

Aus der Klinik für Neonatologie-CVK  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Schmerzreize als Auslöser von Neurodegeneration im sich  
entwickelnden Gehirn der Ratte

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)  
vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lasse Dührsen

aus Hamburg

Gutachter:     1. Prof. Dr. med U. Felderhoff-Müser  
                  2. Prof. Dr. med. H. D. Stober  
                  3. Priv.-Doz. Dr. med. P. Bittigau

Datum der Promotion: 19.11.2010

## **Danksagung**

Für die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit danke ich herzlich meiner Doktormutter, Frau Professor Dr. U. Felderhoff-Müser.

Herrn Dr. Sinno Simons, Herrn Dr. Marco Sifringer, Frau Rodica Altmann, Herrn Dr. Vinzenz Boos und Frau Rebekka Löber danke ich für ihre Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie und meiner Freundin Lena.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1 Die Entwicklung des nozizeptiellen Systems</b> .....	<b>8</b>
<b>1.2 Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns</b> .....	<b>9</b>
<b>1.3 Effekte des neonatalen Schmerzerlebnisses auf das unreife Gehirn</b> .....	<b>10</b>
<b>1.4 Doublecortin ist wichtig für die normale Neuronendifferenzierung</b> .....	<b>11</b>
<b>1.5 Protein Kinase C spielt eine Rolle bei der Schmerzverarbeitung</b> .....	<b>12</b>
<b>1.6 Wirkungen von Morphin</b> .....	<b>13</b>
<b>1.7 Zentrale Fragestellung</b> .....	<b>14</b>
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>15</b>
<b>2.1 Methoden</b> .....	<b>15</b>
2.1.1 Histologie .....	15
2.1.1.1 Versuchstiere .....	15
2.1.1.2 Tierversuche .....	15
2.1.1.3 Aufarbeitung des Gewebes .....	16
2.1.1.4 De Olmos-Silberfärbung .....	17
2.1.1.5 TUNEL-Färbung.....	17
2.1.1.6 Auswertung der histologischen Schnitte.....	18
2.1.2 Proteinbiochemie .....	19
2.1.2.1 Tierversuche .....	19
2.1.2.2 Aufarbeitung des Gewebes .....	19
2.1.2.3 Proteinextraktion aus Gewebe .....	19
2.1.2.4 Proteinbestimmung .....	20
2.1.2.5 Western-Blot.....	20
2.1.2.5.1 Elektrophorese .....	21
2.1.2.5.2 Blotting .....	22
2.1.2.5.3 Chemilumineszenzreaktion .....	23
2.1.2.5.4 Entfernung gebundener Antikörper von Nitrocellulosemembranen.....	24
<b>2.2 Untersuchungsmaterial</b> .....	<b>24</b>
2.2.1 Geräte und Material .....	24
2.2.1.1 Histologie.....	24
2.2.1.2 Molekularbiologie.....	25
2.2.2 Pharmaka und Chemikalien .....	25
2.2.2.1 Pharmaka .....	25
2.2.2.2 Chemikalien.....	26

2.2.2.2.1 Histologie .....	26
2.2.2.2.2 Lösungen für DeOlmos-Kupfersilberfärbung .....	26
2.2.2.2.3 TUNEL-Färbung .....	27
2.2.2.2.4 Molekularbiologie .....	27
2.2.2.3 Antikörper .....	28
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Physiologische Parameter der Versuchstiere .....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Histologische Effekte von Schmerz auf das unreife Gehirn.....</b>	<b>29</b>
3.2.1 Schmerzmodell I.....	29
3.2.2 Schmerzmodell II .....	30
3.2.3 Schmerzmodell III .....	31
3.2.4 TUNEL - Färbung .....	33
3.2.5 Morphinmodell I.....	34
3.2.6 Morphinmodell II .....	35
<b>3.3 Veränderung der Proteinexpression von PKC-<math>\epsilon</math> und <math>\gamma</math> sowie von DCX im unreifen Gehirn durch Schmerzreize .....</b>	<b>37</b>
3.3.1 Protein Kinase C- $\epsilon$ .....	37
3.3.2 Protein KinaseC- $\gamma$ .....	38
3.3.3 Doublecortin-.....	40
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Schmerzen als Auslöser von Zelltod.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Morphin verhindert schmerzinduzierten Neuronenuntergang im unreifen Gehirn der Ratte .....</b>	<b>45</b>
<b>4.3 Beeinflussung der zerebralen PKCs durch Schmerzreize, Kochsalz und Morphin .....</b>	<b>47</b>
<b>4.4 Schmerz erhöht die Expression von Doublecortin im Thalamus .....</b>	<b>48</b>
<b>4.5 Bedeutung der Ergebnisse.....</b>	<b>49</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>51</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>53</b>
<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>56</b>
<b>Erklärung.....</b>	<b>66</b>
<b>Curriculum Vitae.....</b>	<b>67</b>
<b>Publikationsliste .....</b>	<b>68</b>



## **1. EINLEITUNG**

Die perinatale Versorgung hat sich in den letzten 20 Jahren in den Industrienationen deutlich verbessert. Im Zusammenhang damit ist einerseits die Neugeborenensterblichkeit zurückgegangen, andererseits hat die Anzahl Frühgeborener graduell zugenommen. Damit stellen sich der Neonatologie neue Probleme, denn auf Grund ihrer Unreife unterliegen Frühgeborene erheblichen Risiken, die auch ihre spätere Entwicklung betreffen.

Ein erhebliches Risiko ist dadurch gegeben, dass bei sehr unreifen Frühgeborenen die Entwicklung des Gehirns noch nicht komplett abgeschlossen ist. Dank der besseren neonatologischen Versorgung ist die Überlebensrate auch dieser Kinder gestiegen. Langzeitstudien haben ergeben, dass diese Kinder eine erhöhte Prävalenz für schwere, lebenslange neurologische Entwicklungsdefizite haben (Wood 2000; Marlow 2005). Von einigen Autoren werden die Auswirkungen unbehandelter Schmerzen auf das noch unreife Gehirn als Ursachen für diese Langzeiteffekte diskutiert (Anand 2000 b). Seitdem die medizinische Fachwelt ein Bewusstsein dafür entwickelt hat, dass Schmerzen schon in dieser frühen Lebensphase eine Bedeutung haben, ist der Schmerz bei Frühgeborenen und seine Behandlung zu einem Thema geworden, dass von wissenschaftlicher Seite Beachtung findet. Es gibt bereits umfangreiche Forschung über Schmerzverarbeitung und Schmerztherapie bei Neugeborenen, ohne dass diese schon routinemäßigen Einfluss auf die medizinische Praxis haben. Tatsächlich wird die Schmerztherapie bei Neugeborenen noch immer unzureichend gehandhabt (Carbajal 2005).

Frühgeborene sind durch die notwendigen medizinischen Maßnahmen zum Teil erheblichen Schmerzreizen ausgesetzt. Es ist davon auszugehen, dass ein großer Teil dieser Kinder diese Schmerzen ohne ausreichende Schmerzmedikation erleidet. Tierexperimente haben bereits gezeigt, dass sowohl positive als auch negative Erlebnisse in der Neonatalzeit Struktur und Funktion des sich entwickelnden Nervensystems beeinflussen.

## 1.1 Die Entwicklung des nozizeptiellen Systems

Die funktionellen Signalwege der Schmerzverarbeitung des Neugeborenen unterscheiden sich von denen Erwachsener. Das unreife Nervensystem beginnt mit der Entwicklung in den ersten Gestationswochen und verändert sich auch noch weiter nach der Geburt (Anand 1987). Nozizeption ist die im Nervensystem durch einen schädlichen Stimulus hervorgerufene Aktivität. Nozizeption beinhaltet periphere, sensorische Rezeptoren – Nozizeptoren – dessen afferente Fasern über dorsale Hinterstrangganglien mit dem ZNS verbunden sind. Während der Entwicklung sind langsam leitende C-Fasern, nach propriozeptiven Fasern und niedrigschwelligen A-Fasern, die letzten Afferenzen, welche die graue Substanz der Hinterstrangganglien erreichen (Jackman 2000). Um die dreißigste Woche werden die Nervenstränge, u.a. auch die Schmerzleitenden, bis zum Thalamus myelinisiert. Afferente Neurone aus dem Thalamus projizieren in den Neokortex und es entstehen erste Synapsenverbindungen zwischen der 23. und der 30. Gestationswoche (Lee 2005). Im Gegensatz zu direkten thalamokortikalen Verbindungen, welche erst im letzten Trimenon sichtbar werden, wird die somatosensorische Subplate um die 20. Woche (Kostovic 1990) und die visuelle Subplate zwischen der 20. und 22. Gestationswoche von thalamischen Afferenzen erreicht (Hevner 2000). Diese scheinen reif genug zu sein, um mit den Neuronen der Subplate Synapsen zu bilden (Kostovic 1995). Der fetale Neokortex erreicht seine endgültige Zahl von  $10^9$  Neuronen um die 20. Gestationswoche (Wolf 1999). Allerdings gibt es bisher keine Studien die sich mit der Entwicklung thalamokortikaler Verbindungen zur Schmerzwahrnehmung befassen, sodass man sich bis jetzt auf Studien der Entwicklung anderer thalamokortikaler Regelkreise beziehen muss. Bei Neugeborenen unter 32 Wochen finden die meisten Schmerzreaktionen vor allem subkortikal statt (Fitzgerald 2005) und äußern sich in Reflexen ohne Beteiligung der Hirnrinde (Oberlander 2002). Allerdings sollte man unterscheiden zwischen Schmerzreaktion und Schmerzwahrnehmung. Auch wenn die direkte Antwort auf ein Schmerzereignis auf spinaler Ebene und im Hirnstamm ablaufen, bedeutet das nicht, dass es keine kortikale Verarbeitung des Schmerzes gibt. EEG-Untersuchungen zeigten keine kortikale Antwort (Oberlander 2002), obwohl das nicht heißen muss, dass der Kortex nicht auf den Schmerz reagiert, da EEG-Aktivität allein kein Beweis dafür ist (Schenk 1968). Andere Studien hingegen konnten einen erhöhten kortikalen Blutfluss bzw. Sauerstoffverbrauch durch Schmerzreize zeigen (Bartocci 2006; Slater 2006). Abschließend lässt sich die Beteiligung des Kortex bei Frühgeborenen nicht vollständig klären. Zur Vollständigkeit halber sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass es auch beim Erwachsenen kein eindeutiges Schmerzzentrum gibt, sondern



dass der Schmerz in verschiedenen Arealen verarbeitet wird. Hierzu gehören vorderes Cingulum, Thalamus, Nucleus lentiformis, der Inselbereich, der präfrontale Kortex und die primären und sekundären somatosensorischen Kortices (Chen 2001). Siehe auch Tabelle 1.1.

<b>Anatomische/funktionelle Charakteristiken</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Gestationsalter (Wochen)</b>
<b>Periphere sensorische Rezeptoren</b>	Perioral	7,5
	Palmar	10-10,5
	Abdominal	15
<b>Rückenmark</b>	Spinaler Reflexbogen als Antwort auf nicht-noxische Reize	8
	Neurone zur Nozizeption im Hinterstrangganglion	19
<b>Thalamische Afferenzen</b>	Erreichen der Subplatezone	20-22
	Erreichen der kortikalen Platte	23-24
<b>Kortikale Funktionen</b>	Somatosensorisch evozierte Potentiale	29
	Erste EEG-Muster zu erkennen	30

**Tabelle 1.1:** Anatomische und funktionelle Entwicklung des Schmerzsystems (nach Lee et al., 2005)

## **1.2 Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns**

Das Gehirn eines Säugetieres durchläuft in seiner Entwicklung eine Phase schnellen Wachstums, die auch als *brain growth spurt* bezeichnet wird. Die relative Endgröße bezogen auf das Gesamtgewicht und auch der Zeitpunkt der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit ist von Spezies zu Spezies unterschiedlich. So kann der maximale Wachstumsschub bereits pränatal, wie beim Affen, oder auch *post partum* stattfinden, z.B. bei der Ratte. Beim Menschen beginnt dieser Wachstumsspur im 6. Schwangerschaftsmonat, hat eine maximale Geschwindigkeit zum Geburtstermin und endet zu Beginn des dritten Lebensjahres. Bei der Ratte liegt die Phase der maximalen Geschwindigkeit zwischen dem 6. und 10. Lebenstag und endet nach der dritten Lebenswoche, kommt somit der Entwicklung des menschlichen Gehirns sehr nahe (Dobbing 1974). In dieser Phase der Hirnentwicklung vermehrt sich die Hirnmasse nicht nur durch Zellteilung von Neuroblasten, sondern es finden gleichzeitig verschiedene Vorgänge statt, wie die Migration der späteren Nervenzellen an ihren Bestimmungsort, Differenzierung dieser Zellen und die Synaptogenese. Das macht diese Phase zu einer besonders vulnerablen Zeit gegenüber

äußeren Einflüssen. Das Gehirn produziert in dieser Zeit einen „Überschuss“ an Neuronen, dem durch einen geregelten Zelluntergang bestimmter Neuronen entgegengewirkt wird. So kommt physiologischer (programmierter) Zelltod natürlicherweise im sich entwickelnden Gehirn vor, wodurch ca. 50% der ursprünglich produzierten Neuronen beseitigt werden (Wyllie 1980; Ishimaru 1999). Letztendlich bietet sich dadurch die Möglichkeit, an sich noch in der Entwicklung befindlichen Gehirnen zu forschen.

Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass das Gehirn vor allem in der frühen Lebensphase extrem vulnerabel gegenüber äußeren Einflüssen ist. Es konnte gezeigt werden, dass eine kurzzeitige Exposition mit erhöhten, nichtphysiologischen Sauerstoffkonzentrationen zu einem Neuronenuntergang führt (Felderhoff-Mueser 2004; Gerstner 2006). Auch die Exposition gegenüber NMDA-Rezeptor-Antagonisten und GABA-A-Agonisten führt im unreifen Gehirn zu Neurodegeneration (Bittigau 2002).

### **1.3 Effekte des neonatalen Schmerzerlebnisses auf das unreife Gehirn**

Tierstudien haben gezeigt, dass sowohl positive wie auch negative Erlebnisse während der Neonatalperiode, die Struktur und die Funktion des sich entwickelnden Gehirns beeinflussen. Hierzu gehören eine veränderte Anzahl oder Muster von Synapsenverbindungen oder die Kapillarversorgung (Anand 2000 a; Anand 2000 b) was wiederum zu Veränderungen der Somatosensorik und des Verhaltens führen kann (Ruda 2000). Epidemiologische Studien konnten zeigen, dass peri- und neonatale Komplikationen im Zusammenhang stehen mit Verhaltensstörungen in der Kindheit (Botting 1997), veränderter Schmerzreaktion (Whitfield 2000; Peters 2005), Angst und Depression (Botting 1997) oder erhöhter Tendenz zum Selbstmord (Salk 1985). Frühgeborene müssen sich während einer Zeit der kritischen Hirnentwicklung vermehrt schmerzhaften Prozeduren unterziehen lassen (Simons 2003) und wiederholter Schmerz führt zu veränderter Schmerzverarbeitung bei Ratten (Anand 1999) und Menschen (Peters 2005). Auf der anderen Seite wurde beschrieben, dass die kontinuierliche Gabe von Analgetika und Sedativa in diesem Alter auch zu einer vermehrten Neurodegeneration in den unreifen Gehirnen führt.

Schmerzreize führen zu immunohistologisch sichtbaren Veränderungen innerhalb des Gehirns. Das immediate-early-gene c-fos zum Beispiel, wird bei Schmerzreizen neuronal in der Medulla, dem Hypothalamus und dem Thalamus vermehrt exprimiert und kann mittels Immunohistochemie dargestellt werden (Bullit 1990). C-fos ist maßgeblich an Prozessen der neuronalen Erregbarkeit und dem Schutz vor exitotoxischen Effekten beteiligt (Zhang J 2002). Auch ein apoptotischer Effekt auf Neurone kann durch Schmerzreize ausgelöst und histologisch mittels Fluoro-Jade B Färbung sichtbar gemacht werden (Anand 2007). Ein positiver Effekt zur Verhinderung der durch Schmerzen ausgelösten Effekte konnte bis jetzt nur für Ketamin bestätigt werden (Anand 2007). Welchen Effekt Morphin hat, ist leider nicht untersucht worden.

Die oben genannten Veränderungen treten vor allem bei Ereignissen während des *brain growth spurt*, des explosiven Wachstums des Gehirns, auf. Diese Phase tritt bei Ratten postnatal, pränatal in Termingeborenen sowie perinatal in Frühgeborenen auf (Morgane 2002). Daher scheint die neuronale Aktivität für das Überleben des Neurons notwendig zu sein und Faktoren, die die neuronale Aktivität oder deren Zelltod regulieren wichtig für die Entwicklung des Gehirns. Welches genau diese Faktoren sind und ob diese durch Schmerzreize beeinflusst werden, ist bis jetzt nicht vollständig geklärt.

