

Der Einfluss von systemisch verabreichtem
CRH (Corticotropin releasing hormone) auf Temperatur- und
Druckschmerzschwellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Christina Hotz
aus Werne

Gießen, 2007

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
des Klinikums der Justus-Liebig Universität Gießen
Leiter: Prof. Dr. Michael Kracht

Betreuer: Dr. med. Dr. rer. nat. R. Matejec

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher

2. Gutachter: PD Dr. med. M. Bräu

Tag der Disputation: 26.05.2008

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen.....	IV
1 Einleitung	1
1.1 CRH (Corticotropin releasing hormone).....	1
1.2 Mögliche analgetische Wirkungsmechanismen von CRH.....	2
1.2.1 Wirkung des CRH via Freisetzung von β -Endorphin?	2
1.2.2 Wirkung des CRH via Freisetzung von Cortisol?	2
1.2.3 Direkte periphere Wirkung von CRH?.....	3
1.2.4 Wirkung von peripher verabreichtem CRH im Zentralnervensystem?.....	4
1.3 Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen.....	4
1.3.1 Lücken im Konzept von Studien mit CRH am Menschen	4
1.3.2 Probleme beim Nachweis von authentischem β -Endorphin	6
1.3.3 Frage der Funktion von β -Lipotropin.....	7
1.3.4 Frage der Funktionen von Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α	7
1.3.5 Gezielter Einsatz von Tests zur Schmerzschwellenbestimmung	8
2 Aufgabenstellung.....	9
3 Material.....	10
3.1 Substanzen.....	10
3.1.1 Chemikalien	10
3.1.2 Antikörper	10
3.1.3 Proteine und Peptide.....	11
3.1.4 Pufferlösungen	11
3.2 Geräte und Materialien.....	11
3.2.1 Geräte	11
3.2.2 Materialien	12
3.3 Verwendete Medikamente.....	12
3.4 Verwendete Software	12
4 Methodik	13
4.1 Studiendesign	13
4.1.1 Gruppeneinteilung.....	13
4.1.2 Bestimmung der Schmerzschwellen	14
4.1.2.1 Bestimmung der Temperaturschmerzschwelle	14
4.1.2.2 Bestimmung der Druckschmerzschwelle	14
4.1.3 Probandenauswahl.....	15
4.1.4 Versuchsablauf.....	15
4.2 Untersuchungsschritte zur Bestimmung der Konzentrationen von β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31), ACTH, Cortisol, TNF- α und IL-1 β im Blutplasma der Probanden	17
4.3 Probengewinnung und Probenverarbeitung	18
4.3.1 Gewinnung und Verarbeitung der Proben bis zur Extraktion bzw. bis zur Bestimmung von IL-1 β , TNF- α , Cortisol, ACTH und β -Endorphin-IRM (Nichols®).....	18
4.3.2 Extraktion	18

4.4	Standardwerte	19
4.5	Radioimmunometrische Analysen	20
4.5.1	Fluid-Phase One-Site-Radioimmunoassay	21
4.5.1.1	Prinzip	21
4.5.1.2	Durchführung	22
4.5.1.3	Bestimmung des β -Lipotropin-immunoreaktiven Materials.....	23
4.5.1.4	Bestimmung des β -Endorphin immunoreaktiven Materials	23
4.5.2	Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassay.....	24
4.5.2.1	Prinzip	24
4.5.2.2	Durchführung des Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassay zur Bestimmung von β -Endorphin (1-31)	25
4.6	Auswertung der Radioimmunoassays	27
4.7	Bestimmung des Adrenocorticotropen Hormons, des Cortisols, des Tumornekrosefaktors- α , des Interleukins-1 β und des β -Endorphins-IRM (Nichols®)	31
4.7.1	Bestimmung des Adrenocorticotropen Hormons	31
4.7.2	Bestimmung des Cortisols.....	31
4.7.3	Bestimmung des Tumornekrosefaktors- α	31
4.7.4	Bestimmung des Interleukins-1 β	31
4.7.5	Bestimmung des β -Endorphin-IRM (Nichols®).....	31
4.8	Berechnung der Fläche unter der Plasmaspiegelkurve (AUC)	32
4.9	Statistische Auswertungsverfahren	32
4.9.1	Hodges-Lehmann-Schätzer	32
4.9.2	Rangkorrelation nach Spearman	34
5	Ergebnisse	35
5.1	Charakteristika der Probanden	35
5.2	β -Endorphin Radioimmunoassays	35
5.3	Konzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols im kardiovaskulären Kompartiment.....	38
5.3.1	Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Plasmakonzentrationen.....	38
5.3.2	Flächen unter den Plasmaspiegelkurven (AUC)	45
5.4	Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate	46
5.4.1	Korrelationen der Konzentrationen der POMC-Derivate untereinander	46
5.4.2	Korrelationen der Konzentrationen der POMC-Derivate mit der Konzentration des Cortisols.....	47
5.5	Einfluss von CRH und Naloxon auf die Temperatur- und Druckschmerzschwellen	48
5.6	Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate bzw. des Cortisols und den Temperatur- und Druckschmerzschwellen	51
5.6.1	Korrelationen der Konzentrationen der POMC-Derivate mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen	51
5.6.2	Korrelationen der Konzentration von Cortisol im Blutplasma mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen	51
5.7	Plasmakonzentrationen der Zytokine und Korrelationen der Zytokinkonzentrationen mit den Konzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols sowie mit den Schmerzschwellen	54

5.8	Veränderungen der Herzfrequenzen und Korrelationen zwischen den Herzfrequenzen und den Temperatur- und Druckschmerzschwellen	54
5.8.1	Korrelation der Herzfrequenz mit der Temperaturschmerzschwelle	56
5.8.2	Korrelation der Herzfrequenz mit der Druckschmerzschwelle.....	56
6	Diskussion	57
6.1	Diskussion zum Studienkonzept	57
6.1.1	Auswahl der Tageszeit	57
6.1.2	Auswahl der Medikamente.....	57
6.1.3	Auswahl der Messzeitpunkte	58
6.2	β -Endorphin-Radioimmunoassays	59
6.3	Konzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols im kardiovaskulären Kompartiment.....	59
6.3.1	Einfluss von CRH auf die Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols.....	59
6.3.2	Einfluss von Naloxon auf die Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols	60
6.4	Beziehungen zwischen den Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols	60
6.4.1	Korrelationen der Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate untereinander.....	60
6.4.2	Korrelationen der Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate mit der Konzentration des Cortisols.....	61
6.5	Einfluss von CRH und Naloxon auf die Temperatur- und Druckschmerzschwellen.....	61
6.5.1	Einfluss von CRH auf Temperatur- und Druckschmerzschwellen	61
6.5.2	Einfluss von Naloxon auf die Temperatur- und Druckschmerzschwellen.....	63
6.6	Korrelationen der Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate bzw. des Cortisols mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen	64
6.6.1	Korrelationen der Konzentrationen der POMC-Derivate im Blutplasma mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen.....	64
6.6.2	Korrelationen der Konzentration von Cortisol im Blutplasma mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen	65
6.7	Plasmakonzentrationen der Zytokine und Korrelationen der Zytokinkonzentrationen mit den Konzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols sowie mit den Schmerzschwellen	66
6.8	Veränderungen der Herzfrequenzen während der Versuche und Korrelationen der Herzfrequenz mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen.....	67
7	Zusammenfassung.....	68
8	Anhang	71
8.1	Häufigkeitsverteilung der gemessenen Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate, des Cortisols, des TNF- α und des IL-1 β sowie der Temperatur- und Druckschmerzschwellen.....	71
8.2	Hodges-Lehmann-Schätzer und 95 % Konfidenzintervall.....	75
8.3	Korrelationskoeffizienten nach Spearman	78
9	Literaturverzeichnis.....	82

Verzeichnis der verwendeten Symbole und Abkürzungen

Symbole

®	Eingetragenes Warenzeichen
%	Prozent
Σ	Summe

Einheiten

a	Jahre
°C	Grad Celsius
cpm	“counts per minute” (gemessene Zerfälle eines Radioisotops pro Minute)
g	Erdbeschleunigung ($9,81 \text{ m/s}^2$), Gramm
K	Kelvin
l	Liter
M	Molar (Stoffmengenkonzentration, entspricht mol/l)
m	Meter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
min	Minute
mol	Mol (entspricht einer Anzahl von $6,02295 \cdot 10^{23}$ Teilchen)
Pa	Pascal
rpm	“rounds per minute” (Umdrehungen pro Minute)

Aminosäuren

Ala	L-Alanin	Leu	L-Leucin
Arg	L-Arginin	Lys	L-Lysin
Asn	L-Asparagin	Met	L-Methionin
Glu	L-Glutaminsäure	Phe	L-Phenylalanin
Gly	L-Glycin	Ser	L-Serin
His	L-Histidin	Trp	L-Tryptophan
Ile	L-Isoleucin	Tyr	L-Tyrosin

Proteine und Peptide

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
β -Endorphin	β -Endorphin (1-31)
β -LPH	β -Lipotropin
β -MSH	β -Melanozyten-stimulierendes Hormon
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderalbumin)
CRH	Corticotropin releasing hormone
GARGG	Goat-Anti-Rabbit-Immunglobulin G
IgG	Immunglobulin G
IL-1 β	Interleukin-1 β
NK-1	Neurokinin-1
POMC	Proopiomelanocortin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

Variable und Konstanten

α	Signifikanzniveau
C	Konzentration
D_i	Differenzen der Rangplätze $x_i - y_i$
i	Laufindex von $i = 1$ bis n
K_D	Gleichgewichtskonstante
n	Stichprobenumfang, Anzahl der Ränge
P	Wahrscheinlichkeit
r	Korrelationskoeffizient
r_s	Rangkorrelations-Koeffizient von Spearman
$\hat{t}$	t-Verteilung
z	Zählrate, vom Gamma-Zähler gemessen (Einheit: cpm)
ϕ	Verschiebung zwischen zwei Häufigkeitsverteilungen
θ	Hodges-Lehmann-Schätzer

Weitere Abkürzungen

AUC	“area under the curve“ (Fläche unter der Kurve)
BMI	Body Mass Index (kg/m^2)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	Et alii (und andere)
HPA-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IRM	Immunoreaktives Material
i.v.	Intravenös
KG	Körpergewicht
NaCl	Natriumchlorid
NRS	“normal rabbit serum“ (Normales Kaninchenserum)
pH	Potentia hydrogenii (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration)
RIA	Radioimmunoassay
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 CRH (Corticotropin releasing hormone)

Das Corticotropin releasing hormone (CRH), erstmals 1981 von Vale et al. (1981) isoliert, ist ein 41-Aminosäure-Polypeptid, welches unter Stress, z.B. durch eine Schmerzbelastung aus dem Hypothalamus freigesetzt wird und die Hypophysen-Nebennierenrindenachse stimuliert (HPA-Achse) (Dunn and Berridge, 1990; Fisher, 1989; Habib et al., 2000; Lytras et al., 1984; Rivier et al., 1982b). CRH bindet an CRH-Rezeptoren corticotropher Zellen des Hypophysenvorderlappens (Wynn et al., 1983; Chen et al., 1993) und induziert Synthese und Freisetzung von Fragmenten des Proopiomelanocortins (POMC), wie Adrenocorticotropem Hormon (ACTH), β -Lipotropin (β -LPH) und β -Endorphin (Dunn and Berridge, 1990; Grossman et al., 1982; Guillemin et al., 1977; Holsboer, 1995; Lytras et al., 1984; McLoughlin et al., 1984; Orth et al., 1983; Rivier et al., 1982a, Vale et al., 1981; Wynn et al., 1983). Unter Ruhebedingungen wird CRH in zirkadianem Rhythmus sezerniert, mit Maximalwerten in den frühen Morgenstunden, was zur Freisetzung von ACTH und Cortisol in das kardiovaskuläre System im gleichen Rhythmus führt (Chrousos et al., 1998; Horrocks et al., 1990).

