebene zu einer Inhibition der nozizeptiven Signale führt (Lewis et al., 1980; Terman et al., 1984; Hohmann et al., 2005; Butler & Finn, 2009).

Über ähnliche Mechanismen wird auch der DNIC-Effekt ausgelöst, der jedoch nicht mit der Stress-induzierten Analgesie zu verwechseln ist. Dieses Phänomen tritt auf, wenn schmerzhafte Reize Stressoren darstellen. Diese bewirken initial eine Schmerz-induzierte Erhöhung der Schmerzempfindlichkeit, wodurch nachfolgende, erneut zugeführte Schmerzreize gehemmt werden, völlig unabhängig von der Lokalisation dieser Reize (Villanueva & Le Bars, 1995). Die Mechanismen beruhen auf der Opioid- und Serotonin-vermittelten Aktivierung von hemmenden Rückenmarksneuronen, wodurch die nozizeptiven Signale abgeschwächt werden. Da der DNIC-Effekt aber hauptsächlich auf spinaler Ebene abläuft, muss dieser abgegrenzt werden von der supraspinalen Stress-induzierten Hyperalgesie (Butler & Finn, 2009).

### **2.3.2.2. Stress-induzierte Hyperalgesie**

Im Gegensatz zur Stress-induzierten Analgesie liegen zur Stress-bedingten Erhöhung der Schmerzsensibilität keine gesicherten allgemeinen Informationen über die Mechanismen vor (Imbe et al., 2006; Rivat et al., 2007; Bilsky et al., 2011; Donello et al., 2011). Anhand einer Vielzahl von Modellen wurden jedoch Hinweise gefunden, in wieweit Stress eine Hyperalgesie auslösen kann. Die vermuteten Mechanismen werden dabei jeweils anhand der spezifischen Tiermodelle erläutert (Abschnitt 2.3.4.) und in Abbildung 4 schematisch zusammengefasst.

## **2.3.3. Tiermodelle der Stress-induzierten Analgesie**

### **2.3.3.1. Akute Stress-induzierte Analgesie**

Schon in den 70er Jahren wurde gezeigt, dass akute Stressoren wie elektrische Schocks, Rotation (Hayes et al., 1978; Lewis et al., 1980) und Schwimmstress (Jackson & Kitchen, 1989) in der Lage sind, eine Analgesie im Tail-Flick- bzw. Hot-Plate-Test auszulösen. Ebenso wurden bereits damals opioide bzw. nicht-opioide Mechanismen für die Erzeugung des analgetischen Zustands vermutet (Abschnitt 2.3.2.1.).

Sehr häufig konnten analgetische Effekte auch bei akutem (einmaligen) Immobilisationsstress beobachtet werden (Pilcher & Browne, 1983; Porro & Carli, 1988; Aloisi et al., 1994; Gamaro et al., 1998; King et al., 2003; Costa et al., 2005), was ebenso im Zusammenhang

mit der Opioid-vermittelten Aktivierung von absteigenden Nervenbahnen steht, die die nozizeptiven Rückenmarksneurone hemmen.

## **2.3.4. Tiermodelle der Stress-induzierten Hyperalgesie**

### **2.3.4.1. Akute Stress-induzierte Hyperalgesie**

Frühere Versuchsergebnisse zeigen ebenso, dass andere akute Stressoren wie Vibration (Jørum, 1988), das Verbringen in eine neue Umgebung und das Handling der Tiere (Vidal & Jacob, 1986) in der Lage sind, eine Hyperalgesie zu induzieren.

Über die pharmakologische Beeinflussung konnten bei diesen Modellen allerdings schon damals große Unterschiede untereinander festgestellt werden, was für eine Komplexität der beteiligten Mechanismen spricht. Die Neuigkeitsstress-induzierte Hyperalgesie ließ sich nur durch Gabe von GABA- und Glycin-Agonisten beeinflussen, während sich die Vibrationsstress-induzierte Hyperalgesie nur mit einem Glucocorticoid-Rezeptor-Agonisten hemmen ließ (Vidal & Jacob, 1986).

Aber auch bei akutem (einmaligen) Immobilitätsstress konnten thermische (Oyadeyi et al., 2005) bzw. mechanische hyperalgetische (Pilcher & Browne, 1983) Veränderungen festgestellt werden. Nach pharmakologischer Intervention mit selektiven Antagonisten wurde in diesem Zusammenhang gezeigt, dass dabei entweder opioide (Pilcher & Browne, 1983) oder „nicht-adrenerge“ (Oyadeyi et al., 2005) Mechanismen eine Rolle spielen sollen.

Der große Nachteil an diesen Modellen war jedoch, dass der messbare Zustand der Hyperalgesie nur wenige Minuten anhielt, was die Nutzung dieser präklinischen Modelle für chronische Schmerzzustände einschränkt.

### **2.3.4.2. Wiederholte Schwimmstress-induzierte Hyperalgesie**

Wurden Ratten 3-maligem täglichen Schwimmstress (für je 20 min) ausgesetzt, so entwickelten sie eine thermische Hyperalgesie im Hot-Plate-Test (Suarez-Roca et al., 2006a; 2006b). Pharmakologisch konnte dabei gezeigt werden, dass dabei sowohl die NMDA- als auch die  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren mitbeteiligt sind. Dieser Schwimmstress führt weiterhin auch zu einer verminderten Hemmwirkung auf Rückenmarksebene durch eine verringerte GABA-A-Rezeptor-Aktivierung (Suarez-Roca et al., 2006a; 2008). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass zur Ausbildung der Hyperalgesie der verminderte spinale GABA-A-Tonus benötigt wird, während für die Aufrechterhaltung der Hyperalgesie die verstärkte Glutamat-Ausschüttung und die damit verbundene NMDA-Rezeptor-Aktivierung verantwortlich ist (Quintero et al., 2011).

Ebenso konnte durch wiederholten Schwimmstress im Formalin-Schmerz-Modell eine erhöhte Schmerzsensibilität festgestellt werden. In diesem Zusammenhang konnte eine Mitbeteiligung der rostralen ventromedialen Medulla gezeigt werden, da die Inaktivierung

dieser Neurone zu einer Abschwächung des hyperalgetischen Effekts geführt hat (Imbe et al., 2010). Innerhalb dieser rostralen ventromedialen Medulla befinden sich neben den OFF-Neuronen auch die ON-Neurone, die durch Stresswirkung aktiviert werden und auf Höhe des Rückenmarks die Reizweiterleitung der nozizeptiven Neurone verstärken können (Martenson et al., 2009).

#### **2.3.4.3. Wiederholte Sozialstress-induzierte Hyperalgesie**

Auch über wiederholten Sozialen Stress („social defeat“) konnte im Randall-Selitto-Test und im Test mit den Von-Frey-Filamenten eine mechanische Hyperalgesie ausgelöst werden (Rivat et al., 2010). Dabei wurde gezeigt, dass dieser Stress zu einer Neuroinflammation über eine verstärkte Aktivierung der medullären Cyclooxygenase-2 führt. Dies wird im Zusammenhang mit der deszendierenden Aktivierung der nozizeptiven Rückenmarksneurone durch die rostrale ventromediale Medulla genannt (Rivat et al., 2010).

#### **2.3.4.4. Chronische Immobilisationsstress-induzierte Hyperalgesie**

Immobilisationsstress wurde von vielen Arbeitsgruppen angewandt, um im Tier eine Hyperalgesie auszulösen. Um eine Immobilität der Tiere zu erzielen, kam dabei in allen Fällen eine einengende Plexiglasröhre zum Einsatz. Für diese hyperalgetischen Veränderungen im Tail-Flick-Test müssen die Tiere oftmals bis zu 8 Wochen lang diesem Stressor ausgesetzt werden (Gamaro et al., 1998; da Silva Torres et al., 2003; Dantas et al., 2005; Gameiro et al., 2006; Costa et al., 2005; Bardin et al., 2009). Aufgrund der Abnahme der Opioid-Rezeptoren-Dichte im Rückenmark sowie in supraspinalen Strukturen wie dem Hippocampus werden in diesem Zusammenhang opioide Mechanismen vermutet (Dantas et al., 2005). Pharmakologisch hatten selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer sowie Opioid-Rezeptor-Agonisten einen vergleichsweise geringen antihyperalgetischen Effekt, was zusätzlich für die Beteiligung dieser Systeme spricht (da Silva Torres et al., 2003; Gameiro et al., 2006).

Ratten, die einem 3-wöchigen Immobilisationsstress (täglich für 6h) ausgesetzt waren, zeigten ebenso eine thermische Hyperalgesie im Tail-Flick-Test (Imbe et al., 2004; Senba et al., 2011). Diese Verstärkung der Schmerzverarbeitung wird auf die Aktivierung der rostralen ventromedialen Medulla zurückgeführt. Speziell konnte dort gezeigt werden, dass unter anderem die Tryptophan-Hydrolase, ein Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Serotonin, hochreguliert war. Daraus schlossen die Autoren, dass dadurch über serotonerge 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren eine deszendierende Verstärkung der spinalen Schmerzverarbeitung erfolgt (Oyama et al., 1996; Senba et al., 2011).

#### **2.3.4.5. Wiederholte Neuigkeitsstress-induzierte Hyperalgesie**

Durch das tägliche Verbringen von Ratten in eine neue Umgebung konnte im Randall-Selitto-Test in Verbindung mit einer Carrageenan-Behandlung eine mechanische Hyperalgesie nachgewiesen werden (Rivat et al., 2007). Wird den Tieren allerdings vor Stressbeginn eine geringe Dosierung eines Opioids verabreicht, so stellte sich paradoxerweise ebenso eine Hyperalgesie ein. Daraus wurde geschlussfolgert, dass vorherige Opioid-Gaben und vormalige Schmerzerfahrungen zur Sensibilisierung der Nozizeption beitragen können (Rivat et al., 2007).

Für diese Neuigkeitsstress-induzierte Hyperalgesie wird zusätzlich angenommen, dass die vermehrte Schmerzsensibilität durch Störungen innerhalb der monoaminergen Systeme zustande kommt, was wiederum in einer verstärkten synaptischen Weiterleitung auf Ebene des Rückenmarks resultieren soll (McEwen & Kalia, 2010).

#### **2.3.4.6. Wiederholte Lärmstress-induzierte Hyperalgesie**

Obwohl alleiniger Lärmstress nicht in der Lage war, eine Hyperalgesie zu induzieren, konnte dieser Stressor eine periphere Adrenalin-induzierte Hyperalgesie im Randall-Selitto-Test verstärken. Daraus wurde geschlussfolgert, dass zur Sensibilisierung von peripheren Nozizeptoren sowohl Glucocorticoide als auch Adrenalin benötigt werden (Khasar et al., 2005).

Weiterführend wurde gezeigt, dass es im Rahmen dieser peripheren Sensibilisierung zu einer veränderten intrazellulären Signaltransduktion kommt, bei der verstärkt  $G_i$ -Proteine aktiviert werden (Khasar et al., 2008). Dies konnte bestätigt werden, indem diese inhibitorischen  $G_i$ -Proteine pharmakologisch aktiviert wurden und sich ebenso eine Hyperalgesie ausgebildet hat (Dina et al., 2009).

Zusätzlich wird angenommen, dass die chronisch hohen Adrenalin Spiegel nach Lärmstress zu einer veränderten adrenergen Rezeptoraktivierung führen, die für die Induktion und Aufrechterhaltung der Hyperalgesie verantwortlich gemacht wird (Khasar et al., 2009).

Ein weiterer Mechanismus, wie Lärmstress eine mechanische Hyperalgesie induziert, basiert auf der Beeinflussung der Nozizeption durch adrenerge deszendierende Verschaltungen. Dabei wird über die Aktivierung von  $\alpha_2$ -adrenergen Rezeptoren eine hemmende Wirkung vermittelt. Werden dagegen die  $\alpha_1$ -adrenergen Rezeptoren aktiviert, so kommt es zur Verstärkung der Nozizeption. Es konnte selektiv der  $\alpha_2$ -Tonus der deszendierenden Bahnen ausschaltet und eine Hyperalgesie festgestellt werden, während die Hemmung der  $\alpha_1$ -Rezeptoren zur Aufhebung der vermehrten Schmerzsensibilität führte (Donello et al., 2011).

#### **2.3.4.7. Chronische Kältestress-induzierte Hyperalgesie**

Mit einer aufwendigen Kältestress-Applikation konnte in Ratten eine mechanische Hyperalgesie im Randall-Selitto-Test ausgelöst werden (Satoh et al., 1992; Okano et al.,

1985). Bei 5-tägiger bzw. 3-wöchiger Stressdauer konnte mit einem modifizierten Randall-Selitto-Test zusätzlich eine Hyperalgesie im Bereich der Unterschenkel-Muskulatur festgestellt werden (Nasu et al., 2009).

Pharmakologisch werden auf Ebene des Rückenmarks eine verstärkte nozizeptive Signalübertragung durch eine erhöhte Glutamat- und Substanz P-Ausschüttung sowie eine verstärkte NMDA-Rezeptor-Aktivierung diskutiert (Okano et al., 1985; Satoh et al., 1992). Zusätzlich wird auch eine Hypofunktion der supraspinalen und spinalen Opioid-Rezeptoren angenommen, da die Gabe von selektiven Opioid-Agonisten die Hyperalgesie nicht aufheben konnte (Omiya et al., 2000).

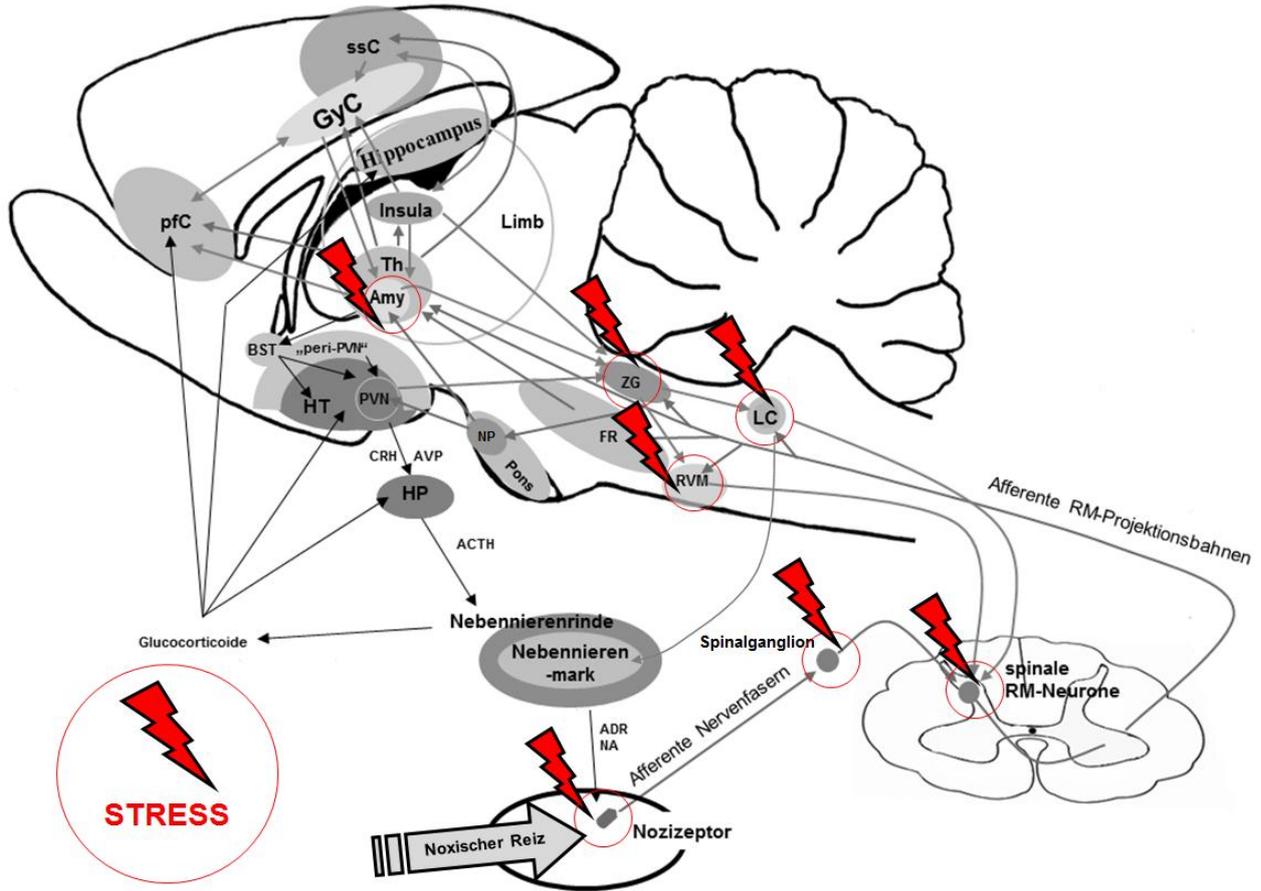
#### **2.3.4.8. Stress-induzierte viszerale Hyperalgesie**

Es sind mehrere Stress-Modelle bekannt, die eine viszerale Hyperalgesie induzieren können. Ein besonderes Augenmerk ist dabei auf den „Water-Avoidance-Stress“ (das Aussetzen eines Tieres in einer Wasserumgebung und der Versuch, daraus zu entfliehen oder dies zu vermeiden) zu richten. Dieser induziert nach 1- oder 7-maliger täglicher Applikation eine viszerale Hyperalgesie. Dies wurde über die Anzahl der abdominalen Kontraktionen gemessen, die nach der Überdehnung des Colons und des Rektums zur Entlastung ausgeführt wurden (Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2007). Über die Applikation von Glucocorticoid-Rezeptor und Mineralocorticoid-Rezeptor-Antagonisten innerhalb der Amygdala (wie bereits in den Abbildungen 1 und 3 dargelegt, stellt die Amygdala sowohl bei der Stress- als auch bei der Schmerzverarbeitung eine wichtige Rolle dar) konnte eine Beteiligung dieser Rezeptoren beim Geschehen der Hyperalgesie nach 7 Tagen festgestellt werden (Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2010a; 2012).

Dies steht in Übereinstimmung mit weiteren Ergebnissen dieser Arbeitsgruppe, da sie zeigen konnten, dass eine einzelne Gabe von Corticosteron innerhalb der Amygdala die viszerale Schmerzsensitivität erhöht. Diese Hyperalgesie wurde pharmakologisch ebenso durch einen Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten bzw. einen CRH1-Rezeptor-Antagonisten abgeschwächt (Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2007; 2010b).

In Anlehnung an die „Water-Avoidance-Stress“-induzierte viszerale Hyperalgesie konnte gezeigt werden, dass dieser Stressor bei 10-maliger Anwendung zur Erhöhung von Corticosteron im Plasma führt. Diese vermehrten Glucocorticoide sollen im Bereich der Spinalganglien die Expression von Cannabinoid (CB)-1-Rezeptoren vermindern und gleichzeitig die Expression der TRPV1-Rezeptoren erhöhen, was zur Ausbildung der viszeralen Hyperalgesie beiträgt (Hong et al., 2011).

Neben diesem Stressmodell konnten auch partieller Immobilisationsstress (Bradesi et al., 2002) oder sozialer Isolationsstress (Coutinho et al., 2002) eine viszerale Hyperalgesie auslösen. Beide Arbeitsgruppen postulierten dafür ebenso die Mitbeteiligung von CRH und dem CRH1-Rezeptor.



**Abb. 4:** Zusammenfassende Darstellung der möglichen Mechanismen der Stress-induzierten Hyperalgesie. Die anatomischen Strukturen, an denen Veränderungen zu finden sind, sind rot markiert. Vor allem die supraspinale rostrale ventromediale Medulla spielt für die Verstärkung der Schmerzverarbeitung innerhalb des Rückenmarks eine große Rolle, ebenso wie der Ausfall der lokalen spinalen Inhibitionsmechanismen. Daneben bewirkt Stress auch eine verstärkte Signalübertragung von Schmerzreizen auf die spinalen nozizeptiven Neurone, was zur Intensitätserhöhung dieses Reizes führt. Für die viszerale Hyperalgesie konnte gezeigt werden, dass Stress die Nozizeption unter Mitbeteiligung der Glucocorticoid-Rezeptoren in der Amygdala sowie über Corticosteron-induzierte Veränderungen von Cannabinoid- und TRP-Rezeptoren innerhalb der Spinalganglien verstärken kann. Aber auch peripher sind die Glucocorticoide und Adrenalin an der Sensibilisierung von Nozizeptoren beteiligt. Das sympathische System mit dem Locus Coeruleus spielt dabei ebenso eine Rolle, gerade bei der Lärmstress-induzierten Hyperalgesie (Details, siehe Text).

## **2.4. Somatoforme und funktionelle Schmerzsyndrome des Menschen**

### **2.4.1. Allgemein**

Wie in Abschnitt 2.3. beschrieben, kann vor allem andauernder Stress die Schmerzempfindlichkeit erhöhen.

Solche andauernden Erhöhungen der Schmerzempfindlichkeit mit möglicher Stressbeteiligung finden sich beim Menschen in einer Vielzahl von Syndromen wie der Fibromyalgie, dem Reizdarmsyndrom („irritable bowel syndrome“), der post-traumatischen Stresserkrankung („post-traumatic stress disorder“), dem chronischen Spannungskopfschmerz („chronic tension-type headache“), den chronischen Unterbauchbeschwerden („chronic pelvic pain“) oder der craniomandibulären Dysfunktion („temporomandibular disorder“) (Ehlert et al., 1999; McLean & Clauw, 2005; McEwen & Kalia, 2010; Nater et al., 2011).

Diese Syndrome werden einerseits hinsichtlich ihres Pathomechanismus der verstärkten Schmerzverarbeitung in die Gruppe der zentralen Sensibilisierungsstörungen (central sensitivity syndrome) eingeordnet (Yunus, 2008; Smith et al., 2011a; 2011b).

Andererseits ist der Mechanismus, der zur Entstehung dieser zentralen Sensibilisierungsstörungen führt, noch weitgehend unbekannt und in der Regel nicht auf organische Ursachen zurückzuführen. Es wird daher angenommen, dass äußere Faktoren wie Stress dabei eine besondere Rolle spielen. Daher können diese zentralen Sensibilisierungsstörungen zusätzlich auch als somatoforme und funktionelle Syndrome bezeichnet werden (Tak & Rosmalen, 2010; Nater et al., 2011).

Um diesen beiden Sachverhalten gerecht zu werden, wird für diese Syndrome nachfolgend die Bezeichnung „somatoforme und funktionelle Schmerzsyndrome“ verwendet. Momentan wird angenommen, dass die präklinischen Modelle der Stress-induzierten Hyperalgesie aufgrund der Beteiligung von Stress an der verstärkten Schmerzempfindlichkeit der Tiere die beste Approximation zur Grundlagenuntersuchung dieser somatoformen und funktionellen Schmerzsyndrome bieten (Imbe et al., 2006; Nagakura et al., 2011). Allerdings sind die Mechanismen sowohl im Tiermodell als auch im Menschen noch größtenteils unverstanden (Nagakura et al., 2009; Abschnitt 2.3.4.).

Im Folgenden werden die Fibromyalgie, das Reizdarmsyndrom und der chronische Spannungskopfschmerz näher erläutert, vor allem im Hinblick auf die Pathogenese, die mögliche Beteiligung von Stress und Therapiemöglichkeiten.

## 2.4.2. Fibromyalgie

### 2.4.2.1. Definition, Symptome und Epidemiologie

Die Fibromyalgie ist ein chronisches Schmerzsyndrom des Menschen, das durch das multifokale Auftreten von andauernden Schmerzen an definierten Triggerpunkten gekennzeichnet ist.

Eine Definition des „American College of Rheumatology“ von 1990 besagt, dass die Fibromyalgie „ein chronisches Schmerzleiden ist, bei dem die Betroffenen mindestens 3 Monate lang in allen 4 Körperquadranten Schmerzen verspüren, verbunden mit einer erhöhten Druckempfindlichkeit bei manueller Palpation an mindestens 11 von 18 muskulärsehnigen Stellen und das Fehlen von Gewebsabnormalitäten“ (Schweinhardt et al., 2008). 20 Jahre später wurde diese Definition noch um die spezifischen „Tenderpoints“ und eine spezialisierte Punkteskala ergänzt, um eine umfangreichere Diagnosestellung zu ermöglichen (Wolfe et al., 2010).

Neben dieser Kernsymptomatik weisen Fibromyalgie-Patienten noch weitere klinische Zeichen wie Fettleibigkeit, Angst- und Schlafstörungen, Gedächtnisprobleme sowie psychische und sexuelle Störungen auf. Häufig tritt die Fibromyalgie comorbid mit weiteren Stress-verbundenen Krankheitskomplexen wie dem chronischen Schwächesyndrom („chronic fatigue syndrom“, CFS), der posttraumatischen Stresserkrankung, dem Reizdarmsyndrom und Depressionen auf (Schweinhardt et al., 2008).

Hinsichtlich der Epidemiologie weist die Fibromyalgie innerhalb der Bevölkerung eine Prävalenz von ca. 2-4 % auf und betrifft dabei hauptsächlich weibliche Patienten (Clauw & Crofford, 2003).

### 2.4.2.2. Pathomechanismen

Die Pathogenese ist weitgehend unbekannt und wird als multifaktoriell angenommen. Eine Vielzahl von Autoren geht jedoch davon aus, dass der auftretende Fibromyalgie-Schmerz hauptsächlich durch zentrale Sensibilisierungsprozesse bedingt ist (Desmeules et al., 2004; Vierck, 2006; Ablin et al., 2008), jedoch periphere Mechanismen nicht ganz ausgeschlossen werden können (Staud, 2009; 2010).

Im Rahmen dieser zentralen Sensibilisierungsstörungen wird vermutet, dass ausgehend von den serotoninergeren und adrenergen Kerngebieten der rostralen ventromedialen Medulla die Hemmung der nozizeptiven Rückenmarksneurone bei Fibromyalgie-Patienten vermindert ist. Dies beruht auf der Verbesserung der Symptomatik nach Gabe von Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer („Serotonine-noradrenaline reuptake inhibitor“, SNRI) wie Milnacipran (Arnold et al., 2010) oder Duloxetine (Arnold et al., 2009). In diesem Zusammenhang steht auch, dass im Liquor von Fibromyalgie-Patienten verringerte Noradrenalin- und Serotonin-Spiegel gefunden wurden (Russel et al., 1992).

Weiterhin wird vermutet, dass die Wirkung der endogenen Opiode bei Fibromyalgie vermindert ist, da eine verringerte Ansprechbarkeit der supraspinalen  $\mu$ -Opioidrezeptoren im Zusammenhang mit erhöhten Opioid-Spiegeln im Liquor gefunden wurden (Baraniuk et al., 2004; Harris et al., 2007).

Auf Rückenmarksebene werden zusätzlich die Mitbeteiligung der Mikroglia, die unter anderem die neuronale spinale Hypererregbarkeit vermitteln (Light et al., 2012), und eine Hemmung des antihyperalgetischen DNIC-Effekts diskutiert (Dadabhoy et al., 2008; Normand et al., 2011).

Bezug nehmend zur synaptischen Übertragung von nozizeptiven Signalen im Rückenmark zeigten Liquoruntersuchungen bei Fibromyalgie-Patienten erhöhte Spiegel von Substanz P, Glutamat und BDNF (Russel et al., 1994; Sarchielli et al., 2007), was zu einer verstärkten synaptischen Übertragung führen kann.

Weiterhin konnte auch gezeigt werden, dass bei Fibromyalgie-Erkrankten verminderte Level von entzündungshemmenden Zytokinen gefunden wurden, was eine mögliche Neuroinflammation begünstigen kann (Uçeyler et al., 2006).

#### **2.4.2.3. Rolle von Stress bei Fibromyalgie-Patienten**

Im Zusammenhang mit der möglichen Stressbeteiligung am Pathomechanismus der Fibromyalgie konnte gezeigt werden, dass Fibromyalgie-Patienten eine abnorme HPA-Achsen-Funktion (Vierck, 2006), eine geringere Expression von Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-Rezeptoren in bestimmten Gehirnarealen sowie eine verminderte Aktivität des Mineralocorticoid-Rezeptoren aufwiesen (Macedo et al., 2008).

Bezüglich des Ansprechverhaltens der Glucocorticoid-Rezeptoren bei Fibromyalgie-Patienten konnte eine Verminderung in der Sensitivität nachgewiesen werden (Lentjes et al., 1997; Geiss et al., 2012), allerdings zeigte eine andere Studie keine Abweichung der Glucocorticoid-Rezeptor-Sensitivität (Wingenfeld et al., 2008).

Die Blut-Cortisol-Messungen deuten auf eine unterschiedliche Beteiligung der HPA-Achse hin, da die Cortisol-Gehalte beim Fibromyalgie-Erkrankten sowohl erniedrigt als auch unverändert bzw. erhöht waren (Chrousos & Gold, 1992; Catley et al., 2000; Crofford, 2002; Crofford et al., 2004; Adler & Geenen, 2005; Tanriverdi et al., 2007; Dadabhoy et al., 2008; Riva et al., 2010). Es konnte jedoch bis jetzt keine Aussage darüber getroffen werden, ob diese Veränderungen an der HPA-Achse durch die chronischen Schmerzen entstanden oder an der Pathogenese dieser beteiligt sind (Cleare, 2004; McEwen & Kalia, 2010).

Ergänzend wurde anhand von anamnestischen Befunden gezeigt, dass viele Fibromyalgie-Patienten frühere Auseinandersetzungen mit stressvollen Situationen hatten (McLean & Clauw, 2005; Weissbecker et al., 2006), sie oftmals stressanfälliger waren (Crofford, 2002) und sie inadäquate Reaktionen im Umgang mit stressvollen Situationen zeigten, was dazu führte, dass sich ihre Schmerz-Symptomatik wieder verschlechterte (Van Houdenhove & Egle, 2004).

#### 2.4.2.4. Therapiemöglichkeiten

Pharmakotherapeutisch sind in Europa und speziell in Deutschland keine Substanzen zur Fibromyalgie-Behandlung zugelassen. Dagegen wurden in den Vereinigten Staaten von der „Food and Drug Administration“ (FDA) in den letzten 4 Jahren 3 Substanzen zur Therapie der Fibromyalgie-Symptomatik zugelassen: Die Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmer Milnacipran bzw. Duloxetin und der Calciumkanalblocker Pregabalin (Staud, 2009; Smith et al., 2011a; 2011b).

In einer Metaanalyse zur Wirksamkeit dieser 3 Substanzen bei Fibromyalgie-Patienten zeigten sich ähnliche Effekte bei der Schmerzbehandlung, allerdings wurde empfohlen, dass die Substanzen Symptom-bezogen eingesetzt werden. Beispielsweise sollte Pregabalin nicht bei zusätzlichen depressiven Verstimmungen gegeben werden, da es bei Depressionen kaum Wirkung zeigte (Häuser et al., 2010).

Neben diesen zugelassenen Wirkstoffen kommen unter anderem auch Trizyklische Antidepressiva mit Erfolg zur Anwendung (Arnold et al., 2000).

Wenn die bisher genannten Standardmedikationen nicht ansprechen, kann auch der nur mäßig wirkende NMDA-Antagonist Ketamin eingesetzt werden (Graven-Nielsen et al., 2000; Hocking & Cousins, 2003; Blonk et al., 2010). Dabei wird neuerdings vermutet, dass diese Wirkung von Ketamin zusätzlich auf der Beeinflussung des endogenen Opioidsystems beruhen kann (Chang et al., 2010).

Obwohl für die günstige Wirkung von Opioiden bei der Therapie der Fibromyalgie bisher noch keine Studienergebnisse vorliegen (Ngian et al., 2011), nahm die Verschreibung von Opioiden bei chronischen Schmerzzuständen in den letzten 20 Jahren sehr stark zu (Woodcock, 2009). Im Detail bekamen innerhalb eines Messzeitraums von 3 Jahren ca. 37,4 % der behandelten Fibromyalgie-Patienten Kurzzeit-Opiode und 8,3 % Langzeit-Opiode (Berger et al., 2009). Lediglich der Einsatz von Tramadol, ein Opioid mit geringer Bindungsaffinität zu den Opioidrezeptoren, zeigte gute Ergebnisse bei Patienten mit Fibromyalgie (Furlan et al., 2006). Diese Wirkung wird aber auf die zusätzlichen Serotonin- bzw. Noradrenalin-Wiederaufnahme-hemmenden Effekte von Tramadol geschoben.

Weiterhin ist anzumerken, dass sich neuere Substanzgruppen zur Fibromyalgie-Therapie wie weitere NMDA-Rezeptor-Antagonisten oder NK-1-Rezeptor-Antagonisten im Moment in klinischen Prüfstudien befinden (Kampfhammer, 2008).

Moderne, stufenweise Therapieschemen vereinen mittlerweile die angesprochenen pharmakologischen Interventionsmöglichkeiten mit nicht-medikamentösen Methoden wie Aerobic, Aufklärung und kognitiver Verhaltenstherapie, je nach Patientenpräferenz und Ausprägungsgrad (Smith et al., 2011a; 2011b).

## **2.4.3. Reizdarmsyndrom**

### **2.4.3.1. Definition, Symptome und Prävalenz**

Das Reizdarmsyndrom ist eine funktionelle Darmerkrankung, die durch abdominale Schmerzen oder abdominale Missempfindungen aufgrund einer viszeralen Hyperalgesie gekennzeichnet ist. Dabei müssen diese Symptome mindestens 3 Tage pro Monat auftreten und sich zusätzlich nach Defäkation verbessern. Ebenso wird auch eine veränderte Stuhlgangsfrequenz sowie Stuhlbeschaffenheit bei Reizdarmsyndrompatienten beobachtet (Foxx-Orenstein, 2006).

Das Reizdarmsyndrom stellt hinsichtlich seiner Prävalenz eine der am meisten vorkommenden funktionellen gastrointestinalen Störungen dar (Elsenbruch, 2011).

### **2.4.3.2. Pathomechanismen und Beteiligung von Stress**

Die viszerale Hyperalgesie bei Reizdarmpatienten soll sowohl auf peripheren, als auch auf zentralen Mechanismen beruhen. In diesem Zusammenhang wird Serotonin eine besondere Rolle zugeschrieben, da es einen wichtigen Neurotransmitter zwischen dem zentralen und dem enterischen Nervensystem darstellt und seine Konzentration in der Darmmukosa bei Reizdarmsyndrom-Patienten oftmals verändert vorlag (Coates et al., 2004; Foxx-Orenstein, 2006; Elsenbruch, 2011).

Die Beteiligung von Stress bei der Pathogenese kann vermutet werden, da oftmals stressvolle Lebenssituationen vor allem im Kindesalter bei Reizdarmsyndrom-Patienten festgestellt wurden (Ross, 2005; Nicholl et al., 2008). Hinzu kommt, dass bei Patienten mit Reizdarmsyndrom wie auch bei Fibromyalgie-Patienten oftmals erhöhte oder erniedrigte Cortisol-Spiegel im Blut gemessen wurden, was für einen möglichen Zusammenhang mit der HPA-Achse spricht (Nater et al., 2011). Niedrigere Cortisol-Spiegel sind dabei hauptsächlich mit schmerzvolleren Begleiterscheinungen assoziiert, wohingegen hohe Cortisol-Spiegel mit zusätzlichen Depressionen verknüpft sind (Ehlert et al., 2005).

### **2.4.3.3. Therapiemöglichkeiten**

Aufgrund seiner Pathophysiologie werden vor allem serotoninerge 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten bzw. 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Agonisten empfohlen, was sich allerdings nach den Begleitsymptomen richtet (Foxx-Orenstein, 2006). Daneben können aber auch Therapieerfolge mit trizyklischen Antidepressiva erzielt werden (Jackson et al., 2006).

## **2.4.4. Chronischer Spannungskopfschmerz**

### **2.4.4.1. Definition, Symptome**

Diese Kopfschmerzform ist pathophysiologisch durch erhöhte Muskel-Druckschmerz-Empfindlichkeit gekennzeichnet, was zu drückenden Schmerzen im Bereich des ganzen Kopfes führt (Cathcart et al., 2010a). Nur selten treten dabei zusätzliche Begleiterscheinungen auf.

Solche primär bedingten Kopfschmerzen stehen in der Häufigkeits-Rangliste der WHO innerhalb der Top-10 (Stovner et al., 2007). Dabei handelt es sich bei circa 80 % aller primären Kopfschmerzdiagnosen um den Spannungskopfschmerz (Jensen, 2003).

### **2.4.4.2. Pathomechanismen und Beteiligung von Stress**

Auch die genauen Mechanismen des Spannungskopfschmerzes sind bisher nur unvollständig verstanden. Das Absinken der Schmerzschwelle kann entweder durch zentrale Sensibilisierungsprozesse oder durch eine periphere Sensibilisierung innerhalb der Schädelmuskulatur bedingt sein. Auch das mögliche Fehlen des DNIC-Phänomens wird in diesem Zusammenhang diskutiert (Cathcart et al., 2010a).

Hinsichtlich der Beteiligung von Stress konnte gezeigt werden, dass stressvolle Arbeit und Überforderung als ein möglicher Faktor für eine erhöhte Kopfschmerzaktivität gilt (Janke et al., 2004; Cathcart et al., 2010b). Weiterhin führt Stress ebenso zu einer zusätzlichen Verstärkung einer bereits etablierten Hyperalgesie (Cathcart et al., 2008; 2010a). Aus diesen Gründen gilt Stress als einer der häufigsten potentiellen Auslöser für die chronischen Spannungskopfschmerzen (Nash & Thebarger, 2006; Fumal & Schoenen, 2008; Cathcart et al., 2010b).

### **2.4.4.3. Therapiemöglichkeiten**

Therapeutisch werden primär durch Aufklärung des Patienten, kognitive Verhaltenstherapie, Physiotherapie, Akkupunktur und Entspannungsübungen Verbesserungen der Symptomatik erzielt (Endres et al., 2007; Bendtsen et al., 2010). Daneben kann pharmakologisch bei episodenhaftem Auftreten durch Analgetika und nicht steroidale Antiphlogistika interveniert werden. Zur Prophylaxe bei chronischem Auftreten werden trizyklische Antidepressiva wie beispielsweise Amitriptylin empfohlen (Bendtsen et al., 2010).

### 3. Zielsetzungen und Versuchsabschnitte

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines Testmodells, bei dem durch wiederholte Stresseinwirkung ein hyperalgetischer Zustand hervorgerufen wird.

Da dieses Modell zur pharmakologischen Prüfung und zur Charakterisierung von neuen Substanzen oder Naturstoffen vorgesehen ist, sind zusätzlich Informationen über die zugrundeliegenden Mechanismen erforderlich, über die der angewandte Stress eine Hyperalgesie induziert.

Weiterhin müssen auch bekannte Wirkstoffe, die therapeutisch bei somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen eingesetzt werden, die Hyperalgesie abschwächen oder aufheben können, damit diesem Modell eine prädiktive Validität zugeschrieben werden kann. Außerdem ist es erforderlich, dass für dieses Modell Reproduzierbarkeit und Praktikabilität unter Standard-Laborbedingungen gewährleistet sind.

Im ersten Teil der eigenen Untersuchungen (Abschnitt 4.1.) sollte ein geeignetes Testmodell generiert werden, in welchem im Versuchstier durch wiederholten Stress eine Hyperalgesie ausgelöst wird. Aus der Literaturübersicht geht dabei hervor, dass sich Immobilisationsstress dafür besonders zu eignen scheint. Ebenso erfolgte aufgrund der guten Eignung die Auswahl des Randall-Selitto- und des Tail-Flick-Tests zur Erfassung der Nozizeption. Als Versuchstiere kamen Ratten vom Stamm Wistar (RjHan:Wi) in Frage, die im Vergleich zu anderen Stämmen deutlichere Ergebnisse hinsichtlich Stress-Reaktion und -wirkung gezeigt haben. Anhand dieser Versuchsbedingungen wurde der Einfluss von verschiedenen Stressverläufen auf das nozizeptive Verhalten der Tiere überprüft.

Das Testmodell, was zur Induktion der ausgeprägtesten Hyperalgesie geführt hat, soll im zweiten Untersuchungsteil (Abschnitt 4.2.) näher charakterisiert werden. Von besonderer Bedeutung war dabei die Fragestellung, inwieweit der Stressor im Tier eine Stressreaktion und -wirkung erzeugt hat. Dafür wurde die Funktionalität der HPA-Achse überprüft, indem z. B. die Nebennieren untersucht und der Plasma-Corticosteron-Spiegel bestimmt wurden. Zur Charakterisierung der Wirkung des Stressors auf den Organismus erfolgten unter anderem die Bestimmung von weiteren klinisch-chemischen Parametern sowie der Körpergewichtsentwicklung. Nach der Diskussion der Ergebnisse wurde ein Zusammenhang von Corticosteron und der verstärkten Schmerzempfindung vermutet.

Im nachfolgenden Abschnitt der eigenen Untersuchungen (Abschnitt 4.3.) sollte dieser Zusammenhang überprüft werden, indem die Versuchstiere über den Zeitraum des Stresses verschiedene Dosierungen von Corticosteron zugeführt bekamen. Dabei wurden ebenso das nozizeptive Verhalten, die Reaktion der HPA-Achse sowie die Wirkung des Glucocorticoids auf den Organismus untersucht. Die Auswertung der Ergebnisse bestätigte den Zusammenhang des erhöhten Corticosteron-Spiegels und der verstärkten Nozizeption und ließ weiterführend Veränderungen am Glucocorticoid-Rezeptor vermuten.

Daher sollte mit dem vorletzten Untersuchungsteil (Abschnitt 4.4.) gezeigt werden, dass die Tiere mit einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit gleichzeitig auch Veränderungen am Glucocorticoid-Rezeptor aufwiesen. Dafür wurden Lymphozyten gewonnen und kultiviert. Anhand dieser Zellen konnten über verschiedene Tests Funktionalität und Dichte der

Glucocorticoid-Rezeptoren untersucht werden. Veränderungen an diesen Rezeptoren können wiederum zu Veränderungen der Nozizeptions-modulierenden Neurotransmittersysteme führen, was zu einer Sensibilisierung der Nozizeption führen kann.

Daher wurden im letzten Teil der eigenen Untersuchungen (Abschnitt 4.5.) pharmakologisch bestimmte Neurotransmittersysteme gehemmt bzw. stimuliert, die im Zusammenhang mit einer veränderten Nozizeption stehen können. Zur Überprüfung der prädiktiven Validität des Testmodells müssen diese pharmakologischen Substanzen zusätzlich auch zur Therapie von somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen des Menschen eingesetzt werden.

## 4. Eigene Untersuchungen

### 4.1. Einfluss des Stressverlaufs auf die Nozizeption

#### 4.1.1. Einleitung

In den Abschnitten 2.1.7.2. und 2.3.4.4. wurde bereits die vielseitige Rolle von Immobilisationsstress - vor allem im Zusammenhang mit der Beeinflussung des nozizeptiven Systems – beschrieben. Daher wurde dieser Stressor in den eigenen Versuchen eingesetzt. Die Auswirkung von Immobilisationsstress auf das Tier hängt allgemein von der Stressdauer, vom Stressverlauf, von der Art bzw. Intensität der Immobilisation und von der Tierart bzw. dem Tierstamm ab (Paré & Glavin, 1986; Natelson et al., 1988; Glavin et al., 1994; Buynitsky & Mostofsky, 2009). Zusätzlich ist auch die Methode der Schmerzmessung entscheidend, da eine thermische Hyperalgesie beispielsweise nicht zwangsläufig mit einer mechanischen Hyperalgesie auftreten muss (Pilcher & Browne, 1983; King et al., 2003).

Die Stressdauer kann dabei von wenigen Minuten bis hin zu mehreren Stunden variieren, allerdings vergrößert eine verlängerte Stressdauer nicht zwangsläufig die Stressreaktion der Tiere (Buynitsky & Mostofsky, 2009). Somit wurde die Zeitdauer, in der das Tier dem Stressor ausgesetzt wird, auf eine Stunde pro Tag festgelegt.

Solche Stresssitzungen können zwar vielfach täglich wiederholt werden, jedoch treten dann oftmals keine linearen Effekte in Relation zu der Länge des Stressverlaufs auf, da durch Anpassungsreaktionen die Stärke der Stressreaktion wieder vermindert werden kann (Dallman, 2007; Buynitsky & Mostofsky, 2009).

Zur Auswirkung von 1-stündigem Immobilisationsstress auf das nozizeptive System liegen bisher fast nur Ergebnisse vor, die die Wirkung von akutem (einmaligem) oder chronischem (5-mal pro Woche für 8 Wochen) Stress beschreiben. Akuter Immobilisationsstress löst dabei hauptsächlich eine Analgesie aus (Abschnitt 2.3.2.1.), während der chronische Immobilisationsstress hyperalgetische Veränderungen induziert (Abschnitt 2.3.4.4.). Über den Zeitraum dazwischen liegen bisher allerdings nur wenige Informationen vor. Daher wurde der Stressverlauf zu Beginn auf 1, 7 und 14 Tage festgelegt, an denen die Tiere jeweils einmal pro Tag einem 1-stündigen Immobilisationsstress ausgesetzt werden. Falls sich diese Zeitspanne als nicht ausreichend erweist, muss der Verlauf auf 21 oder mehr Tage ausgedehnt werden.

Da die Immobilität bei diesen Tieren durch die Immobilisation („Restraint-Stress“) in Plexiglas-Röhren erzielt wurde, kam diese Methode zur besseren Vergleichbarkeit auch in den eigenen Untersuchungen zum Einsatz. Zusätzlich stellt diese Art der Immobilisation auch die am häufigsten verwendete Form dar, um die Tiere zu immobilisieren (Glavin et al., 1994).

Die Auswahl der Versuchstiere beschränkte sich auf Ratten und Mäuse. Letztere reagieren im Vergleich zu Ratten wesentlich sensibler auf Immobilisationsstress in Form von stärkeren Corticosteron-Anstiegen (Armario et al., 1995). Daneben sind sie aber gerade in Bezug auf die Nozizeptionsmessungen schwieriger zu handhaben und bieten zu geringe Blutvolumina

für nachfolgende Analyse Zwecke. Daher wurde der Einsatz von Ratten präferiert. Beim Vergleich verschiedener Rattenstämme zeigten sich bei Wistar-Ratten besser quantifizierbare Ergebnisse hinsichtlich ihrer Stressreaktion als andere Stämme (Gilad et al., 1983; Paré & Glavin, 1986; Glavin et al., 1994; Gómez et al., 1998). Daneben löst Immobilitätsstress bei Ratten vom Stamm Wistar im Vergleich zu Sprague Dawley-Ratten zusätzlich depressionsähnlichere Veränderungen innerhalb der Neurotransmittersysteme aus, die oftmals auch bei somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen im Menschen beobachtet werden (O'Mahony et al., 2011), was deren Eignung nochmals nachträglich bestätigt. Für die Auswahl der nozizeptiven Messgeräte gilt aufgrund der Induktion der Hyperalgesie durch Stress, dass Modelle basierend auf chemischer Hyperalgesie-Induktion dafür ungeeignet sind. Dasselbe gilt für die elektrischen nozizeptiven Testsysteme, da bei einem elektrischen Reiz nicht mehr nur die Nozizeptoren, sondern unselektiv alle peripheren Neurone stimuliert werden. Zur Messung einer auftretenden hyperalgetischen Veränderung kommen somit nur Messsysteme in Frage, die thermische bzw. mechanische Veränderungen der Schmerzsensibilität detektieren.

Da wie bereits beschrieben beide Hyperalgesieformen nicht zwangsläufig parallel auftreten müssen, erschien es notwendig, auf beide Hyperalgesieformen hin zu testen. Aufgrund der Praktikabilität und der frequenten Nutzung innerhalb der Schmerzforschung wurden daher der Tail-Flick-Test für thermische und der Pfoten-Wegzieh-Test für mechanische Sensibilisierungsprozesse angewandt (Le Bars et al., 2001; Abschnitte 2.2.5.2 und 2.2.5.3.).

## **4.1.2. Material und Methoden**

### **4.1.2.1. Versuchstiere**

Die Versuche wurden mit Wistar-Ratten (RjHan:Wi) von Janvier (Le-Genest-Saint-Isle, Frankreich) durchgeführt. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn 8 – 10 Wochen alt und hatten ein Körpergewicht zwischen 180 g und 220 g. Jeweils 3 Tiere wurden in Standard-Makrolon-Käfigen vom Typ IV untergebracht. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Umweltbedingungen mit einer Temperatur von  $23 \pm 1$  °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 40 und 50 % und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus. Die Tiere hatten freien Zugang zu Standard-Futter und Trinkwasser. Vor Versuchsbeginn konnten die Tiere sich für mindestens eine Woche in der neuen Umgebung akklimatisieren.

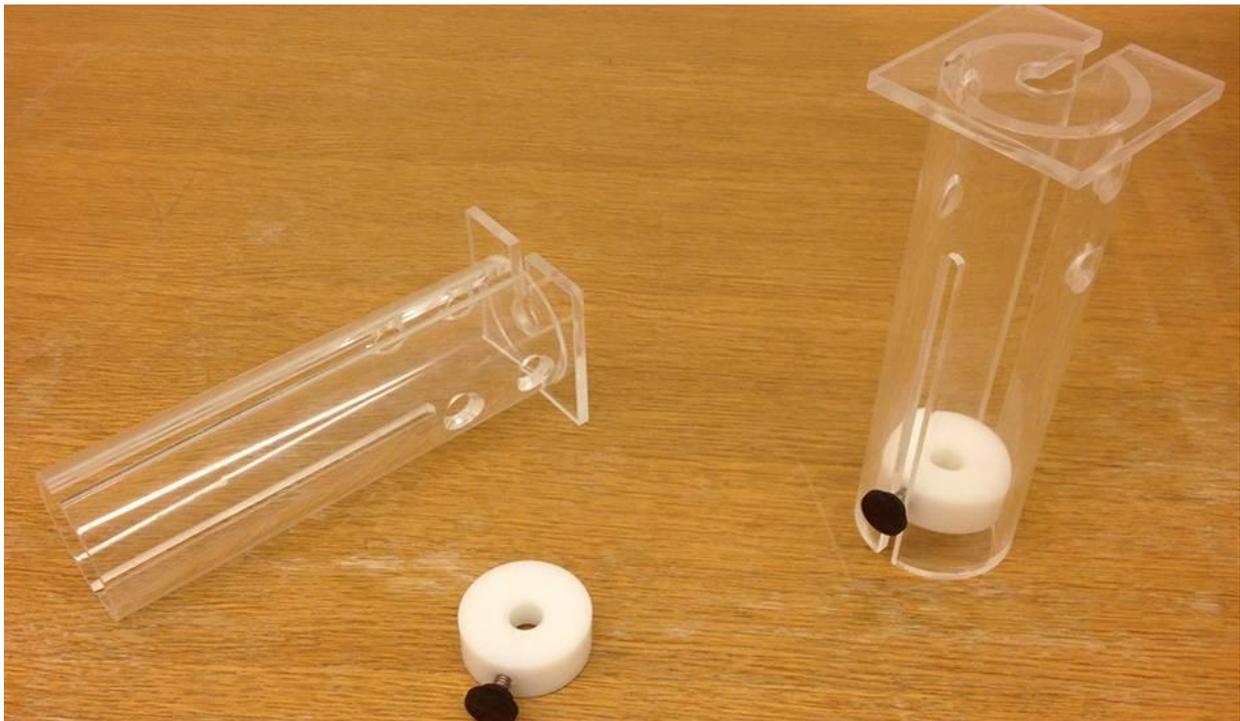
Vor Beginn der Versuchsvorhaben wurde ein Antrag auf Tierversuchsgenehmigung beim Regierungspräsidium Karlsruhe Abteilung 3 – Landwirtschaft, Ländlicher Raum Veterinär- und Lebensmittelwesen gestellt. Diese Versuche im Rahmen der Dissertation wurden nach §8 Abs. 1 Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 07. Juni 2006 (BGBl. I S. 1313) vom Regierungspräsidium Karlsruhe – Abteilung 3 – Landwirtschaft, Ländlicher Raum Veterinär- und Lebensmittelwesen unter der Tierversuchsnummer 35-9185.81/G46/10 zur Durchführung genehmigt.

#### 4.1.2.2. Stressmethodik

Wie vorausgehend erläutert, wurde auf die Tiere ein Immobilisationsstress ausgeübt. Dazu wurden sie an 1, 7 bzw. an 14 aufeinanderfolgenden Tagen für den Zeitraum von jeweils einer Stunde zwischen 10 und 12 Uhr in Plexiglasröhren vom Typ „Broome Rodent Restrainer“ (Abbildung 5) verbracht. Nach einer kurzen Eingewöhnung von ca. 5-10 min wird die Plastikschrube am Eingang verschlossen und fest auf die Größe der Tiere eingestellt. Dabei werden die Tiere ständig überwacht (Kontrolle von Position, Allgemeinbefinden, Verletzungen, Atmung).

Da das Verbringen der Tiere in die Röhren einen gewissen Handling-Stress darstellt, wurden auch die Kontrolltiere parallel dazu einer behutsamen ca. 1-minütigen Handlingprozedur unterzogen, um einen direkten Vergleich zu den immobilieren Tieren zu ermöglichen (Boix et al., 1990; Ottenweller, 2000).

Zusätzlich erfolge eine dauerhafte örtliche Trennung von Kontroll- und Stresstieren, da dies aufgrund der möglichen gegenseitigen Beeinflussung der Tiere durch Gerüche und Lautgebung empfohlen wird (Ottenweller, 2000).

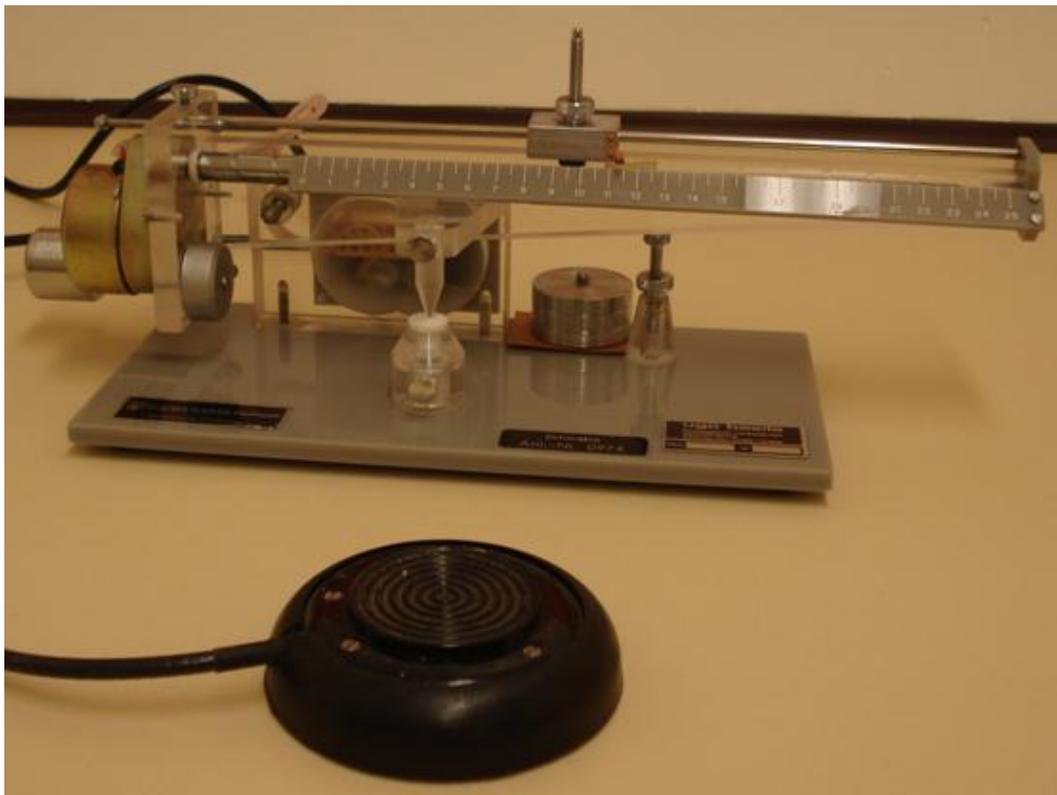


**Abb. 5:** Plexiglasröhre mit Verschluss vom Typ „Broome Rodent Restrainer“ (Hugo Sachs Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten). Auf der gegenüberliegenden Seite der Öffnung sind sowohl vorne als auch links und rechts daneben Atemlöcher eingefügt.

### 4.1.2.3. Nozizeptionsmessungen

Messungen auf Veränderungen der mechanischen Sensibilität erfolgten mit Hilfe des Randall-Selitto-Apparates (Randall & Selitto, 1957; Abbildung 6). Dabei wird das Tier im Nacken fixiert und eine Hinterpfote locker auf einem Sockel positioniert. Auf diese Pfote wird nun im Bereich eines Zwischenzehenspaltes über einen konisch zulaufenden Stift ein zunehmender Druck auf die Hinterpfote der Ratte ausgeübt, bis die Tiere die Pfote wegziehen oder mit Lautgebung bzw. Abwehrhaltung reagieren. Mit einem Fußpedal wird daraufhin die Messung sofort gestoppt und das Gewicht (g) abgelesen, über das der Druck auf die Pfote des Tieres ausgeübt wurde. Um eine mechanische Gewebeschädigung zu verhindern, wurde das maximale Gewicht (Cut-Off-Schwelle) auf 140 g beschränkt.

Aufgrund der höheren Messvariabilität im Randall-Selitto-Test im Vergleich zu anderen Testsystemen werden mindestens 3-5 Messungen empfohlen. Da jedoch zu häufige Messungen zu Sensibilisierungen aufgrund von lokalen gewebereizenden Prozessen führen, wurde die Anzahl der Messungen auf jeweils 3 pro Pfote an beiden Hintergliedmaßen festgelegt. Das Druckgewicht sollte allerdings so gewählt werden, dass es nicht zu niedrig ist, um auch leichte analgetische Effekte detektieren zu können (Le Bars et al., 2001; Anseloni et al., 2003).



**Abb. 6:** Randall-Selitto-Apparat (Analgesiemeter, Ugo Basile, Comerio, Italien). Die Messung erfolgt über einen konisch zulaufenden Stift, der einen zunehmenden Druck auf die Hinterpfote der Ratte ausübt, bis die Tiere die Pfote wegziehen.

Die Messungen auf Veränderungen der thermischen Sensibilität erfolgten mittels des Tail-Flick-Tests (Abbildung 7). Dabei werden die Ratten vorher in einer Plexiglasröhre vom Typ „Broome Rodent Restrainer“ (Abbildung 5) verbracht, ehe sie darin auf dem Tail-Flick-Apparat so positioniert wurden, dass der Schwanz ruhig über der Halogen-Lampe liegt. Mit dieser Lampe wird durch einen fokussierten Lichtstrahl mit hohem Anteil an Infrarotstrahlung ein Hitzereiz auf einem kleinen lokalen Bereich des Rattenschwanzes erzeugt. Dauert dieser Reiz an, zieht das Tier nach Überschreiten der thermischen Schmerzschwelle den Schwanz von der Halogen-Lampe weg und die Messung wird mit dem Fußpedal gestoppt. Dabei wird die Zeitdauer von Beginn der Reizung bis zur Schmerzreaktion erfasst. Zur Vermeidung von möglichen Gewebsschäden wurde eine Cut-Off-Schwelle von 10 Sekunden festgelegt, nach der die Messung gestoppt wird.



**Abb. 7:** Tail-Flick-Gerät (AnalgesiaMeter, TSE-Systems, Bad Homburg). In dem Messgerät befindet sich eine Lampe, die einen fokussierten Lichtstrahl mit hohem Infrarotanteil erzeugt (schwarzer Kreis), der auf den darauf liegenden unfixierten Rattenschwanz einen Hitzereiz ausübt.

Messungen mit einem Tail-Flick-Gerät zeichnen sich besonders durch ihre gute Praktikabilität und ihre geringe Messvariabilität aus. Allerdings wird durch die Schmerzmessung aufgrund des Hitzestrahls das lokale Temperaturgleichgewicht an der Messstelle am Rattenschwanz gestört, so dass regionale Vasokonstriktionen auftreten können, die eine analgetische Wirkung vortäuschen (Porro & Carli, 1988). Weiterhin müssen bei Tail-Flick-Messungen unterschiedliche Temperatursensibilitäten am Rattenschwanz beachtet werden, da diese in Richtung Schwanzspitze immer größer werden (Le Bars et al., 2001). Die Temperatur des Wärmestrahls sollte so eingestellt sein, dass sie alle thermischen Nozizeptoren anspricht, deren Temperaturintervall im Bereich von 40-55 °C liegt (Fleischer et al., 1983; Dubin & Patapoutian, 2010). Andererseits muss ein ausreichend großes

Zeitfenster zwischen Reiz und Reaktion gewährleistet sein, um entsprechende Sensibilitätsveränderungen detektieren zu können. Deswegen wurde die Intensität des Wärmestrahls auf 25 % eingestellt. Wie bei den Messungen mit dem Randall-Selitto-Test besteht auch hier die Gefahr von messbedingten Sensibilisierungsreaktionen, die mit der Kürze der Messabstände und mit zu häufigen Wiederholungen zunehmen (Carstens & Wilson, 1993). Daher wurde sich auf 3 Messungen pro Tier beschränkt, mit einer Mindestpause von 1 Minute vor jeder weiteren Messung.

#### 4.1.2.4. Versuchsablauf

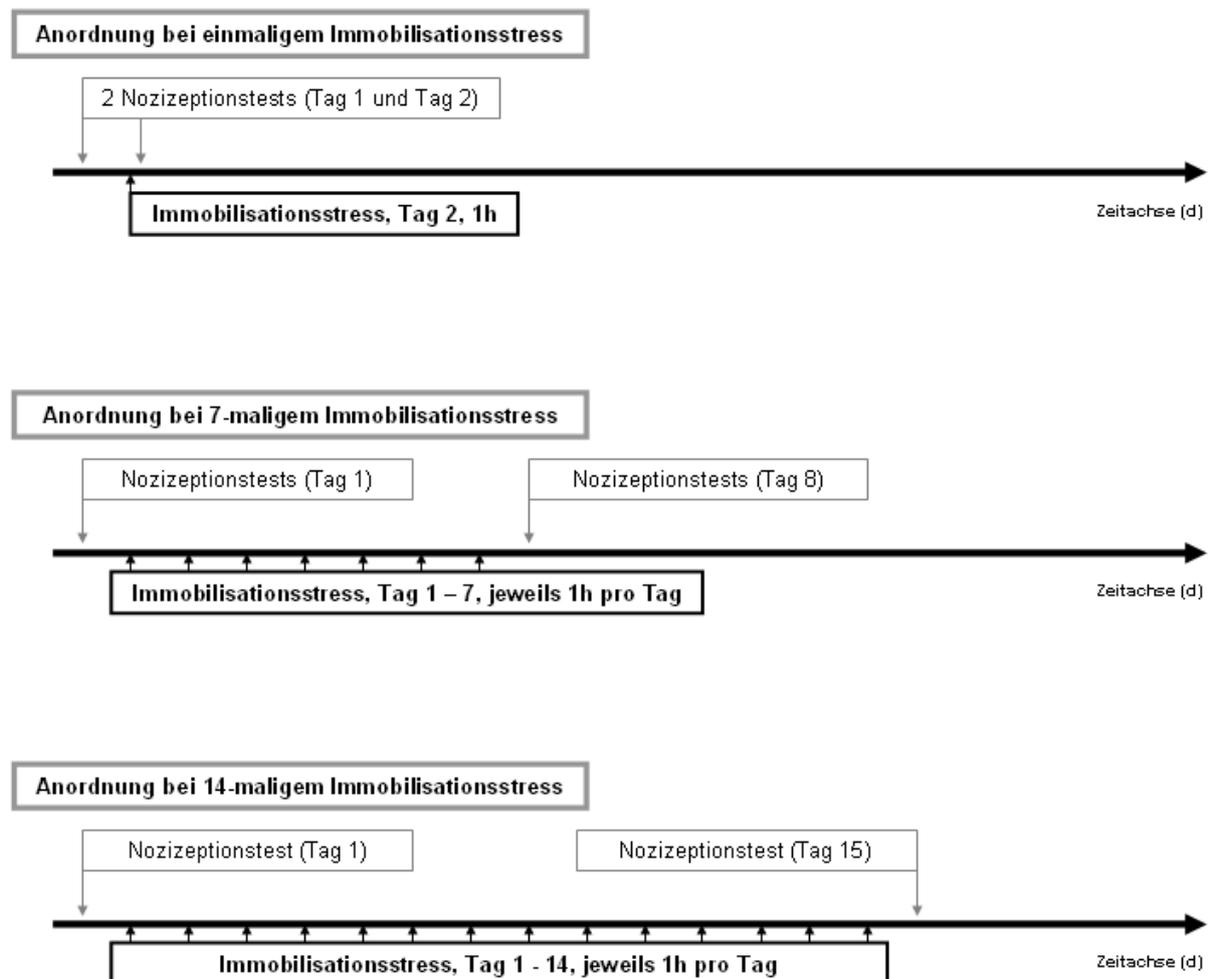
Ziel dieser Versuche war es, den Einfluss von Immobilisationsstress auf die thermische und mechanische Nozizeption von Wistarratten anhand von 3 Stressverläufen (1 Tag; 7 Tage; 14 Tage) zu untersuchen. Dies wurde realisiert, indem am Ende jedes Stressverlaufs ein Vergleich der Nozizeptionsmessergebnisse von gestressten und nicht gestressten Tieren durchgeführt wurde. Da keine gesicherten Daten über den Einfluss von Vormessungen auf nachfolgende Messungen vorliegen, mussten diskutierte Einflüsse wie Lern- bzw. Anpassungseffekte sowie der DNIC-Effekt angenommen werden. Daher wurde zu jeder Testgruppe eine ungestresste Kontrollgruppe benötigt, woraus sich die insgesamt 6 Test- und 6 Kontrollgruppen ergaben (Tabelle 2). Die Tierzahl pro Gruppe betrug dabei N = 8 Tiere bei einer Gesamtzahl von 96 Versuchstieren.

**Tab. 2:** Übersicht der Versuchsgruppen zur Untersuchung der Auswirkung von verschiedenen Immobilisationsstressverläufen und Handlings auf die thermische und mechanische Nozizeption.

Gruppenname	Stressor	Stressdauer	Schmerzmessung
Kontrolle	-	-	Randall-Selitto-Test
Stress	Immobilisation	1x (1x täglich)	Randall-Selitto-Test
Kontrolle	-	-	Tail-Flick-Test
Stress	Immobilisation	1x (1x täglich)	Tail-Flick-Test
Kontrolle	-	-	Randall-Selitto-Test
Stress	Immobilisation	7x (1x täglich)	Randall-Selitto-Test
Kontrolle	-	-	Tail-Flick-Test
Stress	Immobilisation	7x (1x täglich)	Tail-Flick-Test
Kontrolle	-	-	Randall-Selitto-Test
Stress	Immobilisation	14x (1x täglich)	Randall-Selitto-Test
Kontrolle	-	-	Tail-Flick-Test
Stress	Immobilisation	14x (1x täglich)	Tail-Flick-Test

Bei Versuchsbeginn erfolgte die Überprüfung des basalen Nozizeptionsverhaltens, bevor die Tiere dem Immobilisationsstress bzw. Handling an jeweils einem, 7 oder 14 aufeinanderfolgenden Tagen ausgesetzt wurden. Bei den Tieren, die nur einmal dem Immobilisationsstress ausgesetzt wurden, erfolgte die Nozizeptionsmessung direkt nach dem Stress. Um allerdings einen möglichen Einfluss der Basalmessung auf diese Messung zu vermeiden, wurde die basale Nozizeption einen Tag vor Aussetzen des Stressors durchgeführt. Dagegen wurde bei den Stressverläufen von 7 bzw. 14 Tagen die 24-stündige Pause nach dem letztmaligen Stress eingelegt, um akute Stresseffekte ausschließen zu können. Die Messung der Nozizeption erfolgte deswegen am nachfolgenden Tag (Tag 8 bzw. 15). Die Kontrollgruppen (1-minütiges Handling statt einer Stunde Immobilisationsstress) wurden analog zu ihren Stressgruppen behandelt. Der Versuchsablauf dazu wird anhand Abbildung 8 verdeutlicht.

## Versuchsablauf



**Abb. 8:** Darstellung der Versuchsabläufe, um die Auswirkung von verschiedenen Immobilisationsstress-Verläufen auf die thermische und mechanische Nozizeption festzustellen. Vor Versuchsbeginn hatten die Tiere eine Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche.

Zusätzlich fanden bei den Versuchstieren neben den Nozizeptionsmessungen noch weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Stressreaktion und -wirkung statt (Abschnitt 4.2.). Diese untersuchten Parameter wurden so gewählt, das sie den eigentlichen Versuchsablauf zur Untersuchung des Einflusses von alleinigem Immobilisationsstress auf die Nozizeption nicht unnötig durch zusätzliche (akute) Stressoren zu beeinflussen. Die Beschreibung zur Erhebung sowie Auswertung und Diskussion dieser Daten erfolgt in Abschnitt 4.2. und wurde nur bei den Versuchsgruppen durchgeführt, die eine statistisch sichere Sensibilisierung der Schmerzwahrnehmung zeigten. Anhand dieser zusätzlichen Daten sollten nachfolgend die Stressreaktion und -wirkung charakterisiert und gleichzeitig auch erste Hinweise auf die zugrundeliegenden Mechanismen der möglichen nozizeptiven Veränderungen gewonnen werden (Abschnitt 4.2.).