#### **1.4 Doublecortin ist wichtig für die normale Neuronendifferenzierung**

Doublecortin ist notwendig für die normale Migration und Differenzierung von Neuronen im zerebralen Kortex. Doublecortin (DCX) ist ein mikrotubuli-assoziiertes Protein welches fast ausschließlich in unreifen Neuronen vorkommt. Es eignet sich daher als Markerprotein für die Neurogenese. Während der Bildung des menschlichen Kortex ist DCX verantwortlich für die komplikationslose Migration der neuronalen Vorläuferzellen (Francis 1999; Gleeson 1999). Die Funktion wird durch posttranslationelle Modifikationen wie z.B. Cdk5-abhängige Phosphorylierung reguliert (Tanaka 2004). Während der Entwicklung wird DCX spezifisch und reichlich in den neuronalen Vorläuferzellen exprimiert (Gleeson 1998; Francis 1999), während es im adulten Gehirn ausschließlich in Arealen der kontinuierlichen Neurogenese, wie z.B. Hippocampus oder Bulbus Olfactorius, gefunden wird (Brown 2003). Immunhistologische Untersuchungen zeigten, dass DCX exprimierende Zellen kein Nestin oder GFAP exprimieren, was ein Anzeichen dafür sein könnte, dass DCX nicht in pluripotenten neuronalen Stammzellen exprimiert wird. Die Expression von DCX wird durch die Erzeugung von Neuroblasten induziert

und es kommt in der zweiten Wochen nach „Zellgeburt“ zu einem Maximum, welches zeitgleich mit dem Auftreten von Markerproteinen, welche mit reifen Neuronen assoziiert werden, wie z.B. NeuN, wieder herunter reguliert wird (Cooper-Kuhn 2002; Brown 2003).

Bei neuronaler Regeneration oder der Gliogenese wird kein DCX exprimiert (Couillard-Despres 2005). Allerdings konnte Magavi zeigen, dass durch die Induktion von kortikaler Neurogenese durch toxische Läsionen, DCX-positive neuronale Zellen in diesem Areal vorkamen (Magavi 2000). Auch Schmerzreize haben eine Auswirkung auf die Expression von DCX. So konnte die Arbeitsgruppe um Terada zeigen, dass es durch chronische Schmerzen zu einer verminderten Expression von DCX im Hippocampus kommt (Terada 2008).

### **1.5 Protein Kinase C spielt eine Rolle bei der Schmerzverarbeitung**

Die Protein Kinase C gehört zur Familie der Serin/Threonin Kinasen welche in drei Gruppen eingeteilt werden. Die  $\alpha$ ,  $\beta$ -I,  $\beta$ -II und  $\gamma$ -Isoenzyme sind calcium- und diacylglycerolabhängig. Die  $\delta$ -,  $\epsilon$ -,  $\eta$ - und  $\theta$ - Isoenzyme sind calciumunabhängig-diacylglycerolabhängig. Die Isoenzyme  $\xi$  und  $\lambda$ <sub>1</sub> sind sowohl calcium- als auch diacylglycerolunabhängig (Way 2000).

Protein Kinase C (PKC) spielt eine der Hauptrollen bei Regulation und Signalübertragung der Zelle (Mestek 1995; McNulty 2001) und thalamokortikaler Signaltransmission (Mochly-Rosen 1987). Einige Autoren konnten zeigen, dass auch die Analgesie (Sweitzer 2004; Bie 2005) und die Schmerzverarbeitung (Coderre 1992) innerhalb des zentralen Nervensystems mit der Aktivität der PKCs in Verbindung stehen. Darüber hinaus werden die PKCs mit der Toleranzentwicklung bei zum Beispiel morphininduzierter Hypothermie in Verbindung gebracht (Javed 2004).

Das Isoenzym PKC- $\gamma$  ist wichtig für die opioid-induzierte Antinozizeption und Toleranzentwicklung im ZNS auf spinaler Ebene (Narita 2001a; Narita 2001b). Die PKC- $\epsilon$  spielt eine Rolle bei formalininduziertem Schmerz (Sweitzer 2004). Zusätzlich wird beiden Isoenzymen eine funktionelle Rolle in der Schmerzverarbeitung zugeschrieben, was mit Hilfe von Knockout-Tieren gezeigt werden konnte (Malmberg 1997; Khasar 1999). Durch ihre

konkreten Rollen im nozizeptiellen System, Stellen die PKC- $\epsilon$  und - $\gamma$  interessante Angriffspunkte für die Entwicklung von Schmerzmedikamenten dar.

Aber auch schon während der zerebralen Entwicklung scheint die PKC von Bedeutung zu sein. So konnte gezeigt werden, dass die PKC- $\epsilon$  eine aktivitätsabhängige Rolle bei der Bildung synaptischer Verbindungen spielt und für den Neuritenauswuchs im sich entwickelnden Gehirn von Bedeutung ist (Ling 2004; Scott 2007). Die PKC- $\gamma$  spielt zusätzlich eine Rolle bei der für die zerebrale Strukturierung und längerfristige Synapsenverbindungen wichtige „long-term potentiation“ (Saito 2002).

## **1.6 Wirkungen von Morphin**

Opioide, wie zum Beispiel Morphin, sind die am weitesten verbreiteten Analgetika zur Verhinderung moderater und starker Schmerzen und kommen auch bei Neu- und Frühgeborenen zum Einsatz. Systemisch verabreichtes Morphin entfaltet seine Wirkung sowohl spinal als auch supraspinal (Barton 1980). Morphin aktiviert absteigende Bahnen innerhalb des Hirnstamms, welche die nozizeptiven Neurone der Hinterhörner inhibieren (Basbaum 1984), sowie die direkte Hemmung spinaler Neurone um die Weiterleitung in supraspinale Zentren zu verhindern (Yaksh 1985). Dieser analgetische Effekt wird über  $\mu$ -,  $\kappa$ -, und  $\delta$ -Rezeptoren vermittelt, welche sich präsynaptisch befinden (Inturrisi 2002). Die Dichte bzw. Verteilung dieser Rezeptoren scheint sich gerade in den ersten Lebenstagen zu verändern. So konnte gezeigt werden, dass sich die Dichte von  $\mu$ -Opioid-Rezeptoren in den Hinterhörnern bis zum siebten Lebensstag erhöht und dann allmählich abfällt (Rahman 1998). Hier scheint unter anderem eine genetische Komponente eine Rolle zu spielen (Uhl 1999). Das könnte erklären, warum das Alter die größte Rolle bei der Behandlung Neugeborener mit Morphin spielt (Bouwmeester 2003a). Einige Autoren schreiben Morphin zusätzlich einen neuroprotektiven Effekt zu (Kim M.S. 2001; Angeles 2005) wohingegen von anderen postuliert wird, dass es sich negativ auswirken kann, zum Beispiel in Form von erhöhtem Auftreten von intraventrikulären Hämorrhagien (Anand 2004) oder Neuronenapoptose (Hu 2002). Was unbestritten ist, ist die Entzugssymptomatik die nach absetzen einer Morphintherapie auftreten kann, sowie die Atemdepression, weshalb es gerade bei Frühgeborenen eher restriktiv eingesetzt wird. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass frühe chronische Morphinexposition zu einer sich in späteren Jahren manifestierenden

Hypalgesie und verminderter analgetischer Wirkung von Morphin führen kann (Zhang G.H. 2007).

Im klinischen Alltag auf den neonatologischen Intensivstationen wird Morphin nicht routinemäßig eingesetzt, da ihm bis jetzt kein positiv analgetischer Effekt bei den Frühgeborenen nachgewiesen werden konnte (Simons 2003).

### **1.7 Zentrale Fragestellung**

Es wurde bereits viel über die Folgen von Schmerzreizen auf spinaler Ebene und Langzeitfolgen in der Entwicklung geforscht. Die direkten Auswirkungen von repetitiven Schmerzen auf das sich entwickelnde Gehirn sind dahingegen noch weitgehend unbeleuchtet geblieben.

Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, ob Schmerzen histomorphologische Veränderungen im unreifen Gehirn hervorrufen und falls ja, ob dieser Effekt altersabhängig ist. Dafür werden verschiedene histologische Aufarbeitungsmethoden verwendet.

Zusätzlich wird auf molekularer Ebene untersucht, ob die Expressionsmuster von bestimmten Proteinen durch Schmerzreize in Kortex und Thalamus beeinflusst werden. Hier sind vor allem die PKC- $\epsilon$  und die PKC- $\gamma$  von Interesse, da diese beiden Kinasen eine wichtige Rolle in der Schmerzverarbeitung und zerebraler Strukturierungsprozesse spielen. Außerdem wird das Verhalten des Proteins Doublecortin, welches unter anderem für die normale Ausbildung neuronaler Verknüpfungen im Gehirn verantwortlich ist, auf Schmerzreize untersucht.

Abschließend soll geprüft werden, ob Morphin als Analgetikum einen günstigen Effekt auf eventuell durch Schmerzen verursachte negative Veränderungen hat, oder ob es selbst schädlich wirkt.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Methoden**

#### **2.1.1 Histologie**

##### *2.1.1.1 Versuchstiere*

Als Versuchstiere wurden Wistar-Ratten im Alter von 1–12 Tagen verwendet. Der Tag der Geburt wurde als P0 definiert. Die Tiere kamen aus der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin, Campus Benjamin Franklin. Die Tiere eines Wurfes (n=3–16) wurden randomisiert. Die Haltung und Pflege der Tiere wurde von qualifiziertem Personal und unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten (§ 8b Absatz 3 TierSchG) am Standort Virchow übernommen (§ 9 TierSchG, Aktenzeichen 0144 / 04).

Die Tierhaltung erfolgte in der Tierhaltung des Forschungshauses der Charité am Campus Virchow Klinikum. Alle Tiere wurden in vollklimatisierten Tierställen bei einer Temperatur von 20 °C ( $\pm 2$  °C) und einer Luftfeuchtigkeit von 50 % ( $\pm 10$  %) gehalten und erlebten den normalen Tag-Nacht-Rhythmus. Sie lebten in Makrolen-Käfigen mit Weichholzfaser als Einstreu. Zur Ernährung stand den Tieren handelsübliches Alleinfutter zur Haltung von Ratten und Mäusen und Wasser ad libitum zur Verfügung. Um einer Hypothermie bei den Jungtieren vorzubeugen, wurden diese während des gesamten Versuchs nicht von ihren Müttern getrennt.

##### *2.1.1.2 Tierversuche*

Die Tiere wurden zufällig einem der fünf Modelle zugeteilt, nummeriert und gewogen. Im Schmerzmodell I wurden die Tiere wiederum in drei Gruppen eingeteilt: Formalin-Gruppe, NaCl-Gruppe und Kontroll-Gruppe. An den postnatalen Tagen 1 (P1) bis 3 (P3) wurde ihnen dann jeweils im Abstand von 24 Stunden 5  $\mu$ l Formalin 3,7%ig oder 5  $\mu$ l NaCl 0,9%ig subkutan in alle vier Pfoten injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt keine Behandlung. Die Tiere wurden an P4 perfundiert.

Die Tiere im Schmerzmodell II wurden der gleichen Behandlung an den Tagen P1 bis P5 unterzogen und an P6 getötet.

Im Schmerzmodell III wurde die Behandlung an den Tagen P10, P11 und P12 durchgeführt, bevor die Tiere an P13, mittels Perfusion, getötet wurden.

<b>Modell</b>	<b>Gruppen</b>	<b>Behandlungsperiode</b>	<b>Perfusion</b>
<b>Schmerzmodell I</b>	Formalin, NaCl, Kontrollen	P1 bis P3	P4
<b>Schmerzmodell II</b>	Formalin, NaCl, Kontrollen	P1 bis P5	P6
<b>Schmerzmodell III</b>	Formalin, NaCl, Kontrollen	P10 bis P12	P13

**Tabelle 2.1:** Schmerzmodelle

Außerdem wurden zwei Morphinmodelle entwickelt. Es wurden hierzu Schmerzmodell I und II angewandt. Den Tieren wurde zusätzlich 20 Minuten vor der eigentlichen Behandlung 500 µg Morphin/kg Körpergewicht subkutan in die Rückenpartie gespritzt.

<b>Morphinmodell I</b>	Schmerzmodell I + 500 µg Morphin/kg KG subkutan 20 min prior
<b>Morphinmodell II</b>	Schmerzmodell II + 500 µg Morphin/kg KG subkutan 20 min prior

**Tabelle 2.2:** Morphinmodelle

### *2.1.1.3 Aufarbeitung des Gewebes*

Für die histologische Aufarbeitung wurden die Tiere 24 Stunden nach der letzten Behandlung mit einer Überdosis Chloralhydrat intraperitoneal betäubt. Nach der Eröffnung des Thorax wurde der Blutkreislauf über die Eröffnung des rechten Vorhofs und einer transkardial gelegten Kanüle unterbrochen. Die Tiere wurden mittels 20 ml heparinisierendem Phosphatpuffer-Bolus perfundiert. Danach für weitere 10 Minuten mit kalter 4%iger Paraformaldehydlösung durchspült. Mit einer Schere wurde die Kalotte entlang der Sagittalnaht eröffnet und das Gehirn entnommen, gewogen und für mindestens einen Tag bei 4 °C zur Fixierung in Paraformaldehyd-Cacodylat 4%ig eingelegt.

Danach erfolgte der Grobschnitt, wobei das Riechhirn und das Kleinhirn abgetrennt und gesondert gelagert wurden. Das Großhirn wurde wiederum für mindestens 4 Tage in Paraformaldehyd bei 4 °C fixiert und anschließend für 2 Tage in PBS-Azid gelagert. Darauf folgte die Einbettung der Großhirne in 4%igem Agar. In Blöcke geschnitten wurden diese auf der Schneideplatte des Vibratoms festgeklebt und 70 µm dünne Schnitte angefertigt. Jeder sechste Schnitt wurde zur weiteren Verarbeitung für mindestens drei weitere Tage in



Paraformaldehyd-Cacodylat 4%ig gelagert. Die restlichen Schnitte wurden in PBS-Azid bei 4 °C gelagert. Von jedem Tier wurden 10 bis 16 Schnitte angefärbt.

#### *2.1.1.4 De Olmos-Silberfärbung*

Diese Färbung dient der Anfärbung von zu Grunde gegangenen Neuronen. Sie stellen sich schwarz auf goldenem Hintergrund dar (De Olmos 1971).

Bei der Silberfärbung wurden die ausgewählten Schnitte für 60 Minuten in einer Silberlösung bei 40 °C inkubiert und danach für weitere 3 Tage bei Raumtemperatur in einer Kupfer-Silberlösung inkubiert. Die Schnitte wurden mit Aceton gewaschen und für 30 Minuten in Silber-Diamin-Lösung eingelegt, um danach für genau eine Minute in ethanolischer Formaldehyd-Citrat-Lösung geschwenkt zu werden. Daraufhin folgte die Bleichung der jeweils einzelnen Schnitte in 0,3%iger Kaliumferrizyanidlösung. Nach zweimaligem Waschen mit Aqua bidest wurde die Färbung der Schnitte in 0,1%iger Natriumthiosulfatlösung stabilisiert. Nach einem letzten Waschgang wurden die Hirnschnitte mittels eines Gelatinemediums auf Objektträger aufgebracht und in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Die Präparate wurden mit Hilfe von Permount Mounting Medium gedeckelt.

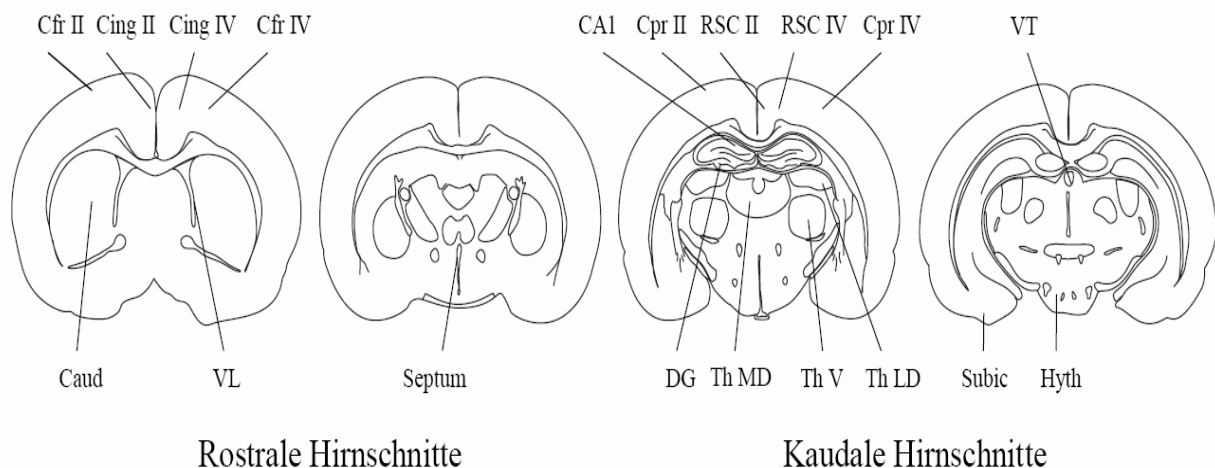
#### *2.1.1.5 TUNEL-Färbung*

Die TUNEL-Färbung dient der Anfärbung apoptotischer Zellen. Hierbei werden, für die Apoptose charakteristische DNS-Fragmente, angefärbt. Die terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (tDT) verbindet die 3'OH-Enden der DNS-Fragmente mit biotinylierten Polydesoxyuridylnukleotiden. Diese vermittelt über eine avidingekoppelte Peroxidase die Farbreaktion. Vorbereitend mussten die Hirne ebenfalls in einen rostralen und einen kaudalen Anteil geteilt und nachfolgend in einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert werden. Hiernach erfolgte das Imprägnieren in reinem, flüssigem Paraffin für eine Stunde bei 60 °C und ein zweites Mal bei gleicher Temperatur für ca. 12 Stunden. Anschließend konnte das Gewebe in kleine Paraffinblöcke eingebettet, und mit Hilfe eines Mikrotoms in 10 µm starke koronare Präparate geschnitten werden. Die entparaffinisierten Schnitte wurden mit 0,002%iger Proteinase K-Lösung 15 min lang inkubiert und nach einigen Spülungen mit Aqua bidest, 3%igem Methanol, PBS und Ausgleichspuffer für 1 Stunde bei 37 °C mit terminaler Deoxynucleotidyl-Transferase inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion mit dem Stop/Wash-Puffer und wiederholtem

Spülen (PBS) wurden die Präparate für 30 min in Anti-Dioxigenin-Peroxidase inkubiert. Nach erneutem Spülen wurde noch zweimal für 15 min mit 0,05%iger Diaminobenzidin-(DAB) Lösung gefärbt und mit Methylgrün 10% für 2-5 min gegengefärbt. Das Resultat waren dunkelbraune Kerne von allen Zellen, die DNS-Fragmentierung zeigten. Das Zytoplasma intakter Zellen wurde mit Methylgrün angefärbt (Gavrieli 1992).