Experimentelle Studien haben gezeigt, dass gesunden Menschen unter akuten Stressbelastungen eine verminderte Schmerzsensibilität aufweisen (al'Absi and Rokke, 1991; al'Absi and Petersen, 2003; Amit and Galina, 1986; Janssen et al., 2001; Willer et al., 1981). Diese unter Stress beobachtete Analgesie wurde auf die analgetische Wirkung des aus der Hypophyse freigesetzten β -Endorphins zurückgeführt (Hargreaves et al., 1983).

Besteht nun ein kausaler Zusammenhang zwischen CRH-induzierter Freisetzung endogenen β -Endorphins und einer verminderten Schmerzsensibilität unter Stressbelastung? Verschiedene Studien, in denen intravenös CRH verabreicht und somit eine Stresssituation simuliert wurde, konnten, sowohl im Tiermodell als auch bei Menschen, eine analgetische Wirkung nachweisen (Ayesta and Nikolarakis, 1989; Hargreaves et al., 1987a, 1990; Kita et al., 1993; Poree et al., 1989; Wei et al., 1986). Der analgetische Effekt von CRH könnte z.B. über β -Endorphin oder andere Fragmente des POMC, über Cortisol oder direkt über CRH hervorgerufen werden. Im folgenden Abschnitt werden mögliche Wirkmechanismen von CRH diskutiert.

1.2 Mögliche analgetische Wirkungsmechanismen von CRH

1.2.1 Wirkung des CRH via Freisetzung von β -Endorphin?

β -Endorphin, das aus 31 Aminosäuren bestehende C-terminale Fragment von POMC, wurde vor etwa 30 Jahren isoliert und als Opioidpeptid identifiziert (Chrétien et al., 1976; Li et al., 1977). β -Endorphin bindet mit seinem N-Terminus (Tyr-Gly-Gly-Phe-Met) an Opioidrezeptoren (Lee and Smith, 1980). Auf diesen Informationen basiert die Vorstellung, dass β -Endorphin ein aus der Hypophyse in das kardiovaskuläre Kompartiment freigesetztes endogenes Analgetikum sei (Cohen et al., 1982; Dubois et al., 1981; Dunn and Berridge, 1990; Hargreaves et al., 1983; Hargreaves et al., 1986; Pickar et al., 1983).

Zweifel an der analgetischen Wirkung von β -Endorphin hypophysären Ursprungs kamen allerdings auf, als die intravenöse Gabe von β -Endorphin bei Patienten keinen analgetischen Effekt zeigte (Foley et al., 1979; Lacoumenta et al., 1987).

Nur wenige Studien zeigten nach intravenöser Applikation von CRH Anhaltspunkte für eine β -Endorphin-vermittelte analgetische Wirkung. Hargreaves et al. (1990) konnten am Tiermodell der Ratte eine CRH-induzierte Analgesie durch Hypophysektomie, Gabe der Opioidrezeptorantagonisten Naltrexon und Naloxon-Methyl-Bromid, passive Immunisierung mit Anti- β -Endorphin-Antiserum und Vorbehandlung mit Dexamethason aufheben. Hierbei wurden hohe Konzentrationen von CRH intravenös verabreicht (120 μ g/kg KG), so dass eine zentrale Wirkung nicht ausgeschlossen werden kann (Lariviere and Melzack, 2000) (siehe 1.2.5).

1.2.2 Wirkung des CRH via Freisetzung von Cortisol?

Cortisol und andere Glucocorticoide werden in der Nebennierenrinde synthetisiert, ihre Synthese und Freisetzung wird durch ACTH induziert. Im Gegenzug regulieren Glucocorticoide über eine negative Rückkopplung die Synthese und Freisetzung von POMC-Derivaten (Birnborg et al., 1983).

Es ist nicht auszuschließen, dass die analgetische Wirkung von CRH über Glucocorticoide vermittelt wird, da Glucocorticoide antiinflammatorische Eigenschaften haben, die zu Analgesie führen könnten (Cato und Wade, 1996). McLennan et al. (1982) wiesen auf die Bedeutung von Cortisol in der stressinduzierten Analgesie hin: stressinduzierte Analgesie konnte

durch Hypophysektomie aufgehoben werden und war durch Therapie mit Glucocorticoiden reversibel.

Des Weiteren wurden niedrige Cortisolkonzentrationen bei verschiedenen chronischen Schmerzsyndromen beschrieben (Heim et al., 1998, Morrison et al., 2000; Valdes et al., 1989). Lautenbacher et al. (1997) fanden hingegen keinen Einfluss der Cortisolkonzentration auf die Schmerzwahrnehmung und schlossen daraus, dass keine kausale Verbindung zwischen Stress-induzierter Analgesie und Stress-induzierter Freisetzung von Hypophysen-Achsen-Hormonen besteht.

1.2.3 Direkte periphere Wirkung von CRH?

Es gibt Hinweise auf eine direkte periphere antiinflammatorische und analgetische, via CRH-Rezeptoren vermittelte Wirkung von CRH. So wurden am Rattenmodell auch nach Hypophysektomie antiinflammatorische und analgetische Wirkungen von systemisch verabreichtem CRH beschrieben (Wei et al., 1986; Poree et al., 1989; Hargreaves et al., 1989), die durch Vorbehandlung mit α -helikalem CRH, einem CRH-Antagonisten, welcher an CRH-Rezeptoren bindet ohne eine Wirkung zu entfalten, gehemmt werden konnte (Poree et al., 1989). Hier war eine Antagonisierung der Wirkung von CRH durch Naloxon nicht möglich (Ayesta und Nikolarakis, 1989, Wei et al., 1986).

Eine analgetische Wirkung durch eine direkte Applikation von CRH in entzündetes Gewebe wurde beobachtet (Hargreaves et al., 1989; Schäfer et al., 1997; Schäfer et al., 2003), wobei Schäfer et al. eine CRH-getriggerte Freisetzung von Opioiden aus Immunzellen als Ursache dieser Analgesie betrachteten. Diese Opioide binden an Opioidrezeptoren afferenter peripherer sensorischen Neurone und hemmen so die Schmerzwahrnehmung (Schäfer et al., 1996 und 1997). Dieser Mechanismus erklärt aber nicht die CRH-induzierte Analgesie, die mit dem tail-flick-test (Ayesta and Nikolarakis, 1989) und dem hot-plate-test (Hargreaves et al., 1987a, 1990), zwei Tests auf Schmerzen ohne Bezug zu Entzündungsprozessen, gezeigt werden konnte.

1.2.4 Wirkung von peripher verabreichtem CRH im Zentralnervensystem?

Ein spezifischer Mechanismus für den Transport von CRH aus dem Zentralen Nervensystem (ZNS) in das Blut ist bereits bekannt (Martins et al., 1996). Umgekehrt kann ein Übertritt geringer Mengen von CRH aus dem Blut in das ZNS dabei nicht ausgeschlossen werden (Martins et al., 1996). So ist es möglich, dass peripher verabreichtes CRH die Blut-Hirn-Schranke überwindet und zentral analgetisch wirken könnte. Da bereits gezeigt werden konnte, dass intrakranielle CRH-Konzentrationen im Nanogrammbereich analgetisch wirken (Bianchi et al., 1991; Bianchi and Panerai, 1995; Kita et al., 1993), könnte bereits die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch einen kleinen Anteil des intravenös verabreichten CRH für eine zentrale analgetische Wirkung ausreichend sein. In den Studien am Tiermodell wurden intravenös sehr hohe CRH-Dosen (bis zu 100 µg/kg Körpergewicht) appliziert (Hargreaves et al., 1987a; Hargreaves et al., 1990; Kiang and Wei, 1987; Wei et al., 1986), so dass in diesen Studien eine zentrale Wirkung des CRH nicht ausgeschlossen werden kann.

1.3 Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen

1.3.1 Lücken im Konzept von Studien mit CRH am Menschen

In vielen Tierstudien wurde eine analgetische Wirkung von CRH belegt und verschiedene Wirkmechanismen diskutiert. Nur wenige Arbeitsgruppen haben die analgetische Wirkung von systemisch verabreichtem CRH auf den Menschen untersucht (Lautenbacher et al., 1999; Hargreaves et al., 1987a).

Lautenbacher et al. (1999) prüften den Einfluss von 100 µg intravenös verabreichtem CRH auf Temperaturschmerzschwellen gesunder Probanden, sowohl mit als auch ohne Vorbehandlung mit Dexamethason. Die Vorbehandlung mit Dexamethason hatte zum Ziel, Synthese und Freisetzung von POMC-Derivaten zu hemmen (Birnberg et al., 1983; Beaulieu et al., 1988), so dass eine Applikation von CRH zu keiner adäquaten Freisetzung von β -Endorphin führen konnte; auf diese Art sollte ein Hinweis auf eine direkte analgetische Wirkung von CRH bzw. auf eine über β -Endorphin und andere POMC-Derivate vermittelte analgetische Wirkung erhalten werden. Eine mögliche analgetische Wirkung von Dexamethason wurde in diesem Studienkonzept nicht berücksichtigt (siehe 1.2.2). Lautenbacher et al. konnten keinen analgeti-

schen Effekt von CRH nachweisen, obwohl die Konzentrationen von Cortisol und β -Endorphin im Blutplasma nach alleiniger Gabe von CRH deutlich anstiegen. Des Weiteren erfolgte die Auswertung der Studie von Lautenbacher et al. mit dem *t*-Test, der einerseits normalverteilte Messdaten voraussetzt, andererseits waren in der Studie von Lautenbacher et al. die interindividuellen Unterschiede der gemessenen Temperaturschmerzschwellen und damit der Standardabweichungen derart hoch, dass Änderungen eines Messparameters zwischen zwei benachbarten Abnahmezeitpunkten bei $n = 18$ Probanden vom *t*-Test nicht erkannt werden können. Es blieb also unklar, ob eine ungeeignete Statistik, eine inadäquate Schmerzschwellenmessung (welche nach Lautenbacher et al. zu ungenau ist, um kleine Änderungen der Schmerzschwellen zu erfassen), eine zu niedrige CRH-Dosis oder eine nicht vorhandene analgetische Wirkung von CRH beim Menschen zu den gefundenen Ergebnissen geführt haben.