Alle durchgeführten Versuche der eigenen Untersuchungen wurden, wenn nicht anders angegeben, in den Versuchslabors der Präklinischen Forschung der Dr. Willmar Schwabe GmbH & Co KG in Karlsruhe durchgeführt.

#### **4.1.2.6. Statistische Auswertung**

Für die deskriptive Statistik wurde Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Bei allen Berechnungen wurden die Versuchsergebnisse der gestressten Gruppen mit denen der jeweiligen ungestressten Kontrollen zu einem bestimmten Zeitpunkt verglichen. Dazu wurden jeweils das arithmetische Mittel (MW) und die Standardabweichung (SD) berechnet.

Da weiterhin auch davon ausgegangen werden muss, dass die basalen Messergebnisse der Schmerzschwellen eine tierspezifische individuelle Variabilität aufweisen, erfolgte für jedes Tier die Bildung der Differenzen aus den Mittelwerten der Basalmessungen und den Mittelwerten der Messungen nach Stress bzw. Handling.

Die explorativen Statistikdaten wurden mit GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) und ebenso Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) ermittelt. Die Prüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung erfolgte mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Zur Prüfung der Varianzhomogenität wurde der F-Test verwendet. Da die Versuchsgruppen voneinander unabhängige (unverbundene) Stichproben darstellten, wurde für den statistischen Vergleich der Student'sche t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Mit Hilfe dieses Tests erfolgte der statistische Vergleich der errechneten Mittelwerte bzw. Differenzen von den Tieren der Stress- und Kontrollgruppen.

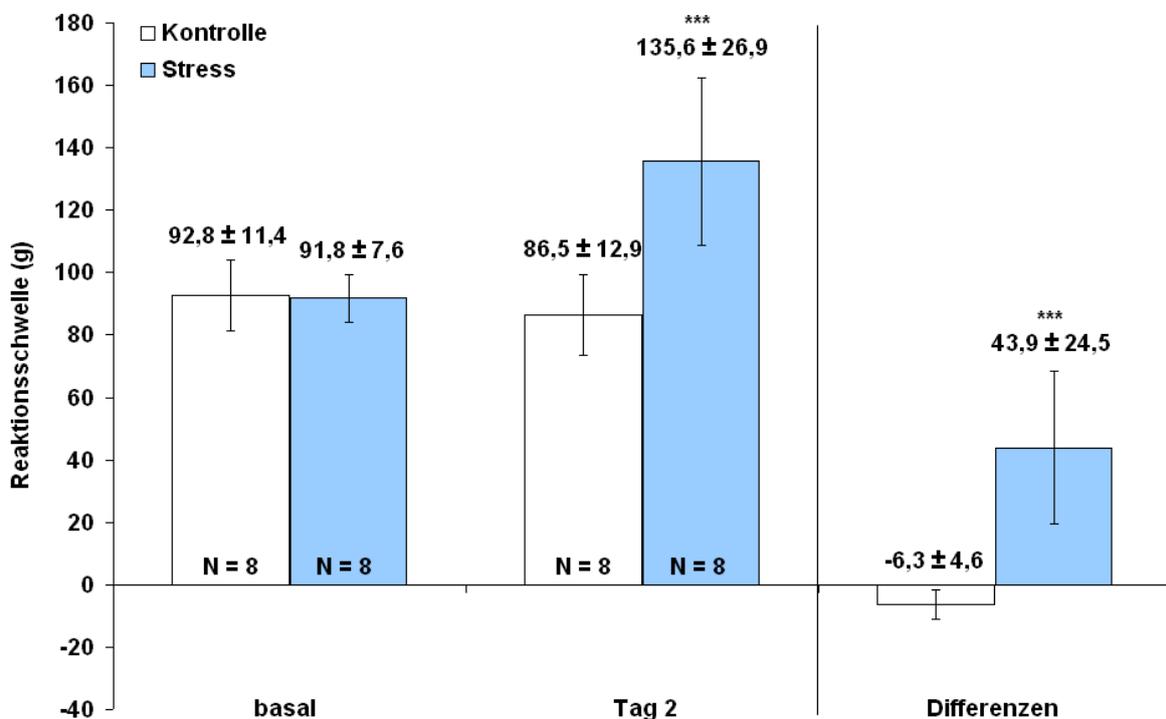
Eine statistische Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant, eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  als hoch signifikant und eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$  als höchst signifikant angesehen.

## 4.1.3. Ergebnisse

### 4.1.3.1. Einfluss von einmaligem Immobilisationsstress auf die Nozizeption

Die Ergebnisse der Randall-Selitto-Messungen nach einmaligem Immobilisationsstress sind in der Abbildung 9 dargestellt. Aus diesem Diagramm wird ersichtlich, dass die Reaktionsschwelle der gestressten Tiere im Vergleich zu ihren ungestressten Kontrolltieren an Tag 2 höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) vergrößert war. Diese Erhöhung ist mit einem Anstieg der Schmerzschwelle und somit einer Analgesie gleichzusetzen.

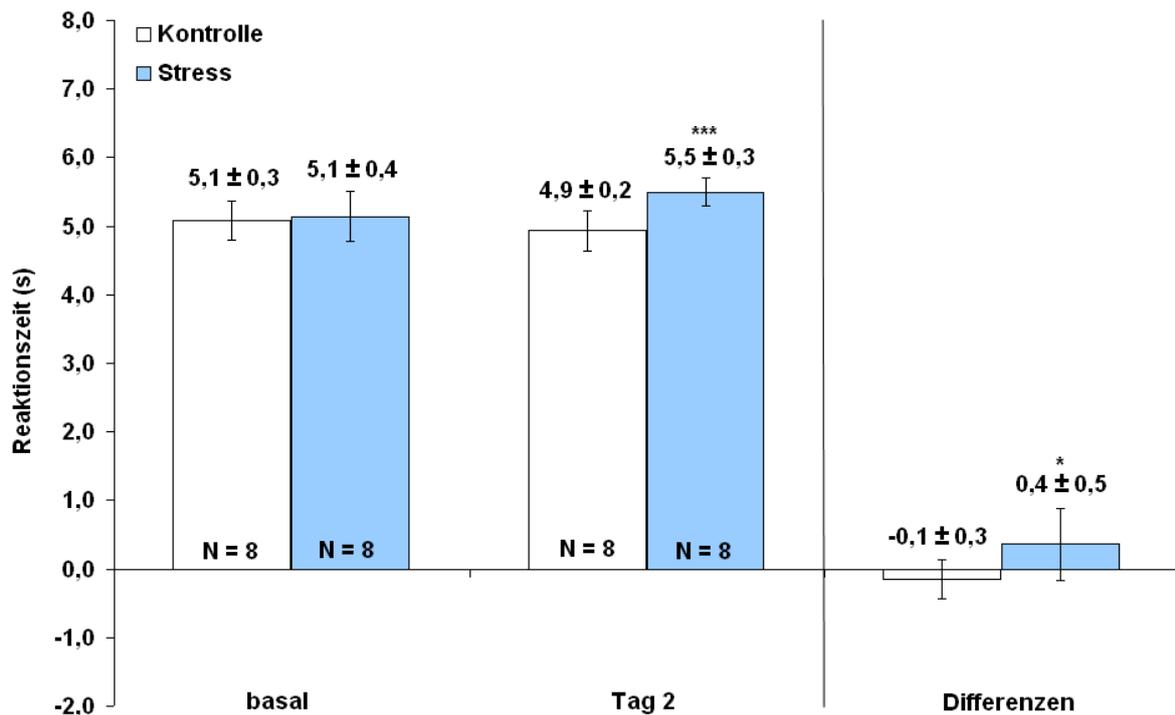
Bei Betrachtung der Differenzen (Mittelwerte der Basalmessungen minus Mittelwerte der Messungen an Tag 2) ergibt sich ebenso ein höchst signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen Kontroll- und Stresstieren.



**Abb. 9:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere im Randall-Selitto-Test nach einmaligem Immobilisationsstress bzw. Handling (Kontrolle). Die Differenzen auf der rechten Seite ergeben sich aus den Basalwerten und den Messwerten an Tag 2. Die Gruppenwerte sind jeweils als MW  $\pm$  SD dargestellt; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-Test, ungepaart).

In Abb. 10 sind die Versuchsergebnisse zur Messung der thermischen Schmerzsensibilität nach einmaligem Immobilisationsstress mittels Tail-Flick-Test abgebildet. Die Reaktionszeit der gestressten Tiere hat sich an Tag 2 im Vergleich zu ihren ungestressten Kontrolltieren höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) verlängert. Wie auch bei den vorangegangenen Randall-Selitto-Messungen stellt diese Verlängerung einen Anstieg der Schmerzschwelle und somit eine Analgesie dar.

Geht man zusätzlich von den Differenzen (Mittelwerte der Basalmessungen minus Mittelwerte der Messungen an Tag 2) aus, so ist der Unterschied von Stress- und Kontrollgruppen nur noch signifikant ( $p < 0,05$ ) im direkten Vergleich zu Tag 2.

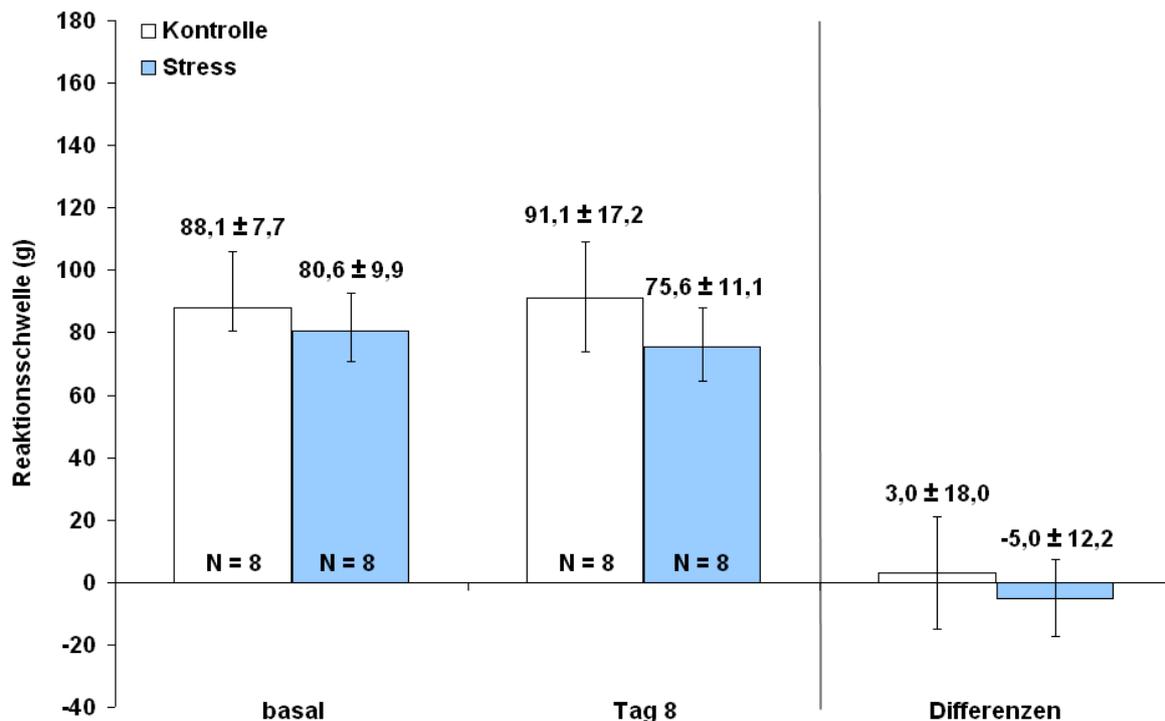


**Abb. 10:** Reaktionszeiten (s) der Tiere im Tail-Flick-Test nach einmaligem Immobilisationsstress bzw. Handling (Kontrolle). Die Differenzen auf der rechten Seite ergeben sich aus den Basalwerten und den Messwerten an Tag 2. Die Gruppenwerte sind jeweils als MW  $\pm$  SD dargestellt; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-Test, ungepaart).

#### 4.1.3.2. Einfluss von 7-maligem Immobilisationsstress auf die Nozizeption

Die Ergebnisse der Randall-Selitto-Messungen nach 7-maligem Immobilisationsstress sind in der Abbildung 12 dargestellt. Anhand dieses Diagramms kann man erkennen, dass die Reaktionsschwelle der Stresstiere am 8. Tag gegenüber den Kontrolltieren tendenziell verringert war. Diese Verminderung besaß jedoch keine statistische Signifikanz ( $p = 0,05$ ). Vergleichend zu den Ergebnissen von Tag 2 war bei diesen Tieren somit keine mechanische Analgesie feststellbar, ihre mechanische Schmerzsensibilität wies eher eine hyperalgetische Tendenz auf.

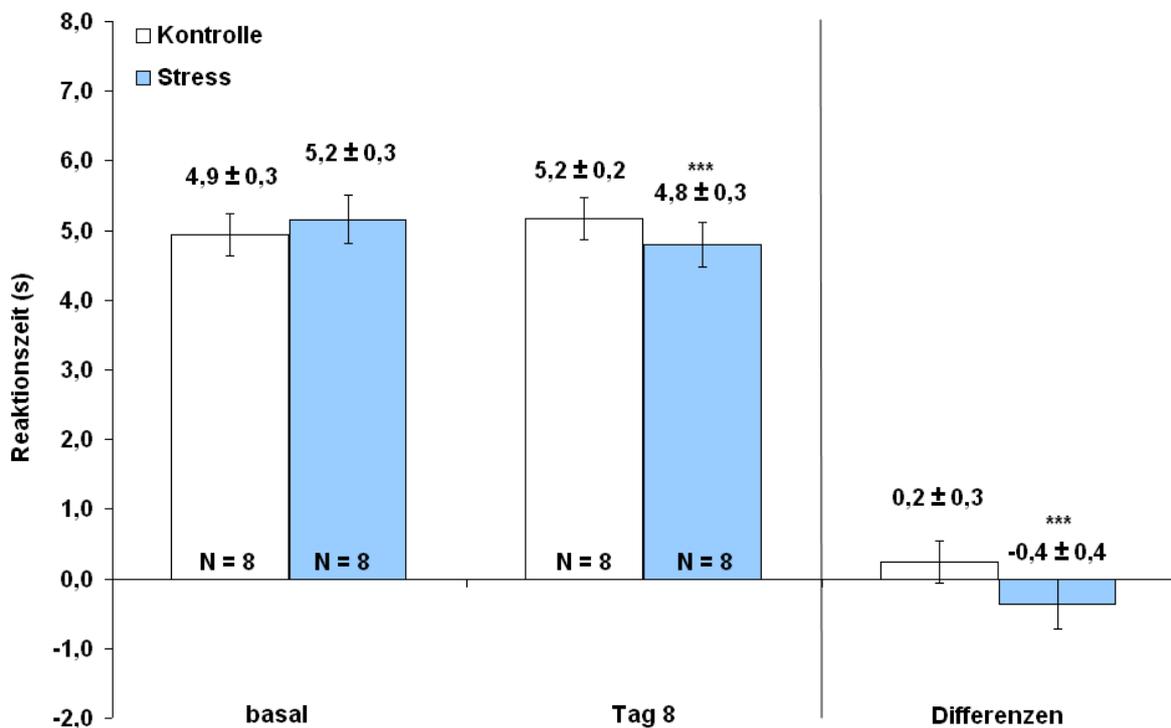
Bei Betrachtung der Differenzen (Mittelwerte der Basalmessungen minus Mittelwerte der Messungen an Tag 8) fällt auf, dass der Unterschied zwischen Kontroll- und Stresstieren geringer ( $p = 0,32$ ) ausfällt als an Tag 8. Dies erklärt sich aus der ebenso tendenziell verminderten basalen Reaktionsschwelle der Stressgruppe im Vergleich zu ihrer Kontrollgruppe.



**Abb. 11:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere im Randall-Selitto-Test nach 7-maligem Immobilisationsstress bzw. Handling (Kontrolle). Die Differenzen auf der rechten Seite ergeben sich aus den Basalwerten und den Messwerten an Tag 8. Die Gruppenwerte sind jeweils als MW ± SD dargestellt.

In Abb. 12 sind die Versuchsergebnisse zur Messung der thermischen Schmerzsensibilität nach 7-maligem Immobilisationsstress mittels Tail-Flick-Test dargestellt. Die Reaktionszeit der gestressten Tiere war im Vergleich zu ihren ungestressten Kontrolltieren an Tag 8 höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) verlängert. Im Gegensatz zu der thermischen Analgesie nach einmaligem Immobilisationsstress wiesen die Tiere hier somit einen Anstieg der Schmerzschwelle auf, was einer thermischen Hyperalgesie gleichzusetzen ist.

Geht man zusätzlich von den Differenzen (Mittelwerte der Basalmessungen minus Mittelwerte der Messungen an Tag 8) aus, so lässt sich ebenso ein höchst signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen Kontroll- und Stresstieren feststellen, was das Vorliegen einer thermischen Hyperalgesie bestätigt.

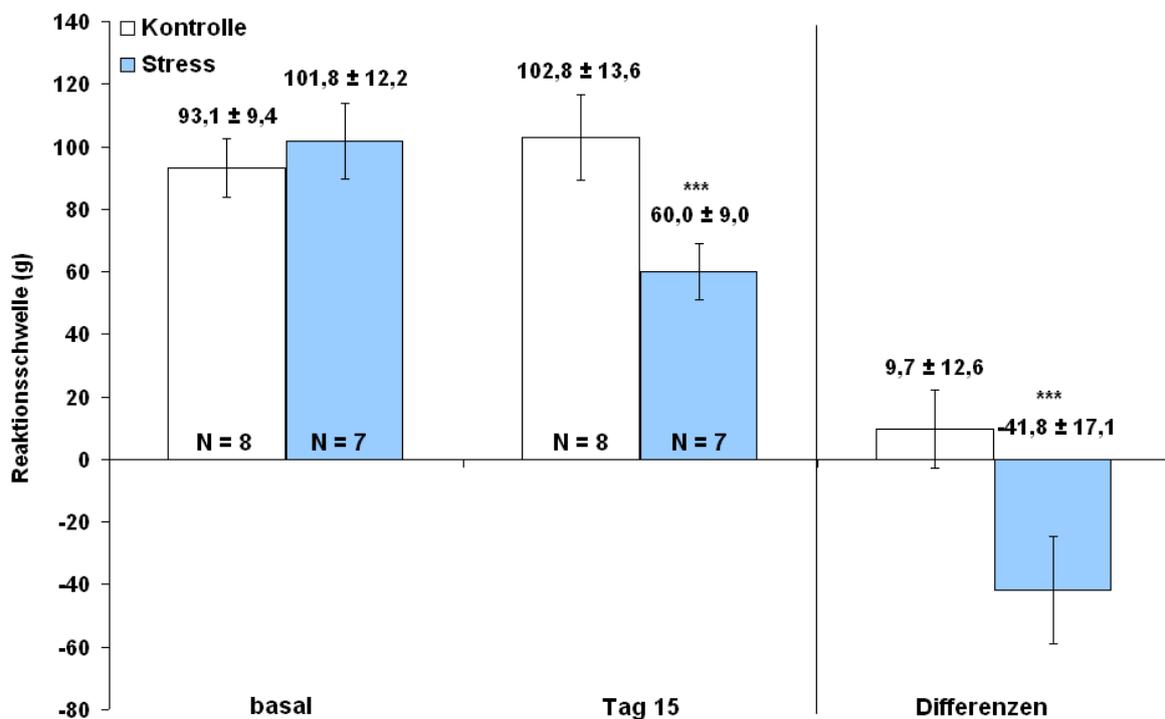


**Abb. 12:** Reaktionszeiten (s) der Tiere im Tail-Flick-Test nach 7-maligem Immobilisationsstress bzw. Handling (Kontrolle). Die Differenzen auf der rechten Seite ergeben sich aus den Basalwerten und den Messwerten an Tag 8. Die Gruppenwerte sind als MW  $\pm$  SD dargestellt; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-Test, ungepaart).

#### 4.1.3.3. Einfluss von 14-maligem Immobilisationsstress auf die Nozizeption

Die Ergebnisse der Randall-Selitto-Messungen nach 14-maligem Immobilisationsstress sind in der Abbildung 13 dargestellt. Aus diesem Diagramm wird ersichtlich, dass die Reaktionsschwelle der gestressten Tiere im Vergleich zu ihren ungestressten Kontrolltieren an Tag 15 höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) verringert war. Diese Verminderung ist mit einer Verringerung der Schmerzschwelle und somit einer mechanischen Hyperalgesie gleichzusetzen.

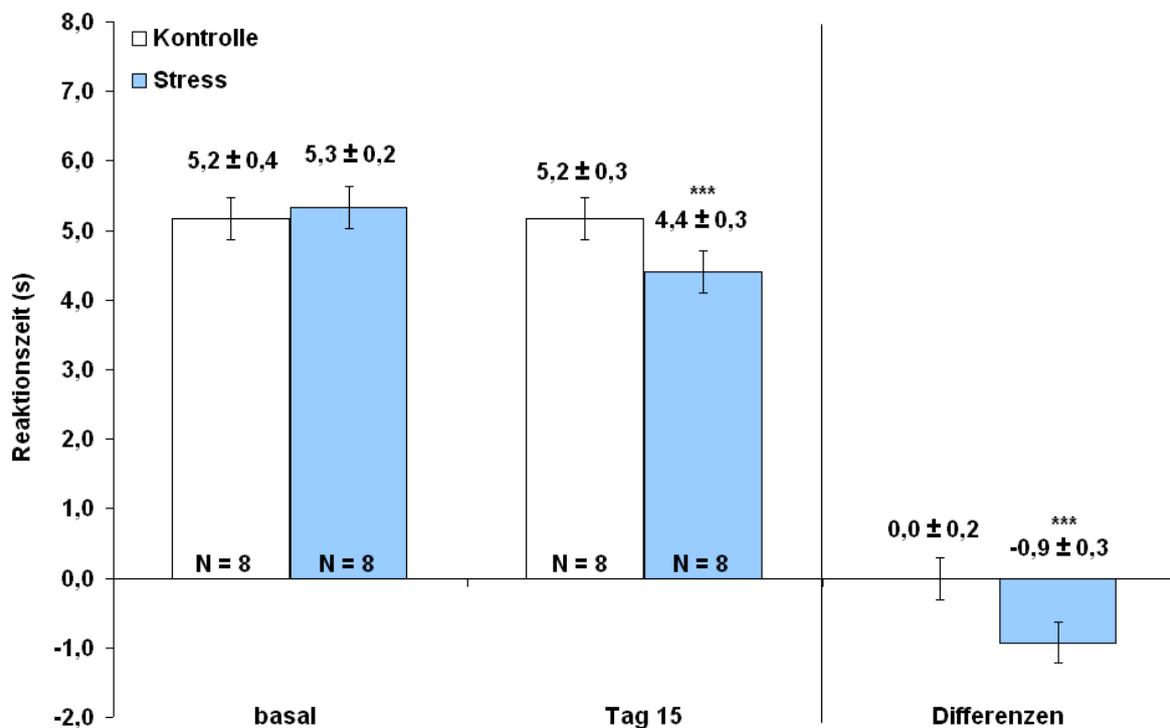
Bei Betrachtung der Differenzen (Mittelwerte der Basalmessungen minus Mittelwerte der Messungen an Tag 15) ergibt sich ebenso ein höchst signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen Kontroll- und Stresstieren. Dieser Unterschied fällt im Vergleich zu den Messungen an Tag 15 größer aus, was durch die tendenziell vergrößerte basale Reaktionsschwelle der Stressgruppe bedingt ist.



**Abb. 13:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere im Randall-Selitto-Test nach 14-maligem Immobilisationsstress bzw. Handling (Kontrolle). Die Differenzen auf der rechten Seite ergeben sich aus den Basalwerten und den Messwerten an Tag 15. Die Gruppenwerte sind jeweils als MW ± SD dargestellt; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-Test, ungepaart).

In Abb. 14 sind die Versuchsergebnisse zur Messung der thermischen Schmerzsensibilität nach 14-maligem Immobilisationsstress mittels Tail-Flick-Test dargestellt. Die Reaktionszeit der gestressten Tiere war im Vergleich zu ihren ungestressten Kontrolltieren an Tag 15 höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) verlängert. Wie bereits nach 7-maligem Immobilisationsstress wiesen somit auch diese Tiere einen Anstieg der Schmerzschwelle auf, was gleichbedeutend mit einer thermischen Hyperalgesie ist. Somit wiesen die Tiere an Tag 15 sowohl eine mechanische, als auch eine thermische höchst signifikante Hyperalgesie auf.

Geht man zusätzlich von den Differenzen (Mittelwerte der Basalmessungen minus Mittelwerte der Messungen an Tag 15) aus, so lässt sich ebenso ein höchst signifikanter Unterschied ( $p < 0,001$ ) zwischen Kontroll- und Stresstieren feststellen, was das Vorliegen einer thermischen Hyperalgesie bestätigt. Auch dieser Unterschied fällt im Vergleich zu den Messungen an Tag 15 größer aus, was durch die geringgradig vergrößerte basale Reaktionsschwelle der Stressgruppe bedingt ist.

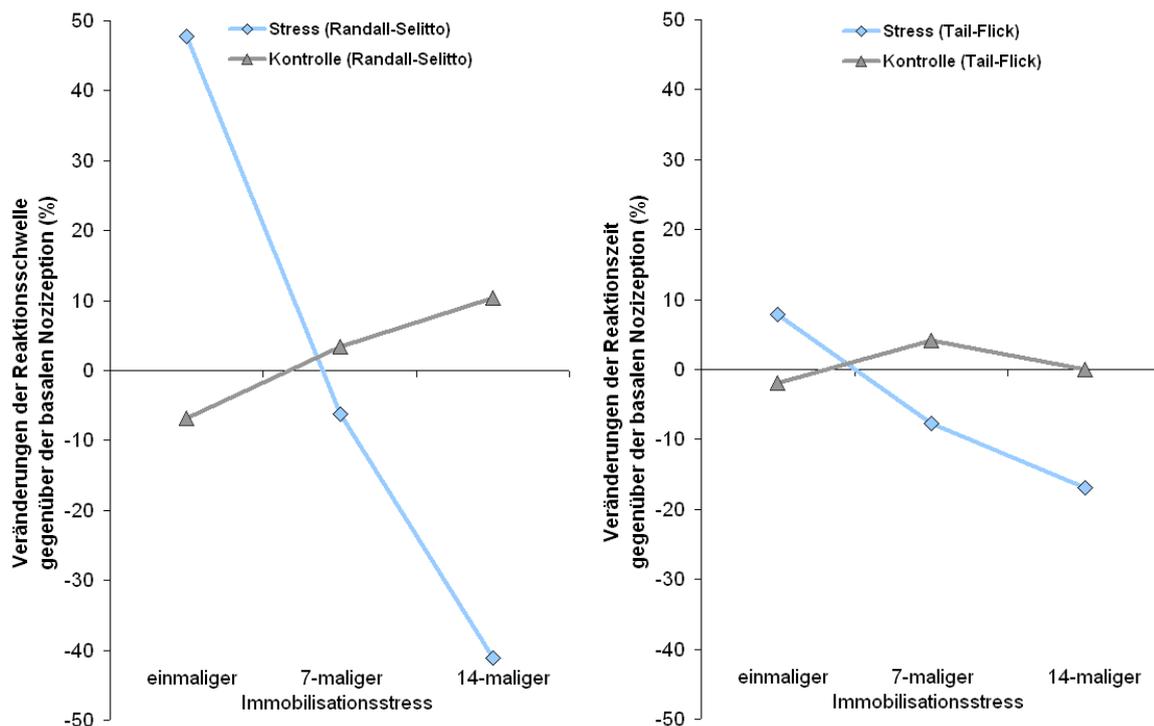


**Abb. 14:** Reaktionszeiten (s) der Tiere im Tail-Flick-Test nach 14-maligem Immobilisationsstress bzw. Handling (Kontrolle). Die Differenzen auf der rechten Seite ergeben sich aus den Basalwerten und den Messwerten an Tag 15. Die Gruppenwerte sind als MW  $\pm$  SD dargestellt; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-Test, ungepaart).

In der nachfolgenden Abbildung 15 werden die Ergebnisse aus den Randall-Selitto- und Tail-Flick-Messungen in Form eines Kurvenverlaufs gegenübergestellt. In diesen Diagrammen sind die prozentualen Veränderungen der Schmerzschwellen (= Differenz (Mittelwert der Basalmessungen „minus“ Mittelwert der Messungen am jeweiligen Tag) „geteilt durch“ den Mittelwert der Basalmessung am jeweiligen Tag „mal“ 100) dargestellt.

Man erkennt dabei, dass die Schmerzschwelle bei beiden Kurven zu Beginn erhöht ist (Analgesie) und mit zunehmendem Stressverlauf sinkt. Nach 14-maligem Immobilitätsstress liegt bei beiden Kurven eine verminderte Schmerzschwelle (Hyperalgesie) vor.

Bei direktem Vergleich von Randall-Selitto- und Tail-Flick-Test lässt sich bei Ersterem ein deutlich stärkerer Abfall im Kurvenverlauf erkennen. Das drückt sich durch eine wesentlich höhere Schmerzschwelle nach einmaligem Immobilisationsstress sowie eine erheblich stärkere Verminderung der Schmerzschwelle an Tag 15 aus. Demgegenüber flacht die Kurve des Tail-Flick-Tests viel langsamer ab. Trotz dieses flacheren Abfalls weist dieser Kurvenverlauf an Tag 8 eine niedrigere prozentuale Schmerzschwelle auf als der Randall-Selitto-Test.



**Abb. 15:** Vergleichende Darstellung der Veränderungen der Schmerzschwellen (bezogen auf die jeweilige basale Nozizeption) bei einmaligem, 7-maligem und 14-maligem Immobilisationsstress. Im linken Diagramm sind die Randall-Selitto-Messungen und im rechten Diagramm die Tail-Flick-Messungen dargestellt.

#### 4.1.4. Diskussion

Ziel dieser Versuche war es, den Einfluss von einmaligem, 7-maligem und 14-maligem Immobilisationsstress auf die thermische und mechanische Schmerzsensibilität festzustellen, um dabei eine mögliche hyperalgetische Veränderung zu detektieren.

Bei Betrachtung der Versuchsergebnisse nach einmaligem (akuten) Immobilisationsstress konnte im Randall-Selitto-Test eine höchst signifikante mechanische Analgesie festgestellt werden. Zusätzlich zeigte sich auch eine signifikante thermische Analgesie im Tail-Flick-Test.

Diese Beobachtungen gehen mit den bereits bekannten Ergebnissen einher, in denen ein akuter (einmaliger) Immobilisationsstress ebenso eine thermische Analgesie im Tail-Flick-Test induziert hat (Pilcher & Browne, 1983; Porro & Carli, 1988; Aloisi et al., 1994; Gamaro et al., 1998; Costa et al., 2005). Diese Autoren vermuten, dass eine Wirkung von akutem Immobilisationsstress auf die thermische Schmerzsensibilität vermutlich auf einer Opioid-vermittelten Aktivierung von absteigenden Nervenbahnen beruht, die die nozizeptiven Rückenmarksneurone und somit die Nozizeption hemmen (Abschnitte 2.3.2.1. und 2.3.3.1.). Die eigenen Ergebnisse des Randall-Selitto-Tests belegen zwar die Ansicht, dass akuter Stress eher eine analgetische Wirkung hat, jedoch konnten Pilcher & Browne (1983) zeigen, dass akuter Immobilisationsstress im Randall-Selitto-Test eine mechanische Hyperalgesie induzieren kann. Ebenso demonstrierten Gameiro et al. (2006), dass akuter Immobilisationsstress im Formalin-Schmerz-Modell keine Auswirkungen auf die Schmerzwahrnehmung hat. Diese Unterschiede können jedoch aufgrund der unterschiedlichen Versuchsbedingungen zustande kommen, da Pilcher & Browne (1983) einen anderen Rattenstamm (Hood-Ratten) und eine andere Form der Immobilisierung (flexibles Drahtgitter) und Gameiro et al. (2006) das Formalin-Schmerz-Modell zur Erfassung von hyperalgetischen Veränderungen eingesetzt haben.

Betrachtet man die Versuchsergebnisse nach 7-maligem Immobilisationsstress, so konnten bei beiden Testsystemen keine analgetischen Veränderungen mehr detektiert werden. Stattdessen wurde im Tail-Flick-Test eine höchst signifikante thermische Hyperalgesie gemessen, während die Stresstiere im Randall-Selitto-Test allerdings nur eine hyperalgetische Tendenz aufwiesen.

Diese Ergebnisse des Tail-Flick-Tests gehen einher mit denen von Costa et al. (2005), die in ihren Versuchen nach 7 aufeinanderfolgenden Tagen ebenso eine thermische Hyperalgesie feststellen konnten. Bardin et al. (2009) zeigten dagegen, dass sich nach 4-maligem Immobilisationsstress sowohl im Randall-Selitto-Test, als auch im Tail-Flick-Test keine Hyperalgesie ausgebildet hat. Wurden die Tiere dem Stressor dagegen 8-mal ausgesetzt, so wiesen sie zumindest eine thermische Hyperalgesie im Tail-Flick-Test auf. Auch hier muss darauf verwiesen werden, dass bei Bardin et al. (2009) neben dem unterschiedlichen Stressverlauf noch weitere gravierende Unterschiede zu den eigenen Versuchen bestehen, da sie ihre Versuchstiere nur an 4 Tagen pro Woche einem Immobilisationsstress ausgesetzt haben, sie für die thermischen Hyperalgesie-Messungen eine Sonderform des Tail-Flick-Tests einsetzten und sie beim Randall-Selitto-Test nur die Lautgebung der Tiere als Zeichen

für einen Schmerzreiz gewertet haben (Bardin et al., 2009). Dieses Versuchsprotokoll hat bei mehrwöchiger Durchführung jedoch noch einen weiteren Nachteil, da einmal pro Woche am 5ten Tag eine unterschiedliche Nozizeptionsmessung (wöchentlicher Wechsel der Messgeräte) durchgeführt wurde und nicht bekannt ist, in wieweit sich diese wiederholten und unterschiedlichen Nozizeptionsmessungen untereinander durch Messstress- und eventuell auftretende DNIC-Effekte beeinflussen können (Villanueva & Le Bars, 1995; Ottenweller, 2000; Le Bars et al., 2001).

Bei Betrachtung der Versuchsergebnisse nach 14-maligem Immobilisationsstress konnte im Tail-Flick-Test erneut eine höchst signifikante thermische Hyperalgesie festgestellt werden. Zusätzlich zeigte sich auch im Randall-Selitto-Test eine höchst signifikante mechanische Hyperalgesie.

Bisher sind in der Literatur keine vergleichbaren Versuchsabläufe bekannt, in denen die Tiere an 14 aufeinanderfolgenden Tagen für jeweils 1 h einem Immobilisationsstress ausgesetzt waren. Häufig finden sich dagegen Versuchsabläufe, in denen die Tiere für 8 Wochen lang (5 Tage/Woche, täglich 1 h) durch Immobilisation in Plexiglasröhren gestresst wurden (Gamaro et al., 1998; da Silva Torres et al., 2003; Dantas et al., 2005; Gameiro et al., 2006; Bardin et al., 2009). Diese Tiere wiesen nach dem Stress alle eine Hyperalgesie im Tail-Flick-Test bzw. Formalin-Schmerz-Modell auf. Lediglich in der bereits angesprochenen Arbeit von Bardin et al. (2009) konnten nach 8 Wochen im Tail-Flick und im Randall-Selitto-Test keine hyperalgetischen Veränderungen festgestellt werden.

Jedoch stellt diese Arbeit aufgrund deren Vielzahl von nozizeptiven Zwischenmessungen die einzige dar, mit der der Stressverlauf in den eigenen Versuchen verglichen werden kann. Bardin et al. (2009) konnten nach „3 Wochen“ (= 15-maliger Immobilisationsstress nach deren Stressverlauf) im Tail-Flick-Test eine thermische, im Randall-Selitto-Test jedoch keine mechanische Hyperalgesie nachweisen. Paradoxerweise trat dagegen bei ihnen mit anderen Nozizeptionsmessgeräten (Von-Frey-Filamente; Kältestimulation) eine mechanische und thermische Allodynie auf. Als Grund dafür können erneut die Unterschiede hinsichtlich des Versuchsablaufs und der Messmethodik zu den eigenen Untersuchungen aufgeführt werden, die bereits erläutert wurden.

Bei Betrachtung des gesamten Stressverlaufs kann insgesamt eine Dynamik im Randall-Selitto- und im Tail-Flick-Test festgestellt werden (Abb. 15). Akute Stresszustände führen zu einer Analgesie, während diese mit fortschreitendem Verlauf aufgehoben werden und sich eine Hyperalgesie einstellt.

Auch bei einigen der bereits erwähnten Arbeitsgruppen konnte ebenso diese Dynamik mit zunehmendem Stressverlauf beobachtet werden. Bei Costa et al. (2005) trat nach akuter Analgesie bereits nach 7 Tagen eine Hyperalgesie auf, wohingegen dies bei anderen bis zu 40 Tage dauerte (Gamaro et al., 1998; Gameiro et al., 2006), abhängig von den jeweiligen Stressbedingungen.

Auch anhand der Versuchsergebnisse von Schwimmstress (Jackson & Kitchen, 1989; Suarez-Roca et al., 2006a; 2006b) kann dies ebenso vermutet werden, da dieser akut zu einer Analgesie, wiederholt angewandt jedoch zu einer Hyperalgesie führen soll. Leider wurde dies bisher noch nicht in einem zusammenhängenden Versuch bestätigt.

Eine mögliche Theorie für diese Dynamik von Stress-induzierten Nozizeptionsveränderungen wurde zumindest vor kurzem bei Lärmstress beschrieben (Donello et al., 2011; Abschnitt 2.3.4.6.). Dort spielt vor allem der Sympathikus eine große Rolle. Dieser wirkt dabei gleichermaßen über Nozizeptions-verstärkende adrenerge  $\alpha$ 1- und Nozizeptions-hemmende  $\alpha$ 2-Rezeptoren auf die Schmerzwahrnehmung ein. Werden selektiv die  $\alpha$ 1- oder die  $\alpha$ 2-adrenergen Rezeptoren ausgeschaltet, so kann Lärmstress entweder eine Analgesie oder auch eine Hyperalgesie ausbilden (Donello et al., 2011).

Da sich für die weiterführenden Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus aufgrund von tierschutzrechtlichen und methodischen Gründen auf eine Messmethode beschränkt werden musste, wurden die nachfolgenden nozizeptiven Untersuchungen nur noch mit dem Randall-Selitto-Test durchgeführt. Das lag methodisch zum einen an stärkeren messbaren Effekten (Abb. 15) sowie dem besseren und für die Tiere stressfreieren Handling (ohne Fixierung in einer Plexiglasröhre). Ausschlaggebend dafür aber war vor allem die Tatsache, dass bei den chronischen humanen Schmerzkrankheiten mechanische hyperalgetische Veränderungen zugrunde liegen und auch diagnostisch genutzt werden, wie z. B. die „tender points“ bei der Fibromyalgie (Schweinhardt et al., 2008; Wolfe et al., 2010). Vor kurzem wurde zudem auch die Eignung des Randall-Selitto-Tests bei weiteren präklinischen Schmerzmodellen sowie deren erfolgreiche Behandlung mit therapeutisch wirksamen Pharmaka festgestellt (Mico et al., 2011; Santos-Nogueria et al., 2011).

Zusammenfassend kann somit festgehalten werden, dass akuter (einmaliger) Immobilisationsstress eine Analgesie auslöst. Dieser Effekt ist allerdings nach 7-maliger Stress-Wiederholung aufgehoben, während nach 14-maligem Immobilisationsstress eine höchst signifikante thermische und mechanische Hyperalgesie festgestellt werden konnte. Somit sind keine weiteren Versuche zur Untersuchung eines längeren Stressverlaufs nötig. Weiterhin war dieser hyperalgetische Effekt beim Randall-Selitto-Test am größten, so dass der Tail-Flick-Test in den weiterführenden eigenen Untersuchungen nicht mehr eingesetzt werden wird. Somit wird sich zur Charakterisierung der Stressreaktion und -wirkung und zur Aufklärung der zugrundeliegenden Mechanismen auf den Randall-Selitto-Test in Verbindung mit dem 14-maligen täglichen Immobilisationsstress beschränkt.

## **4.2. Charakterisierung der Stressreaktion und -wirkung von 14-maligem Immobilisationsstress**

### **4.2.1. Einleitung**

In Abschnitt 4.1. konnte gezeigt werden, dass Wistarratten im Randall-Selitto-Test eine höchst signifikante mechanische Hyperalgesie aufwiesen, wenn diese über einen Zeitraum von 14 Tagen täglich 1 h immobilisiert wurden.

Zwar ist bekannt, dass eine Immobilisation von Tieren als „Stress“ gilt (Paré & Glavin, 1986; Glavin et al., 1994; Buynitsky & Mostofsky, 2009), jedoch wurde ein expliziter Nachweis in diesem Zusammenhang in den eigenen Untersuchungen noch nicht erbracht. Daher erfolgte bereits parallel zu den Nozizeptionsmessungen die Gewinnung von zusätzlichen Daten, um die Stressreaktion und -wirkung von 14-maligem täglichen Immobilisationsstress zu charakterisieren.

Wie bereits beschrieben (Abschnitt 2.1.7.), führt ein andauernder (chronischer) Stress zu einer Fülle von peripheren und zentralen Veränderungen innerhalb des gesamten Organismus (Chrousos, 2009). Daher ergibt sich eine Vielzahl von möglichen Parametern, um die Wirkung und Reaktion von Immobilisationsstress auf die Versuchstiere zu untersuchen. Allerdings durfte die Gewinnung dieser Daten den eigentlichen Versuchsablauf zur Untersuchung des Einflusses von Immobilisationsstress auf die Nozizeption nicht unnötig durch zusätzliche Stressoren beeinflussen.

Aus diesen Gründen und unter dem Aspekt der Praktikabilität wurden folgende Parameter bestimmt: der Tiergewichtsverlauf, der Gesamtverbrauch von Futter- und Trinkwasser, das Differenzialblutbild, die Plasmaspiegel von Corticosteron und Glucose sowie das Nebennierengewicht.

Über die Corticosteron-Konzentration im Plasma und die Nebennierengewichte (Corticosteron wird in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde synthetisiert) kann dabei eine Aussage über die HPA-Achse getroffen werden, was somit der Charakterisierung der Stressreaktion dient. Ebenso hätten dafür auch die Sympathikus-Hormone Noradrenalin und Adrenalin bestimmt werden können. Jedoch erfordert dies ein spezielles Kathetersystem zur Blutgewinnung, da es bereits bei der ebenso bei Stresshormon-Messungen empfohlenen Decapitation zu einem zusätzlichen 8-fachen Anstieg der Noradrenalin- und Adrenalinpiegel im peripheren Blut kommen kann (Ottenweller, 2000; Kvetnansky et al., 2009), was die Aussagekraft dieser Parameter erheblich reduziert. Daher wurde sich initial auf die Bestimmung des Plasma-Corticosterons beschränkt.

Von diesen ubiquitär wirkenden Glucocorticoiden ist im Rahmen der Stresswirkung auf den Organismus unter anderem bekannt, dass sie die vegetativen Funktionen, das Immunsystem und den Stoffwechsel beeinflussen können (Chrousos, 2009). Der Einfluss von 14-maligem Immobilisationsstress auf die vegetativen Funktionen wie z. B. Wachstum und Ernährung kann daher über einfache Messungen des Körpergewichts sowie der Trinkwasser- und

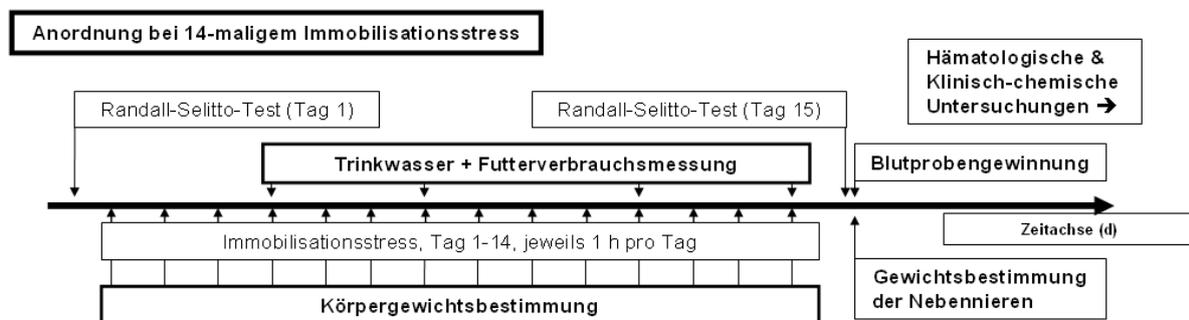
Futteraufnahmen bestimmt werden. Hinsichtlich des Immunsystems lässt sich die Stresswirkung durch Bestimmung der Leukozytenzahl ermitteln. Dies spiegelt sich in der Tatsache wieder, dass bereits frühzeitig Messungen der Leukozytenzahl im Blut als indirekter Marker für Stresswirkungen verwendet wurden (Hoagland et al., 1946). Für die Untersuchung einer möglichen Stoffwechsellage sollten die Bestimmungen der Blutglucose und des Körpergewichts dienen, da Stress bekannterweise eine katabole Stoffwechsellage induziert (Chrousos, 2009).

## 4.2.2. Material und Methoden

### 4.2.2.1. Versuchsablauf

Der Versuchsablauf zur Gewinnung der Daten parallel zu den Nozizeptionsmessungen ist in Abbildung 16 schematisch dargestellt. Wie bereits erläutert, handelte es sich bei den Versuchstieren um die Tiere, die einem 14-maligen Immobilisationsstress bzw. Handling ausgesetzt waren und deren Nozizeption im Randall-Selitto-Test bestimmt wurde. Parallel dazu erfolgte bei diesen Tieren die Bestimmung des Trinkwasser- und Futtergewichts beim Wechsel der Makrolonkäfige. Auf einer Waage (sartorius BT 1200, sartorius mechatronics AG, Göttingen) wurde dazu die verbrauchte Menge pro Käfig mit jeweils 2 Tieren gemessen. Zusätzlich wurde täglich unmittelbar vor dem Immobilisationsstress bzw. Handling das Körpergewicht der Tiere durch eine Tierwaage (Modell CS 2000, Ohaus Corporation, Parsippany, USA) bestimmt. Nach der letzten Nozizeptionsmessung mit dem Randall-Selitto-Apparat an Tag 15 erfolgten die Dekapitation zur Gewinnung des Vollblutes und dessen anschließende Verwendung für die klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchungen. Daneben wurden auch die Nebennieren zur Bestimmung des Gewichts gewonnen.

### Versuchsablauf



**Abb. 16:** Darstellung des Versuchsablaufs, um die Auswirkungen von 14-maligen Immobilisationsstress auf das Körpergewicht, das Nebennierengewicht, den Futter- und Trinkwasserverbrauch sowie auf klinisch-chemische und hämatologische Parameter festzustellen.

#### **4.2.2.2. Klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungen**

Direkt nach der letzten Nozizeptionsmessung wurde zwischen 10 – 12 Uhr durch Dekapitation das Vollblut in Monovetten (Kalium-EDTA 9 ml Monovetten, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) gewonnen. Daraufhin erfolgte die Portionierung des EDTA-Vollbluts für die hämatologische Untersuchung (250 µl) und die Bestimmung des Glucose-Spiegels (30 µl) in Eppendorfgefäße (Eppendorf AG, Hamburg). Das restliche EDTA-Blut wurde für die Bestimmung des Corticosteron-Gehalts zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus Instruments, Osterode; 2300 G, 20 °C, 5 min), ebenso in Eppendorfgefäße portioniert und anschließend bei -80 °Celsius tiefgefroren. Die Messung des Glucose-Spiegels im EDTA-Vollblut erfolgte mit einem Blutanalyse-Automat (Reflotron® Plus, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Zur Analyse des Differentialblutbildes wurde ein Hämatologie-System (Advia 120 Analyzer, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn) verwendet. Der Corticosteron-Gehalt im Plasma wurde mit Hilfe eines Radioimmunoassays (RIA; Corticosterone RIA-KIT, MP Biomedicals Germany GmbH, Eschwege) gemäß der Vorschriften des Herstellers bestimmt.

#### **4.2.2.3. Bestimmung des Nebennierengewichts**

Der Tierkörper wurde in Rückenlage entlang der Linea alba geöffnet. Unter Verlegung der abdominalen Organe erfolgten die Darstellung und die Entfernung der beiden Nebennieren. Das Gewicht der Nebennieren wurde daraufhin über eine Waage (sartorius BP 2215, sartorius mechatronics AG, Göttingen) bestimmt.

#### **4.2.2.4. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte analog zum vorherigen Versuchsabschnitt. Bei allen Berechnungen wurden die Versuchsergebnisse der gestressten Gruppen mit denen der jeweiligen ungestressten Kontrollen zu einem bestimmten Zeitpunkt verglichen. Dazu wurden jeweils das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet.

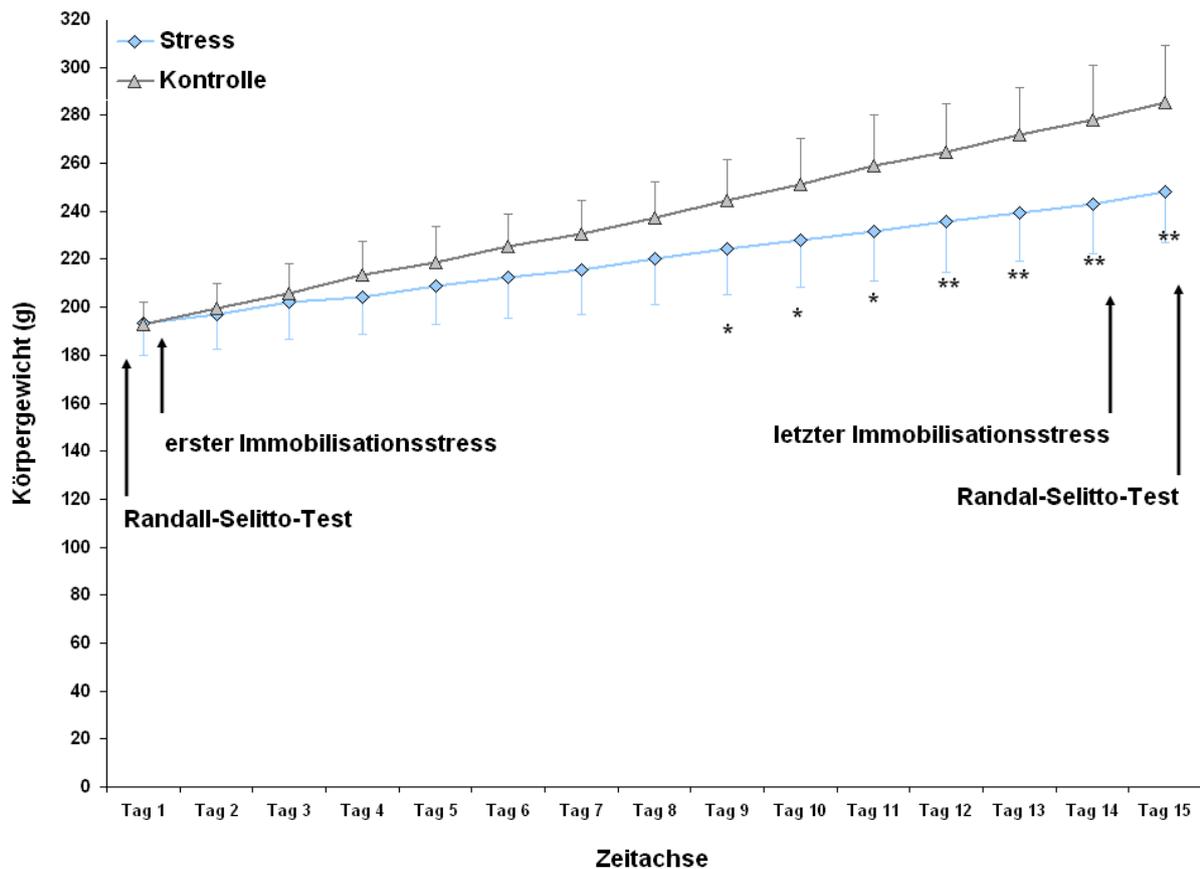
Die Prüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung erfolgte mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Zur Prüfung der Varianzhomogenität wurde der F-Test verwendet. Da die Versuchsgruppen voneinander unabhängige (unverbundene) Stichproben darstellten, wurde für den statistischen Vergleich der Student'sche t-Test für unverbundene Stichproben verwendet.

Eine statistische Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant, eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  als hoch signifikant und eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$  als höchst signifikant angesehen.

## 4.2.3. Ergebnisse

### 4.2.3.1. Einfluss auf das Körpergewicht

Der Verlauf der Körpergewichte von Stress- und Kontrolltieren über den Messzeitraum von 15 Tagen ist in Abbildung 17 dargestellt. Beide Kurven haben einen linearen Verlauf, wobei der Anstieg der Kontrollgruppe größer erscheint als bei den Tieren, die gestresst wurden. Beim Vergleich der Mittelwerte zeigen sich ab dem 9. Tag signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ), ab dem 12. Tag bis zur letzten Messung hoch signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,01$ ) zwischen den Kontroll- und den Stresstieren.



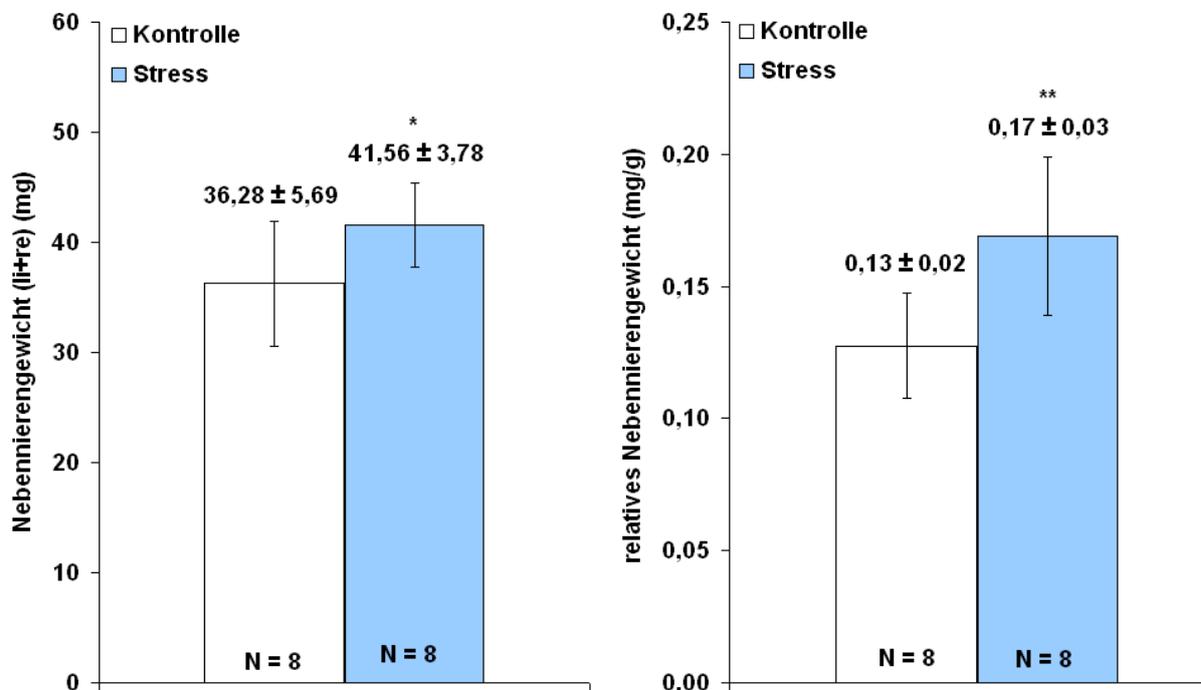
**Abb. 17:** Verlauf der Körpergewichtsentwicklung (g) von Stress- und Kontrolltieren über den 15-tägigen Versuchszeitraum. Die Punkte der Kurven stellen die MW  $\pm$  SD an dem jeweiligen Tag dar; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (t-Test, ungepaart).

#### 4.2.3.2. Einfluss auf die Nebennierengewichte

In der nachfolgenden Abbildung 18 werden die absoluten (linkes Diagramm) und die relativen (rechtes Diagramm) Gewichte von beiden Nebennieren der Stress- bzw. Kontrolltiere dargestellt. Das relative Nebennierengewicht errechnet sich dabei aus dem Gewicht von beiden Nebennieren (mg) bezogen auf 1 Gramm Tiergewicht.

Bei Betrachtung des linken Diagramms lässt sich eine signifikante Zunahme ( $p < 0,05$ ) der Nebennierengewichte nach 14-maligem Immobilisationsstress im Vergleich zur Kontrolle erkennen.

Werden die Nebennierengewichte zu den Körpergewichten (Durchschnittskörpergewicht der Kontrolltiere betrug  $285,13 \text{ g} \pm 23,95 \text{ g}$ , das der gestressten Tiere  $248,25 \text{ g} \pm 21,47 \text{ g}$ ) in Bezug gesetzt, so wird dieser Unterschied zwischen Kontroll- und Stressgruppe hoch signifikant ( $p < 0,01$ ).

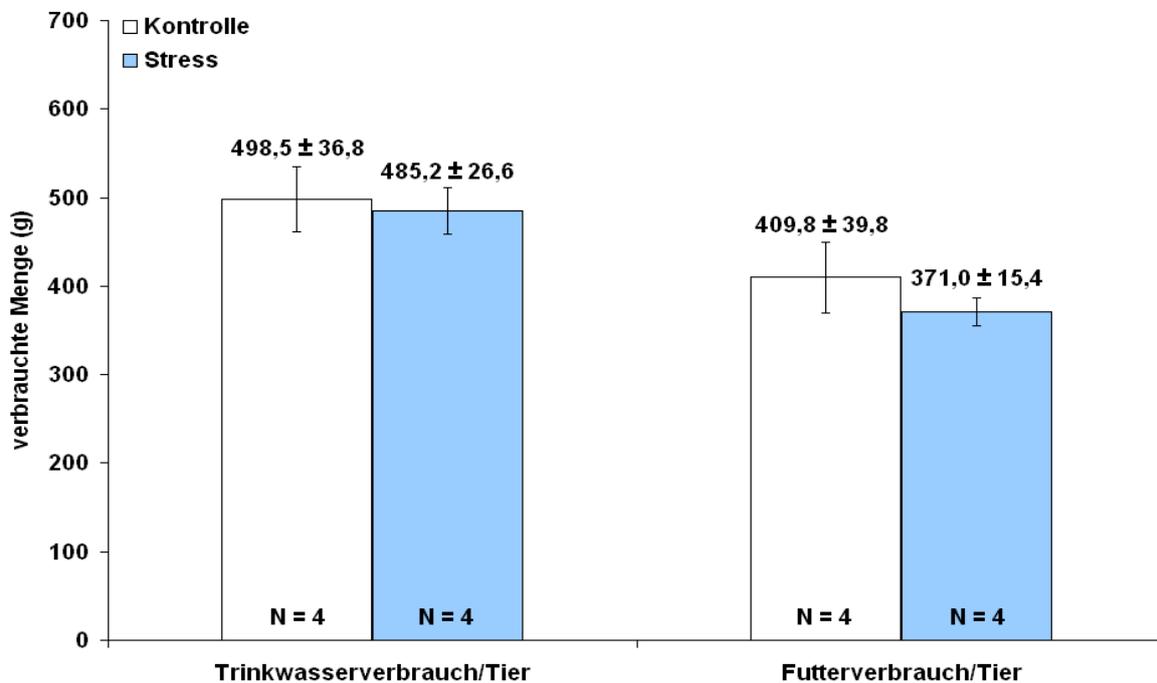


**Abb. 18:** Darstellung der Gewichte von beiden Nebennieren (links: absolut (mg), rechts: relativ pro Gramm Tiergewicht (mg/g)) nach Immobilisationsstress oder Handling. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (t-Test, ungepaart).

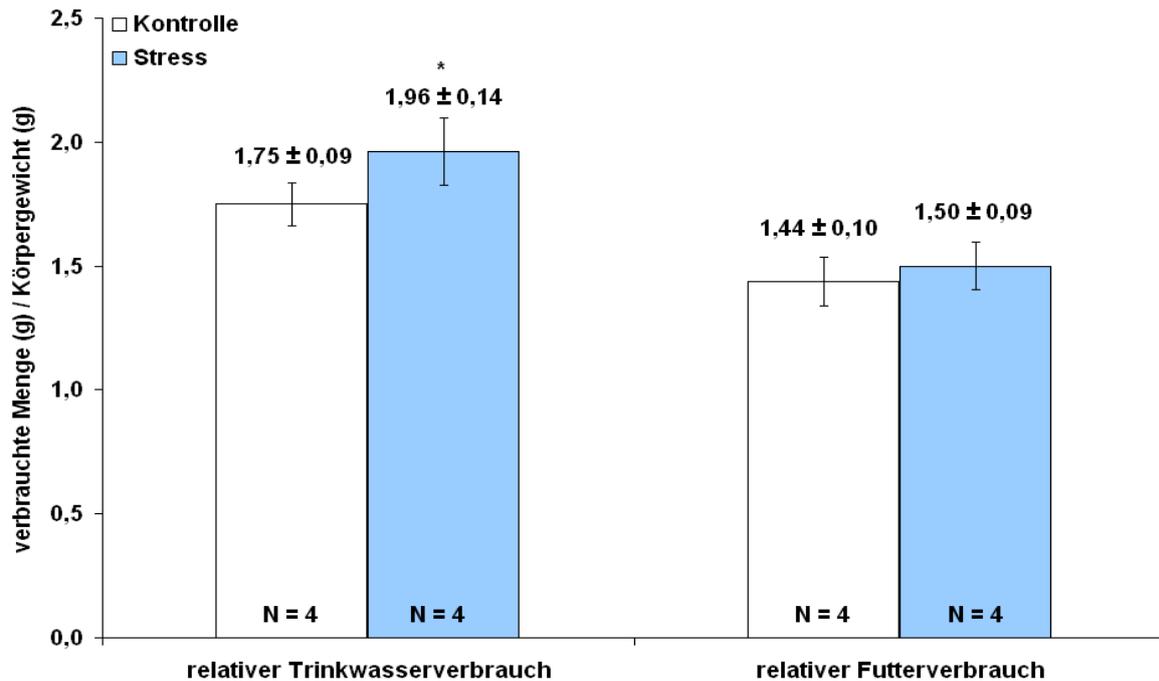
#### 4.2.3.3. Einfluss auf den Futter- und Trinkwasserverbrauch

Die Abbildung 19 zeigt den Futter- und Wasserverbrauch pro Käfig bei den Stress- bzw. Kontrolltieren. Da sich in einem Käfig zwei Ratten befanden, konnte keine Verbrauchsstatistik pro Tier erstellt werden. Bei Betrachtung des absoluten Trinkwasser- und Futterverbrauchs pro Käfig erscheint zwar der Verbrauch in den Käfigen der gestressten Tiere tendenziell geringer als bei den Kontrolltieren, jedoch konnten keine statistisch sicheren Unterschiede ( $p = 0,58$  bzw.  $p = 0,12$ ) festgestellt werden.

Werden die Verbrauchsmengen ins Verhältnis zu den Tiergewichten gesetzt (Abbildung 20), so ergeben sich ein signifikant höherer Trinkwasserverbrauch ( $p < 0,05$ ) sowie ein tendenziell höherer Futterverbrauch pro Käfig. Dieser höhere relative Futterverbrauch war jedoch nicht statistisch signifikant ( $p = 0,39$ ).



**Abb. 19:** Absolutes Gewicht (g) der verbrauchten Futter- und Trinkwassermenge/Tier (2 Tiere/Käfig) von Stress- und Kontrolltieren nach 15 Tagen. Das Futter- und Trinkwassergewicht wurde pro Käfig bestimmt (N = 2) und auf die Tieranzahl in den Käfigen bezogen. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD.

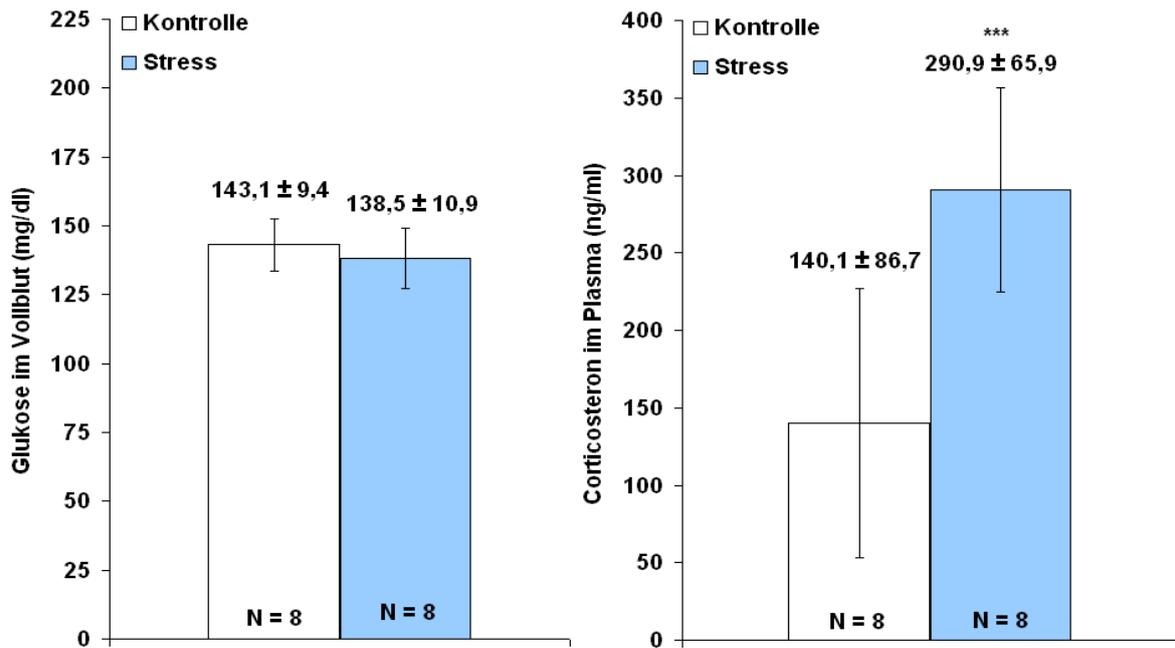


**Abb. 20:** Relatives Gewicht (g/g) der verbrauchten Trinkwasser- und Futtermenge/Käfig (2 Tiere/Käfig) von Stress- und Kontrolltieren nach 15 Tagen. Das Futter- und Trinkwassergewicht wurde pro Käfig bestimmt (N = 2) und auf die Tieranzahl in den Käfigen bezogen. Darstellung als MW ± SD; \* p < 0,05 (t-Test, ungepaart).

#### 4.2.3.4. Einfluss auf klinisch-chemische Blutwerte

In der nachfolgenden Abbildung 21 werden die Glucose-Spiegel (mg/dl) im EDTA-Plasma (linkes Diagramm) und der Corticosteron-Gehalt (ng/ml) im EDTA-Plasma (rechtes Diagramm) der Stress- bzw. Kontrolltiere dargestellt.

Bei der Glucose im Plasma konnte kein statistisch signifikanter Unterschied (p = 0,35) zwischen Stress- und Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dagegen konnte eine höchst signifikante Erhöhung (p ≤ 0,001) des Corticosteron-Spiegels im Plasma der gestressten Tiere im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden. Auffällig waren dabei auch die hohen Standardabweichungen, die sich in beiden Gruppen zeigten.