#### 2.1.1.6 Auswertung der histologischen Schnitte

Für die Auswertung der Präparate wurde die stereologische Dissektionsmethode benutzt (Cruz-Orive 1990). Folgende Hirnregionen wurden untersucht: Kortex frontalis und parietalis (jeweils Lamina II und IV), Gyrus cinguli (II, IV), retrospinaler Kortex (II, IV), Septumregion, Nucleus Caudatus, ventraler, mediodorsaler und laterodorsaler Thalamuskern, Subiculum, Hypothalamus und die Regionen CA 1 und Gyrus Dentatus des Hippocampus. Mit Hilfe eines Zählrasters (10 x 10 Kästchen) im Okular wurden die degenerierten Zellen in vier zufälligen Abschnitten der jeweiligen Region ausgezählt. Dies wurde mit einem zweiten Schnitt des gleichen Tiers wiederholt, sodass man insgesamt acht Werte erhielt (Abbildung 2.1).



**Abbildung 2.1:** Regionen, die für die histologische Auswertung ausgezählt wurden (Aus der Dissertation von O. Polley, 2006).

Die Anzahl der Zellen im Raster, die Rastermaße (0,05 mm x 0,05 mm), die Dicke des Präparates (0,07 mm) und die Vergrößerung machten es möglich die Anzahl degenerierter Zellen pro Kubikmillimeter zu berechnen (numerische Dichte). Aus den acht Werten wurde ein Mittelwert gebildet. Die Mittelwerte aller Regionen wurden addiert und man erhielt einen

Summenscore der die Neuronendegeneration im Gehirn des Tieres widerspiegelte. Aus den Mittelwerten der einzelnen Tiere wurde ein Gesamtmittelwert aller Tiere einer Versuchsgruppe berechnet. Um die Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren zu berücksichtigen, wurden die Standardabweichung und der Standardfehler für jede Gruppe errechnet. Dann konnten die einzelnen Versuchsgruppen untereinander verglichen werden. Zur statistischen Auswertung wurde die Software GraphPad PRISM™ Version 4.0 verwendet. Zunächst wurde eine Varianzanalyse aller Gruppen-Scores gemacht und dann mit Hilfe des Newman-Keul-Tests die eventuelle Signifikanz zwischen den Mittelwerten der Gruppen ermittelt.

## **2.1.2 Proteinbiochemie**

### *2.1.2.1 Tierversuche*

Es wurden drei Tage alte Han-Wistar Ratten verwendet. Diese wurden in sechs Gruppen eingeteilt. Der ersten Gruppe wurde Formalin 3,7%ig subkutan in die Pfoten gespritzt, der zweiten Gruppe NaCl 0,9%ig und die dritte Gruppe diente als Kontroll-Gruppe und bekam keine Injektionen. Die Gruppen 4, 5 und 6 bekamen zusätzlich 20 Minuten vorher 500 µg Morphin/kg Körpergewicht subkutan injiziert bevor sie die gleiche Behandlung wie die Gruppen 1, 2 und 3 erhielten. Die Tiere wurden dann in den Zeitabständen 2, 6, 12 und 24 Stunden getötet.

### *2.1.2.2 Aufarbeitung des Gewebes*

Um die Gehirne für molekularbiologische Methoden zu nutzen, wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn genauso wie für die Histologie entnommen. Die Gehirne wurden dann schnellstmöglich mit Hilfe eines feinen Spatels und einer Rasierklinge, auf einer Glasplatte in Cortex parietalis und frontalis, Thalamus, Hypothalamus, Striatum und Cerebellum geteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren, bevor sie bei -80 °C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert wurden.

### *2.1.2.3 Proteinextraktion aus Gewebe*

Die tiefgefrorenen Gehirnareale wurden, nachdem sie mit 300 µl RIPA-Puffer versetzt wurden, mittels eines rotierenden Teflonstabes (Homogenisator Potter S, VWR Int.) homogenisiert und dann in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 3000 g für 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand beinhaltete die zytosolische sowie die mitochondriale Fraktion, das Sediment die

nukleäre Fraktion. Der Überstand wurde erneut bei 17000 g für 20 Minuten zentrifugiert um so die mitochondriale Fraktion im Sediment und die zytosolische im Überstand zu erhalten. Dieser wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß pipettiert und bis zur Proteinbestimmung bei -80 °C gelagert.

Mitochondriale und nukleäre Fraktionen wurden mit 200 µl RIPA-Puffer versetzt und dann bei -80 °C tiefgefroren.

#### *2.1.2.4 Proteinbestimmung*

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der BCA-Test von Pierce verwendet. In der so genannten Biuret-Reaktion bilden die Proteine im alkalischen Milieu mit Kupfer-II-Ionen einen Komplex. Die Kupferionen werden reduziert und es entsteht ein lila Chelatkomplex, dessen Absorption bei 562 nm gemessen werden kann und ein direktes Maß für die Proteinkonzentration darstellt.

Die Proben wurden langsam auf Eis aufgetaut. Aus jeder zu bestimmenden Probe wurde ein Teil entnommen und im Verhältnis 1:10 mit PBS-Puffer verdünnt. Die Verdünnung wurde auf dem Vortex durchmischt und dann dreifach auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte aufgetragen. Außerdem wurde noch eine BSA-Standardreihe mit den Konzentrationen 100, 200, 300, 400, 500 und 600 µg/ml Protein in die Platte pipettiert. 20 µl des BCA-Reagenz A wurden mit 400 µl des BCA-Reagenz B gemischt um dann jeweils 200 µl dieses Gemisches in jedes Loch der 96-Lochplatte zu pipettieren. Die Platte wurde verschlossen und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte, nach Abkühlung auf Raumtemperatur, in den Microplate-Reader gestellt und die Absorption bei 570 nm gemessen. Mit Hilfe des Microplate Manager 4.0© Programms und der BSA-Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen der Proben berechnet.

#### *2.1.2.5 Western-Blot*

Die Western-Blot Methode dient der quantitativen Bestimmung von Protein.

### 2.1.2.5.1 Elektrophorese

Die meisten Proteine binden das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) im Verhältnis 1:1,4, d.h. 1 g Protein bindet 1,4 g SDS. Dabei verhalten sich die resultierenden SDS-Proteinkomplexe wie stäbchenförmige Partikel, deren Länge sich proportional zum Molekulargewicht des Proteins ändert. Die durch SDS auf das Protein übertragene negative Ladung unterdrückt die proteineigene Ladung, sodass es möglich wird, Proteine aufgrund ihres Molekulargewichts im SDS-Gel aufzutrennen. Die Gelelektrophorese wird unter denaturierenden Bedingungen als diskontinuierliche Elektrophorese durchgeführt, wobei die Gele aus einem Trenngel und einem darüber gelagerten Sammelgel (ca. 1,5-3 cm) bestehen. Die spezielle Kombination von Elektrophoresepuffer (Tris/Glycin), pH-Diskontinuität (2 pH-Einheiten) und Acrylamidkonzentrationen des Sammel- und Trenngels bewirken eine Konzentrierung der Proteine im Sammelgel und die anschließende optimale Auftrennung in einzelne scharfe Proteinbanden im Trenngel.

Zur Herstellung der Polyacrylamidgele wurden zunächst zwei Glasplatten aufeinander gelegt und in die Gelgießapparatur eingespannt. Danach wurde das kurz zuvor angesetzte Trenngel bis 2,5 cm unterhalb der oberen Kante der Glasplatte gegossen, mit Isopropanol überschichtet und bei RT für 30 min auspolymerisiert. Nach Entfernung des Isopropanols und vorsichtiger Trocknung der Geloberfläche wurde das Trenngel mit dem kurz vorher präparierten Sammelgelansatz überschichtet, ein Probenkamm luftblasenfrei eingesetzt und ebenfalls für 30 min bei RT auspolymerisiert.

<b>Komponente</b>	<b>Trenngel 12,5%</b>	<b>Sammelgel 4,5%</b>
Rotiphorese Gel (37,5:1)	8,3 ml	2,2 ml
4 x Trenngelpuffer	5,0 ml	-
4 x Sammelgelpuffer	-	3,7 ml
10% SDS	0,2 ml	0,15 ml
ddH <sub>2</sub> O	6,4 ml	8,9 ml
TEMED	10 µl	30 µl
12,5% APS	80 µl	50 µl

**Tabelle 2.3:** Gelzusammensetzung für 4 Gele

Im Anschluss daran wurde das Gel, inklusive der Glasplatten, in die mit 1x Polyacrylamidgelelektrophorese-Puffer befüllte Elektrophoreseapparatur des Mini-Protean 3 Cell-Systems eingehangen und der Probenkamm entfernt. Nun wurden folgende Ansätze pipettiert und im Anschluss für 5 min bei 95 °C denaturiert:

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Endkonzentration</b>
Proteinlösung	X µl	25-50 µg
Laemmli-Puffer	18 µl	-
PCR-H <sub>2</sub> O	add 36,0 µl	-

**Tabelle 2.4:** Probenzusammensetzung

Nach der Denaturierung folgte eine 5 minütige Inkubation auf Eis und die Ansätze wurden auf das Gel aufgetragen. Um das Molekulargewicht der nachzuweisenden Proteine stets bestimmen zu können, wurde jeweils ein Molekulargewichtsmarker mit definierten Proteinbanden mitgeführt.

Die elektrophoretische Trennung der Proteine erfolgte zunächst für 30 min bei 100 V und nach dem Erreichen der Trenngelschicht für weitere 40-60 min bei 160 V und 0,05 A. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel von den beiden Glasplatten entfernt und die Sammelgelschicht entsorgt. Die Trenngelschicht wurde für die sich anschließende Immunoblotanalyse eingesetzt.

#### *2.1.2.5.2 Blotting*

Dieser Schritt dient dem Transfer der Proteine aus dem Gel auf eine Nitrocellulose-Membran. Dazu wurden die Gele zunächst für 20min im Transferpuffer unter gleichmäßigem Schütteln äquilibriert und die einzusetzenden Filterpapiere, sowie die Membranen mit Transferpuffer benetzt. Ein feuchtes Filterpapier wurde nun auf die Graphitplatte (Anode) des Trans-Blot-SD Systems gelegt und glatt gestrichen. Darauf wurde die Membran luftblasenfrei aufgelegt, das Gel übertragen und abschließend mit einem feuchten Filterpapier abgedeckt. Nach dem Auflegen einer weiteren Graphitplatte (Kathode) wurde der Transfer für 45 min bei 20 V und 0,16 A durchgeführt. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde die Membran zunächst 30 s mit Ponceau S angefärbt und nach dem Markieren der Proteinbanden des

Molekulargewichtsstandards mittels zweimaligen Waschens für 10 min bei RT in TBST wieder entfärbt.

Nach zweistündiger Inkubation der Membran in 5%iger Magermilchlösung, zur Reduzierung unspezifischer Bindungen im folgenden Inkubationsschritt mit primärem Antikörper, wurde die Membran noch viermal für je 10 min bei RT in TBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Immunodetektion der filtergebundenen Proteine.

#### *2.1.2.5.3 Chemilumineszenzreaktion*

Der gegen das nachzuweisende Protein gerichtete Antikörper (primärer Antikörper) wird durch einen zweiten Antikörper nachgewiesen, der gegen den ersten gerichtet und an welchem eine Peroxidase gekoppelt ist. In Gegenwart von  $H_2O_2$  oxidiert die Peroxidase ein zyklisches Diacylhydrazid (LumiGlo) zu einem instabilen, energiereichen Intermediat, das unter Lichtemission in den Grundzustand übergeht und durch die Exposition auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann.

Je nach zu detektierendem Protein wurde die Membran über Nacht in einer bestimmten Verdünnung des primären Antikörpers (in 1% BSA/TBST) bei 4 °C unter gleichmäßiger Agitation inkubiert. Danach wurde die Membran viermal für 10 min bei RT mit TBST gewaschen und folgend mit einer Verdünnung Peroxidase-konjugiertem sekundärem Antikörper (in 1% BSA/TBST) für 1 h bei RT, unter ständigem Schütteln, inkubiert. Dabei wurden Antikörper gegen Protein-Kinase-C  $\epsilon$  (Verdünnung 1:2000), Protein-Kinase-C  $\gamma$  (1:2000) und Doublecortin (1:2000) eingesetzt. Die Antikörper wurden in TBS-Tween-Puffer verdünnt.

Im Anschluss an die Inkubation mit sekundärem Antikörper wurde die Membran nochmals vierfach mit TBST für 10 min bei RT gewaschen, wonach die Substratinkubation erfolgte. Dazu wurden zunächst 3 ml ECL-Lösung II mit 1,8  $\mu$ l  $H_2O_2$  versetzt, kurz geschüttelt und mit 3 ml ECL-Lösung I vermischt. Nach starkem Schütteln wurde das gesamte Volumen gleichmäßig über die zuvor luftgetrocknete, in einer Plastikbox befindliche, Membran verteilt. Da die Reaktion relativ schnell verläuft und lichtempfindlich ist, muss zügig und im Dunkeln gearbeitet werden. Nach 1 minütiger Reaktionsdauer wurde die Substrat-Lösung entfernt und die abgetropfte Membran in Haushaltsfolie eingewickelt. Unter Rotlicht wurde diese dann in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm versehen. Die Expositionszeit variierte in

Abhängigkeit vom zu detektierenden Protein zwischen 30 s und 30 min. Die Entwicklung des Films fand anschließend in einer Filmentwicklungsmaschine statt und die erhaltenen Proteinbanden wurden mittels der densitometrischen TINA 2.09g Software erfasst und quantifiziert. Um die Membranen im Anschluss nochmals zu verwenden, damit diese mit einem, gegen ein internes Standardprotein ( $\beta$ -Aktin) gerichteten, primären Antikörper inkubiert werden konnte, wurde die Membran gereinigt („stripping“).

#### *2.1.2.5.4 Entfernung gebundener Antikörper von Nitrocellulosemembranen*

Zum Entfernen der gebundenen Antikörper wurde die Membran zweimal für 10 min bei RT in TBST gewaschen und anschließend 30 min bei RT in Stripping-Puffer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in TBST bei RT wurde die Membran erneut mit 5%iger Magermilchlösung blockiert, wiederum dreimal für 10 min bei RT in TBST gewaschen und es erfolgten die Inkubationen mit primärem und sekundärem Antikörper, sowie die jeweiligen Waschschrte und Durchführungen der Chemilumineszenzreaktion, wie oben beschrieben. Die erhaltenen Proteinbanden wurden ebenfalls ausgewertet und schließlich zur Normalisierung des jeweiligen Proteins herangezogen.

## **2.2 Untersuchungsmaterial**

### **2.2.1 Geräte und Material**

#### *2.2.1.1 Histologie*

Die Rattenhirne wurden mit einem Microtom (VT 1000 S, Leica, Nußloch) geschnitten. Die zu schneidenden Hirnhälften wurden nebeneinander auf eine Metallplatte geklebt, welche in einer mit Phosphatpufferlösung (PBS) gefüllten Kammer, fixiert wurde. Die Kammer bewegte sich mit kontinuierlicher Geschwindigkeit auf eine waagrecht oszillierende Rasierklinge, die um etwa 17 Grad gegen die Schnittfläche nach oben gerichtet war. Nach jedem Schnitt wurde die Kammer um 70  $\mu\text{m}$  angehoben.

Die Phosphatpufferlösung wurde durch ein Kühlaggregat während der ganzen Zeit auf 4 °C gekühlt.

Die histologischen Schnitte wurden unter einem Lichtmikroskop der Firma Leica ausgewertet.



### 2.2.1.2 Molekularbiologie

Extra-thick blotpaper	Biorad, München
Film X-omat LS 13x18cm	Kodak, Stuttgart
Hybond ECL 0.45µm (Blottingmembran)	Amersham Bioscience, Little Chalfont,UK
Hypercassette	Amersham Bioscience, Little Chalfont,UK
Loading Guide, 15-W	Biorad, München
Kimwipes (Präzisionstücher)	Kimberley-Clark, Mainz
Mikrowelle	Panasonic, Hamburg
Mini Protean 3 Cell	Biorad, München
Original Eppendorf Tips 1-20µl	Eppendorf, Hamburg
2-200µl	
50-1000µl	
Original Eppendorf Combitips plus 5ml	Eppendorf, Hamburg
Pipetten 10-1000µl	Gilson, Middleton, USA
Pipetten 5-25ml	Falcon, Franklin Lakes, USA
Power-Pac HC (250V, 3.0A, 300W)	Biorad, München
Reaktionsgefäße 1.5ml	Plastibrand, Wertheim
Schüttler: Unimax 10101	Heidolph, Kelheim
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Transblot, semidry transfer cell	Biorad, München

## 2.2.2 Pharmaka und Chemikalien

### 2.2.2.1 Pharmaka

- Zur Betäubung der Tiere, vor der transkardialen Perfusion, wurde 10%iges Chloralhydrat (150 mg/kg) verwendet.
- Morphin (500 µg/kg KG)

## 2.2.2.2 Chemikalien

### 2.2.2.2.1 Histologie

PBS Phosphatpuffer (10fach Konzentrat):

- 180 g NaCl
- 70 ml 1 M monobasisches Natriumphosphat
- 330 ml 1 M dibasisches Natriumphosphat
- ad 2 l Aqua bidest

PBS-Azid:

Die Phosphatpufferlösung PBS wurde mit 50 mg/100ml (0,05%) Natriumazid versetzt.