In der Studie von Hargreaves et al. (1987a) wurden $1 \mu\text{g/kg}$ Körpergewicht (KG) CRH 60 Minuten nach Zahnextraktion intravenös appliziert. 90-120 Minuten später konnte eine analgetische Wirkung nachgewiesen werden. Die Halbwertszeit von β -Endorphin im Blutplasma (37°C) beträgt nach Foley et al., (1979) etwa 37 Minuten. Nach etwa zwei bis drei Halbwertszeiten ist die β -Endorphinkonzentration im Blutplasma somit sehr gering (siehe Hargreaves et al., 1987a). Es scheint also unwahrscheinlich, dass die Schmerzreduktion in der Studie von Hargreaves et al. durch systemisches β -Endorphin bedingt gewesen ist. Eine lokal analgetische Wirkung von CRH in entzündetem Gewebe (Schäfer et al., 1997) kann nicht ausgeschlossen werden, da nach Zahnextraktion von einer entzündlichen Komponente ausgegangen werden muss. Des Weiteren ist eine Zahnextraktion mit Stress verbunden, der die Freisetzung von endogenem CRH wahrscheinlich macht. Die analgetischen Effekte könnten auf einer Addition der Wirkungen von endogenem und exogenem CRH beruht haben. Ein Hinweis auf eine analgetische Wirkung von β -Endorphin beim Menschen könnte aus einer Studie von Hargreaves et al., 1987b, hervorgehen: Patienten, die 10 Minuten nach Zahnextraktion Dexamethason ($0,1 \text{ mg i.v.}$) erhalten haben, womit der postoperative Anstieg von β -Endorphin im Plasma unterdrückt wurde, gaben im Vergleich zur Placebogruppe stärkere Schmerzen an. Ursachen dafür könnten jedoch auch eine Hemmung der Freisetzung von endogenem CRH oder weiteren POMC-Derivaten außer β -Endorphin gewesen sein. Hargreaves et al. (1987a und 1987b) setzten in ihren Studien entweder CRH (Hargreaves et al., 1987a) oder Dexamethason (Hargreaves et al., 1987b) ein, um die Freisetzung von POMC-Derivaten aus der Hypophyse zu stimulieren bzw. zu hemmen. Bei einem Patienten wurden jedoch in

derselben Studie nie beide Medikamente verabreicht, jeder Proband wurde zufällig einer Gruppe (Dexamethason oder Placebo) zugeordnet; intraindividuelle Unterschiede in der Schmerzwahrnehmung, die beträchtlich sind (siehe Ergebnisteil) berücksichtigen die Studienkonzepte von Hargreaves et al. (1987b) nicht.

Die hier vorliegende Studie ist das erste Experiment an Menschen, in dem versucht wurde, die vermutete analgetische Wirkung von CRH (via β -Endorphin-Freisetzung) mit Naloxon zu antagonisieren. Es handelt sich um eine doppelt verblindete Längsschnittstudie mit einem cross-over design, bei der alle Probanden placebokontrolliert CRH, und anschließend, wiederum placebokontrolliert den Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon erhalten haben. Vorteil dieses Studiendesigns war, dass sich die Wirkungen von CRH und Naloxon auf die Schmerzschwellen an ein und demselben Probanden miteinander vergleichen ließen. Die Auswirkungen der intra- und interindividuellen Unterschiede der Schmerzwahrnehmung auf die Messergebnisse wurden somit minimiert.

1.3.2 Probleme beim Nachweis von authentischem β -Endorphin

Ein weiterer Grund für die widersprüchlichen Ergebnisse einer analgetischen Wirkung von β -Endorphin könnten die verwendeten Nachweisverfahren sein. Die in zahlreichen Studien verwendeten Nachweisverfahren (Hargreaves et al. 1987a, 1987b, Lautenbacher et al., 1999) erfassten nicht nur β -Endorphin (1-31), sondern auch dessen Derivate β -Endorphin (1-16), β -Endorphin (1-17), β -Endorphin (1-27) sowie deren N-acetylierte Derivate und β -LPH. In diesen Studien wurde also nicht nur authentisches β -Endorphin (β -Endorphin (1-31)), sondern auch β -Endorphin-immunoreaktives Material (IRM) bestimmt.

Harbach et al. entwickelten einen Two-Site-Assay für β -Endorphin (1-31) ohne jegliche Kreuzreaktivitäten mit anderen POMC-Derivaten (Harbach et al., 2000) und konnten zeigen, dass es sich bei dem in bisherigen Studien nachgewiesenen β -Endorphin-IRM nur zu einem geringen Anteil um β -Endorphin (1-31) handelt.

In der hier vorliegenden Studie wurden sowohl die Konzentrationen von β -Endorphin-IRM als auch diejenigen von authentischem β -Endorphin mit Hilfe des von Harbach et al. entwickelten Assays bestimmt.

1.3.3 Frage der Funktion von β -Lipotropin

Nach intravenöser Gabe von CRH werden aus der Hypophyse neben β -Endorphin auch weitere POMC-Derivate mit noch weitgehend unbekannter Funktion freigesetzt. Fraglich ist der Einfluss dieser Fragmente auf die Schmerzwahrnehmung. Insbesondere ist die Funktion von β -LPH, dem direkten Vorläufer von β -Endorphin, zu klären. Da β -LPH, im Gegensatz zu β -Endorphin, den an Opioidrezeptoren bindenden N-Terminus nicht in freier Form enthält, kann nicht von einer direkt analgetischen Wirkung des β -LPH ausgegangen werden; wohl aber könnte β -Endorphin in der Peripherie aus β -LPH abgespalten werden, so dass in der Peripherie β -Endorphin in ausreichend hoher Konzentration zur Verfügung stehen könnte. Studien zeigen, dass die Konzentrationen von β -LPH im kardiovaskulären System deutlich (etwa 3 bis 5 fach) höher sind als von authentischem β -Endorphin (Gibson et al., 1994; Matejec et al., 2006). Im Blut ist β -LPH sehr stabil; es wird nicht enzymatisch gespalten, sondern nur in der Niere abgebaut (Kuhn et al., 1984). Die Freisetzung von β -Endorphin aus β -LPH durch Spaltung in peripherem Gewebe könnte so die Konzentration von β -Endorphin im Gewebe und damit an Opioidrezeptoren im Gewebe erheblich erhöhen.

Um einen möglichen Einfluss des β -LPH auf die Schmerzwahrnehmung zu prüfen, wurde auch dessen Konzentration im Blutplasma in der hier vorliegenden Studie bestimmt.

1.3.4 Frage der Funktionen von Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α

Neben CRH stimulieren auch proinflammatorische Zytokine, wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) die HPA-Achse und führen so zur Freisetzung von POMC-Derivaten und Cortisol (Bernton et al., 1987; Fagarasan et al., 1989; Besedovsky et al., 1991). Sogar eine analgetische Wirkung von IL-1 β und TNF- α wurde beschrieben (Besedovsky and Del Ray, 1987; Sacerdote et al., 1992; Ricciardi-Castagnoli et al., 1990, Bianchi et al., 1991)

Um den Einfluss der Zytokine IL-1 β und TNF- α auf die Schmerzwahrnehmung zu untersuchen und um eine eventuelle Wirkung von CRH via IL-1 β oder TNF- α auf die Freisetzung von POMC-Derivaten und damit auf die Schmerzwahrnehmung zu erkennen, wurden auch die Konzentrationen der beiden Zytokine im Blutplasma in der hier vorliegenden Arbeit bestimmt und die Korrelationen mit den Schmerzschwellen und den Konzentrationen der POMC-Derivate berechnet.

1.3.5 Gezielter Einsatz von Tests zur Schmerzschwellenbestimmung

Die in den bisherigen Studien verwendeten Tests zur Bestimmung von Schmerzschwellen jeglicher Art variierten stark (Lariviere and Melzack, 2000). Besonders wichtig erscheint die Unterscheidung zwischen entzündungsauslösenden und nicht entzündungsauslösenden Tests, um zwischen einer analgetischen und einer antiinflammatorischen Wirkung von CRH differenzieren zu können. Die Bestimmung von Temperaturschmerzschwellen in Form von kurzen Temperaturreizen, vergleichbar dem "hot-plate-test", gelten als wenig bis nicht entzündungsauslösend (Lautenbacher et al., 1999; Lariviere and Melzack, 2000), auch die Induktion eines Druckschmerzes scheint nicht mit einer Entzündungsreaktion einherzugehen. Beide Schmerzmodelle sind demnach geeignet, um eine entzündungsunabhängige Wirkung von CRH zu untersuchen. Eine analgetische Wirkung von CRH in entzündetem Gewebe ist bereits untersucht und gezeigt worden (Schäfer et al. (1996, 1997)).

Studien haben gezeigt, dass verschiedene afferente Nervenfasern durch thermische, mechanische und chemische Reize unterschiedlich stimuliert werden (Meyer et al., 1991; Schmidt et al., 1995). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen die μ -Opioidrezeptoren fehlen (μ -Opioidrezeptormutanten), im Vergleich zum Wildtyp eine höhere Temperatursensibilität aufweisen (Matthes et al., 1996, 1998; Qiu et al., 2000). Im Gegensatz dazu wiesen μ -, δ -, und κ -Opioid-Rezeptor-defiziente Mäuse keine veränderte Druckschmerzsensibilität auf (Filliol et al., 2000; Fuchs et al., 1999; Simonin et al., 1998). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass über μ -Opioid-Rezeptoren die Temperaturschmerzsensibilität, nicht jedoch die Druckschmerzsensibilität reguliert wird.

Um die Möglichkeit einer Opioid- (via μ -Rezeptor) und somit β -Endorphin-vermittelten Analgesie von CHR zu prüfen, wurden deshalb in der hier vorliegenden Studie Veränderungen von Schmerzschwellen mit Hilfe zwei verschiedener nicht entzündungsauslösender Schmerzmodelle bestimmt: Temperaturschmerz, der scheinbar über Opioidrezeptoren beeinflusst wird, sowie Druckschmerz, der offenbar nicht über Opioidrezeptoren beeinflussbar ist.