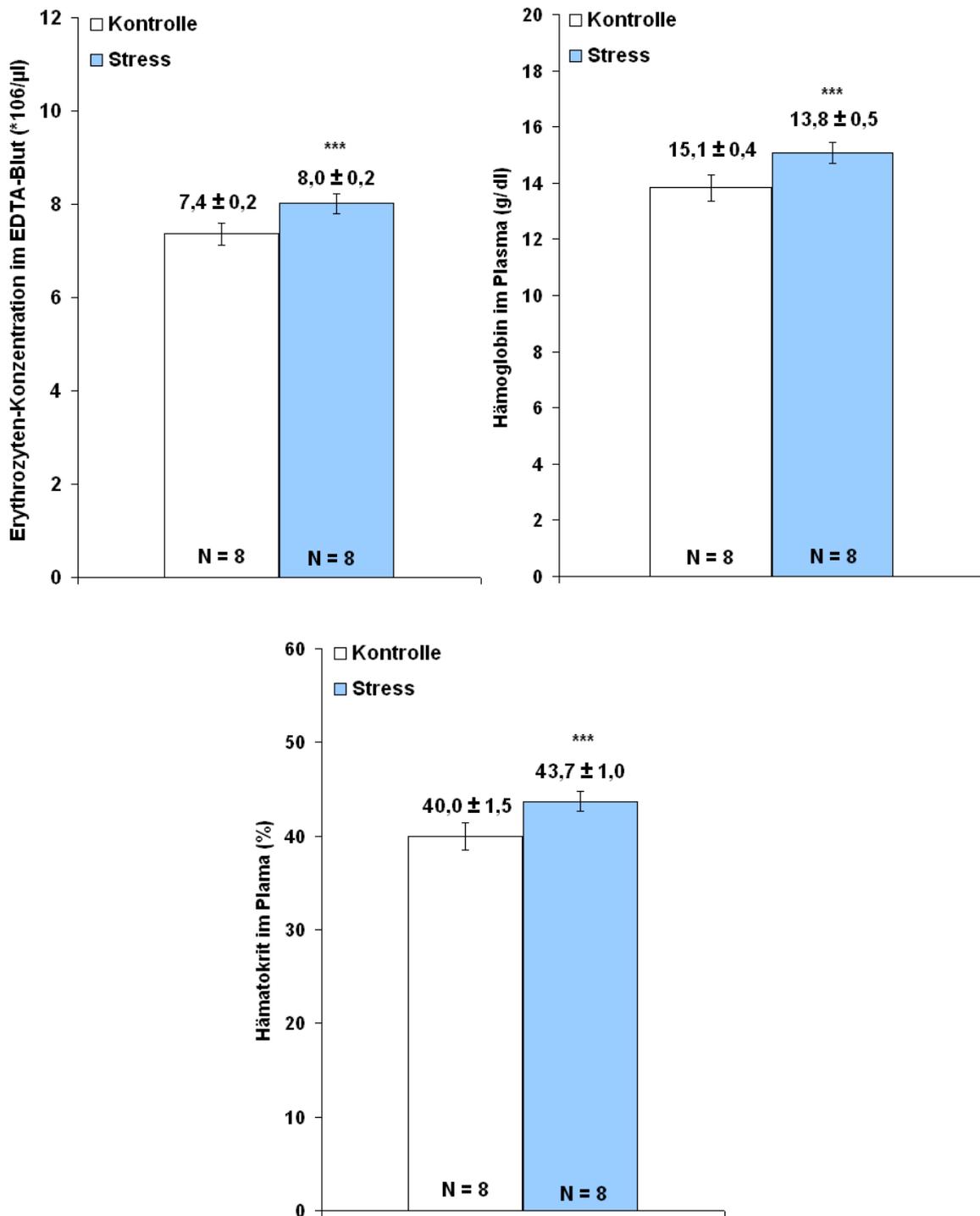


**Abb. 21:** Darstellung des Glucose-Spiegels (mg/dl) sowie des Corticosteron-Gehalts (ng/ml) im EDTA-Plasma nach Immobilisationsstress oder Handling. Darstellung als MW ± SD; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-Test, ungepaart).

#### 4.2.3.5. Einfluss auf das rote Blutbild

Abbildung 22 zeigt den Erythrozyten-Gehalt ( $\cdot 10^6/\mu\text{l}$ ; links), den Hämoglobingehalt (g/dl; rechts) sowie den Hämatokrit-Gehalt (%; unten) im EDTA-Vollblut nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress oder Handling.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren wiesen bei den gestressten Tieren alle 3 Parameter eine höchst signifikante Erhöhung ( $p \leq 0,001$ ) auf.



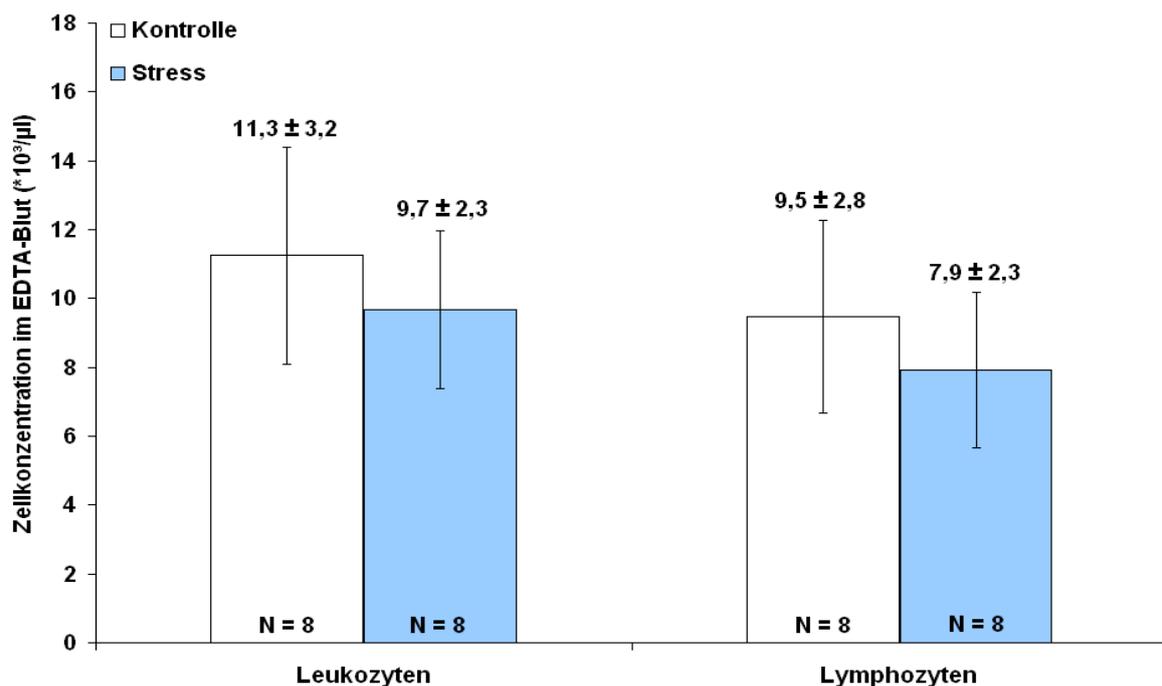
**Abb. 22:** Darstellung des Erythrozyten-Gehalts (\*10<sup>6</sup>/μl), des Hämoglobingehalts (g/dl) sowie des Hämatokrit-Gehalts (%) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress oder Handling. Darstellung als MW ± SD; \*\*\* p < 0,01 (t-Test, ungepaart).

#### 4.2.3.6. Einfluss auf das weiße Blutbild

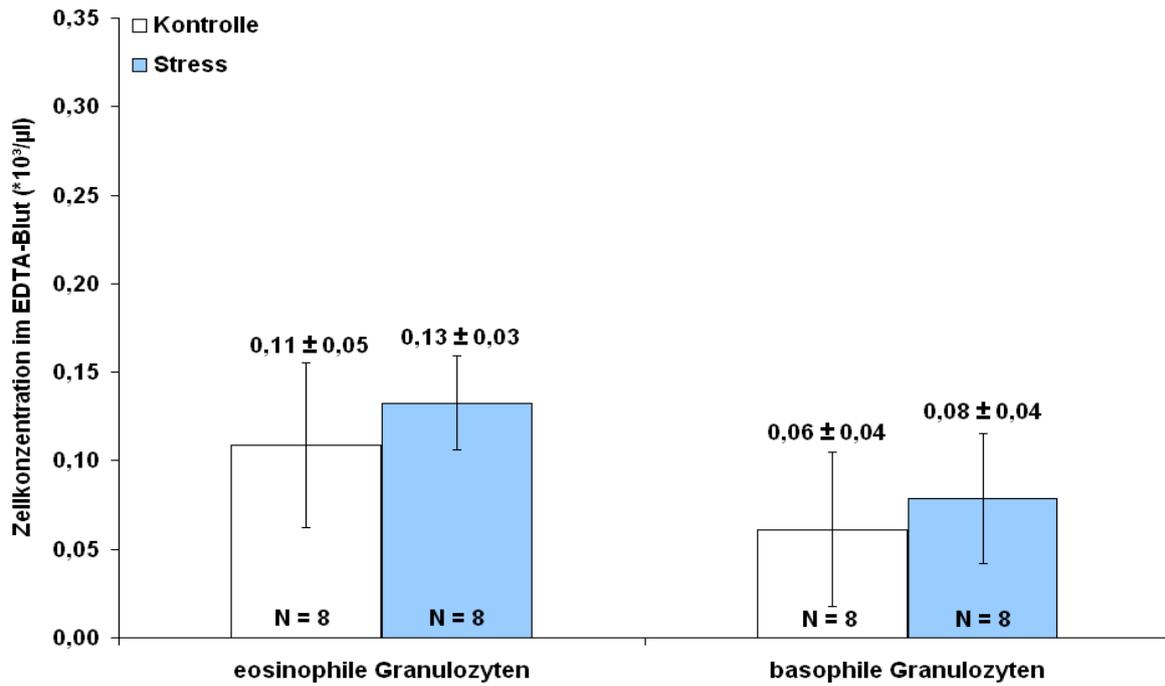
In der nachfolgenden Abbildung 23 werden Leukozyten- (linkes Diagramm) und Lymphozyten-Gehalt (rechtes Diagramm;  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress oder Handling dargestellt. Bei beiden Diagrammen ist eine tendenzielle Abnahme der Zellanzahl bei den gestressten Tieren erkennbar, jedoch wiesen diese Abnahmen keine statistische Signifikanz auf ( $p = 0,27$  bzw.  $p = 0,24$ ).

Abbildung 24 zeigt den Gehalt an eosinophilen- (links) und basophilen Granulozyten (rechts;  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut bei Stress- bzw. Kontrolltieren. Bei Betrachtung dieses Diagramms zeigten sich jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen, auch wenn eine tendenzielle Zunahme dieser Zellpopulationen bei den Stresstieren angedeutet wird ( $p = 0,23$  bzw.  $p = 0,40$ ).

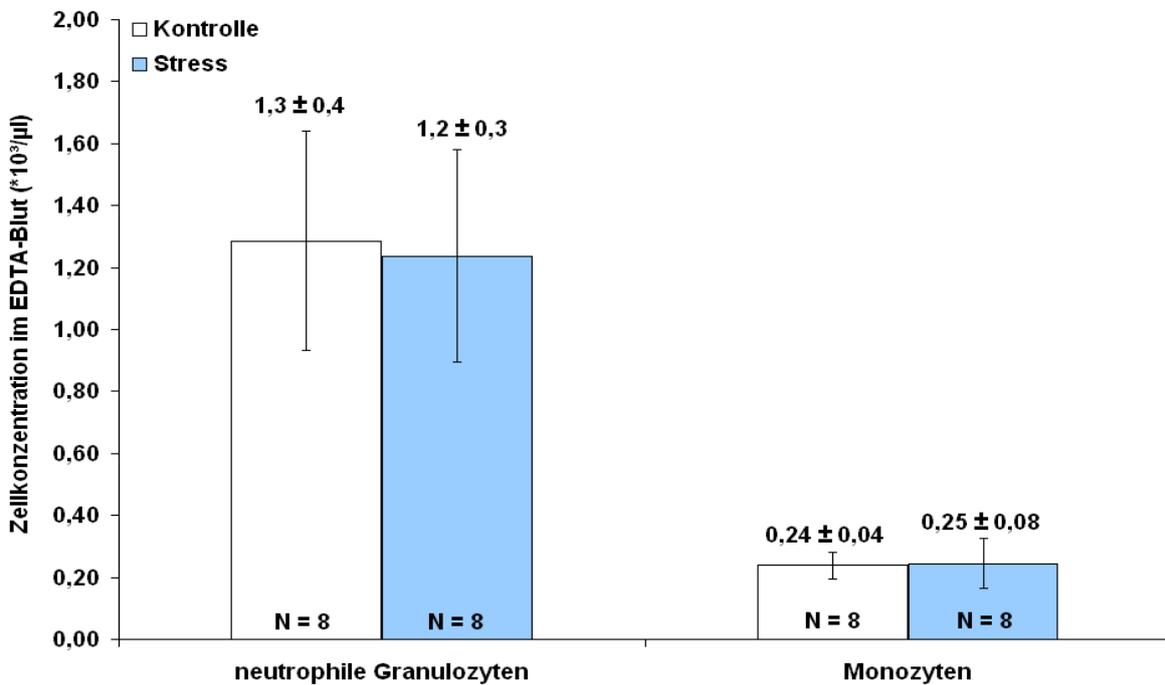
In der unteren Abbildung 25 werden die neutrophilen Granulozyten- (links) und Monozyten-Gehalte (rechts;  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress bzw. Handling dargestellt. Auch bei diesen Zellpopulationen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontroll- und Stresstieren ( $p = 0,78$  bzw.  $p = 0,85$ ).



**Abb. 23:** Leukozyten- und Lymphozyten-Gehalt ( $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress oder Handling. Darstellung als MW  $\pm$  SD.



**Abb. 24:** Gehalt an eosinophilen- und basophilen Granulozyten ( $*10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress oder Handling. Darstellung als MW  $\pm$  SD.



**Abb. 25:** Gehalt an neutrophilen Granulozyten und Monozyten ( $*10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress oder Handling. Darstellung als MW  $\pm$  SD.

## 4.2.4. Diskussion

Im ersten Versuchsteil konnte gezeigt werden, dass eine 14-malige tägliche Immobilisation eine mechanische Hyperalgesie auslöst. Mit diesen Untersuchungen sollte nachgewiesen werden, dass die Tiere in diesem Zeitraum Anzeichen einer Stressreaktion zeigen und gleichzeitig weitere Stress-induzierte Veränderungen aufweisen.

Zur Charakterisierung der Stressreaktion wurden mit den Messungen des Corticosteron-Spiegels und der Nebennierengewichte speziell Teile der HPA-Achse untersucht. Es konnte eine höchst signifikante Erhöhung des Corticosteron-Spiegels sowie eine höchst signifikante Zunahme der Nebennierengewichte im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden.

Erhöhungen des Corticosteron-Plasmaspiegels konnten auch von einigen anderen Autoren festgestellt werden, die Ratten einem 14-maligen Immobilisationsstress ausgesetzt hatten (Magariños et al., 1998; Torres et al., 2004; Gameiro et al., 2006). Dagegen fand sich bei anderen Untersuchungen auch eine Abnahme des Corticosteron-Spiegels nach wiederholtem Immobilisationsstress (Rabasa et al., 2011b; Masini et al., 2012). Diese Abnahmen beruhen vermutlich auf einer Anpassung der Tiere an die Stressoren (Dallman, 2007; Grissom & Bhatnagar, 2009), was zu einer verminderten Reaktivität der HPA-Achse und einer verminderten Ausschüttung von Corticosteron führt (Kventnansky et al., 2009). Unterschiede hinsichtlich dieser Anpassungsfähigkeit ergeben sich besonders aufgrund der verschiedenen Stress-Intensitäten. Für Stressoren mit hoher Intensität gilt, dass sie die Anpassungsfähigkeit der HPA-Achse vermindern können (Ottenweller, 2000; Rabasa et al., 2011a).

Zusätzlich hängt die Adaptation an Stress auch vom Tierstamm, der Stressmethodik sowie von vorangegangenen Stresserfahrungen ab (Ottenweller, 2000; Fries et al., 2005; Sutherland et al., 2010; Jaggi et al., 2011). So erhöhte sich der Corticosteron-Spiegel bei Wistar-Ratten beim Vergleich von zweimaligem und 10-maligem Immobilisationsstress, während die Corticosteron-Konzentration im Plasma bei Brown-Norway-Ratten nach 10-maligem Immobilisationsstress deutlich verringert war (Sutherland et al., 2010).

Die relativen und absoluten Zunahmen der Nebennierengewichte nach 14-maligem Immobilisationsstress wurden ebenso bereits von anderen Autoren festgestellt (Marti et al., 1994; Magariños et al., 1998). Diese Zunahme der Nebennierengewichte kann im Zusammenhang mit den erhöhten Corticosteron-Werten stehen, da die endokrinen Zellen der Zona fasciculata innerhalb der Nebennierenrinde für die Synthese und Ausschüttung von Corticosteron verantwortlich sind. Zusätzlich können Corticosteron ebenso wie ACTH über Beeinflussung des Nebennierenmarks zu den Gewichtszunahmen der Nebennieren beitragen (Ulrich-Lai et al., 2006).

Wie bereits in der Einleitung und im Abschnitt 2.1.3.4. beschrieben, werden auch die Stresshormone Adrenalin und Noradrenalin in den Nebennieren synthetisiert. Eine solche Stress-induzierte Catecholamin-Ausschüttung könnte ebenso für die Vergrößerung der Nebennierengewichte verantwortlich sein (McCarty et al., 1988). Dazu kann mit den eigenen Untersuchungen bisher keine Aussage getroffen werden, da die Bestimmungen von Adrenalin und Noradrenalin im Plasma aufgrund der Blutgewinnungsmethodik nur bedingt

aussagekräftig wären (Kvetnansky et al., 2009) und nicht durchgeführt wurden. Um diesen Sachverhalt zu klären, wären die Bestimmung des ACTH-Spiegels im Plasma und die histologische Untersuchung der Nebennieren notwendig gewesen.

Anhand der Ergebnisse aus den Corticosteron- und Nebennierengewichtsbestimmungen können weitere Rückschlüsse auf die negativen Rückkopplungsmechanismen gewonnen werden, die ebenso im Rahmen einer Stresswirkung beeinträchtigt sein können. Wie bereits in Abschnitt 2.1.4. erläutert, führen hohe Corticosteron-Spiegel über den Glucocorticoid-Rezeptor zur Hemmung der CRH- und POMC-Synthese, was nachfolgend wiederum die Corticosteron-Ausschüttung hemmt. Da in diesen Versuchen nach 15 Tagen dennoch ein erhöhter Corticosteron-Plasmaspiegel sowie eine Zunahme der Nebennierengewichte festgestellt wurden, deutet dies auf eine Hemmung der negativen Feedback-Mechanismen hin.

Für diese negativen Rückkopplungssysteme stellt der Hippocampus eine wichtige zentrale Struktur dar. In diesem Zusammenhang konnten Magariños & McEwen (1995) morphologisch zeigen, dass 14-maliger Immobilisationsstress gleichzeitig zu einer Erhöhung des Plasma-Corticosterons und zu einer dendritischen Atrophie von bestimmten Hippocampus-Neuronen führt. Diese Atrophie konnte ebenso durch eine direkte 14-tägige Corticosteron-Zufuhr über das Trinkwasser induziert werden (Magariños et al., 1998) und wird von den Autoren im Zusammenhang mit der verminderten negativen Feedback-Hemmung bei 14-maligem Immobilisationsstress genannt (Magariños & McEwen, 1995; Magariños et al., 1998), die ebenso hier in den eigenen Versuchen vermutet wird.

Neben den Ergebnissen zur Stressreaktion konnten allerdings auch Stresswirkungen wie die Inhibition von vegetativen Funktionen festgestellt werden. Sehr deutlich zeigt sich dies durch die Wachstumshemmung anhand der verminderten Körpergewichtszunahmen.

Geringere Körpergewichtszunahmen wurden bei Ratten aufgrund einer wiederholten Immobilisation bereits durch verschiedene Autoren beschrieben (Marti et al., 1994; Magariños & McEwen, 1995; Magariños et al., 1998; Marin et al., 2007; Scherer et al., 2011). Diese Verminderung des Wachstums kann auf den erhöhten Corticosteron-Spiegel zurückgeführt werden, da Magariños et al. (1998) zeigen konnten, dass Corticosteron im Trinkwasser ausreichend war, um das Wachstum der Tiere zu reduzieren. Bestätigend konnten Scherer et al. (2011) zeigen, dass wiederholter Immobilisationsstress zu einem erhöhten Corticosteron-Plasmaspiegel führt und dieser explizit für die ebenfalls festgestellten verminderten Körpergewichtszunahmen verantwortlich ist, da keine weiteren Erhöhungen von HPA-Achsen-Hormonen wie CRH nachgewiesen wurden.

Wegen diesen verminderten Gewichtszunahmen konnte nach wiederholtem Immobilisationsstress eine relative Zunahme der verbrauchten Trinkwassermenge festgestellt werden, während die Zunahme der Futtermenge keine Signifikanz zeigte. Diese Zunahmen können ebenso durch das vermehrte Corticosteron im Plasma bedingt sein, da Glucocorticoide einen stimulierenden Effekt auf die Nahrungsaufnahme besitzen (Santana et al., 1995; la Fleur et al., 2004; Warne et al., 2009).

Auch die Messung des Glucose-Spiegels in den eigenen Versuchen zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Immobilisationsstress- und Kontrolltieren. Torres et al.

(2004) konnten 24 h nach der letzten Immobilisation (täglich eine Stunde, für 50 Tage) ebenso keine veränderten Glucose-Spiegel im Plasma feststellen. Erfolgt die Glucose-Messung jedoch schon 1 h direkt nach der letzten Immobilisation, konnte eine Erhöhung nachgewiesen werden (Torres et al., 2004). Da die Messung der Plasma-Glucose in den eigenen Versuchen ebenfalls 24 Stunden nach der letzten Immobilisation stattgefunden hat, kann somit keine Aussage getroffen werden, ob diese Tiere nach einer Stunde eventuell ebenso eine Stress-bedingte Hyperglycämie aufgewiesen hätten.

Dennoch sind diese Ergebnisse nicht eingängig mit den bekannten Glucose-Spiegel erhöhenden Wirkungen von Glucocorticoiden (Warne et al., 2009), da diese die Gluconeogenese stimulieren, indem deren Schlüsselenzyme wie die Pyruvatcarboxylase vermehrt induziert werden (Yoon et al., 2001). Gleichzeitig hemmen Glucocorticoide die Translokation des Insulin-sensitiven Glucose-Transporters 4 in die Zellmembran, was zur Verminderung der Glucose-Aufnahme in die Zelle führt (Dimitriadis et al., 1997). Weiterhin konnte eine inhibitorische Wirkung von Corticosteroiden auf die Insulinfreisetzung nachgewiesen werden, was somit indirekt zur Erhöhung des Glucose-Plasmaspiegels führt (Lambillotte et al., 1997). Diese Mechanismen spielen ebenso bei der Entstehung einer Insulin-Resistenz bei Cushing-Syndrom-Patienten eine wichtige Rolle, da aufgrund der dauerhaft hohen Glucocorticoid-Spiegel die Glucose-Konzentration im Blut erhöht ist, was sekundär zu einer vermehrten Insulin-Sekretion und langfristig zu einer Abschwächung der Insulin-Wirkung führen kann (Sapolsky et al., 2000).

Da keine Insulin-Bestimmung in den eigenen Versuchen durchgeführt wurde und eine 24-stündliche Pause zwischen dem letzten Stress und der Glucose-Messung lag, ist die Aussagekraft dieser alleinigen Glucose-Messung im Hinblick auf das Vorhandensein einer Stresswirkung als gering einzuschätzen.

Die Untersuchungen zum weißen Blutbild zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen an Tag 15 zwischen den immobilisierten Tieren und ihren Kontrollen. Tendenziell wurden zwar Verminderungen der Leukozyten- und Lymphozyten-Konzentrationen im Blut festgestellt, allerdings waren diese für eine statistische Signifikanz nicht ausreichend.

Zumindest ist über den Einfluss von mehrwöchigem täglichen Immobilisationsstress in Verbindung mit Rotationsstress bekannt, dass diese Kombination durch Aktivierung der HPA-Achse und Corticosteron-Ausschüttung die Lymphozyten-, Monozyten und Leukozyten-Konzentration im Blut vermindert (Dhabhar et al., 1996; Dhabhar & McEwen, 1997; Dhabhar, 2009). Über die Glucocorticoid- und  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren wird dabei die Apoptose dieser Zellpopulationen induziert (Meagher et al., 1996; Wang et al., 2002a).

Möglicherweise war somit die Dauer des Immobilisationsstresses in den eigenen Versuchen zu gering, um signifikante Stress-induzierte Veränderungen an den Leukozyten-Populationen hervorzurufen. Zusätzlich scheint auch hier die unterschiedliche Stressmethodik eine Rolle zu spielen, was Bowers et al. (2008) zumindest bei Mäusen bestätigen konnten.

Bei Betrachtung der Untersuchungsergebnisse des roten Blutbildes konnten nach 14-maligem Immobilisationsstress höchst signifikante Erhöhungen der Erythrozyten-Konzentration, des Hämoglobin-Gehalts und des Hämatokrits festgestellt werden. Diese

Wirkung von andauerndem Stress ist bereits in der Literatur als „Stress-Erythropoese“ bekannt (Socolovsky, 2007). Chronischer Stress soll dabei zur Erhöhung von Erythropoetin führen, was zur vermehrten Aktivierung der Erythropoetin-Rezeptoren führt. Über diese werden der für die Apoptose wichtige Todes-Rezeptor Fas und sein Ligand FasL herunter reguliert, was zur verstärkten Proliferation der erythroiden Zellen führen kann (Socolovsky, 2007).

In Zusammenhang mit der verstärkten Erythropoese können aber auch die erhöhten Corticosteron-Konzentrationen im Plasma stehen. Golde et al. (1976) zeigten bereits *in vitro*, dass Glucocorticoide die Erythropoese stimulieren können. Diese Wirkung beruht auf der verstärkten Aktivierung von Glucocorticoid-Rezeptoren, durch die die erythroiden Progenitorzellen vermehrt zur Proliferation angeregt werden, während ihre Ausdifferenzierung gehemmt wird (Wessely et al., 1997; Bauer et al., 1999).

Zusammenfassend konnte mit diesen Untersuchungen gezeigt werden, dass 14-maliger täglicher Immobilisationsstress zu einer Erhöhung der Corticosteron-Konzentration im Blut und zu einer Zunahme der Nebennierengewichte führt. Dies lässt nicht nur auf eine Aktivierung der HPA-Achse im Rahmen der Stressreaktion schließen, sondern deutet auch auf die Hemmung der negativen Feedbackmechanismen hin.

Weiterhin konnte bestätigt werden, dass 14-maliger Immobilisationsstress eine hemmende Wirkung auf vegetative Funktionen besitzt sowie Veränderungen am Differenzialblutbild bewirkt. Dem erhöhten Corticosteron-Spiegel kommt dabei eine besondere Bedeutung zu, da wie bereits im Einzelnen beschrieben die Glucocorticoide über die Glucocorticoid-Rezeptoren bei den festgestellten Veränderungen eine wichtige Rolle spielen. Ob dabei allerdings noch andere Strukturen des Stresssystems wie der Sympathikus mitwirken, kann anhand dieser Versuchsergebnisse nicht ausgeschlossen werden. Somit sind weitere Untersuchungen notwendig, um die vermutete Schlüsselrolle von Corticosteron bei 14-maligem Immobilisationsstress abzuklären.

## **4.3. Vergleichende Untersuchungen von Immobilisationsstress und oraler Corticosteron-Aufnahme**

### **4.3.1. Einleitung**

Im vorangegangenen Versuchsabschnitt wird beschrieben, dass der 14-malige Immobilisationsstress den Corticosteron-Spiegel erhöht und das vermehrte Corticosteron somit eine wichtige Rolle bei Vermittlung der Immobilisationsstress-Wirkung (Veränderung vegetativer Funktionen, Veränderungen am Differentialblutbild) darstellen kann (Abschnitt 4.2.). Auch im Hinblick auf die festgestellte mechanische Hyperalgesie (Abschnitt 4.1.) gibt es Hinweise, dass Corticosteron die Schmerzwahrnehmung sowohl abschwächen als auch verstärken kann (McEwen & Kalia, 2010).

Allerdings galten Glucocorticoide bisher primär als Mediator der (akuten) Stress-induzierten Analgesie bei Tieren, denen die Nebennieren entfernt wurden und die gleichzeitig Corticosteron verabreicht bekommen haben (MacLennan et al., 1982). Yarushkina (2008) postulierte in diesem Zusammenhang, dass mit steigendem Corticosteron-Spiegel stärkere analgetische Effekte auftreten, da Ratten mit hohen Corticosteron-Konzentrationen im Plasma eine Analgesie aufgewiesen haben. Wurde bei diesen Tieren die Corticosteron-Synthese gehemmt, so trat ebenso eine Abschwächung der Analgesie auf (Yarushkina, 2008).

Im Kontext dazu zeigten Zhang et al. (2004), dass Ratten nach Entfernung der Nebennieren in einem chemischen Schmerz-Modell (mit Freund's-Adjuvans) eine Hyperalgesie aufwiesen, die durch die Zufuhr von Corticosteron aufgehoben wurde (Zhang et al., 2004). Dieser Effekt von Corticosteroiden wurde auch anhand eines neuropathischen Schmerzmodells bestätigt, bei dem die durch Nervenligatur ausgelöste Hyperalgesie mit einem Glucocorticoid attenuiert werden konnte (Kingery et al., 2001).

Im Gegensatz dazu konnte in neueren Versuchen die Beteiligung von Corticosteron bei der zu Beginn erwähnten Stress-induzierten Analgesie mit anderen Stress-Modellen allerdings nicht bestätigt werden. In diesen Fällen konnte trotz Entfernung der Nebennieren entweder kein Einfluss auf die Schmerzwahrnehmung festgestellt werden (Mendes-Gomes et al., 2011) oder es trat sogar eine verstärkte Nozizeption auf (Yokoro et al., 2003).

Daneben konnten Myers & Greenwood-Van Meerveld (2007; 2010b) zeigen, dass eine einzelne Gabe von Corticosteron innerhalb der Amygdala die viszerale Schmerzsensitivität erhöhen kann. Diese Hyperalgesie konnte wiederum pharmakologisch durch einen Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonisten abgeschwächt werden (Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2010a), was die Bedeutung von Corticosteron bei dieser viszeralen Hyperalgesie verdeutlicht.

In Anlehnung an die viszerale Hyperalgesie wurde gezeigt, dass ein „Water-Avoidance-Stress“ bei 10-maliger Anwendung zur Erhöhung von Corticosteron im Plasma führte und diese vermehrten Glucocorticoide im Bereich der Spinalganglien die Expression von

Schmerz-dämpfenden Cannabinoid-1-Rezeptoren vermindern. Gleichzeitig wurde die Expression von Schmerz-wahrnehmenden TRPV1-Rezeptoren erhöht, was zur Ausbildung der viszeralen Hyperalgesie beitrug (Hong et al., 2011).

Diese Daten, die eine modulierende Wirkung von Corticosteron auf Nozizeption beschreiben, sowie die diskutierte bisherige Rolle von Corticosteron bei der Vermittlung der Immobilisationsstress-Wirkung in den eigenen Versuchen deuten darauf hin, dass Corticosteron möglicherweise auch eine wichtige Rolle bei der festgestellten Immobilisationsstress-induzierten Hyperalgesie (Abschnitt 4.1.) spielt.

Um dies zu überprüfen, soll nun in den eigenen Untersuchungen durch exogene Zufuhr von Corticosteron eine Stress-assoziierte Hypercorticosteronämie imitiert und gleichzeitig mit dem 14-maligem täglichen Immobilisationsstress verglichen werden. Die Untersuchungen im Rahmen dieses Vergleiches umfassen die Bestimmungen der mechanischen Schmerzwahrnehmung, des Tiergewichtsverlaufs, des Gesamtverbrauchs von Futter- und Trinkwasser, des Differenzialblutbildes, der Plasmaspiegel von Corticosteron und Glucose sowie des Nebennierengewichts (Abschnitte 4.1.2. und 4.2.2.).

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse sind dazu ergänzend die Bestimmungen der ACTH- und Insulin-Spiegel im Plasma sowie die histologische Untersuchung der Nebennieren angedacht. Die Bestimmung des Insulins erscheint notwendig, da die alleinige Glucose-Messung nicht eingängig mit den bekannten Glucose-Spiegel erhöhenden Wirkungen von Glucocorticoiden war und die Blut-Glucose weiterhin einer komplexen Regulation durch Insulin, Glucocorticoide und Catecholamine unterliegt (Warne et al., 2009).

Anhand der Ergebnisse aus den bisherigen Corticosteron- und Nebennierengewichtsbestimmungen in den eigenen Untersuchungen wurde vermutet, dass die negativen Feedback-Mechanismen durch den wiederholten Immobilisationsstress beeinträchtigt sind. Über eine zusätzliche Bestimmung von ACTH im Plasma (für die Freisetzung von Corticosteron verantwortlich) und eine histologische Untersuchung der Nebennieren (Syntheseort des Corticosterons) können zusätzliche Rückschlüsse über die Funktionalität der HPA-Achsen-Rückkopplungssysteme erzielt werden.

Mit dieser Histologie kann dann ebenso abgeklärt werden, welche morphologischen Ursachen hinter den vergrößerten Nebennieren stecken, da dafür einerseits die Zona fasciculata der Nebennierenrinde (Syntheseort des Corticosterons) und/oder das Nebennierenmark (Syntheseort der Catecholamine) verantwortlich sein können (McCarty et al., 1988).

## **4.3.2. Material und Methoden**

### **4.3.2.1. Versuchsbedingungen**

Es wurde erneut dieselbe Versuchstierart (Wistar-Ratten, männlich, 8–10 Wochen alt, 180 g – 220 g schwer), Stressform (Immobilisationsstress mittels Plexiglas-Röhren, eine Stunde

täglich für 14 aufeinanderfolgende Tage) und nozizeptive Messmethode (Randall-Selitto-Test, Messungen vor und nach Immobilisationsstress) wie in Abschnitt 4.1.2. verwendet.

Verändert wurde gegenüber dem vorherigen Versuch allerdings die Tierzahl pro Käfig und pro Gruppe. Die Verwendung von 3 statt bisher 2 Tieren pro Käfig beruhte auf den Untersuchungen von Ferland und Schrader (2011), die einen akuten Stress bei Tieren festgestellt haben, die alleine waren, während ihre Käfigpartner kurzzeitig aus dem Käfig entfernt wurden („Separationsstress“).

Weiterhin erfolgte aufgrund der hohen hyperalgetischen Effektstärke und aus tierschutzrechtlichen Gründen die Reduzierung der Gruppengröße auf N = 6 Tiere.

#### **4.3.2.2. Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser**

Um für die Tiere einen Injektionsstress bzw. -schmerz zu vermeiden, erschien die orale Gabe von Corticosteron über das Trinkwasser als die beste Form, da Corticosteron aufgrund seiner Lipophilie und hohen Bioverfügbarkeit oral verabreicht werden kann. Nach intensiven Literaturrecherchen und Vorversuchen bezüglich der Löslichkeit, wurden 3 Dosierungen (400, 150 und 50 µg/ml) für Corticosteron sowie Ethanol als Lösungsmittel ausgesucht, was bei Ratten eine gute Akzeptanz besitzt (Magariños & McEwen, 1995a; Magariños et al., 1998). Kristallines Corticosteron (Corticosterone C2505, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) wurde zuerst in Ethanol (Ethanol 99,8 % absolut, VWR International GmbH, Darmstadt) gelöst (12,5 µg; 37,5 µg bzw. 100 µg Corticosteron je 2,5 ml Ethanol) und anschließend auf eine finale Konzentration von 2,5 % Ethanol im Trinkwasser verdünnt. Alle 3 Tage wurde eine Lösung frisch hergestellt (Gourley & Taylor, 2009) und den Tieren für einen Gesamtzeitraum von 14 Tagen zur Verfügung gestellt, beginnend ab der basalen Nozizeptionsmessung.

#### **4.3.2.3. Klinisch-chemische und hämatologische Untersuchungen**

Die Blutgewinnung erfolgte in Analogie zum vorangegangenen Versuch (Abschnitt 4.2.2.), allerdings mit zusätzlichen Portionierungen des gewonnenen EDTA-Plasmas für die ACTH- und Insulin-Bestimmungen. Der Glucose-Spiegel wurde dagegen bereits während der Blutgewinnung aus dem Vollblut mittels Blutzuckermessgerät (CONTOUR USB, Bayer Healthcare) bestimmt. Zur Messung des Corticosteron-Gehalts im EDTA-Plasma kam erneut der Radioimmunoassay (Corticosterone RIA-KIT, MP Biomedicals) gemäß der Vorschrift des Herstellers zum Einsatz. Für die Insulinbestimmung aus den Plasmaproben wurde ein Enzym-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA; Rat Insulin ELISA, Mercodia) verwendet. Als Durchführungsvorschrift diente ebenso die beiliegende Beschreibung des Herstellers. Die Messung des adrenotropen Hormons erfolgte dagegen mit einem Chemi-Lumineszenz-Immuno-Assay (CLIA) durch die IDEXX Laboratories (Vet Med Labor GmbH, Ludwigsburg).

#### **4.3.2.4. Nebennierengewinnung und -konservierung**

Die Präparation der Nebennieren erfolgte ebenso wie bereits in Abschnitt 4.2.2.3. beschrieben. Nach Entnahme wurden die Organe sofort in vorgewogene EppendorfgeläÙe mit 4%iger gepufferter Formalin-Lösung verbracht. Die Lösung (pH-Wert 7) wurde im Vorfeld durch Verdünnung von Formaldehyd (Formaldehydlösung reinst, mind. 35 %, Merck, Darmstadt) mit einem Natrium-Hydrogenphosphat-Puffer ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  wasserfrei, bzw.  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , jeweils Merck, Darmstadt) hergestellt. Nach der Gewichtsbestimmung über eine Waage (sartorius BP 2215, sartorius mechatronics AG, Göttingen) verblieben die Nebennieren bis zur histologischen Untersuchung in diesen GefäÙen.

#### **4.3.2.5. Histologische Untersuchung der Nebennieren**

Zuerst erfolgte die Entwässerung der einzelnen Organe in EppendorfgeläÙen beginnend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 bis 99,8 %, mehrmalig jeweils für 1 h), danach mit Aceton (100 %, zweimal für jeweils 1 h) bzw. Xylol (100 %, für 1 h). Daraufhin wurden die Organe mit Hilfe eines EinbettgeräÙs (Tissue Tek II Embedding Center system 4603, Miles Inc, Elkhart, USA) in flüssiges Paraffin eingebettet. Nach Aushärtung (2 h) erfolgte über ein Schlittenmikrotom (Hn40, Jung AG, Heidelberg) die Anfertigung von Querschnitten (GröÙe 7  $\mu\text{m}$ ). Dabei wurden in Abhängigkeit von OrgangröÙe, -gewicht und -form mehrere Schnittebenen hergestellt. Die optimalen Ebenen befanden sich ca. auf 50%iger Organhöhe. Diese Paraffinschnitte gelangten daraufhin für 30 Minuten in ein Streckbad (45–50 °C), ehe sie auf Objektträgern (Superfrost Color, Vogel GmbH & Co. KG, Gießen) fixiert wurden. Nach dem Trocknen erfolgte die Entparaffinierung über Xylol (100 %, zweimal für 10 min), Isopropanol (100 %, zweimal für 10 min) und eine absteigende Alkoholreihe (99,8 bis 50 %, jeweils für 5 min). Daraufhin schloss sich die Hämatoxylin-Eosin Übersichtsgefärbung mittels Färbekit (Hämatoxylin & Eosin (HE), Morphisto Evolutions-forschung und Anwendung GmbH, Frankfurt) gemäß der mitgeführten Gebrauchsanleitung des Herstellers an. Für das Eindecken wurden das Einbettmedium Entellan® Neu Schnelleindeckmittel (Merck, Darmstadt) sowie Standard-Deckgläser (Menzel Gläser, Braunschweig) verwendet. Zur Betrachtung der fertigen Objektträger kam ein Invert-Lichtmikroskop (Wilovert A, Helmut Hund GmbH, Wetzlar) zum Einsatz. Mit Hilfe einer digitalen Kamera (Spot Insight Color, Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA) erfolgte die Bildübermittlung zu einer entsprechenden Software (Spot Advanced 4.7., Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA), über die die histologischen Bilder im verlustfreien TIF-Datei-Format erstellt wurden. Die Aufnahme der Übersichtsbilder geschah in 40-facher, die der Detailbilder in 100-facher Vergrößerung. Mittels Grafiksoftware (Adobe Photoshop Elements 6.0, Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) wurden Aufnahmeartefakte entfernt sowie die Beschriftungen hinzugefügt.

#### 4.3.2.6. Versuchsablauf

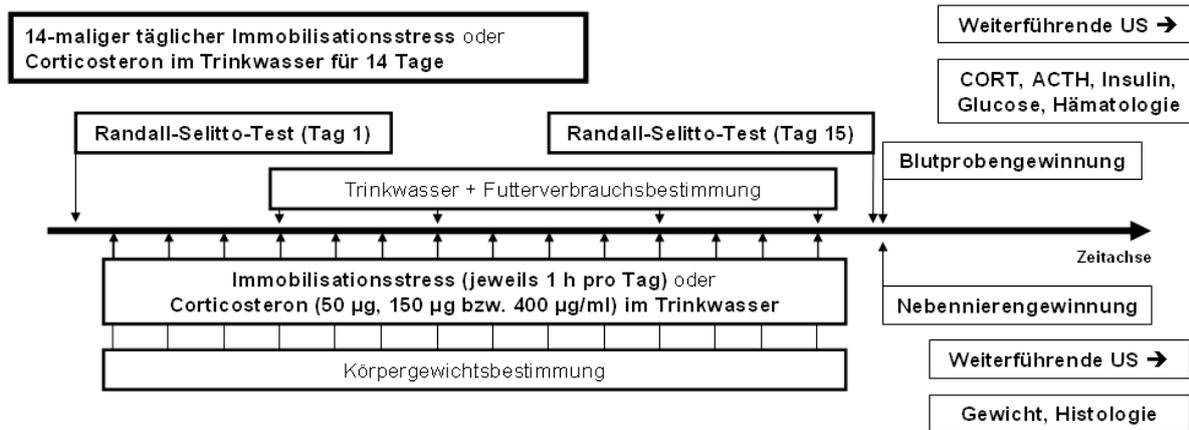
Insgesamt wurden 38 Tiere verwendet. Die Immobilisationsstress-Gruppe bestand aus 8 Tieren, ansonsten betrug die Tieranzahl bei allen anderen Gruppen N = 6. Als Kontrollgruppe diente die Trinkwasser-Gruppe, die keinen Stress, kein Corticosteron und kein Lösungsmittel (Ethanol) für Corticosteron erhielt. Um die Eigenwirkung von Ethanol zu untersuchen, wurde eine weitere Lösungsmittel-Kontrollgruppe verwendet. Das Ethanol diente dabei zum Lösen des lipophilen Corticosterons, das 3 Gruppen in jeweils verschiedenen Konzentrationen (50 µg/ml, 150 µg/ml, 400 µg/ml) im Trinkwasser ad libitum vorliegen hatten. Als Wirkungskontrolle diente die Immobilisationsstress-Gruppe. Die Tiere dieser Gruppe wurden analog zu den vorherigen Versuchen einmal täglich für 1 Stunde lang gestresst und hatten dabei keine Zusätze im Trinkwasser. In Tabelle 3 werden die 6 Gruppen zusammengefasst dargestellt.

**Tab. 3:** Übersicht der Versuchsgruppen zur Untersuchung der Auswirkungen von täglichem 14-maligen Immobilisationsstress sowie verschiedenen Corticosteron-Dosierungen im Trinkwasser auf die mechanische Nozizeption, das Körpergewicht, das Nebennierengewicht, den Futter- und Trinkwasserverbrauch sowie auf klinisch-chemische und hämatologische Parameter.

Gruppenname	Tieranzahl	Stressor	Trinkwasserzusätze
Wasser-Kontrolle	6	-	-
Ethanol-Kontrolle	6	-	2,5 % Ethanol
Corticosteron 50	6	-	50 µg/ml Corticosteron und 2,5 % Ethanol
Corticosteron 150	6	-	150 µg/ml Corticosteron und 2,5 % Ethanol
Corticosteron 400	6	-	400 µg/ml Corticosteron und 2,5 % Ethanol
Immobilisationsstress	8	Immobilisation	-

Wie auch bei vorherigem Versuchsaufbau erfolgte zu Versuchsbeginn die Messung der basalen Nozizeption im Randall-Selitto-Test, bevor die Tiere dem Immobilisationsstress bzw. Handling an jeweils 14 aufeinanderfolgenden Tagen ausgesetzt wurden oder für 14 Tage ihre Trinkwasserzusätze bekamen. Während dieser gesamten Versuchsdauer wurden die Trinkwasser- und Futtergewichte sowie die Körpergewichte bestimmt. Am Tag 15 erfolgte dann erneut die Überprüfung der Nozizeption mittels Randall-Selitto-Test, ehe durch Dekapitation das Vollblut (für die anschließenden klinisch-chemischen und hämatologischen Untersuchungen) und die Nebennieren (für die Gewichtsbestimmung und histologische Untersuchung) gewonnen wurden. Dieser Versuchsablauf wird anhand der Abbildung 26 verdeutlicht.

## Versuchsablauf



**Abb. 26:** Darstellung des Versuchsablaufs, um die Auswirkungen von täglichem 14-maligen Immobilisationsstress sowie verschiedenen Corticosteron-Dosierungen im Trinkwasser auf die mechanische Nozizeption, das Körpergewicht, das Nebennierengewicht, den Futter- und Trinkwasserverbrauch sowie auf klinisch-chemische und hämatologische Parameter festzustellen. Vor Versuchsbeginn hatten die Tiere eine Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche. Für weitere Einzelheiten, siehe Text.

### 4.3.2.7. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu den vorherigen Versuchsabschnitten. Bei allen Berechnungen wurden entweder die Versuchsergebnisse der Immobilisationsstress-Gruppe mit denen der Wasser-Kontrolle oder die Werte der Corticosteron-Gruppen mit der Lösungsmittel-Kontrolle (Ethanol-Kontrolle) verglichen. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich der beiden Kontrollgruppen untereinander. Dazu wurden jeweils das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung berechnet.

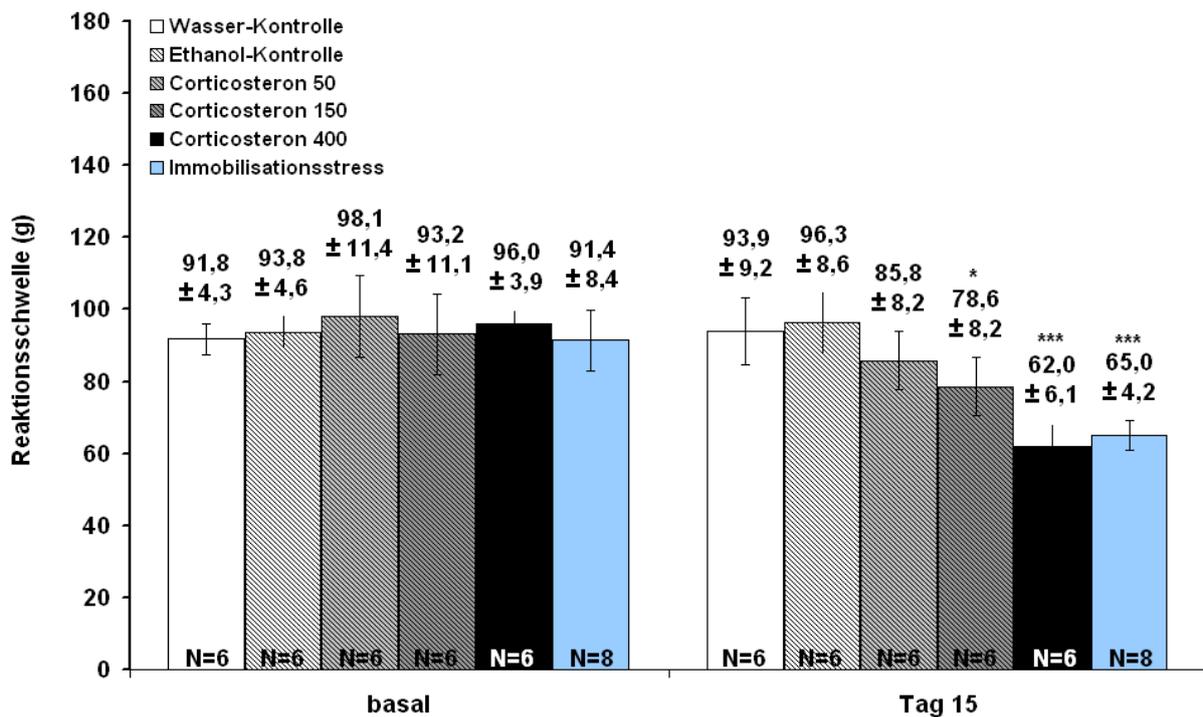
Zur Ermittlung der explorativen Statistikdaten wurde GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) verwendet. Die Prüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung erfolgte mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Zur Prüfung der Varianzhomogenität wurde der F-Test verwendet. Da es sich um unverbundene parametrische Tests handelt, wurden die Gruppen anhand einer 1-Weg „analysis of variance“ (ANOVA) auf eine signifikante Unterscheidung geprüft. Für die anschließenden Analysen wurde der Bonferroni-Test für vorher geplante und selektierte Paarungen verwendet (Motulsky, 2007). Bei einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde das Ergebnis als signifikant, bei  $p < 0,01$  als hoch signifikant und bei  $p < 0,001$  als höchst signifikant gewertet.

### 4.3.3. Ergebnisse

#### 4.3.3.1. Einfluss auf die mechanische Schmerzempfindung

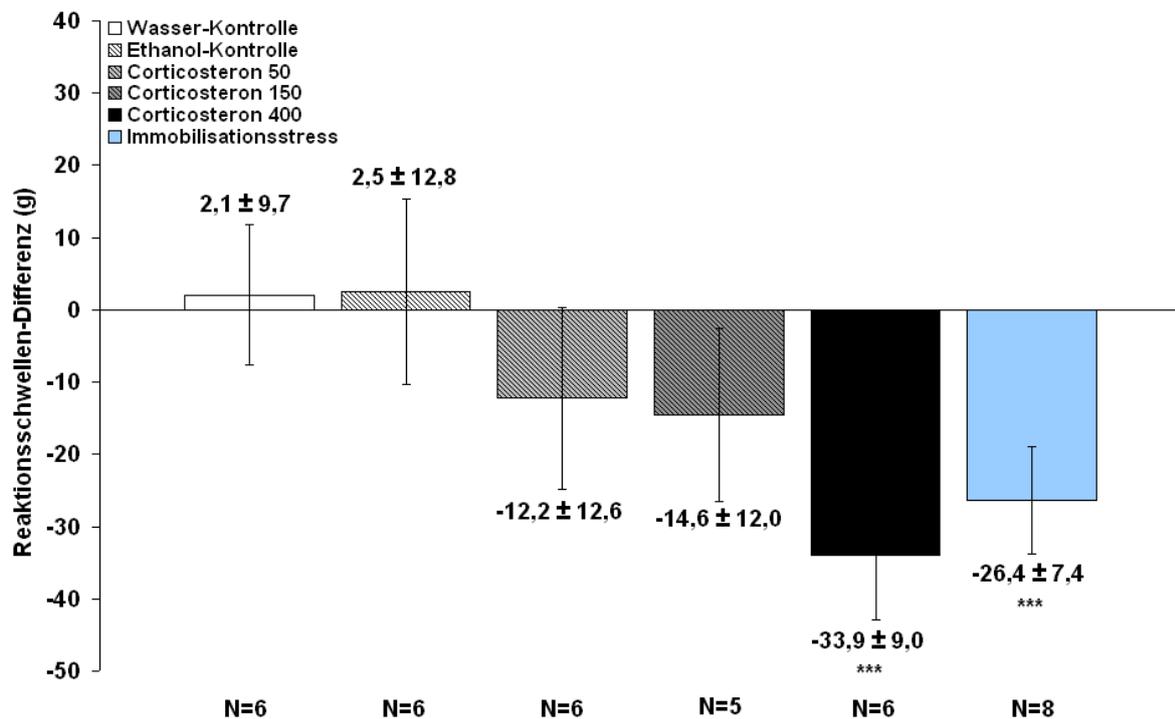
In der Abbildung 27 sind die Ergebnisse der Randall-Selitto-Messungen nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress, 14-tägiger oraler Corticosteron-Aufnahme und den jeweiligen Kontrollen dargestellt.

Anhand dieses Diagramms kann man erkennen, dass die Reaktionsschwelle der gestressten Tiere und der Tiere mit der höchsten Corticosteron-Dosierung (400 µg/ml) im Trinkwasser im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen an Tag 15 höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) verringert war. Diese Verminderung ist mit einer Verringerung der Schmerzschwelle und somit einer mechanischen Hyperalgesie gleichzusetzen. Die beiden niedrigeren Corticosteron-Dosierungen bewirkten ebenso eine Erniedrigung der mechanischen Schmerzschwelle, die allerdings nur tendenziell (50 µg/ml) bzw. signifikant ( $p < 0,05$  bei 150 µg/ml) war. Somit führt Corticosteron im Trinkwasser zu einer dosisabhängigen Verminderung der Schmerzempfindlichkeit. Beim Vergleich der Lösungsmittel-Kontrolle mit der Trinkwasser-Kontrolle wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Reaktionsschwellen festgestellt.



**Abb. 27:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere im Randall-Selitto-Test nach Immobilisationsstress bzw. oraler Corticosteron-Aufnahme sowie von den jeweiligen Kontrollgruppen. Die Gruppenwerte sind jeweils als MW ± SD dargestellt; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Bonferroni-Test, selektiert).

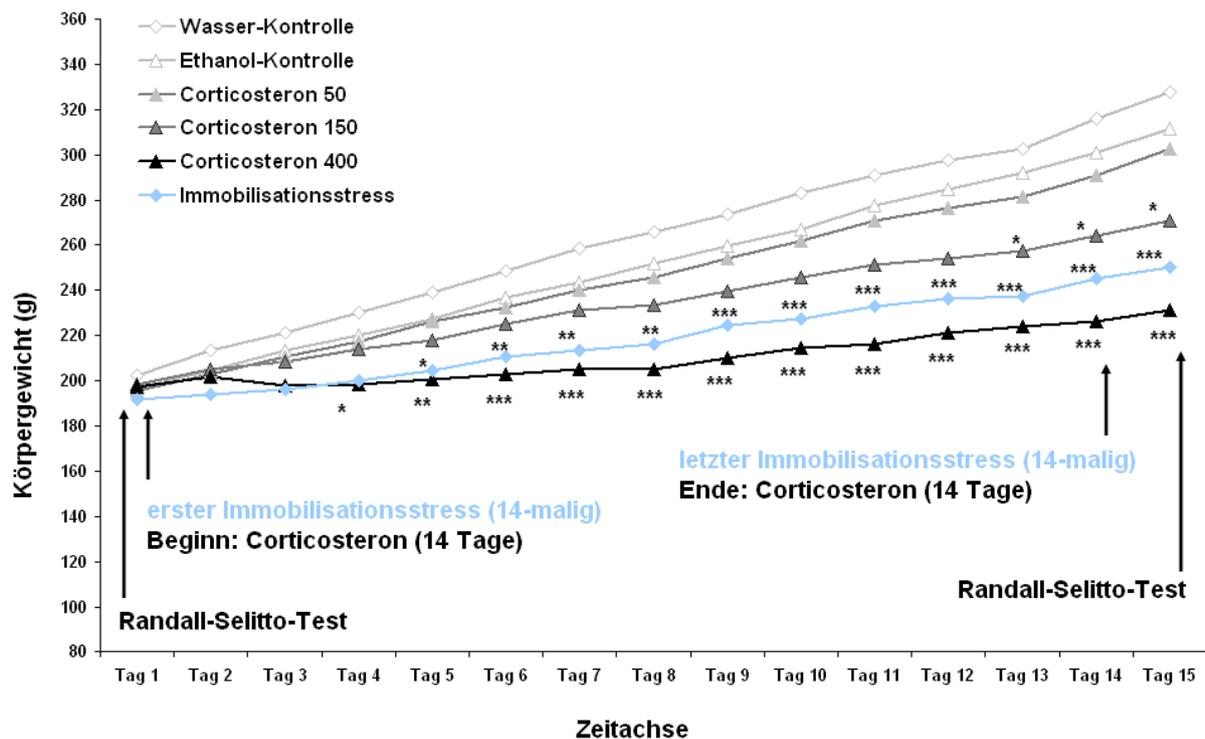
Auch bei Betrachtung der Differenzen (Mittelwerte der Basalmessungen minus Mittelwerte der Messungen an Tag 15) in Abbildung 28 ergeben sich höchst signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zwischen den (Wasser-)Kontroll- und den Stresstieren bzw. den Tieren mit der höchsten Corticosteron-Dosierung (400  $\mu\text{g/ml}$ ) und ihrer Ethanol-Kontrolle. Die beiden niedrigeren (50 und 150  $\mu\text{g/ml}$ ) Corticosteron-Dosierungen bewirkten dagegen nur eine tendenzielle Zunahme der Differenzbeträge ohne statistische Signifikanz. Somit führt Corticosteron im Trinkwasser auch bei Betrachtung der Differenzen zu einer dosisabhängigen Verminderung der Schmerzsensitivität. Beim Vergleich der Ethanol- mit der Trinkwasser-Kontrolle wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Reaktionsschwellen-Differenzen festgestellt.



**Abb. 28:** Reaktionsschwellen-Differenzen (g) der Tiere im Randall-Selitto-Test nach Immobilisationsstress bzw. nach oraler Corticosteron-Aufnahme sowie von den beiden Kontrollgruppen. Diese Differenzen ergeben sich aus den Basalwerten und den Messwerten an Tag 15. Die Gruppenwerte sind jeweils als MW  $\pm$  SD dargestellt; \*\*\*  $p < 0,001$  (Bonferroni-Test, selektiert).

### 4.3.3.2. Einfluss auf das Körpergewicht

Der Körpergewichtsverlauf von Tieren, die täglich einem Immobilisationsstress ausgesetzt waren, verschiedene Corticosteron-Dosierungen im Trinkwasser hatten bzw. den jeweiligen Kontrollen über den Messzeitraum von 15 Tagen ist in Abbildung 29 dargestellt. Die Kurven weisen einen eher linearen Verlauf auf, wobei die Anstiege der Kontrollgruppen größer sind als bei den Tieren, die gestresst wurden oder Corticosteron im Trinkwasser hatten. Beim Vergleich der Mittelwerte zwischen der Ethanol-Kontrolle und der höchsten Corticosteron-Dosierung (400 µg/ml) zeigen sich ab dem 4. Tag signifikante ( $p < 0,05$ ), ab dem 5. Tag hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) und ab dem 6. Tag bis zur letzten Messung höchst signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,001$ ). Die Gruppe mit 150 µg/ml Corticosteron im Trinkwasser weist ab dem 13. Tag signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) zur Ethanol-Gruppe auf. Zusätzlich zeigen auch die immobilisierten Tiere ab dem 5. Tag signifikante ( $p < 0,05$ ), ab dem 6. Tag hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) und ab dem 9. Tag bis zur letzten Messung höchst signifikante Unterschiede ( $p \leq 0,001$ ) zur Wasser-Kontrolle. Zwischen den Körpergewichtsverläufen von beiden Kontrollgruppen wurden dagegen keine Veränderungen gefunden.

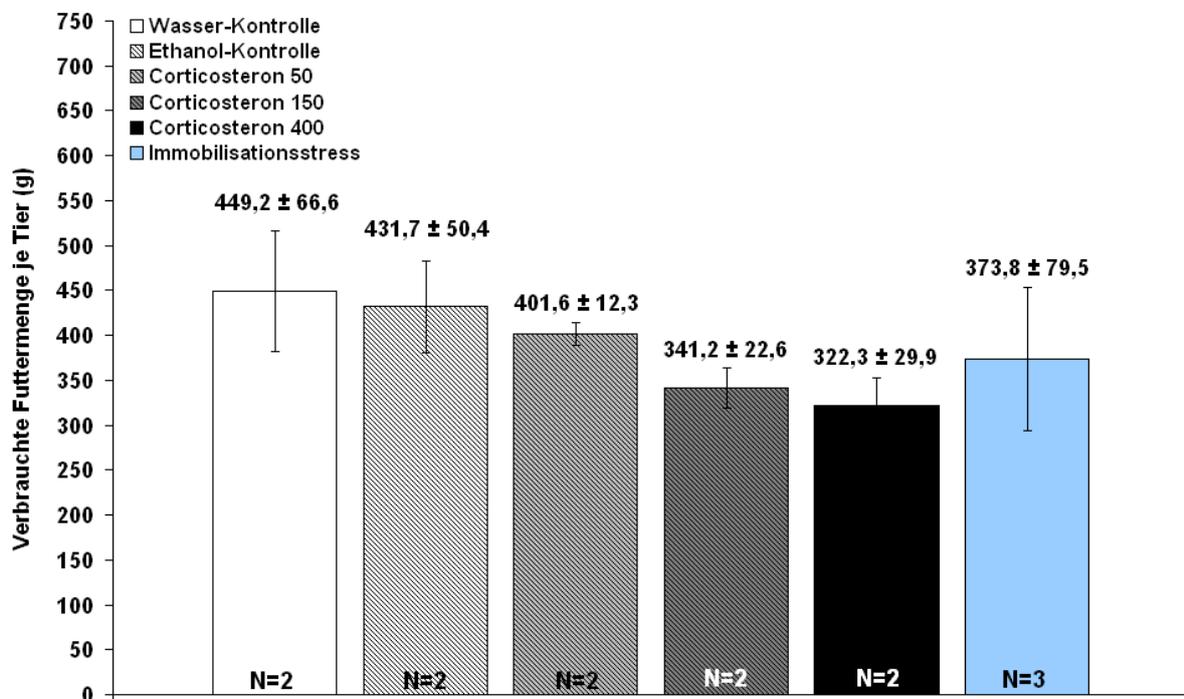


**Abb. 29:** Verlauf der Körpergewichtsentwicklung (g) von Tieren, die täglich einem Immobilisationsstress ausgesetzt waren bzw. verschiedene Corticosteron-Dosierungen im Trinkwasser hatten sowie von den jeweiligen Kontrollgruppen über den Messzeitraum von 15 Tagen. Die Punkte der Kurven stellen die MW  $\pm$  SD am jeweiligen Tag dar. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Bonferroni-Test, selektiert).

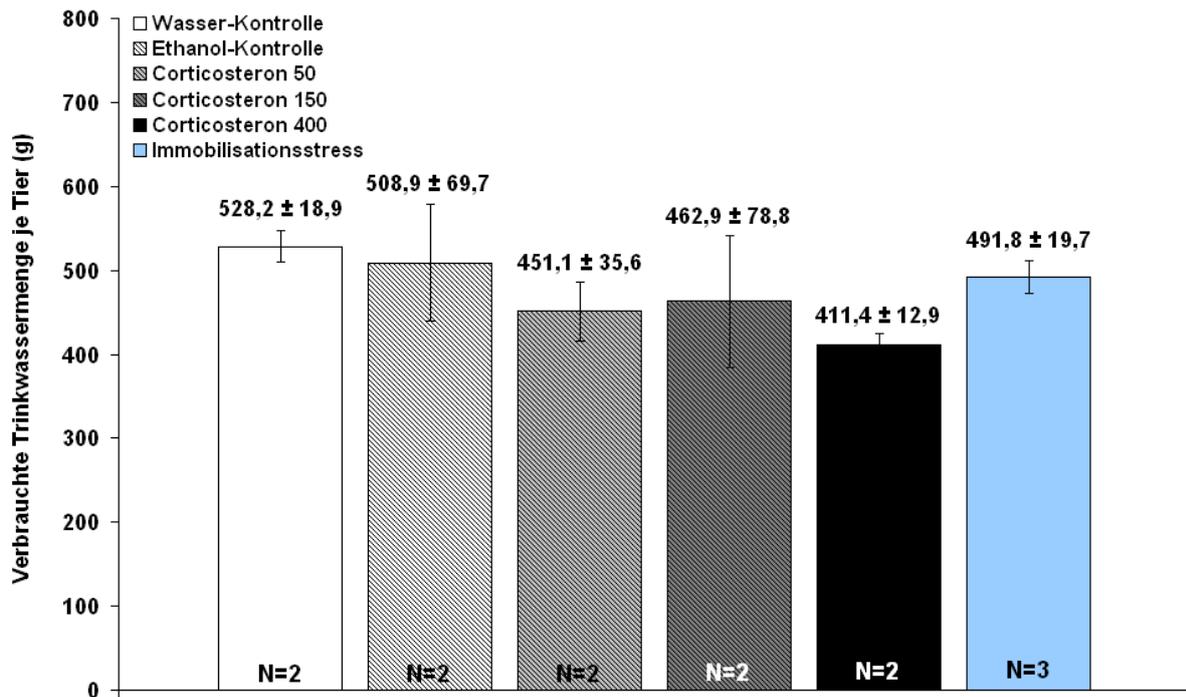
#### 4.3.3.3. Einfluss auf den Futter- und Trinkwasserverbrauch

Die Abbildungen 30 und 31 zeigen den absoluten Futter- und Trinkwasserverbrauch pro Tier bei den Stress- und Corticosteron-Gruppen sowie den jeweiligen Kontrollen. Da sich in einem Käfig 3 Ratten (Ausnahme: 2 Tiere in Käfig 3 der Immobilisationsstress-Gruppe) befanden, bezieht sich die Statistik auf den Verbrauch pro Käfig, welcher auf die Anzahl der darin enthaltenen Tiere berechnet wurde.

Bei Betrachtung des absoluten Trinkwasser- und Futterverbrauchs pro Käfig erscheint zwar der Verbrauch in den Käfigen der gestressten Tiere sowie der Corticosteron-Gruppen tendenziell geringer als bei den jeweiligen Kontrolltieren, jedoch konnten aufgrund der sehr geringen und versuchsbedingten N-Zahl keine statistisch sicheren Unterschiede ( $p > 0,05$ ) festgestellt werden. Die Abnahme der verbrauchten absoluten Futtermenge wies bei den Tieren mit Corticosteron im Trinkwasser zusätzlich eine Dosisabhängigkeit auf.



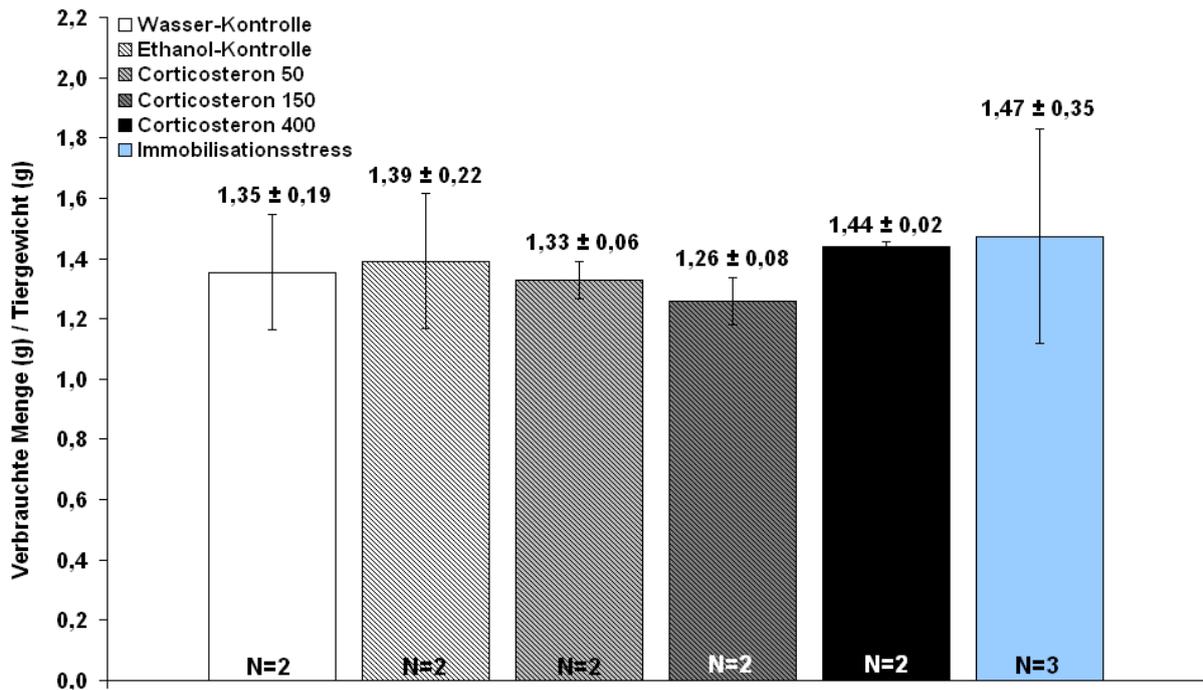
**Abb. 30:** Absolutes Gewicht (g) der verbrauchten Futtermenge/Tier von den Stress- und Corticosteron-Gruppen sowie von ihren jeweiligen Kontrollen nach 15 Tagen. Das Futtergewicht wurde pro Käfig bestimmt (N = 3 bzw. 2) und auf die Tieranzahl in den Käfigen bezogen. Dargestellt sind die MW ± SD.