Paraformaldehyd 4%ig

- 2 Tabletten Natriumhydroxid
- 80 g Paraformaldehyd
- 38 ml 1 M monobasisches Natriumphosphat
- 162 ml 1 M dibasisches Natriumphosphat

werden in 1 l Aqua bidest (60 °C) vermischt. Nachdem die Lösung Raumtemperatur erreicht hat, wird diese mit 1 M NaOH oder 1 M HCl auf einen pH-Wert von 7,3-7,4 titriert und ad 2 l Aqua bidest aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei 4 °C.

### 2.2.2.2.2 Lösungen für DeOlmos-Kupfersilberfärbung

Kupfer-Silber-Lösung:

- 180 ml Aqua bidest, unter Rühren wurden hinzugefügt:
- 1,5 g AgNO<sub>3</sub> (Silbernitrat, C. Roth, Karlsruhe)
- 3 ml 0,5%ige Kupfer-II-Nitrat-Lösung
- 15 ml 0,1%iges Allantoin
- 9 ml Boratpuffer
- 17 ml Ethanol absolut
- 9 ml Pyridin

Die Lösung wurde auf 40 °C aufgewärmt und vor Licht geschützt.

#### Silber-Diamin-Lösung:

- 24 g AgNO<sub>3</sub> wurde in
- 120 ml Aqua bidest gelöst und mit
- 60 ml 0,4%iger NaOH (Braunfärbung) und
- 30 ml Ammoniumhydroxid versetzt (Lösung klarte auf).

#### Reduktionslösung:

- 135 ml Aqua bidest, unter Rühren wurden
- 15 ml Ethanol absolut,
- 180 µl 37%iges Formaldehyd und
- 10,5 mg Zitronensäure hinzugefügt.

#### Bleichlösung: 0,3%-iges Kaliumferrizyanid

- 0,45 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> wurde in
- 150 ml Aqua bidest gelöst

#### Stabilisierungslösung: 0,1%iges Natriumthiosulfat (*Sigma*)

- 0,2 g Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurden in
- 200 ml Aqua bidest gelöst.

#### 2.2.2.2.3 TUNEL-Färbung

- kommerzielles Kit: ApopTag®, Oncor Appligene, Heidelberg

#### 2.2.2.2.4 Molekularbiologie

Dc Protein Assay Reagent A	Biorad, München
Dc Protein Assay Reagent B	Biorad, München
Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
LumliGlo Reagent + Peroxide	Cell Signal, Frankfurt
β-Mercaptoethanol	Calbiochem, San Diego, USA

Methanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
PBS (10x)	Gibco, Paisley, UK
Ponceau S Solution 0.1%	Sigma, Deisenhofen
reines Wasser	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Tween 20	Sigma, Deisenhofen

### 2.2.2.3 Antikörper

Doublecortin sc-28939 r-IgG	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
HRP anti-r-IgG, HRP-linked AB	Cell Signaling, Frankfurt
Ladder + HRP	Cell Signaling, Frankfurt
PKC- $\epsilon$ sc-214 r-pAK	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
PKC- $\gamma$ sc-211 r-pAK	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Polyclonal Rabbit anti-mouse Ig/HRP	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Physiologische Parameter der Versuchstiere**

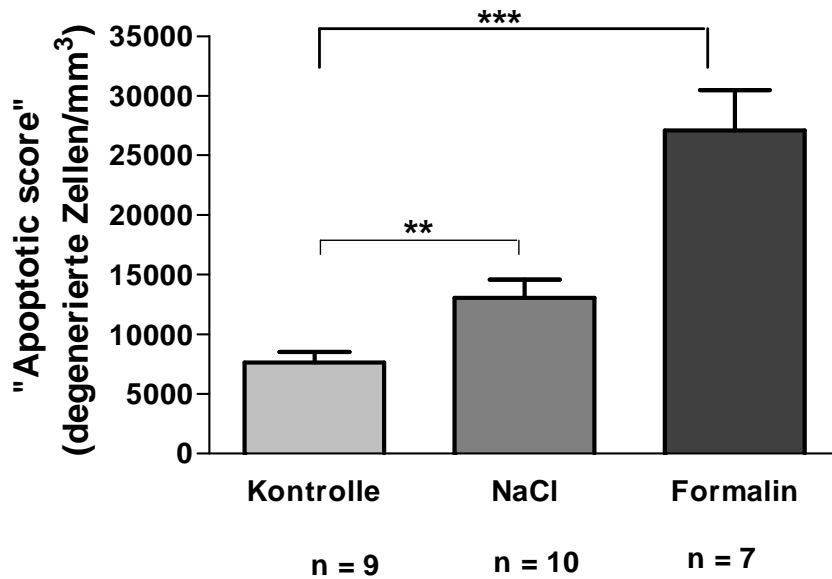
Zwischen Versuchs- und Kontrolltieren konnten keine phänotypischen Unterschiede festgestellt werden. Keine der Gruppen zeigte eine Beeinträchtigung oder Unterschiede in Körpergewicht oder Atemparametern. Die Tiere wurden täglich gewogen um eine progrediente Reifung festzustellen. Der Schmerzreiz hatte keine Auswirkung auf das Fressverhalten und Wachstum der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### **3.2 Histologische Effekte von Schmerz auf das unreife Gehirn**

##### **3.2.1 Schmerzmodell I**

Das Schmerzmodell I bestand aus drei Gruppen. Den Tieren wurde an den Tagen P1, P2 und P3 jeweils 5 µl 3,7%iges Formalin (n=7) beziehungsweise 0,9%iges NaCl (n=10) in alle vier Pfoten injiziert. Eine Kontrollgruppe erhielt keine Injektionen (n=9). 24 Stunden nach der letzten Injektion wurden alle Tiere wie oben beschrieben perfundiert und die Gehirne histologisch aufgearbeitet.

Die in DeOlmos-Silberfärbung gefärbten Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop ausgewertet und es wurde für jede der siebzehn untersuchten Hirnregionen ein Apoptoscore (degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup>) errechnet. Aus diesen wurde ein Mittelwert gebildet. Dabei ergaben sich folgende Werte: Kontrollgruppe: 7625 (entsprechend der physiologischen Apoptose), NaCl-Gruppe: 13044 und Formalin-Gruppe: 27092. Abbildung 3.1 zeigt die Auswertung der drei Gruppen. Es wurden signifikant mehr degenerierte Zellen in der Formalin-Gruppe gezählt als in der NaCl- und der Kontroll-Gruppe ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,0001$ ). Auch der Unterschied zwischen toten Zellen in der NaCl-Gruppe und der Kontroll-Gruppe ist signifikant ( $p < 0,01$ ). Die meisten degenerierten Zellen in der Formalin- und der NaCl-Gruppe wurden in der Lamina II des frontalen und des parietalen Kortex gezählt.

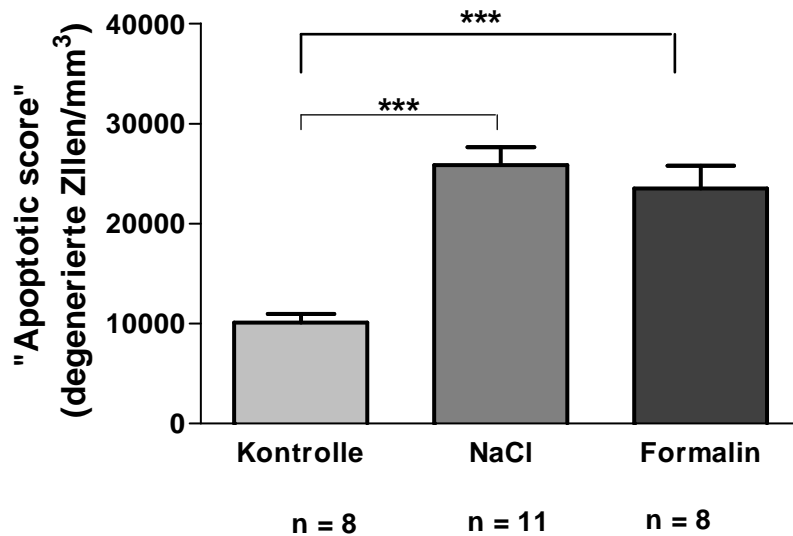


**Abbildung 3.1:** Schmerzreiz an P1 bis P3. Schmerzen lösen einen deutlichen Neuronenuntergang aus. Durch formalininduzierte Schmerzen (P1-P3) kommt es zu einem drastischen Zelluntergang im sich entwickelnden Gehirn junger Ratte. Auch die Injektion mit Kochsalzlösung führt zu einer Zellzerstörung (Formalin  $p < 0.001$ ; NaCl  $p < 0.01$ ).

### 3.2.2 Schmerzmodell II

Auch in dieser Versuchreihe wurden die Tiere in drei Gruppen eingeteilt in denen sie an den Tagen P1 bis P5 entweder 5  $\mu$ l 3,7%iges Formalin ( $n=8$ ) oder 5  $\mu$ l 0,9%iges NaCl ( $n=11$ ) in alle vier Pfoten gespritzt bekamen. Die Kontrollgruppe bekam keine Injektionen. An P6 wurden die Tiere getötet und die Gehirne konserviert. Abbildung 3.2 zeigt die Ergebnisse für die drei Gruppen.

Die Mittelwerte waren 23506, 25862 und 10092 degenerierte Zellen/ $\text{mm}^3$  für die Formalin-, die NaCl- und die Kontroll-Gruppe. Signifikant mehr Zellen degenerierten in der Formalin- und der NaCl-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Auch hier wurden siebzehn Hirnregionen ausgewertet, wobei die höchsten Degenerationsraten in Lamina II des frontalen und des parietalen Kortex, sowie in der Cingulum-Region gefunden wurden. Im Vergleich zum Schmerzmodell I ist vor allem der immense Anstieg an degenerierten Neuronen in der NaCl-Gruppe zu erwähnen.

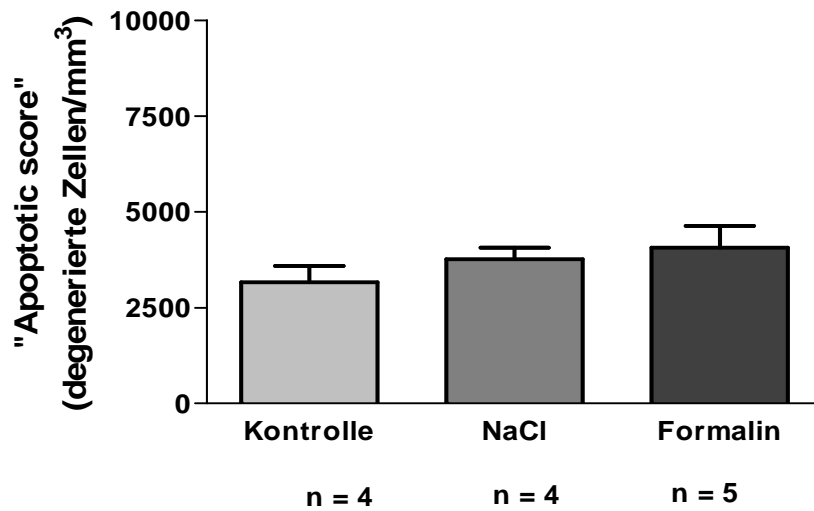


**Abbildung 3.2:** Zelluntergang nach fünf Tagen. NaCl verursacht einen gleichhohen Zelluntergang wie der Formalinschmerz ( $p < 0.001$ ).

### 3.2.3 Schmerzmodell III

Um die Altersabhängigkeit zu untersuchen, wurde gewartet bis die Tiere P10 erreicht hatten. Ihnen wurde dann wieder 3,7%iges Formalin ( $n=5$ ) oder 0,9%iges NaCl ( $n=4$ ) über drei Tage bis P12 subkutan in alle vier Pfoten gespritzt. Eine Kontroll-Gruppe ( $n=4$ ) erhielt keine Injektionen. An P13 wurden alle Tiere mittels Perfundierung getötet und die Gehirne histologisch aufgearbeitet. Abbildung 3.3 zeigt die Ergebnisse für das Schmerzmodell III.

Die Mittelwerte der errechneten apoptotischen Scores sind 4064 (Formalin), 3759 (NaCl) und 3162 (Kontrolle) degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup> und entsprechend der altersgemäßen physiologischen Apoptose. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.


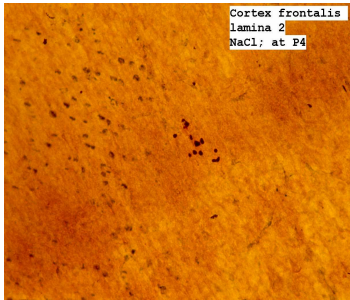
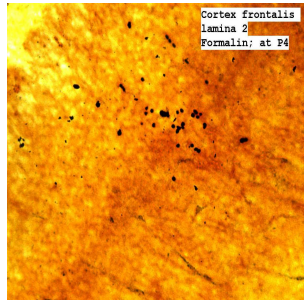

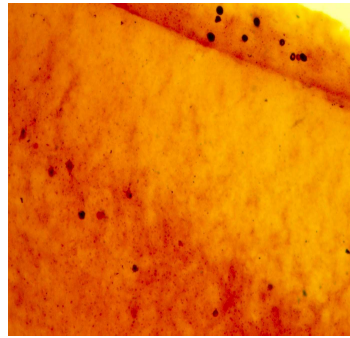
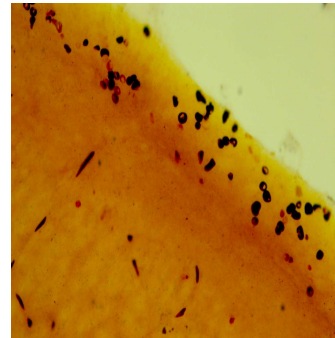
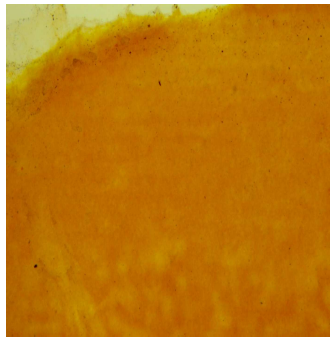
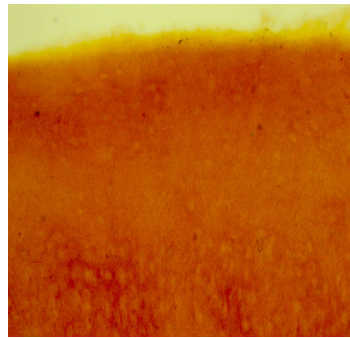
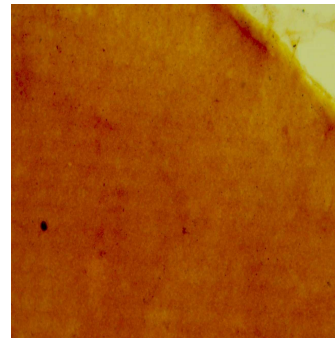


**Abbildung 3.3:** Bei älteren Tieren (P10-P12) kommt es zu keinem vermehrtem Zelltod durch Formalinschmerzen. Die Zelltodraten sind unbeeinflusst von Schmerzreizen in allen drei Gruppen.

Apoptosescor			
	Kontrollen	NaCl 0,9%	Formalin
Schmerzmodell I	7625	13044	27092
Schmerzmodell II	10092	25862	23506
Schmerzmodell III	3162	3759	4064

**Tabelle 3.1:** Apoptosescor (Anzahl degenerierte Zellen/mm³) für die Schmerzmodelle I bis III.

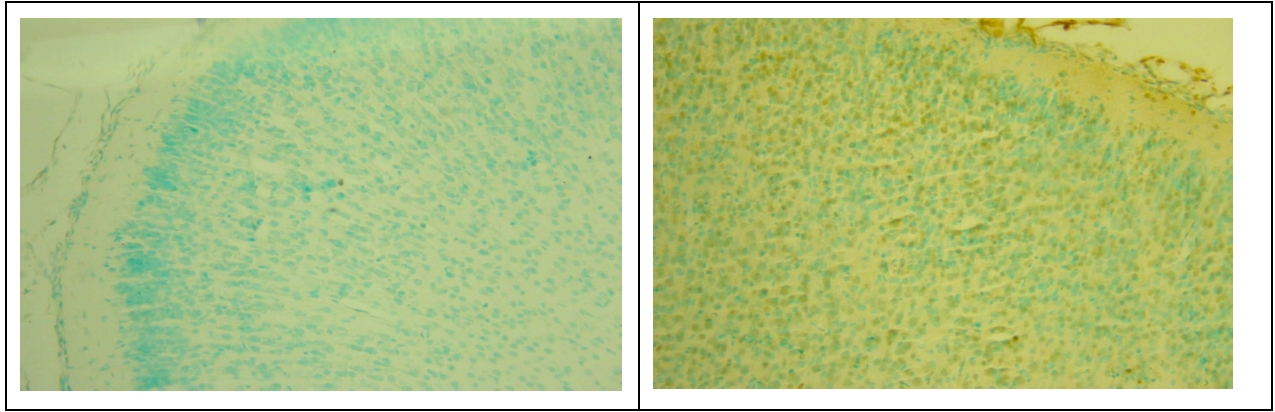


	<u>Kontrolle</u>	<u>NaCl</u>	<u>Formalin</u>
<b>P1- P3</b>	 <p>Cortex frontalis lamina 2 no treatment; at P4</p>	 <p>Cortex frontalis lamina 2 NaCl; at P4</p>	 <p>Cortex frontalis lamina 2 Formalin; at P4</p>
<b>P1- P5</b>			
<b>P10- P12</b>			

**Histologie 1:** Die Bilder zeigen die histologische Aufarbeitung in DeOlmos Silberfärbung der Schmerzmodelle I-III. Beispielhaft ist hier der frontale Cortex gezeigt. 40fache Vergrößerung.