2 Aufgabenstellung

Unter Stress, z.B. bei einer Schmerzbelastung, induziert CRH die Freisetzung von β -LPH und β -Endorphin aus der Hypophyse in den Blutkreislauf. β -Endorphin wurde kurz nach seiner Isolation als endogenes Opioidpeptid identifiziert, das mit seinem N-Terminus an Opioidrezeptoren bindet. Die unter Stress zu beobachtende Analgesie wurde deshalb auf die analgetische Wirkung des freigesetzten β -Endorphins zurückgeführt. In späteren Studien wurde in der Tat eine analgetische Wirkung von CRH nachgewiesen und wiederum auf die Freisetzung von β -Endorphin zurückgeführt. Zweifel an der analgetischen Wirkung kamen auf, als intravenös zugeführtes β -Endorphin keinen analgetischen Effekt zeigte. Weitere Studien lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Damit erscheint auch der Wirkmechanismus von CRH wiederum unklar. Die hier vorliegende Studie wurde durchgeführt, da bisher in keinem Experiment am Menschen versucht wurde, die vermutete analgetische Wirkung von CRH (via β -Endorphin Freisetzung) mit Naloxon zu antagonisieren.

Hierzu sollte in einer kontrollierten, doppelblind randomisierten Studie mit cross-over design der Einfluss von i.v. verabreichtem CRH (100 μ g) bzw. Placebo gefolgt von Naloxon (1,2 mg) bzw. Placebo auf das Temperatur- und Druckschmerzempfinden von 16 gesunden Probanden untersucht werden. Die Konzentrationen der POMC-Derivate β -LPH, β -Endorphin und ACTH und des Cortisols im Blutplasma sowie die Temperatur- und Druckschmerzschwellen sollten vor sowie 15 und 30 Minuten nach Gabe von CRH (oder Placebo) und fünf Minuten nach Gabe von Naloxon (oder Placebo) gemessen werden. Zusätzlich sollten jeweils die Konzentrationen von Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) bestimmt werden. Die Veränderungen der Temperatur- und Druckschmerzschwellen sowie der Konzentrationen der untersuchten Peptide bzw. Proteine im Blutplasma nach CRH- und Naloxon-Gabe sollten bestimmt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, inwieweit die Konzentrationen der untersuchten POMC-Derivate, des Cortisols, des TNF- α und des IL-1 β mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen korrelieren, um Informationen über den Einfluss der untersuchten Peptide bzw. Proteine auf die Schmerzempfindung zu erhalten.

3 Material

3.1 Substanzen

3.1.1 Chemikalien

Aktivkohle	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Gelatine	Merck, Darmstadt
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Methanol	Baker, Deventer
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Normal Rabbit Serum	Peninsula, Heidelberg
1-Propanol	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Thiomersal	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg

3.1.2 Antikörper

Antikörper 3E7 (monoklonal)	Gramsch Laboratories, Dachau
Antiserum 84E (polyklonal)	Arbeitsgruppe Teschemacher, JLU Gießen
Antiserum 93E (polyklonal)	Arbeitsgruppe Teschemacher, JLU Gießen
Antiserum 11P (polyklonal)	Arbeitsgruppe Teschemacher, JLU Gießen
Goat-Anti-Rabbit-Immunglobulin G	Peninsula, Heidelberg
Maus-IgG	Peninsula, Heidelberg

3.1.3 Proteine und Peptide

β-Endorphin (1-31), human	Peninsula, Heidelberg
β-Lipotropin, human	Dr. Parlow, NHPP, Torrance, CA, USA
β-Melanozyten-stimulierendes Hormon	Saxon Biochemicals, Hannover
Rinderserumalbumin	Sigma, München
Thyreoglobulin, porcine	Serva, Heidelberg

3.1.4 Pufferlösungen

Natriumphosphatpuffer:	0,02 M Natriumdihydrogenphosphat 0,02 M Dinatriumhydrogenphosphat eingestellt auf pH 7,4
Puffer-C:	Zusammensetzung: 0,02 M Natriumphosphatpuffer 0,15 M Natriumchlorid 0,1 % ¹ Gelatine 0,01% ¹ Rinderserumalbumin 0,01% ¹ Thiomersal eingestellt auf pH 7,4
Puffer-D:	Puffer-C + 0,1 % ² Triton X-100

3.2 Geräte und Materialien

3.2.1 Geräte

Druckschmerzschwellenmessgerät	Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie (Entwurf und Anfertigung: R. Matejec)
Gamma-Zähler	1282 Compugamma CS, LKB Wallac, Turku, Finnland
EKG-Monitor	Sirecust 311, Siemens, München
Eppendorf-Zentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Sorvall, RC 5B, 5C Rotoren: SM-24, SS-34	Du Pont Company, Newtown, Connecticut, USA
Kühlzentrifuge (mobil)	Leybold Heraeus, Köln
Lyophilisator	Leybold Heraeus, Köln
Magnetrührer	Jahnke und Kunkel, Staufen

¹ Gewichtsprozent

² Volumenprozent

Speed Vac Concentrator SVC-100 H
Gerät zur Bestimmung der
Temperaturschmerzschwelle
Tischrüttler

Savant, New York, USA
Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie
(Entwurf: R. Matejec; Anfertigung: Ch. Zimmermann)
Heidolph, Kelheim

3.2.2 Materialien

Einmalspritzen, Kanülen, etc.
Glasmaterialien (Bechergläser etc.)
Multipette
Pipetten (verstellbar, 10 µl bis 5 ml)
Pipettenspitzen
Reaktionsgefäße Nr. 2810 (1,5 ml)
Reaktionsröhrchen aus Polypropylen
Reaktionsröhrchen aus Polystyrol
Sep-Pak C₁₈-Cartidges (Classic)

Braun, Melsungen
Schott, Mainz
Eppendorf, Hamburg
Abimed, Langenfeld
Eppendorf, Hamburg
Eppendorf, Hamburg
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Waters, Milford, USA

3.3 Verwendete Medikamente

CRH (Corticotropin releasing hormone)
Naloxon
NaCl (0,9 %)

CRH Ferring[®], 100 µg,
Ferring Arzneimittel GmbH, Kiel
Naloxon-ratiopharm[®], 0,4 mg Injektionslösung,
ratiopharm GmbH, Ulm
Braun, Melsungen

3.4 Verwendete Software

Excel, Version 2002
Origin, Version 3,5
Word, Version 2002

Microsoft[®]
Microcal[®]
Microsoft[®]

4 Methodik

4.1 Studiendesign

4.1.1 Gruppeneinteilung

In der hier vorliegenden prospektiven Studie wurde untersucht, inwieweit ein Zusammenhang zwischen dem Schmerzempfinden und den Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate β -Endorphin (1-31), β -Endorphin-IRM, β -Lipotropin (β -LPH)-IRM, Cortisol, IL-1 β und TNF- α besteht.

Hierzu wurde bei 16 gesunden Probanden doppelblind randomisiert die Hypophyse entweder mit 100 μ g CRH (Corticotropin releasing hormone) i.v. als Verum zur Freisetzung der POMC-Derivate stimuliert, oder es wurde ein Placebo (physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)) verabreicht. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde, ebenfalls doppelblind randomisiert, entweder 1,2 mg Naloxon als Verum oder wiederum physiologische Kochsalzlösung als Placebo i.v. appliziert.

Bei allen Probanden wurden zwei Typen der Schmerzempfindung untersucht: Druckperzeption und Temperaturperzeption. Dabei diente die Höhe der jeweiligen Schmerzschwelle als Maß für das Schmerzempfinden der Probanden.

Jeder Proband wurde insgesamt an vier verschiedenen Studienterminen jeweils einmal doppelblind randomisiert einer Gruppe zugeordnet und untersucht.

Gruppe I: intravenöse Gabe von 100 μ g CRH
 intravenöse Gabe von 1,2 mg Naloxon

Gruppe II: intravenöse Gabe vom 100 μ g CRH
 intravenöse Gabe von NaCl 0,9 %

Gruppe III: intravenöse Gabe von NaCl 0,9 %
 intravenöse Gabe von 1,2 mg Naloxon

Gruppe IV: intravenöse Gabe von NaCl 0,9 %
 intravenöse Gabe von NaCl 0,9 %

Zwischen den Versuchsterminen lagen mindestens fünf Tage. Die Versuche begannen jeweils zwischen 14:00 Uhr und 19:00 Uhr und dauerten etwa 90 Minuten.

4.1.2 Bestimmung der Schmerzschwellen

Die Schmerzschwelle wurde definiert als Übergang eines unangenehmen Gefühls in Schmerzen. Besonderer Wert wurde auf die intraindividuelle Reproduzierbarkeit der Schmerzschwellen der Probanden bei allen vier Studienterminen gelegt. Ein interindividueller Vergleich der Schmerzschwellen war nicht Ziel dieser Studie.

4.1.2.1 Bestimmung der Temperaturschmerzschwelle

Mit Hilfe einer am ventralen Unterarm befestigten, sich kontinuierlich erwärmenden Metallplatte (2,5 cm*2,5 cm) wurde die Temperaturschmerzschwelle eines jeden Probanden bestimmt. Zunächst wurde die Anfangstemperatur der Metallplatte über einen Regelkreis konstant bei 311,15 K (38,0°C) gehalten; die Bestimmung der Temperaturschmerzschwelle begann indem sich die Temperatur der Metallplatte etwa um 0,25 K pro Sekunde erhöhte. Sobald die Schmerzschwelle des Probanden erreicht war, stoppte er die Erwärmung der Metallplatte durch Knopfdruck, worauf die Platte sofort abkühlte. Das Temperaturmaximum wurde digital mit einer Genauigkeit von 0,05 K angezeigt und abgespeichert. Sowie der Schmerz abgeklungen war wurde die Messung wiederholt. Von insgesamt drei Messungen wurde der Mittelwert gebildet, dieser wurde als Temperaturschmerzschwelle definiert.

4.1.2.2 Bestimmung der Druckschmerzschwelle

Die Druckschmerzschwelle eines jeden Probanden wurde mit Hilfe einer am Oberarm angebrachten Blutdruckmanschette bestimmt, deren Druck sich per Knopfdruck kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von etwa 1 kPa pro Sekunde erhöhte. Bei Erreichen der Schmerzschwelle stoppte der Proband durch Knopfdruck die Druckerhöhung, der in der Manschette herrschende Druck wurde digital gemessen und abgespeichert, daraufhin entleerte sich die Manschette sofort. Der maximale Druck, den das Gerät aufbauen konnte lag bei 56 kPa (420 mmHg). Eine neue Messung wurde nach Abklingen der Schmerzen gestartet. Insgesamt fanden pro Messdurchgang fünf Messungen statt. Zur Bestimmung der Druckschmerzschwelle wurde aus den fünf Messungen der Mittelwert gebildet.

4.1.3 Probandenauswahl

Je acht männliche und weibliche Probanden im Alter zwischen 22 und 40 Jahren meldeten sich auf Aushänge im Universitätsklinikum Gießen zur Teilnahme an dieser Studie. Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme waren akute oder chronische Erkrankungen, akute oder chronische Schmerzsyndrome, die Einnahme von Medikamenten in der Woche vor und während der Studie sowie eine bestehende Schwangerschaft oder Stillzeit. Alle Probanden wurden über Inhalt und Verlauf der Studie informiert und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme. Die Studie war von der Ethikkommission des Universitätsklinikums Gießen genehmigt (Aktenzeichen 64/02).