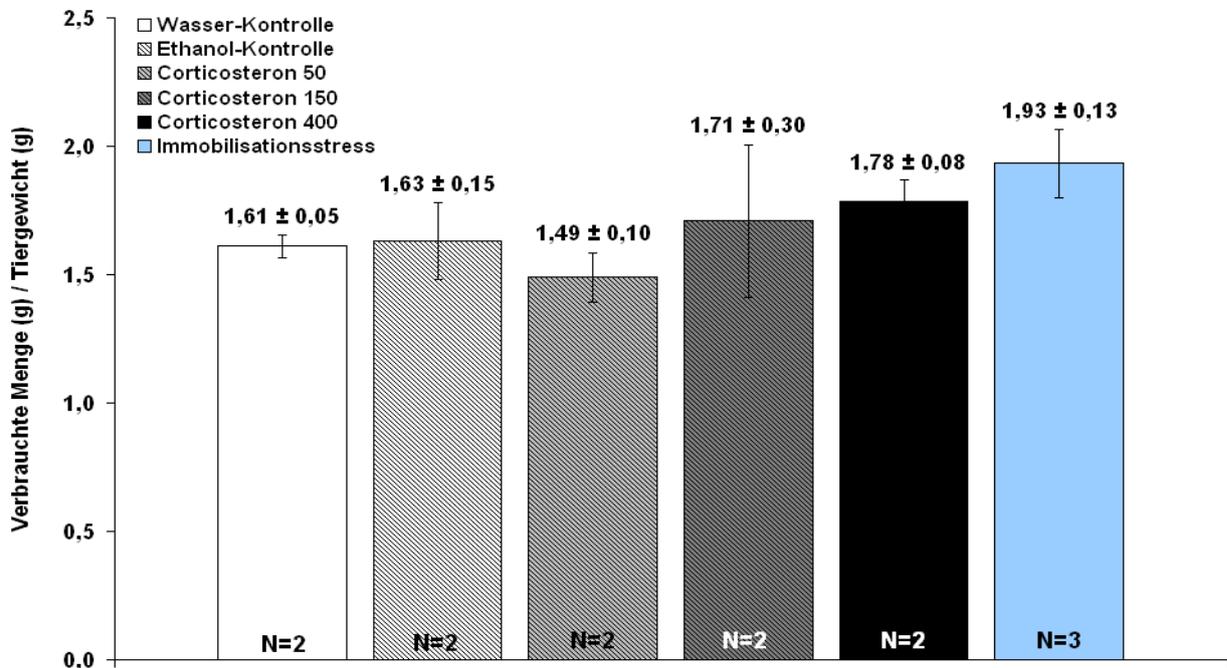
**Abb. 31:** Absolutes Gewicht (g) der verbrauchten Trinkwassermenge/Tier von den Stress- und Corticosteron-Gruppen sowie von ihren jeweiligen Kontrollen nach 15 Tagen. Das Futtergewicht wurde pro Käfig bestimmt (N = 3 bzw. 2) und auf Tiere darin zurückgerechnet. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD.

In den Abbildungen 32 und 33 ist von allen Versuchsgruppen der relative Futter- und Wasserverbrauch pro Tier dargestellt, welcher sich auf das Durchschnittsgewicht der darin gehaltenen Tiere bezieht.

In diesem Fall zeigen die Tiere mit der höchsten Corticosteron-Dosierung (400  $\mu\text{g/ml}$ ) und die immobilisierten Tiere im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen einen tendenziell höheren Futter- sowie Trinkwasserverbrauch. Letzterer war auch bei der mittleren Corticosteron-Dosierung (150  $\mu\text{g/ml}$ ) tendenziell erhöht. Statistische Unterschiede konnten aufgrund der zu geringen N-Zahl (wie auch bei den absoluten Berechnungen) nicht festgestellt werden.



**Abb. 32:** Relatives Gewicht (g/g) der verbrauchten Futtermenge/Tiergewicht aller Versuchsgruppen nach 15 Tagen. Das Futtergewicht wurde pro Käfig bestimmt (N = 2 bzw. 3). Dargestellt als MW ± SD.



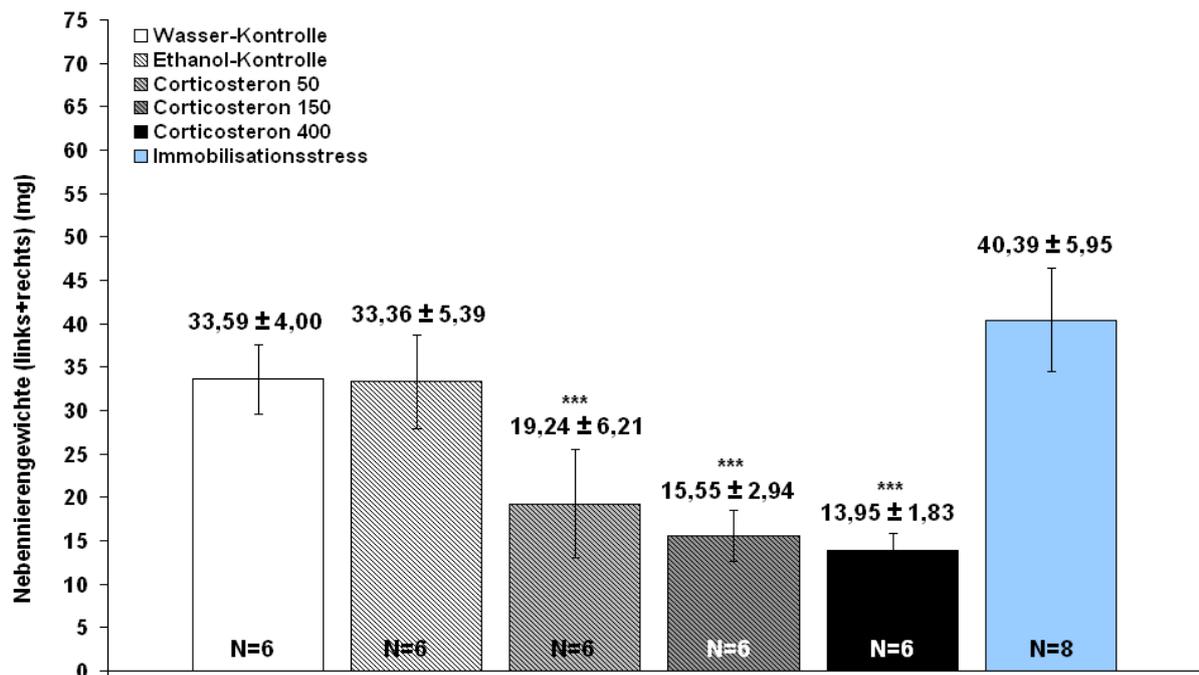
**Abb. 33:** Relatives Gewicht (g/g) der verbrauchten Trinkwassermenge/Tiergewicht aller Versuchsgruppen nach 15 Tagen. Das Futtergewicht wurde pro Käfig bestimmt (N = 2 bzw. 3). Dargestellt sind die MW ± SD.

#### 4.3.3.4. Einfluss auf die Nebennierengewichte

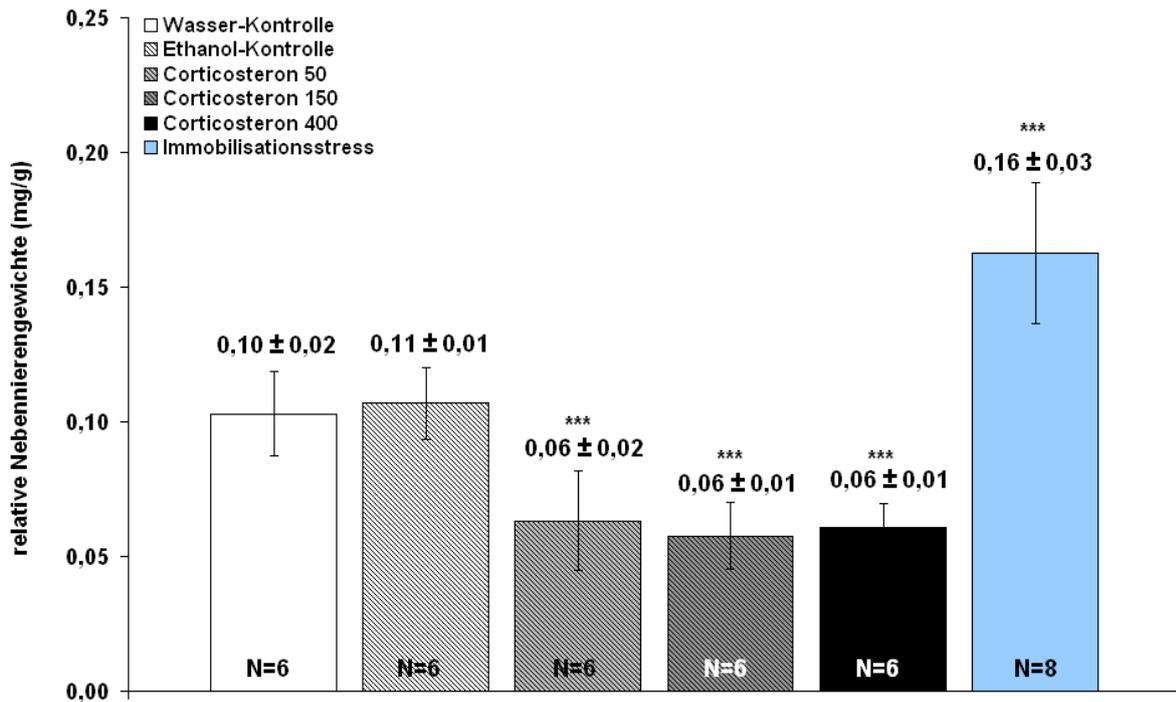
In den nachfolgenden Abbildungen 34 und 35 werden die absoluten und die relativen Gewichte von beiden Nebennieren der Stress-, Corticosteron- und Kontrolltiere dargestellt. Das relative Nebennierengewicht errechnet sich dabei aus dem Gewicht der beiden Nebennieren (mg) bezogen auf 1 Gramm Tiergewicht.

Bei Betrachtung der absoluten Nebennierengewichte lässt sich eine höchst signifikante und dosisabhängige Abnahme der Nebennierengewichte ( $p < 0,001$ ) bei allen Corticosteron-Dosierungen im Vergleich zur Ethanol-Kontrolle erkennen. Dagegen weisen die Tiere nach 14-maligem Immobilisationsstress im Vergleich zur Wasser-Kontrolle eine tendenzielle Zunahme der Nebennierengewichte auf, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Werden die Nebennierengewichte zu den Körpergewichten in Bezug gesetzt, so ergeben sich ebenso höchst signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zwischen den Corticosteron-Gruppen und der Ethanol-Kontrolle sowie zwischen der Immobilisationsstress-Gruppe und der Wasser-Kontrolle. Die Kontrollgruppen wiesen dagegen untereinander sowohl absolut als auch relativ keine Unterschiede auf.



**Abb. 34:** Darstellung der absoluten Gewichte von beiden Nebennieren (mg) nach Immobilisationsstress bzw. oraler Corticosteron-Aufnahme sowie bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Dargestellt sind die MW ± SD; \*\*\*  $p < 0,001$  (Bonferroni-Test, selektiert).



**Abb. 35:** Darstellung der relativen Gewichte von beiden Nebennieren/Tiergewicht (mg/g) nach Immobilisationsstress bzw. oraler Corticosteron-Aufnahme sowie bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Dargestellt sind die MW ± SD; \*\*\* p < 0,001 (Bonferroni-Test, selektiert).

#### 4.3.3.5. Einfluss auf die Nebennierenhistologie

Nachfolgend sind von jeder Versuchsgruppe 2 histologische Nebennieren-Schnitte (auf ca. halber Organhöhe geschnitten) abgebildet: Eine Übersicht mit allen in 40-facher Vergrößerung aufgenommenen Bilder (Abbildung 36) sowie eine jeweilige detaillierte Darstellung der Nebennierenrinde in 100-facher Vergrößerung (Abbildungen 37-42). Die abgebildeten Nebennieren wurden repräsentativ anhand ihres Eigengewichtes ausgewählt, das am nächsten zum Durchschnitts-Nebennierengewicht der jeweiligen Gruppe lag. Diese vergleichenden Gewichtsdaten sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Bindegewebe (BG)-Kapsel kann auf einigen abgebildeten Schnitten fehlen.

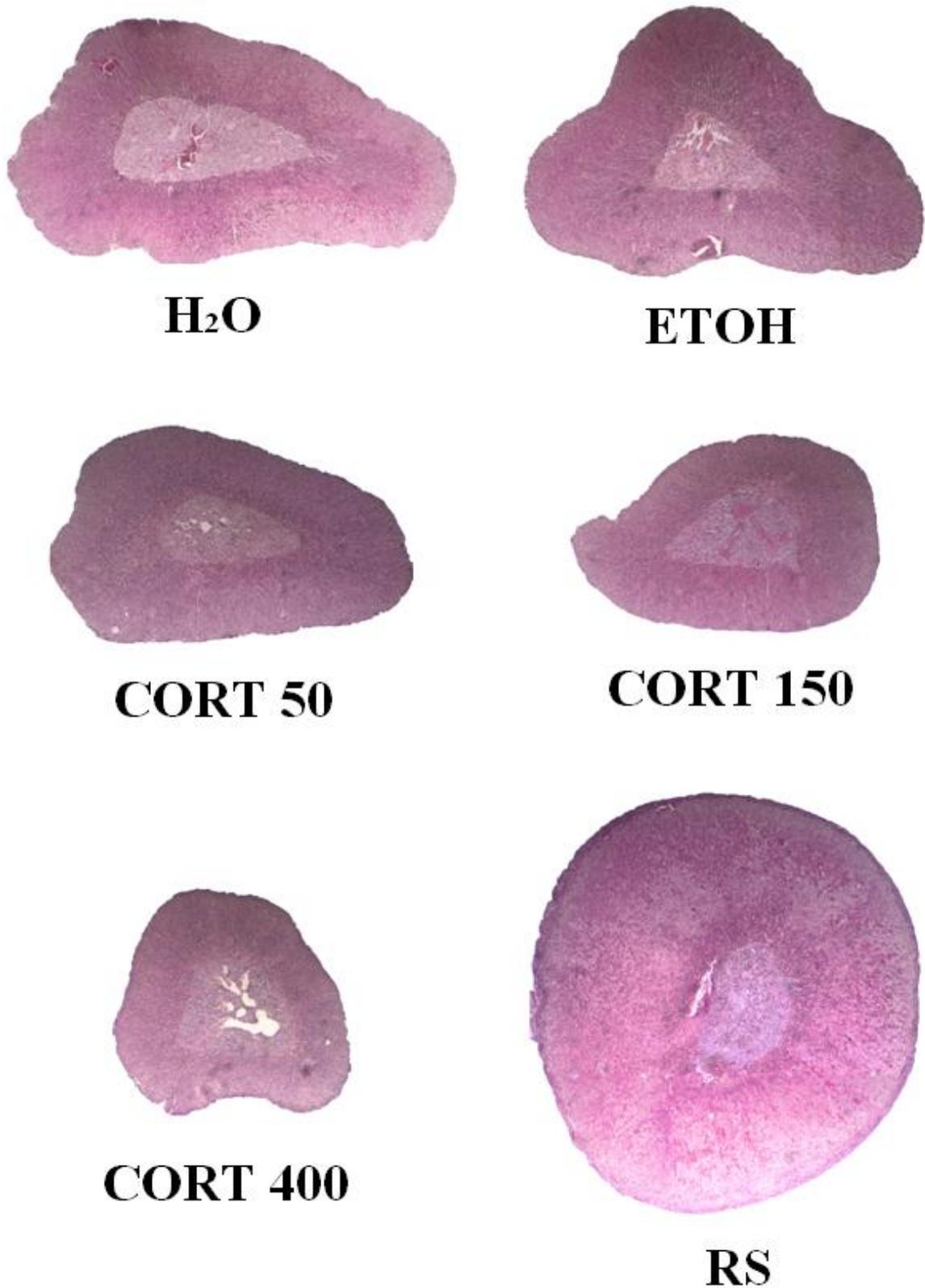
**Tab. 4:** Übersicht der Gewichtsdaten der nachfolgend abgebildeten Nebennieren

Versuchsgruppe	Gruppen-MW des Nebennieren-Gewichts (mg)	Gewicht der abgebildeten Nebennieren (mg)	Tiergewicht (g)
Wasser-Kontrolle	16,80	17,31	329
Ethanol-Kontrolle	16,68	17,43	342
Corticosteron 50	9,62	9,71	313
Corticosteron 150	7,78	8,08	266
Corticosteron 400	6,97	6,15	235
Immobilisationsstress	20,20	20,36	284

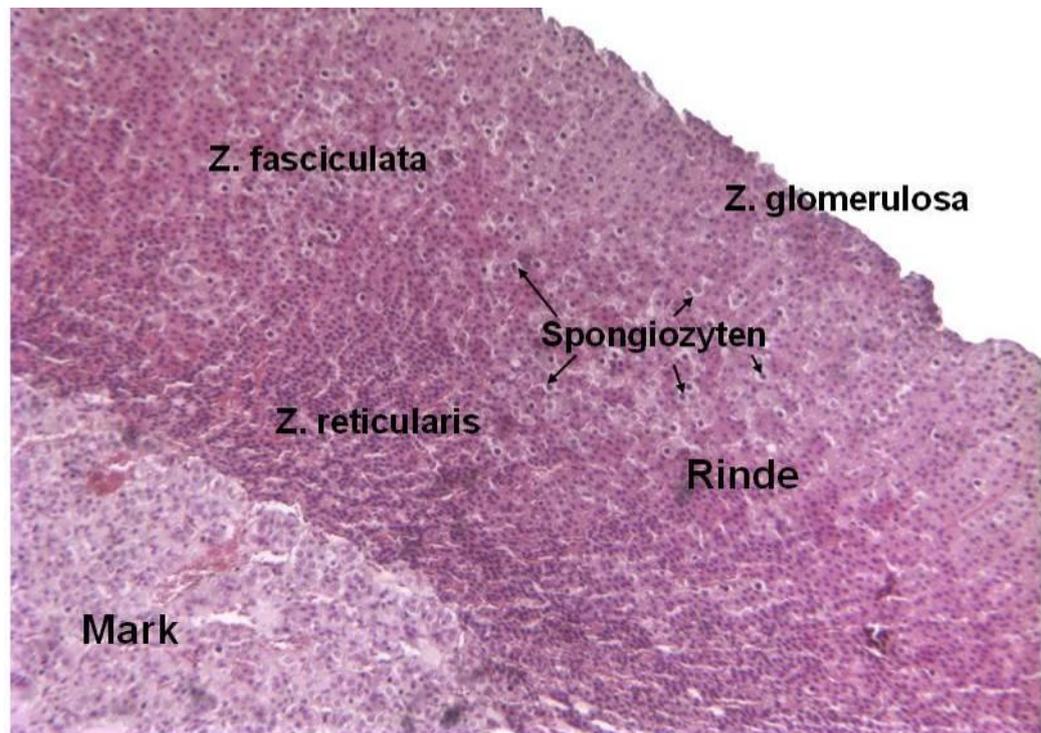
Im Vergleich der abgebildeten Schnitte von Trinkwasser- und Lösungsmittel-Kontrolle zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der Nebennieren-Morphologie, lediglich die Form war abweichend. Die endokrinen Zellen der Zona fasciculata waren bei beiden Kontrollgruppen gut sichtbar in Form von bläschenförmigen Spongiozyten innerhalb der Nebennierenrinde.

Auf den dargestellten Übersichtsschnitten der Tiere mit Corticosteron im Trinkwasser zeigte sich dagegen in Übereinstimmung mit der ermittelten Gewichtsreduktion eine dosisabhängige Verkleinerung der Nebennieren. Die Detailaufnahmen ließen weiterhin eine größer werdende Reduktion der spongiösen Ausprägung der endokrinen Zellen der Zona fasciculata erkennen, was besonders gut in Abbildung 41 anhand der Nebenniere eines Tieres mit der höchsten Corticosteron-Konzentration (400 µg/ml) erkennbar war. Insgesamt erscheinen die Rindenregionen dieser Nebennieren verkleinert, am stärksten war die Größenreduktion bei den beiden Nebennieren der Tiere mit den höchsten Corticosteron-Dosierungen im Trinkwasser (150 µg/ml und 400 µg/ml).

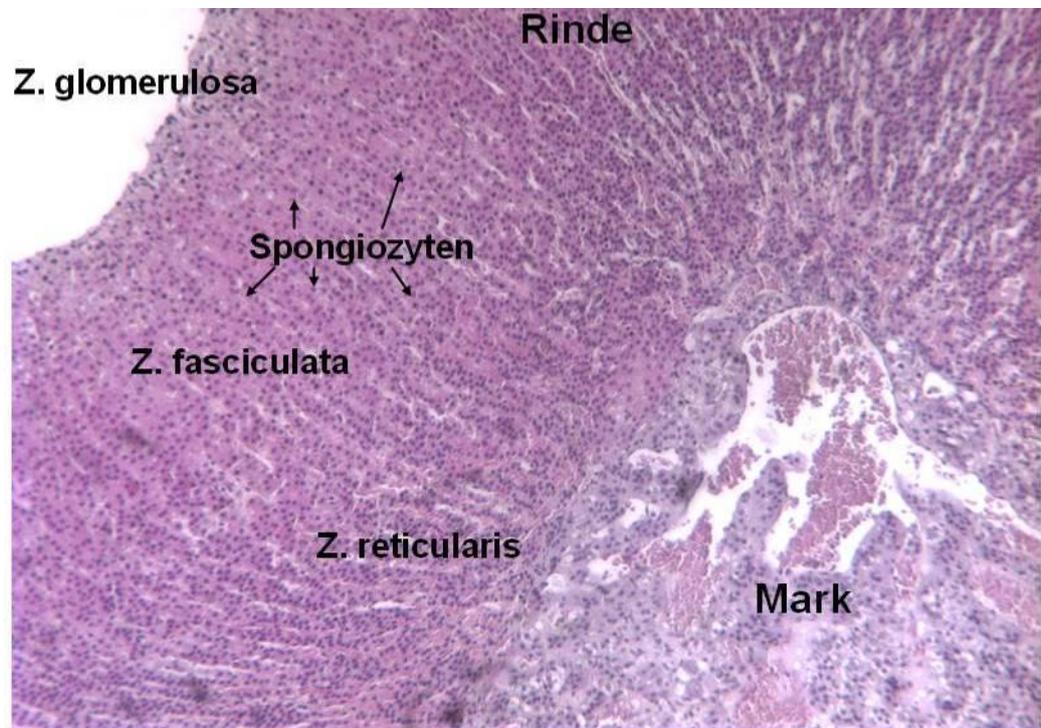
Im Gegensatz dazu wirkt die abgebildete Nebenniere des Immobilisationsstress-Tieres sehr prominent im Vergleich zu allen anderen Nebennieren-Schnitten. Vor allem die Rindenregion erschien dabei massiv vergrößert, was sich in einer Vielzahl von spongiösen Zellen innerhalb der Zona fasciculata ausgedrückt hat, die zusätzlich ein sehr ausgeprägtes Zelllumen aufwiesen.



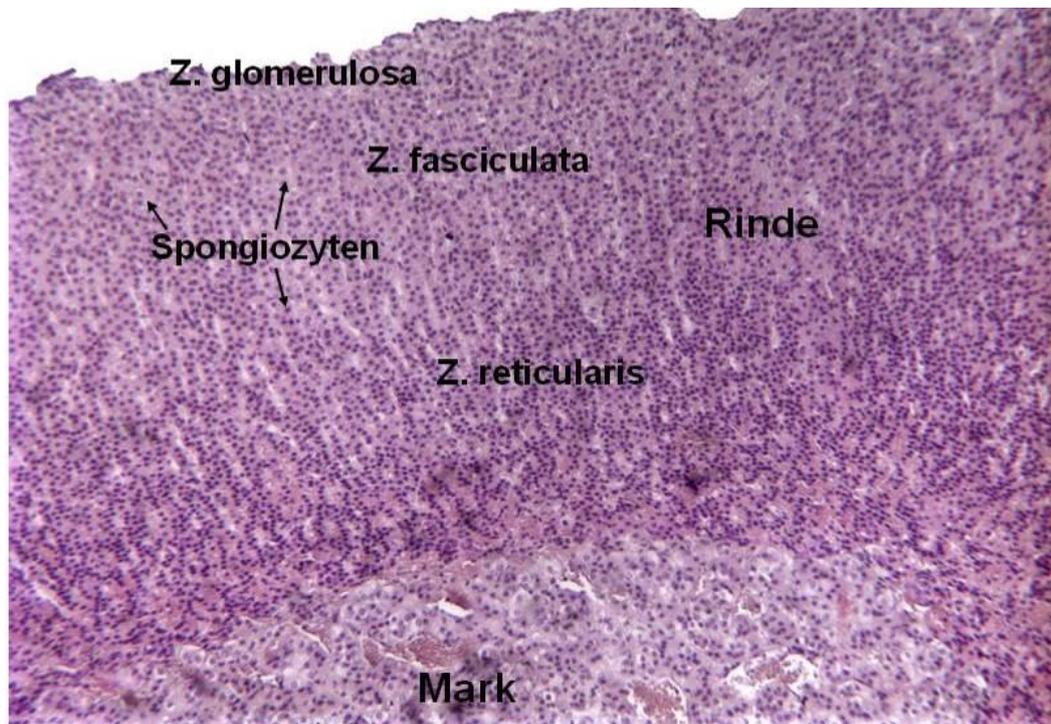
**Abb. 36:** Übersicht der Nebennierenquerschnitte aller 6 Gruppen in 40-facher Vergrößerung (11 % Skalierung) zum Vergleich der Organgrößen.



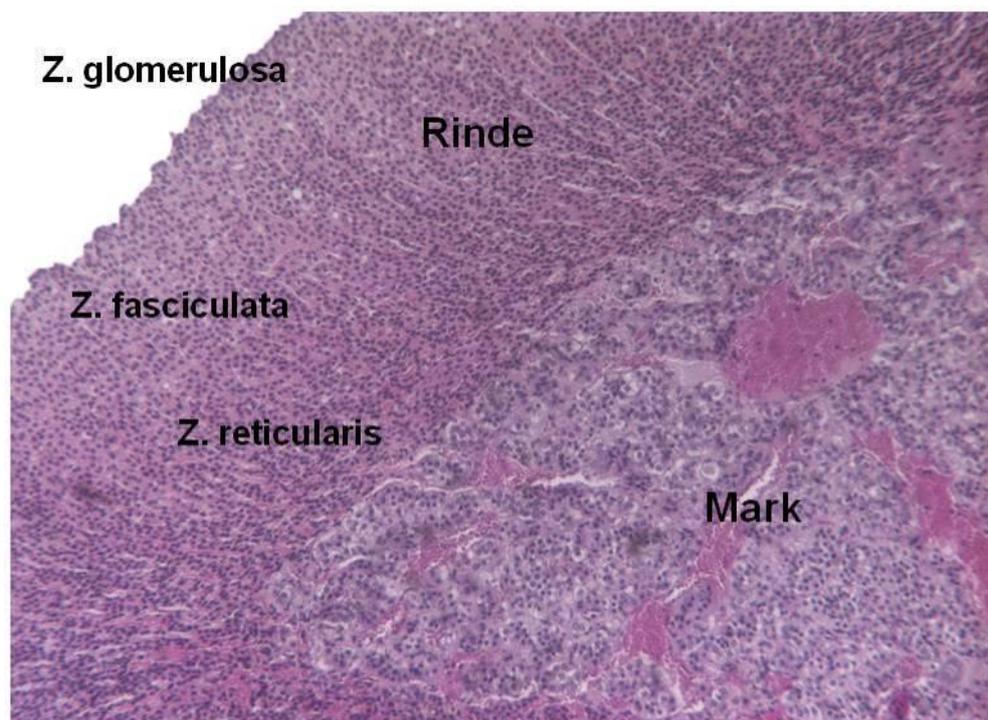
**Abb. 37:** Nebennierenrinde eines Tieres aus der Wasser-Kontrolle (100-fach vergrößert) ohne BG-Kapsel. Gut sichtbar sind die endokrinen Zellen der Zona fasciculata, die aufgrund ihrer Lipidgranula schaumig erscheinen (= Spongiocyten).



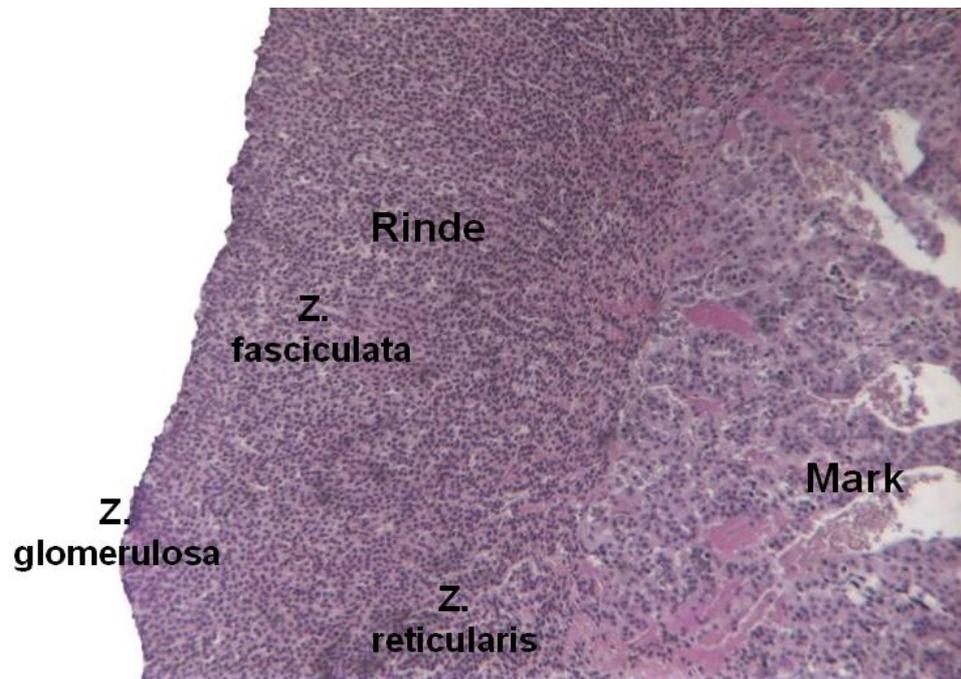
**Abb. 38:** Nebennierenrinde eines Tieres aus der Ethanol-Kontrollgruppe in 100-facher Vergrößerung, die bindegewebige Kapsel wurde entfernt. Gut sichtbar sind die strahlenförmig um das Mark angeordneten endokrinen Zellen der Zona fasciculata.



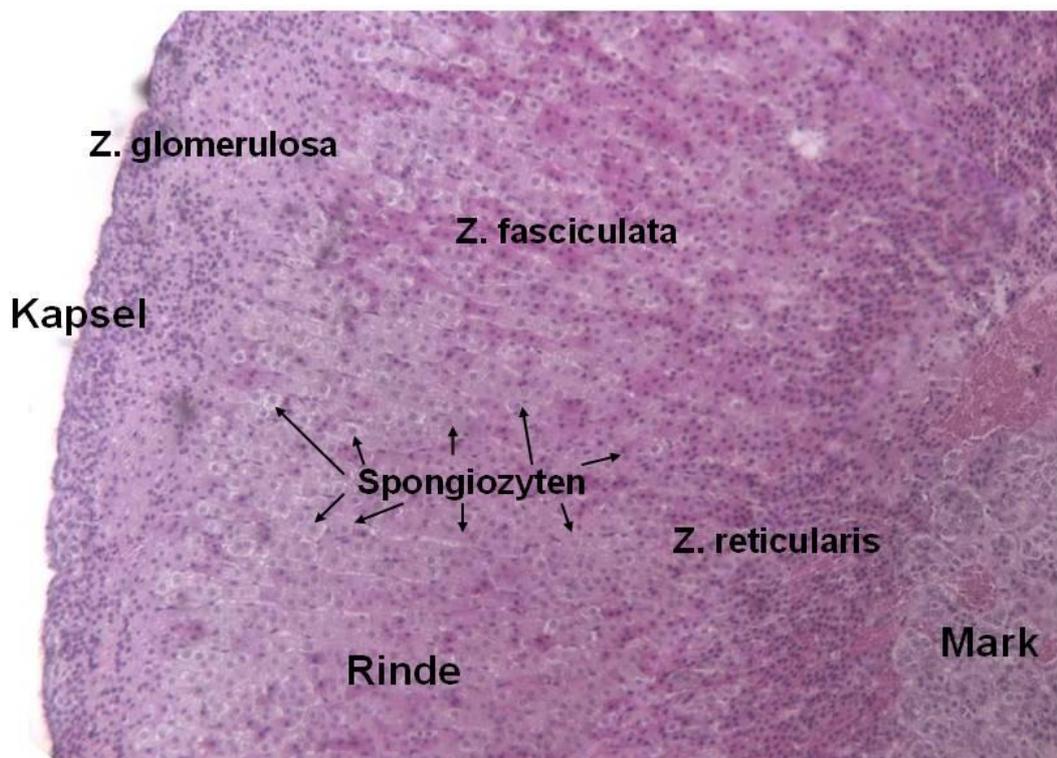
**Abb. 39:** Nebennierenrinde eines Tieres aus der Corticosteron-50-Gruppe in 100-facher Vergrößerung, die bindegewebige Kapsel wurde entfernt. Es sind weniger spongiöse Zellen erkennbar.



**Abb. 40:** Nebennierenrinde eines Tieres aus der Corticosteron-150-Gruppe ohne Bindegewebskapsel (100-fach vergrößert). Die Rinde erscheint kleiner im Vergleich zu den Nebennieren in den Abbildungen 37-39. Weiterhin sind die Zellkerne in der Zona fasciculata dichter gepackt.



**Abb. 41:** Nebennierenrinde eines Tieres aus der Corticosteron-400-Gruppe ohne BG-Kapsel. Die Rinde erscheint verkleinert im Vergleich zu den Abbildungen 37-39. Die Zellkerne innerhalb der Rinde liegen sehr kompakt zueinander.

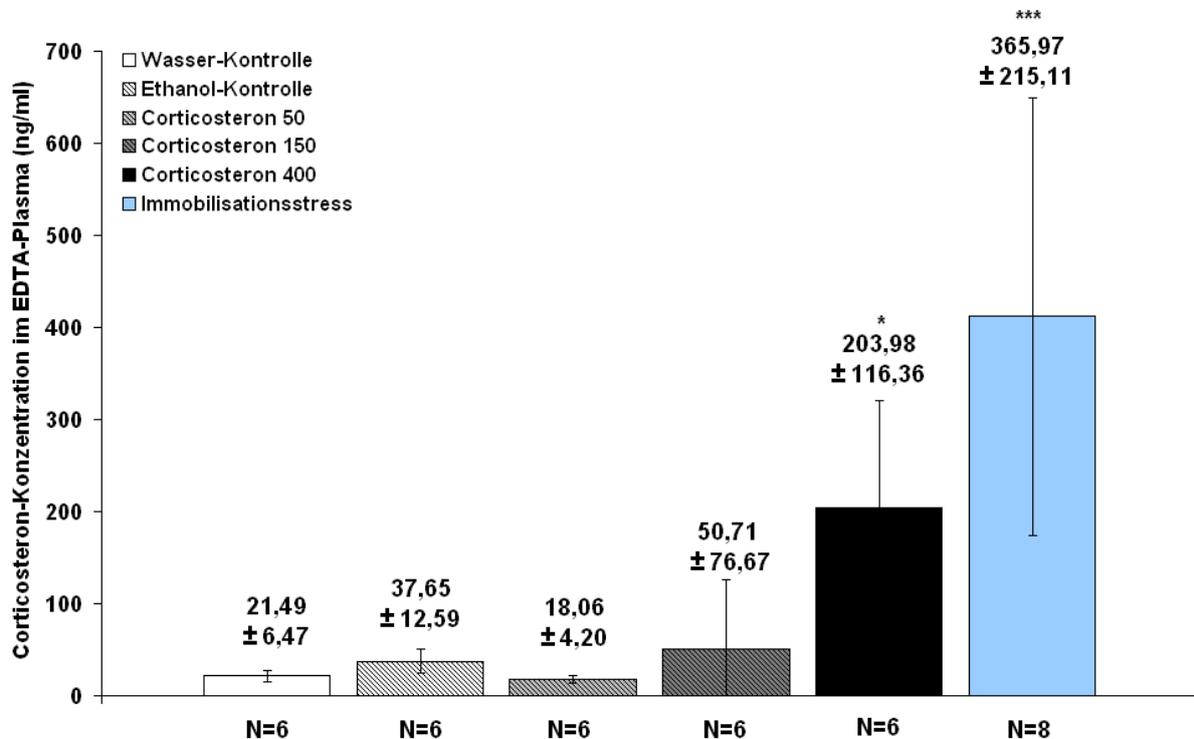


**Abb. 42:** Nebennierenrinde des Tieres nach Immobilisationsstress in 100-facher Vergrößerung. Die Rinde ist sehr prominent im Vergleich zu allen anderen Abbildungen. Die Zona fasciculata wirkt stark vergrößert, ebenso deren Zelllumina. Es sind ebenso massenhaft endokrin aktive Spongiocyten mit großem Zytoplasma-Hof erkennbar.

#### 4.3.3.6. Einfluss auf klinisch-chemische Blutwerte

In der nachfolgenden Abbildung 43 wird der Corticosteron-Gehalt (ng/ml) im EDTA-Plasma der Stress-, Corticosteron- und Kontrolltiere dargestellt.

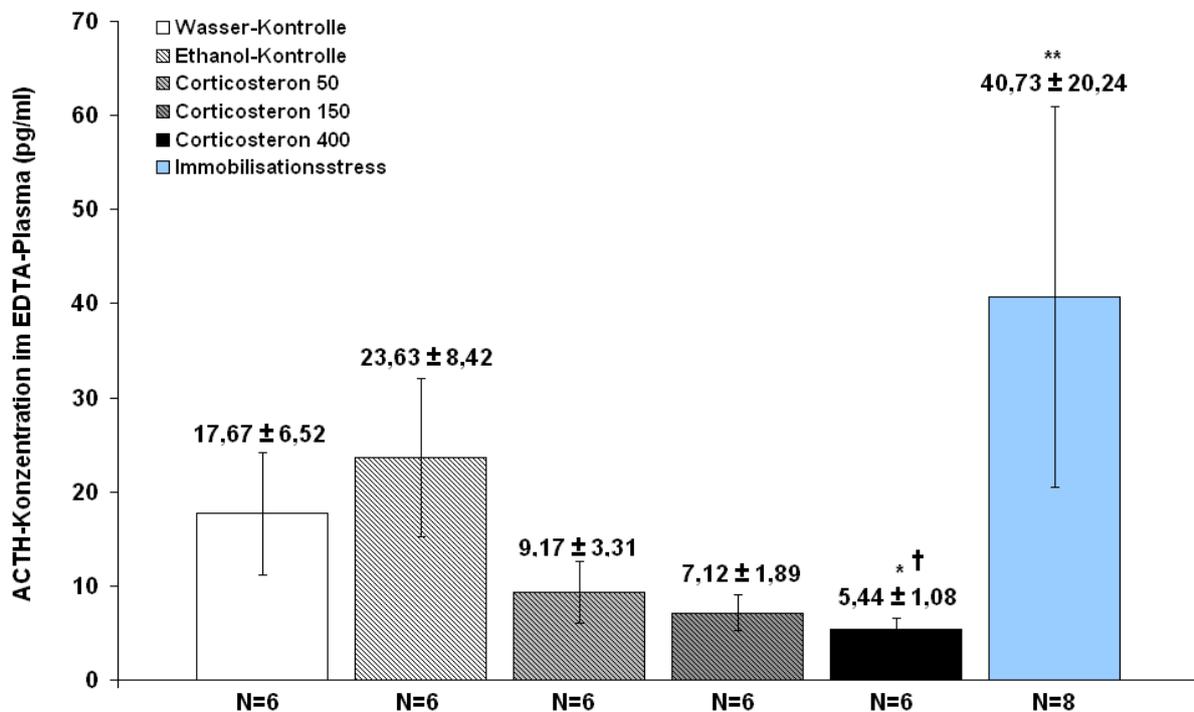
Innerhalb der Corticosteron-Gruppen zeigte sich eine dosisabhängige Erhöhung der Corticosteron-Konzentration im Plasma, jedoch wies nur der Wert der höchsten Corticosteron-Dosierung (400 µg/ml) gegenüber der Lösungsmittel-Kontrolle eine statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) auf. Ebenso war der Corticosteron-Spiegel der immobilisierten Tiere höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) gegenüber der Wasser-Kontrolle erhöht. Zwischen den Kontrollgruppen konnten abschließend keine Unterschiede festgestellt werden. Im Vergleich zu den vorherigen Kontroll-Messungen (Abschnitt 4.2.3.4.) besaßen die Kontrollen allerdings ein deutlich geringeres Effekt-Level und eine niedrigere Standardabweichung.



**Abb. 43:** Darstellung des Corticosteron-Gehalts (ng/ml) im EDTA-Plasma nach Immobilisationsstress bzw. Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser sowie bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Bonferroni-Test, selektiert).

Abbildung 44 zeigt die Ergebnisse der extern durchgeführten CLIA-Messung des adrenotropen Hormons im Plasma von Tieren, die einem 14-maligem täglichen Immobilisationsstress ausgesetzt waren bzw. für 14 Tage jeweils verschiedene Corticosteron-Dosierungen im Trinkwasser erhalten haben sowie die entsprechenden Kontrollgruppen.

Die Tiere mit Corticosteron im Trinkwasser zeigten mit steigender Dosierung eine tendenzielle Verringerung der ACTH-Konzentration im Plasma. Einen signifikant ( $p < 0,05$ ) erniedrigten ACTH-Gehalt wies dabei nur die Gruppe mit der höchsten Corticosteron-Dosierung (400  $\mu\text{g/ml}$ ) gegenüber der Ethanol-Kontrolle auf. Es lagen jedoch 3 Tiere unterhalb der Nachweisgrenze von 5  $\text{pg/ml}$  ( $\dagger$ ), so dass der eigentliche Effekt unterhalb der dargestellten 5,44  $\text{pg/ml}$  liegt. Bei den gestressten Tieren war dagegen die Konzentration des adrenotropen Hormons gegenüber der Trinkwasser-Kontrolle hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht. Letztere und die Ethanol-Kontrolle wiesen keine Unterschiede zueinander auf.

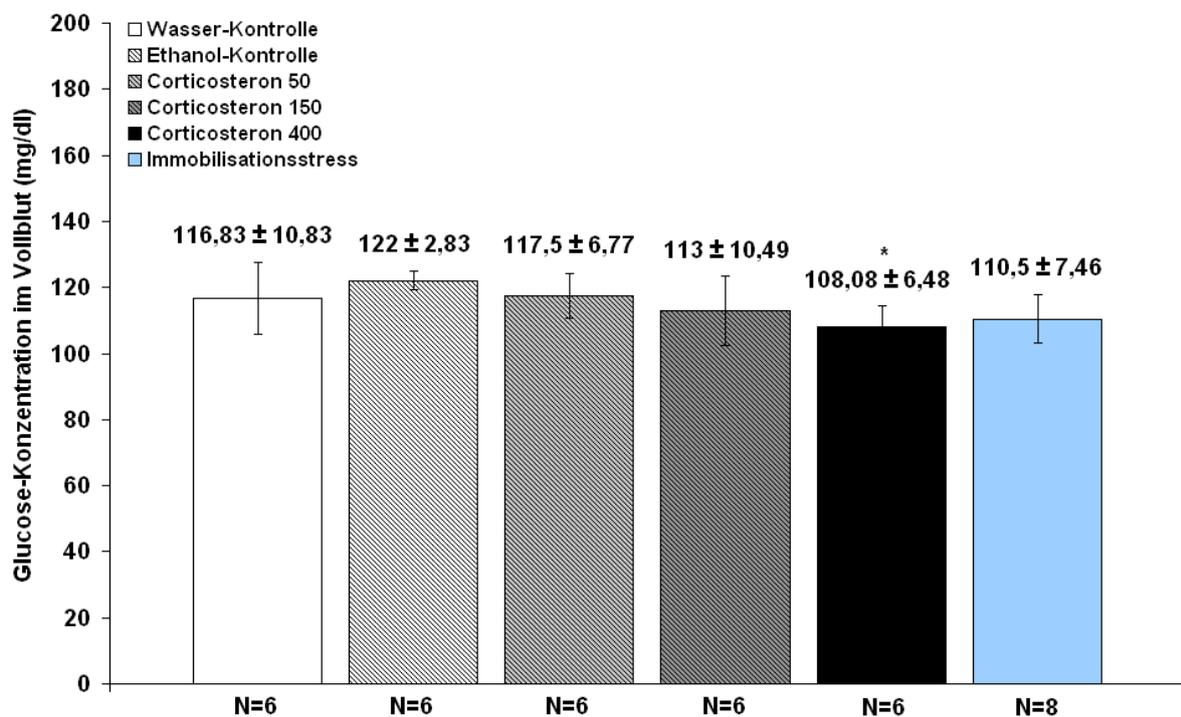


**Abb. 44:** Darstellung der ACTH-Konzentration (ng/ml) im EDTA-Plasma nach Immobilisationsstress bzw. oraler Corticosteron-Aufnahme sowie bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD ( $\dagger$  = Spiegel bei 3 Tieren unter 5,00  $\text{pg}$  und somit unterhalb der Nachweisgrenze); \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (Bonferroni-Test, selektiert).

In der nachfolgenden Abbildung 45 wird der Glucose-Gehalt (mg/dl) im Vollblut der Stress-, Corticosteron- und Kontrolltiere dargestellt.

Innerhalb der Corticosteron-Gruppen zeigte sich eine dosisabhängige und tendenzielle Verringerung der Glucose-Konzentration, jedoch wies nur der Wert der höchsten Corticosteron-Dosierung (400 µg/ml) gegenüber der Lösungsmittel-Kontrolle eine statistische Signifikanz ( $p < 0,05$ ) auf. Ebenso war der Glucose-Spiegel der immobilisierten Tiere gegenüber der Wasser-Kontrolle tendenziell erhöht. Zwischen den Kontrollgruppen konnten abschließend keine Unterschiede festgestellt werden.

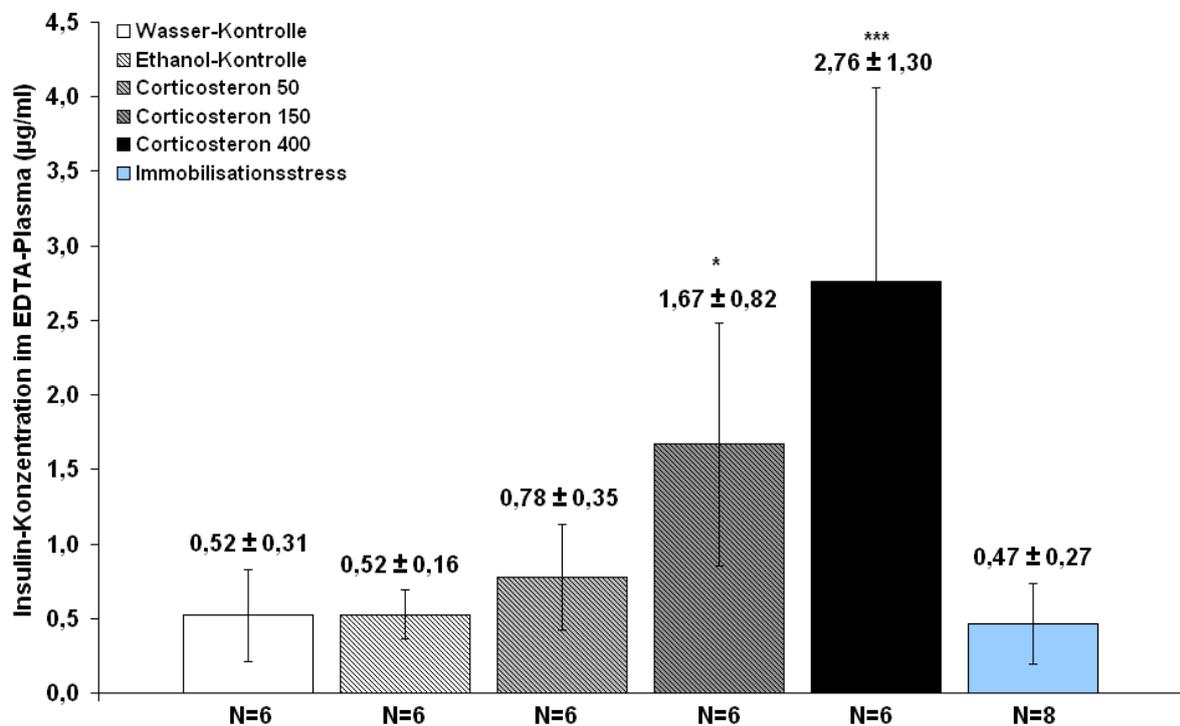
Anzumerken ist noch die geringere Effektstärke der hier dargestellten Messungen gegenüber den Messungen in Abschnitt 2.2.3.4., was aber vermutlich auf die veränderte Messmethode zurückzuführen ist.



**Abb. 45:** Darstellung des Glucose-Gehalts (mg/dl) im Vollblut nach Immobilisationsstress, bzw. Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser sowie bei den entsprechenden Kontrollgruppen. Die Darstellung erfolgt als MW ± SD; \*  $p < 0,05$  (Bonferroni-Test, selektiert).

Abbildung 46 zeigt die Ergebnisse der Insulin-Bestimmung im EDTA-Plasma von Tieren, die einem 14-maligem täglichen Immobilisationsstress ausgesetzt waren bzw. für 14 Tage jeweils verschiedene Corticosteron-Dosierungen im Trinkwasser erhalten haben sowie von den dazugehörigen Kontrollgruppen.

Die Tiere mit Corticosteron im Trinkwasser zeigten mit steigender Dosis eine Erhöhung der Insulin-Konzentration im Plasma. Dabei wies die Gruppe mit 150 µg/ml Corticosteron im Trinkwasser einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ), die Gruppe mit 400 µg/ml Corticosteron dagegen sogar einen höchst signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) zur Ethanol-Kontrolle auf. Im Gegensatz dazu konnten im Vergleich zur Trinkwasser-Kontrolle keine Veränderungen bei den Tieren nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress und bei den Tieren mit Ethanol im Trinkwasser festgestellt werden.



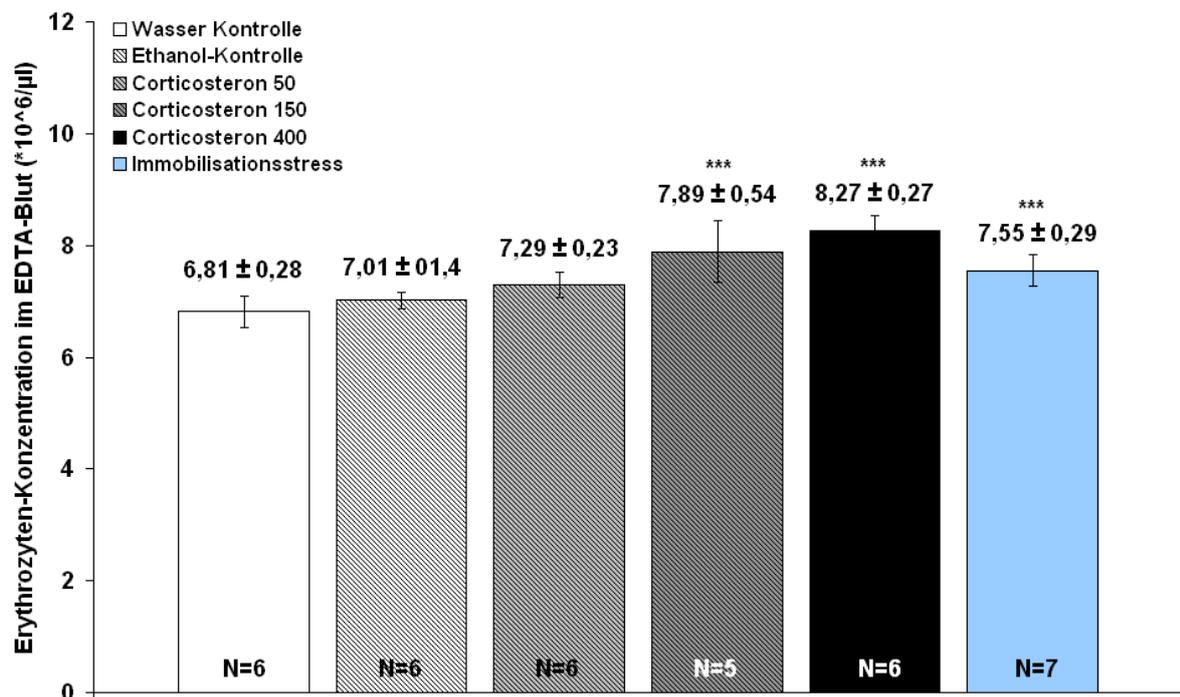
**Abb. 46:** Darstellung des Insulin-Spiegels (µg/ml) im EDTA-Plasma nach Immobilisationsstress bzw. oraler Corticosteron-Aufnahme sowie bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Dargestellt sind die MW ± SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Bonferroni-Test, selektiert).

#### 4.3.3.7. Einfluss auf das rote Blutbild

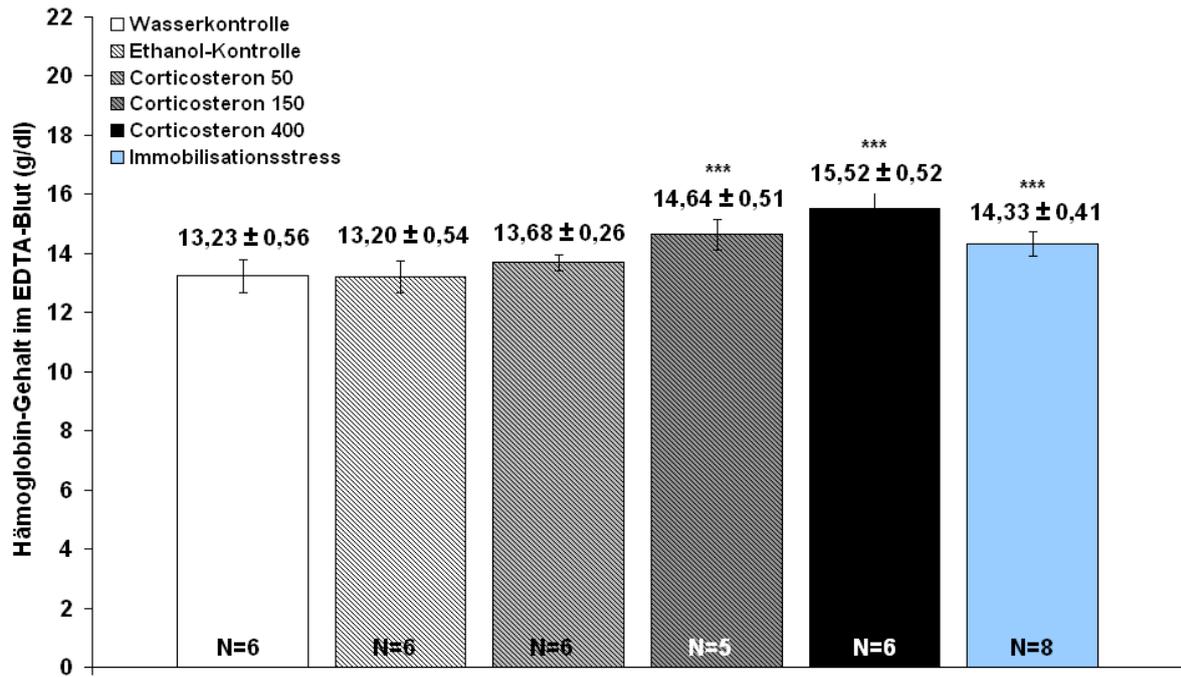
Die Abbildungen 47-49 zeigen den Erythrozytengehalt ( $\cdot 10^6/\mu\text{l}$ ), den Hämoglobingehalt (g/dl) sowie den Hämatokritgehalt (%) im EDTA-Vollblut von Tieren, die einem 14-maligem täglichen Immobilisationsstress ausgesetzt waren bzw. für 14 Tage jeweils verschiedene Corticosteron-Dosierungen im Trinkwasser erhalten haben sowie von den entsprechenden Kontrollgruppen.

Die Tiere mit Corticosteron im Trinkwasser zeigten mit steigender Dosis eine Erhöhung dieser 3 Parameter im EDTA-Vollblut. Dabei wiesen die beiden Gruppen mit den höchsten Corticosteron-Dosierungen (150  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 400  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) einen höchst signifikanten Unterschied ( $p < 0,001$ ) zur Ethanol-Kontrolle auf. Ebenso waren der Erythrozyten-, Hämoglobin- und Hämatokritgehalt der immobilisierten Tiere höchst signifikant ( $p < 0,001$ ) gegenüber der Wasser-Kontrolle erhöht. Zwischen den Kontrollgruppen konnten abschließend keine Unterschiede festgestellt werden.

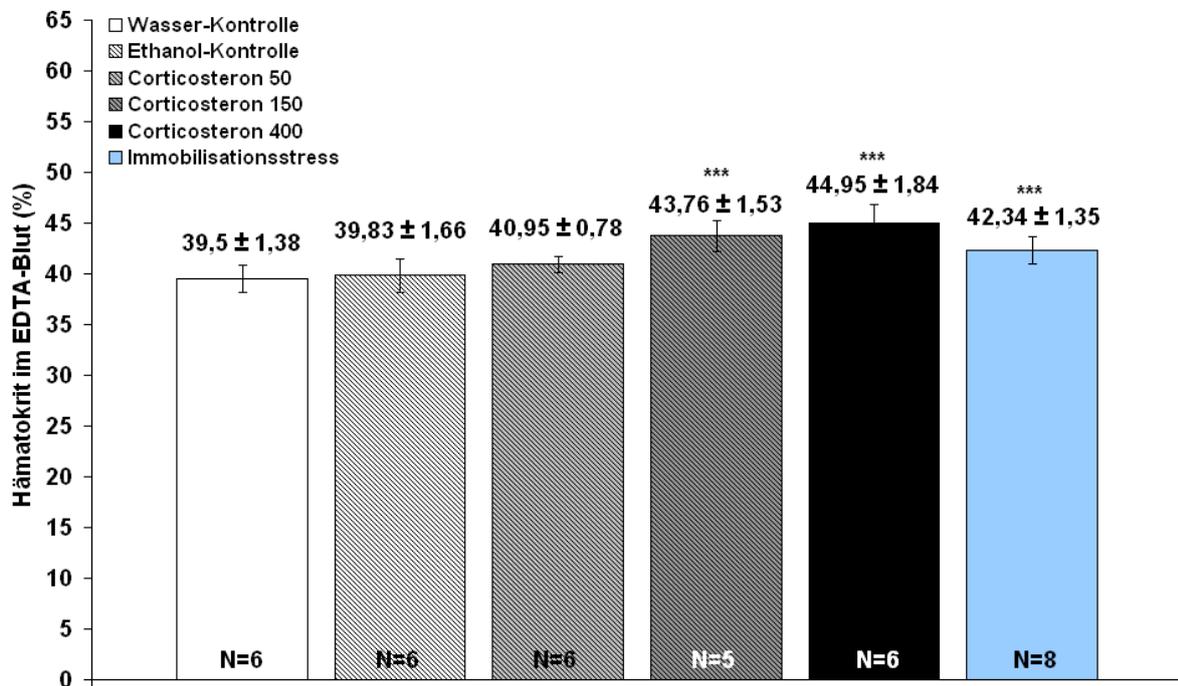
Anzumerken ist, dass aufgrund eines Blutkoagels innerhalb der Ansaugkapillare des Hämatologieautomats die Messung eines Tieres aus der Corticosteron 150-Gruppe nicht durchgeführt werden konnte.



**Abb. 47:** Darstellung des Erythrozytengehalts ( $\cdot 10^6/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress bzw. oraler Corticosteron-Aufnahme sowie bei den entsprechenden Kontrollgruppen. Darstellung als MW  $\pm$  SD; \*\*\*  $p < 0,001$  (Bonferroni-Test, selektiert).



**Abb. 48:** Darstellung des Hämoglobin-Gehalts (g/dl) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress, Corticosteron-Aufnahme und bei den jeweiligen Kontrollen. Dargestellt als MW ± SD; \*\*\* p < 0,001 (Bonferroni-Test, selektiert).

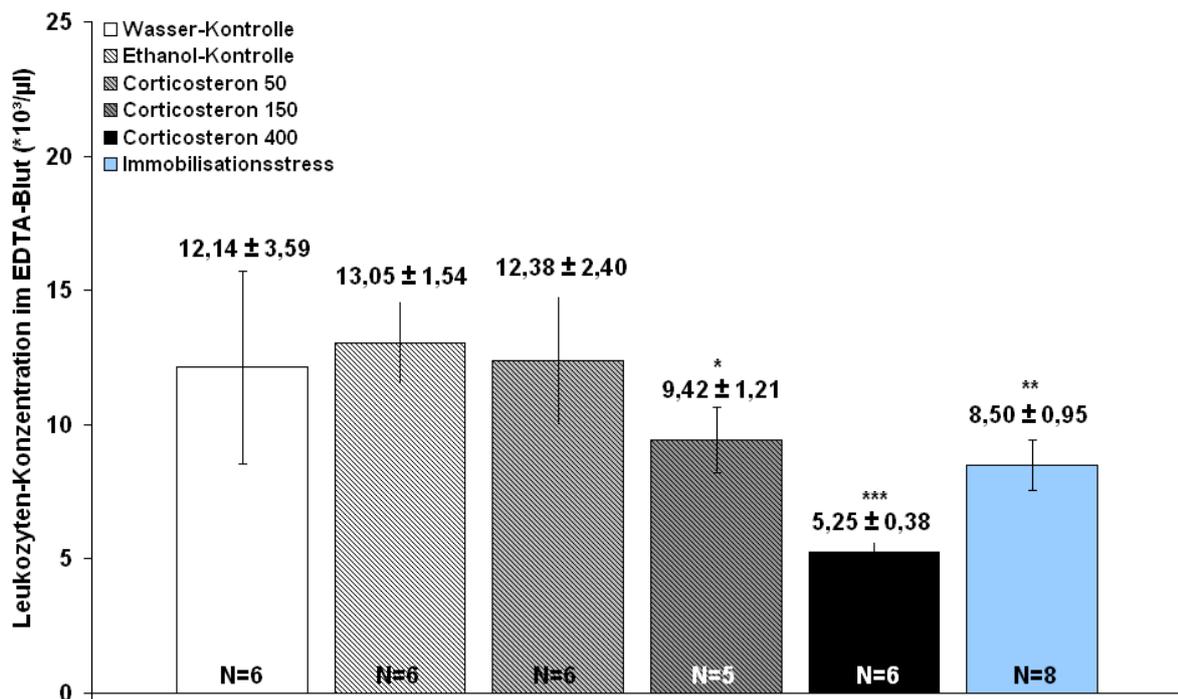


**Abb. 49:** Darstellung des Hämatokrit-Gehalts (%) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress, Corticosteron-Aufnahme sowie bei den entsprechenden Kontrollgruppen. Darstellung als MW ± SD; \*\*\* p < 0,001 (Bonferroni-Test, selektiert).

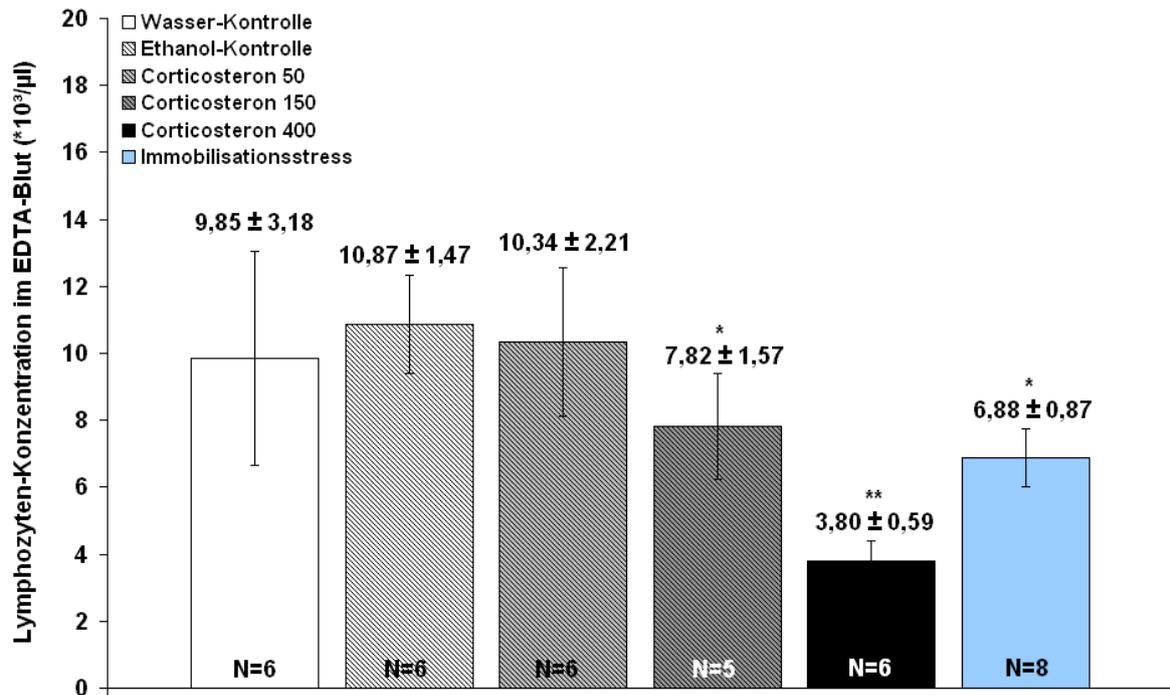
#### 4.3.3.8. Einfluss auf das weiße Blutbild

In den nachfolgenden Abbildungen 50-52 werden Leukozyten-, Lymphozyten- und Monozyten-Gehalt (jeweils  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut der Stress-, Corticosteron- und Kontrolltiere dargestellt.

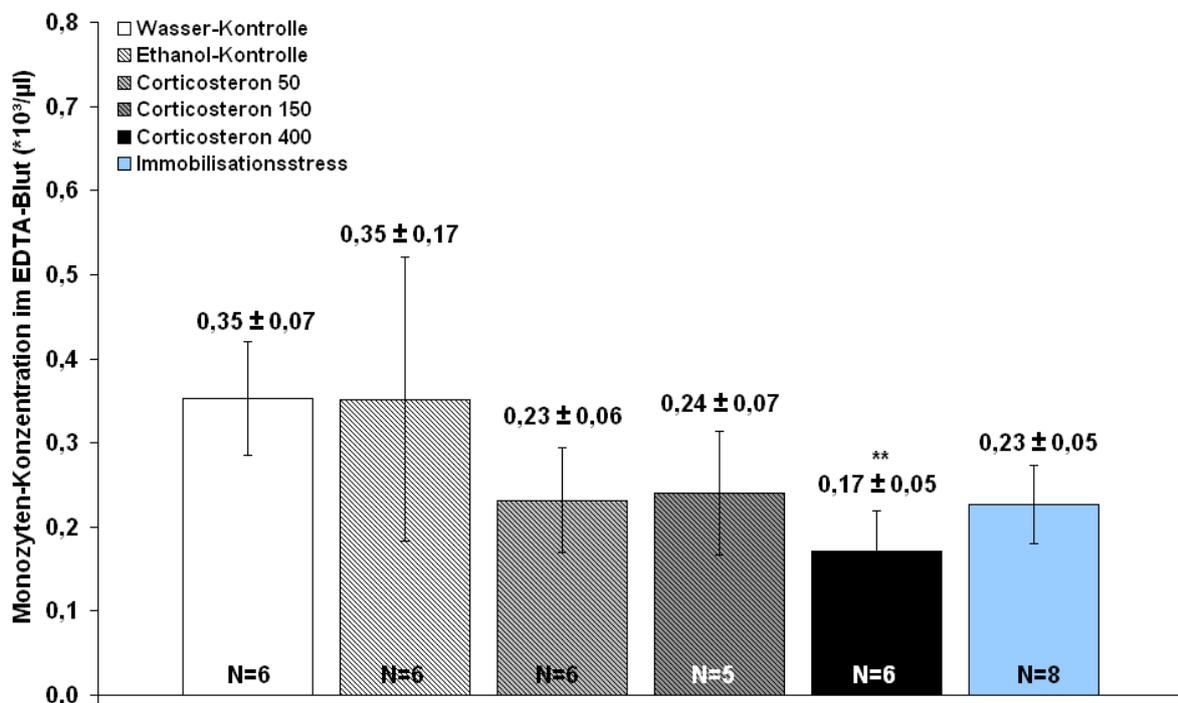
Die Tiere mit Corticosteron im Trinkwasser zeigten mit steigender Dosis eine Verminderung der Leukozyten- und Lymphozyten-Konzentrationen im EDTA-Vollblut. Dabei wies die Gruppe mit 150  $\mu\text{g/ml}$  Corticosteron im Trinkwasser jeweils einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ), die Gruppe mit 400  $\mu\text{g/ml}$  Corticosteron dagegen sogar einen hoch bzw. höchst signifikanten Unterschied ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ) zur Ethanol-Kontrolle auf. Zusätzlich war auch der Monozyten-Gehalt in dieser Gruppe hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) vermindert. Bei den immobilisierten Tieren waren die Gehalte an Leukozyten und Lymphozyten signifikant ( $p < 0,05$ ) bzw. hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) gegenüber der Wasser-Kontrolle vermindert, während wie bei den beiden Corticosteron-Gruppen mit den niedrigeren Dosierungen (50  $\mu\text{g/ml}$  bzw. 150  $\mu\text{g/ml}$ ) nur eine tendenzielle Verringerung der Monozyten-Konzentration vorlag. Bei allen 3 Zellpopulationen traten weiterhin keine Unterschiede zwischen den beiden Kontrollgruppen auf.