### 3.2.4 TUNEL - Färbung

Für die Versuchsreihe Schmerzmodell I wurden zusätzlich TUNEL-Färbungen durchgeführt. Hierbei wird fraktionierte DNS angefärbt, welche bei Apoptose vorkommt. Die Zellkerne stellen sich bräunlich dar. Wie in den Bildern ersichtlich, kommt es bei Tieren die an P1-P3 mit Formalin behandelt wurden zu vermehrter Neuronenapoptose. Auch die mit Kochsalz behandelten Tiere weisen gegenüber der Kontrollgruppe mehr apoptotische Zellen auf (Histologie 2).



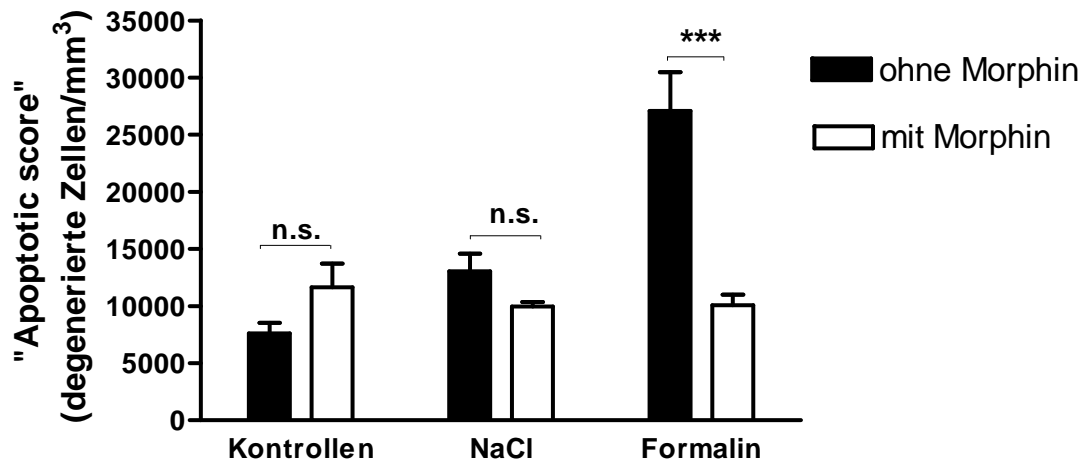
**Histologie 2:** TUNEL-Färbung des Kortex beim Kontrolltier und nach Formalininjektion. Die braunefärbten Zellen im rechten Bild markieren die apoptotischen Zellen. 20fache Vergrößerung.

### 3.2.5 Morphinmodell I

Das Morphinmodell I ähnelt im Versuchsaufbau dem Schmerzmodell I. Den Tieren wurde an P1-P3 jeweils Formalin 3,7%ig (n=5) oder NaCl 0,9%ig (n=4) in alle vier Pfoten gespritzt. Eine Kontroll-Gruppe (n=4) erhielt keine Pfoten-Injektionen. Zusätzlich wurde den Tieren an jedem Versuchtag, circa 20 Minuten vor den Injektionen, 500µg/kg Körpergewicht Morphin subkutan in die Rückenpartie gespritzt. Abbildung 3.4 bildet die Ergebnisse ab.

<b>Apoptosescore</b>			
	<b>Kontrollen</b>	<b>NaCl 0,9%</b>	<b>Formalin</b>
<b>Morphinmodell I</b>	11657	9971	10086
<b>Morphinmodell II</b>	11908	19942	17371

**Tabelle 3.2:** Apoptosescores (Anzahl degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup>) für die Morphinmodelle I und II.

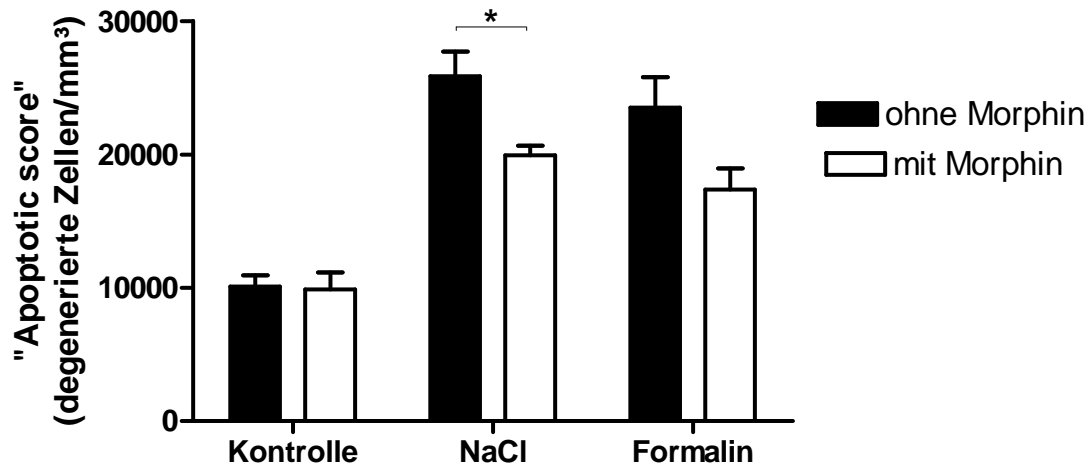


**Abbildung 3.4:** Morphin hat einen Effekt auf die Zelluntergangsrage durch Formalinschmerz. Die Graphik zeigt, dass durch die Gabe von Morphin vor dem Schmerzereignis die Dichte toter Zellen gesenkt werden kann.

Der Mittelwert des Apoptose-Scores lag bei der Formalin-Gruppe bei 10086 degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup> (27092 degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup> ohne Morphin), bei der NaCl-Gruppe bei 9971 degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup> (13044) und bei der Kontroll-Gruppe, welche ausschliesslich Morphin bekam, bei 11657 degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup> (7625). Der Unterschied zu den Versuchsgruppen des Schmerzmodells I ist besonders in den Formalin Gruppen deutlich und signifikant ( $p < 0.001$ ).

### 3.2.6 Morphinmodell II

Hier wurde den Tieren von P1 bis P5 Formalin (n=5), NaCl (n=3) oder nichts (n=5) in die Pfoten injiziert. An jedem Behandlungstag wurde allen Tieren 500µg Morphin/kg Körpergewicht subkutan gespritzt. Die Apoptose-Scores für die Formalin-Gruppe: 17371 degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup>; für die NaCl-Gruppe: 19942 degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup>; für die Kontroll-Gruppe: 11908 degenerierte Zellen/mm<sup>3</sup>. Wenn man diese Ergebnisse mit denen des Schmerzmodells II vergleicht, so ist zwar ein Unterschied zu Gunsten des Morphins zu sehen, dieser ist aber nur in der NaCl Gruppe signifikant ( $p < 0.05$ ).



---

**Abbildung 3.5:** Im Vergleich ist das Schmerzmodell II gegen das Morphinmodell II aufgetragen. In der NaCl-Gruppe führt die Morphingabe zu einer signifikanten ( $p < 0.05$ ) Reduzierung degenerierter Neurone.

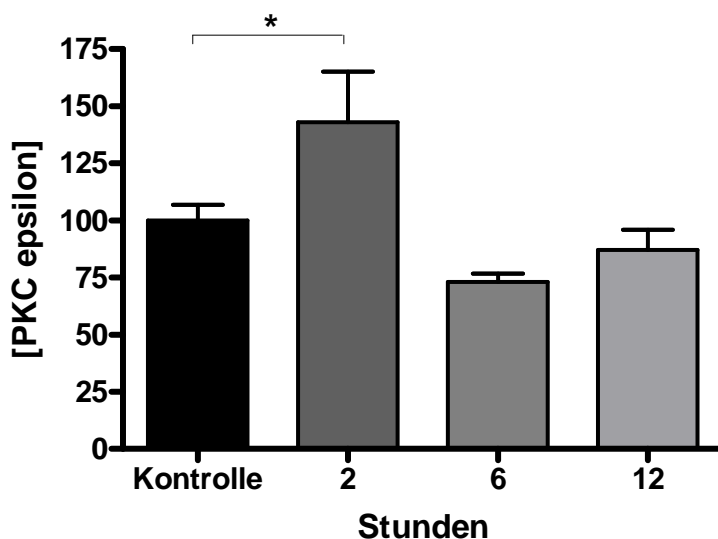
---

### 3.3 Veränderung der Proteinexpression von PKC- $\epsilon$ und $\gamma$ sowie von DCX im unreifen Gehirn durch Schmerzreize

#### 3.3.1 Protein Kinase C- $\epsilon$

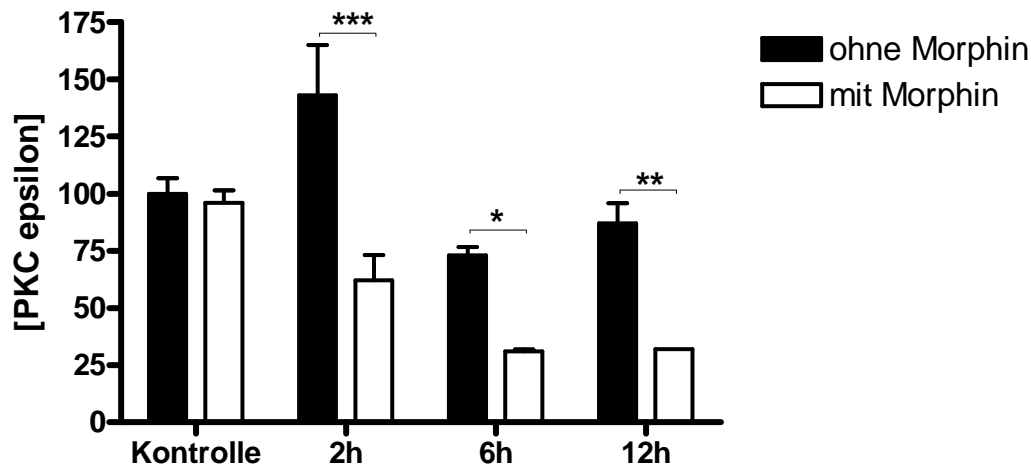
Der Einfluss von Schmerz auf die Expression von ProteinKinaseC- $\epsilon$  wurde auf Proteinebene untersucht. Die PKC- $\epsilon$  Proteinkonzentrationen wurden in Gewebe aus Cortex und Thalamus drei Tage alter Han Wistar Ratten bestimmt. Dies geschah bei Versuchstieren nach einer definierten Schmerzexposition, sowie bei Kontrolltieren die keinem Schmerzreiz ausgesetzt waren. In einer zweiten Versuchsreihe wurde den Tieren 20 Minuten vor dem Schmerzereignis Morphin s.c. gespritzt.

Nach setzen des Schmerreizes wurde ein Anstieg der PKC- $\epsilon$  im Cortex bereits nach zwei Stunden festgestellt der nach sechs Stunden wieder abfiel (Abbildung 3.7). Bei diesen Versuchen diente  $\beta$ -Aktin als interner Standard. Signifikante Unterschiede für  $\beta$ -Aktin wurden hierbei nicht nachgewiesen. Die Gabe von 500  $\mu$ g Morphin/kg Körpergewicht verursachte einen Rückgang der PKC- $\epsilon$  Konzentration im Cortex (Abbildung 3.8).

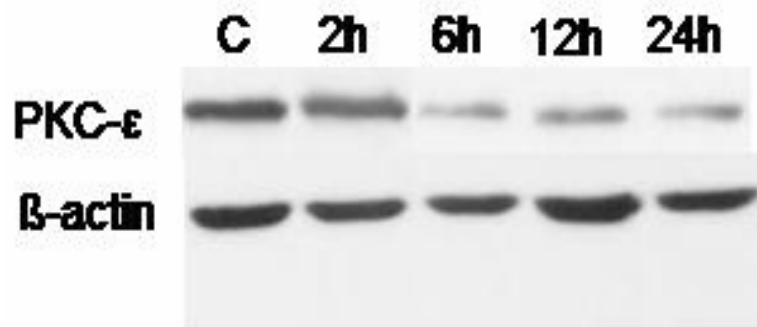


**Abbildung 3.7:** Formalinschmerz erhöht die Expression von PKC- $\epsilon$  (n = 5/Gruppe).

Densitometrische Messungen der PKC- $\epsilon$  Proteinkonzentrationen im Cortex. Zwei Stunden nach dem Schmerzreiz kommt es zu einem Anstieg der PKC- $\epsilon$ . Die Erhöhung ist signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe C (p = 0.029).



A)

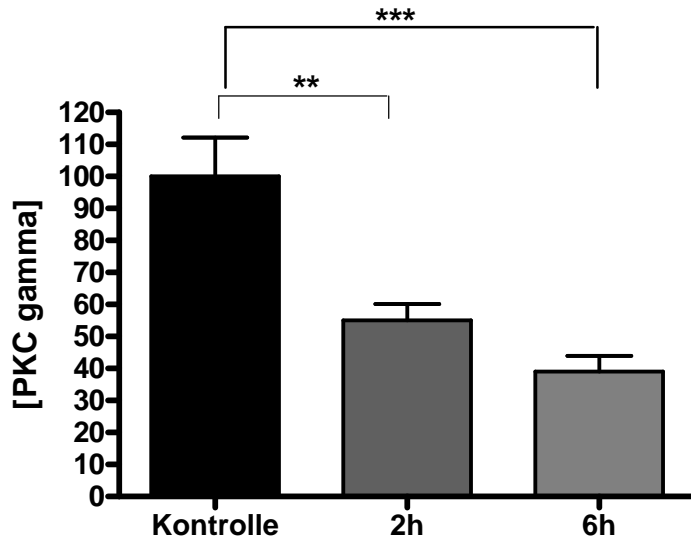


B)

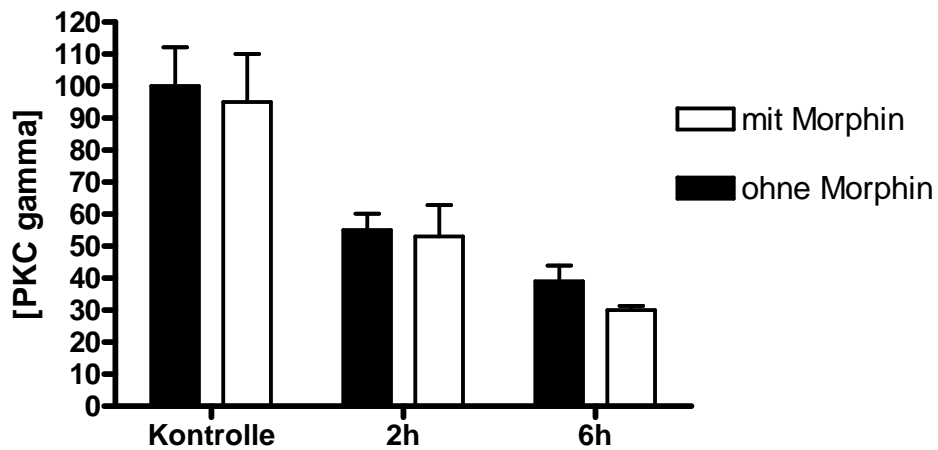
**Abbildung 3.8:** Morphin unterdrückt die Überexpression von PKC-ε im Cortex nach Schmerzreiz (n = 5/Gruppe).  
 A) Die densitometrische Messung ergab einen signifikanten Abfall der PKC-ε Konzentration im Cortex nach sechs Stunden (p=0.015)  
 B) Die Proteinbanden im Western-Blot zeigen, dass Morphin die PKC-ε Expression im Cortex vermindert.

### 3.3.2 Protein KinaseC-γ

Im Cortex kam es durch den Schmerzreiz nach zwei Stunden zu einer signifikanten Erniedrigung der PKC-γ Aktivität welche sich nach sechs Stunden noch deutlicher zeigte (zwei Stunden: p<0.01; sechs Stunden: p<0.001). Die Proteinbanden für 12 und 24 Stunden waren zu dünn um eine Dichtemessung durchzuführen. Morphin hatte keinerlei Effekt auf die Expression der PKC-γ (Abbildung 3.9).



A)



B)

**Abbildung 3.9:** Gezeigt wird das Verhalten der PKC- $\gamma$  im Cortex nach Formalinreiz ohne und mit Morphin an P3 (n = 5/Gruppe).

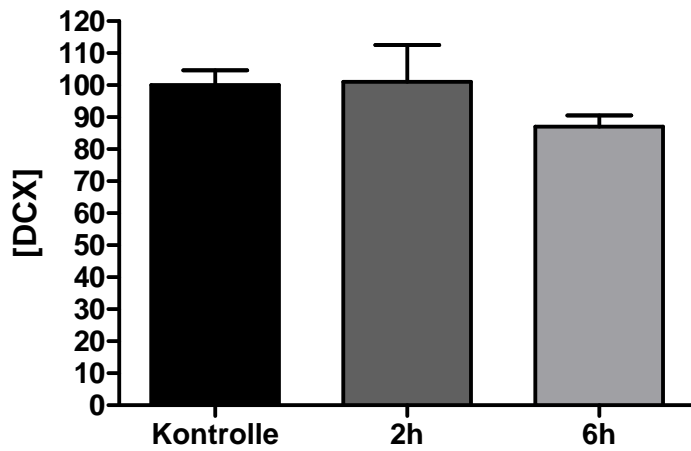
**A)** Der Schmerzreiz sorgt für eine Verminderung der PKC- $\gamma$  im Cortex.