4.1.4 Versuchsablauf

Der Versuchsablauf ist in Abbildung 4.2.4-1 schematisch dargestellt:

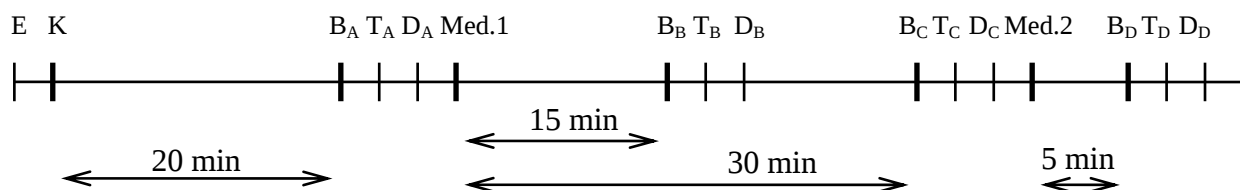


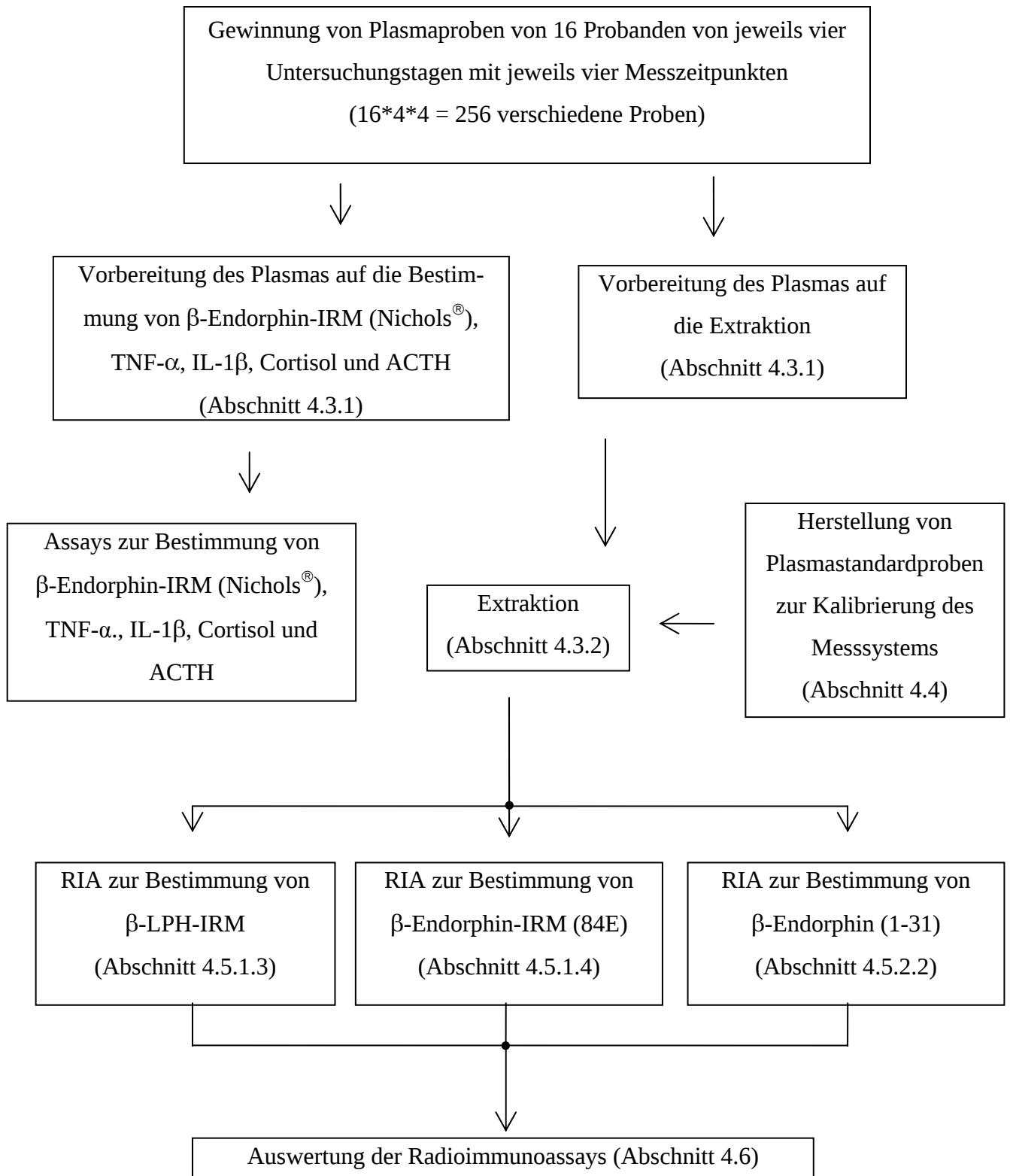
Abb. 4.2.4-1: Schema des Versuchsablaufs

E: Eintreffen des Probanden im Versuchsraum; **K:** Legen der Venenverweil-kanüle (Versuchsbeginn); **B_A-B_D:** Blutentnahmen zu den Zeitpunkten A bis D; **T_A-T_D:** Bestimmung der Temperaturschmerzschwelle zu den Zeit-punkten A bis D; **D_A-D_D:** Bestimmung der Druckschmerzschwelle zu den Zeitpunkten A bis D; **Med. 1:** Stimulation der Hypophyse (mit CRH) oder Verabreichung eines Placebos (NaCl 0,9%); **Med. 2:** Verabreichung von Naloxon oder Placebo (NaCl 0,9 %)

Nach Eintreffen des Probanden im Versuchsraum (E) wurde dieser aufgefordert, sich entspannt auf eine Liege mit erhöhtem Kopfteil zu legen. Es wurden drei EKG-Elektroden zur Kontrolle der Herzfrequenz und die Apparaturen zur Schmerzschwellenbestimmung angebracht. Die Blutdruckmanschette zur Bestimmung der Druckschmerzschwelle wurde am Oberarm und die Metallplatte zur Bestimmung der Temperaturschmerzschwelle am Unterarm derselben Seiten befestigt. In die V. cephalica oder die V. basilica der Ellenbeuge des anderen

Arms wurde nun zur Gabe der Medikamente sowie zur Blutentnahme eine Venenverweilkannüle (1,3 x 4,5 mm) gelegt (K). Nach einer Ruhephase von 20 Minuten erfolgte die erste Blutentnahme von 30 ml (B_A). Sofort im Anschluss wurden dreimal in Folge die Temperaturschmerzschwellen (T_A) und fünfmal in Folge die Druckschmerzschwellen (D_A) bestimmt. Für die Auswertung wurden jeweils die Mittelwerte berechnet. Nach Beenden dieses ersten Messdurchgangs wurde doppelblind CRH oder physiologische Kochsalzlösung verabreicht (Med. 1). Jeweils 15 und 30 Minuten nach Gabe von CRH bzw. physiologischer Kochsalzlösung folgten ein zweiter und ein dritter Messdurchgang, d.h. Blutabnahme, Bestimmung der Temperatur- und der Druckschmerzschwellen. Im Anschluss an den dritten Messdurchgang wurde, wiederum doppelblind randomisiert, Naloxon oder physiologische Kochsalzlösung gegeben (Med. 2). Nach fünf Minuten erfolgte der vierte und letzte Messdurchgang. Während des gesamten Messzeitraumes wurde die Herzfrequenz über die EKG-Ableitungen bestimmt.

4.2 Untersuchungsschritte zur Bestimmung der Konzentrationen von β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31), ACTH, Cortisol, TNF- α und IL-1 β im Blutplasma der Probanden



4.3 Probengewinnung und Probenverarbeitung

4.3.1 Gewinnung und Verarbeitung der Proben bis zur Extraktion bzw. bis zur Bestimmung von IL-1 β , TNF- α , Cortisol, ACTH und β -Endorphin-IRM (Nichols[®])

Jeweils 30 ml Blut wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten abgenommen. Das Blut wurde unverzüglich bei 4°C gekühlt und mit Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) vermischt (150 μ l EDTA/10 ml Blut) und sofort bei 4°C für 15 Minuten mit 1000g zentrifugiert. Anschließend wurde das Plasma abpipettiert.

Zur späteren Bestimmung von ACTH, Cortisol, TNF- α , IL-1 β und β -Endorphin-IRM (Nichols[®]) wurde je 1 ml des Plasmas in vier vorgekühlte Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und bei -80°C eingefroren.

Für die Messungen der übrigen POMC-Derivate wurden 10 ml des Plasmas in vorgekühlte Probenröhrchen pipettiert und mit 1 ml 1N-Salzsäure angesäuert, um den enzymatischen Abbau der POMC-Derivate zu verhindern und um die Proben auf die Extraktion (s. u.) vorzubereiten. Diese Proben wurden bis zur Extraktion bei -20°C gelagert.

4.3.2 Extraktion

Die Plasmaproben der Probanden und die Standardproben (s. u.) wurden vor der radioimmunometrischen Bestimmung der POMC-Derivate (s. u.) mit Hilfe eines Octadecasilyl-Silica-Kartuschen-Extraktionsverfahrens über Sep-Pak C₁₈-Kartuschen (Waters, Milford, USA) vorgereinigt.

Die Extraktion von POMC-Derivate aus angesäuertem Plasma wurde von Wiedemann und Teschemacher (1986) beschrieben.

Die Extraktion fand bei einer Temperatur von 4°C statt, die verwendeten Lösungen waren auf 4°C gekühlt. Die Lösungen und die Plasmen wurden durch Unterdruck, welcher durch eine Wasserstrahlpumpe erzeugt wurde, mit einer Geschwindigkeit von ca. 1 ml pro Minute durch die Kartuschen gesaugt. Zunächst wurden die Kartuschen mit je 5 ml Methanol, 5 ml Harnstoff (8 M) und 10 ml bidestilliertem Wasser (Aqua bidest.) aktiviert. Das bei -20°C eingefrorene Plasma wurde auf ca. 4°C aufgetaut und 5 min bei 4°C und 10000g zentrifugiert, je 5 ml des Überstands wurden auf die Kartuschen aufgegeben. Die an die Kartuschen adsorbierten POMC-Derivate wurden nach zwei Waschvorgängen mit 10 ml bidestilliertem Wasser und

10 ml Essigsäure (4 %) durch je 10 ml Propanol-Essigsäure (96 %/4 % = V/V) eluiert und in Probenröhrchen gesammelt. In der Tabelle 4.3.2-1 sind die Schritte des Extraktionsvorgangs zusammengefasst.