**Abb. 50:** Darstellung des Leukozyten-Gehalts ( $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress, oraler Corticosteron-Aufnahme sowie bei den entsprechenden Kontrollgruppen. Darstellung als MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Bonferroni-Test, selektiert).



**Abb. 51:** Darstellung des Lymphozyten-Gehalts ( $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut aller Versuchsgruppen an Tag 15. Darstellung als MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (Bonferroni-Test, selektiert).



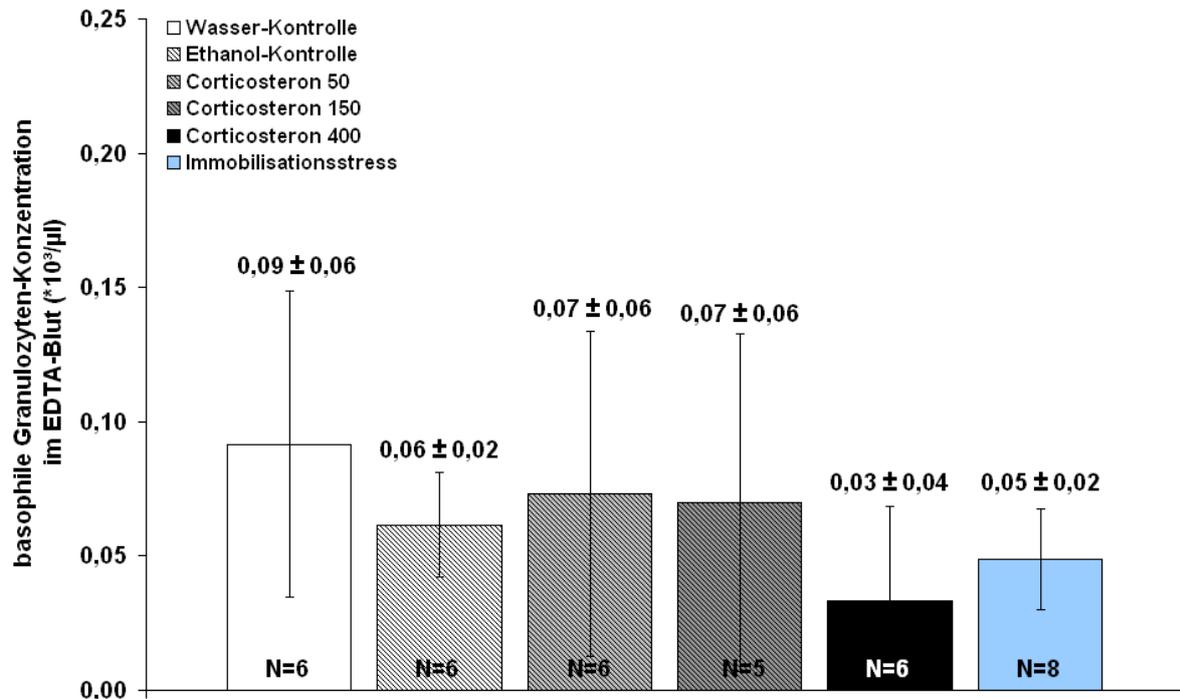
**Abb. 52:** Darstellung des Monozyten-Gehalts ( $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress, oraler Corticosteron-Aufnahme und bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Dargestellt als MW  $\pm$  SD; \*\*  $p < 0,01$  (Bonferroni-Test, selektiert).

Die Abbildungen 53-55 zeigen die Gehalte an basophilen, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten (jeweils  $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut bei den Tieren nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress bzw. 14-tägiger oraler Corticosteron-Aufnahme sowie bei den jeweiligen Kontrollgruppen.

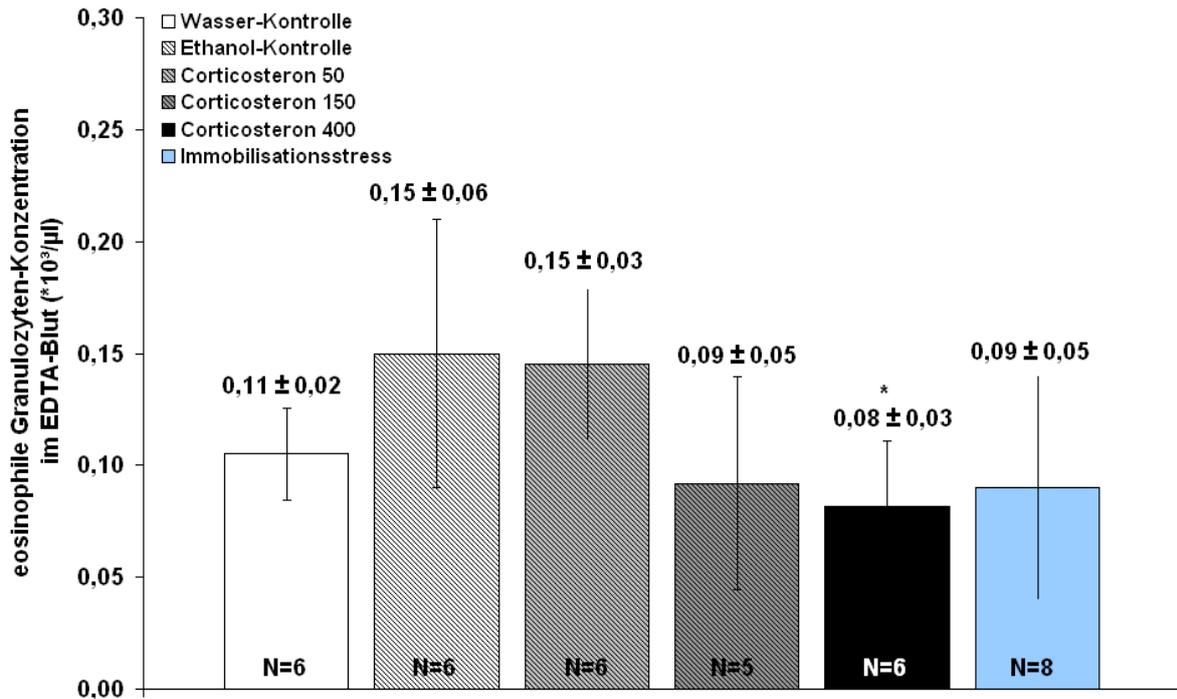
Bei Betrachtung dieser Diagramme ergibt sich bei den Tieren mit Corticosteron im Trinkwasser mit steigender Dosis eine Verminderung der eosinophilen Granulozyten-Konzentrationen im EDTA-Vollblut, wobei allerdings nur bei der höchsten Corticosteron-Dosierung eine signifikante Abnahme ( $p < 0,05$ ) gegenüber der Ethanol-Kontrolle vorlag.

Daneben erscheint eine tendenzielle Verringerung der Gehalte an basophilen Granulozyten bei der Stress- und Corticosteron 400-Gruppe gegenüber ihren jeweiligen Kontrollen vorzuliegen, jedoch ohne eine statistische Signifikanz zu besitzen.

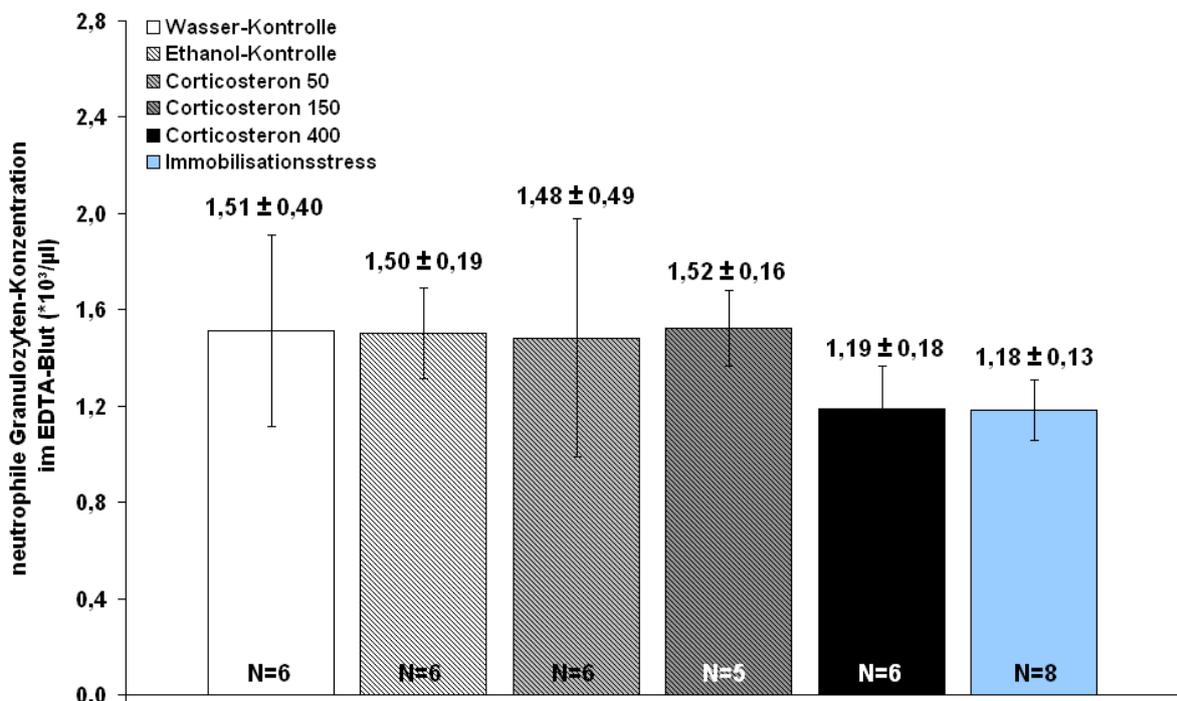
Bei allen anderen Gruppenvergleichen konnten keine weiteren Unterschiede festgestellt werden.



**Abb. 53:** Darstellung des Gehalts an basophilen Granulozyten ( $\cdot 10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress bzw. oraler Corticosteron-Aufnahme sowie bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Darstellung als MW  $\pm$  SD.



**Abb. 54:** Darstellung des Gehalts an eosinophilen Granulozyten ( $10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress, Corticosteron-Aufnahme und bei den jeweiligen Kontrollen. Darstellung als MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$  (Bonferroni-Test, selektiert).



**Abb. 55:** Darstellung des Gehalts an neutrophilen Granulozyten ( $10^3/\mu\text{l}$ ) im EDTA-Vollblut nach Immobilisationsstress, Corticosteron-Aufnahme und bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Dargestellt als MW  $\pm$  SD.

### 4.3.4. Diskussion

In den ersten beiden Versuchsabschnitten konnte gezeigt werden, dass 14-maliger täglicher 1-stündiger Immobilisationsstress eine mechanische Hyperalgesie auslöst, zu einer Erhöhung des Corticosteronspiegels führt und dieser Corticosteron-Anstieg für eine Reihe weiterer festgestellter Veränderungen im Rahmen der Stresswirkung (geringere Gewichtszunahmen, Stress-Erythropoese, Beeinflussung der negativen Rückkopplungs-Mechanismen) ursächlich sein kann. Daher hatten diese Versuche das Ziel, den Einfluss von verschiedenen Corticosteron-Dosierungen (50 µg/ml, 150 µg/ml, 400 µg/ml) im Trinkwasser vergleichend zum Immobilisationsstress hin zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass sowohl der 14-malige tägliche Immobilisationsstress, als auch die 14-tägige Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser (bei der höchsten Corticosteron-Dosierung von 400 µg/ml) bei den Versuchstieren eine ausgeprägte mechanische Hyperalgesie induzierten.

Wie in der Einleitung zu diesem Versuchsabschnitt beschrieben, existieren in der Literatur eine Reihe von Hinweisen, dass Stress-induzierte Corticosteron-Erhöhungen die Schmerzsensibilität verstärken können, was sich besonders im Zusammenhang mit der bereits beschriebenen Stress-induzierten viszerale Hyperalgesie zeigt (Hong et al., 2011; Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2012). Die Ergebnisse in den eigenen Versuchen konnten nun auch zum ersten Mal zeigen, dass eine mechanische Hyperalgesie über eine 14-tägige Corticosteron-Aufnahme (400 µg/ml) über das Trinkwasser induziert werden kann (Corticosteron-induzierte Hyperalgesie).

Über die zugrunde liegenden Mechanismen finden sich bisher nur wenige Hinweise in der Literatur. Im Rahmen der Untersuchungen zur Stress-induzierten viszerale Hyperalgesie von Myers & Greenwood-Van Meerveld (2007) konnte über eine exogene Corticosteron-Applikation innerhalb der Amygdala eine Verstärkung der Schmerzwahrnehmung induziert werden. Zusätzlich dazu stellten sie die Beteiligung von Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-Rezeptoren bei der Sensibilisierung der Nozizeption fest, wobei speziell die Glucocorticoid-Rezeptoren mit der ebenfalls festgestellten mechanischen Hyperalgesie in Zusammenhang gebracht wurden (Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2010a). Diese Corticosteroid-Rezeptoren sollen zusätzlich auch bei der Vermittlung des „Wasser-Avoidance“-Stress eine wichtige Rolle spielen, da die Blockade dieser Rezeptoren die Hyperalgesie nach 10-tägigem Stress aufheben konnte (Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2010a; 2012).

Auch in einem weiteren Modell der Stress-induzierten viszerale Hyperalgesie konnte eine Mitbeteiligung von Corticosteron und den Glucocorticoid-Rezeptoren festgestellt werden (Hong et al., 2011). Sowohl der 10-tägige Stress, als auch die subkutane Corticosteron-Injektion für 10 Tage führen zu einer Erhöhung von Corticosteron im Plasma sowie zu einer viszerale Hyperalgesie. Werden auch hier die Glucocorticoid-Rezeptoren durch gleichzeitige Gabe eines Antagonisten gehemmt, findet keine Sensibilisierung der viszerale Schmerzwahrnehmung statt. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, zeigte sich im

Bereich der Spinalganglien eine Mitbeteiligung von Cannabinoid-1- sowie von TRPV1-Rezeptoren. Letztere wurden dabei durch Corticosteron hoch reguliert, während die Expression der Cannabinoid-1-Rezeptoren verringert war (Hong et al., 2011).

Diese Hinweise aus der Literatur sowie die in den eigenen Versuchen festgestellte Corticosteron-induzierte Hyperalgesie deuten darauf hin, dass Corticosteron eine Schlüsselrolle bei der Immobilitätsstress-induzierten Hyperalgesie spielen kann.

Neben dieser neuen Rolle ist von Corticosteron bekannt, dass es in einer Vielzahl von Experimenten bei Ratten ein depressionsähnliches Verhalten auslösen kann (Johnson et al., 2006; Marks et al., 2009; Iijima et al., 2010). Depressionen kommen auch oftmals bei Patienten mit somatoformen und funktionellen Syndromen wie der Fibromyalgie vor (Schweinhardt et al., 2008; Häuser et al., 2010), was zusätzlich für die Rolle von Glucocorticoiden bei der pathologischen Sensibilisierung der Schmerzwahrnehmung spricht.

War die Corticosteron-Konzentration im Plasma sowohl bei den Stresstieren als auch bei den Tieren mit der höchsten Corticosteron-Dosierung (400 µg/ml) erhöht, zeigte sich dagegen nur bei den gestressten Tieren eine Erhöhung des ACTH-Gehalts im Plasma, was einhergeht mit anderen Ergebnissen aus der Literatur (Djordjevic et al., 2007). Ebenso waren bei diesen Tieren die Nebennieren im Vergleich zu den Wasser-Kontrollen vergrößert, was durch die stark vergrößerte Nebennierenrinde, speziell die Zona fasciculata, bedingt war. Diese Vergrößerung beruht auf einer gleichzeitigen zellulären Hypertrophie und Hyperplasie der endokrin aktiven Zellen der Zona fasciculata (Ulrich-Lai et al., 2006; Donner et al., 2011), was auch auf den histologischen Schnittbildern festgestellt werden konnte. Durch den hohen ACTH-Spiegel im Plasma induziert, wird von diesen Zellen Corticosteron produziert, was durch die ebenfalls hohen Corticosteron-Spiegel im Plasma zum Ausdruck kommt. Daraus kann geschlossen werden, dass bei diesen Tieren die negative Feedback-Hemmung gestört ist. Das kann mit einer verminderten Sensitivität der Glucocorticoid-Rezeptoren im Bereich der Hypophyse oder des Hypothalamus zusammenhängen, wodurch die Eigenhemmwirkung von Corticosteron vermindert ist (Holsboer, 2000; Pariante, 2009).

Im Gegensatz dazu fanden sich bei den Corticosteron-Tieren dosisabhängig verringerte ACTH-Konzentrationen im Plasma sowie verkleinerte Nebennieren. Gerade bei den Tieren mit der höchsten Corticosteron-Konzentration im Trinkwasser erschienen die Zona fasciculata durch die ebenso atrophierten Zellkörper verkleinert. Diese Beobachtungen sprechen dagegen eher dafür, dass in diesem Fall die negativen Rückkopplungs-Mechanismen noch aktiv sind. Somit scheint Corticosteron entgegen anderen Versuchsergebnissen (Young & Vazquez, 1996; Magariños et al., 1998) allein nicht in der Lage zu sein, die Feedback-Mechanismen außer Kraft zu setzen. Ähnliche Ergebnisse stellten auch Donner et al. (2011) fest, die nach 3-wöchiger oraler Gabe von jeweils verschiedenen Corticosteron-Konzentrationen eine dosisabhängige Verringerung der ACTH-Konzentration im Plasma, verkleinerten Nebennieren und somit ebenso intakte Rückkopplungs-Mechanismen fanden. Sie vermuteten in diesem Zusammenhang, dass 14 Tage bzw. 3 Wochen Versuchsdauer nicht ausreichend sind, um diese Feedback-Hemmung außer Kraft zu setzen.

Durch die unterschiedlich hohen ACTH-Spiegel stellt sich die Frage, welche Rolle ACTH bei der Induzierung der Hyperalgesie spielt und inwieweit sich die beiden Testmodelle dadurch unterscheiden. Hohe ACTH-Spiegel können auf eine gleichzeitig hohe  $\beta$ -Endorphin-Ausschüttung hindeuten, da beide Peptidhormone aus demselben Vorläufermolekül POMC entstehen. Für Opioide wie das  $\beta$ -Endorphin wird wiederum angenommen, dass sie als ein wichtiger Mediator der akuten Immobilisationsstress-induzierten Analgesie (Abschnitte 2.3.2.1. und 2.3.3.1.) gelten. Allerdings können bei andauernd hohen Spiegel von Opioiden Toleranzeffekte auftreten, welche bereits im Zusammenhang mit chronischem Immobilisationsstress festgestellt wurden (Dantas et al., 2005; Konopka & van Wijhe, 2010). Eine solche Toleranzwirkung geht mit einem fehlenden oder verminderten Analgesie-Effekt einher, was die Ausbildung einer Hyperalgesie begünstigt. In diesem Zusammenhang konnte für  $\beta$ -Endorphin-defiziente Mäuse gezeigt werden, dass diese nach einem akuten Schwimmstress keine Analgesie im Vergleich zu nicht defizienten Mäusen aufwiesen (Parikh et al., 2011).

Dennoch ist die Rolle der Hypophysen-Hormone in Bezug auf diesen analgetischen Effekt widersprüchlich, da beispielsweise für das Melanozyten-stimulierende Hormon ein gegensätzlicher Effekt auf die  $\beta$ -Endorphin induzierten Analgesie nachgewiesen werden konnte (Starowicz & Przewlocka, 2003; Imbe et al., 2006). Zusätzlich spricht dagegen, dass das nach Stress ausgeschüttete POMC-Releasing-Hormon CRH ebenso analgetisch wirkt (Ji & Neugebauer, 2007), diese Analgesie allerdings nicht auf einer nachgeschalteten  $\beta$ -Endorphin-Wirkung beruht (Lariviere & Melzack, 2000; Yarushkina et al., 2011). Um genauere Aussagen treffen zu können, sind dafür weitere Untersuchungen wie beispielsweise die Bestimmung von  $\beta$ -Endorphin und/oder CRH im Plasma notwendig.

Ein weiterer Unterschied zwischen der Immobilitätsstress-induzierten und der Corticosteron-induzierten Hyperalgesie liegt vermutlich in der unterschiedlichen pulsatilen Ausschüttung von endogenem Corticosteron. Durch die Aufnahme von Corticosteron über das Trinkwasser soll eine gewisse diurnale Rhythmik der endogenen Corticosteron-Ausschüttung erhalten bleiben, da sich der superphysiologische Plasmaspiegel über den ganzen Tageszeitraum durch regelmäßige Aufnahme von Trinkwasser einstellt (Karatsoreos et al., 2010; Donner et al., 2011). Stress erzeugt dagegen einen starken Peak-förmigen Corticosteron-Anstieg im Plasma, der sich durch negative Rückkopplungsmechanismen und die renale Ausscheidung der Glucocorticoide normalerweise binnen weniger Stunden wieder auf das basale Niveau reguliert (Windle et al., 1998; Abschnitt 2.1.4.). Wird der Stress dagegen wiederholt eingesetzt, so kann es zu Dysfunktionen innerhalb dieser Rückkopplungssysteme kommen und die Plasmaspiegel von Corticosteron bleiben erhöht, wie es in den eigenen Versuchen festgestellt wurde.

Daneben stellte sich die Frage, inwieweit eine Mitbeteiligung des sympathoadrenergen Systems bei der Vermittlung der Stresswirkung von 14-maligem Immobilisationsstress und 14-maliger Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser vorliegt. Bei Betrachtung der histologischen Befunde wurden zumindest keine auffälligen morphologischen Veränderungen am Nebennierenmark sowie den chromaffinen Zellen festgestellt, was

ebenso mit den Versuchsergebnissen von Donner et al. (2011) einhergeht. Dennoch konnte bei anderen Stress-Modellen wie z. B. bei einem wiederholten variablen Stress gezeigt werden, dass durch diesen eine Hypertrophie des Nebennierenmarks induziert wird (Ulrich-Lai et al., 2006), was auf eine Stressor-spezifische Beteiligung des Nebennierenmarks bei der Vermittlung der Stresswirkung hindeutet. Dafür spricht auch die Tatsache, dass beispielsweise die Lärm-Stresswirkung auf die Nozizeption fast ausschließlich über sympathoadrenerge Mechanismen abläuft (Khasar et al., 2005; 2009; Donello et al., 2011). Aufgrund der Befunde in den eigenen Untersuchungen kann somit eine Mitbeteiligung des sympathoadrenergen Systems bei der Vermittlung der Stresswirkung nicht ganz ausgeschlossen werden, was weitere Untersuchungen zur genaueren Abklärung notwendig macht.

Bei Betrachtung der Gewichtszunahmen gehen die Werte der Corticosteron-Tiere einher mit bereits bekannten Ergebnissen aus der Literatur, in denen Corticosteron ebenso dosisabhängig die täglichen Gewichtszunahmen vermindert (Johnson et al., 2006; Scherer et al., 2011). Somit kann Corticosteron als Mediator der Gewichtsverluste angesehen werden, da die täglichen Körpergewichtszunahmen auch bei den Immobilisationsstress-Tieren im Vergleich zu ihren Kontrollen (wie im vorherigen Versuchsabschnitt) verringert waren. Über welchen genauen Mechanismus Corticosteron dies vermittelt ist allerdings bisher noch unklar (Scherer et al., 2011).

Die absoluten Futter- und Trinkwasseraufnahmen waren bei den Tieren mit Corticosteron im Trinkwasser sowie bei den immobilisierten Tieren tendenziell geringer, jedoch konnte aufgrund der zu geringen N-Zahl keine statistische Aussage getroffen werden. Bezieht man die Menge der aufgenommenen Nahrung auf das Tiergewicht, so zeigte sich bei der höchsten Corticosteron-Dosierung und der Immobilitätsstress-Gruppe eine tendenzielle relative Zunahme des Futter- und Trinkwasserverbrauchs. Auch hier konnte wegen der zu geringen Käfiganzahl keine statistische Aussage getroffen werden. Dennoch gehen diese tendenziellen Beobachtungen mit den anderen Ergebnissen einher, in denen Corticosteron im Trinkwasser bei Mäusen und Ratten eine dosisabhängige Zunahme des relativen Futter- und Trinkwasserverbrauchs bewirkte (Karatsoreos et al., 2010; Donner et al., 2011).

Die Glucose-Spiegel im Plasma waren bei den immobilisierten Tieren erneut tendenziell verringert, während diese Verringerung bei den Tieren mit 400 µg/ml Corticosteron im Trinkwasser eine statistische Signifikanz besaß. Auch Donner et al. (2011) stellten bei ihren Corticosteron-Tieren entgegen ihrer Erwartungen eine Verringerung des Glucose-Spiegels im Plasma fest, da Glucocorticoide die Gluconeogenese stimulieren (Yoon et al., 2001), gleichzeitig die Translokalisierung des Insulin-sensitiven Glucose-Transporters 4 in die Zellmembran vermindern (Dimitriadis et al., 1997) und verschiedene inhibitorische Wirkungen auf die Insulinfreisetzung besitzen (Delaunay et al., 1997; Labillotte et al., 1997). Durch die Bestimmung des Insulins im Plasma konnte zumindest für die Tiere mit Corticosteron im Trinkwasser eine Erklärung für die nicht erhöhten Glucose-Spiegel gefunden werden, da die Tiere im Vergleich zu ihrer Kontrolle eine signifikante (Corticosteron 150) bzw. höchst signifikante Insulinämie (Corticosteron 400) aufwiesen, was zu einer

verstärkten Aufnahme der Glucose aus dem Blut in die Zellen führt. Solche erhöhten Insulin-Plasmaspiegel wurden auch bei Mäusen festgestellt, die Corticosteron über das Trinkwasser verabreicht bekommen haben (Karatsoreos et al., 2010). Solche hohen Insulinwerte bei gleichzeitig hohen Corticosteron-Konzentrationen deuten darauf hin, dass die inhibitorische Wirkung von Glucocorticoiden auf die Insulinfreisetzung möglicherweise insuffizient war, was durch eine verminderte Glucocorticoid-Rezeptor-Wirkung bedingt sein kann (Andrews & Walker, 1999; Opherk et al., 2004; Vegiopoulos & Herzig, 2007; Rose et al., 2010). Dies hat weiterhin zur Folge, dass durch die Insulinämie die Sensitivität der Insulin-Rezeptoren reduziert wird (van Raalte et al., 2009), was schließlich zu einer Insulin-Resistenz führen kann.

Bei den Tieren mit Immobilitätsstress trat jedoch entgegen der Erwartungen keine Erhöhung des Insulin-Spiegels auf, wodurch der tendenziell verminderte Glucose-Spiegel nicht durch Insulin-Wirkung erklärt werden kann. Jedoch spielen bei der komplexen Regulation der Blutspiegel von Insulin und Glucose beispielsweise auch Sympathikus und Parasympathikus eine Rolle, deren Funktion ebenso durch externe Stressoren beeinflusst werden kann (Sjöstrand & Eriksson, 2009). Dennoch deutet diese tendenzielle Verminderung des Glucose-Spiegels trotz der erhöhten Corticosteron-Konzentration im Plasma auch auf eine Beeinträchtigung des Glucocorticoid-Rezeptors hin (Andrews & Walker, 1999; Opherk et al., 2004).

Bei Betrachtung der Untersuchungsergebnisse des roten Blutbilds konnten nach 14-maligem Immobilisationsstress erneut höchst signifikante Erhöhungen der Erythrozyten-Konzentration, des Hämoglobin-Gehalts und des Hämatokrits festgestellt werden. Bereits im vorherigen Abschnitt 4.2.3. wurde diskutiert, dass bei dieser Stress-Erythropoese (Socolovsky, 2007) Corticosteron und die Glucocorticoid-Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen können (Golde et al., 1976; Wessely et al., 1997; Bauer et al., 1999). Die bestätigt sich durch die Ergebnisse der Tiere mit den beiden höchsten Corticosteron-Konzentrationen im Trinkwasser, die ebenfalls höchst signifikante Erhöhungen der Erythrozyten-Konzentration, des Hämoglobin-Gehalts und des Hämatokrits aufwiesen.

Die Untersuchungen zum weißen Blutbild zeigten im Gegensatz zum vorherigen Abschnitt statistisch signifikante bzw. hoch signifikante Verminderungen der Leukozyten- und Lymphozyten-Populationen sowie eine tendenzielle Verringerung der Monozyten-Konzentration bei den immobilisierten Tieren im Vergleich zu ihren Kontrollen. Wie bereits beschrieben, kann mehrwöchiger Immobilisationsstress (in Verbindung mit Rotationsstress) die Lymphozyten-, Monozyten und Leukozyten-Konzentration durch die anhaltende Wirkung von Glucocorticoiden im Blut vermindern (Dhabhar et al., 1996; Dhabhar & McEwen, 2001; Dhabhar, 2009). Diese beschriebene Glucocorticoid-Wirkung zeigt sich auch bei den Corticosteron-Tieren, da 400 µg/ml Corticosteron im Trinkwasser höchst signifikante bzw. hoch signifikante Verminderungen der Leukozyten-, Lymphozyten- und Monozyten-Konzentrationen induziert. In diesem Zusammenhang ist beschrieben, dass Corticosteron über die Aktivierung der Glucocorticoid-Rezeptoren die Apoptose dieser Blutzellen sowie der eosinophilen Granulozyten induziert (Helmberg et al., 1995; Meagher et al., 1996), was

ebenso die Verminderung dieser Granulozyten-Population bei den Tieren mit der höchsten Corticosteron-Dosierung erklärt.

Zusammenfassend konnte in den eigenen Versuchen gezeigt werden, dass neben 14-maligem täglichen Immobilisationsstress auch die Dosierung von 400 µg/ml Corticosteron im Trinkwasser für 14 Tage eine mechanische Hyperalgesie induzieren kann. Weiterhin fand beim Immobilisationsstress ein Ausfall der negativen Feedback-Hemmung statt, was sich in Form von vergrößerten Nebennieren sowie gleichzeitig erhöhten ACTH- und Corticosteron-Spiegeln im Plasma ausgedrückt hat. Diese vermehrten Glucocorticoide führten neben der erhöhten mechanischen Schmerzsensibilität zu geringeren täglichen Körpergewichtszunahmen sowie zu Veränderungen am Differentialblutbild und Kohlenhydrat-Stoffwechsel. Dabei müssen diese festgestellten Corticosteron-Wirkungen zwangsläufig auch durch die Glucocorticoid-Rezeptoren vermittelt werden, deren Rolle bei diesem Geschehen allerdings noch nicht ganz klar ist. Denn gerade im Zusammenhang mit der fehlenden Feedback-Hemmung beim Immobilisationsstress und den Veränderungen am Kohlenhydrat-Stoffwechsel kann die Glucocorticoid-Rezeptor-Wirkung verändert sein, wohingegen sie allerdings bei den Veränderungen am Differentialblutbild als normal angenommen wird. Aufgrund dieser uneinheitlichen Datenlage sind weiterführende Untersuchungen notwendig, um die Rolle des Glucocorticoid-Rezeptors bei der Stress- und Corticosteron-induzierten Hyperalgesie näher zu charakterisieren.

## 4.4. Einfluss von Immobilisationsstress und oraler Corticosteron-Aufnahme auf die Glucocorticoid-Rezeptoren

### 4.4.1. Einleitung

Bisher konnte gezeigt werden, dass täglicher 2-wöchiger Immobilisationsstress bei Ratten zur Erhöhung des Corticosteron-Plasmaspiegels an Tag 15 führte und diese Tiere gleichzeitig eine mechanische Hyperalgesie aufwiesen (Abschnitte 4.1. und 4.2.). Beides konnte ebenso durch eine 2-wöchige Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser imitiert werden (Abschnitt 4.3.). Daher wurde angenommen, dass die andauernde Erhöhung des Plasma-Corticosteron-Spiegels eine wichtige Rolle beim Hyperalgesie-Geschehen spielt und dies über die Glucocorticoid-Rezeptoren vermittelt wird. Bisher wurde dieser Zusammenhang von einer veränderten Glucocorticoid-Rezeptor-Wirkung nach wiederholtem Stress und einer vermehrten Schmerzempfindung noch nicht untersucht.

Die Wirkweise dieser Rezeptoren basiert entweder auf Aktivierung oder Hemmung der Transkription von bestimmten Genen. Daneben sind auch membranständige Glucocorticoid-Rezeptoren bekannt, die schnelle Reaktionen über Second-Messenger-Kaskaden vermitteln (Abschnitt 2.1.4.3.). Über diese Mechanismen können Stress und Glucocorticoide die Freisetzung von Neurotransmittern beeinflussen, die auch eine Rolle bei Modulation von nozizeptiven Signalen spielen (Abschnitt 2.2.4.). Als Beispiel dafür dienen die vermehrte Bildung und Sezernierung von Endocannabinoiden nach Aktivierung von membranständigen Glucocorticoid-Rezeptoren (Tasker et al., 2006; Di et al., 2009;) sowie die Beeinflussung der glutamatergen Neurotransmission (Musazzi et al., 2010; Popoli et al., 2011).

Lediglich in zwei Tiermodellen der Stress-induzierten viszerale Hyperalgesie (Abschnitt 2.3.4.8.) konnte bisher nachgewiesen werden, dass der Glucocorticoid-Rezeptor für das Hyperalgesie-Geschehen eine wichtige Rolle spielt, da die Blockade dieser Rezeptoren die vermehrte viszerale Schmerzempfindung aufhob (Hong et al., 2011; Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2012).

Zusätzlich konnte auch in einem neuropathischen Hyperalgesie-Modell die wichtige Rolle der Glucocorticoid-Rezeptoren gezeigt werden (Wang et al., 2004). Neben dem Nachweis der vermehrten Expression von Glucocorticoid-Rezeptor-mRNA wurde nach Blockade dieser Rezeptoren die Hyperalgesie abgeschwächt (Takasaki et al., 2005).

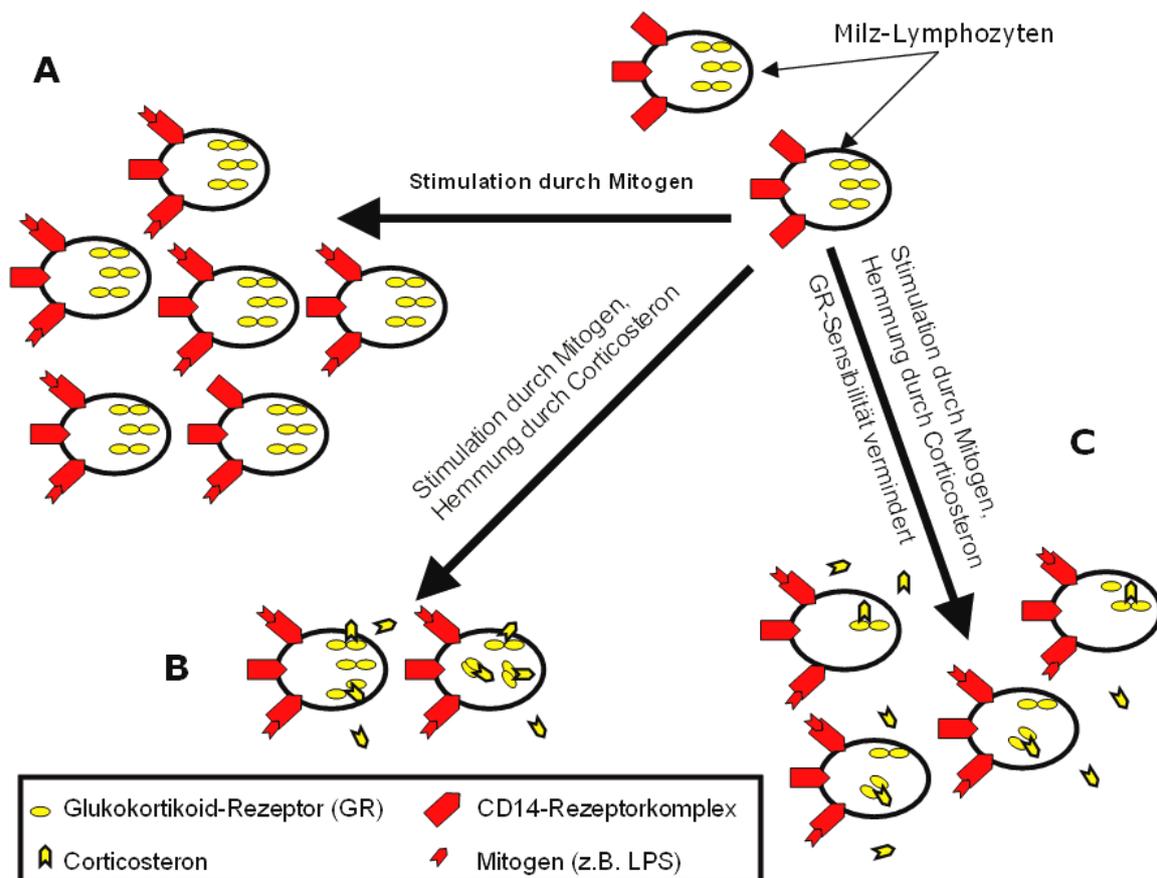
Neben diesen tierexperimentellen Ergebnissen wurden auch beim Menschen mit Fibromyalgie-Syndrom eine veränderte Glucocorticoid- und Mineralocorticoid-Rezeptor-Expression sowie Aktivität festgestellt (Macedo et al., 2008). Ebenso fand sich bei Fibromyalgie-Patienten eine Verminderung der Glucocorticoid-Rezeptor-Sensitivität (Lentjes et al., 1997; Geiss et al., 2012), was jedoch in einer anderen Studie nicht bestätigt werden konnte (Wingenfeld et al., 2008).

Diese Daten, die eine Beteiligung der Glucocorticoid-Rezeptoren bei Veränderungen der Schmerzempfindlichkeit beschreiben, deuten darauf hin, dass die Glucocorticoid-Rezeptoren

möglicherweise auch in den eigenen Versuchen bei der Vermittlung der Corticosteron-induzierten Hyperalgesie involviert sind.

Um dies zu überprüfen, wurden deshalb die Expression sowie die Funktionalität der Glucocorticoid-Rezeptoren untersucht. Die Corticosteroid-Rezeptoren kommen ubiquitär in allen kernhaltigen Körperzellen vor, daher können über die Bestimmung der Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte und -Funktionalität in Lymphozyten auch Rückschlüsse über Veränderungen dieser Rezeptoren im Gehirn gewonnen werden (Lowy, 1991; Pariante et al., 1995; Yehuda et al., 1995; Gotovac et al., 2003).

Die Sensitivität dieser Steroid-Rezeptoren kann dabei über einen Lymphozyten-transformationstest (LTT) (Wiegiers et al., 1994) bestimmt werden. Durch ein Mitogen werden ruhende Lymphozyten in proliferierende Lymphoblasten umgewandelt. Als Maß der Proliferation gilt dabei der Einbau radioaktiv markierter Nukleotide in die DNA (z. B. 3H-Thymidin). Corticosteron supprimiert dabei diese Proliferation, während bei einer Hemmung der Corticosteron-induzierten Suppression die Lymphoblasten stärker proliferieren. In der nachfolgenden Abbildung 56 wird das Prinzip dieses Tests schematisch dargestellt.



**Abb. 56:** Schematische Darstellung des Prinzips des Lymphozytentransformationstests am Beispiel der Lipopolysaccharid (LPS)-Stimulation (A), der gleichzeitigen Hemmung durch Corticosteron (B) und der möglichen Aufhebung dieses hemmenden Effekts aufgrund einer verminderten GR-Sensibilität (C).

Neben der Ansprechbarkeit wurde auch die Dichte der Glucocorticoid-Rezeptoren über 2 semi-quantitative Verfahren (Durchflusszytometrie „Fluorescence Activated Cell Sorting“ (FACS) und Western-Blotting) bestimmt. Über eine Markierung der Glucocorticoid-Rezeptoren mit fluoreszierenden Antikörpern kann in Zellkulturen bzw. Lymphozytenpopulationen semiquantitativ die Anzahl dieser Rezeptoren erfasst werden (Gotovac et al., 2003; Voutsas et al., 2007; Butts et al., 2007).

Daneben ist auch der Western-Blot (WB) sehr gut dafür geeignet (Spencer et al., 2000). Bei dieser Technik werden die Proteine zunächst (aufgrund ihrer Größe, meist über Elektrophorese) in Banden innerhalb einer Trägermatrix aufgetrennt. Daraufhin werden diese Banden durch ein elektrisches Feld auf eine Membran übertragen, wo die spezifischen Proteine über markierte Antikörper gefärbt werden können.

In vielen bisherigen Untersuchungen zur Bestimmung der Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte wurde oftmals auch der Ribonukleinsäure (RNA)-Nachweis angewandt. Gegenüber dieser Methode ist bei der FACS- und Western-Blotting-Bestimmung vorteilhaft, dass nach Permeabilisierung der Zellen alle Rezeptoren sowie auch die aktivierten nukleären Rezeptor-Dimere bzw. Monomere erfasst werden können (Butts et al., 2007; Noguchi et al., 2010). Weiterhin wird im Gegensatz zur RNA-Bestimmung die tatsächlich vorhandene Menge des Glucocorticoid-Rezeptor-Proteins bestimmt, die mitunter stark vom RNA-Gehalt abweichen kann (Spencer et al., 2000; Noguchi et al., 2010).

Im Zusammenhang mit der durchflusszytometrischen Untersuchung bzw. der Western-Blot-Analyse des Glucocorticoid-Rezeptors zeigten Sarabdjitsingh et al. (2010b), dass dafür der Antikörper-Klon BuGR2 besonders geeignet ist, da speziell bei diesem im Gegensatz zu anderen Antikörper-Klonen keine Unterschiede zwischen In-vivo und In-vitro-Bedingungen feststellbar waren.

## **4.4.2. Material und Methoden**

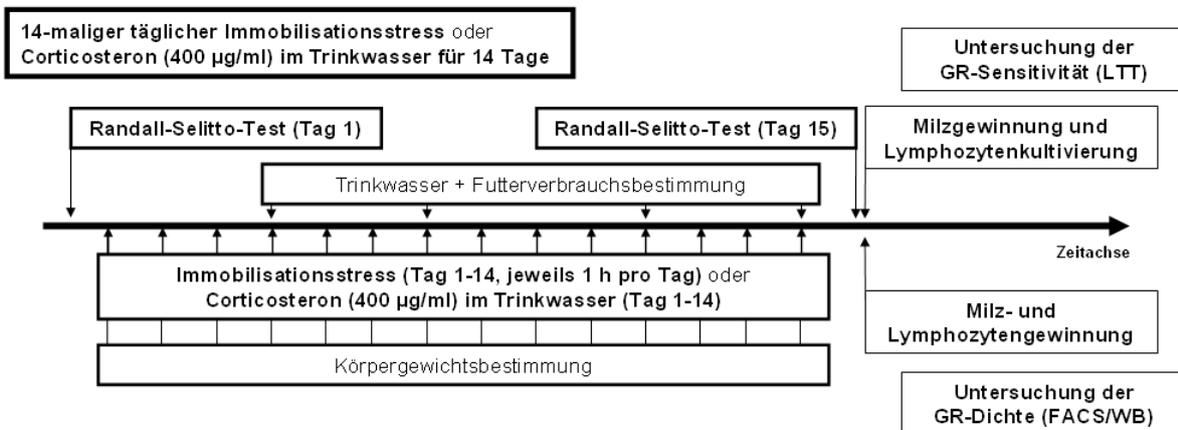
### **4.4.2.1. Versuchsaufbau**

Es wurden wie in den vorherigen Versuchen dieselbe Versuchstierart (Wistar-Ratten, männlich, 8–10 Wochen alt, 180 g bis 220 g schwer), dieselben Stressbedingungen (Immobilisationsstress mittels Plexiglas-Röhren, eine Stunde täglich für 14 aufeinanderfolgende Tage), dieselbe Methodik zur oralen Verabreichung von Corticosteron über das Trinkwasser (2 Wochen lang 400 µg/ml) sowie dieselbe Messmethodik zur Erfassung der mechanischen Schmerzsensibilität (Randall-Selitto-Test, Messungen vor und nach Immobilisationsstress) wie in den Abschnitten 4.1.2. und 4.3.2. verwendet.

Der Versuchsablauf (Abbildung 57) gleicht grundlegend dem des vorangegangenen Abschnitts, jedoch wurde sich aufgrund der Ergebnisse aus Abschnitt 4.3.3. auf die höchste Corticosteron-Dosierung (400 µg/ml) im Trinkwasser beschränkt. Anschließend an die letzten Nozizeptionsmessungen mit dem Randall-Selitto-Apparat erfolgte die Gewinnung des Probematerials. Dazu wurden die Milzen extrahiert und daraus die Lymphozyten gewonnen.

Für die Sensitivitätsuntersuchung des Glucocorticoid-Rezeptors mit Hilfe des Lymphozyten-transformationstests fand eine Kultivierung der Zellen statt. Für die Dichte-Bestimmung der Glucocorticoid-Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot wurde eine zweite Kohorte von Tieren zur Gewinnung der Milz-Lymphozyten verwendet. Aufgrund des höheren Zeitaufwands bei der Gewinnung und Trennung der Zellen mussten die Präparationen und Schmerzmessungen über mehrere Tage gestaffelt werden. Dabei erfolgte dies immer im Zeitfenster von 9 bis 14 Uhr, um vergleichbare Bedingungen zu den Vormessungen zu ermöglichen und um den Einfluss der ultradianen Rhythmik der HPA-Achse zu minimieren.

## Versuchsablauf



**Abb. 57:** Darstellung des Versuchsablaufs, um die Auswirkungen von 2-wöchigem Immobilisationsstress und 400 µg/ml Corticosteron im Trinkwasser für 14 Tage auf Glucocorticoid-Rezeptor-Sensitivität und -Dichte in Milz-Lymphozyten festzustellen. Vor Versuchsbeginn hatten die Tiere eine Eingewöhnungszeit von mindestens einer Woche.

Insgesamt wurden dafür 50 Tiere verwendet, die Gruppengröße betrug  $N = 6$  Tiere (Ausnahme: Immobilitätsstress-Gruppen mit  $N = 7$ ). Als Kontrollgruppen dienten jeweils erneut die Trinkwasser- und die Ethanol-Gruppen. Die Tiere der Immobilisationsstress-Gruppe wurden analog den vorherigen Versuchen einmal täglich für 1 Stunde lang gestresst und hatten dabei keine Zusätze im Trinkwasser. Dagegen war das Trinkwasser der Ethanol-Tiere mit insgesamt 2,5% Ethanol (Vehikel) versetzt. Die Corticosteron-Gruppen hatten zusätzlich noch Corticosteron (400 µg/ml) im Trinkwasser vorliegen. In Tabelle 5 werden die 8 Gruppen innerhalb der Teilversuche zusammenfassend dargestellt.

**Tab. 5:** Übersicht der Versuchsteile und -gruppen zur Untersuchung der Auswirkung von 14-tägigem Immobilisationsstress und 400 µg/ml Corticosteron im Trinkwasser auf die Glucocorticoid-Rezeptor-Sensitivität und -Dichte in Milz-Lymphozyten.

Versuchsteil	Untersuchung	Gruppenname	Tieranzahl
<b>A</b>	von GR-Sensitivität mittels Lymphozytentransformationstest	Wasser-Kontrolle	6
		Immobilitätsstress	7
<b>B</b>	von GR-Sensitivität mittels Lymphozytentransformationstest	Ethanol-Kontrolle	6
		Corticosteron 400	6
<b>C</b>	von GR-Dichte mittels Western-Blot und Durchflusszytometrie	Wasser-Kontrolle	6
		Immobilitätsstress	7
<b>D</b>	von GR-Dichte mittels Western-Blot und Durchflusszytometrie	Ethanol-Kontrolle	6
		Corticosteron 400	6

#### 4.4.2.2. Gewinnung und Kultivierung von Milzlymphozyten

Bei der Obduktion wurde die Milz präpariert und vorsichtig in eine mit „Hank's Balanced Salt Solution“ (HBSS) (Hanks Balanced Salt Solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gefüllte Petrischale überführt. Die Milzzellen wurden durch das Reiben der Milz zwischen zwei Objektträgern gewonnen. Die entstandene Zellsuspension wurde für 5 min in ein V-förmiges Reagenzglas zum Absetzen der groben Gewebspartikel überführt. Nach Vorlage von 3 ml eines Lymphozyten-Trennmediums (Lymphodex, inno-Train/Gull Laboratories, Kronberg) in ein weiteres Reagenzglas wurde dieses Medium vorsichtig mit der Zellsuspension überschichtet und anschließend zentrifugiert (15 min, 800 g, Raumtemperatur, Heraeus Omnifuge 2.0RS, Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Die gebildete Lymphozyten-reiche Zwischenschicht wurde vorsichtig abgenommen, mit 10 ml HBSS in einem weiteren Reagenzglas resuspendiert und schließlich erneut zentrifugiert (10 min, 600 g, Raumtemperatur, Heraeus Omnifuge 2.0RS, Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Nach einem weiteren Resuspensions- (10 ml HBSS) und Zentrifugationsschritt (5 min, 400 g, Raumtemperatur, Heraeus Omnifuge 2.0RS, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) wurde die Lymphozyten-Konzentration und -dichte an einem Hämatologie-Automaten (Advia 120 Analyzer, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn) bestimmt.

Für den Lymphozytentransformationstest wurde eine Zellkonzentration von  $2 \cdot 10^6$  Zellen/ml im RPMI-Medium und für die durchflusszytometrische Untersuchung eine Konzentration von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml in einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (PBS) eingestellt. Für die später durchgeführte Western-Blot-Analyse wurden die überschüssigen Zellen als Zellpellet

konserviert. Dazu wurden die Proben zentrifugiert (5 min, 2000 rpm, Heraeus Biofuge Fresco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte), der Überstand daraufhin abgenommen und die Sedimente bei -80 °C eingefroren.

#### **4.4.2.3. Lymphozytentransformationstest**

Zur Beurteilung der GR-Sensitivität wurde der Einfluss von Corticosteron auf die Mitogen-induzierte Proliferation von Lymphozyten der Versuchstiere untersucht (Abb. 56). Nach der Milzextraktion wurden die isolierten Lymphozyten in Anwesenheit von 2,5 µg/ml Concanavalin-A (ConA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) oder 25 µg/ml Lipopolysaccharide (Lipopolysaccharide from *Salmonella typhosa* L-6386, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und verschiedenen Konzentrationen von Corticosteron (0 mM; 0,05 mM; 0,1 mM; 0,2 mM) für 72 Stunden kultiviert.

In einer 96-Rundboden-Microtiterplatte (VWR International GmbH, Darmstadt) wurden pro Vertiefung 50 µl der Zellsuspension (100000 Zellen), 50 µl der jeweiligen Corticosteron-Konzentration (in Dimethylsulfoxid (DMSO) (Dimethyl sulfoxide ≥99,5%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verdünnt) und 100 µl des Zellkulturmediums RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit dem jeweiligen Mitogen (aus 1 mg/ml Stocklösung mit HBSS; mit RPMI 1640 auf finale Konzentration verdünnt) zusammengeführt. Die Platten wurden daraufhin für 3 Tage in einen Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) zur Inkubation verbracht. Zur Erfassung der Proliferationsrate wurde den Zellen anschließend über einen Zeitraum von 6 Stunden 18,5 kBq (37 GBq/mmol spezifische Aktivität, in 25 µl HBSS) von [Methyl-3H] Thymidin (Amersham, Deutschland) pro Vertiefung hinzugegeben. Nach dieser Inkubationszeit erfolgte das Auswaschen des freien 3H-Thymidins aus der Zellsuspension, indem die Zellen durch einen Glasfaserfilter (Type G-10, Berthold, Bad Wildbad) abgesaugt wurden. Durch mehrmaliges Spülen wurden die Zellen bzw. die DNA auf dem Filter fixiert, während das nicht eingebaute Tritium-markierte Thymidin entfernt wurde. Das inkorporierte 3H-markierte Thymidin diente somit als Marker für neu synthetisierte DNA und indirekt für die Zellproliferation. Die Filter wurden danach im Brutschrank (50 °C) getrocknet, ehe abschließend die Messung der Radioaktivität erfolgte (Automatic TCL-Linear-Analyser, Berthold, Wildbad).

#### **4.4.2.4. Durchflusszytometrie**

Für diese Untersuchungen wurden 3 Antikörper verwendet: Ein Antikörper gegen den Glucocorticoid-Rezeptor (Mouse monoclonal antibody to Glucocorticoid receptor BuGR2, Abcam, Cambridge, England), ein Isotypenkontroll-Antikörper (Mouse IgG2a Isotype Control from murine myeloma, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und ein sekundärer, mit fluoreszierendem Farbstoff markierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Life Technologies GmbH, Darmstadt). Im Vorfeld erfolgte dazu die Titration der

optimalen Antikörper-Konzentrationen. Die beiden Primärantikörper (Anti-Glucocorticoid-Rezeptor und Isotypenkontrolle, jeweils Maus-Immunglobulin-G) wurden 1:100 mit dem FACS-Puffer (Zusammensetzung, siehe Abschnitt 10.1.) verdünnt, für den sekundären Antikörper wurde eine 1:200 Verdünnung mit FACS-Puffer verwendet.

Der Lymphozyten-Gehalt wurde auf eine feste Zellzahl von  $1 \cdot 10^6$  Zellen eingestellt und in eine Suspension mit PBS (0,1 ml) gebracht. Danach erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen mittels 250  $\mu$ l Fixierpuffer (BD CytoFix/CytoPerm, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) für 30 min bei 4 °C. Dieser Puffer wurde nach Zugabe einer Waschlösung (CytoWash, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) und anschließender Zentrifugation (900 g, 5 min, 4 °C) durch Absaugung des Überstands entfernt. Die zurückbleibenden Zellen wurden daraufhin mit den Primärantikörper-Lösungen (Anti-Glucocorticoid-Rezeptor bzw. Isotypenkontrolle) inkubiert (1 h, 4 °C). Nach dieser Einwirkzeit erfolgte das 2malige Auswaschen, Zentrifugieren (900 G, 5 min, 4 °C) und Absaugen der ungebundenen Primärantikörper, ehe der Zellkuchen mit 100  $\mu$ l der Sekundärantikörper-Lösung (30 min, 4 °C) inkubiert wird. Abschließend wurde die Zellsuspension nach 2 Waschvorgängen mit 250  $\mu$ l CytoFix erneut fixiert und am Durchflusszytometer (Coulter Epics XL-MCL, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) analysiert.

Die gemessene Fluoreszenz wurde anhand der PC-Software (System II Software Version 3.0, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) in Form von Histogrammen wiedergegeben. Als Auswertekriterium diente dabei die mittlere gemessene Fluoreszenz.

#### **4.4.2.5. Proteinbestimmung**

Die bei -80 °C eingefrorenen Zellsedimente wurden mit jeweils 138  $\mu$ l Lysepuffer (inklusive 2,5 % Proteaseinhibitor (Proteaseinhibitor Cocktail P8340, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) für 30 min auf Eis inkubiert und resuspendiert. Daraufhin erfolgte die Zentrifugation der Proben (5 min, 13000 rpm, 4 °C, Heraeus Biofuge Fresco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte). Für die Bestimmung des Proteingehalts wurden die Überstände abgenommen und mittels Testkit (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) gemäß der Durchführungsvorschrift des Herstellers bestimmt. Die Absorption wurde mit einem Photospektrometer (Uvikon 930, Kontron Instruments, Mailand, Italien) bei 562 nm gemessen. Anhand dieser wurden die aufzutragenden Proteinmengen für die Elektrophorese festgelegt.

#### **4.4.2.6. Gel-Elektrophorese**

Zu Beginn wurden in die mit Ladepuffer gefüllte Elektrophorese-Kammer (Mini-Protean Tetra cell for 2 mini Precast Gels, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) die 10%igen Gele (Mini-PROTEAN TGX Gels, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) eingespannt. Pro Gel wurden 12 bzw. 13 Proben und jeweils 2x2 Marker (Prestained SDS-PAGE Standards, Bio-Rad

Laboratories GmbH, München und Amersham ECL DualVue, GE Healthcare Europe GmbH, München) aufgetragen. Vor Auftragen der Proben (10 µl) wurden diese mit den jeweiligen Laufpuffern (Laemmli-Puffer 2-, 4-, 6-fach) versetzt und erhitzt (5 min, 95 °C) um final eine Proteinkonzentration von 1 µg/ml zu erhalten. Die Marker wurden mit den Volumina von 10 µl (BioRad) bzw. 5 µl (Amersham) aufgetragen. Nach Füllung der Taschen erfolgte über eine Spannungsquelle (200 V, 40 min) die elektrophoretische Auftrennung der Proteine innerhalb der Gele aufgrund ihrer elektrischen Ladung.

#### **4.4.2.7. Western-Blot mit Immunfärbung**

Nach Beendigung der Elektrophorese erfolgte die Übertragung der Gelbanden auf eine Transfermembran sowie deren Immunfärbung. Dazu wurden die Gele aus ihrer Hülle entfernt und in die Blotkassetten verbracht. Der Zusammenbau der Kassetten mit Gel, Membran (Amersham Hybond P PVDF Transfer Membran, GE Healthcare Europe GmbH, München), Filterpapieren und Faser-Polster geschah gemäß der zugehörigen Anleitung. Vorher erfolgte die Equilibrierung der Bestandteile im Blotpuffer für 30 min, die Membran wurde vorher zusätzlich mit 100%igem Methanol (VWR International GmbH, Darmstadt) angefeuchtet. Danach erfolgte der Einbau der Kassetten in die Blotkammer (Mini Trans-Blot Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München), die mit Blotpuffer entsprechend der Markierung und einem Eisblock gefüllt war. Für das Blotten selbst wurde für 90 min eine Spannung von 40 V angelegt.

An den Blot schloss sich die Immunfärbung an. Dazu wurden die Membranen jeweils zweimal in TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20) gewaschen und daraufhin in 10 ml TBST-Lösung verbracht. Nach vormaliger mehrfacher Titration der Antikörper ergab sich für den  $\beta$ -Actin-Antikörper (Mouse monoclonal antibody to  $\beta$ -Actin, Abcam, Cambridge, England) eine optimale Verdünnung von 1:10000, für den Glucocorticoid-Rezeptor-Antikörper (Mouse monoclonal antibody to Glucocorticoid receptor BuGR2, Abcam, Cambridge, England) eine bestmögliche Verdünnung von 1:1000 und für den Sekundär-Antikörper (Rabbit polyclonal Secondary Antibody to Mouse IgG - H&L (HRP), Abcam, Cambridge, England) eine optimale Verdünnung von 1:50000. Die Inkubation des primären Antikörpers (Anti- $\beta$ -Actin und Anti-Glucocorticoid-Rezeptor) erfolgte über Nacht bei 4 °C und gleichzeitigem Blocken (5 %, Non Fat Dry Milk Blotting Grade Blocker, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) von zusätzlichen Bindungsstellen.

Nach der Inkubation wurden die Membranen am nächsten Morgen zunächst innerhalb von 15 Minuten zweimal mit mindestens 200 ml TBST gespült, woraufhin sich 3 weitere Spülvorgänge (für 5 min) ebenso mit TBST anschlossen. Daraufhin wurden die Membranen in jeweils 10 ml TBST-Puffer mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-Immunglobulin-G) unter leichtem Schütteln inkubiert (1 h, Raumtemperatur). Nach diesem letzten Inkubationsschritt wurden die Membranen erneut innerhalb von 15 min zweimal mit mindestens 200 ml TBST gespült, woraufhin sich erneut 3 weitere Spülvorgänge (für 5 min) mit TBST anschlossen.

Nachdem nach 2-3 min die Reste des Waschpuffers von der Membran abgelaufen waren, erfolgte die Detektion. Für diese wurden die Detektionslösungen (Amersham ECL Plus Western Blotting detection reagents, GE Healthcare Europe GmbH, München) nach Vorschrift des Herstellers hergestellt und angewandt. Daraufhin wurden die Membranen mit Folie luftblasenfrei bedeckt und in eine Filmkassette mit der Proteinseite nach oben hin überführt. Die Filme (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Europe GmbH, München) wurden auf die Membranen gelegt und für ca. 5 Sekunden belichtet. Zur Bildentwicklung unter Rotlicht wurden die Fotos bis zum Erkennbarwerden der Banden in die Entwicklerlösung (Kodak GBX devel-oper/replenisher, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verbracht, danach kurz gewässert und schließlich in die Fixierlösung (Kodak GBx fixer/replenisher; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) überführt. Zum Schluss erfolgte eine letzte Wässerung der entwickelten Filme mit Leitungswasser.

Die fertigen Filme wurden daraufhin eingescannt, um die Intensität der Graustufen durch ein Bildanalyse-Programm (SigmaScan/Image, Jandel Scientific Corporation, Corte Madera, USA) zu bestimmen.

#### **4.4.2.8. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung erfolgte analog zu den vorherigen Versuchsabschnitten mit Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA). Bei allen Berechnungen wurden die Versuchsergebnisse der Immobilisationsstress-Gruppe mit denen der Wasser-Kontrolle sowie die Werte der Corticosteron-Gruppe mit der Ethanol-Kontrolle verglichen. Dazu wurden jeweils das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung berechnet. Zusätzlich wurden bei den Ergebnissen der Nozizeptionsmessungen für jedes Tier die Differenzen aus den Mittelwerten der Messungen an Tag 1 und an Tag 15 gebildet. Bei der Auswertung der LTT-Ergebnisse wurde die „Area Under the Curve“ (AUC) berechnet, die die Fläche unterhalb der Kurve aus den „Counts Per Minute“ (CPM) und den dazugehörigen Hemm-Konzentrationen von Corticosteron darstellt.

Die explorativen Statistikdaten wurden mit GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) und ebenso Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) ermittelt. Die Prüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung erfolgte mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Zur Prüfung der Varianzhomogenität wurde der F-Test verwendet. Da die Versuchsgruppen voneinander unabhängige (unverbundene) Stichproben darstellten, wurde für den statistischen Vergleich der Student'sche t-Test für unverbundene Stichproben verwendet. Mit Hilfe dieses Tests erfolgte der statistische Vergleich der errechneten Mittelwerte bzw. Differenzen von den Tieren der Stress- und Kontrollgruppen.

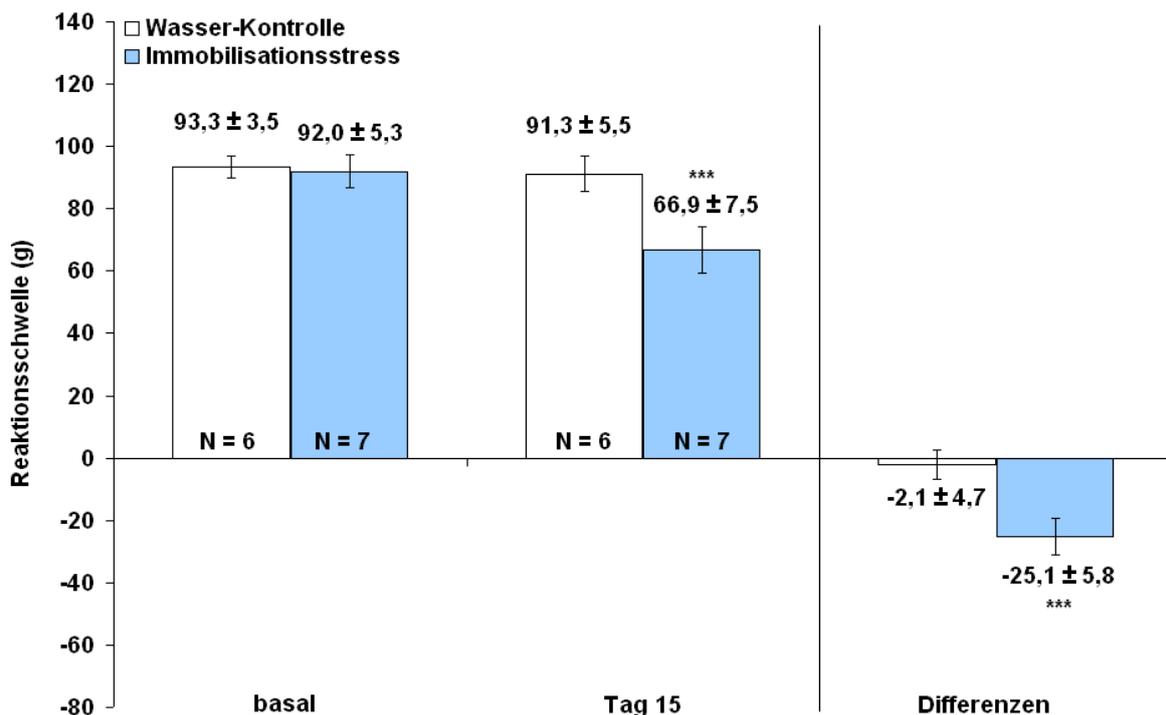
Eine statistische Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant, eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,01$  als hoch signifikant und eine Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,001$  als höchst signifikant angesehen.

### 4.4.3. Ergebnisse

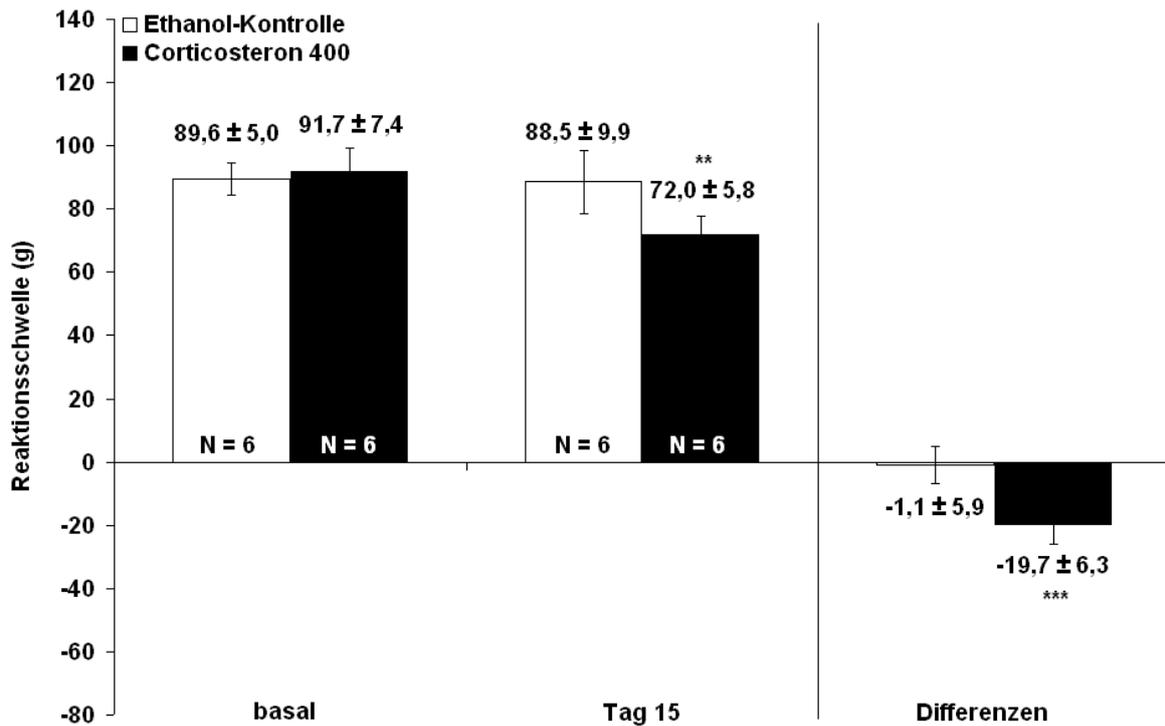
#### 4.4.3.1. Bestätigung der mechanischen Hyperalgesie

Die Ergebnisse der Randall-Selitto-Messungen im Rahmen der Untersuchungen am Glucocorticoid-Rezeptor nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress, 14-tägiger oraler Corticosteron-Aufnahme (400 µg/ml) und von den jeweiligen Kontrollen sind in den Abbildungen 58-61 dargestellt.