**B)** Morphin vor dem Schmerzereignis hat keinen Einfluss auf die Expression der PKC- $\gamma$  im Cortex.

### **3.3.3 Doublecortin-**

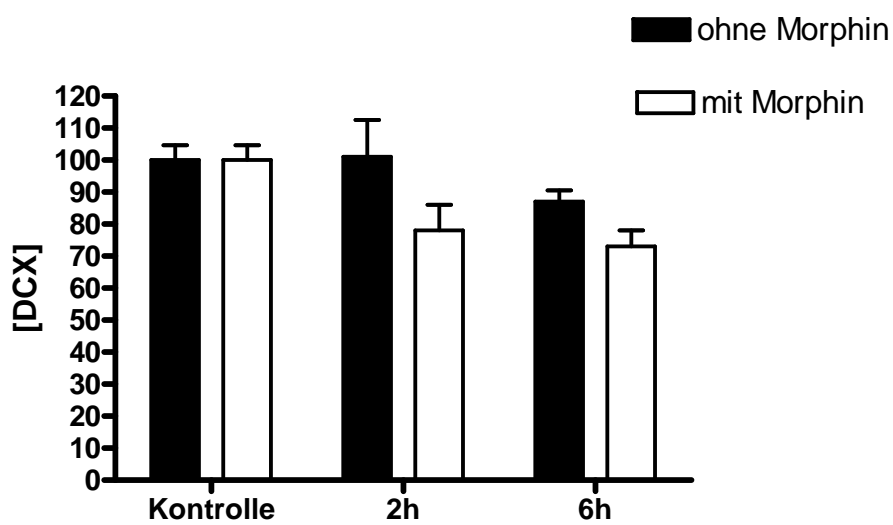
Der durch Formalin verursachte Schmerz brachte keine Veränderung in der Expression von Doublecortin im Cortex. Allerdings kam es im Thalamus zu einer signifikanten Erhöhung von Doublecortin nach zwei Stunden ( $p=0.0005$ ). Diese konnte durch die einmalige Gabe von Morphin unterdrückt werden (Abbildungen 3.10 und 3.11).





A)

---



B)

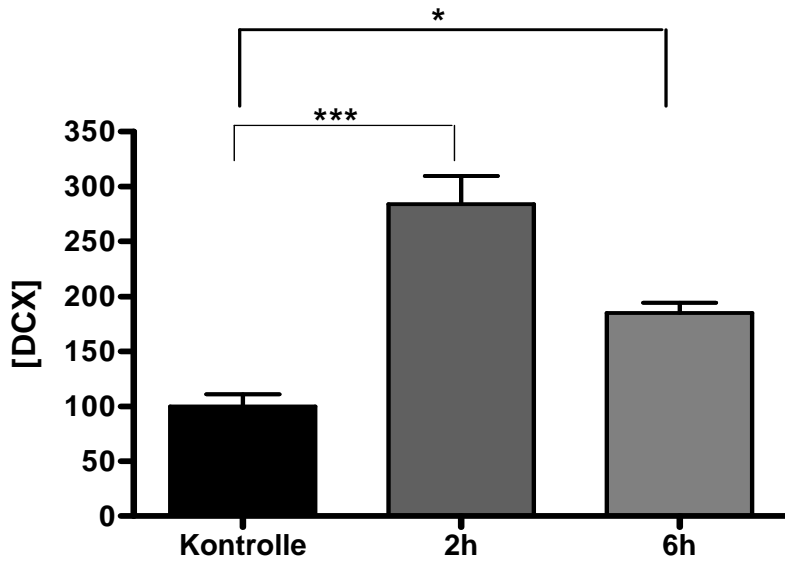
---

**Abbildung 3.10:** Die Dichte von Doublecortin im Cortex wird nicht durch Formalin beeinflusst (n = 5/Gruppe).

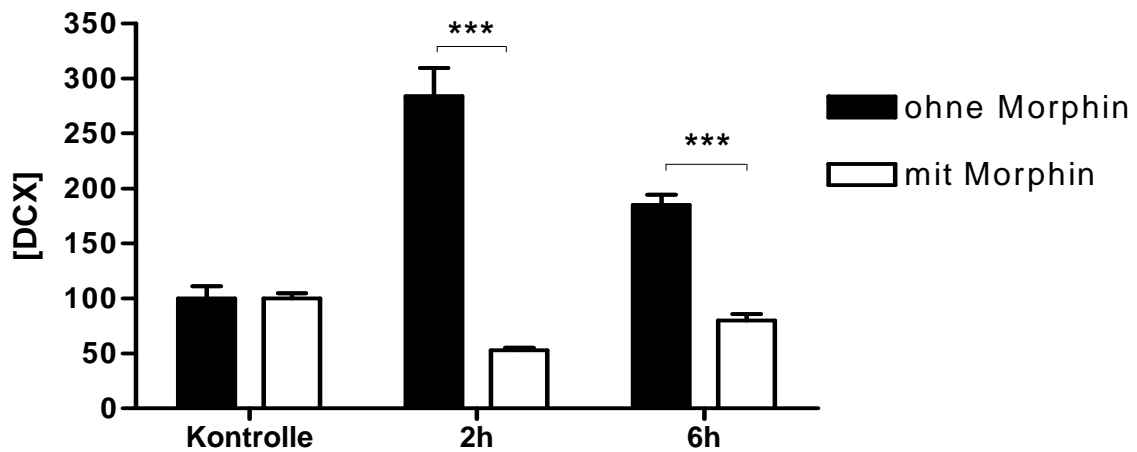
A) Der Formalinschmerz zeigt keinen Einfluss auf DCX im Cortex.

B) Nach zusätzlicher Morphin Gabe kommt es zu einem nicht signifikanten Abfall von DCX.

---



A)



B)

**Abbildung 3.11:** Die durch Formalinreiz erzielte Steigerung der DCX-Konzentration im Thalamus konnte durch Morphin unterdrückt werden (n = 5/Gruppe).

**A)** Steiler Anstieg von DCX nach Formalinreiz (2h:  $p < 0.001$ ; 6h:  $p < 0.05$ ).

**B)** Die Morphingabe verhindert den drastischen Anstieg des DCX im Thalamus nach Schmerzreiz.

## **4. DISKUSSION**

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es einen Zusammenhang zwischen Schmerzen während der vulnerablen Phase der Gehirnentwicklung und Neurodegeneration gibt. Morphin scheint einen schützenden Effekt in dieser Hinsicht zu haben. Der neurodegenerative Effekt der Schmerzen ist altersabhängig und tritt vor allem bei jungen Tieren auf. Der Beleg für die Neurodegeneration wurde mittels DeOlmos-Silberfärbung und TUNEL-Färbung erbracht. Außerdem konnte die Beteiligung der PKC- $\epsilon$  und der PKC- $\gamma$  in der zerebralen Schmerzverarbeitung dargestellt werden. Auch das für eine normale neuronale Strukturierung wichtige Doublecortin wies unter Schmerzen ein verändertes Expressionsmuster auf. Zusätzlich wurden alle Versuche mit Morphin durchgeführt um die Effekte des Analgetikums auf die Neurodegeneration und die genannten Proteine zu erforschen.

Klinische Studien haben bereits den negativen Effekt neonataler Schmerzen auf die Entwicklung frühgeborener Kinder bestätigt (Whitfield 2000; Grunau RE 2009) und mit Hilfe bildgebender Verfahren konnte eine zerebrale Aktivierungen während eines Schmerzereignisses festgestellt werden (Bartocci 2006; Slater 2006). Die meisten tierexperimentellen Studien beschäftigten sich vornehmlich mit den Langzeitfolgen des neonatalen Schmerzes (Anand 1999; Bhutta 2001), was sich z.B. in verändertem Sozialverhalten und gestörten endokrinen Regelkreisen zeigte.

Das Anliegen dieser Arbeit war es, den wiederholten Schmerzreiz zu simulieren wie ihn z.B. Kinder auf der neonatologischen Intensivstation erfahren und die daraus entstehenden Folgen für das unreife Gehirn zu erforschen. Der Formalintest stellt hierfür ein gut validiertes Schmerzmodell dar (Abbot 1995; Sternberg 2005).

### **4.1 Schmerzen als Auslöser von Zelltod**

Morphologische Veränderungen durch Schmerzen wurden bisher vor allem auf spinaler Ebene (Ruda 2000) und durch Langzeiteffekte, die sich vor allem in einer herabgesetzten Schmerzschwelle (Taddio 1994; Sternberg 2005) und einem veränderten Sozialverhalten (Anand 1999) äußerten, nachgewiesen. Wir konnten hier die unmittelbaren Veränderungen auf das Gehirn durch Schmerzen darstellen.

Neugeborene Ratten die an den Tagen P1-P3 (Schmerzmodell I) einem Schmerzreiz ausgesetzt wurden, zeigten in der Silberfärbung vermehrt degenerierte Zellen gegenüber den Kontrolltieren. Aber auch Tiere die ausschließlich mit gewöhnlicher Kochsalzlösung behandelt wurden hatten eine höhere Zelltodrate als die Kontrolltiere. Ähnlich verhielt es sich mit den Tieren die über fünf Tage einen Schmerzreiz erhielten (Schmerzmodell II). Bei dieser Gruppe waren die Auswirkungen des Kochsalzes noch deutlicher als bei den Tieren des Schmerzmodell I. Die meisten toten Zellen fanden sich hierbei im frontalen Kortex, was wiederum zum von Anand beobachteten veränderten Sozialverhalten in der späteren Entwicklung von Ratten passen würde (Anand 1999).

Bis heute sind neben der physiologischen Neuronenapoptose während der Entwicklung verschiedene pathologische Auslöser beschrieben worden. So konnte z.B. die Gruppe um Felderhoff-Müser einen negativen Effekt der Hyperoxie für unreife Gehirne nachweisen (Felderhoff-Mueser 2004; Felderhoff-Mueser U 2005). Auch Antikonvulsiva konnte ein neurodegenerativer Effekt nachgewiesen werden (Bittigau 2002). Wir konnten hier zeigen, dass auch Schmerzen im sich entwickelnden Gehirn der Ratte zu Neurodegeneration führen. Zusätzlich konnten wir als Erste zeigen, dass subkutane Kochsalzinjektionen zu Neuronenuntergang im sich entwickelnden Gehirn führen. Dies ist ein Beleg für die extreme Vulnerabilität des unreifen Gehirns. Wie hier der genaue Pathomechanismus ist, bleibt spekulativ. Eine Möglichkeit ist, dass es durch den lokalen Reiz zu einer ungebremsten Überstimulation von Neuronen kommt, da die inhibierenden Bahnen noch unvollständig ausgebildet sind (Cull-Candy 2001; Bosman 2005). Zusätzlich spielen wahrscheinlich die verringerte Glutamataufnahme an NMDA-Synapsen und die direkte Zytotoxizität durch Mikrogliaaktivierung eine Rolle (Epstein 1999).

Die Schmerzmodelle I und II zeigen, dass je länger der NaCl-Reiz besteht, desto höher ist auch die Rate an degenerierten Neuronen. Der Formalinschmerz scheint hingegen sofort seine volle Wirkung zu entfalten. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass der NaCl-Reiz, im Gegensatz zum inflammatorischen Formalinreiz, eine stressbedingte Neurodegeneration nach sich zieht. Das neonataler Stress zu Zelltod im sich entwickelnden Gehirn führt, konnte u.a. durch Zhang gezeigt werden (Zhang L 2001). Der stressinduzierte Zelltod wird v.a. durch eine erhöhte Konzentration an Glukokortikoiden verursacht (Bohn 1980 a; Bohn 1980 b), woraus sich

ableiten ließe, dass je länger eine bestimmte Konzentration aufrecht erhalten wird, desto höher ist die Zahl der abgestorbenen zerebralen Zellen. Das wiederum würde erklären, warum die länger dem NaCl-Reiz ausgesetzten Tiere auch mehr tote zerebrale Zellen aufweisen.

In einer weiteren Untersuchung wurden ältere Tiere (P10-P12 = Schmerzmodell III) repetitiven Schmerzreizen und NaCl-Injektionen ausgesetzt um eine mögliche Altersabhängigkeit der Neurodegeneration festzustellen. Es kam hierbei nicht, wie bei den jüngeren Tieren, zu einem massiven Zelluntergang woraus sich schließen lässt, dass der durch Formalinschmerz und subkutane NaCl-Injektionen hervorgerufene Neuronenuntergang altersabhängig ist. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Reifung von inhibierenden Neuronen erst zu diesem Zeitpunkt einen Entwicklungsstand erreicht hat, welcher es ihnen erlaubt, eine überschießende excitatorische Entladung zu verhindern (Cull-Candy 2001; Bosman 2005).

Das Schmerzreize zu Neuronenuntergang führen ist konform mit den Ergebnissen von Anand et al. Die Tiere wurden hier auch dem Formalintest unterzogen und dann mittels Fluoro-Jade B Färbung der Zelluntergang festgestellt. Zusätzlich wurde der Effekt von Ketamin, einem Anästhetikum, untersucht, welches auch zu einer Verminderung der Zelltodrate führte (Anand 2007). Allerdings konnten wir zusätzlich zeigen, dass auch reine Kochsalzlösung ausreicht, um einen drastischen Neuronenuntergang herbeizuführen.

#### **4.2 Morphin verhindert schmerzinduzierten Neuronenuntergang im unreifen Gehirn der Ratte**

Es sollte untersucht werden, ob die Gabe von Morphin vor einem Schmerzreiz, einen Einfluss auf die durch Schmerzreize ausgelöste Neurodegeneration hat. Die Tiere bekamen ca. 30 Minuten vor der Formalininjektion bzw. der NaCl-Injektion 500 µg Morphin/kg Körpergewicht subkutan in die Rückenpartie injiziert und wurden dann den gleichen Protokollen wie Schmerzmodell I und II unterzogen. Nach Morphingabe blieb der in Schmerzmodell I gesehene Anstieg an apoptotischen Zellen aus. Morphin scheint hier also einen neuroprotektiven Effekt zu haben. Dies wird unterstützt durch andere Arbeiten in welchen gezeigt wurde, dass Morphin zwar nicht direkt, aber z.B. durch die Aktivierung von Astrozyten einen neuroprotektiven Effekt hat (Kim M.S. 2001; Ammon-Treiber 2005). Allerdings ist dies das erste Mal, dass es in einem

neonatalen Schmerzmodell gezeigt werden konnte. Der Grund für den protektiven Mechanismus bleibt spekulativ. Eine Möglichkeit wäre, wie bereits oben erwähnt, dass es durch Astrozytenaktivierung zu einer verhinderten Degeneration kommt. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass die Metabolismusfunktion der Organe noch nicht voll ausgeprägt ist und das Morphin dadurch länger im Organismus wirkt (Kart T 1997).

Im zweiten Morphinmodell, in welchem die Tiere über einen fast doppelt so langen Zeitraum lebten wie im Morphinmodell I, deutet sich der positive Effekt des Morphins nur an. Dieses Ergebnis wird durch eine klinische Studie unterstützt in welcher gezeigt wurde, dass je älter die Patienten sind desto mehr Morphin ist nötig um den gleichen analgetischen Effekt zu erzielen (Bouwmeester 2003 b). Einerseits wird das Morphin vermehrt metabolisiert wodurch der absolute Effekt abnimmt (Bouwmeester 2004). Das drückt sich in unseren Ergebnissen wiederum als abgeschwächte Neuroprotektion im Vergleich zum Morphinmodell I aus. Hinzu kommt, dass im Laufe der ersten Lebensstage die Dichte an Opioid-Rezeptoren deutlich abnimmt und dadurch auch die Wirkungsmöglichkeit (Rahman 1998).

Auf die durch reine Kochsalzinjektionen ausgelöste Neurodegeneration (s. Abb. 3.1 und 3.2) hat das Morphin nur in den 5 Tage behandelten Tieren (Morphinmodell II) einen signifikanten Einfluss (s. Abb. 3.4 und 3.5). Eine Möglichkeit, weswegen der Effekt hier im Hinblick auf die FormalinGruppe so unterschiedlich ausfällt, könnte die zu geringe Anzahl an Versuchstieren in dieser NaCl-Gruppe sein.

Im Tiermodell wurde nachgewiesen, dass die alleinige Gabe von Morphin keine Auswirkung auf das sich entwickelnde Gehirn der Ratte (Black 2008). Dies stimmt mit unseren Ergebnissen überein (s. Abb. 3.4). Die Morphingabe bei neugeborenen Ratten zeigte bei erneuter Applikation im gleichen, ausgewachsenen Tier einen länger anhaltenden analgetischen Effekt (Rozisky 2008).

Klinische Studien von Simons oder Carbajal, welche die routinemäßige Morphingabe bei beatmeten Frühgeborenen untersuchten, konnten keinen unmittelbaren positiven Effekte für das

Outcome der Kinder zeigen (Simons 2003; Carbajal 2005). Langzeitergebnisse der frühen Morphinexposition stehen hier allerdings noch aus.

Abschließend lässt sich an dieser Stelle feststellen, dass Morphin die durch Schmerzreize hervorgerufene Neurodegeneration vermindert und keine negativen Effekte auf das sich entwickelnde Gehirn hat.

#### **4.3 Beeinflussung der zerebralen PKCs durch Schmerzreize, Kochsalz und Morphin**

Bis heute ist wenig bekannt über die zerebralen PKCs wenn es um Schmerzen und Analgesie geht. Die Aktivierung der PKC im Gehirn scheint den nozizeptiellen Effekt über eine Phosphorylierung von AMPA- und NMDA-Rezeptoren zu verstärken (Guan 2004; Guo 2006). Außerdem wird durch supraspinale Morphinexposition die PKC aktiviert und es kommt so zu einer verstärkten excitatorischen Glutamatfreisetzung (Galeotti 2006). Hinzu kommt, dass auch Neuritenwachstum und synaptische Verbindungen maßgeblich durch die Aktivität der PKC- $\epsilon$  beeinflusst werden (Hundle 1995; Scott 2007).

In dieser Arbeit wurde das Verhalten der PKC Isoenzyme  $\epsilon$  und  $\gamma$  im unreifen Kortex und Thalamus drei Tage alter Ratten auf Schmerzen untersucht und zusätzlich die Reaktion auf gewöhnliche Kochsalzlösung. Ferner wurden alle Experimente mit der Gabe von Morphin durchgeführt.