Tab. 4.3.2-1: Schritte des Extraktionsvorgangs

<i>Phase:</i>	<i>Aufgeben von:</i>
1. Aktivieren	5 ml Methanol 5 ml Harnstoff (8M) 10 ml Aqua bidest.
2. Probenaufgabe	5 ml Plasma
3. Waschen	10 ml Aqua bidest. 10 ml Essigsäure (4%)
4. Elution	2*5 ml Propanol-Essigsäure (96 %/4 % = V/V)

Die Lösungsmittelbestandteile des Eluats wurden nun durch Vakuumzentrifugation im Speed-Vac-Concentrator bei ca. 18°C verdampft. Die verbleibenden Rückstände wurden in 500 µl bidestilliertem Wasser gelöst, bei -20°C eingefroren und nach ein bis zwei Tagen in einem Lyophilisator gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 500 µl Puffer-C gelöst. Vier Aliquots zu je 100 µl – bei der Beschreibung der Radioimmunoassays als „Probenextrakte“ bezeichnet - wurden bis zur radioimmunometrischen Analyse bei -20 °C gelagert.

4.4 Standardwerte

Zur Kalibrierung des Messsystems wurden Plasmaproben mit bekannten Konzentrationen der zu untersuchenden POMC-Derivate hergestellt.

Dazu wurden zunächst gesunden weiblichen und männlichen Spendern je 120 ml Blut entnommen. Das Blut wurde in auf 4°C gekühlte EDTA-Röhrchen gegeben (250 µl EDTA/20 ml Blut) und anschließend 15 min bei 4 °C mit 1000g zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und nochmals 5 min bei 4°C mit 10000g zentrifugiert.

Aus dem Überstand wurden POMC-Derivate, sofern sie vorhanden waren, mittels „Filtration“³ entfernt. Die Filtration erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die Extraktion (s. o.). Die Kartuschen wurden aktiviert und 5 ml Plasma wurden durch jede Kartusche gesaugt (siehe Tabelle 4.3.2-1). Das damit gewonnene Filtrat wurde im Gegensatz zur Extraktion jedoch

³ die Bezeichnung „Filtration“ trifft nicht exakt auf die dargestellte Technik zu, wird jedoch hier im Hinblick auf die Verwendung in bereits publizierten Arbeiten beibehalten

nicht verworfen, sondern in Reaktionsröhrchen aufgefangen und auf Aliquots zu je 5 ml verteilt.

Sieben dieser Aliquots wurden mit verschiedenen Mengen des zu untersuchenden Peptids versehen, so dass folgende Konzentrationen vorlagen: 1000 pmol/l, 100 pmol/l, 33 pmol/l, 10 pmol/l, 3,3 pmol/l, 1 pmol/l und 0,3 pmol/l. Die restlichen Aliquots dienten als Leerwerte.

Sowohl Standardproben als auch Leerproben wurden mit 500 µl 1 N HCl pro Ansatz versehen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

In den nachfolgenden Arbeitsschritten wurden die Leer- und Standardproben wie die Plasmaproben der Probanden behandelt, es folgten also die Extraktion und die Einschleusung der sog. „Leerextrakte“ und „Standardextrakte“ in die radioimmunometrische Analyse.

4.5 Radioimmunometrische Analysen

Für die Bestimmung von β -Endorphin-IRM (mit Hilfe des Antiserums 84E) und β -LPH-IRM (mit Hilfe des Antiserums 93E) wurden Fluid-Phase One-Site-Radioimmunoassays durchgeführt. Die Konzentrationen von β -Endorphin (1-31) wurde mit einem Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassays (mit Hilfe der Antiseren 11P und 3E7) bestimmt. Zusätzlich wurde die Konzentration von β -Endorphin-IRM mit einem käuflichen Radioimmunoassay der Firma Nichols[®] bestimmt.

4.5.1 Fluid-Phase One-Site-Radioimmunoassay

4.5.1.1 Prinzip

Eine konstante Menge eines radioaktiv markierten Peptids und die unbekannte Menge eines zu bestimmenden Peptids konkurrieren in einer Serie von Reaktionsgefäßen um die Bindungsstellen einer konstanten Antikörpermenge. Je höher die Konzentration des zu bestimmenden Peptids ist, desto weniger radioaktiv markiertes Peptid wird an die Antikörper gebunden. Nach Entfernung des nichtgebundenen markierten und nichtmarkierten Peptids kann von der Radioaktivität in der Probe auf die Konzentrationen des zu bestimmenden Peptids geschlossen werden.

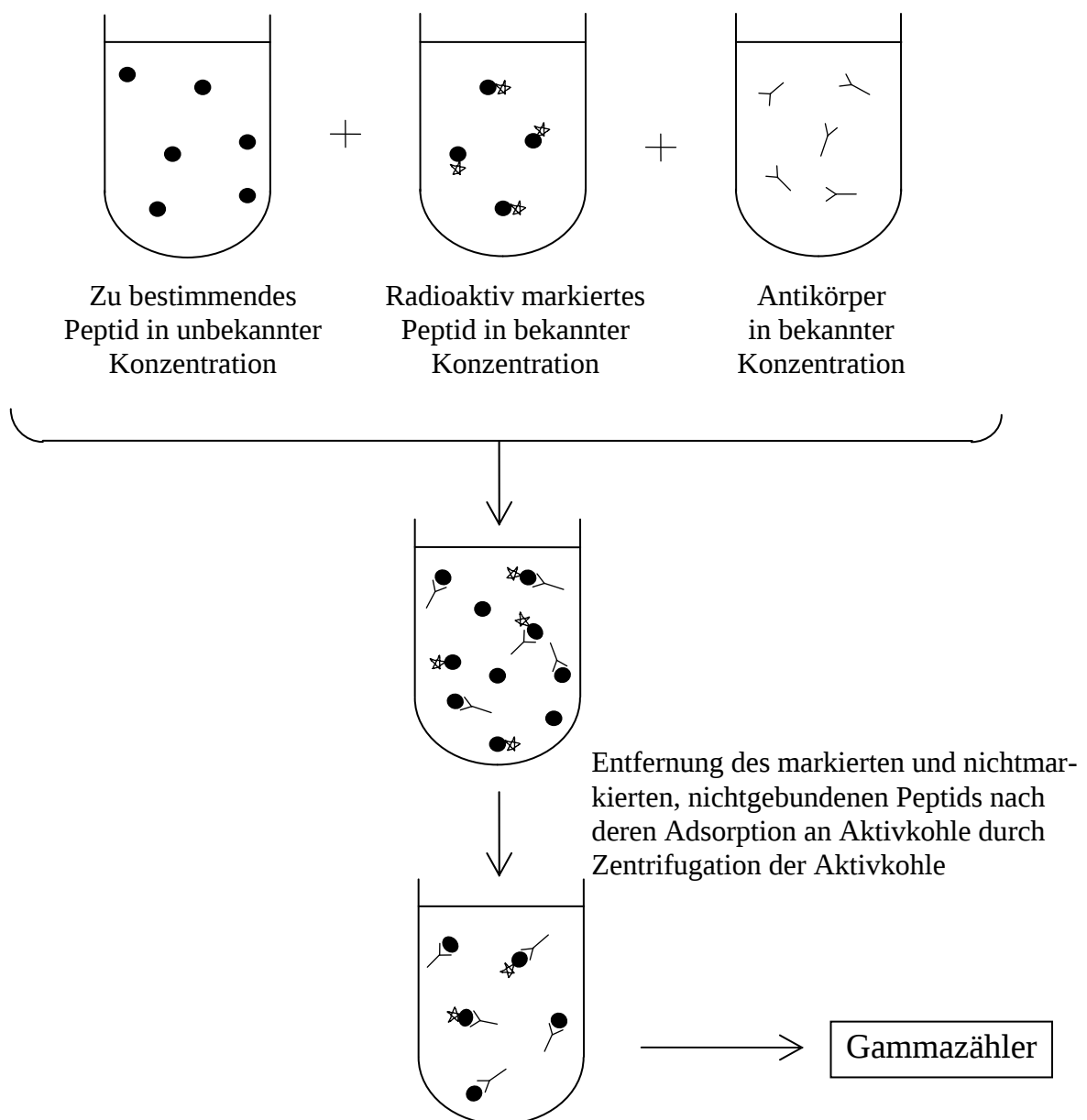


Abb. 4.5.1.1-1: Schematische Darstellung eines Fluid-Phase One-Site Radioimmunoassays

4.5.1.2 Durchführung

Die für den Fluid-Phase One-Site-Radioimmunoassay benötigten Inkubationsansätze sind im Folgenden beschrieben. Das Pipettierschema ist in der Tabelle 4.5.1.2-1 dargestellt.

Inkubationsansätze:

C_t -Wert: „Total counts“ (*sechs Inkubationsansätze*)

Dieser Wert dient der Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Inkubationsansatz.

B_l -Wert: „Blank-Wert“ bzw. „Leerwert“ (*zwei Inkubationsansätze*)

Der Leerwert dient der Bestimmung der Radioaktivität im Überstand, die nicht auf die Bindung an Komponenten des Antiserums zurückzuführen ist. Der Leerwert schließt den Geräte-leerwert des Gammazählers mit ein und wird von den übrigen Werten subtrahiert.

B_0 -Wert: „Nullstandard“ (*acht Inkubationsansätze*)

Der Nullstandard dient der Bestimmung derjenigen Menge an radioaktiv markiertem Peptid, die in Abwesenheit des zu bestimmenden Peptids an Antikörper gebunden werden kann.

Standardwerte: (*zwei Inkubationsansätze pro Standardwert*)

Die Plasmastandardwerte sind Plasmaproben mit vorgegebenen Peptidkonzentrationen, die der Kalibrierung des Messsystems dienen (siehe Abschnitt 4.4)

Probenwerte: (*zwei Inkubationsansätze pro Probenwert*)

Mit diesen Inkubationsansätzen wurden die Konzentrationen der POMC-Derivate in den Probenproben ermittelt.

Tab. 4.5.1.2-1: Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Fluid-Phase One-Site Radioimmunoassay (Angaben in μl)

	C_t	B_l	B_0	Standard- werte	Proben
Puffer-C (P-C)	500	100	50	50	50
Puffer-D (P-D)	20	20	20	20	20
Leerextrakt (in P-C)	-	100	100	-	-
Standardextrakt (in P-C)	-	-	-	100	-
Probenextrakt (in P-C)	-	-	-	-	100
Antiserum (in P-C)	-	-	50	50	50
Radioaktiv markiertes Peptid (in P-D)	20	20	20	20	20

Nach Herstellung der Inkubationsansätze wie in Tabelle 4.5.1.2-1 beschrieben, wurden diese 20 Sekunden geschüttelt und anschließend 20 Stunden bei 4 °C inkubiert.