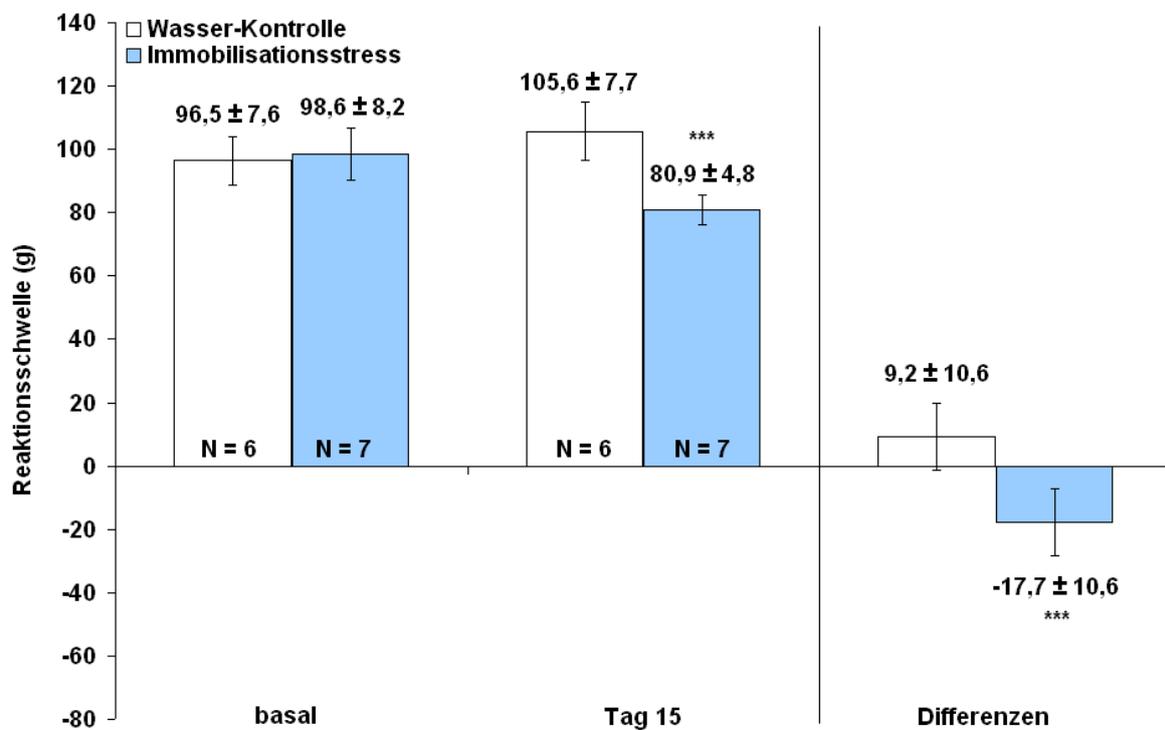
Bei Betrachtung dieser Abbildungen wird ersichtlich, dass sich die Reaktionsschwellen der gestressten Tiere und der Tiere mit Corticosteron (400 µg/ml) im Trinkwasser im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollen an Tag 15 hoch bzw. höchst signifikant ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ) verringert haben - was die Ergebnisse aus den vorherigen Versuchen bestätigt. Auch die Differenzen (Mittelwerte der Basalmessungen minus Mittelwerte der Messungen an Tag 15) auf der linken Seite dieser Abbildungen ergeben wie in den vorherigen Versuchen hoch bzw. höchst signifikante Unterschiede ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ) zwischen den (Wasser)-Kontroll- und den Stresstieren bzw. den Tieren mit Corticosteron (400 µg/ml) im Trinkwasser und ihren Ethanol-Kontrollen.



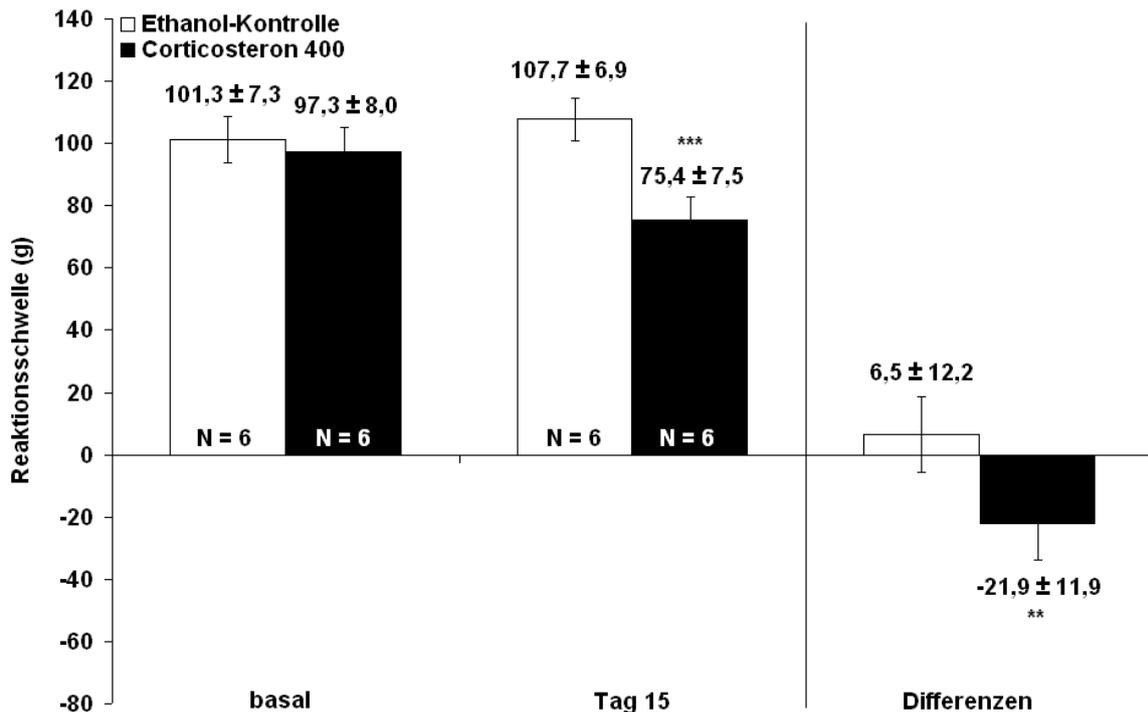
**Abb. 58:** Reaktionsschwellen (g) der Stress- und Kontrolltiere im Randall-Selitto-Test im Rahmen der Versuche für die Messung der Ansprechbarkeit der GR. Die Gruppenwerte sind als MW ± SD dargestellt; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-Test, ungepaart).



**Abb. 59:** Reaktionsschwellen (g) der Corticosteron- und Ethanol-Kontrolltiere im Randall-Selitto-Test im Rahmen der Versuche für den Lymphozytentransformationstest. Die Gruppenwerte sind als MW ± SD dargestellt; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 (t-Test, ungepaart).



**Abb. 60:** Reaktionsschwellen (g) der Stress- und Kontrolltiere im Randall-Selitto-Test im Rahmen der Versuche zur Bestimmung der Dichte von GR in Lymphozyten. Dargestellt als MW ± SD; \*\*\* p < 0,001 (t-Test, ungepaart).

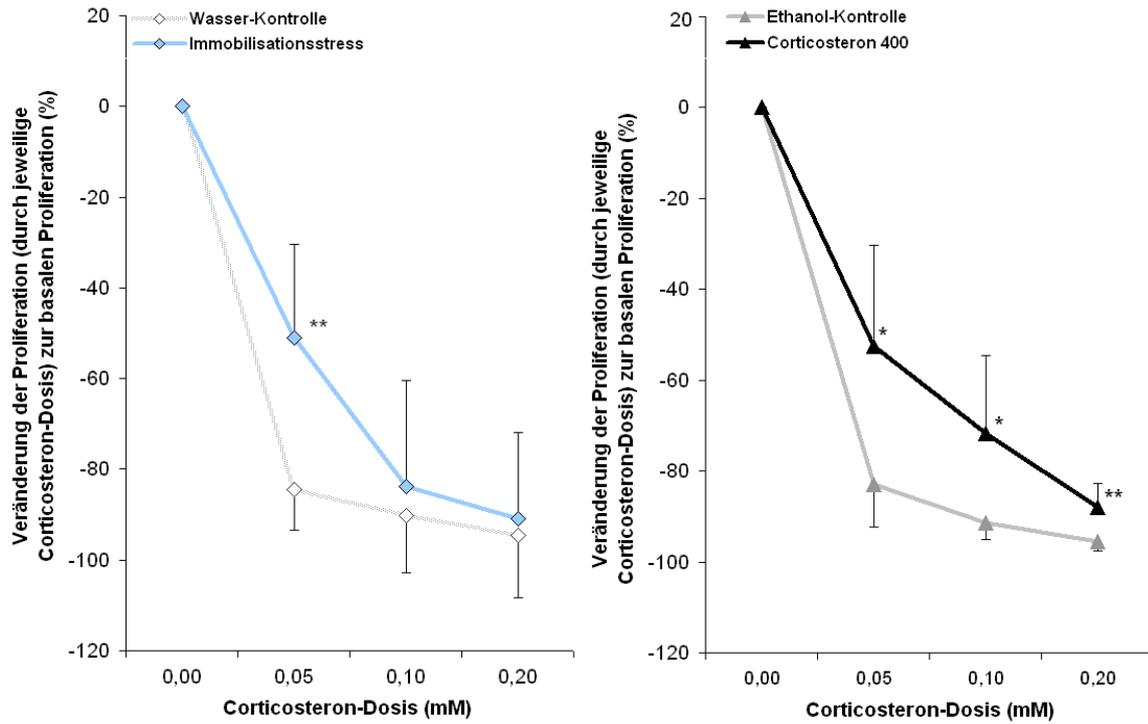


**Abb. 61:** Reaktionsschwellen (g) der Corticosteron- und Ethanol-Kontrolltiere im Randall-Selitto-Test im Rahmen der Versuche für die Dichte-Bestimmung der GR. Darstellung als MW ± SD; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 (t-Test, ungepaart).

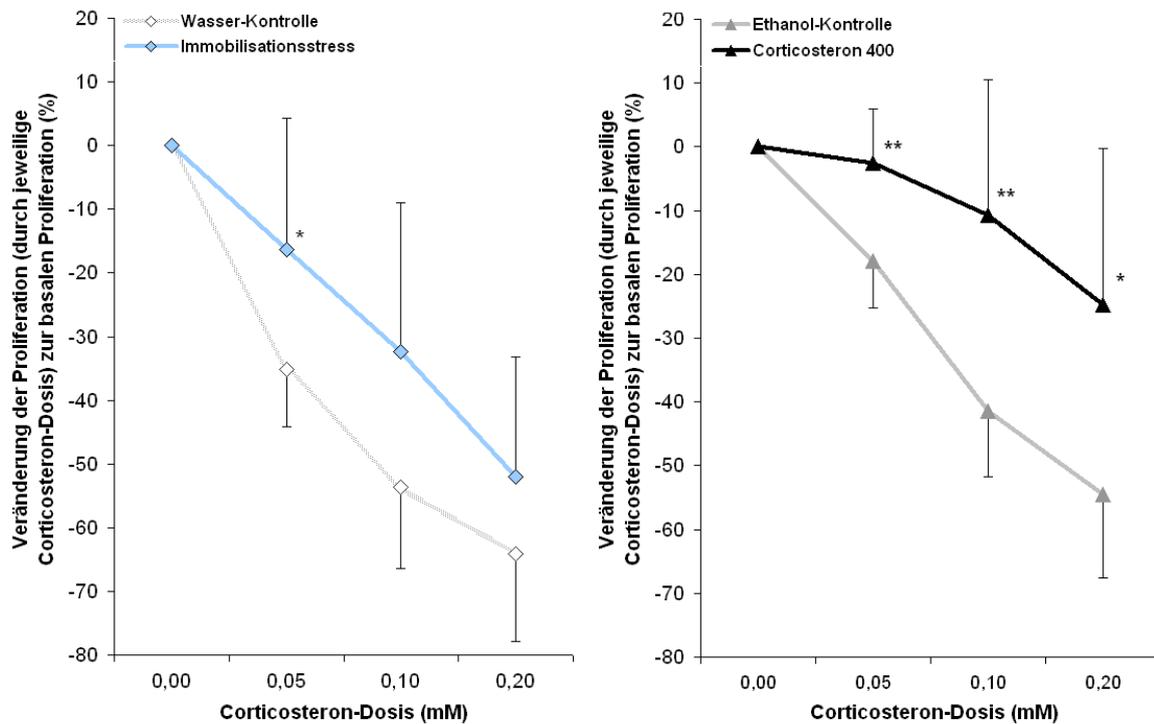
#### 4.4.3.2. Einfluss auf die Hemmung der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation

Schon von Beginn an ergeben sich zwischen den ungehemmten, mit LPS bzw. ConA-stimulierten Proliferationen (Corticosteron-Dosis: 0 mM) Unterschiede zwischen den Stress- bzw. Corticosteron-Tieren und ihren Kontrollen. Um eine Vergleichbarkeit zu ermöglichen, wurden die prozentualen Veränderungen der CPM-Werte bezogen auf die ungehemmte basale Proliferation berechnet und miteinander verglichen (Abbildungen 62 und 63).

Bei Betrachtung der mit LPS stimulierten Proliferationen (Corticosteron-Dosis: 0,05 mM) zeigt sich ein hoch signifikanter Unterschied (p < 0,01) zwischen den immobilisierten Tieren und ihren Kontrollen, was sich in einer verminderten Hemmung der Lymphozyten-Proliferation bei diesen Tieren ausdrückt. Auch bei den Tieren mit Corticosteron im Trinkwasser (400 µg/ml) zeigen sich - bei allen Hemmdosierungen von Corticosteron signifikante Verminderungen (p < 0,05) der Proliferationshemmung im Vergleich zu den Ethanol-Kontrollen. Bei den Zellen, die mit ConA stimuliert wurden, zeigt sich ebenso bei den Immobilisationsstress-Tieren eine signifikante Verminderung (p < 0,05) der Proliferationshemmung (Corticosteron-Dosis: 0,05 mM) im Vergleich zu den ungestressten Kontrollen. Eine reduzierte Proliferationshemmung tritt auch bei den Tieren mit Corticosteron im Trinkwasser auf. Ebenso wie bei LPS zeigen sich bei allen Hemmdosierungen von Corticosteron signifikante Unterschiede (p < 0,05) zu den Ethanol-Kontrollen.



**Abb. 62:** Darstellung der relativen Veränderung der Proliferation von Milz-Lymphozyten bei gleichzeitiger Stimulation (LPS) und Hemmung (Corticosteron). Dargestellt als MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (t-Test, ungepaart).



**Abb. 63:** Darstellung der relativen Veränderung der Proliferation von Milz-Lymphozyten bei gleichzeitiger Stimulation (ConA) und Hemmung (Corticosteron). Dargestellt als MW  $\pm$  SD; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  (t-Test, ungepaart).

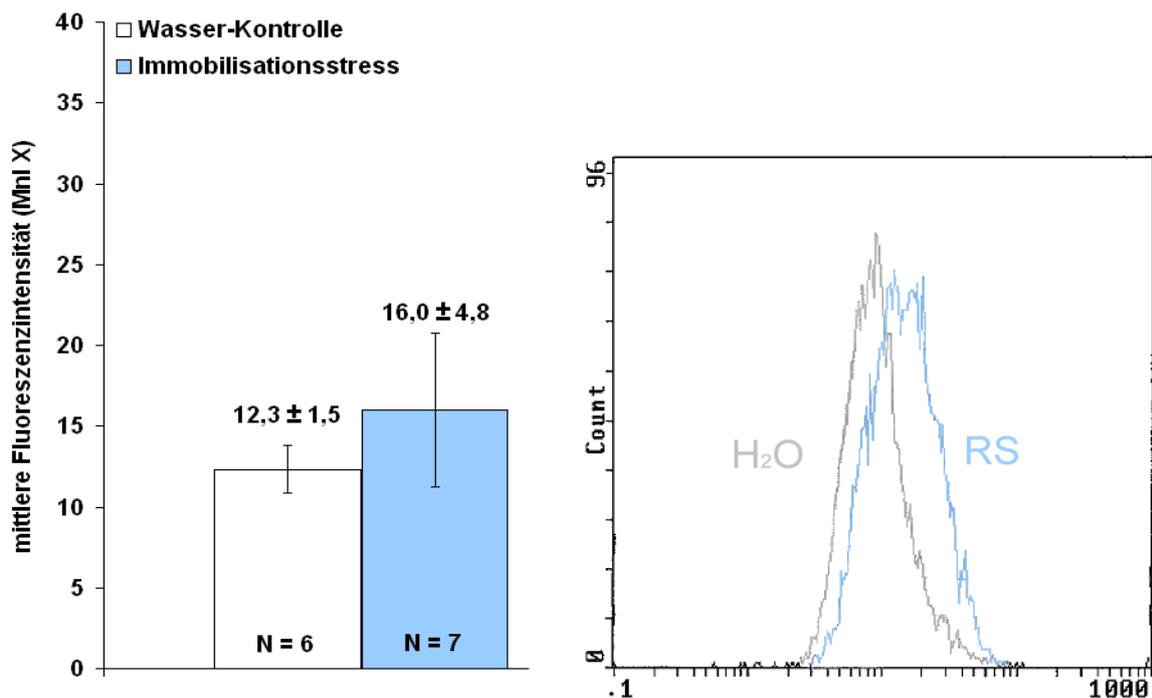
#### 4.4.3.3. Einfluss auf Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte von Milz-Lymphozyten

Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchungen der Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte in Milz-Lymphozyten von Ratten nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress bzw. nach 14-tägiger oraler Corticosteron-Aufnahme (400 µg/ml) und von den jeweiligen Kontrollen sind in den Abbildungen 64-65 dargestellt. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität, die sich aus der Anzahl der gebundenen Farbstoff-markierten Antikörper ergibt und somit ein Marker für die Anzahl der Glucocorticoid-Rezeptoren ist.

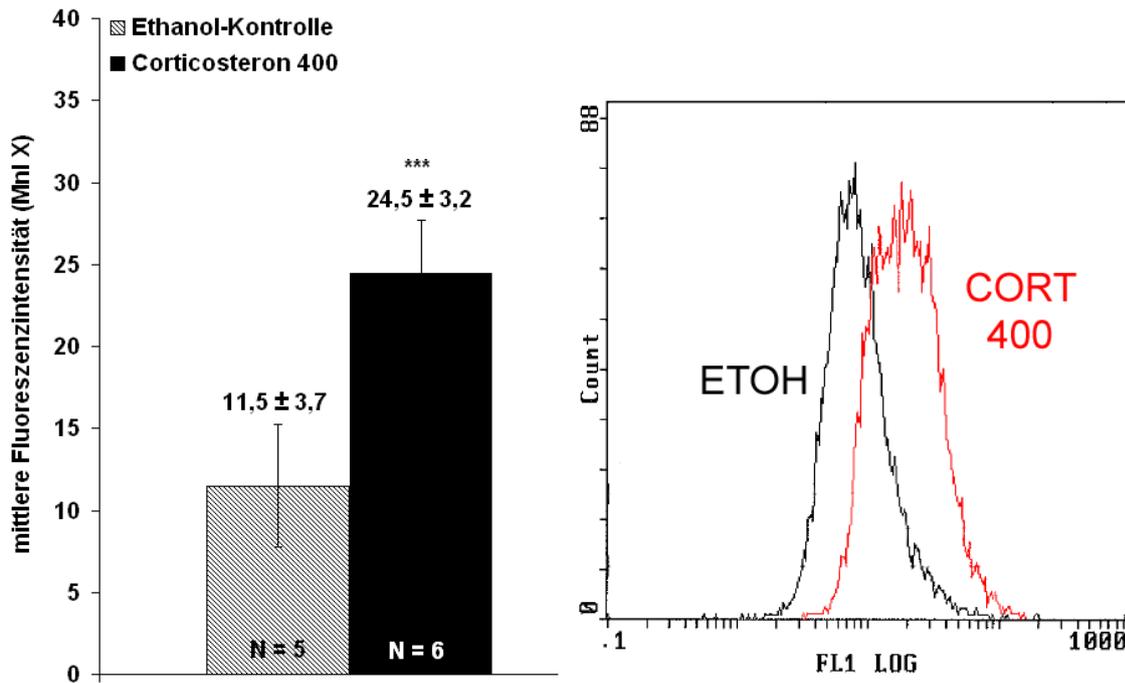
Die gestressten Tiere zeigen gegenüber den ungestressten Kontrollen eine tendenzielle Erhöhung der Glucocorticoid-Rezeptoren in den Milzlymphozyten, jedoch ohne statistische Signifikanz (Abb. 64).

Dagegen weisen die Milzlymphozyten der Corticosteron-Tiere eine signifikant erhöhte ( $p < 0,001$ ) Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte im Vergleich zu den Milz-Lymphozyten der Ethanol-Kontrollen auf (Abb. 65).

Eine Probe der Ethanol-Kontrollen konnte nicht ausgewertet werden, da während des Absaugens das Zellmaterial verloren ging.



**Abb. 64:** Mittlere Fluoreszenzintensität und das dazugehörige Histogramm (logarithmisch) der Glucocorticoid-Rezeptoren in Milzlymphozyten nach Immobilisationsstress und der zugehörigen Kontrolle. Darstellung als MW ± SD.



**Abb. 65:** Mittlere Fluoreszenzintensität und das dazugehörige Histogramm (logarithmisch) der Glucocorticoid-Rezeptoren in Milzlymphozyten nach Corticosteron-Aufnahme und der zugehörigen Ethanol-Kontrolle. Darstellung als MW  $\pm$  SD; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-Test, ungepaart).

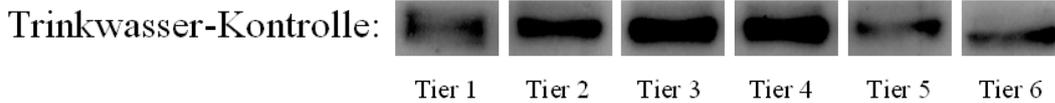
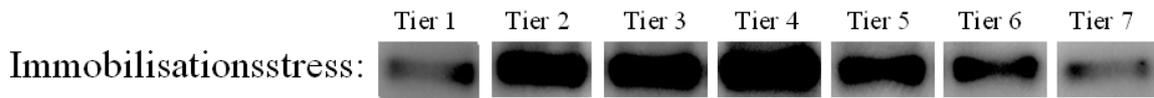
In Abbildung 66 werden die Gehalte des Glucocorticoid-Rezeptors (A) und von  $\beta$ -Actin (B) der Immobilisationsstress-Tiere vergleichend mit denen der Trinkwasser-Kontrolle dargestellt. Insgesamt zeigen die Glucocorticoid-Rezeptor-Proteinbanden der gestressten Tiere dabei eine intensivere Färbung gegenüber ihrer Kontrolle, was tendenziell auch nach Auswertung der Graustufen-Intensität in Abbildung 67 bestätigt wird.

Die Kontroll-Banden des  $\beta$ -Actins weisen dagegen bei beiden Gruppen eine gleiche Graufärbung auf (Abb. 66 B), was sich auch nach Auswertung der Graustufen zeigt (Abb. 67).

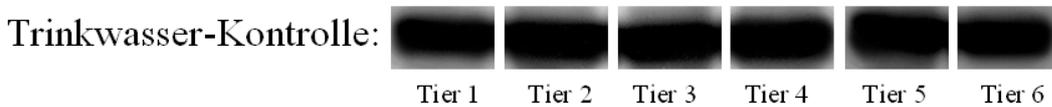
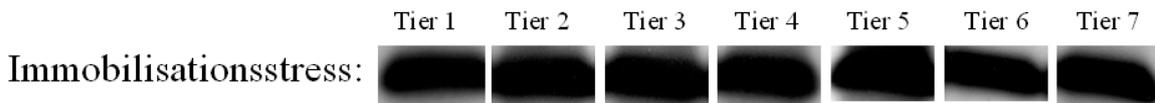
Die Abbildung 68 stellt die Gehalte des Glucocorticoid-Rezeptors (A) und von  $\beta$ -Actin (B) der Corticosteron- und Ethanol-Gruppe dar. Es fällt auf, dass die Glucocorticoid-Rezeptor-Proteinbanden der Corticosteron-Tiere eine wesentlich intensivere Färbung gegenüber den Ethanol-Kontrollen aufweisen. Das bestätigt sich auch anhand der Auswertung der Graustufen-Intensität in Abbildung 69, in der die Corticosteron-Gruppe eine hoch signifikant ( $p < 0,01$ ) stärkere Graufärbung aufweist als die Ethanol-Gruppe.

Dagegen weisen die Kontroll-Banden des  $\beta$ -Actins bei beiden Gruppen erneut eine gleiche Graufärbung auf (Abb. 68 B), was sich ebenso in der Auswertung der Graustufen-Intensitäten widerspiegelt (Abb. 69).

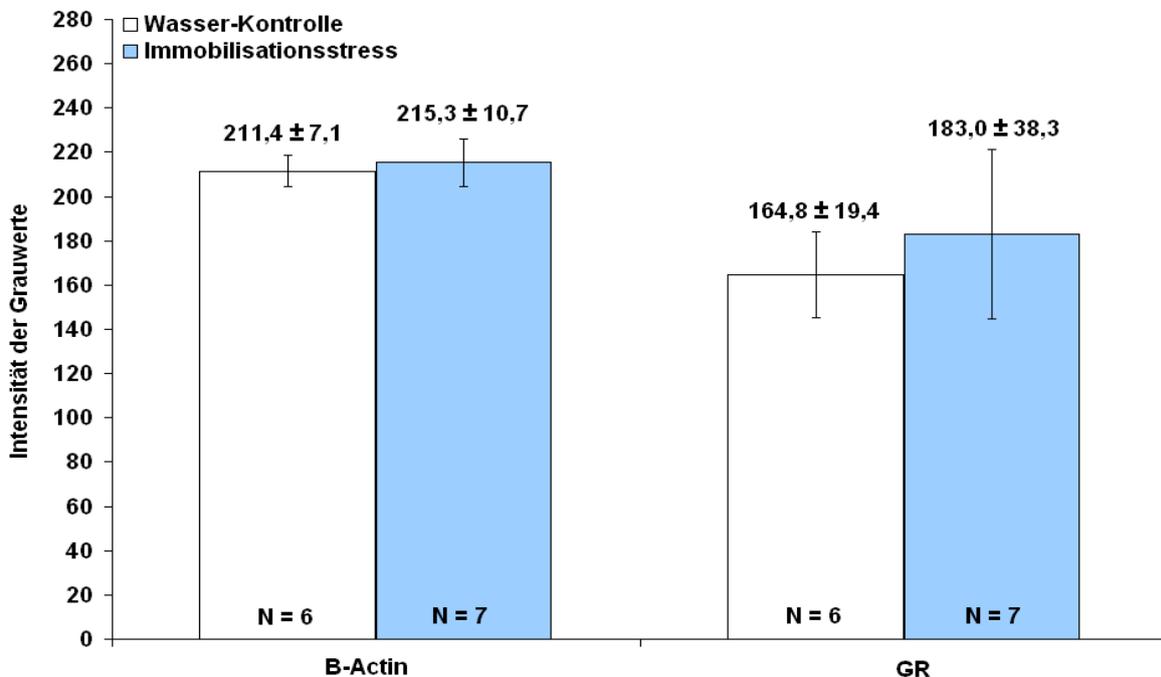
A: Protein-Banden des Glucocorticoid-Rezeptors (86 kDa)



B: Proteinbanden des  $\beta$ -Actins (42 kDa)

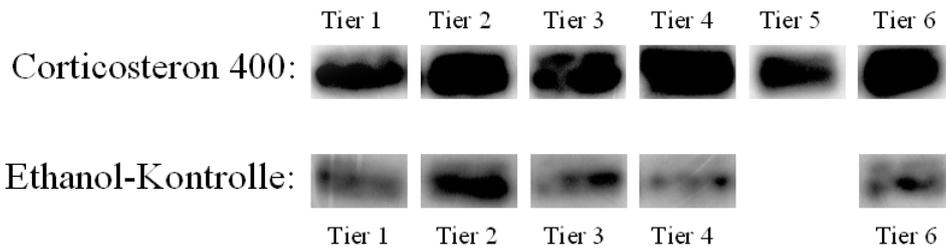


**Abb. 66:** Darstellung der Protein-Banden des Glucocorticoid-Rezeptors (A) und von  $\beta$ -Actin (B). Die Tiere der Immobilisationsstress-Gruppe wurden jeweils im Vergleich zu den Tieren der Trinkwasser-Kontrolle abgebildet.

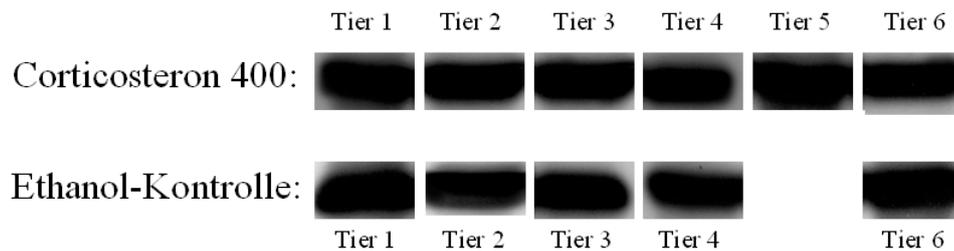


**Abb. 67:** Darstellung der Graustufen-Intensität von den Protein-Banden des  $\beta$ -Actins und des Glucocorticoid-Rezeptors der gestressten Tiere im Vergleich zu ihren Kontrollen. Dargestellt als MW  $\pm$  SD.

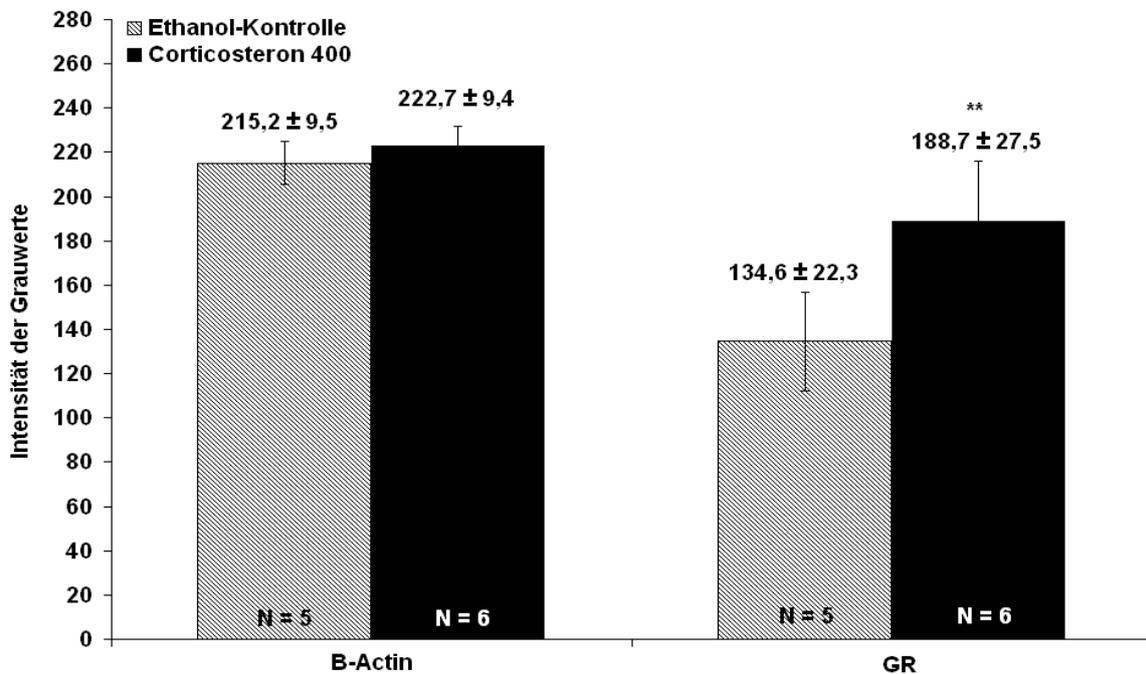
A: Protein-Banden des Glucocorticoid-Rezeptors (86 kDa)



B: Proteinbanden des  $\beta$ -Actins (42 kDa)



**Abb. 68:** Darstellung der Protein-Banden des Glucocorticoid-Rezeptors (A) und von  $\beta$ -Actin (B). Die Tiere der Corticosteron-Gruppe wurden jeweils im Vergleich zu den Tieren der Ethanol-Gruppe abgebildet.



**Abb. 69:** Darstellung der Graustufen-Intensität von den Protein-Banden des  $\beta$ -Actins und des Glucocorticoid-Rezeptors der Tiere mit Corticosteron im Trinkwasser im Vergleich zu ihren Ethanol-Kontrollen. Dargestellt als MW  $\pm$  SD; \*\*  $p < 0,01$  (t-Test, ungepaart).

#### 4.4.4. Diskussion

Bisher wurde gezeigt, dass ein 14-maliger täglicher Immobilisationsstress bei Ratten eine mechanische Hyperalgesie auslöst und diese Tiere an Tag 15 noch immer erhöhte Corticosteron-Spiegel im Blut aufwiesen. Diese mechanische Hyperalgesie konnte ebenso in Ratten induziert werden, bei denen über eine 2-wöchige Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser eine andauernde Hypercorticosteronämie erzeugt wurde. Da die festgestellten Corticosteron-Wirkungen nach 14 Tagen über den Glucocorticoid-Rezeptor vermittelt werden, war die Fragestellung in diesen Versuchen, inwieweit an diesem Steroid-Rezeptor ebenso Veränderungen zu erwarten sind. Dazu wurden exemplarisch 2 Versuchsreihen an Milz-Lymphozyten von gestressten bzw. Corticosteron-Tieren durchgeführt - eine zur Überprüfung der Rezeptor-Ansprechbarkeit und eine zur Untersuchung der Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte.

Im Rahmen der Versuche dazu konnte die ausgeprägte mechanische Hyperalgesie sowohl bei den Corticosteron-, als auch bei den gestressten Tieren erneut bestätigt werden (siehe Abschnitt 4.3.4.), womit die Reproduzierbarkeit der Modelle bewiesen werden konnte.

An den Milz-Lymphozyten dieser beiden Versuchsgruppen konnte im Lymphozyten-Transformations-Test eine verminderte Ansprechbarkeit des Glucocorticoid-Rezeptors im Gegensatz zu den Kontrollen festgestellt werden. Bisher konnte dies bei Immobilisationsstress unter dem Aspekt der veränderten Schmerzsensibilität noch nie gezeigt werden. Lediglich bei Versuchen mit anderen Stressoren wie wiederholtem sozialen Stress wurde bisher eine verminderte Sensitivität von peripheren Immunzellen auf eine Corticosteron-Behandlung nachgewiesen (Stark et al., 2001).

Diese verminderte Ansprechbarkeit des Glucocorticoid-Rezeptors kann bei den Tieren nach Immobilisationsstress im Zusammenhang mit der dort festgestellten und bereits diskutierten gestörten negativen Feedback-Hemmung stehen. Auch die Tiere mit Corticosteron im Trinkwasser wiesen eine Desensibilisierung der Glucocorticoid-Rezeptoren auf, obwohl dort die Feedback-Mechanismen nicht beeinträchtigt waren (Abschnitt 4.3.4.).

Im Zusammenhang mit dieser Desensibilisierung wurde weiterhin bei den Immobilisationsstress- und vor allem bei den Corticosteron-Tieren eine vermehrte Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte gefunden. Dies kann auf eine mögliche Kompensation auf die desensibilisierten Rezeptoren hindeuten, um so die verminderte Funktionalität auszugleichen. Zur Abklärung des genaueren Zusammenhangs dieser Ergebnisse sollten noch weiterführende Rezeptor-Kinetik-Untersuchungen erfolgen.

Ein Vergleich mit den Untersuchungen anderer ist aufgrund von unterschiedlichen Corticosteron-Spiegeln im Plasma (bedingt durch eine abweichende Stressmethodik) und einer somit abweichenden Corticosteron-Exposition der Glucocorticoid-Rezeptoren schwierig. Für diese Unterschiede ist zusätzlich auch die regional unterschiedliche Enzymaktivität der Corticosteron-inaktivierenden 11-beta-Hydroxysteroid-Dehydrogenase von Bedeutung (Mizoguchi et al., 2003; Noguchi et al., 2010).

Bedingt vergleichbare Untersuchungen zeigten in diesem Zusammenhang, dass nach 3-wöchigem Immobilisationsstress im medialen präfrontalen Cortex und in den para-

ventrikulären Kerngruppen des Hypothalamus von Ratten die Anzahl der nukleären Glucocorticoid-Rezeptoren unverändert war, während im Hippocampus eine erhöhte Anzahl dieser Rezeptoren festgestellt wurde (Mizoguchi et al., 2003). Messungen der peripheren Rezeptor-Dichte ergaben, dass nach wiederholtem Immobilisationsstress vermehrt Glucocorticoid-Rezeptor-Protein in Zellen von inneren Organen wie Leber, Thymus und Milz gefunden wurde (Hu et al., 2000; Al-Mohaisen et al., 2000).

Nicht zuletzt deuten aufgrund der möglichen Beeinflussung von Nozizeptions-assoziierten Neurotransmittern und Rezeptoren die festgestellten Veränderungen am Glucocorticoid-Rezeptor auf einen möglichen Zusammenhang mit der mechanischen Hyperalgesie hin. Wie in der Einleitung beschrieben, betrifft das unter anderem die Endocannabinoide. Diese spielen als Vermittler der schnellen Stressreaktion und der gleichzeitigen initialen Hemmung der HPA-Achse eine wichtige Rolle beim negativen Rückkopplungs-Mechanismus der Glucocorticoide (Evanson et al., 2010) und können zusätzlich auf Rückenmarksebene über ihren CB1-Rezeptor die synaptische Übertragung von nozizeptiven Signalen inhibieren (Harris et al., 2000; Kelly & Chapman, 2001).

Passend dazu wurde in einem weiteren Hyperalgesie-Modell im Bereich der Spinalganglien eine verminderte Expression von CB1-Rezeptoren nach wiederholtem Stress gefunden (Hong et al., 2011). Darüber hinaus konnte auch bei Mäusen gezeigt werden, dass eine andauernde Aufnahme von Corticosteron über das Trinkwasser zu einer Verminderung der CB1-Rezeptoren im limbischen System führt (Bowles et al., 2012).

Ebenso führt akuter Stress im Rückenmark über die Aktivierung von membranständigen Glucocorticoid-Rezeptoren zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat und somit zu einer verstärkten Neurotransmission von nozizeptiven Signalen (Musazzi et al., 2010; Popoli et al., 2011).

Über die Glucocorticoid-Rezeptoren können weiterhin auch die Biosynthese und der Abbau von Adrenalin und Noradrenalin beeinflusst werden, indem die Transkription des Phenylethanolamin-N-Methyltransferase-Gens und die Transkription von MOA-A verändert werden können (Tai et al., 2002; Morsink et al., 2007). Beide Catecholamine spielen sowohl bei der Vermittlung der schnellen Stressreaktion als auch als Nozizeptions-modulierende Neurotransmitter eine wichtige Rolle (Abschnitte 2.1.3.4. und 2.2.4.5.).

Daneben ist auch bekannt, dass durch Aktivierung der Glucocorticoid-Rezeptoren sowohl der Vorgang der Transkription als auch die Transkriptionsfaktoren von POMC und CRH gehemmt werden. Für diese beiden Neurotransmitter wird zusätzlich auch eine analgetische Wirkung diskutiert (Abschnitte 2.1.4. und 4.3.4.).

Wie bereits erwähnt, wurde vor kurzem in zwei Stress-induzierten viszerale Hyperalgesie-Modellen ein Zusammenhang der verstärkten Schmerzsensibilität mit dem Glucocorticoid-Rezeptor nachgewiesen (Hong et al., 2011; Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2012) und zumindest teilweise auf eine verminderte CB1- sowie eine verstärkte TRPV1-Expression zurückgeführt (Hong et al., 2011).

Neben diesen tierexperimentellen Ergebnissen konnte auch beim Menschen gezeigt werden, dass Patienten mit somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen wie der Fibromyalgie oder dem Reizdarmsyndrom eine verminderte Sensitivität der Glucocorticoid-

Rezeptoren besaßen (Geiss et al., 2012) oder eine vermehrte Glucocorticoid-Rezeptor-Dichte aufwiesen (Schottelius et al., 2010). Auch bei depressiven Störungen, die oftmals bei Patienten mit somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen auftreten (Schweinhardt et al., 2008; Nater et al., 2011), konnte eine veränderte Glucocorticoid-Rezeptor-Funktion festgestellt werden (Leff et al., 2010; Anacker et al., 2011).

Zusammenfassend konnte nun gezeigt werden, dass ein wiederholter Immobilisationsstress oder eine andauernde Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser eine anhaltende Corticosteronämie und dadurch Veränderungen am Glucocorticoid-Rezeptor (Dichte und Sensibilität) induzieren. Diese Rezeptoren sind wiederum in der Lage, verschiedene Nozizeptions-modulierende Neurotransmittersysteme beeinflussen zu können. Damit können sie am Geschehen der Stress-induzierten Hyperalgesie eine wichtige Rolle spielen.

Im letzten Teil der eigenen Untersuchungen soll somit pharmakologisch überprüft werden, inwieweit einzelne wichtige Nozizeptions-modulierende Neurotransmitter und Rezeptoren möglicherweise am Hyperalgesie-Geschehen beteiligt sind, um weitere Rückschlüsse auf die zugrundeliegenden Mechanismen zu erhalten.

## 4.5. Pharmakologische Beeinflussung der induzierten Hyperalgesie

### 4.5.1. Einleitung

Die vorausgehend beschriebenen eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass der wiederholte Immobilisationsstress oder die dauernde Gabe von Corticosteron über das Trinkwasser eine anhaltenden Corticosteronämie induziert, was zu Veränderungen am Glucocorticoid-Rezeptor (Dichte und Sensibilität) führt und vermutlich am Geschehen der Stress-induzierten Hyperalgesie eine Rolle spielt. Die genauen Wirkmechanismen bleiben allerdings noch offen, da eine Vielzahl von Nozizeptions-modulierenden Neurotransmittersystemen durch den Glucocorticoid-Rezeptor beeinflusst werden (Abschnitt 4.4.4.). Daher sollen in diesen Versuchen pharmakologisch aktive Substanzen getestet werden, die Nozizeptions-assoziierte Neurotransmittersysteme modulieren und zusätzlich im Rahmen der Therapie von somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen angewendet werden (Abschnitt 2.4.2.4. bzw. 2.4.3.3.). Aufgrund der möglichen Beeinflussung durch die Glucocorticoid-Rezeptoren sind vor allem die adrenergen, serotonineren, opioiden und glutamatergen Neurotransmittersysteme von besonderer Bedeutung.

Im Zusammenhang mit den serotonineren und adrenergen Neurotransmittersystemen wird speziell bei Fibromyalgie-Patienten vermutet, dass dort eine verminderte Hemmung der nozizeptiven Rückenmarksneurone vorliegt, welche von den serotonineren und adrenergen Kerngebieten der rostralen ventromedialen Medulla ausgehen. Zusätzlich werden Imbalancen im Serotonin-Haushalt auch bei der Pathogenese des Reizdarmsyndroms diskutiert (Foxx-Orenstein, 2006; Elsenbruch, 2011). Therapeutisch konnte dies bei der Fibromyalgie bestätigt werden, da der Einsatz von Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahme-Hemmern wie Milnacipran (Arnold et al., 2010) oder Duloxetine (Arnold et al., 2009) eine Verbesserung der Symptomatik nach sich zog. Innerhalb eines großen Literaturvergleichs zeigten beide Wirkstoffe zudem eine ähnlich gute Effizienz (Häuser et al., 2010).

Da Patienten mit Fibromyalgie weiterhin eine abweichende Ansprechbarkeit der supraspinalen  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren im Zusammenhang mit abweichenden Opioid-Spiegeln im Liquor aufwiesen (Baraniuk et al., 2004; Harris et al., 2007) und Opiode bei chronischen Schmerzzuständen wie der Fibromyalgie oder dem chronischen Spannungskopfschmerz vermehrt eingesetzt wurden (Woodcock, 2009; Bendtsen et al., 2010), sollten diese auch in den eigenen Versuchen zum Einsatz kommen.

Für die Anwendung von NMDA-Rezeptor-Antagonisten spricht, dass Ketamin zumindest als zweite Wahl auch bei Fibromyalgie-Patienten zum Einsatz kommt (Graven-Nielsen et al., 2000; Hocking & Cousins, 2003; Blonk et al., 2010; Murrrough, 2012) und sich neue NMDA-Rezeptor-Antagonisten im Moment in klinischen Prüfstadien befinden (Kampfhammer, 2008). Da beim Fibromyalgie-Geschehen auch periphere Mechanismen nicht ganz ausgeschlossen werden können (Staud, 2009; 2010), ist auch der Einsatz eines nur peripher wirksamen nicht-steroidalen Antiphlogistikums sinnvoll.

Ziel dieser Untersuchungen war somit die den Modellen der Immobilisationsstress- und Corticosteron-induzierten Hyperalgesie zugrunde liegenden Mechanismen weiter aufzuklären, um Rückschlüsse zur prädiktiven Validität zum Humanpatienten zu erhalten.

## **4.5.2. Material und Methoden**

### **4.5.2.1. Versuchsbedingungen**

Es wurden wie in den vorherigen Versuchen (Abschnitte 4.1.2. und 4.3.2.) dieselbe Versuchstierart (Wistar-Ratten, männlich, 8–10 Wochen alt, 180 g bis 220 g schwer), dieselben Stressbedingungen (Immobilisationsstress mittels Plexiglas-Röhren, eine Stunde täglich für 14 aufeinanderfolgende Tage), dieselbe Methodik zur ad libitum Aufnahme von Corticosteron über das Trinkwasser (2 Wochen lang 400 µg/ml, gelöst in Ethanol mit einer Endkonzentration von 2,5%) sowie dieselbe Messmethodik zur Erfassung der mechanischen Schmerzsensibilität (Randall-Selitto-Test) verwendet. Da für die beiden speziellen Hyperalgesie-Modelle bisher keine Daten über optimale Behandlungszeitpunkte und Wirkdauer von pharmakologischen Substanzen vorlagen, wurde die mechanische Schmerzsensibilität im Randall-Selitto-Test (nach 2-wöchigem Immobilisationsstress bzw. 2-wöchiger Corticosteron-Aufnahme) direkt vor der Applikation der Substanzen sowie 30 min, 60 min, 120 min, 4 h, 8 h und 24 h nach der Behandlung geprüft.

### **4.5.2.2. Pharmakologische Substanzen**

Im Zusammenhang mit der Beeinflussung der serotoninerger und adrenerger Neurotransmittersysteme wurde Milnacipran ausgewählt, da es in Österreich als Antidepressivum (IXEL 50 mg, Pierre Fabre Medicament, Boulogne, Frankreich) verfügbar war. Als Opioid wurde aufgrund seiner oralen Bioverfügbarkeit und supraspinalen Wirkung Levomethadon ausgewählt, was als L-Polamivet (Intervet (MSD), Unterschleißheim) bezogen wurde. Für die Beeinflussung der NMDA-Rezeptoren wurde Ketamin ausgewählt, da auch dieses oral bioverfügbar ist. Zum Test auf peripher-entzündliche Mechanismen wurde das nicht-steroidale Antiphlogistikum Diclofenac (Diclofenac sodium salt, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) verwendet.

Die Applikation der pharmakologischen Substanzen (Tabelle 6) erfolgte an Tag 15 (nach Stress bzw. Corticosteron-Aufnahme), direkt nach den basalen Randall-Selitto-Messungen. Dazu wurden die Substanzen entsprechend ihrer finalen Dosierung in 0,2%igem Agarose-Gel gelöst. Da nur eine einmalige Applikation vorgesehen war, wurden übliche pharmakologische Dosierungen (Diclofenac: 50 mg/kg, Ketamin: 100 mg/kg, Levomethadon 3 mg/kg, Milnacipran 200 mg/kg) verwendet (Borchard et al., 1991). Die in Agar gelösten Substanzen wurden den Tieren per os über eine Magen-Schlund-Sonde in einem Volumen von 10 ml/kg appliziert. Die genauen Substanzbezeichnungen sind in Tabelle 6 aufgeführt.

**Tab. 6:** Übersicht der angewandten pharmakologischen Substanzen

Wirkstoff	Verbindung	Handelsname	Hersteller
Diclofenac	Diclofenac-Natrium	Diclofenac sodium salt	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ketamin	Ketamin-Hydrochlorid	Ketavet 100 mg/ml	Pfizer GmbH, Berlin
Levomethadon	Levomethadon-Hydrochlorid	L-Polamivet	Intervet (MSD), Unterschleißheim
Milnacipran	Milnacipran-Chlorhydrat	IXEL 50 mg	Pierre Fabre Medicament, Boulogne, Frankreich

#### 4.5.2.3. Versuchsaufbau

Wie auch bei allen vorherigen Versuchsabschnitten erfolgte bei Versuchsbeginn die Messung der Nozizeption im Randall-Selitto-Test, bevor die Tiere dem Immobilisationsstress bzw. Handling an jeweils 14 aufeinanderfolgenden Tagen ausgesetzt wurden oder 2 Wochen lang Corticosteron (400 µg/ml) oder nur Ethanol (final 2,5 %) über das Trinkwasser aufnehmen mussten. An Tag 15 erfolgte dann erneut die Überprüfung der Nozizeption mittels Randall-Selitto-Test. Diese Messung diente als eigentliche Basalmessung vor der Behandlung der Tiere mit den entsprechenden Substanzen. Direkt nach dieser Messung wurden den Tieren die Substanzen per os über eine Magen-Schlund-Sonde appliziert. Darauf erfolgten nach 0,5, 1, 2, 4, 8 und 24 Stunden weitere Randall-Selitto-Messungen, um den Einfluss der Substanzen auf die mechanische Schmerzsensibilität festzustellen. Dieser Versuchsablauf wird anhand der Abbildung 70 verdeutlicht:

#### Versuchsablauf



**Abb. 70:** Darstellung des Versuchsablaufs, um den Einfluss von Diclofenac, Ketamin, Levomethadon und Milnacipran auf die Immobilisationsstress- und Corticosteron-induzierte Hyperalgesie ab Tag 15 festzustellen. Für weitere Einzelheiten, siehe Text.

Insgesamt wurden für diesen letzten Versuchsteil 73 Tiere verwendet. In den nachfolgenden Tabellen 7 und 8 werden die einzelnen Gruppen detailliert aufgelistet.

**Tab. 7:** Übersicht der Versuchsgruppen zur Untersuchung des Einflusses von Diclofenac, Ketamin, Levomethadon und Milnacipran auf die Immobilisationsstress-induzierte Hyperalgesie an Tag 15. Die Applikation erfolgte p. o. mit 0,2%igem Agar.

Gruppenname	Stressor	Substanzname	Dosierung	Tieranzahl
Agar-Kontrolle	-	-	-	6
Agar-Stress	Immobilisation	-	-	7
Diclofenac-Stress	Immobilisation	Diclofenac	50 mg/kg	5
Ketamin-Stress	Immobilisation	Ketamin	100 mg/kg	6
Levomethadon-Stress	Immobilisation	Levomethadon	3 mg/kg	6
Milnacipran-Stress	Immobilisation	Milnacipran	200 mg/kg	6

**Tab. 8:** Übersicht der Versuchsgruppen zur Untersuchung des Einflusses von Diclofenac, Ketamin, Levomethadon und Milnacipran auf die Corticosteron-induzierte Hyperalgesie an Tag 15. Die Applikation erfolgte p. o. mit 0,2%igem Agar.

Gruppenname	Corticosteron	Substanzname	Dosierung	Tieranzahl
Agar-Ethanol	-	-	-	6
Agar-Corticosteron	400 µg/ml	-	-	7
Diclofenac-Corticosteron	400 µg/ml	Diclofenac	50 mg/kg	6
Ketamin-Corticosteron	400 µg/ml	Ketamin	100 mg/kg	6
Levomethadon-Corticosteron	400 µg/ml	Levomethadon	3 mg/kg	6
Milnacipran-Corticosteron	400 µg/ml	Milnacipran	200 mg/kg	6

#### 4.5.2.4. Statistische Auswertung

Für die deskriptive Statistik wurde analog zu den vorherigen Versuchsteilen Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) verwendet. Für jeden Messzeitpunkt wurde für jede Gruppe das arithmetische Mittel sowie die Standardabweichung berechnet.

Da nach 4 Stunden keine Substanzeffekte mehr nachweisbar waren, erfolgte innerhalb dieses Intervalls die Bildung einer AUC (Fläche unterhalb der Kurve aus den Reaktionsschwellen an den dazugehörigen Messzeitpunkten: 0, 0,5, 1, 2 und 4 h). Dabei wurden bei den Versuchen mit Immobilisationsstress jeweils die Ergebnisse der unbehandelten Stresstiere (Stress und Agar) mit denen der übrigen Stress-Gruppen

verglichen. Ebenso wurden bei den Versuchen mit Corticosteron im Trinkwasser die Ergebnisse der unbehandelten Corticosteron-Tiere (Corticosteron und Agar) mit denen der übrigen Corticosteron-Gruppen verglichen.

Die explorativen Statistikdaten wurden mit GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) und ebenso Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, USA) berechnet. Für die Ermittlung der Substanzeffekte innerhalb einer Gruppe erfolgte die Prüfung auf das Vorliegen einer Normalverteilung mit Hilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Zur Prüfung der Varianzhomogenität wurde der F-Test verwendet. Da es sich jeweils um dieselben Versuchsgruppen und somit um voneinander abhängige (verbundene) Stichproben handelte, wurde für den statistischen Vergleich der Student'sche t-Test für verbundene Stichproben verwendet. Da es sich bei den Berechnungen der AUC um einen unverbundenen parametrischen Test handelt, wurden die Gruppen anhand einer 1-Weg ANOVA auf eine signifikante Unterscheidung geprüft. Für die anschließenden Analysen wurde der Bonferroni-Test für vorher geplante und selektierte Paarungen verwendet. Bei einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde das Ergebnis als signifikant, bei  $p < 0,01$  als hoch signifikant und bei  $p < 0,001$  als höchst signifikant gewertet.

### **4.5.3. Ergebnisse**

#### **4.5.3.1. Nozizeptionsmessungen bei Behandlung und Immobilisationsstress**

In den Abbildungen 71 bis 76 sind die Randall-Selitto-Messwerte von den Immobilisationsstress- und Kontrolltieren vor und nach den Substanzapplikationen dargestellt. Bei Betrachtung von Abbildung 71 erkennt man, dass im Vergleich zum ersten Tag keine statistischen Veränderungen der Reaktionsschwellen im Verlauf bis zum Tag 16 auftreten.

Bei den Tieren, die innerhalb von 14 Tagen einem Immobilisationsstress ausgesetzt waren und mit Agar behandelt wurden (Abbildung 72), zeigte sich bis zum Tag 15 eine höchst signifikante Verminderung der Schmerzschwelle ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zum ersten Tag. Diese mechanische Hyperalgesie war auch nach oraler Behandlung der Tiere mit Agar bis zum Tag 16 feststellbar, da keine statistischen Unterschiede zu den Folgemessungen an Tag 15 auftraten.

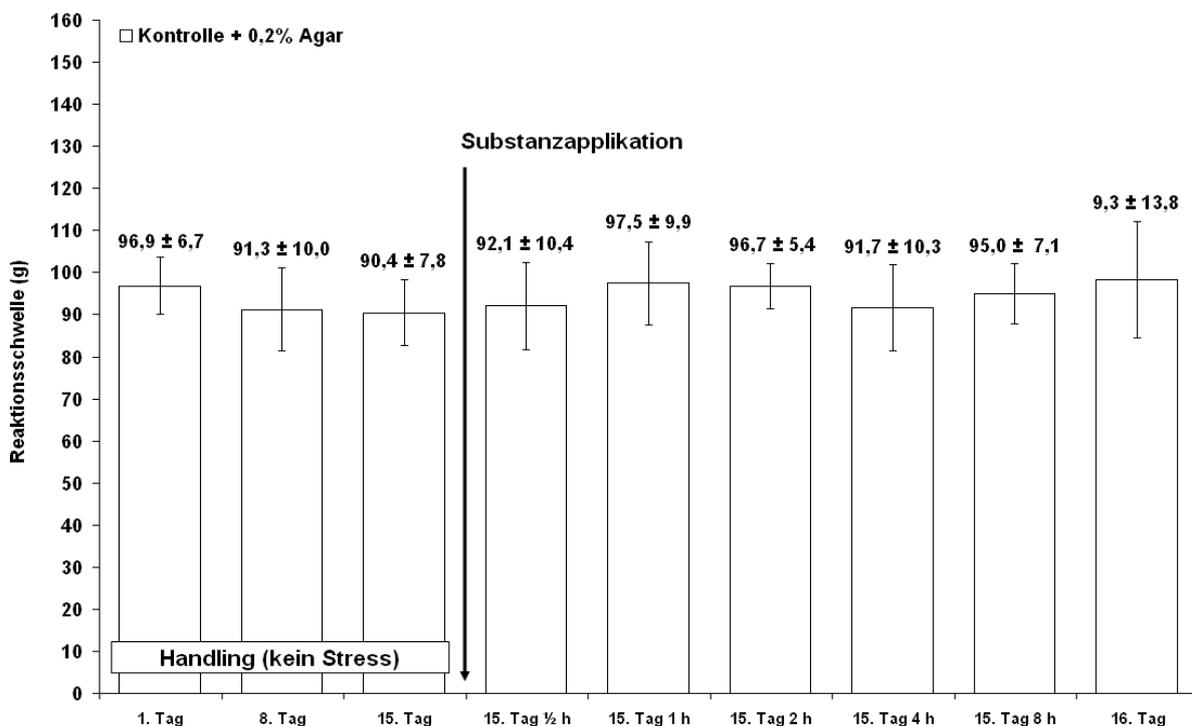
Anhand von Abbildung 73 werden die Reaktionsschwellen der Stresstiere dargestellt, die oral 50 mg/kg Diclofenac erhielten. Vergleichend zum Tag 1 wiesen diese Tiere an Tag 15 eine signifikante Reduktion ( $p < 0,05$ ) der Schmerzschwelle und somit eine Hyperalgesie auf. Nach oraler Applikation von Diclofenac zeigten sich bis hin zum Tag 16 keine Veränderungen zu der Hyperalgesie, die nach dem 14-maligen täglichen Immobilisationsstress festgestellt wurde.

Die Tiere, die innerhalb von 14 Tagen einem Immobilisationsstress ausgesetzt waren und am 15. Tag Ketamin (100 mg/kg) oral verabreicht bekamen (Abbildung 74), wiesen bis zur Behandlung eine höchst signifikante Verminderung der Schmerzschwelle ( $p < 0,001$ ) im

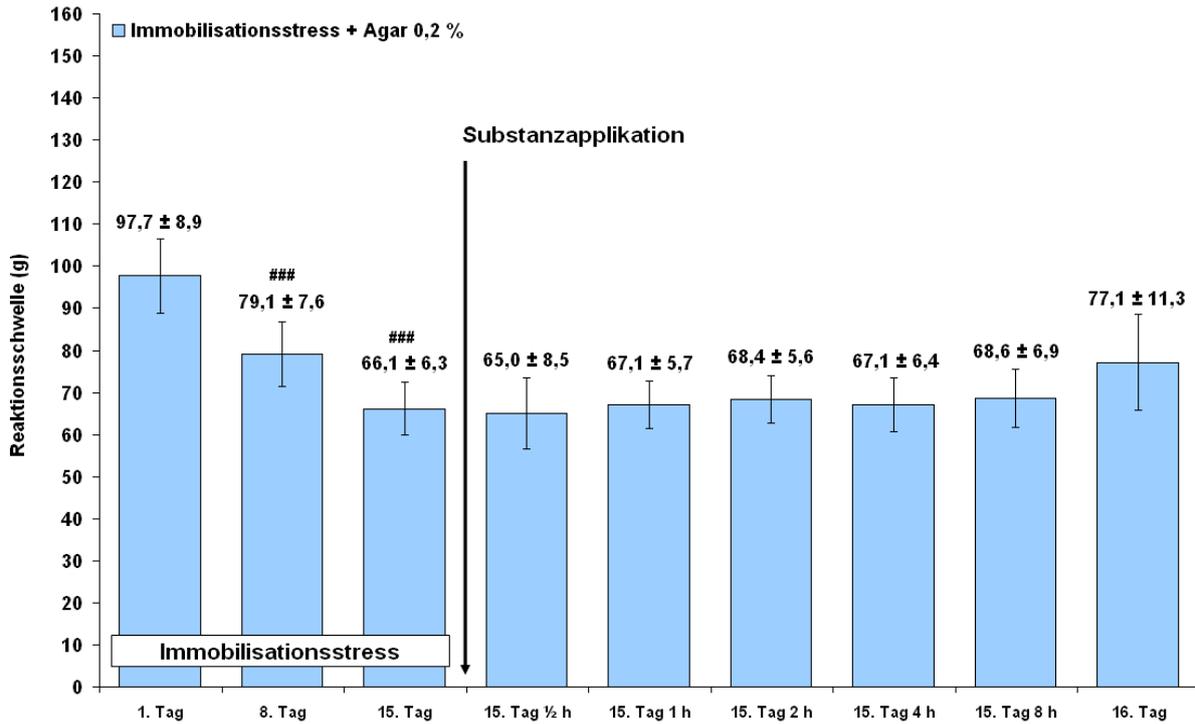
Vergleich zum ersten Messtag auf. Diese Hyperalgesie wurde zunehmend bis hin zur 4-stündigen Messung nach der Ketamin-Applikation abgeschwächt (tendenziell bis zur 2. Stunde, bei der Messung nach 4 Stunden war die Abschwächung der Hyperalgesie signifikant). Diese Substanzwirkung war jedoch bei den Messungen nach 8 und 24 Stunden nicht mehr nachweisbar.

In Abbildung 75 zeigt sich, dass der 14-malige tägliche Immobilisationsstress auch bei den Tieren eine höchst signifikante Verminderung der Schmerzschwelle ( $p < 0,001$ ) induziert hat, die daraufhin mit Levomethadon (3 mg/kg) behandelt werden sollten. Nach dieser Applikation zeigte sich eine starke Abschwächung (ab der 1. Stunde hoch signifikant) dieser Hyperalgesie bis zu 4 Stunden nach der Behandlung. Ab diesem Zeitpunkt wurde dieser Effekt bis zur letzten Messung an Tag 16 geringer und wies keine statistische Signifikanz mehr auf.

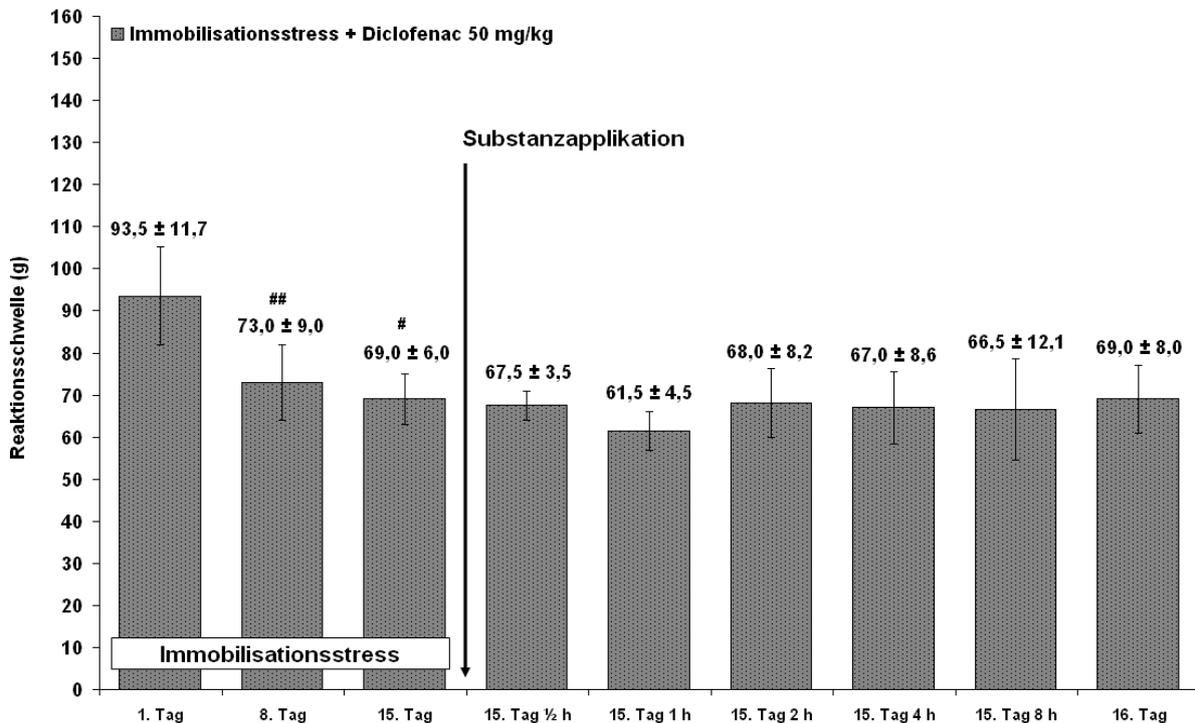
Bei den Tieren, die innerhalb von 14 Tagen einem Immobilisationsstress ausgesetzt waren und mit Milnacipran (100 mg/kg) behandelt wurden, zeigte sich bis zum Tag 15 eine höchst signifikante Verminderung der Schmerzschwelle ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zum ersten Tag (Abbildung 76). Bereits nach 30 Minuten wurde eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Abschwächung der Hyperalgesie festgestellt. Bis hin zur Messung 4 Stunden nach der Behandlung mit Milnacipran nahm diese Verminderung des Hyperalgesie-Effekts zu (höchst signifikant). Bei den Messungen nach 8 und 24 Stunden war jedoch keine Substanzwirkung mehr nachweisbar.



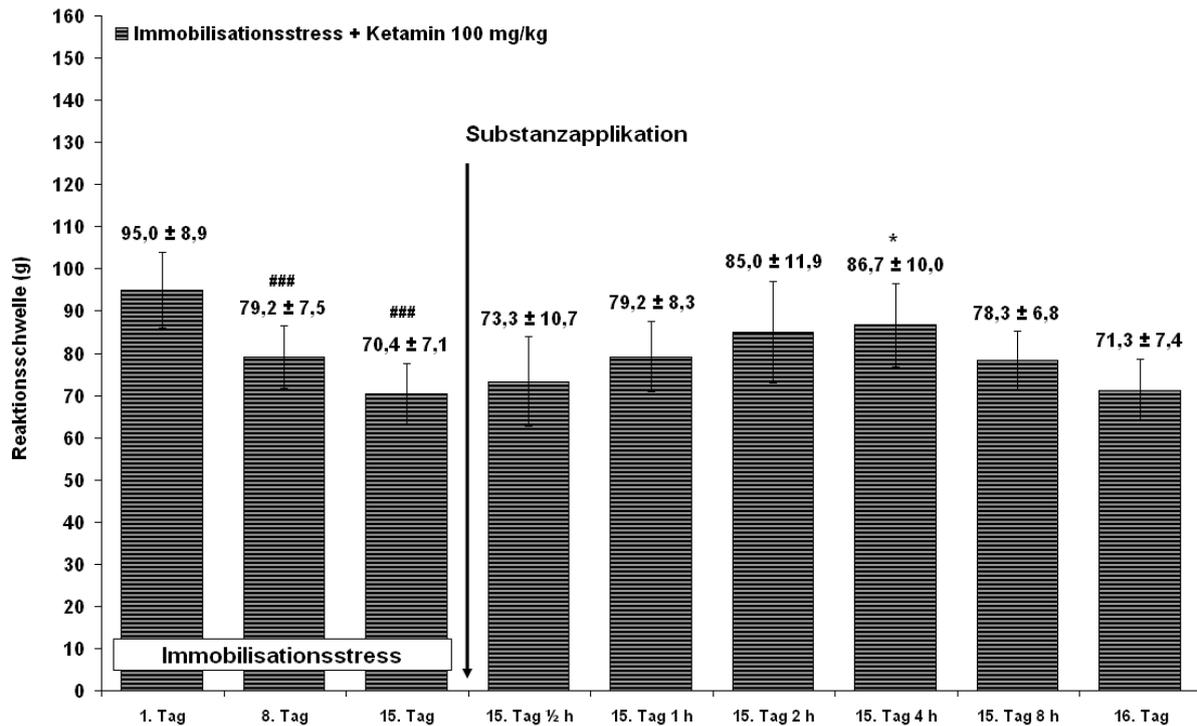
**Abb. 71:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 14-maligem täglichem Handlings im Randall-Selitto-Test vor und nach oraler Applikation von 0,2 % Agar an Tag 15. Die Gruppenwerte sind als MW ± SD dargestellt.



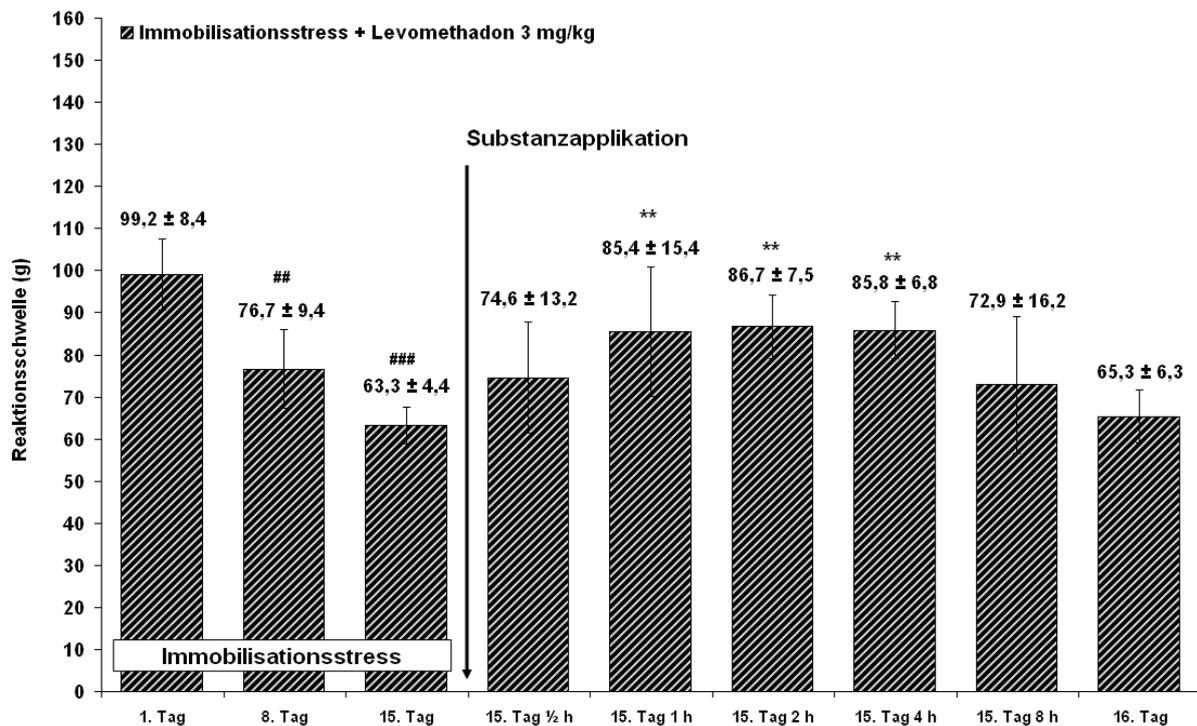
**Abb. 72:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress im Randall-Selitto-Test vor und nach oraler Applikation von 0,2 % Agar an Tag 15. Darstellung als MW ± SD; ### p < 0,001 vs. 1. Tag (t-Test, gepaart).