Im Kortex wurde die PKC- $\epsilon$  durch den Schmerzreiz kurzzeitig (nach 2h) hoch reguliert und fiel dann auf das Ausgangslevel zurück. Diese Aktivierung könnte zu einer erhöhten Aktivität der neuronalen NMDA-Rezeptoren führen und darüber die schon vorhandene Aktivität durch den Schmerzreiz potenzieren. Zusätzlich wird über eine Überexpression der PKC der Magnesium-Block innerhalb der NMDA-Rezeptoren gelöst und so dessen Aktivität potenziert (Chen 1992). Dies führt dann zu dem, schon von Anand als Hypothese formuliertem, excitatorischen Neuronenuntergang (Anand 2000 b). Dies wiederum deckt sich mit unseren histologischen Ergebnissen. In unserem Versuch wurden auch die Auswirkungen von Morphin auf die PKC- $\epsilon$  untersucht. Hier kam es zu einer signifikanten Reduktion der PKC- $\epsilon$  Konzentration im Cortex. Dadurch würde die zuvor beschriebene Aktivierung der NMDA-Rezeptoren ausbleiben.

Außerdem bleibt so die Lösung des Magnesiumblocks im NMDA-Rezeptor aus. Beides sind Mechanismen die die Neurodegeneration vermindern, was wiederum mit den von uns gezeigten histologischen Befunden übereinstimmt.

Die NaCl-Injektionen führten, ähnlich wie der Formalinreiz, zu einer verstärkten Expression der PKC- $\epsilon$  im Cortex drei Tage alter Ratten. Da beide Reize in der Histologie zu einem vermehrten Auftreten degenerierter Nervenzellen führen, könnte man schlussfolgern, dass die PKC- $\epsilon$  direkt an der Degeneration beteiligt ist. Dies wird durch eine Arbeit unterstützt, welche zeigen konnte, dass inflammatorisch provoziertes Neuronentod direkt durch die PKC- $\epsilon$  vermittelt wird (Jung 2004). Morphin hatte hier allerdings keinen Einfluss auf das Expressionsmuster.

Das Isoenzym PKC- $\gamma$  wurde unter inflammatorischen Formalinschmerzen stark runter reguliert. Dieses Isoenzym ist maßgeblich an der für die weitere Entwicklung des Gehirns entscheidenden Long-term Potentiation beteiligt (Saito 2002). Eine, wie in diesem Versuch gezeigte, Reduzierung der PKC- $\gamma$  hat also weitreichende Folgen für die Synapsenverbindungen des Cortex. Das vor Schmerzreiz gegebene Morphin hatte keinen Einfluss auf die PKC- $\gamma$  im Cortex.

Da die PKCs entscheidend an der Synaptogenese, dem Neuritenwachstum und auch der Long-Term-Potentiation (LTP), was der Synapsenstabilisierung dient, beteiligt sind, ist jede Überexpression und Reduzierung theoretisch auch mit Folgen für die weitere Entwicklung des Nervensystems behaftet. Wir konnten zeigen das Schmerzreize das Expressionsmuster der PKCs beeinflussen. Daher ist dies ein Indiz dafür, dass es zu fehlerhaften und unsinnigen Vernetzung innerhalb des sich entwickelnden Nervensystems kommen kann.

#### **4.4 Schmerz erhöht die Expression von Doublecortin im Thalamus**

Wir wollten sehen, ob Schmerzreize eine Auswirkung auf das, für Migration und Differenzierung von Neuronen wichtige Doublecortin haben. Veränderte Expressionsmuster wären ein Indiz für eine pathologische Neurogenese im unreifen Gehirn. Im Thalamus drei Tage junger Ratten kam es nach setzen eines Formalin-Schmerzes nach 2 h zu einem massiven Anstieg von DCX. Die Degeneration scheint hier als Auslöser für die verstärkte Expression zu dienen, was Magavi et al. bereits durch induzierte Apoptose im adulten Rattencortex zeigen



konnten (Magavi 2000). Dieses induzierte, vermehrte Auftreten von DCX könnte wiederum zu einer pathologisch verlaufenden Neuronendifferenzierung führen, was wiederum Auswirkungen für die spätere Entwicklung hätte. In klinischen Studien zu Schädelhirntraumen (SHT) bei Kindern, wurde das im Liquor initial erhöhte DCX nach SHT als prognostisch günstig eingestuft (Chiaretti A. 2009). In einer Tierstudie, in welcher unter anderem die Auswirkungen von Hypoxie auf das adulte Rattenhirn untersucht wurden, konnte DCX protektive Eigenschaften gegenüber migrierenden Neuroblasten nachgewiesen werden (Santra 2006). Das lässt auf der einen Seite Vermuten, dass die im Rahmen der durch Schmerzreiz induzierten Neurodegeneration überschießende DCX-Expression auch zum Schutz der verbleibenden Neurone exprimiert werden könnte. Auf der anderen Seite könnte die Überexpression zu einer vermehrten Neoproliferation und –migration führen. Inwieweit diese Neoproliferation allerdings eine „normale“ Proliferation und Migration nach sich zieht, oder ob es dadurch zu einer gestörten Vernetzung kommt sollte Thema weiterer Studien sein.

Durch die Gabe von Morphin vor Setzen des Schmerzes, blieb der Anstieg von DCX im Thalamus aus. Da Morphin immer wieder antiproliferative Effekte das ZNS betreffend nachgesagt werden (Kornblum 1987; Kim E. 2006), könnte es einerseits ein direkter Effekt des Morphins sein, der hier nachgewiesen wurde, wie er auch für Sedativa und Antikonvulsiva beschrieben wurde (Stefovska 2008). Auf der anderen Seite konnte die Gruppe um Sargeant et al. keinen Zusammenhang zwischen Opioidrezeptor exprimierenden Zellen und DCX exprimierenden Zellen feststellen (Sargeant 2007), sodass der Rückgang des DCX unter Morphingabe wohl doch indirekt über einen verhinderten Schmerz zu erklären ist. Dies wiederum stützt unsere Hypothese, dass Schmerzen direkten Einfluss auf die neuronale Migration, Proliferation und Apoptose haben.

#### **4.5 Bedeutung der Ergebnisse**

Zu wenig ist bis jetzt über die direkten und die längerfristigen Folgen von Schmerzen im Früh- und Neugeborenenalter bekannt. Die klinischen Studien die es gibt, belegen einen Zusammenhang zwischen früh erlebten Schmerzen und später auftretenden Veränderungen der Schmerzempfindung (Taddio 1994). Bildgebende Studien haben bereits einen zerebralen Volumenverlust bei Frühgeborenen feststellen können (Peterson 2000), welcher mit der durch uns gezeigten Neurodegeneration bedingt durch Schmerzen, zusammenhängen könnte. Morphin

scheint in der Klinik allerdings keinen so positiven Effekt zu haben wie wir es zeigen konnten, sodass auch nicht zur routinemäßigen Morphingabe geraten wird.

Es scheint, dass auf molekularer Ebene die neuronalen Verarbeitungs- und Strukturierungsprozesse durch Schmerzen gestört werden. Dies in Verbindung mit den histomorphologischen Veränderungen, könnte ein Indiz für die signifikant häufiger auftretenden Entwicklungsstörungen bei Frühgeborenen sein. Letztendlich wurde mit dieser Arbeit gezeigt, dass Schmerzen im unreifen Gehirn morphologische und molekulare Veränderungen nach sich ziehen und diese sich teilweise durch Morphin kompensieren lassen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund: Schmerzen bei Frühgeborenen sind ein wichtiges und unzureichend erforschtes Feld. Die Effekte von Schmerzreizen auf das sich entwickelnde Gehirn sind nicht geklärt.

Daher wurde ein neonatales Tiermodell entwickelt, um die Auswirkungen von Schmerzen auf unterschiedliche Gehirnareale zu untersuchen.

Methoden: Neugeborene Wistar-Ratten wurden dem, bei adulten Tieren etablierten, „Formalin-Test“ (Injektion von 10%igem Formalin subkutan in die Pfoten), unterzogen. Die zwei Kontrollgruppen bekamen entweder 0,9%NaCl oder keine Injektion. Eine Serie von neugeborenen Tieren wurde an Tag 1 (P1), Tag 2 (P2) und Tag 3 (P3) injiziert und an P4 transkardial perfundiert. Eine zweite Versuchsreihe erhielt tägliche Injektionen an P1 bis P5 und wurde an Tag 6 der Aufarbeitung zugeführt. Außerdem gab es eine Versuchsreihe mit Tieren im Alter von 12 Tagen. In einer letzten Behandlungsstudie wurde zudem Morphin (500 µg/kg oder 5 mg/kg), 20 min vor Behandlungsstart subkutan gespritzt. Nach transkardialer Perfusion wurden die Gehirne histologisch mittels DeOlmos Kupfer Silberfärbung sowie der TUNEL-Färbung zur Detektion apoptotischer Zellen aufgearbeitet. Aus 12 verschiedenen Hirnarealen wurde ein Summenscore degenerierter Neurone ermittelt. Für molekularbiologische Untersuchungen (Western blotting für Protein-Kinase-C Isoformen  $\epsilon$  und  $\gamma$  sowie Doublecortin) wurden die Tiere an P3 injiziert und nach 2, 6, 12 und 24 Stunden dekapitiert, Thalamus und Cortex herauspräpariert und sofort bei -80 °C bis zur weiteren Analyse tiefgefroren.

Ergebnisse: In vier Tage alten Tieren waren in der Formalin-Gruppe signifikant mehr degenerierte Neurone als in den Kontrollgruppen ( $p < 0,001$ ). Bei den Tieren, die über 5 Tage Injektionen erhielten, zeigten sich in der Formalin-Gruppe und in der mit Kochsalz behandelten Gruppe die gleiche Dichte an degenerierten Neuronen und signifikant weniger in der Gruppe ohne Behandlung ( $p < 0,001$ ). Die zwölf Tage alten Tiere zeigten keine Differenzen bei den untergegangenen Zellen.

In den molekularbiologischen Untersuchungen zeigte sich eine schmerzassoziierte Hochregulation des Doublecortins im Thalamus sowie ein unterschiedliches Verhalten der PKC-Isoenzyme in Cortex und Thalamus.

Die Vorbehandlung mit Morphin (500 µg/kg) führte zu einer Verminderung der Neurodegeneration, sodass die Signifikanzen in beiden Versuchsreihen aufgehoben wurden.

Schlussfolgerung: Unsere Ergebnisse zeigen, dass Schmerzen im unreifen Gehirn zu einem Neuronenverlust führen können. Bemerkenswerterweise, wird auch bei chronisch applizierter Kochsalzlösung ein hoher Schaden am Gehirn verursacht, was auf die Verwundbarkeit des sich entwickelnden Gehirns unter Stress hindeutet. Eine Therapie mit Morphin scheint diesen Effekt zu verringern. Außerdem ist dieser Effekt abhängig vom Alter des Tieres was auf spezielle, schützende Reifungsprozesse schließen lässt, welche erst im Laufe der ersten Lebensstage ausgebildet werden. Auf molekularer Ebene wurden ebenfalls Veränderungen im Expressionsmuster der untersuchten PKC-Isoenzyme und DCX gefunden. Dies lässt die Vermutung zu, dass durch Schmerzen bedingt, wichtige zerebrale Strukturierungsprozesse gestört werden und es so zu, erst später feststellbaren, Folgeschäden kommt.

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumpersulfat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i>
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	<i>control</i> (Kontrolltiere)
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
Caud	Nucleus caudatus
Cfr II	Cortex frontalis, lamina II
Cing	Cingulum
Cere	Cerebellum
cm	Zentimeter
Cpr	Cortex parietalis
d	destiliert
DAB	Diaminobenzidin
DCX	Doublecortin
DG	Gyrus dentatus
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
et al.	et altera
g	Gramm
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

Hg	Quecksilber
Hip	Hippocampus
HRP	<i>horseradish peroxidase-linked</i>
Hyth	Hypothalamus
Ig	Immunglobulin
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
l	Liter
LTP	<i>long-term-potential</i>
μ	Mikro
m	Meter
M	Molar
mA	Milliamper
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff

PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PKC	Proteinkinase C
RSC	retrosplenialer Kortex
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SHT	Schädelhirntrauma
Str	Striatum
Subic	Subiculum
TBS	<i>tris buffered saline</i>
tDT	terminale Deoxynucleotidyltransferase
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tha	Thalamus
Th LD	Thalamus laterodorsalis
Th MD	Thalamus mediodorsalis
Th V	Thalamus ventralis
U	<i>unit</i>
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
W	Watt
ZNS	zentrales Nervensystem

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Abbot, F. V., Guy, E.R. (1995). "Effects of morphine, pentobarbital and amphetamine on formalin-induced behaviours in infant rats: sedation versus specific suppression of pain." Pain **62**: 303-312.

Ammon-Treiber, S., Stolze D, Schroder H, Loh H, Holtt V. (2005). "Effects of opioid antagonists and morphine in a hippocampal hypoxia/hypoglycemia model." Neuropharmacology **49**: 1160-1169.

Anand, K. J., Hall, R.W., Desai, N., Shephard, B., Bergqvist, L.L., Young, T.E., Boyle, E.M., Carbajal, R., Bhutani, V.K., Moore, M.B., Kronsberg, S.S., Barton, B.A., (2004). "Effects of morphine analgesia in ventilated preterm neonates: primary outcomes from the NEOPAIN randomised trial." Lancet **363**: 1673-1682.

Anand, K. J., Hickey, P.R: (1987). "Pain and its effects in the human neonate and fetus." N Engl J Med **317**(21): 1321-1329.

Anand, K. J. S. (2000 a). "Effects of perinatal pain and stress." Prog Brain Res(122): 117-129.

Anand, K. J. S. (2007). "Ketamine reduces the Cell Death following Inflammatory pain in Newborn Rat Brain." Pediatric Research **62**(3): 283-290.

Anand, K. J. S., Coskun V, Trinvikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM (1999). "Longterm behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups." Physiol Behav(66): 627-637.

Anand, K. J. S., Scalzo FM (2000 b). "Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior?" Biol Neonate(77): 69-82.

Angeles, D. M., Wycliffe, N., Michelson, D., Holshouser, B.A., Deming, D.D., Pearce, W.J., Sowers, L.C., Ashwal, S. (2005). "Use of opioids in asphyxiated term neonates: effects on neuroimaging and clinical outcome." Pediatric Research **57**: 873-878.

Bartocci, B., Lagercrantz, Anand KJ (2006). "Pain activates cortical areas in the preterm newborn brain." Pain(122): 109-117.

Barton, G., Basbaum, A.I. (1980). "Dissociation of supraspinal and spinal actions of morphine: a quantitative evaluation." Brain Res(188): 487-498.



Basbaum, A. I., Fields, H.L. (1984). "Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry." Annu. Rev. Neuroscience(7): 309-338.

Bhutta, A. T., Rovnaghi, C.R., Simpson, P.M., Gosset, J.M., Scalzo, F.M., Anand, K.J.S. (2001). "Interactions of inflammatory pain and morphine treatment in infant rats: long term behavioral effects." Physiol Behav **73**: 51-58.

Bie, B., Pan, ZZ (2005). "Increased glutamate synaptic transmission in the nucleus raphe magnus neurons from morphine-tolerant rats." Mol Pain **1**: 7.

Bittigau, P., Sifringer M, Genz K, Olney JW, Ikonomidou C (2002). "Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain." PNAS **99**(23): 15089-15094.

Black, A. M., Pandya, S., Clark, D. (2008). "Effect of caffeine and morphine on the developing pre-mature brain." Brain Res **1219**: 136-142.

Bohn, M. C. (1980 a). "Granule cell genesis in the hippocampus of rats treated neonatally with hydrocortisone." Neuroscience **5**: 2003-2012.

Bohn, M. C., Lauder, JM (1980 b). "Cerebellar granule cell genesis in the hydrocortisone-treated rats." Dev Neurosci **3**(2): 81-9.

Bosman, L., Heinen, K, Spijker S, Brussaard AB. (2005). "Mice lacking the major adult GABAA receptor subtype have normal number of synapses, but retain juvenile IPSC kinetics until adulthood." J Neurophysiol **94**: 338-46.

Botting, N., Powls A, Cooke RW, Marlow N (1997). "Attention deficit hyperactivity disorders and other psychiatric outcomes in very low birthweight children at 12 years." J Child Psychol Psychiatry(38): 931-941.

Bouwmeester, N., Anderson, BJ, Tibboel, D, Halford, NHG (2004). "Developmental pharmacokinetics of morphine and its metabolites in neonates, infants and young children." Br J Anaesth **92**: 208-17.

Bouwmeester, N., Hop WC, van Dijk M, Anand KJ, van den Anker JN, Tibboel D (2003 b). "Postoperative pain in the neonate: age-related differences in morphine requirements and metabolism." Intensive Care Med **29**(11): 2009-15.

Bouwmeester, N. J., van den Anker, J.N., Hop, W.C., Anand, K.J.S., Tibboel, D. (2003a). "Age- and therapy related effects on morphine and its metabolites in postoperative infants." Br J Anaesth **90**: 642-52.

Brown, J. P., Couillard-Despres, S., Cooper-Kuhn, C., Winkler, J., Aigner, L., Kuhn, H.G. (2003). "Transient Expression of Doublecortin during Adult Neurogenesis." J Comp Neurol **467**: 1-10.

Bullit, E. (1990). "Expression of C-fos-Like Protein as a Marker for Neuronal Activity Following Noxious Stimulation in the Rat." J Comp Neurol **296**: 517-530.