Danach erfolgte die Trennung der ungebundenen Peptide von den an Antikörper gebundenen Peptiden. Dazu wurden allen Inkubationsansätzen, mit Ausnahme der C_I -Ansätze, 300 µl einer Kohlesuspension, bestehend aus Puffer-C mit 1 % Aktivkohle und 0,5 % BSA, zugesetzt. Die Inkubationsansätze wurden anschließend 20 Sekunden geschüttelt, 15 Minuten bei 4°C inkubiert und vier Minuten bei 8000 g zentrifugiert. 450 µl des Überstands wurden nun von allen Inkubationsansätzen, einschließlich der C_I -Ansätze, in Sarstedt-Reaktionsgefäße pipettiert. Die Radioaktivität der Inkubationsansätze wurde mit einem Gammazähler gemessen.

4.5.1.3 Bestimmung des β -Lipotropin-immunoreaktiven Materials

Zur Bestimmung des β -Lipotropin-IRM wurde ein Fluid-Phase One-Site-Radioimmunoassay eingesetzt (Matejec, 2002).

Das verwendete polyklonale Kaninchen-Antiserum (93E) enthält Antikörper, die lateral an β -LPH binden. Es wurde in einer Verdünnung von 1:1500 eingesetzt. Das Kaninchenantiserum 93E besitzt folgende Kreuzreaktivitäten: β -MSH (100 %), β -LPH (32,3 %). In den Standardproben diente β -LPH als Standardpeptid. Als radioaktiv markiertes Peptid wurde β -MSH eingesetzt.

4.5.1.4 Bestimmung des β -Endorphin immunoreaktiven Materials

Die Bestimmung des β -Endorphin-immunoreaktiven Materials erfolgte mit Hilfe eines von Kramer (1988) entwickelten Fluid-Phase One-Site-Radioimmunoassays.

Das polyklonale Kaninchen-Antiserum 84E wurde in einer Verdünnung von 1:10000 eingesetzt. Das Antiserum enthält Antikörper, die gegen die Aminosäuresequenz 17-26 (-LFKNAIIKNA-) des β -Endorphins gerichtet sind. Es bestehen Kreuzreaktivitäten mit allen Substanzen, die dieses Epitop besitzen, also mit β -Endorphin (1-31), β -Endorphin (1-26) und deren N-acetylierten Fragmenten sowie mit β -LPH. Als Standardpeptid und radioaktiv markiertes Peptid diente humanes β -Endorphin (1-31).

4.5.2 Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassay

4.5.2.1 Prinzip

Zwei verschiedene Antikörper von verschiedenen Spezies (Maus, Kaninchen) binden an C- und N-Terminus des zu bestimmenden Peptids und bilden einen so genannten Sandwich-Komplex (Antikörper-Peptid-Antikörper-Komplex). Aus diesem Grund werden nur komplette Peptide erkannt, und nicht etwa Fragmente dieses Peptids. Der zweite Antikörper ist radioaktiv markiert. Ein dritter Antikörper bindet an den ersten Antikörper und führt zur Präzipitation der Sandwich-Komplexe. Das Präzipitat wird abzentrifugiert, der Überstand wird abgesaugt und die Radioaktivität des Zentrifugats wird gemessen.

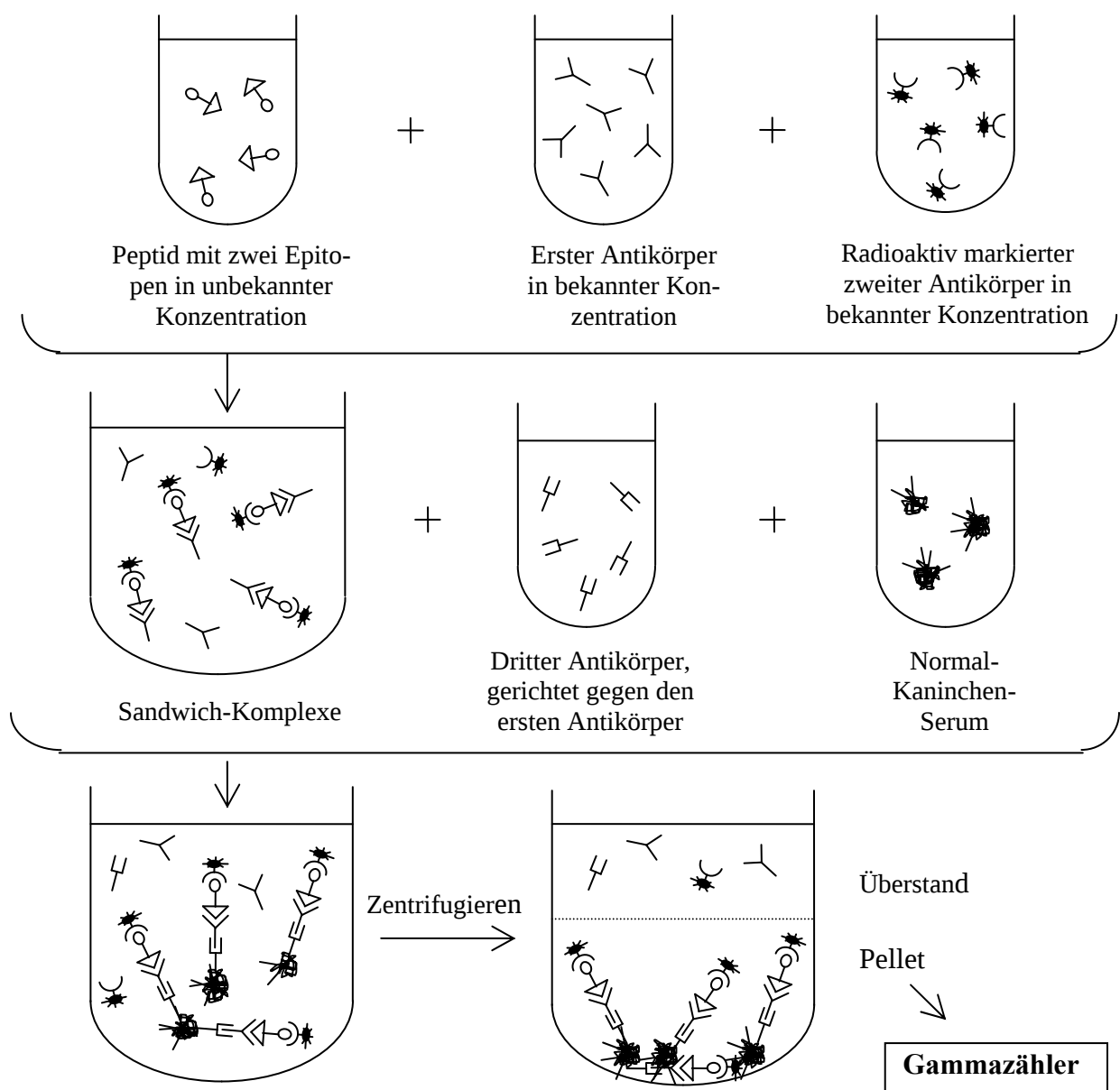


Abb. 4.5.2.1-1: Schematische Darstellung eines Fluid-Phase-Immunoprecipitation Two-Site-Radioimmunoassay

4.5.2.2 Durchführung des Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassay zur Bestimmung von β -Endorphin (1-31)

Der Fluid-Phase-Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassay zur Bestimmung der Konzentration von β -Endorphin (1-31) wurde von Hell (2000) und Harbach et al. (2000) entwickelt.

Der Assay setzt sich aus folgenden Inkubationsansätzen zusammen, das Pipettierschema ist in Tabelle 4.5.2.2-1 dargestellt.

Inkubationsansätze:

C_t -Wert: „Total counts“ (*zwei Inkubationsansätze*)

Dieser Wert dient der Bestimmung der Gesamtradioaktivität im Inkubationsansatz.

B_0 -Wert: „Nullstandard“ (*sechs Inkubationsansätze*)

Der Nullstandard dient der Bestimmung derjenigen Menge an radioaktiv markiertem Antikörper, die in Abwesenheit des nachzuweisenden Peptids präzipitierte. Der Nullstandard schließt den Geräteleerwert des Gammazählers ein.

Standardwerte: (*zwei Inkubationsansätze pro Standardwert*)

Die Standardwerte sind Plasmaproben mit vorgegebenen Peptidkonzentrationen, die der Kalibrierung des Messsystems dienen (siehe Abschnitt 4.2)

Probenwerte: (*zwei Inkubationsansätze pro Probenwert*)

Mit den Ansätzen der Probenwerte wurden die Konzentrationen der zu bestimmenden Peptide ermittelt.

Tab. 4.5.2.2-1: Zusammensetzung der Inkubationsansätze des Fluid-Phase Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassay zur Bestimmung der Konzentrationen von β -Endorphin (1-31) (Angaben in μ l)

	C_t	B_0	Standardwerte	Proben
Puffer-C (P-C)	-	50	50	50
Puffer-D (P-D)	20	20	20	20
Leerextrakt (in P-C)	-	100	-	-
Standardextrakt (in P-C)	-	-	100	-
Probenextrakt (in P-C)	-	-	-	100
1. Antikörper (11P) (in P-C)	-	50	50	50
Maus-IgG (in P-C)	-	10	10	10
Thyreoglobulin (in P-C)	-	20	20	20
2. Antikörper (3E7) (in P-D)	20	20	20	20

Die Antikörper eines polyklonalen Kaninchenantisera (11P), die gegen den C-Terminus des β -Endorphins (1-31) gerichtet waren, und ein ^{125}Jod -markierter monoklonaler Antikörper der Maus (3E7), gegen den N-Terminus des β -Endorphins (1-31) gerichtet, bildeten mit β -Endorphin (1-31) einen Sandwichkomplex. Die Jodierung des monoklonalen Antikörpers der Maus erfolgte nach einem von Hunter und Greenwood beschriebenen Verfahren (1962) mit Modifikationen (Harbach et al., 2000).

Das Antiserum des ersten Antikörpers (11P) und das Antiserum des dritten Antikörpers (Anti-Kaninchen-Immunglobulin) (s.u.) können Antikörper gegen das Fc-Fragment des zweiten, von der Maus stammenden Antikörpers (3E7) enthalten. Um eine Bindung dieser Antikörper mit dem Fc-Fragment des zweiten Antikörpers (3E7), und somit eine Präzipitation mit der Folge falsch positiver Werte zu vermeiden, wurden den Inkubationsansätzen Maus-IgG im Überschuss (0,5g/l in Puffer-C) zugefügt. Die möglicherweise störenden Antikörper gegen das Fc-Fragment des Antikörpers 3E7 konnten so gebunden werden.

Zur Herstellung des polyklonalen Antisera (11P) gegen den C-Terminus des β -Endorphins (1-31) wurde Thyreoglobulin als Trägermolekül für β -Endorphin (27-31) verwendet (Wiedemann und Teschemacher, 1986). Folglich enthielt das Antiserum 11P nicht nur Antikörper gegen β -Endorphin, sondern auch Antikörper gegen Thyreoglobulin. Da diese Antikörper das Messsystem stören, wurde jedem Ansatz Thyreoglobulin (0,5 g/l in Puffer-C) hinzugefügt, um diese Antikörper abzufangen.