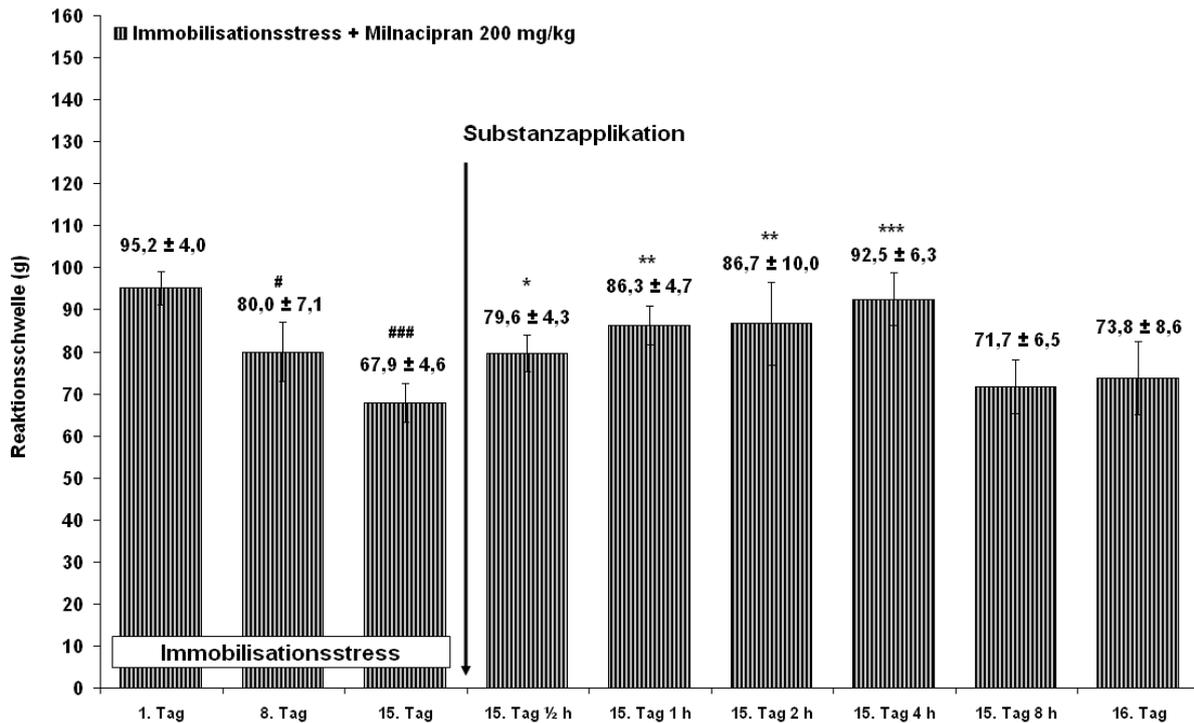
**Abb. 73:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress im Randall-Selitto-Test vor und nach Applikation von Diclofenac. Dargestellt als MW ± SD; # p < 0,05 vs. 1. Tag; ## p < 0,01 vs. 1. Tag (t-Test, gepaart).



**Abb. 74:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress im Randall-Selitto-Test vor und nach oraler Applikation von Ketamin. Darstellung als MW ± SD; ###  $p < 0,001$  vs. 1. Tag; \*  $p < 0,05$  vs. 15. Tag (t-Test, gepaart).



**Abb. 75:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress im Randall-Selitto-Test vor und nach Applikation von Levomethadon. Dargestellt als MW ± SD; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,001$  vs. 1. Tag; \*\*  $p < 0,01$  vs. 15. Tag (t-Test, gepaart).



**Abb. 76:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 14-maligem täglichen Immobilisationsstress im Randall-Selitto-Test vor und nach Applikation von Milnacipran. Darstellung als MW ± SD; #  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,001$  vs. 1. Tag; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. 15. Tag (t-Test, gepaart).

#### 4.5.3.2. Nozizeptionsmessungen bei Behandlung und Corticosteron-Aufnahme

Die Abbildungen 77 bis 82 zeigen die Randall-Selitto-Messwerte der Tiere mit Corticosteron oder Ethanol im Trinkwasser vor und nach den Substanzapplikationen.

Bei Betrachtung von Abbildung 77 erkennt man, dass im Vergleich zum ersten Tag keine statistischen Veränderungen der Reaktionsschwellen im Verlauf bis zum Tag 16 auftreten.

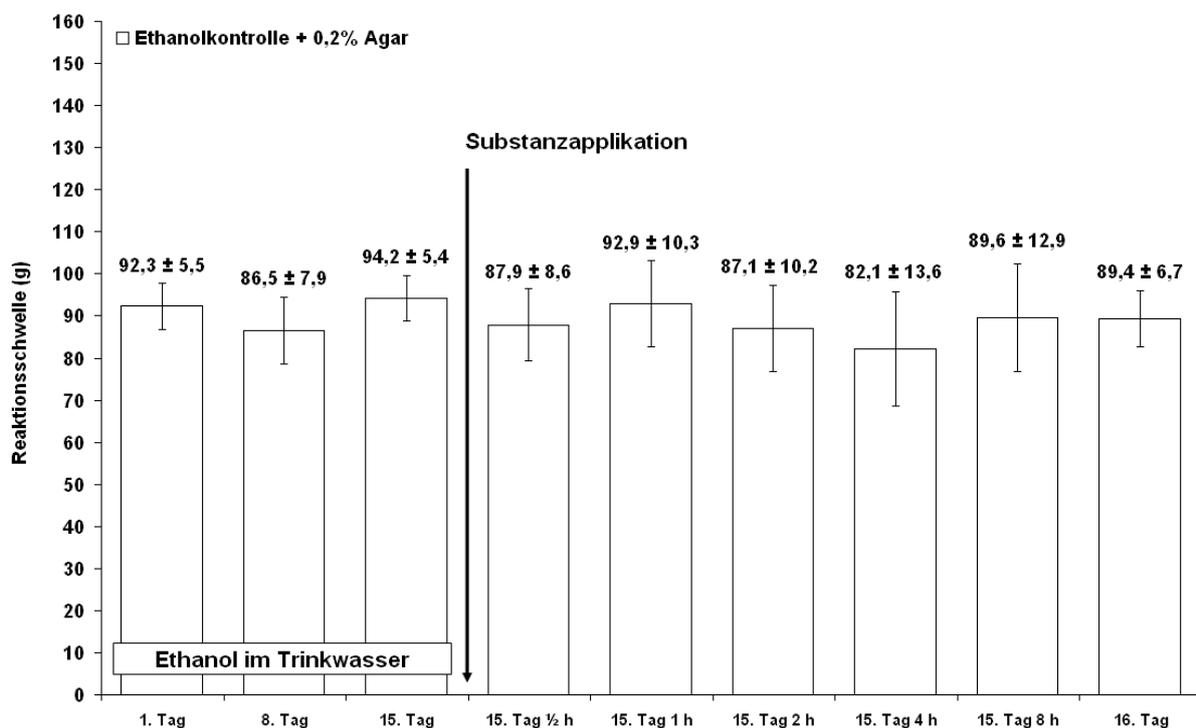
Bei den mit Agar behandelten Corticosteron-Tieren (Abbildung 78) zeigte sich bis zum Tag 15 eine höchst signifikante Verminderung der Schmerzschwelle ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zum ersten Tag. Diese mechanische Hyperalgesie war auch nach oraler Behandlung der Tiere mit Agar bis zum Tag 16 nachweisbar.

Anhand von Abbildung 79 werden die Reaktionsschwellen der Corticosteron-Tiere dargestellt, die oral 50 mg/kg Diclofenac erhielten. Vergleichend zum Tag 1 wiesen diese Tiere an Tag 15 eine höchst signifikante Reduktion ( $p < 0,001$ ) der Schmerzschwelle und somit eine Hyperalgesie auf. Nach oraler Applikation von Diclofenac zeigten sich bis hin zum Tag 16 keine statistisch signifikanten Veränderungen zu der Hyperalgesie an Tag 15, lediglich eine tendenzielle Abschwächung bis zu 1h nach Substanzapplikation konnte beobachtet werden. Die Corticosteron-Tiere, die am 15. Tag Ketamin (100 mg/kg) oral verabreicht bekamen (Abbildung 80), wiesen bis zur Behandlung eine höchst signifikante Verminderung der

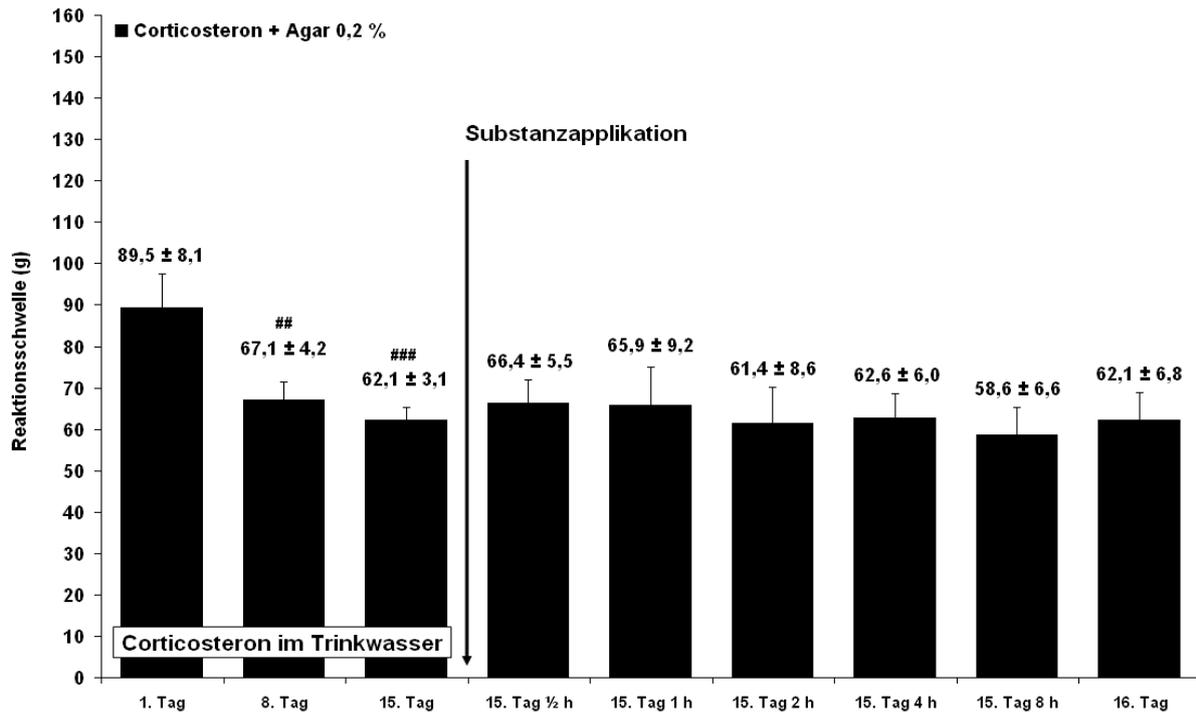
Schmerzschwelle ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zum ersten Messtag auf. Diese Hyperalgesie wurde zunehmend bis hin zur 1-stündigen Messung nach der Applikation signifikant abgeschwächt. Ab diesem Zeitpunkt nahm die Substanzwirkung ab, so dass bei den Folgemessungen keine statistischen Unterschiede mehr festgestellt werden konnten.

In Abbildung 81 zeigt sich, dass die Corticosteron-Tiere an Tag 15 eine höchst signifikante Verminderung der Schmerzschwelle ( $p < 0,001$ ) aufwiesen, die daraufhin mit Levomethadon (3 mg/kg) behandelt werden sollten. Nach dieser Applikation zeigte sich eine starke Abschwächung (zwischen 60 und 120 Minuten höchst signifikant) dieser Hyperalgesie bis zu 4 Stunden nach der Behandlung. Ab diesem Zeitpunkt nahm diese Substanzwirkung bis zur letzten Messung an Tag 16 weiter ab und wies keine statistische Signifikanz mehr auf.

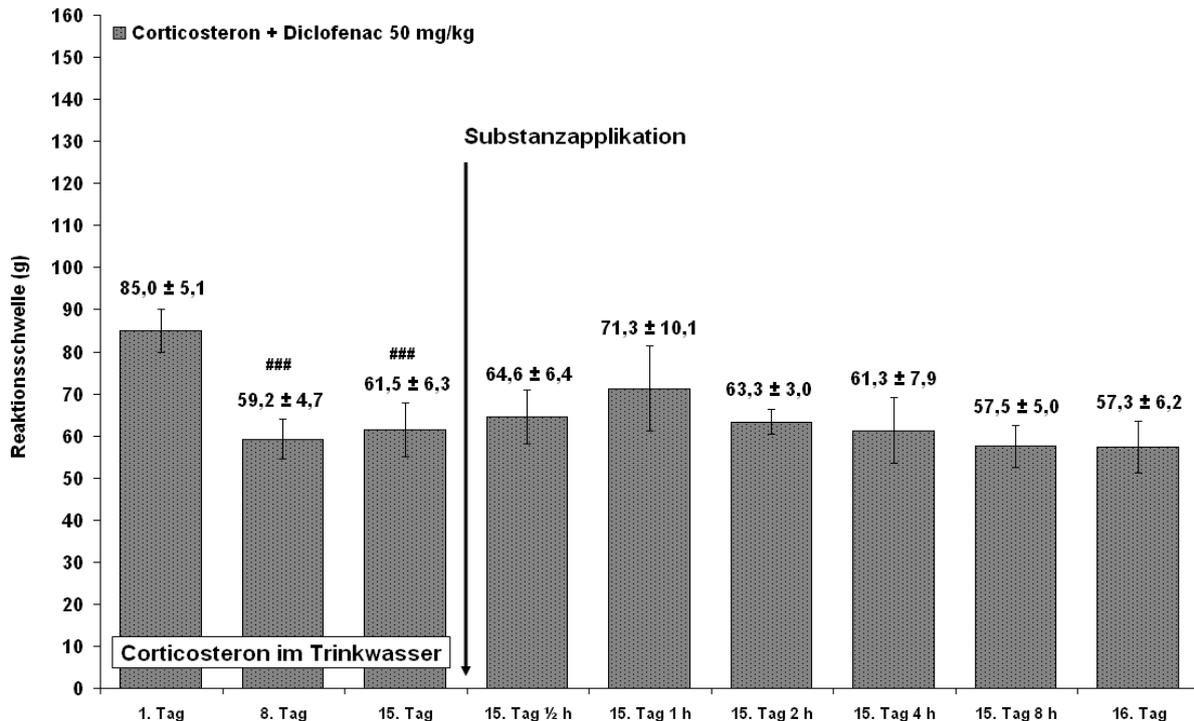
Bei den Tieren, die Corticosteron im Trinkwasser hatten und mit Milnacipran (100 mg/kg) behandelt wurden (Abbildung 82), zeigte sich bis zum Tag 15 eine hoch signifikante Verminderung der Schmerzschwelle ( $p < 0,01$ ) im Vergleich zum ersten Tag. Bereits 30 Minuten nach Applikation von Milnacipran wurde eine hoch signifikante ( $p < 0,01$ ) Abschwächung der Hyperalgesie festgestellt. Diese starke Verminderung des Hyperalgesie-Effekts konnte bis zur Messung 4 Stunden nach der Behandlung festgestellt werden. Bei den letzten beiden Nozizeptionsmessungen nach 8 und 24 Stunden war jedoch keine Substanzwirkung mehr nachweisbar.



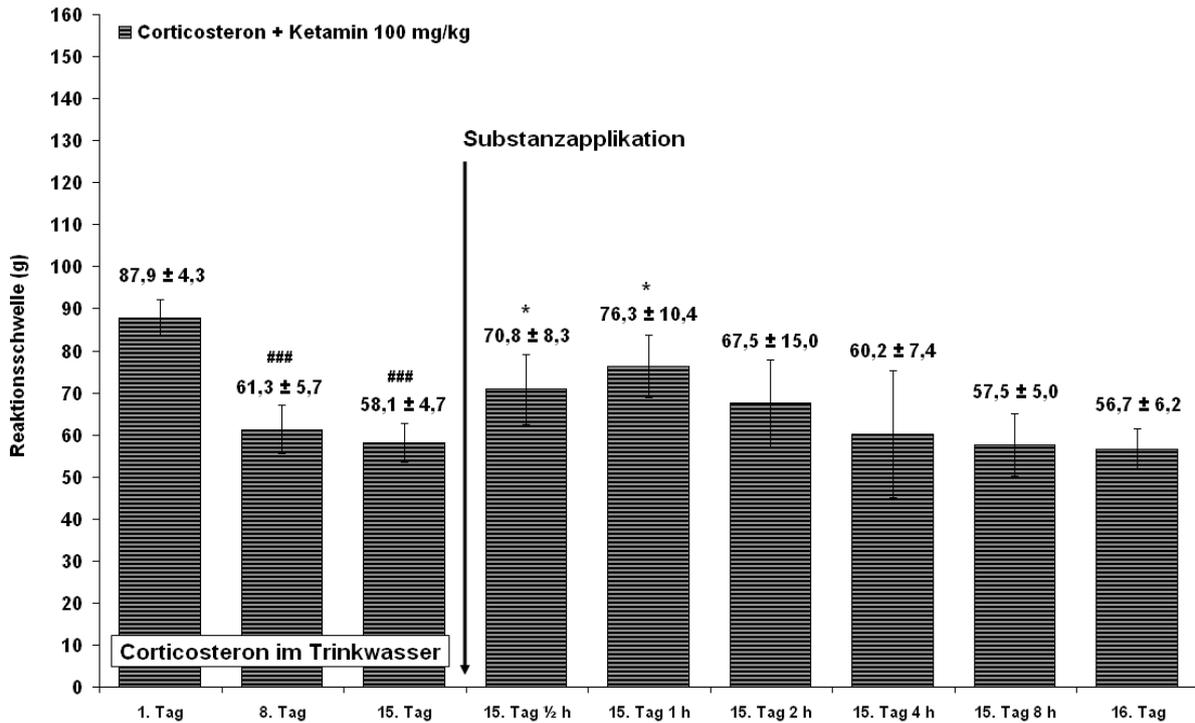
**Abb. 77:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 2-wöchiger Aufnahme von 2,5 % Ethanol im Trinkwasser im Randall-Selitto-Test vor und nach oraler Applikation von 0,2 % Agar. Die Gruppenwerte sind als MW ± SD dargestellt.



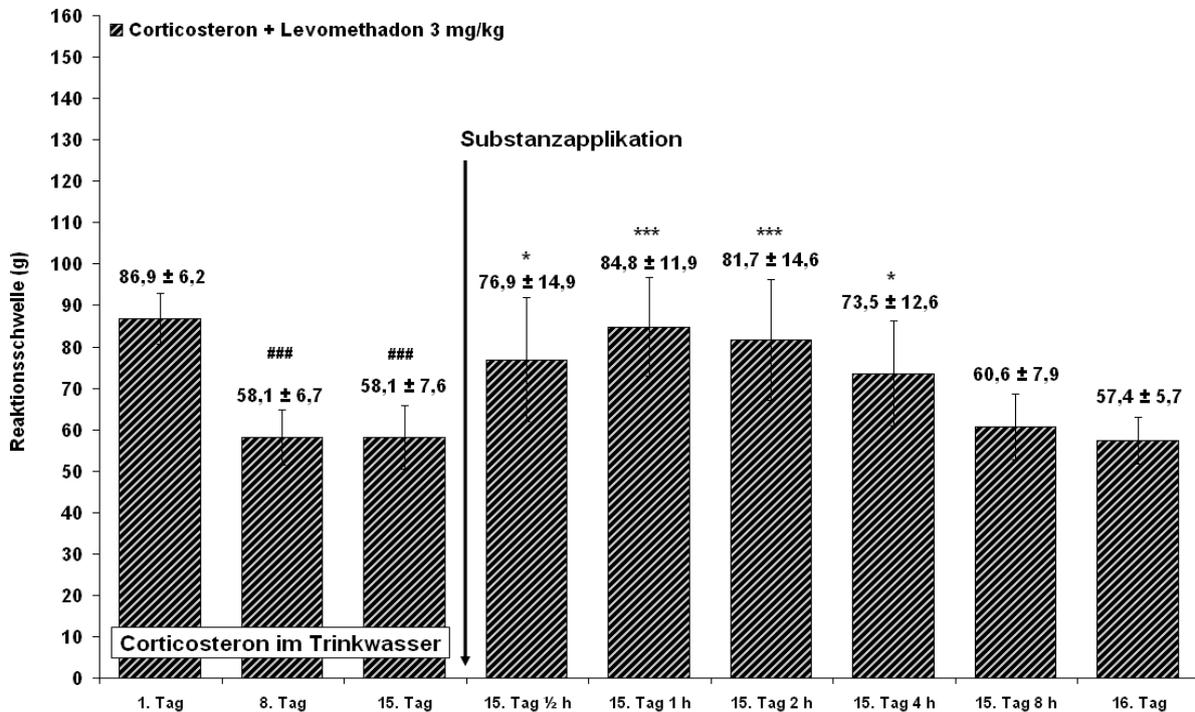
**Abb. 78:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 2-wöchiger Aufnahme von Corticosteron im Trinkwasser im Randall-Selitto-Test vor und nach oraler Applikation von 0,2 % Agar. Darstellung als MW ± SD; ### p < 0,001 vs. 1. Tag (t-Test, gepaart).



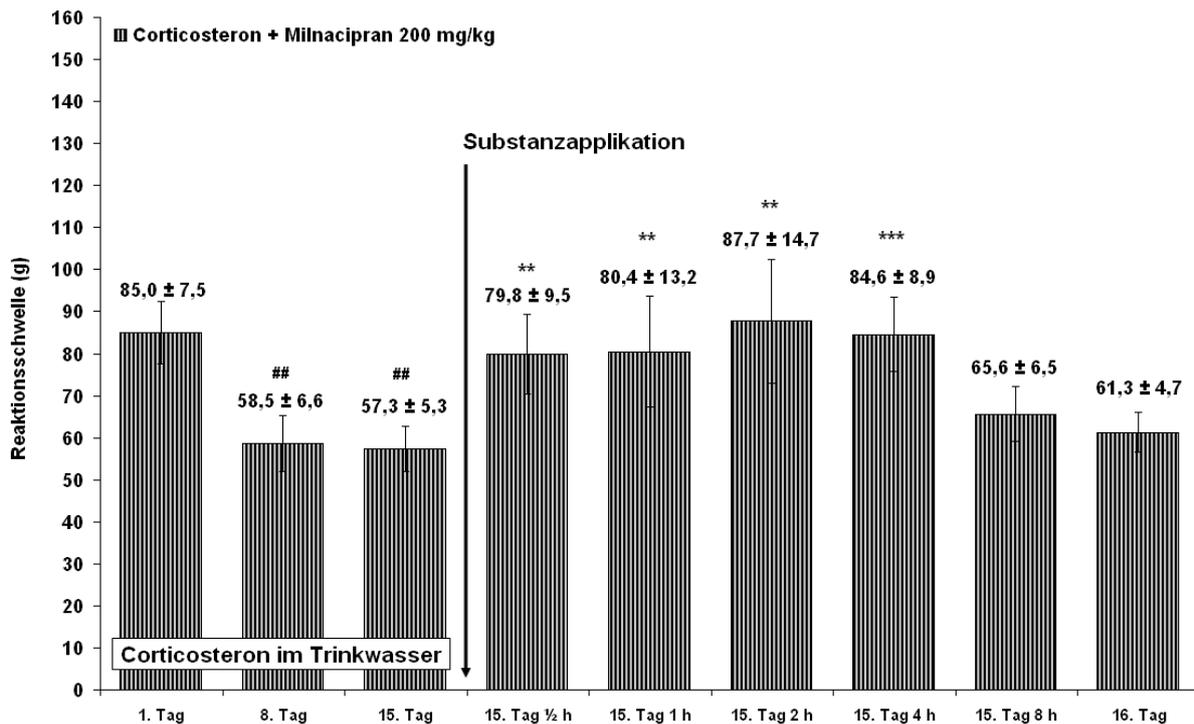
**Abb. 79:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 2-wöchiger Aufnahme von Corticosteron im Trinkwasser im Randall-Selitto-Test vor und nach Applikation von Diclofenac. Dargestellt als MW ± SD; # p < 0,05 vs. 1. Tag; ## p < 0,01 vs. 1. Tag (t-Test, gepaart).



**Abb. 80:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 2-wöchiger Aufnahme von Corticosteron im Trinkwasser im Randall-Selitto-Test vor und nach oraler Applikation von Ketamin. Darstellung als MW ± SD; ### p < 0,001 vs. 1. Tag; \* p < 0,05 vs. 15. Tag (t-Test, gepaart).



**Abb. 81:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 2-wöchiger Aufnahme von Corticosteron im Trinkwasser im Randall-Selitto-Test vor und nach Applikation von Levomethadon. Dargestellt als MW ± SD; ## p < 0,01, ### p < 0,001 vs. 1. Tag; \*\* p < 0,01 vs. 15. Tag (t-Test, gepaart).



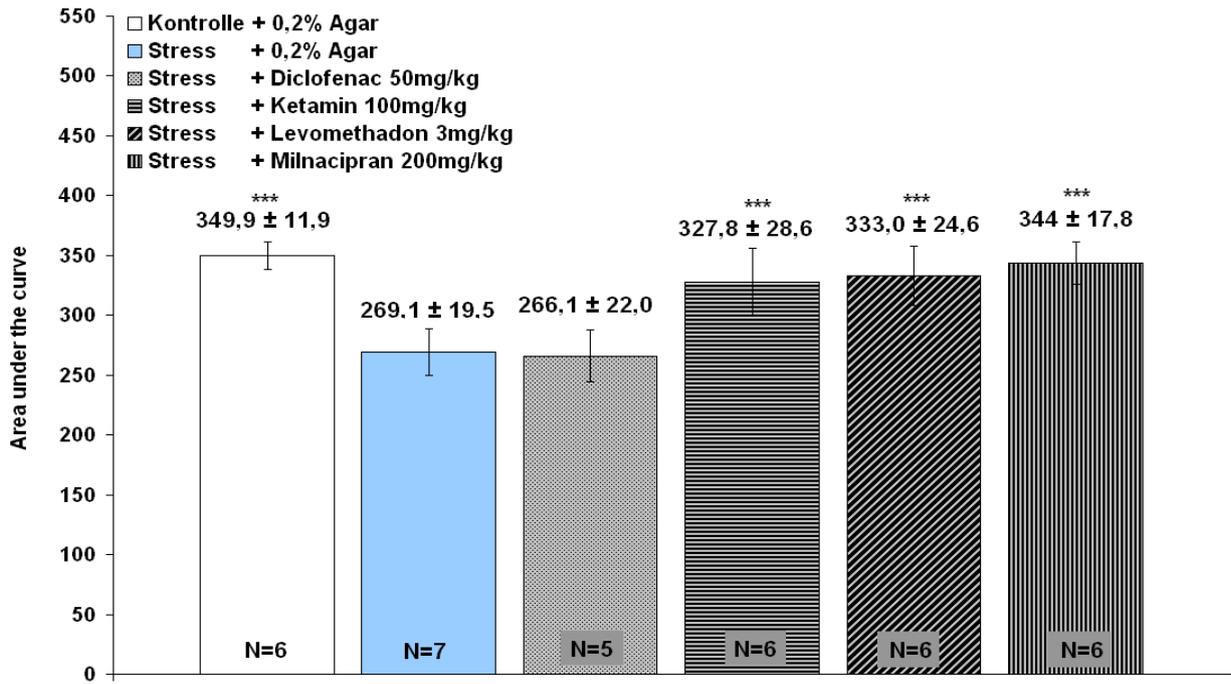
**Abb. 82:** Reaktionsschwellen (g) der Tiere nach 2-wöchiger Aufnahme von Corticosteron im Trinkwasser im Randall-Selitto-Test vor und nach Applikation von Milnacipran. Darstellung als MW ± SD; #  $p < 0,05$ , ###  $p < 0,001$  vs. 1. Tag; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  vs. 15. Tag (t-Test, gepaart).

#### 4.5.3.3. AUC der Substanzwirkungen im Zeitraum von 4 h nach Applikation

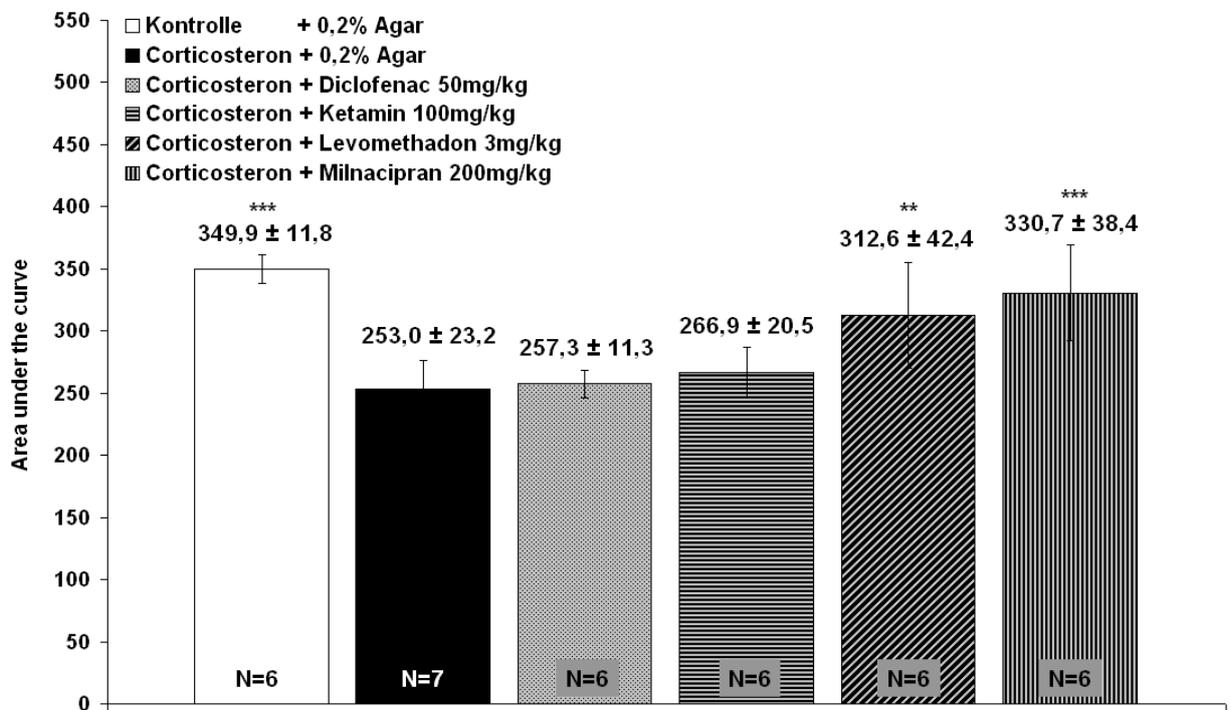
Die Abbildungen 83 und 84 zeigen die AUC der Reaktionsschwellen im Randall-Selitto-Test über den 4-stündigen Verlauf nach der per os-Applikation mit den entsprechenden Substanzen. Dieses Intervall von 4 Stunden wurde ausgewählt, da nach 8 Stunden keine Substanzwirkungen mehr festgestellt wurden (Abschnitte 4.5.3.1. und 4.5.3.2.).

Anhand von Abbildung 83 wird deutlich, dass zwischen Kontroll- und Stresstieren (jeweils nur mit Agar behandelt) höchst signifikante Unterschiede vorlagen ( $p < 0,001$ ). Ebenso zeigten sich höchst signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ) zwischen den mit Ketamin, Levomethadon oder Milnacipran behandelten Stressgruppen im Vergleich zu der mit Agar behandelten Stressgruppe.

In Abbildung 84 zeigten sich auch ähnliche Substanzeffekte im Corticosteron-Modell (exklusive Ketamin). Hier wiesen auch die mit Levomethadon bzw. Milnacipran behandelten Gruppen hoch ( $p < 0,01$ ) bzw. höchst ( $p < 0,001$ ) signifikante Unterschiede zur mit Agar behandelten Corticosteron-Gruppe auf. Dagegen wurden im Vergleich zu dieser letzteren Gruppe bei den mit Ketamin und Diclofenac behandelten Tieren keine statistischen Unterschiede festgestellt. Ebenso wie auch beim Immobilisationsstress zeigten die jeweils mit Agar behandelten Corticosteron- und Ethanol-Tiere untereinander höchst signifikante Unterschiede ( $p < 0,001$ ).



**Abb. 83:** AUC der Reaktionsschwellen im Randall-Selitto-Test über den 4-stündigen Verlauf nach Behandlung der Stresstiere. Dargestellt als MW ± SD; \*\*\* p < 0,001 (Bonferroni-Test, selektiert).



**Abb. 84:** AUC der Reaktionsschwellen im Randall-Selitto-Test über den 4-stündigen Verlauf nach Behandlung der Corticosteron-Tiere. Dargestellt als MW ± SD; \*\*p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 (Bonferroni-Test, selektiert).

#### 4.5.4. Diskussion

Ziel dieser Untersuchungen war es, weitere Aussagen zu den zugrunde liegenden Mechanismen der Immobilisationsstress- und der Corticosteron-induzierten Hyperalgesie zu treffen sowie Rückschlüsse zur prädiktiven Validität für Humanpatienten zu gewinnen.

In beiden Modellen wies der Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer Milnacipran die ausgeprägteste Hyperalgesie-abschwächende Wirkung auf. Bei Ratten konnte in diesem Zusammenhang bisher gezeigt werden, dass Milnacipran zur Erhöhung der Noradrenalin und Serotonin-Konzentration auf Rückenmarksebene führt (Obata et al., 2010). Beide Neurotransmitter vermitteln dabei den hemmenden Einfluss der rostralen ventromedialen Medulla auf die spinalen nozizeptiven Neurone (Millan, 2002). Dort aktivieren Serotonin bzw. Noradrenalin über 5-HT<sub>1A</sub>-, 5-HT<sub>2</sub>-, 5-HT<sub>7</sub>- bzw. über adrenerge  $\alpha$ 2-Rezeptoren hemmende Interneurone (Pan et al., 2002; Baba et al., 2000a; 2000b), die wiederum die Schmerzweiterleitung der nozizeptiven Rückenmarksneurone hemmen.

Im Vergleich zu anderen Versuchsergebnissen war bisher nur bekannt, dass der selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Fluoxetin bei Ratten eine durch Immobilisationsstress induzierte Hyperalgesie abschwächen kann, was zusätzlich für die Beteiligung des serotoninergeren Systems spricht (Gameiro et al., 2006). Auch Milnacipran wurde bereits in einem weiteren Modell, der Schwimmstress-induzierten Hyperalgesie, eingesetzt. Dort zeigte der Wirkstoff im Hot-Plate-Test allerdings keine signifikante Wirkung, was auf Unterschiede zwischen den Hyperalgesie-Modellen zurückzuführen sein könnte (Suarez-Roca et al., 2006b).

Neben diesen serotoninergeren Mechanismen kann zusätzlich auch das Opioidsystem eine Rolle spielen, da der spinal und supraspinal wirksame  $\mu$ -Opioid-Rezeptor-Agonist Levomethadon ebenso in beiden Modellen eine starke Hyperalgesie-abschwächende Wirkung aufwies. Die spinalen  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren befinden sich an der präsynaptischen Endigung und hemmen dort die Freisetzung von Glutamat (Light & Willcockson, 1999; Butler & Finn, 2009). Zusätzlich kommen sie auch im zentralen Höhlengrau vor und hemmen von dort aus die OFF-Zellen in der rostralen ventromedialen Medulla (Smith et al., 2011a) und somit die absteigende Hemmung der spinalen nozizeptiven Neurone. Die Opiode gelten vor allem als ein wichtiger Mediator der akuten Immobilisationsstress-induzierten Analgesie (Gamero et al., 1998; King et al., 2003; Costa et al., 2005). Allerdings nimmt ihre Wirkung bei zu häufigem Einsatz von exogenen Opioiden oder zu häufiger, Stress-induzierter Ausschüttung aufgrund einer Toleranzentwicklung ab und es bildet sich eine Opioid-vermittelte Hyperalgesie aus (Inturrisi, 2005; Konopka & van Wijhe, 2010). Im Zusammenhang mit chronischem Immobilisationsstress wurde dabei eine Abnahme der Opioid-Rezeptoren-Dichte festgestellt, die aus einer möglichen vermehrten  $\beta$ -Endorphin-Freisetzung resultieren kann (Dantas et al., 2005). Dennoch führte diese Verringerung der Rezeptorenanzahl nur bei niedrigen Dosierungen vom Opioid-Agonisten Morphin zur Wirkungsverminderung, während bei hohen Dosierungen kein Wirkungsverlust von Morphin feststellbar war (da Silva Torres et al., 2003). Ebenso ist die Ausbildung einer pharmakologischen Toleranz für wiederholte (Levo)Methadon-Gaben beschrieben, jedoch

entwickelt sich diese Toleranz im Vergleich zu Morphin wesentlich später (Bulka et al., 2002; Inturrisi, 2005).

Somit kann für die Immobilisationsstress- und Corticosteron-induzierten Hyperalgesie-Modelle geschlussfolgert werden, dass obwohl die  $\mu$ -Opioid-Rezeptor-Wirkung eingeschränkt sein kann, die eingesetzte Levomethadon-Dosierung dennoch ausreichend war, um die Hyperalgesie abschwächen zu können.

Der NMDA-Rezeptor-Antagonist Ketamin zeigte vor allem im Modell der Stress-induzierten Hyperalgesie eine gute Wirkung, während beim Corticosteron-Modell 60 Minuten nach der Behandlung nur ein tendenzieller Effekt erkennbar war. Dabei sind die glutamatergen NMDA-Rezeptoren besonders auf Rückenmarksebene für die Weiterleitung der nozizeptiven Signale wichtig, da durch sie die synaptische Übertragung verstärkt wird (Abschnitt 2.2.4.2.). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass Stress über die Glucocorticoid-Rezeptoren vermittelt eine NMDA-Rezeptor-Dysfunktion induzieren kann (Alexander et al., 2009, Marsden, 2011). Aus den Versuchen anderer liegen auch Hinweise vor, dass die NMDA-Rezeptoren an den Geschehen der Schwimmstress- und Kältestress-induzierten Hyperalgesie mitbeteiligt sein können (Okano et al., 1985; Suarez-Roca et al., 2006b; Quintero et al., 2011). Weiterhin konnte für einen NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie Ketamin gezeigt werden, dass es bei Ratten eine Hyperalgesie nach wiederholter Morphin-Gabe (Opioid-induzierte Hyperalgesie) vermindern kann (Haugan et al., 2007).

Im Gegensatz zu den anderen Substanzen konnte für das peripher-wirksame nicht-steroidale Antiphlogistikum Diclofenac bei beiden Modellen zu keinem Zeitpunkt ein Effekt auf die mechanische Hyperalgesie festgestellt werden. Somit liegt kein Hinweis vor, dass bei den induzierten Hyperalgesien periphere entzündliche Mechanismen (Basbaum et al., 2009) oder lokale Gewebsreizungen durch die wiederholten Nozizeptionsmessungen eine Rolle spielen (Le Bars et al., 2001).

Abschließend kann somit festgehalten werden, dass durch die eigenen Versuche erste Hinweise auf die beteiligten Mechanismen erlangt wurden. Sowohl die adrenergen, serotonineren, opioden und glutamatergen Neurotransmittersysteme spielen aufgrund der Wirkungen von Ketamin, Levomethadon und Milnacipran eine Rolle bei den Modellen der Immobilisationsstress- und Corticosteron-induzierten Hyperalgesie. Eine periphere inflammatorische Komponente kann allerdings aufgrund der negativen Wirkung von Diclofenac ausgeschlossen werden. Somit kann weiterhin für diese Modelle eine prädiktive Validität zum Humanpatienten angenommen werden.

Weiterführend könnten nun zu diesen ersten Hinweisen zusätzliche Wirkstoffe getestet werden, wie z.B. der Glucocorticoid-Rezeptor-Antagonist Mifepriston (Myers & Greenwood-Van Meerveld, 2007; 2010b). Auch die Anwendung von Pregabalin, einem Calcium-Kanal-Blocker, kann sinnvoll sein, da es ebenso bei Fibromyalgie-Patienten zum Einsatz kommt (Smith et al., 2011a) und die verstärkte Schmerz Wahrnehmung auf Rückenmarksebene durch eine Verminderung der synaptischen Übertragung hemmt (Abschnitt 2.2.4.2.). Zusätzlich kann durch den Einsatz eines Inhibitors der „Fatty acid amide hydrolase“ wie z. B. URB597 die Mitbeteiligung des Endocannabinoid-Systems am Hyperalgesie-Geschehen getestet werden (Jayamanne et al., 2006).

## 5. Zusammenfassung

### **Entwicklung und pharmakologische Charakterisierung eines experimentellen Modells für somatoforme und funktionelle Schmerzsyndrome**

Stress hat einen starken Einfluss auf die Schmerzwahrnehmung und äußert sich abhängig von den Stressmodalitäten entweder in einer erhöhten oder erniedrigten Sensitivität. Ebenso scheint Stress auch eine zentrale Rolle bei vielen somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen wie z. B. der Fibromyalgie zu spielen.

Zur Erzeugung einer andauernden Stresssituation wurden männliche Wistar-Ratten einem einstündigen Immobilisationsstress einmalig oder täglich über den Zeitraum von einer oder zwei Wochen ausgesetzt. Die Wirkung auf die Nozizeption wurde mit einem Randall-Selitto- und einem Tail-Flick-Test ausgewertet. Nur nach 2 Wochen zeigten die Tiere in beiden Nozizeptionstests eine signifikante Hyperalgesie. Aufgrund der höheren Effektstärke und der besseren Vergleichbarkeit des Druckschmerzes zum humanen Fibromyalgie-Syndrom erfolgte anschließend eine Beschränkung auf den Randall-Selitto-Test. Die weiterführenden Untersuchungen ergaben unter anderem, dass die Tiere mit der erhöhten Schmerzsensibilität gleichzeitig auch erhöhte Plasmaspiegel von Corticosteron sowie vergrößerte Nebennieren aufwiesen. Dies deutete auf eine Fehlregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA) hin, die eine Schlüsselrolle bei der Stressreaktion besitzt.

Zur Überprüfung des möglichen Zusammenhangs von HPA-Achsen-Dysregulation und der Hyperalgesie wurde in Wistarratten eine Hypercorticosteronämie durch die Zufuhr von Corticosteron über das Trinkwasser erzeugt. Zusätzlich erfolgten dabei die Messung der ACTH-Plasmaspiegel und die histologische Untersuchung der Nebennierenrinde, die den Syntheseort von Corticosteron darstellt. Die Tiere mit Corticosteron wiesen im Vergleich zu den gestressten Tieren ebenso eine erhöhte nozizeptive Sensitivität auf, die auf eine Dosisabhängigkeit zur Menge von Corticosteron im Trinkwasser hindeutete. Ebenso dosisabhängig waren die gleichzeitige Verkleinerung der Nebennierenrinde (vor allem der Zona fasciculata) und die verminderten ACTH-Spiegel dieser Tiere. Dagegen wiesen die Tiere nach wiederholtem Immobilisationsstress eine vergrößerte Nebennierenrinde sowie erhöhte ACTH-Spiegel auf. Daraus wird geschlossen, dass innerhalb einer fehlregulierten HPA-Achse vor allem die anhaltend erhöhten Plasmaspiegel von Corticosteron mit einer Hyperalgesie assoziiert sind.

Zur weiterführenden Aufklärung dieses Zusammenhangs erfolgten Untersuchungen an den Glucocorticoid-Rezeptoren. Dazu wurden jeweils nach wiederholtem Immobilisationsstress und wiederholter Corticosteron-Aufnahme über das Trinkwasser Milz-Lymphozyten der Tiere gewonnen und anhand dieser die Ansprechbarkeit und die Dichte der Glucocorticoid-Rezeptoren bestimmt. Es konnte eine verminderte Sensitivität der Glucocorticoid-Rezeptoren festgestellt werden bei einer gleichzeitigen Erhöhung der Rezeptordichte, die als eine versuchte Dekompensation angenommen wird. Weiterhin wird geschlossen, dass diese festgestellten Veränderungen an den Glucocorticoid-Rezeptoren zur erhöhten

Schmerzsensibilität beitragen, da eine Vielzahl von Nozizeptions-modulierenden Neurotransmittern über diesen Rezeptor beeinflusst wird.

Um für die beteiligten Neurotransmittersysteme auch pharmakologisch weitere Anhaltspunkte zu erhalten und um die Modelle der Immobilisationsstress- und Corticosteron-induzierten Hyperalgesie auch prädiktiv zu validieren, wurden verschiedene Pharmaka geprüft, die bei der Therapie von somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen eingesetzt werden können. Neben dem Noradrenalin-Serotonin-Wiederaufnahmehemmer Milnacipran erwies sich das Opioid Levomethadon in beiden Modellen als wirksam, während der NMDA-Antagonist Ketamin hauptsächlich die durch Immobilisationsstress induzierte Hyperalgesie aufhob. Dagegen wurde für das nicht steroidale Antiphlogistikum Diclofenac in beiden Modellen kein antihyperalgetischer Effekt beobachtet.

Die Ergebnisse zeigen, dass eine fehlregulierte Corticosteron-Ausschüttung in beiden Hyperalgesie-Modellen zu Veränderungen am Glucocorticoid-Rezeptor führt, was aufgrund der Beeinflussung von Nozizeptions-modulierenden Neurotransmittern in einer vermehrten Schmerzwahrnehmung resultiert. Weiterhin scheinen beide Modelle ebenso eine prädiktive Validität zu besitzen, da die erhöhte Schmerzsensibilität durch mögliche Therapeutika von somatoformen und funktionellen Schmerzsyndromen vermindert werden konnte. Unter dem Aspekt des Tierschutzes steht mit dem Modell der Corticosteron-induzierten Hyperalgesie eine neue belastungsarme experimentelle Methode zur Nachahmung der Wirkung von andauerndem Stress auf Nozizeption zur Verfügung.

## 6. Summary

### **Development and pharmacological characterization of an experimental model for functional and somatoform pain syndromes**

Stress has a strong influence on pain perception and may result in either increased or decreased sensitivity depending on the challenging conditions. Accordingly, stress appears to play a central role in many functional somatoform disorders such as fibromyalgia.

To create a long lasting stressful situation, male Wistar rats were exposed to a single restraint stress for 1 h only once or over periods of either one or two weeks. The effect on nociception was evaluated using the Randall-Selitto- and the tail-flick-test. After two weeks the animals exhibited a significant hyperalgesia in both tests. Due to the higher effect size and better comparability for pressure pain of tender points in human fibromyalgia syndrome further nociceptive testing was restricted to the Randall-Selitto-test. Additional analysis showed that rats with increased pain sensitivity also displayed elevated plasma levels of corticosterone with an accompanied enlargement of adrenal glands indicating a dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, which play a key role in the stress response.

In order to test for a possible correlation of HPA-axis dysregulation and hyperalgesia a persistent increase in plasma corticosterone was generated in Wistar rats by the administration of different concentrations of corticosterone via drinking water for two weeks. Additionally the measurement of plasma ACTH and histological examination of the adrenal cortex, which represents the site of corticosterone synthesis, were performed. Similar to the restraint stressed rats animals consuming different concentrations of corticosterone in drinking water exhibited also a significant mechanical hyperalgesia, indicating a dose-dependency to the amount of corticosterone in drinking water. These animals showed as well dose-dependent a concurrent reduction of the adrenal zona fasciculata and reduced ACTH plasma levels. On the other hand, the restraint animals exhibited an enlarged adrenal cortex and increased ACTH plasma levels. Thus it is concluded that within a dysregulated HPA-axis, especially the persistently elevated plasma levels of corticosterone are associated with hyperalgesia.

For further elucidation of this relationship studies were carried out on glucocorticoid receptors. For this purpose, from restrained and corticosterone drinking animals spleen lymphocytes were obtained, which were used for determination of responsiveness and density of glucocorticoid receptors. The lymphocytes of these animals showed a reduced sensitivity of glucocorticoid receptors with an accompanied increase of receptor density, which is assumed to be an attempted decompensation mechanism. Furthermore, it is supposed that the observed glucocorticoid receptor alterations may contribute to increased pain sensitivity, since a number of nociception-modulating neurotransmitters is affected by this receptor.

In order to validate the hyperalgesia models and to obtain additional information on the underlying mechanisms, different drugs which are used in the therapy of functional

somatoform pain disorders were tested by oral administration. In addition to the serotonin–norepinephrine reuptake inhibitor Milnacipran, the opioide levomethadone was found to be active in both models while the NMDA-antagonist ketamine abolished mainly the restraint stress-induced hyperalgesia. In contrast, no effect was observed for the COX-inhibitor diclofenac in both stress- and corticosterone-induced hyperalgesia.

The results indicate that a dysregulated corticosterone secretion leads in both hyperalgesia models to glucocorticoid receptor alterations, resulting in an increased pain perception due the influence on nociception-modulating neurotransmitters. Finally, both models seem to possess predictive validity as inhibition of hyperalgesia could be demonstrated for drugs used therapeutically to treat of functional somatoform pain disorders. Under animal welfare aspects the corticosterone-induced hyperalgesia model is a new animal friendly experimental method for mimicking stress effects on nociception.

## 7. Literaturangaben

- Abe T., Sugihara H., Nawa H., Shigemoto R., Mizuno N., Nakanishi S. (1992) Molecular characterization of a novel metabotropic glutamate receptor mGluR5 coupled to inositol phosphate/Ca<sup>2+</sup> signal transduction. *J Biol Chem*, 267 (19), 13361-13368.
- Ablin J., Neumann L., Buskila D. (2008) Pathogenesis of fibromyalgia - a review. *Joint Bone Spine*, 75 (3), 273-279.
- Adler G. K., Geenen R. (2005) Hypothalamic-pituitary-adrenal and autonomic nervous system functioning in fibromyalgia. *Rheum Dis Clin North Am*, 31 (1), 187-202.
- Adzic M., Djordjevic J., Djordjevic A., Niciforovic A., Demonacos C., Radojic M., Krstic-Demonacos M. (2009) Acute or chronic stress induce cell compartment-specific phosphorylation of glucocorticoid receptor and alter its transcriptional activity in Wistar rat brain. *J Endocrinol*, 202 (1), 87- 97.
- Alexander J. K., DeVries A. C., Kigerl K. A., Dahlman J. M., Popovich P. G. (2009) Stress exacerbates neuropathic pain via glucocorticoid and NMDA receptor activation. *Brain Behavior and Immunity*, 23, 851-860.
- Al-Mohaisen M., Cardounel A., Kalimi M. (2000) Repeated immobilization stress increases total cytosolic glucocorticoid receptor in rat liver. *Steroids*, 65 (1), 8-15.
- Aloisi A. M., Steenbergen H. L., van de Poll N. E., Farabollini F. (1994) Sex-dependent effects of restraint on nociception and pituitary-adrenal hormones in the rat. *Physiol Behav*, 55 (5), 789-793.
- Anacker C., Zunszain P. A., Carvalho L. A., Pariante C. M. (2011) The glucocorticoid receptor: pivot of depression and of antidepressant treatment? *Psychoneuroendocrinology*, 36 (3), 415-425.
- Andrews R. C., Walker B. R. (1999) Glucocorticoids and insulin resistance: old hormones, new targets. *Clin Sci*, 96 (5), 513-523.
- Anseloni V. C., Ennis M., Lidow M. S. (2003) Optimization of the mechanical nociceptive threshold testing with the Randall-Selitto assay. *J Neurosci Methods*, 131, 93-97.
- Apkarian A. V., Bushnell M. C., Treede R. D., Zubieta J. K. (2005) Human brain mechanisms of pain perception and regulation in health and disease. *Eur J Pain*, 9 (4), 463-484.
- Armario A., Gavaldà A., Martí J. (1995) Comparison of the behavioural and endocrine response to forced swimming stress in five inbred strains of rats. *Psychoneuroendocrinology*, 20 (8), 879-890.
- Arnold L. M., Clauw D. J., Wohlrreich M. M., Wang F., Ahl J., Gaynor P. J., Chappell A. S. (2009) Efficacy of duloxetine in patients with fibromyalgia: pooled analysis of 4 placebo-controlled clinical trials. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry*, 11 (5), 237-244.
- Arnold L. M., Gendreau R. M., Palmer R. H., Gendreau J. F., Wang Y. (2010) Efficacy and safety of milnacipran 100 mg/day in patients with fibromyalgia: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 62 (9), 2745-2756.
- Arnold L. M., Keck P. E. Jr, Welge J. A. (2000) Antidepressant treatment of fibromyalgia. A meta-analysis and review. *Psychosomatics*, 41 (2), 104-113.

- Arnsten A. F. (2009) Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function. *Nat Rev Neurosci*, 10 (6), 410-422.
- Atkinson H. C., Wood S. A., Castrique E. S., Kershaw Y. M., Wiles C. C., Lightman S. L. (2008) Corticosteroids mediate fast feedback of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis via the mineralocorticoid receptor. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 294 (6), E1011-E1022.
- Azkue J. J., Liu X. G., Zimmermann M., Sandkuehler J. (2003) Induction of long-term potentiation of C fibre-evoked spinal field potentials requires recruitment of group I, but not group II/III metabotropic glutamate receptors. *Pain*, 106 (3), 373-379.
- Baba H., Goldstein P. A., Okamoto M., Kohno T., Ataka T., Yoshimura M., Shimoji K. (2000a) Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 2): effects on somatodendritic sites of GABAergic neurons. *Anesthesiology*, 92 (2), 485-492.
- Baba H., Shimoji K., Yoshimura M. (2000b) Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1): effects on axon terminals of GABAergic and glycinergic neurons. *Anesthesiology*, 92 (2), 473-484.
- Bale T. L., Vale W. W. (2004) CRF and CRF receptors: role in stress responsivity and other behaviors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 525-557.
- Baraniuk J. N., Whalen G., Cunningham J., Clauw D. J. (2004) Cerebrospinal fluid levels of opioid peptides in fibromyalgia and chronic low back pain. *BMC Musculoskelet Disord*, 5, 48.
- Bardin L., Malfetes N., Newman-Tancredi A., Depoortère R. (2009) Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behav Brain Res*, 205 (2), 360-366.
- Basbaum A. I., Bautista D. M., Scherrer G., Julius D. (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139 (2), 267-284.
- Bauer A., Tronche F., Wessely O., et al. (1999) The glucocorticoid receptor is required for stress erythropoiesis. *Genes Dev*, 13, 2996-3002.
- Bendtsen L., Evers S., Linde M., Mitsikostas D. D., Sandrini G., Schoenen J. (2010) EFNS guideline on the treatment of tension-type headache - report of an EFNS task force. *Eur J Neurol*, 17 (11), 1318-1325.
- Berger A., Toelle T., Sadosky A., Dukes E., Edelsberg J., Oster G. (2009) Clinical and economic characteristics of patients with painful neuropathic disorders in Germany. *Pain Pract*, 9 (1), 8-17.
- Berretta S. (2005) Cortico-amygdala circuits: role in the conditioned stress response. *Stress*, 8 (4), 221-232.
- Bhatnagar S., Dallman M. (1998) Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience*, 84 (4), 1025-1039.
- Bilsky E., Reynolds J., Meng I. (2011) Role of the rostral ventromedial medulla in a rat model of stress-induced hypersensitivity to pain. American Academy of Pain Medicine Annual Meeting March 24–27 2011, Poster 151.
- Blanchard R. J., Blanchard D. C. (1989) Antipredator defensive behaviors in a visible burrow system. *J Comp Psychol*, 103 (1), 70-82.

- Blanchard R. J., McKittrick C. R., Blanchard D. C. (2001) Animal models of social stress: effects on behavior and brain neurochemical systems. *Physiol Behav*, 73 (3), 261-271.
- Blonk M. I., Koder B. G., van den Bemt P. M., Huygen F. J. (2010) Use of oral ketamine in chronic pain management: a review. *Eur J Pain*, 14 (5), 466-472.
- Boix F., Fernández Teruel A., Escorihuela R. M., Tobeña A. (1990) Handling-habituation prevents the effects of diazepam and alprazolam on brain serotonin levels in rats. *Behav Brain Res*, 36 (3), 209-215.
- Borchard R. E., Barnes C. D., Eltherington L. G. (1991) Drug dosage tables. In: *Drug dosage in laboratory animals: A Handbook*, edited by Borchard R. E., Barnes C. D., Eltherington L. G., The Telford Press, Inc, 1-511.
- Bowers S. L., Bilbo S. D., Dhabhar F. S., Nelson R. J. (2008) Stressor-specific alterations in corticosterone and immune responses in mice. *Brain Behav Immun*, 22 (1), 105-113.
- Bowles N. P., Hill M.N., Bhagat S. M., Karatsoreos I. N., Hillard C. J., McEwen B. S. (2012) Chronic, noninvasive glucocorticoid administration suppresses limbic endocannabinoid signaling in mice. *Neuroscience*, 204, 83-89.
- Bradesi S., Eutamene H., Garcia-Villar R., Fioramonti J., Buéno L. (2002) Acute and chronic stress differently affect visceral sensitivity to rectal distension in female rats. *Neurogastroenterol Motil*, 14 (1), 75-82.
- Bulka A., Plesan A., Xu X. J., Wiesenfeld-Hallin Z. (2002) Reduced tolerance to the anti-hyperalgesic effect of methadone in comparison to morphine in a rat model of mononeuropathy. *Pain*, 95, 103-109.
- Burow A., Day H. E., Campeau S. (2005) A detailed characterization of loud noise stress: intensity analysis of hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis and brain activation. *Brain Res*, 1062 (1-2), 63-73.
- Butler R. K., Finn D. P. (2009) Stress-induced analgesia. *Prog Neurobiol*, 88 (3), 184-202.
- Butts C. L., Shukair S. A., Duncan K. M., Harris C. W., Belyavskaya E., Sternberg E. M. (2007) Evaluation of steroid hormone receptor protein expression in intact cells using flow cytometry. *Nucl Recept Signal*, 5, e007.
- Buynitsky T., Mostofsky D. I. (2009) Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. *Neurosci Biobehav Rev*, 33, 1089-1098.
- Carrasco G. A., Van De Kar L. D. (2003) Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol*, 463, 235-272.
- Carrive P., Churyukanov M., Le Bars D. (2011) A reassessment of stress-induced "analgesia" in the rat using an unbiased method. *Pain*, 152 (3), 676-86.
- Carstens E., Wilson C. (1993) Rat tail flick reflex: magnitude measurement of stimulus-response function, suppression by morphine and habituation. *J Neurophysiol*, 70 (2), 630-639.
- Carter R. B. (1991) Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. *Pain*, 47 (2), 211-220.
- Caterina M. J., Schumacher M. A., Tominaga M., Rosen T. A., Levine J. D., Julius D. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389 (6653), 816-824.

- Cathcart S, Winefield A. H., Lushington K., Rolan P. (2010a) Stress and tension-type headache mechanisms. *Cephalalgia*, 30 (10), 1250-1267.
- Cathcart S., Petkov J., Pritchard D. (2008) Effects of induced stress on experimental pain sensitivity in chronic tension-type headache sufferers. *Eur J Neurol*, 15 (6), 552-558.
- Cathcart S., Petkov J., Winefield A. H., Lushington K., Rolan P. (2010b) Central mechanisms of stress-induced headache. *Cephalalgia*, 30 (3), 285-295.
- Catley D., Kaell A. T., Kirschbaum C., Stone A. A. (2000) A naturalistic evaluation of cortisol secretion in persons with fibromyalgia and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res*, 13 (1), 51-61.
- Chang C., Bezov D., Pappagallo M. (2010) Ketamine for chronic pain and treatment resistant depression: a mechanistic hypothesis. *Current Drug Therapy*, 5 (4), 229-249.
- Chen J. X., Tang Y. T., Yang J. X. (2008) Changes of glucocorticoid receptor and levels of CRF mRNA, POMC mRNA in brain of chronic immobilization stress rats. *Cell Mol Neurobiol*, 28 (2), 237-244.
- Chen-Izu Y., Xiao R. P., Izu L. T., Cheng H., Kuschel M., Spurgeon H., Lakatta E. G. (2000) G(i)-dependent localization of beta(2)-adrenergic receptor signaling to L-type Ca(2+) channels. *Biophys J*, 79 (5), 2547-2556.
- Choi I. S., Cho J. H., Jeong S. G., Hong J. S., Kim S. J., Kim J., Lee M. G., Choi B. J., Jang I. S. (2008) GABA (B) receptor-mediated presynaptic inhibition of glycinergic transmission onto substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord. *Pain*, 138 (2), 330-342.
- Chrousos G. P. (1998) Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann N Y Acad Sci* 851, 311-335.
- Chrousos G. P. (2009) Stress and disorders of the stress system. *Nat Rev Endocrinol*, 5 (7), 374-381.
- Chrousos, G. P., Gold, P. W. (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*, 267 (9), 1244-1252.
- Clauw D. J., Crofford L. J. (2003) Chronic widespread pain and fibromyalgia: what we know, and what we need to know. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 17 (4), 685-701.
- Cleare A. J. (2004) Stress and fibromyalgia--what is the link? *J Psychosom Res*, 57 (5), 423-425.
- Coates M. D., Mahoney C. R., Linden D. R., Sampson J. E., Chen J., Blaszyk H., Crowell M. D., Sharkey K. A., Gershon M. D., Mawe G. M., Moses P. L. (2004) Molecular defects in mucosal serotonin content and decreased serotonin reuptake transporter in ulcerative colitis and irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*, 126 (7), 1657-1664.
- Conrad K. L., Louderback K. M., Gessner C. P., Winder D. G. (2011) Stress-induced alterations in anxiety-like behavior and adaptations in plasticity in the bed nucleus of the stria terminalis. *Physiol Behav*, 104 (2), 248-256.
- Conway-Campbell B. L., McKenna M. A., Wiles C. C., Atkinson H. C., de Kloet E. R., Lightman S. L. (2007) Proteasome-dependent down-regulation of activated nuclear hippocampal glucocorticoid receptors determines dynamic responses to corticosterone. *Endocrinology*, 148 (11), 5470-5477.
- Costa A., Smeraldi A., Tassorelli C., Greco R., Nappi G. (2005) Effects of acute and chronic restraint stress on nitroglycerin-induced hyperalgesia in rats. *Neurosci Lett*, 383 (1-2), 7-11.

- Coull J. A., Beggs S., Boudreau D., Boivin D., Tsuda M., Inoue K., Gravel C., Salter M. W., De Koninck Y. (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature*, 438 (7070), 1017-1021.
- Coutinho S. V., Plotsky P. M., Sablad M., Miller J. C., Zhou H., Bayati A. I., McRoberts J. A., Mayer E. A. (2002) Neonatal maternal separation alters stress-induced responses to viscerosomatic nociceptive stimuli in rat. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282 (2), G307-G316.
- Covington E. C. (2000) Psychogenic pain-what it means, why it does not exist, and how to diagnose it. *Pain Med*, 1 (4), 287-294.
- Crofford L. J. (2002) The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of rheumatic diseases. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 31 (1), 1-13.
- Crofford L. J., Young E. A., Engleberg N. C., Korszun A., Brucksch C. B., McClure L. A., Brown M. B., Demitrack M. A. (2004) Basal circadian and pulsatile ACTH and cortisol secretion in patients with fibromyalgia and/or chronic fatigue syndrome. *Brain Behav Immun*, 18 (4), 314-325.
- da Silva Torres I. L., Cucco S. N., Bassani M., Duarte M. S., Silveira P. P., Vasconcellos A. P., Tabajara A. S., Dantas G., Fontella F. U., Dalmaz C., Ferreira M. B. (2003) Long-lasting delayed hyperalgesia after chronic restraint stress in rats-effect of morphine administration. *Neurosci Res*, 45 (3), 277-283.
- Dadabhoj D., Crofford L. J., Spaeth M., Russell I. J., Clauw D. J. (2008) Biology and therapy of fibromyalgia. Evidence-based biomarkers for fibromyalgia syndrome. *Arthritis Res Ther*, 10 (4), 211-228.
- Dallman M. F. (2007) Modulation of stress responses: how we cope with excess glucocorticoids. *Exp Neurol*, 206 (2), 179-182.
- Dantas G., Torres I. L., Crema L. M., Lara D. R., Dalmaz C. (2005) Repeated restraint stress reduces opioid receptor binding in different rat CNS structures. *Neurochem Res*, 30, 1-7.
- Datson N. A., Morsink M. C., Meijer O. C., de Kloet E. R. (2008) Central corticosteroid actions: search for gene targets. *Eur J Pharmacol*, 583 (2-3), 272-289.
- Datson N. A., van der Perk J., de Kloet E. R., Vreugdenhil E. (2001) Identification of corticosteroid-responsive genes in rat hippocampus using serial analysis of gene expression. *Eur J Neurosci*, 14 (4), 675-689.
- De Bosscher K., Vanden Berghe W., Haegeman G. (2003) The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression. *Endocr Rev*, 24 (4), 488-522.
- de Kloet E. R., Joëls M., Holsboer F. (2005) Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nat Rev Neurosci*, 6 (6), 463-475.
- de Kloet E. R., Karst H., Joëls M. (2008) Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Front Neuroendocrinol*, 29 (2), 268-272.
- Delaunay F., Khan A., Cintra A., Davani B., Ling Z. C., Andersson A., Ostenson C. G., Gustafsson J., Efendic S., Okret S. (1997) Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids. *J Clin Invest*, 100 (8), 2094-2098.
- Desmeules J. A., Cedraschi C., Rapiti E., Baumgartner E., Finckh A., Cohen P., Dayer P., Vischer T. L. (2004) Neurophysiologic evidence for a central sensitization in patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum*, 48 (5), 1420-1429.

- Devall A. J., Liu Z. W., Lovick T. A. (2009) Hyperalgesia in the setting of anxiety: sex differences and effects of the oestrous cycle in Wistar rats. *Psychoneuroendocrinology*, 34 (4), 587-596.
- Dhabhar F. S. (2009) Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*, 16 (5), 300-317.
- Dhabhar F. S., McEwen B. S. (1997) Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun*, 11 (4), 286-306.
- Dhabhar F. S., Miller A. H., McEwen B. S., Spencer R. L. (1996) Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *J Immunol*, 157 (4), 1638-1644.
- Dhaka A., Uzzell V., Dubin A. E., Mathur J., Petrus M., Bandell M., Patapoutian A. (2009) TRPV1 is activated by both acidic and basic pH. *J Neurosci*, 29 (1), 153-158.
- Di S., Maxson M. M., Franco A., Tasker J. G. (2009) Glucocorticoids regulate glutamate and GABA synapse-specific retrograde transmission via divergent nongenomic signaling pathways. *J Neurosci*, 29 (2), 393-401.
- Dimitriadis G., Leighton B., Parry-Billings M., Sasson S., Young M., Krause U., Bevan S., Piva T., Wegener G., Newsholme E. A. (1997) Effects of glucocorticoid excess on the sensitivity of glucose transport and metabolism to insulin in rat skeletal muscle. *Biochem J*, 321 (3), 707-712.
- Dina O. A., Khasar S. G., Gear R. W., Levine J. D. (2009) Activation of Gi induces mechanical hyperalgesia poststress or inflammation. *Neuroscience*, 160 (2), 501-507.
- Diorio D., Viau V., Meaney M. J. (1993) The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci*, 13 (9), 3839-3847.
- Djordjevic J., Vuckovic T., Jasic N., Cvijic G. (2007) Effect of various stressors on the blood ACTH and corticosterone concentration in normotensive Wistar and spontaneously hypertensive Wistar-Kyoto rats. *Gen Comp Endocrinol*, 153, 217-220.
- D'Mello R., Dickenson A. H. (2008) Spinal cord mechanisms of pain. *Br J Anaesth*, 101 (1), 8-16.
- Donello J. E., Guan Y., Tian M., Cheevers C. V., Alcantara M., Cabrera S., Raja S. N., Gil D. W. (2011) A peripheral adrenoceptor-mediated sympathetic mechanism can transform stress-induced analgesia into hyperalgesia. *Anesthesiology*, 114 (6), 1403-1416.
- Donner N. C., Montoya C. D., Lukkes J. L., Lowry C. A. (2011) Chronic non-invasive corticosterone administration abolishes the diurnal pattern of tph2 expression. *Psychoneuroendocrinology*, 37 (5), 645-661.
- Douglas D. K., Carstens E. (1997) Responses of rat sacral spinal neurons to mechanical and noxious thermal stimulation of the tail. *J Neurophysiol*, 77, 611-620.
- Drdla R., Sandkühler J. (2008) Long-term potentiation at C-fibre synapses by low-level presynaptic activity in vivo. *Mol Pain*, 4, 18.
- Drouin J., Sun Y. L., Chamberland M., Gauthier Y., De Léan A., Nemer M., Schmidt T. J. (1993) Novel glucocorticoid receptor complex with DNA element of the hormone-repressed POMC gene. *EMBO J*, 12 (1), 145-156.
- Dubin A. E., Patapoutian A. (2010) Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, 120 (11), 3760-3772.