Carbajal, R., Lenclen, Richard, Jugie, Myriam, Paupe, Alain, Barton, Bruce A. ,Anand, Kanwaljeet J. S. (2005). "Morphine Does Not Provide Adequate Analgesia for Acute Procedural Pain Among Preterm Neonates." Pediatrics **115**(6): 1494-1500.

Chen, A. (2001). "New perspectives in EEG/MEG brain mapping and PET/fMRI neuroimaging of human pain." Int J Psychophysiol(42): 147-159.

Chen, L., Huang, LYM (1992). "Protein kinase C reduces Mg<sup>2+</sup> block of NMDA-receptor channels as a mechanism of modulation." Nature **356**: 521-523.

Chiaretti A., B. G., Riccardi R., Antonelli A., Pezotti P., Genovese O., Tortorolo L., Conti G. (2009). "NGF, DCX, and NSE upregulation correlates with severity and outcome of head trauma in children." Neurology **72**: 609-616.

Coderre, T. (1992). "Contribution of protein kinase C to central sensitization and persistent pain following tissue injury." Neurosci. Lett.(140): 181-184.

Cooper-Kuhn, C. M. a. K., H. G. (2002). "Is it all DNA repair? Methodological considerations for detecting neurogenesis in the adult brain." Brain Res. Dev. Brain Res. **134**: 13-21.

Couillard-Despres, S., Winner, B., Schaubeck, S., Aigner, R., Aigner, L. (2005). "Doublecortin expression levels in adult brain reflect neurogenesis." Eur J Neurosci **21**: 1-14.

Cruz-Orive (1990). "Recent stereological methods for cell biology: a brief survey." Am J Physiol **258**: L148-L156.

Cull-Candy, S., Brickley S, Farrant M, (2001). "NMDA receptor subunits: diversity, development and disease." Curr Opin Neurobiol **11**: 327-35.

De Olmos, J. e. a. (1971). "An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration." Brain Res **33**: 523-529.

Dobbing, J. (1974). "The later growth of the brain and its vulnerability." Pediatrics **53**: 2-6.

Epstein, L. G., Gelbard, HA., (1999). "HIV-1 induced neuronal injury in the developing brain." J Leukoc Biol **65**: 453-457.

Felderhoff-Mueser, U., Bittigau P, Sifringer M, Bozena J, Bühler C, Ikonomidou C (2004). "Oxygen causes cell death in the developing brain." Neurobiology of Disease(17): 273-282.

Felderhoff-Mueser U, S. M., Polley O, Dzierko M, Leineweber B, Mahler L, Baier M, Bittigau P, Obladen M, Bozena J, Ikonomidou C, Bühler C (2005). "Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain." Ann Neurol **57**(1): 50-9.

Fitzgerald, M. (2005). "The development of nociceptive circuits." Nat Rev Neurosci(6): 507-520.

Francis, F., Koulakoff, A., Boucher, D., Chafey, P., Chelley, J. (1999). "Doublecortin Is a Developmentally Regulated, Microtubule-Associated Protein Expressed in Migrating and Differentiating Neurons." Neuron **23**: 247-256.

Galeotti, N., Stefano, G.B., Guarna, M., Bianchi, E., Ghelardini, C. (2006). "Signaling pathway of morphine induced acute thermal hyperalgesia in mice." Pain **123**: 294-305.

Gavrieli, Y. S., Y. und Ben-Sasson, S. A. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol **3**: 493-501.

Gerstner, B., Bühler C, Rheinländer C, Obladen M, Felderhoff-Mueser U (2006). "Maturation-Dependent oligodendrocyte apoptosis caused by hyperoxia." Journal of Neuroscience Research **84**: 306-315.

Gleeson, J. G., Allen K. M., Fox J. W. et al. (1998). "Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein." Cell **92**: 63-72.

Gleeson, J. G., Lin, P.T., Flanagan, L.A., Walsh, C.A. (1999). "Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons." Neuron **23**: 257-271.

Grunau RE, W. M., Petrie-Thomas J., Synnes A.R., Cepeda IL., Keidar A., Rogers M., MacKay M., Hubber-Richard P., Johannesen D. (2009). "Neonatal pain, parenting stress an interaction, in relation to cognitive and motor development at 8 and 18 months in preterm infants." Pain **143**: 138-146.

Guan, Y., Wei Guo, Meredith T. Robbins, Ronald Dubner, Ke Ren (2004). "Changes in AMPA receptor phosphorylation in the rostral ventromedial medulla after inflammatory hyperalgesia in rats." Neurosci Lett **366**: 201-205.

Guo, W., Robbins, M.T., Wei, F., Zou, S., Dubner, R., Ren, K. (2006). "Supraspinal Brain-Derived Neurotrophic Factor Signaling: A Novel Mechanism for Descending Pain Facilitation." J Neurosci **26**: 126-137.

Hevner, R. (2000). "Development of connections in the human visual system during fetal mid-gestation: a Dil-tracing study." J Neuropath Exp Neurol(59): 385-392.

Hu, S., Sheng, W.S., Lokensgard, J.R., Peterson, P.K. (2002). "Morphine induces apoptosis of human microglia and neurons." Neuropharmacology(42): 829-836.

Hundle, B., McMahon, T, Dagar, J, Messing, RO (1995). "Overexpression of e-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth." J Biol Chem **270**: 30134–30140.

Inturrisi, C. E. (2002). "Clinical pharmacology of opioids for pain." Clin J Pain(18(Suppl. 4)): S3-13.

Ishimaru, M. J. I., C.; Tenkova, T. I.; Der, T. C.; Dikranian, K.; Sesma, M. A. und Olney, J. W. (1999). "Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain." J Comp Neurol **4**: 461-76.

Jackman, A. F., M. (2000). "Development of peripheral hindlimb and central spinal cord innervation by subpopulations of dorsal root ganglion cells in the embryonic rat." J Comp Neurol(418): 281-298.

Javed, R. R., Dewey, W.L., Smith, P.A., Smith, F.L. (2004). "PKC and PKA inhibitors reverse tolerance to morphine-induced hypothermia and supraspinal analgesia in mice." Eur J Pharmacol **492**: 149-157.

Jung, Y., Ryu, BR, Lee, BK, Mook-Jung, I, Kim ,SU, Lee, SH, Baik, EJ, Moon, CH (2004). "Role for PKC-epsilon in neuronal death induced by oxidative stress." Biochem Biophys Res Commun. **320**(3): 789-794.

Kart T, C. L., Rasmussen M. (1997). "Recommended use of morphine in neonates, infants and children based on a literature review: Part 1ÐPharmacokinetics." Paediatr Anaesth **7**: 5-11.

Khasar, L. Y., Martin A, Dadgar J, McMahon T, Wang D, Hundle B, Aley KO, Isenberg W, McGarter J (1999). "A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice." Neuron **24**: 253-260.

Kim E., C., A.L., Kiss, A., Hahn, J.W., Wesselschmidt, R., Coscia, C.J., Belcheva, M.M., (2006). "Mu and kappa-opioids induce the differentiation of embryonic stem cells to neural progenitors." J. Biol. Chem. **281**: 33749–33760.

Kim M.S., C., Y.P., So, H.S., Lee, K.M., Kim, T.Y., Oh, J., Chung, Y.T., Son, Y., Kim, B.R., Park, R., (2001). "Protective effects of morphine in peroxynitrite-induced apoptosis of primary rat neonatal astrocytes: potential involvement of G protein and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3 kinase)." Biochem. Pharmacol. **61**: 779-786.

Kornblum, H. I., Loughlin, S.E., Leslie, F.M., (1987). "Effects of morphine on DNA synthesis in neonatal rat brain." Dev. Brain Res **31**: 45-52.

Kostovic, I., Judas M, Petanjek Z, Simic G (1995). "Ontogenesis of goaldirected behavior: anatomo-functional considerations." Int J Psychophysiol(19): 85-102.

Kostovic, I., Rakic, P. (1990). "Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain." J Comp Neurol(297): 441-470.

Lee, S. J., Ralston, H.J., Drey, E.A., Partridge, J.C., Rosen, M.A. (2005). "Fetal pain: a systemic multidisciplinary review of the evidence." JAMA(294): 947-954.

Ling, M., Troller, U, Zeidman, R, Lundberg, C, Larsson C (2004). "Induction of neurites by the regulatory domains of PKCdelta and epsilon is counteracted by PKC catalytic activity and by the RhoA pathway." Exp Cell Res **292**(1): 135-50.

Magavi, S. S., Leavitt, B.R., Macklis, J.D. (2000). "Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice." Nature **405**: 951-955.

Malmberg, C., Tonegawa, Basbaum (1997). "Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC-gamma." Science **278**: 279-283.

Marlow, N., Wolke, Dieter, Bracewell, Melanie A., Samara, Muthanna, the EPICure Study Group (2005). "Neurologic and Developmental Disability at Six Years of Age after Extremely Preterm Birth." N Engl J Med **352**(1): 9-19.

McNulty, S., Crouch, M., Smart, D., Rumsby, M. (2001). "Differentiation of bipolar CG-4 line oligodendrocytes is associated with regulation of CREB, MAP kinase and PKC signaling pathways." Neurosci Res **41**: 217-226.

Mestek, A., Hurley, J.H., Bye, L.S., Campbell, A.D., Chen, Y., Tisn, M., Liu, J., Schulman, H., Yu, L. (1995). "The human mu opioid receptor: modulation of functional desensitization by calcium/calmodulin-dependent protein Kinase C." J Neurosci **15**: 2396-2406.

Mochly-Rosen, B. A., Koshland DE (1987). "Distinct cellular and regional localization of immunoreactive protein kinase C in rat brain." Proc Natl Acad Sci USA **84**: 4660-4664.

Morgane, P., Mokler DJ, Galler JR (2002). "Effects of prenatal protein malnutrition on the hippocampal formation." Neurosci Biobehav. Rev. **26**: 471-483.

Narita, M., Mizogushi, H., Suzuki, T., Dun, N.J., Imai, S., Yajima, Y., Nagase, H., Tseng, L.F. (2001a). "Enhanced mu-opioid responses in the spinal cord of mice lacking protein kinase C gamma isoform." J Biol Chem **276**: 15409-15414.

Narita, M., Mizogushi, H., Suzuki, T., Nagase, H., Tseng, L.F. (2001b). "Involvement of spinal protein kinase C gamma in the attenuation of opioid mu-receptor-mediated G-protein activation after chronic intrathecal administration of [D-Ala<sup>2</sup>,N-MePhe<sup>4</sup>,Gly-Ol<sup>5</sup>] enkephalin." J Neurosci **21**: 3715-3720.

Oberlander, T. F., Grunau, R.E., Fitzgerald, C., Whitfield, M.F. (2002). "Does parenchymal brain injury affect biobehavioral pain responses in very low birthweight infants at 32 weeks' postconceptional age?" Pediatrics(110): 570-576.

Peters, J., Schouw R, Anand KJS, van Dijk M, Duivenvoorden HJ, Tibboel D (2005). "Does neonatal surgery lead to increased pain sensitivity in later childhood?" Pain(114): 444-454.

Peterson, B., Vohr B, Staib LH, Cannistraci CJ, Dolberg A, Schneider KC, Katz KH, Westerveld M, Sparrow S, Anderson AW, Duncan CC, Makuch RW, Gore JC, Ment, LR (2000). "Regional brain volume abnormalities and long-term cognitive outcome in preterm infants." JAMA **284**: 1939-1947.

Rahman, W., Dashwood, MR, Fitzgerald, M (1998). "Postnatal development of multiple opioid receptors in the spinal cord and development of spinal morphine analgesia." Dev Brain Res(108): 239-54.

Rozisky, J. R., Dantas, G., Adachi, L.S., Torres, I.L.d.S. (2008). "Long-term effect of morphine administration in young rats on the analgesic opioid response in adult life." Int J Dev Neurosci.

Ruda, L. Q., Hohmann AG, Peng YB, Tachibana T (2000). "Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation." Science(289): 628-631.

Saito, N., Shirai, Y (2002). "Protein kinase Cgamma (PKCgamma): function of neuron specific isotype." J Biochem **132**: 683-687.

Salk, L., Lipsitt LP, Sturner WQ, Reilly BM, Levat RH (1985). "Relationship of maternal and perinatal conditions to eventual adolescent suicide." Lancet(1): 624-627.

Santra, M., Liu, XS, Santra, S, Zhang, J, Zhang, RL, Zhang, ZG, Chopp, M (2006). "Ectopic expression of doublecortin protects adult rat progenitor cells and human glioma cells from severe oxygen and glucose deprivation." Neuroscience **142**(3): 739-52.

Sargeant, T., Day DJ., Mrkusich EM., Foo DF., Miller JH. (2007). "Mu opioid receptors are expressed on radial glia but not migrating neuroblasts in the late embryonic mouse brain." Brain Research **1175**: 28-38.

Schenk, V., De Vlioger M, Hamersma K, De Weerd J (1968). "Two rhombencephalic anencephalics: a clinico-pathological and electroencephalographic study." Brain (91): 497-506.

Scott, B. S., Bannister NJ, Isaac JTR (2007). "Synaptic strength at the thalamocortical input to layer IV neonatal barrel cortex is regulated by protein kinase C." Neuropharmacology **52**: 185-192.

Simons, S., van Dijk M, Anand KJS, Roofthoof D, van Lingen RA, Tibboel D (2003). "Do we still hurt newbornbabies? A prospective study of procedural pain and analgesia in neonates." Arch Pediatr Adolesc Med(157): 1058-1064.

Simons, S., van Dijk M, Roofthoof D, van Lingen RA, Tibboel, D. (2003). "Routine Morphine infusion in Preterm Newborns who received ventilatory support " J Am Med Assoc **290**: 2419-27.

Slater, R., Cantarella A, Gallella S, Fitzgerald M (2006). "Cortical pain responses in human infants." J Neurosci **26**(14): 3662-3666.

Stefovska, V., Uckermann O, Czuczwar M, Smitka M, Czuczwar P, Kis J, Kaindl AM, Turski L, Turski W, Ikonomidou C (2008). "Sedative and Anticonvulsant Drugs Suppress Postnatal Neurogenesis." Ann Neurol **64**: 434-445.

Sternberg, W. F., Scorr L., Smith, L.D., Ridgway, C.G., Stout, M. (2005). "Long-term effects of neonatal surgery on adulthood pain behavior." Pain **113**(3): 347-353.

Sweitzer, S. M., SME Wong, MC Peters, D Mochly-Rosen, DC Yeomans, JJ Kendig (2004). "Protein Kinase C epsilon and gamma: Involvement in formalin-induced Nociception in Neonatal rats." J Pharmacol Exp Ther **309**: 616-625.

Taddio, A., Goldbach, M., Ipp, M., Stevens, B., Koren, G. (1994). "Effects of neonatal circumcision on pain responses during vaccination in boys." Lancet **344**: 291-292.

Tanaka, T., Serneo F. F., Tseng H. C., Kulkarni A. B., Tsai L. H., Gleeson J. G. (2004). "Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration." Neuron **41**: 215-227.

Terada, M., Naoko, Kuzumaki, Nana, Hareyama, Satoshi Imai, Keiich Niikura, Michiko Narita, Mitsuaki Yamazak, Tsutomu Suzuki, Minoru Narita (2008). "Suppression of enriched environment-induced neurogenesis in a rodent model of neuropathic pain." Neurosci. Lett. **440**: 314-318.

Uhl, G. R., Sora, I., Wang, Z. (1999). "The mu receptor as a candidate gene for pain: polymorphism, variations in expression, nociception, and opiate response." Proc Natl Acad Sci USA **96**(14): 7752-5.

Way, K., Chou, E., King, G.L. (2000). "Identification of PKC isoform-specific biological actions using pharmacological approaches." Trends Pharmacol Sci **21**: 181-187.

Whitfield, M., Grunau RE (2000). "Behavior, pain perception, and the extremely low-birth weight survivor." Clin Perinatol(27): 363-379.

Wolf, A. (1999). "Pain, perception and the developing infant." Paediatr Anaesth(9): 7-17.

Wood, N. S., Marlow, Neil, Costeloe, Kate, Gibson, Alan T., Wilkinson, Andrew R., The EPICure Study Group (2000). "Neurologic and Developmental Disability after Extremely Preterm Birth." N Engl J Med **343**(6): 378-384.

Wyllie, A. H. K., J. F. und Currie, A. R. (1980). "Cell death: the significance of apoptosis." Int Rev Cytol **68**: 251-306.

Yaksh, T. L., Noueihed, R. (1985). "The physiology and pharmacology of spinal opiates." Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.(25): 433-462.



Zhang G.H., S., S.M. (2007). "Neonatal morphine enhances nociception and decreases analgesia in young rats." Brain Res(1199): 82-90.

Zhang J, Z. D., Xu M (2002). "c-fos regulates neuronal excitability and survival." Nature genetics **30**: 416-420.

Zhang L, L., S, Dent, G, Zhan, Y, Xing, G, Okimoto, D, Gordon, M.K., Post, R.M., Smith, M.A. (2001). "Maternal deprivation increases cell death in the infant rat brain." Brain Res Dev Brain Res **133**(1): 1-11.

## **ERKLÄRUNG**

„Ich, Lasse Dührsen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Schmerzreize als Auslöser von Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn der Ratte“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **CURRICULUM VITAE**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **PUBLIKATIONSLISTE**

Dührsen L, Simons S, Genz K, Dzierko M, Boos V, Altmann R, Sifringer M, Felderhoff Mueser U (2007): Schmerzreize als Auslöser von Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn der Ratte (Vortrag auf der 33. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Neonatologie und pädiatrische Intensivmedizin in Hamburg im Mai 2007)

Dührsen L, Simons S, Dzierko M, Genz K, Boos V, Sifringer M, Tibboel D, Felderhoff-Mueser U (2010): Effects of repetitive pain and morphine exposure on neonatal brain development (Artikel, eingereicht)