- Ehlert U., Heim C., Hellhammer D. H. (1999) Chronic pelvic pain as a somatoform disorder. *Psychother Psychosom*, 68 (2), 87-94.
- Ehlert U., Nater U. M., Böhmelt A. (2005) High and low unstimulated salivary cortisol levels correspond to different symptoms of functional gastrointestinal disorders. *J Psychosom Res*, 59 (1), 7-10.
- Elias L. L., Clark A. J. (2000) The expression of the ACTH receptor. *Braz J Med Biol Res*, 33 (10), 1245-1248.
- Elsenbruch S. (2011) Abdominal pain in Irritable Bowel Syndrome: a review of putative psychological, neural and neuro-immune mechanisms. *Brain Behav Immun*, 25 (3), 386-394.
- Endres H. G., Böwing G., Diener H. C., Lange S., Maier C., Molsberger A., Zenz M., Vickers A. J., Tegenthoff M. (2007) Acupuncture for tension-type headache: a multicentre, sham-controlled, patient-and observer-blinded, randomised trial. *J Headache Pain*, 8 (5), 306-314.
- Espejo E. F., Mir D. (1993) Structure of the rat's behaviour in the hot plate test. *Behav Brain Res*, 56 (2), 171-176.
- Evanson N. K., Tasker J. G., Hill M. N., Hillard C. J., Herman J. P. (2010) Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology*, 151 (10), 4811-4819.
- Fagni L., Chavis P., Ango F., Bockaert J. (2000) Complex interactions between mGluRs, intracellular Ca<sup>2+</sup> stores and ion channels in neurons. *Trends Neurosci*, 23 (2), 80-88.
- Fanselow M. S. (1986) Conditioned fear-induced opiate analgesia: a competing motivational state theory of stress analgesia. *Ann N Y Acad Sci*, 467, 40-54.
- Ferland C. L., Schrader L. A. (2011) Cage mate separation in pair-housed male rats evokes an acute stress corticosterone response. *Neurosci Lett*, 489 (3), 154-158.
- Fleischer E., Handwerker H. O., Joukhadar S. (1983) Unmyelinated nociceptive units in two skin areas of the rat. *Brain Res*, 267 (1), 81-92.
- Foxx-Orenstein A. (2006) IBS--review and what's new. *Med Gen Med*, 8 (3), 20.
- Fries E., Hesse J., Hellhammer J., Hellhammer D. H. (2005) A new view on hypocortisolism. *Psychoneuroendocrinology*, 30 (10), 1010-1016.
- Fuller P. J., Young M. J. (2005) Mechanisms of mineralocorticoid action. *Hypertension*, 46 (6), 1227-1235.
- Fumal A., Schoenen J. (2008) Tension-type headache: current research and clinical management. *Lancet Neurol*, 7 (1), 70-83.
- Furlan A. D., Sandoval J. A., Mailis-Gagnon A., Tunks E. (2006) Opioids for chronic noncancer pain: a meta-analysis of effectiveness and side effects. *CMAJ*, 174 (11), 1589-1594.
- Galigniana M. D., Scruggs J. L., Herrington J., Welsh M. J., Carter-Su C., Housley P. R., Pratt W. B. (1998) Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin-inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton. *Mol Endocrinol*, 12 (12), 1903-1913.
- Gamaro G. D., Xavier M. H., Denardin J. D., Pilger J. A., Ely D. R., Ferreira M. B., Dalmaz C. (1998) The effects of acute and repeated restraint stress on the nociceptive response in rats. *Physiol Behav*, 63 (4), 693-697.

- Gameiro G. H., Gameiro P. H., Andrade Ada S., Pereira L. F., Arthuri M. T., Marcondes F. K., Veiga M. C. (2006) Nociception- and anxiety-like behavior in rats submitted to different periods of restraint stress. *Physiol Behav*, 87 (4), 643-649.
- Geerse G. J., van Gorp L. C., Wiegant V. M., Stam R. (2006) Individual reactivity to the open-field predicts the expression of stress-induced behavioural and somatic pain sensitisation. *Behav Brain Res*, 174 (1), 112-118.
- Geiss A., Rohleder N., Anton F. (2012) Evidence for an association between an enhanced reactivity of interleukin-6 levels and reduced glucocorticoid sensitivity in patients with fibromyalgia. *Psychoneuroendocrinology*, 37 (5), 671-684.
- Gilad G. M., Rabey J. M., Shenkman L. (1983) Strain-dependent and stress-induced changes in rat hippocampal cholinergic system. *Brain Res*, 267 (1), 171-174.
- Glavin G. B., Paré W. P., Sandbak T., Bakke H. K., Murison R. (1994) Restraint stress in biomedical research: an update. *Neurosci Biobehav Rev*, 18, 223–249.
- Golde D. W., Bersch N., Cline M. J. (1976) Potentiation of erythropoiesis in vitro by dexamethasone. *J Clin Invest*, 57 (1), 57-62.
- Goldstein D. S. (1995) Stress as a scientific idea: a homeostatic theory of stress and distress. *Homeostasis* 4, 177-215.
- Goldstein D. S., Kopin I. J. (2007) Evolution of concepts of stress. *Stress* 10 (2), 109-120.
- Gómez F., De Kloet E. R., Armario A. (1998) Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains. *Am J Physiol*, 274 (2), 420-427.
- Gotovac K., Sabioncello A., Rabatic S., Berki T., Dekaris D. (2003) Flow cytometric determination of glucocorticoid receptor (GCR) expression in lymphocyte subpopulations: lower quantity of GCR in patients with post-traumatic stress disorder (PTSD). *Clin Exp Immunol*, 131 (2), 335-339.
- Gourley S. L., Taylor J. R. (2009) Recapitulation and reversal of a persistent depression-like syndrome in rodents. *Curr Protoc Neurosci*, 9, 9-32.
- Graven-Nielsen T., Aspegren Kendall S., Henriksson K. G., Bengtsson M., Sörensen J., Johnson A., Gerdle B., Arendt-Nielsen L. (2000) Ketamine reduces muscle pain, temporal summation, and referred pain in fibromyalgia patients. *Pain*, 85 (3), 483-491.
- Grissom N., Bhatnagar S. (2009) Habituation to repeated stress: get used to it. *Neurobiol Learn Mem*, 92 (2), 215-224.
- Groeneweg F. L., Karst H., de Kloet E. R., Joëls M. (2011) Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J Endocrinol*, 209 (2), 153-167.
- Hargreaves K., Dubner R., Brown F., Flores C., Joris J. (1988) A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32 (1), 77-88.
- Harris J., Drew L. J., Chapman V. (2000) Spinal anandamide inhibits nociceptive transmission via cannabinoid receptor activation in vivo. *Neuroreport*, 11 (12), 2817-2819.
- Harris R. E., Clauw D. J., Scott D. J., McLean S. A., Gracely R. H., Zubieta J. K. (2007) Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *J Neurosci*, 27 (37), 10000-10006.
- Haugan F., Rygh L. J., Tjølsen A. (2007) Ketamine blocks enhancement of spinal long-term potentiation in chronic opioid treated rats. *Acta Anaesthesiol Scand*, 52 (5), 681-787.

- Häuser W., Petzke F., Sommer C. (2010) Comparative efficacy and harms of duloxetine, milnacipran, and pregabalin in fibromyalgia syndrome. *J Pain*, 11 (6), 505-521.
- Hayes R. L., Bennett G. J., Newlon P. G., Mayer D. J. (1978) Behavioral and physiological studies of non-narcotic analgesia in the rat elicited by certain environmental stimuli. *Brain Res*, 155 (1), 69-90.
- Heinricher M. M., Barbaro N. M., Fields H. L. (1989) Putative nociceptive modulating neurons in the rostral ventromedial medulla of the rat: firing of on- and off-cells is related to nociceptive responsiveness. *Somatosens Mot Res*, 6 (4), 427-439.
- Heinricher M. M., Tavares I., Leith J. L., Lumb B. M. (2009) Descending control of nociception: specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res Rev*, 60 (1), 214-225.
- Heitzer M. D., Wolf I. M., Sanchez E. R., Witchel S. F., DeFranco D. B. (2007) Glucocorticoid receptor physiology. *Rev Endocr Metab Disord*, 8 (4), 321-330.
- Helmberg A., Auphan N., Caelles C., Karin M. (1995) Glucocorticoid-induced apoptosis of human leukemic cells is caused by the repressive function of the glucocorticoid receptor. *EMBO J*, 14 (3), 452-460.
- Hennessy J. W., Levine S. (1979) Stress, arousal, and the pituitary-adrenal system: a psychoendocrine hypothesis. In: *Progress in psychobiology and physiological psychology* 8, edited by Sprague J., Epstein, A., New York Academic Press, 133-177.
- Herman J. P., Adams D., Prewitt C. (1995) Regulatory changes in neuroendocrine stress-integrative circuitry produced by a variable stress paradigm. *Neuroendocrinology*, 61 (2), 180-190.
- Herman J. P., Cullinan W. E. (1997) Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo–pituitary–adrenocortical axis. *Trends Neurosci*, 20 (2), 78-84.
- Herman J. P., Figueiredo H., Mueller N. K., Ulrich-Lai Y., Ostrander M. M., Choi D. C., Cullinan W. E. (2003) Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol*, 24 (3), 151-180.
- Hoagland H., Elmadjian F., Pincus G. (1946) Stressful psychomotor performance and adrenal cortical function as indicated by the lymphocyte response. *J Clin Endocrinol Metab*, 6, 301-311.
- Hocking G., Cousins M. J. (2003) Ketamine in chronic pain management: an evidence-based review. *Anesth Analg*, 97 (6), 1730-1739.
- Hohmann A. G., Suplita R. L., Bolton N. M., Neely M. H., Fegley D., Mangieri R., Krey J. F., Walker J. M., Holmes P. V., Crystal J. D., Duranti A., Tontini A., Mor M., Tarzia G., Piomelli D. (2005) An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, 435 (7045), 1108-1112.
- Hollmann M., Hartley M., Heinemann S. (1997) Ca<sup>2+</sup> permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science*, 252 (5007), 851-853.
- Holsboer F. (2000) The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology*, 23 (5), 477-501.
- Hong S., Zheng G., Wu X., Snider N. T., Owyang C., Wiley J. W. (2011) Corticosterone mediates reciprocal changes in CB 1 and TRPV1 receptors in primary sensory neurons in the chronically stressed rat. *Gastroenterology*, 140 (2), 627-637.

- Hu Y., Cardounel A., Gursoy E., Anderson P., Kalimi M. (2000) Anti-stress effects of dehydroepiandrosterone: protection of rats against repeated immobilization stress-induced weight loss, glucocorticoid receptor production, and lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol*, 59 (7), 753-762.
- Hwang S. W., Oh U. (2007) Current concepts of nociception: nociceptive molecular sensors in sensory neurons. *Curr Opin Anaesthesiol*, 20 (5), 427-434.
- Iannetti G. D., Mouraux A. (2010) From the neuromatrix to the pain matrix (and back). *Exp Brain Res*, 205 (1), 1-12.
- Iijima M., Ito A., Kurosu S., Chaki S. (2010) Pharmacological characterization of repeated corticosterone injection-induced depression model in rats. *Brain Res*, 1359, 75-80.
- Ikeda H., Heinke B., Ruscheweyh R., Sandkuehler J. (2003) Synaptic plasticity in spinal lamina I projection neurons that mediate hyperalgesia. *Science*, 299 (5610), 1237-1240.
- Ikeda H., Murase K. (2004) Glial nitric oxide-mediated long-term presynaptic facilitation revealed by optical imaging in rat spinal dorsal horn. *J Neurosci*, 24 (44), 9888-9896.
- Imbe H., Iwai-Liao Y., Senba E. (2006) Stress-induced hyperalgesia: animal models and putative mechanisms. *Front Biosci*, 11, 2179-2192.
- Imbe H., Murakami S., Okamoto K., Iwai-Liao Y., Senba E. (2004) The effects of acute and chronic restraint stress on activation of ERK in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus. *Pain*, 112 (3), 361-371.
- Imbe H., Okamoto K., Donishi T., Senba E., Kimura A. (2010) Involvement of descending facilitation from the rostral ventromedial medulla in the enhancement of formalin-evoked nocifensive behavior following repeated forced swim stress. *Brain Res*, 1329, 103-112.
- Inturrisi C. E. (2005) Pharmacology of methadone and its isomers. *Minerva Anesthesiol*, 71, 435-437.
- IASP Taxonomy Working Group: Boyd D., Butler M., Carr D., Cohen M., Devor M., Dworkin R., Greenspan J., Jensen T., King S., Koltzenburg M., Loeser J., Merskey H., Okifuji A., Paice J., Serra J., Treede R. D., Woda A. (2011) Pain Terms. <http://www.iasp-pain.org/Content/NavigationMenu/GeneralResourceLinks/PainDefinitions>.
- Jackson H. C., Kitchen I. (1989) Swim-stress-induced antinociception in young rats. *Br J Pharmacol*, 96 (3), 617-622.
- Jackson J. L., O'Malley P. G., Kroenke K. (2006) Antidepressants and cognitive-behavioral therapy for symptom syndromes. *CNS Spectr*, 11 (3), 212-222.
- Jaggi A. S., Bhatia N., Kumar N., Singh N., Anand P., Dhawan R. (2011) A review on animal models for screening potential anti-stress agents. *Neurol Sci*, 32 (6), 993-1005.
- Janke E. A., Holroyd K. A., Romanek K. (2004) Depression increases onset of tension-type headache following laboratory stress. *Pain*, 111 (3), 230-238.
- Jayamanne A., Greenwood R., Mitchell V. A., Aslan S., Piomelli D., Vaughan C. W. (2006) Actions of the FAAH inhibitor URB597 in neuropathic and inflammatory chronic pain models. *Br J Pharmacol*, 147 (3), 281-288.
- Jensen R. (2003) Diagnosis, epidemiology, and impact of tension-type headache. *Curr Pain Headache Rep*, 7 (6), 455-459.

- Ji G., Neugebauer V. (2007) Differential effects of CRF1 and CRF2 receptor antagonists on pain-related sensitization of neurons in the central nucleus of the amygdala. *J Neurophysiol*, 97 (6), 3893-3904.
- Ji R. R., Kohno T., Moore K. A., Woolf C. J. (2003) Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends Neurosci*, 26 (12), 696-705.
- Joëls M., Karst H., Krugers H. J., Lucassen P. J. (2007) Chronic stress: implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Front Neuroendocrinol*, 28 (2-3), 72-96.
- Johnson S. A., Fournier N. M., Kalynchuk L. E. (2006) Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and HPA axis responses to a novel stressor. *Behav Brain Res*, 168 (2), 280-288.
- Jonas P., Bischofberger J., Sandkühler J. (1998) Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science*, 281 (5375), 419-424.
- Jørum E. (1988) Analgesia or hyperalgesia following stress correlates with emotional behavior in rats. *Pain*, 32 (3), 341-348.
- Kampfhammer H. P. (2008) Somatoforme Störungen und Somatisierungssyndrome. In: *Handbuch der Psychopharmakotherapie*, edited by Gründer G., Benkert O., Holsboer F., Springer Berlin Heidelberg, 1043-1057.
- Karatsoreos I. N., Bhagat S. M., Bowles N. P., Weil Z. M., Pfaff D. W., McEwen B. S. (2010) Endocrine and physiological changes in response to chronic corticosterone: a potential model of the metabolic syndrome in mouse. *Endocrinology*, 151 (5), 2117-2127.
- Kelly S., Chapman V. (2001) Selective cannabinoid CB1 receptor activation inhibits spinal nociceptive transmission in vivo. *J Neurophysiol*, 86 (6), 3061-3064.
- Khasar S. G., Burkham J., Dina O. A., Brown A. S., Bogen O., Alessandri-Haber N., Green P. G., Reichling D. B., Levine J. D. (2008) Stress induces a switch of intracellular signaling in sensory neurons in a model of generalized pain. *J Neurosci*, 28 (22), 5721-5730.
- Khasar S. G., Dina O. A., Green P. G., Levine J. D. (2009) Sound stress-induced long-term enhancement of mechanical hyperalgesia in rats is maintained by sympathoadrenal catecholamines. *J Pain*, 10 (10), 1073-1077.
- Khasar S. G., Green P. G., Levine J. D. (2005) Repeated sound stress enhances inflammatory pain in the rat. *Pain*, 116, 79-86.
- King C. D., Devine D. P., Vierck C. J., Rodgers J., Yezierski R. P. (2003) Differential effects of stress on escape and reflex responses to nociceptive thermal stimuli in the rat. *Brain Res*, 987 (2), 214-222.
- Kingery W. S., Agashe G. S., Sawamura S., Davies M. F., Clark J. D., Maze M. (2001) Glucocorticoid inhibition of neuropathic hyperalgesia and spinal Fos expression. *Anesth Analg*, 92 (2), 476-482.
- Konopka K. H., van Wijhe M. (2010) Opioid-induced hyperalgesia: pain hurts? *Br J Anaesth*, 105 (5), 555-557.
- Koolhaas J. M., de Boer S. F., Buwalda B. (2005) Stress. In: *The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests*, edited by Whishaw I. Q., Kolb B. Oxford University Press, 236-244.
- Kosten T. A., Zhang X. Y., Kehoe P. (2005) Neurochemical and behavioral responses to cocaine in adult male rats with neonatal isolation experience. *J Pharmacol Exp Ther*, 314 (2), 661-667.

- Krugers H. J., Lucassen P. J., Karst H., Joëls M. (2010) Chronic stress effects on hippocampal structure and synaptic function: relevance for depression and normalization by anti-glucocorticoid treatment. *Front Synaptic Neurosci*, 2, 24.
- Kvetnansky R., Sabban E. L., Palkovits M. (2009) Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*, 89 (2), 535-606.
- la Fleur S. E., Akana S. F., Manalo S. L., Dallman M. F. (2004) Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology*, 145 (5), 2174-2185.
- Lambert G. A., Mallos G., Zagami A. S. (2009) Von Frey's hairs--a review of their technology and use-- a novel automated von Frey device for improved testing for hyperalgesia. *J Neurosci Methods*, 177 (2), 420-426.
- Lambillotte C., Gilon P., Henquin J. C. (1997) Direct glucocorticoid inhibition of insulin secretion. An in vitro study of dexamethasone effects in mouse islets. *J Clin Invest*, 99 (3), 414-423.
- Langerman L., Zakowski M. I., Piskoun B., Grant G. J. (1995) Hot plate versus tail flick: evaluation of acute tolerance to continuous morphine infusion in the rat model. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 34 (1), 23-27.
- Lariviere W. R., Melzack R. (1996) The bee venom test: a new tonic-pain test. *Pain*, 66, 271-277.
- Lariviere W. R., Melzack R. (2000) The role of corticotropin-releasing factor in pain and analgesia. *Pain*, 84 (1), 1-12.
- Latremoliere A., Woolf C. J. (2009) Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. *J Pain*, ;10 (9), 895-926.
- Lau C. G., Takayasu Y., Rodenas-Ruano A., Paternain A. V., Lerma J., Bennett M. V., Zukin R. S. (2010) SNAP-25 is a target of protein kinase C phosphorylation critical to NMDA receptor trafficking. *J Neurosci*, 30 (1), 242-254.
- Lazarus R. S. (1974) Psychological stress and coping in adaptation and illness. *Int J Psychiatry Med* 5 (4), 321-333.
- Le Bars D., Gozariu M., Cadden S. W. (2001) Animal models of nociception. *Pharmacol Rev*, 53 (4), 597-652.
- Le Moal M. (2007) Historical approach and evolution of the stress concept: a personal account. *Psychoneuroendocrinology* 32, Suppl 1, 3-9.
- Leff P., Hernández-Gutiérrez M. E., Becerril L. E., Martínez C., Téllez-Santillán C., Pérez-Tapia M., Salazar A., Antón B., Berlanga C., Pavón L. (2010) The interacting neuroendocrine network in stress-inducing mood disorders. *The Open Neuroendocrinology Journal*, 3, 180-207.
- Lentjes E. G., Griep E. N., Boersma J. W., Romijn F. P., de Kloet E. R. (1997) Glucocorticoid receptors, fibromyalgia and low back pain. *Psychoneuroendocrinology*, 22 (8), 603-614.
- Levine J. D., Feldmesser M., Tecott L., Gordon N. C., and Izdebski K. (1984) Pain induced vocalization in the rat and its modification by pharmacological agents. *Brain Res*, 296 (1), 121-127.
- Lewis J. W., Cannon J. T., Liebeskind J. C. (1980) Opioid and nonopioid mechanisms of stress analgesia. *Science*, 208 (4444), 623-625.
- Li H., Kang J. F., Li Y. Q. (2002) Serotonin potentiation of glycine-activated whole-cell currents in the superficial laminae neurons of the rat spinal dorsal horn is mediated by protein kinase C. *Brain Res Bull*, 58 (6), 593-600.

- Light A. R., Willcockson H. H. (1999) Spinal laminae I-II neurons in rat recorded in vivo in whole cell, tight seal configuration: properties and opioid responses, *J Neurophysiol*, 82 (6), 3316-3326.
- Light K. C., White A. T., Tadler S., Jacob E., Light A. R. (2012) Genetics and gene expression involving stress and distress pathways in fibromyalgia with and without comorbid chronic fatigue syndrome. *Pain Res Treat*, 2012, 427869.
- Lightman S. L., Conway-Campbell B. L. (2010) The crucial role of pulsatile activity of the HPA axis for continuous dynamic equilibration. *Nat Rev Neurosci*, 11 (10), 710-718.
- Lineberry C. G. (1981) Laboratory animals in pain research. In: *Methods in animal experimentation*, edited by Gay W. I., New York Academic Press, 6, 237-311.
- Loughlin S. E., Foote S. L., Bloom F. E. (1986) Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience*, 18 (2), 291-306.
- Lowy M. T. (1991) Corticosterone regulation of brain and lymphoid corticosteroid receptors. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 39 (2), 147-154.
- Macedo J. A., Hesse J., Turner J. D., Meyer J., Hellhammer D. H., Muller C. P. (2008) Glucocorticoid sensitivity in fibromyalgia patients: decreased expression of corticosteroid receptors and glucocorticoid-induced leucine zipper. *Psychoneuroendocrinology*, 33 (6), 799-809.
- MacLennan A. J., Drugan R. C., Hyson R. L., Maier S. F., Madden J. 4th., Barchas J. D. (1982) Corticosterone: a critical factor in an opioid form of stress-induced analgesia. *Science*, 215 (4539), 1530-1532.
- Magariños A. M., McEwen B. S. (1995) Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: comparison of stressors. *Neuroscience*, 69 (1), 83-88.
- Magariños A. M., Orchinik M., McEwen B. S. (1998) Morphological changes in the hippocampal CA3 region induced by non-invasive glucocorticoid administration: a paradox. *Brain Res*, 809 (2), 314-318.
- Magerl W., Treede R. D. (2010) Physiologie von Nozizeption und Schmerz. In: *Schmerzpsychotherapie*, edited by Kroener-Herwig B., Frettloeh J., Klinger R., Nilges P., Springer Verlag Berlin Heidelberg, 30-75.
- Malkoski S. P., Dorin R. I. (1999) Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene. *Mol Endocrinol*, 13 (10), 1629-1644.
- Mamalaki E., Kvetnansky R., Brady L. S., Gold P. W., Herkenham M. (1992) Repeated immobilization stress alters tyrosine hydroxylase, corticotropin-releasing hormone and corticosteroid receptor messenger ribonucleic Acid levels in rat brain. *J Neuroendocrinol*, 4 (6), 689-699.
- Marin M. T., Cruz F. C., Planeta C. S. (2007) Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiol Behav*, 90 (1), 29-35.
- Marks W., Fournier N. M., Kalynchuk L. E. (2009) Repeated exposure to corticosterone increases depression-like behavior in two different versions of the forced swim test without altering nonspecific locomotor activity or muscle strength. *Physiol Behav*, 98, 67-72.
- Marsden W. N. (2011) Stressor-induced NMDAR dysfunction as a unifying hypothesis for the aetiology, pathogenesis and comorbidity of clinical depression. *Med Hypotheses*, 77 (4), 508-528.

- Martens C., Bilodeau S., Maira M., Gauthier Y., Drouin J. (2005) Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol*, 19 (4), 885-897.
- Martenson M. E., Cetas J. S., Heinricher M. M. (2009) A possible neural basis for stress-induced hyperalgesia. *Pain*, 14 (3), 236-244.
- Martí O., Martí J., Armario A. (1994) Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav*, 55 (4), 747-753.
- Masini C. V., Day H. E., Gray T., Crema L. M., Nyhuis T. J., Babb J. A., Campeau S. (2012) Evidence for a lack of phasic inhibitory properties of habituated stressors on HPA axis responses in rats. *Physiol Behav*, 105 (2), 568-575.
- Mason J. W. (1971) A re-evaluation of the concept of "non-specificity" in stress theory. *J Psychiatr Res* 8 (3), 323-333.
- Mason J. W. (1975) A historical view of the stress field. *J Human Stress* 1 (1), 6-12.
- Mayer M. L., Westbrook G. L., Guthrie P. B. (1984) Voltage-dependent block by Mg<sup>2+</sup> of NMDA responses in spinal cord neurones. *Nature*, 309 (5965), 261-263.
- McCarty R., Horwatt K., Konarska M. (1988) Chronic stress and sympathetic-adrenal medullary responsiveness. *Soc Sci Med*, 26 (3), 333-341.
- Mcdonald A. J., Mascagni F., Guo L. (1996) Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in the rat. *Neuroscience*, 71 (1), 55-75.
- McEwen B. S. (2004) Protection and damage from acute and chronic stress: allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 1032, 1-7.
- McEwen B. S. (2007) Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev*, 87 (3), 873-904.
- McEwen B. S., Kalia M. (2010) The role of corticosteroids and stress in chronic pain conditions. *Metabolism*, 59, Suppl 1, 9-15.
- McLean S. A., Clauw D. J. (2005) Biomedical models of fibromyalgia. *Disabil Rehabil*, 27 (12), 659-665.
- McNamara F. N., Randall A., Gunthorpe M. J. (2005) Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br J Pharmacol*, 144 (6), 781-790.
- Meagher L. C., Cousin J. M., Seckl J. R., Haslett C. (1996) Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes. *J Immunol*, 156 (11), 4422-4428.
- Mendes-Gomes J., Amaral V. C., Nunes-de-Souza R. L. (2011) Ventrolateral periaqueductal gray lesion attenuates nociception but does not change anxiety-like indices or fear-induced antinociception in mice. *Behav Brain Res*, 219 (2), 248-253.
- Mico J. A., Berrocoso E., Vitton O., Ladure P., Newman-Tancredi A., Bardin L., Depoortère R. (2011) Effects of milnacipran, duloxetine and indomethacin, in polyarthritic rats using the Randall-Selitto model. *Behav Pharmacol*, 22 (5-6), 599-606.
- Millan M. J. (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol*, 66 (6), 355-474.

- Milligan E. D., Twining C., Chacur M., Biedenkapp J., O'Connor K., Poole S., Tracey K., Martin D., Maier S. F., Watkins L. R. (2003) Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci*, 23 (3), 1026-1040.
- Mitra R., Sapolsky R. M. (2008) Acute corticosterone treatment is sufficient to induce anxiety and amygdaloid dendritic hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105 (14), 5573-5578.
- Mizoguchi K., Ishige A., Aburada M., Tabira T. (2003) Chronic stress attenuates glucocorticoid negative feedback: involvement of the prefrontal cortex and hippocampus. *Neuroscience*, 119 (3), 887-897.
- Moga M. M., Weis R. P., Moore R. Y. (1995) Efferent projections of the paraventricular thalamic nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, 359 (2), 221-238.
- Montell C. (2005) The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE*, 2005 (272), re3.
- Morilak D. A., Barrera G., Echevarria D. J., Garcia A. S., Hernandez A., Ma S., Petre C. O. (2005) Role of brain norepinephrine in the behavioral response to stress. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 29 (8), 1214-1224.
- Morrison S. F. (2001) Differential control of sympathetic outflow. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 281 (3), R683-R698.
- Morsink M. C., Van Gemert N. G., Steenbergen P. J., Joels M., De Kloet E. R., Datson N.A. (2007) Rapid glucocorticoid effects on the expression of hippocampal neurotransmission-related genes. *Brain Res*, 1150, 14-20.
- Motulsky H. J. (2007) Prism 5 statistics guide. GraphPad Software Inc., San Diego CA, 158-167.
- Munck A., Guyre P. M., Holbrook N. J. (1984) Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr Rev* 5 (1), 25-44.
- Murrough J. W. (2012) Ketamine as a novel antidepressant: from synapse to behavior. *Clin Pharmacol Ther*, 91 (2), 303-309.
- Musazzi L., Milanese M., Farisello P., Zappettini S., Tardito D., Barbiero V. S., Bonifacino T., Mallei A., Baldelli P., Racagni G., Raiteri M., Benfenati F., Bonanno G., Popoli M. (2010) Acute stress increases depolarization-evoked glutamate release in the rat prefrontal/frontal cortex: the dampening action of antidepressants. *PLoS One*, 5 (1), e8566.
- Myers B., Greenwood-Van Meerveld B. (2007) Corticosteroid receptor-mediated mechanisms in the amygdala regulate anxiety and colonic sensitivity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292 (6), 1622-1629.
- Myers B., Greenwood-Van Meerveld B. (2010a) Divergent effects of amygdala glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the regulation of visceral and somatic pain. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 298 (2), G295-303.
- Myers B., Greenwood-Van Meerveld B. (2010b) Elevated corticosterone in the amygdala leads to persistent increases in anxiety-like behavior and pain sensitivity. *Behav Brain Res*, 214 (2), 465-469.
- Myers B., Greenwood-Van Meerveld B. (2012) Differential involvement of amygdala corticosteroid receptors in visceral hyperalgesia following acute or repeated stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 302 (2), 260-266.
- Nagakura Y., Ito H., Shimizu Y. (2011) Animal models of fibromyalgia. In: *New insights into fibromyalgia*, edited by Wilke W. S., InTech, 41-58.

- Nagakura Y., Oe T., Aoki T., Matsuoka N. (2009) Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: a putative animal model of fibromyalgia. *Pain*, 146 (1-2), 26-33.
- Nash J. M., Thebarg R. W. (2006) Understanding psychological stress, its biological processes, and impact on primary headache. *Headache*, 46 (9), 1377-1386.
- Nasu T., Taguchi T., Mizumura K. (2009) Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. *Eur J Pain*, 14 (3), 236-244.
- Natelson B. H., Ottenweller J. E., Cook J. A., Pitman D., McCarty R., Tapp W. N. (1988) Effect of stressor intensity on habituation of the adrenocortical stress response. *Physiol Behav*, 43 (1), 41-46.
- Nater, U. M., Fischer, S., Ehlert, U. (2011) Stress as a pathophysiological factor in functional somatic syndromes. *Current Psychiatry Reviews*, 7 (2), 152-169.
- Neufeld-Cohen A., Tsoory M. M., Evans A. K., Getselter D., Gil S., Lowry C. A., Vale W. W., Chen A. (2010) A triple urocortin knockout mouse model reveals an essential role for urocortins in stress recovery. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107 (44), 19020-19025.
- Ngian G. S., Guymer E. K., Littlejohn G. O. (2011) The use of opioids in fibromyalgia. *Int J Rheum Dis*, 14 (1), 6-11.
- Nicholl B. I., Halder S. L., Macfarlane G. J., Thompson D. G., O'Brien S., Musleh M., McBeth J. (2008) Psychosocial risk markers for new onset irritable bowel syndrome--results of a large prospective population-based study. *Pain*, 137 (1), 147-155.
- Noguchi T., Makino S., Matsumoto R., Nakayama S., Nishiyama M., Terada Y., Hashimoto K. (2010) Regulation of glucocorticoid receptor transcription and nuclear translocation during single and repeated immobilization stress. *Endocrinology*, 151 (9), 4344-4355.
- Normand E., Potvin S., Gaumond I., Cloutier G., Corbin J. F., Marchand S. (2011) Pain inhibition is deficient in chronic widespread pain but normal in major depressive disorder. *J Clin Psychiatry*, 72 (2), 219-224.
- Obata H., Kimura M., Nakajima K., Tobe M., Nishikawa K., Saito S. (2010) Monoamine-dependent, opioid-independent antihypersensitivity effects of intrathecally administered milnacipran, a serotonin noradrenaline reuptake inhibitor, in a postoperative pain model in rats. *J Pharmacol Exp Ther*, 334 (3), 1059-1065.
- Ohara P. T., Vit J. P., Jasmin L. (2005) Cortical modulation of pain. *Cell Mol Life Sci*, 62 (1), 44-52.
- Okano K., Kuraishi Y., Satoh M. (1985) Effects of intrathecally injected glutamate and substance P antagonists on repeated cold stress-induced hyperalgesia in rats. *Biol Pharm Bull*, 18 (1), 42-44.
- O'Mahony C. M., Clarke G., Gibney S., Dinan T. G., Cryan J. F. (2011) Strain differences in the neurochemical response to chronic restraint stress in the rat: relevance to depression. *Pharmacol Biochem Behav*, 97 (4), 690-699.
- Omiya Y., Goto K., Ishige A., Komatsu Y. (2000) Changes in analgesia-producing mechanism of repeated cold stress loading in mice. *Pharmacol Biochem Behav*, 65 (2), 261-266.

- Opherk C., Tronche F., Kellendonk C., Kohlmüller D., Schulze A., Schmid W., Schütz G. (2004) Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol Endocrinol*, 18 (6), 1346-1353.
- Ossipov M. H., Dussor G. O., Porreca F. (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest*, 120 (11), 3779-3787.
- Ostrander M. M., Ulrich-Lai Y. M., Choi D. C., Richtand N. M., Herman J. P. (2006) Hypoactivity of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis during recovery from chronic variable stress. *Endocrinology*, 147 (4), 2008-2017.
- Ottenweller J. E. (2000) Animals models (nonprimate) for human stress. In: *Encyclopedia of stress*, edited by Fink G. New York Academic Press, 200-205.
- Oyadeyi A. S., Ajao F. O., Ibrinke G. F., Afolabi A. O. (2005) Acute restraint stress induces hyperalgesia via non-adrenergic mechanisms in rats. *African Journal of Biomedical Research*, 8 (2), 123-125.
- Oyama T., Ueda M., Kuraishi Y., Akaike A., Satoh M. (1996) Dual effect of serotonin on formalin-induced nociception in the rat spinal cord. *Neurosci Res*, 25 (2), 129-135.
- Pacák K., Palkovits M. (2001) Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev*, 22 (4), 502-548.
- Pan B., Castro-Lopes J. M., Coimbra A. (1999) Central afferent pathways conveying nociceptive input to the hypothalamic paraventricular nucleus as revealed by a combination of retrograde labeling and c-fos activation. *J Comp Neurol*, 413, 129-145.
- Pan Y. Z., Li D. P., Pan H. L. (2002) Inhibition of glutamatergic synaptic input to spinal lamina II (o) neurons by presynaptic alpha (2)-adrenergic receptors. *J Neurophysiol*, 87 (4), 1938-1947.
- Paré W. P., Glavin G. B. (1986) Restraint stress in biomedical research: a review. *Neurosci Biobehav Rev*, 10 (3), 339-370.
- Pariante C. M., Nemeroff C. B., Miller A. H. (1995) Glucocorticoid receptors in depression. *Isr J Med Sci*, 31 (12), 705-712.
- Pariante C. M. (2009) Risk factors for development of depression and psychosis. Glucocorticoid receptors and pituitary implications for treatment with antidepressant and glucocorticoids. *Ann N Y Acad Sci*, 1179, 144-152.
- Parikh D., Hamid A., Friedman T. C., Nguyen K., Tseng A., Marquez P., Lutfy K. (2011) Stress-induced analgesia and endogenous opioid peptides: the importance of stress duration. *Eur J Pharmacol*, 650 (2-3), 563-567.
- Petrov T., Krukoff T. L., Jhamandas J. H. (1993) Branching projections of catecholaminergic brainstem neurons to the paraventricular hypothalamic nucleus and the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res*, 609 (1-2), 81-92
- Petrus M., Peier A. M., Bandell M., Hwang S. W., Huynh T., Olney N., Jegla T., Patapoutian A. (2007) A role of TRPA1 in mechanical hyperalgesia is revealed by pharmacological inhibition. *Mol Pain*, 3, 40.
- Pilcher C. W., Browne J. L. (1983) Effects of naloxone and Mr 1452 on stress-induced changes in nociception of different stimuli in rats. *Life Sci*, 33 Suppl 1, 697-700.

- Ploghaus A., Narain C., Beckmann C. F., Clare S., Bantick S., Wise R., Matthews P. M., Rawlins J. N., Tracey I. (2001) Exacerbation of pain by anxiety is associated with activity in a hippocampal network. *J Neurosci*, 21 (24), 9896-9903.
- Plone M. A., Emerich D. F., and Lindner M. D. (1996) Individual differences in the hotplate test and effects of habituation on sensitivity to morphine. *Pain*, 66 (2-3), 265–270.
- Popoli M., Yan Z., McEwen B. S., Sanacora G. (2011) The stressed synapse: the impact of stress and glucocorticoids on glutamate transmission. *Nat Rev Neurosci*, 13 (1), 22-37.
- Porro C. A., Carli G. (1988) Immobilization and restraint effects on pain reactions in animals. *Pain*, 32 (3), 289-307.
- Price D. D. (2000) Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science*, 288 (5472), 1769-1772.
- Quintero L, Cardenas R, Suarez-Roca H. (2011) Stress-induced hyperalgesia is associated with a reduced and delayed GABA inhibitory control that enhances post-synaptic NMDA receptor activation in the spinal cord. *Pain*, 152 (8), 1909-1922.
- Rabasa C., Delgado-Morales R., Muñoz-Abellán C., Nadal R., Armario A. (2011a) Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose to repeated immobilization or restraint stress is not influenced by associative signals. *Behav Brain Res*, 217 (1), 232-239.
- Rabasa C., Muñoz-Abellán C., Daviu N., Nadal R., Armario A. (2011b) Repeated exposure to immobilization or two different footshock intensities reveals differential adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Physiol Behav*, 103 (2), 125-133.
- Randall, L. O., Selitto, J. J. (1957) A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn*, 111, 409-419.
- Reppert S. M., Weaver D. R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418 (6901), 935-941.
- Retana-Márquez S., Bonilla-Jaime H., Vázquez-Palacios G., Domínguez-Salazar E., Martínez-García R., Velázquez-Moctezuma J. (2003) Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*, 28 (2), 207-227.
- Reul J. M., de Kloet E. R. (1985) Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology*, 117 (6), 2505-2511.
- Reul J. M., Gesing A., Droste S., Stec I. S., Weber A., Bachmann C., Bilang-Bleuel A., Holsboer F., Linthorst A. C. (2000) The brain mineralocorticoid receptor: greedy for ligand, mysterious in function. *Eur J Pharmacol*, 405 (1-3), 235-249.
- Rhudy J. L., Meagher M. W. (2000) Fear and anxiety: divergent effects on human pain thresholds. *Pain*, 84 (1), 65-75.
- Riedemann T., Patchev A. V., Cho K., Almeida O. F. (2010) Corticosteroids: way upstream. *Mol Brain*, 3, 2.
- Riva R., Mork P. J., Westgaard R. H., Rø M., Lundberg U. (2010) Fibromyalgia syndrome is associated with hypocortisolism. *Int J Behav Med*, 17 (3), 223-233.
- Rivat C., Becker C., Blugeot A., Zeau B., Mauborgne A., Pohl M., Benoliel J. J. (2010) Chronic stress induces transient spinal neuroinflammation, triggering sensory hypersensitivity and long-lasting anxiety-induced hyperalgesia. *Pain*, 150 (2), 358-368.

- Rivat C., Laboureyras E., Laulin J. P., Le Roy C., Richebé P., Simonnet G. (2007) Non-nociceptive environmental stress induces hyperalgesia, not analgesia, in pain and opioid-experienced rats. *Neuropsychopharmacology*, 32 (10), 2217-2228.
- Ross C. A. (2005) Childhood sexual abuse and psychosomatic symptoms in irritable bowel syndrome. *J Child Sex Abus*, 14 (1), 27-38.
- Rose A. J., Vegiopoulos A., Herzig S. (2010) Role of glucocorticoids and the glucocorticoid receptor in metabolism: insights from genetic manipulations. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 122 (1-3), 10-20.
- Rozeboom M. (2008) Functions of the mineralocorticoid receptor in the hippocampus. Thesis, <http://hdl.handle.net/2027.42/58376>.
- Ruggiero D. A., Giuliano R., Anwar M., Stornetta R., Reis D. J. (1990) Anatomical substrates of cholinergic-autonomic regulation in the rat. *J Comp Neurol*, 292 (1), 1-53.
- Ruscheweyh R., Wilder-Smith O., Drdla R., Liu X. G., Sandkuehler J. (2011) Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. *Mol Pain*, 7, 20.
- Russell I. J., Orr M. D., Littman B., Vipraio G. A., Alboukrek D., Michalek J. E., Lopez Y., MacKillip F. (1994) Elevated cerebrospinal fluid levels of substance P in patients with the fibromyalgia syndrome. *Arthritis Rheum*, 37 (11), 1593-1601.
- Russell I. J., Vaeroy H., Javors M., Nyberg F. (1992) Cerebrospinal fluid biogenic amine metabolites in fibromyalgia/fibrositis syndrome and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 35 (5), 5550-5556.
- Ruuskanen J. O., Xhaard H., Marjamäki A., Salaneck E., Salminen T., Yan Y. L., Postlethwait J. H., Johnson M. S., Larhammar D., Scheinin M. (2004) Identification of duplicated fourth alpha2-adrenergic receptor subtype by cloning and mapping of five receptor genes in zebrafish. *Mol Biol Evol*, 21 (1), 14-28.
- Salter M. W., Kalia L. V. (2004) Src kinases: a hub for NMDA receptor regulation. *Nat Rev Neurosci*, 5 (4), 317-328.
- Sandkühler J. (2007) Understanding LTP in pain pathways. *Mol Pain*, 3, 9.
- Sandkühler J. (2009a) Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. *Physiol Rev*, 89 (2), 707-758.
- Sandkühler J. (2009b) The roles of inhibition for the generation and amplification of pain. In: *Current Topics in Pain*, edited by Castro-Lopes J. M., Seattle IASP 2009, 53-71.
- Santana P., Akana S. F., Hanson E. S., Strack A. M., Sebastian R. J., Dallman M. F. (1995) Aldosterone and dexamethasone both stimulate energy acquisition whereas only the glucocorticoid alters energy storage. *Endocrinology*, 136 (5) 2214-2222.
- Santos-Nogueira E., Redondo Castro E., Mancuso R., Navarro X. (2011) Randall-Selitto test: a new approach for the detection of neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma*, 29 (5), 898-904.
- Sapolsky R. M., Romero L. M., Munck A. U. (2000) How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev*, 21 (1), 55-89.
- Sarabdjitsingh R. A., Conway-Campbell B. L., Leggett J. D., Waite E. J., Meijer O. C., de Kloet E. R., Lightman S. L. (2010a) Stress responsiveness varies over the ultradian glucocorticoid cycle in a brain-region-specific manner. *Endocrinology*, 151 (11), 5369-5379.

- Sarabdjitsingh R. A., Meijer O. C., de Kloet E. R. (2010b) Specificity of glucocorticoid receptor primary antibodies for analysis of receptor localization patterns in cultured cells and rat hippocampus. *Brain Res*, 1331, 1-11.
- Sarchielli P., Mancini M. L., Floridi A., Coppola F., Rossi C., Nardi K., Acciarresi M., Pini L. A., Calabresi P. (2007) Increased levels of neurotrophins are not specific for chronic migraine: evidence from primary fibromyalgia syndrome. *J Pain*, 8 (9), 737-745.
- Sato M., Kuraishi Y., Kawamura M. (1992) Effects of intrathecal antibodies to substance P, calcitonin gene-related peptide and galanin on repeated cold stress-induced hyperalgesia: comparison with carrageenan-induced hyperalgesia. *Pain*, 49 (2), 273-278.
- Sawchenko P. E., Swanson L. W., Steinbusch H. W., Verhofstad A. A. (1983) The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res*, 277 (2), 355-360.
- Scherer I. J., Holmes P. V., Harris R. B. (2011) The importance of corticosterone in mediating restraint-induced weight loss in rats. *Physiol Behav*, 102 (2), 225-233.
- Schmidtke A., Tegeder I., Geisslinger G. (2009) No NO, no pain? The role of nitric oxide and cGMP in spinal pain processing. *Trends Neurosci*, 32 (6), 339-346.
- Schottelius A., Wedel S., Weltrich R., Rohde W., Buttgerit F., Schreiber S., Lochs H. (2010) Higher expression of glucocorticoid receptor in peripheral mononuclear cells in inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol*, 95 (8), 1994-1999.
- Schouenborg J., Sjölund B. H. (1983) Activity evoked by A- and C-afferent fibers in rat dorsal horn neurons and its relation to a flexion reflex. *J Neurophysiol*, 50 (5), 1108-1121.
- Schweinhardt P., Sauro K. M., Bushnell M. C. (2008) Fibromyalgia: a disorder of the brain? *Neuroscientist*, 14 (5), 415-421.
- Selye H. (1936) A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138, 32.
- Selye H. (1973) The evolution of the stress concept. *Am Sci* 61 (6), 692-699.
- Seminowicz D. A., Mikulis D. J., Davis K. D. (2004) Cognitive modulation of pain-related brain responses depends on behavioral strategy. *Pain*, 112 (1-2), 48-58.
- Senba E., Okamoto K., Imbe H. (2011) Central sensitization and descending facilitation in chronic pain state. In: *New insights into fibromyalgia*, edited by Wilke W. S., InTech, 19-40.
- Sivilotti L., Woolf C. J. (1994) The contribution of GABAA and glycine receptors to central sensitization: disinhibition and touch-evoked allodynia in the spinal cord. *J Neurophysiol*, 72 (1), 169-179.
- Sjöstrand M., Eriksson J. W. (2009) Neuroendocrine mechanisms in insulin resistance. *Mol Cell Endocrinol*, 297, 104-111.
- Smith D. L., D'Amour M. C., D'Amour F. E. (1943) The analgesic properties of certain drugs and drug combinations. *J Pharmacol Exp Ther*, 77, 184-193.
- Smith H. S., Bracken D., Smith J. M. (2011a) Pharmacotherapy for fibromyalgia. *Front Pharmacol*, 2, 17.
- Smith H. S., Harris R., Clauw D. (2011b) Fibromyalgia: an afferent processing disorder leading to a complex pain generalized syndrome. *Pain Physician*, 14 (2), 217-245.
- Socolovsky M. (2007) Molecular insights into stress erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*, 14 (3), 215-224.

- Spencer R. L., Kalman B. A., Cotter C. S., Deak T. (2000) Discrimination between changes in glucocorticoid receptor expression and activation in rat brain using western blot analysis. *Brain Res*, 868 (2), 275-286.
- Spiga F., Waite E. J., Liu Y., Kershaw Y. M., Aguilera G., Lightman S. L. (2011) ACTH-dependent ultradian rhythm of corticosterone secretion. *Endocrinology*, 152 (4), 1448-1457.
- Stark J. L., Avitsur R., Padgett D. A., Campbell K. A., Beck F. M., Sheridan J. F. (2001) Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 280 (6), 1799-1805.
- Starowicz K., Przewlocka B. (2003) The role of melanocortins and their receptors in inflammatory processes, nerve regeneration and nociception. *Life Sci*, 73, 823-847.
- Staud R. (2009) Pharmacological treatment of fibromyalgia syndrome: new developments. *Drugs*, 70 (1), 1-14.
- Staud R. (2010) Is it all central sensitization? Role of peripheral tissue nociception in chronic musculoskeletal pain. *Curr Rheumatol Rep*, 12 (6), 448-454.
- Stovner L. j., Hagen K., Jensen R., Katsarava Z., Lipton R., Scher A., Steiner T., Zwart J. A. (2007) The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalalgia*, 27 (3), 193-210.
- Strack A. M., Sawyer W. B., Platt K. B., Loewy, A. D. (1989) CNS cell groups regulating the sympathetic outflow to adrenal gland as revealed by transneuronal cell body labelling with pseudorabies virus. *Brain Res*, 491 (2), 274-296.
- Suarez-Roca H., Leal L., Silva J. A., Pinerua-Shuhaibar L., Quintero L. (2008) Reduced GABA neurotransmission underlies hyperalgesia induced by repeated forced swimming stress. *Behav Brain Res*, 189 (1), 159-169.
- Suarez-Roca H., Quintero L., Arcaya J. L., Maixner W., Rao S. G. (2006a) Stress-induced muscle and cutaneous hyperalgesia: differential effect of milnacipran. *Physiol Behav*, 88 (1-2), 82-87.
- Suarez-Roca H., Silva J. A., Arcaya J. L., Quintero L., Maixner W., Pinerua-Shuhaibar L. (2006b) Role of mu-opioid and NMDA receptors in the development and maintenance of repeated swim stress-induced thermal hyperalgesia. *Behav Brain Res*, 167 (2), 205-211.
- Sutherland J. E., Burian L. C., Covault J., Conti L. H. (2010) The effect of restraint stress on prepulse inhibition and on corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF receptor gene expression in Wistar-Kyoto and Brown Norway rats. *Pharmacol Biochem Behav*, 97 (2), 227-238.
- Suzuki R., Morcuende S., Webber M., Hunt S. P., Dickenson A. H. (2002) Superficial NK1-expressing neurons control spinal excitability through activation of descending pathways. *Nat Neurosci*, 5 (12), 1319-1326.
- Tai T. C., Claycomb R., Her S., Bloom A. K., Wong D. L. (2002) Glucocorticoid responsiveness of the rat phenylethanolamine N-methyltransferase gene. *Mol Pharmacol*, 61 (6), 1385-1392.
- Taiwo Y. O.,Coderre T. J., Levine J. D. (1989) The contribution of training to sensitivity in the nociceptive paw-withdrawal test. *Brain Res*, 487 (1), 148-151.
- Tak L. M., Rosmalen J. G. (2010) Dysfunction of stress responsive systems as a risk factor for functional somatic syndromes. *J Psychosom Res*, 68 (5), 461-468.

- Takasaki I., Kurihara T., Saegusa H., Zong S., Tanabe T. (2005) Effects of glucocorticoid receptor antagonists on allodynia and hyperalgesia in mouse model of neuropathic pain. *Eur J Pharmacol*, 524, 80-83.
- Tanriverdi F., Karaca Z., Unluhizarci K., Kelestimur F. (2007) The hypothalamo-pituitary-adrenal axis in chronic fatigue syndrome and fibromyalgia syndrome. *Stress*, 10 (1), 13-25.
- Tasker J. G., Di S., Malcher-Lopes R. (2006) Minireview: rapid glucocorticoid signaling via membrane-associated receptors. *Endocrinology*, 147 (12), 5549-5556.
- Tata D. A., Anderson B. J. (2010) The effects of chronic glucocorticoid exposure on dendritic length, synapse numbers and glial volume in animal models: implications for hippocampal volume reductions in depression. *Physiol Behav*, 99 (2), 186-193.
- Terman G. W., Shavit Y., Lewis J. W., Cannon J. T., Liebeskind J. C. (1984) Intrinsic mechanisms of pain inhibition: activation by stress. *Science*, 226 (4680), 1270-1277.
- Torres I. L., Gamaro G. D., Silveira-Cucco S. N., Michalowski M. B., Corrêa J. B., Perry M. L., Dalmaz C. (2004) Effect of acute and repeated restraint stress on glucose oxidation to CO<sub>2</sub> in hippocampal and cerebral cortex slices. *Braz J Med Biol Res*, 34 (1), 111-116.
- Tsuda M., Inoue K., Salter M. W. (2005) Neuropathic pain and spinal microglia: a big problem from molecules in "small" glia. *Trends Neurosci*, 28 (2), 101-107.
- Uçeyler N., Valenza R., Stock M., Schedel R., Sprötte G., Sommer C. (2006) Reduced levels of antiinflammatory cytokines in patients with chronic widespread pain. *Arthritis Rheum*, 54 (8), 2656-2664.
- Ulrich-Lai Y. M., Figueiredo H. F., Ostrander M. M., Choi D. C., Engeland W. C., Herman J. P. (2006) Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 291 (5) 965-973.
- Ulrich-Lai Y. M., Herman J. P. (2009) Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci*, 10 (6), 397-409.
- Urca G., Segev S., Sarne Y. (1985) Stress induced analgesia: its opioid nature depends on the strain of rat but not on the mode of induction. *Brain Res*, 343 (2), 216-222.
- Vale W., Spiess J., Rivier C., Rivier J. (1981) Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science*, 213 (4514), 1394-1397.
- Van Houdenhove B., Egle U. T. (2004) Fibromyalgia: a stress disorder? Piecing the biopsychosocial puzzle together. *Psychother Psychosom*, 73 (5), 267-275.
- van Raalte D. H., Ouwens D. M., Diamant M. (2009) Novel insights into glucocorticoid-mediated diabetogenic effects: towards expansion of therapeutic options? *Eur J Clin Invest*, 39 (2), 81-93.
- Vegiopoulos A., Herzig S. (2007) Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Mol Cell Endocrinol*, 275 (1-2), 43-61.
- Vendruscolo L. F., Pamplona F. A., Takahashi R. N. (2004) Strain and sex differences in the expression of nociceptive behavior and stress-induced analgesia in rats. *Brain Res*, 1030 (2), 277-283.
- Vidal C., Jacob J. (1986) Hyperalgesia induced by emotional stress in the rat: an experimental animal model of human anxiogenic hyperalgesia. *Ann N Y Acad Sci*, 467, 73-81.

- Vierck C. J. Jr. (2006) Mechanisms underlying development of spatially distributed chronic pain (fibromyalgia). *Pain*, 124 (3), 242-263.
- Vierck C. J., Green M., Yezierski R. P. (2009) Pain as a stressor: effects of prior nociceptive stimulation on escape responding of rats to thermal stimulation. *Eur J Pain*, 14 (1), 11-16.
- Villanueva L., Le Bars D. (1995) The activation of bulbo-spinal controls by peripheral nociceptive inputs: diffuse noxious inhibitory controls. *Biol Res*, 28 (1), 113-125.
- Voutsas I. F., Gritzapis A. D., Alexis M. N., Katsanou E. S., Perez S., Baxevanis C. N., Papamichail M. (2007) A novel quantitative flow cytometric method for measuring glucocorticoid receptor (GR) in cell lines: correlation with the biochemical determination of GR. *J Immunol Methods*, 324, 110-119.
- Vyas A., Mitra R., Shankaranarayana Rao B. S., Chattarji S. (2002) Chronic stress induces contrasting patterns of dendritic remodeling in hippocampal and amygdaloid neurons. *J Neurosci*, 22 (15), 6810-6818.
- Walker J. J., Terry J. R., Tsaneva-Atanasova K., Armstrong S. P., McArdle C. A., Lightman S. L. (2010) Encoding and decoding mechanisms of pulsatile hormone secretion. *J Neuroendocrinol*, 22 (12), 1226-1238.
- Wang J., Charboneau R., Barke R. A., Loh H. H., Roy S. (2002a) Mu-opioid receptor mediates chronic restraint stress-induced lymphocyte apoptosis. *J Immunol*, 169 (7), 3630-3636.
- Wang S., Lim G., Zeng Q., Sung B., Ai Y., Guo G., Yang L., Mao J. (2004) Expression of central glucocorticoid receptors after peripheral nerve injury contributes to neuropathic pain behaviors in rats. *J Neurosci*, 24, 8595-8605.
- Wang X., Pongrac J. L., DeFranco D. B. (2002b) Glucocorticoid receptors in hippocampal neurons that do not engage proteasomes escape from hormone-dependent down-regulation but maintain transactivation activity. *Mol Endocrinol*, 16 (9), 1987-1998.
- Warne J. P., Akana S. F., Ginsberg A. B., Horneman H. F., Pecoraro N. C., Dallman M. F. (2009) Disengaging insulin from corticosterone: roles of each on energy intake and disposition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 296 (5), 1366-1375.
- Weissbecker I., Floyd A., Dedert E., Salmon P., Sephton S. (2006) Childhood trauma and diurnal cortisol disruption in fibromyalgia syndrome. *Psychoneuroendocrinology*, 31 (3), 312-324.
- Wellman C. L. (2001) Dendritic reorganization in pyramidal neurons in medial prefrontal cortex after chronic corticosterone administration. *J Neurobiol*, 49 (3), 245-253.
- Wessely O., Deiner E. M., Beug H., von Lindern M. (1997) The glucocorticoid receptor is a key regulator of the decision between self-renewal and differentiation in erythroid progenitors. *EMBO J*, 16 (2), 267-280.
- Wieggers G. J., Reul J. M., Holsboer F., de Kloet E. R. (1994) Enhancement of rat splenic lymphocyte mitogenesis after short term preexposure to corticosteroids in vitro. *Endocrinology*, 135 (6), 2351-2357.
- Willis W. D. (1985) Nociceptive pathways: anatomy and physiology of nociceptive ascending pathways. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 308 (1136), 253-270.
- Windle R. J., Wood S. A., Shanks N., Lightman S. L., Ingram C. D. (1998) Ultradian rhythm of basal corticosterone release in the female rat: dynamic interaction with the response to acute stress. *Endocrinology*, 139 (2), 443-450.

- Wingenfeld K., Heim C., Schmidt I., Wagner D., Meinschmidt G., Hellhammer D. H. (2008) HPA axis reactivity and lymphocyte glucocorticoid sensitivity in fibromyalgia syndrome and chronic pelvic pain. *Psychosom Med*, 70 (1), 65-72.
- Wolfe F., Clauw D. J., Fitzcharles M. A., Goldenberg D. L., Katz R. S., Mease P., Russell A. S., Russell I. J., Winfield J. B., Yunus M. B. (2010) The American College of Rheumatology preliminary diagnostic criteria for fibromyalgia and measurement of symptom severity. *Arthritis Care Res*, 62 (5), 600-610.
- Woodcock J. (2009) A difficult balance-pain management, drug safety and the FDA. *N Engl J Med*, 361 (22), 2105-2107.
- Woodward C. J., Hervey G. R., Oakey R. E., Whitaker E. M. (1991) The effects of fasting on plasma corticosterone kinetics in rats. *Br J Nutr*, 66 (1), 117-127.
- Wolf C. J., Ma Q. (2007) Nociceptors-noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55 (3), 353-364.
- Yarushkina N. I. (2008) The role of hypothalamo-hypophyseal-adrenocortical system hormones in controlling pain sensitivity. *Neurosci Behav Physiol*, 38 (8), 759-766.
- Yarushkina N. I., Bagaeva T. R., Filaretova L. P. (2011) Central corticotropin-releasing factor (CRF) may attenuate somatic pain sensitivity through involvement of glucocorticoids. *J Physiol Pharmacol*, 62 (5), 541-548.
- Yehuda R., Boisoneau D., Lowy M. T., Giller E. L. Jr. (1995) Dose-response changes in plasma cortisol and lymphocyte glucocorticoid receptors following dexamethasone administration in combat veterans with and without posttraumatic stress disorder. *Arch Gen Psychiatry*, 52 (7), 583-593.
- Yokoro C. M., Tatsuo M. A., Pereira L. S., Alves D. L., Francischi J. N. (2003) Role of endogenous glucocorticoids in hyperalgesia and edema in old arthritic rats. *Braz J Med Biol Res*, 36 (1), 77-83.
- Yokota K., Shibata H., Kobayashi S., Suda N., Murai A., Kurihara I., Saito I., Saruta T. (2004) Proteasome-mediated mineralocorticoid receptor degradation attenuates transcriptional response to aldosterone. *Endocr Res*, 30 (4), 611-616.
- Yoon J. C., Puigserver P., Chen G., Donovan J., Wu Z., Rhee J., Adelmant G., Stafford J., Kahn C. R., Granner D. K., Newgard C. B., Spiegelman B. M. (2001) Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature*, 413 (6852), 131-138.
- Young E. A., Vazquez D. (1996) Hypercortisolemia, hippocampal glucocorticoid receptors and fast feedback. *Mol Psychiatry*, 1 (2), 149-159.
- Yunus M. B. (2008) Central sensitivity syndromes: a new paradigm and group nosology for fibromyalgia and overlapping conditions, and the related issue of disease versus illness. *Semin Arthritis Rheum*, 37 (6), 339-352.
- Zeilhofer H. U., Zeilhofer U. B. (2008) Spinal dis-inhibition in inflammatory pain. *Neurosci Lett*, 437 (3), 170-174.
- Zhang R. X., Lao L., Qiao J. T., Malsnee K., Ruda M. A. (2004) Endogenous and exogenous glucocorticoid suppresses up-regulation of preprodynorphin mRNA and hyperalgesia in rats with peripheral inflammation. *Neurosci Lett*, 359, 85-88.

## 8. Anhang

### 8.1. Verwendete Lösungen

#### Lysepuffer

150 mM Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)  
50 mM Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, Merck, Darmstadt)  
1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
ad 100 ml mit Reinstwasser; pH 8.0  
vor Lysierung der Zellen 1463 µl Lysepuffer mit 38 µl Proteaseinhibitor (Proteaseinhibitor-Cocktail P8340, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) gemischt (auf Eis)

#### Ladepuffer

##### 2x Ladepuffer (Laemmli 2x buffer)

1 ml Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, Merck, Darmstadt) 0,5M, pH 6,8  
1 ml Glycerol (Glycerol 87 %, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)  
80 mg DDT (DL-Dithiothreitol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
1 g SDS (Lauryl Sulfate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
10 mg Bromphenolblau (Bromphenolblau-Na-salz, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
ad 10 ml mit Reinstwasser

##### 4x Ladepuffer (Laemmli 4x buffer)

2 ml Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, Merck, Darmstadt) 0,5M, pH 6,8  
2 ml Glycerol (Glycerol 87 %, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)  
160 mg DDT (DL-Dithiothreitol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
2 g SDS (Lauryl Sulfate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
20 mg Bromphenolblau (Bromphenolblau-Na-salz, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
ad 10 ml mit Reinstwasser

##### 6x Ladepuffer (Laemmli 6x buffer)

3 ml Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, Merck, Darmstadt) 0,5M, pH 6,8  
3 ml Glycerol (Glycerol 87 %, Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)  
240 mg DDT (DL-Dithiothreitol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
3 g SDS (Lauryl Sulfate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
30 mg Bromphenolblau (Bromphenolblau-Na-salz, SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg)  
ad 10 ml mit Reinstwasser

### Laufpuffer

125 mM Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, Merck, Darmstadt)  
960 mM Glycin (Glycin pro analysi, Merck, Darmstadt)  
0,5 % SDS (Sodium dodecyl sulfat, for molecular biology, approx. 99 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
ad 1000 ml mit Reinstwasser (5-fach); pH 8.3  
mit Reinstwasser 1:5 verdünnt

### Blotpuffer

25 mM Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, Merck, Darmstadt)  
192 mM Glycin (Glycin pro analysi, Merck, Darmstadt)  
200 ml/l Ethanol (Ethanol 99,8 % absolut, VWR International GmbH, Darmstadt)  
ad 1 l mit Reinstwasser

### Waschpuffer

200 mM Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, Merck, Darmstadt)  
1,37 M Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)  
ad 1000 ml mit Reinstwasser (10-fach); pH 7,6  
mit Reinstwasser 1:10 verdünnt  
0,01 % Tween 20

### Blockpuffer

200 mM Tris (Tris (hydroxymethyl)-aminomethane, Merck, Darmstadt)  
1,37 M Natriumchlorid (Merck, Darmstadt)  
ad 1000 ml mit Reinstwasser (10-fach); pH 7,6  
mit Reinstwasser 1:10 verdünnt  
0,01 % Tween 20 (Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
5 % Magermilchpulver (Blotting Grade Blocker: Non-Fat Dry Milk, Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

### FACS-Puffer

1000 ml PBS (Phosphate buffered saline, pH 7,4, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)  
2 % FBS-CSS (Fetal bovine serum – charcoal stripped sterile filtered, Equitech-Bio Inc., Kerrville, USA)  
0,4 % Natriumazid (Sodium azide 99,5 %, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)

## 8.2. Vorveröffentlichungen

Schramm E. (2010) Entwicklung eines Tiermodells für hyperalgetische Somatisierungsstörungen und dessen pharmakologische Beeinflussung. (Vortrag). 5. Doktorandensymposium am Fachbereich Veterinärmedizin/DRS Präsentationsseminar. Berlin, 02.07.2010. Programm und Abstracts, Mensch und Buch Verlag Berlin, 2010.

Schramm E., Koch E. (2011) Corticosterone-induced hyperalgesia (CiH): A new animal model for chronic pain syndromes – Possible mechanisms and pharmacological interventions. (Poster). 77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e. V.. Frankfurt, 30.03. - 01.04.2011. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 383, (Suppl. 1), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011, 22.

Schramm E., Koch E. (2012) A new animal model for chronic pain syndromes – Possible mechanisms and pharmacological interventions. (Vortrag). 3. Young Researcher Meeting: Phytotherapeutika in der aktuellen Forschung: Phytochemie, Pharmakologie und klinische Anwendungen. Münster, 02./03.03.2012. Vortragskurzfassungen, 2012, 6.

Schramm E., Koch E. (2012) Stress-induced hyperalgesia is mimicked by oral administration of corticosterone. (Poster). 78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e. V.. Dresden, 19. - 22.03.2012. Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 385, (Suppl. 1), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2012, 375.

### 8.3. Danksagung

Nach Fertigstellung der vorliegenden Arbeit möchte ich allen danken, die durch ihr Mitwirken zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt hierfür an erster Stelle Herrn Dr. Egon Koch und Herrn Prof. Dr. Michael Habs für die Überlassung des Themas.

Dabei möchte ich ganz besonders Herrn Dr. Koch für seine fachliche und vor allem konstruktive Betreuung danken. Ferner haben seine kritischen Durchsichten und seine Beharrlichkeit zur Verbesserung des Manuskriptes beigetragen.

Frau Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink danke ich ebenso ganz besonders für die Übernahme der Arbeit als Erstgutachterin sowie Herrn Prof. Michael Habs als Zweitgutachter und Frau Frau PD Dr. Kerstin Müller als Drittgutachterin.

Mein Dank gilt auch Frau Beatrix König und Frau Silvia Sprissler, die mich im Verlauf meiner Arbeit bei der Gewinnung der Blut- und Organproben unterstützt haben. Dabei sei im besonderen Maße Frau König gedankt, die mich weiterhin nach meinem Unfall bei der Durchführung des Immobilisationsstresses unterstützt hat. Schließlich möchte ich mich auch bei ihr für das Einlernen in das histologische Arbeiten sowie die Mitwirkung beim Anfertigen der Schnitte bedanken.

Ebenso möchte ich Frau Carola Wohn für das Einlernen in die Durchflusszytometrie sowie für die Mithilfe bei der Isolierung der Lymphozyten danken. Weiterhin gebührt auch Frau Christa Weibezahn mein herzlicher Dank für das Einarbeiten in das Western-Blotting.

Herr Dr. Michael Nöldner hat mich sehr freundschaftlich mit Tipps und Ratschlägen unterstützt und mich nie den roten Faden verlieren lassen, so dass ich mich auch bei ihm recht herzlich bedanken möchte.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei Frau Karin Benz für das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken.

Ebenso bedanke ich mich herzlich bei allen Mitarbeitern der Präklinischen Forschung der Dr. Willmar Schwabe GmbH und Co. KG für die sehr angenehme und sehr produktive Arbeitsatmosphäre.

Abschließend sei vor allem auch meinen Eltern und meiner lieben Katharina, aber auch meiner Familie und meinen Freunden für ihre ständige Geduld und ihren Zuspruch im besonderen Maße gedankt.

## **8.4. Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die Untersuchungen, auf denen die vorliegende Dissertation beruht, eigenständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter durchgeführt und ausgewertet habe. Das Manuskript wurde von mir selbständig verfasst. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet. Die aus fremden Quellen wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit ist in dieser oder anderer Form zuvor nicht als Prüfungsarbeit zur Begutachtung vorgelegt worden.

Karlsruhe, den 14.03.2013

Enrico Schramm