Alle Inkubationsansätze wurden bei 4°C in Eppendorfgefäßen angesetzt, 20 Sekunden geschüttelt und 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden 100 μl des dritten Antikörpers, Anti-Kaninchen-IgG-AK (Goat-Anti-Rabbit-IgG, GARGG, 10 g/l, in Puffer-D), der gegen die C-terminalen Antikörper gerichtet war, den B_0 -Werten, den Standardwerten und den Proben hinzugefügt. Dann erfolgte die Zugabe von Normal-Kaninchenserum (NRS, 4 g/l, in Puffer-D) zu den Inkubationsansätzen der B_0 -Werte, der Standardwerte und der Proben. Anschließend wurden die Ansätze 15 Sekunden geschüttelt und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden je 500 μl Puffer-C den Inkubationsansätzen der B_0 -Werte, der Standardwerte und der Proben hinzugegeben. Die Ansätze wurden wieder 15 Sekunden geschüttelt und anschließend zehn Minuten bei 8000g zentrifugiert. Die präzipitierten Sandwich-Komplexe waren als Pellets sichtbar. Der Überstand wurde abgesaugt und die Radioaktivität in den Pellets wurde in einem Gammazähler gemessen.

4.6 Auswertung der Radioimmunoassays

Die Auswertung der Radioimmunoassays erfolgte mit Hilfe einer Standardkurve, die aus den Zählraten der Standardwerte konstruiert wurde. Dazu mussten die Zählraten zunächst in Bindungsprozente, d.h. in den Anteil des gebundenen radioaktiv markierten Peptids an der Gesamtmenge des radioaktiv markierten Peptids im Ansatz umgerechnet werden.

Die Umrechnung erfolgte nach folgenden Gleichungen (Fluid-Phase One-Site-Radioimmunoassays nach 4.6-1; Fluid-Phase Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassay nach 4.6-2):

$$B(z) = \frac{z - \overline{B}_I}{\overline{C}_I - \overline{B}_I} \cdot 100 \quad (4.6-1)$$

$$B(z) = \frac{z}{\overline{C}_I} \cdot 100 \quad (4.6-2)$$

Hierbei sind $B(z)$ die Bindungsprozente, z die Zählrate der Proben, Standardwerte oder B_0 -Werte, $\overline{C}_I$ das arithmetische Mittel der Zählraten der C_I -Werte und $\overline{B}_I$ das arithmetische Mittel der B_I -Werte.

Mit Hilfe des Computerprogramms Origin[®] (Version 3,5) wurde aus den bekannten Peptidkonzentrationen der Standardwerte und den zugehörigen Bindungsprozente eine Standardkurve konstruiert.

Aus den Zählraten der Proben wurden ebenfalls die Bindungsprozente errechnet. Mit Hilfe der Standardkurve konnten nun von den Bindungsprozente ausgehend die entsprechenden Peptidkonzentrationen an der Abszisse abgelesen werden.

Für die Fluid-Phase One-Site-Radioimmunoassays wurden jeweils zwei Standardreihen, für die Fluid-Phase Immunoprecipitation-Two-Site-Radioimmunoassays wurden drei Standardreihen hergestellt. Jede Plasmastandardreihe stammte aus dem Plasma nur eines Spenders. Für die Bestimmung der Konzentrationen in den Proben der Probanden wurden „Mittelwertstandardkurven“ errechnet. Diese sind in den Abbildungen 4.6-1 bis 4.6-6 dargestellt. Die Nachweisgrenze ist hier definiert als diejenige Konzentration von β -Endorphin (1-31), β -Endorphin-IRM bzw. β -LPH-IRM, die dem Schnittpunkt der Fitkurve mit der Parallelen zur Abszisse, die durch die Standardabweichung der Nullstandards ($B_0 - s$) bestimmt ist, zugeordnet ist.

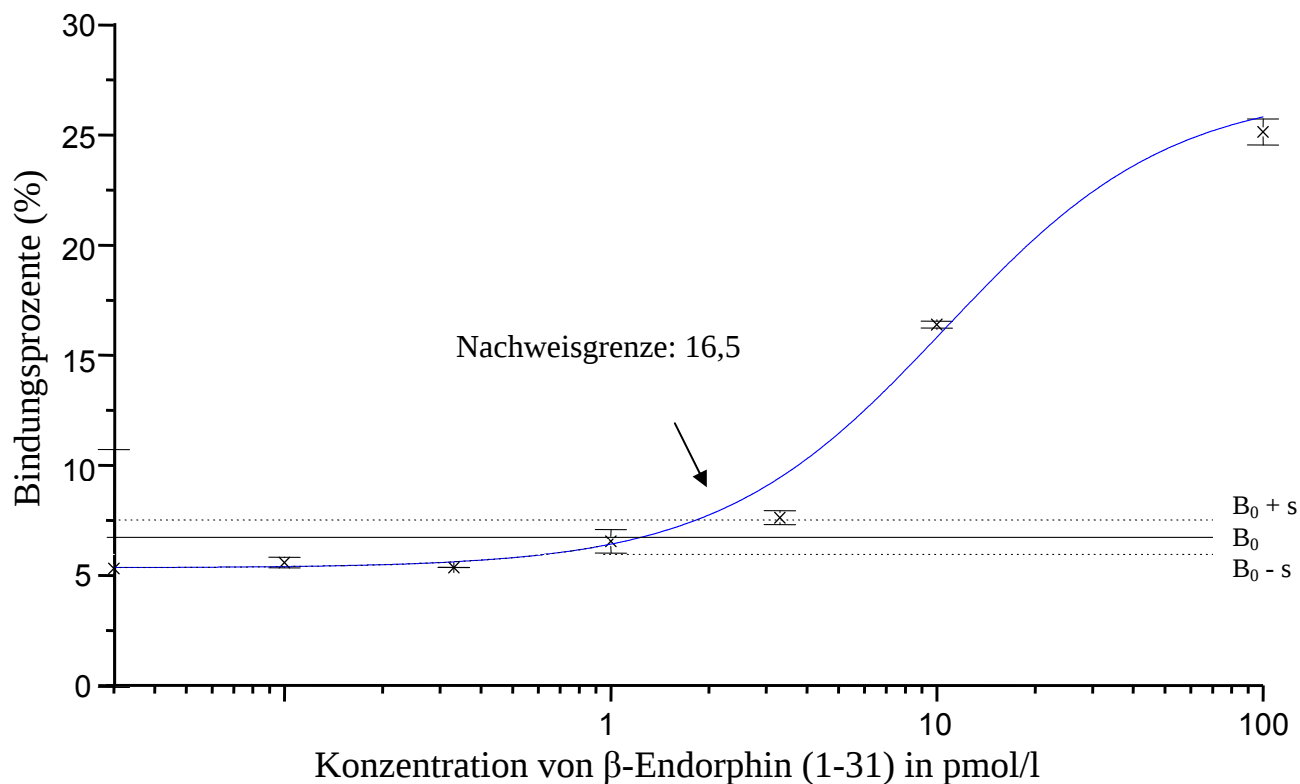


Abb. 4.6-1: Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration des β -Endorphins (1-31) im Plasma der Probanden 1-8

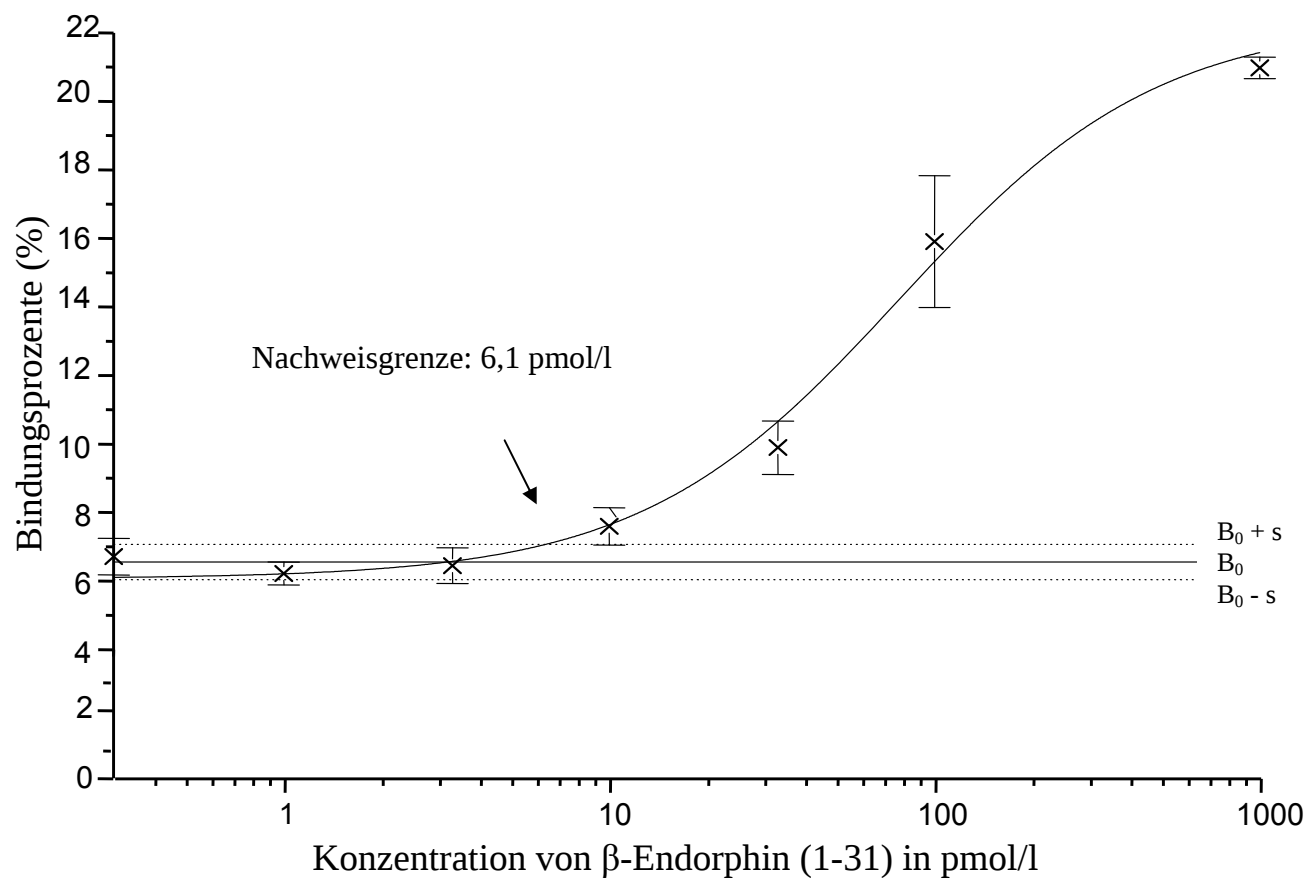


Abb. 4.6-2: Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration des β -Endorphins (1-31) im Plasma der Probanden 9-16

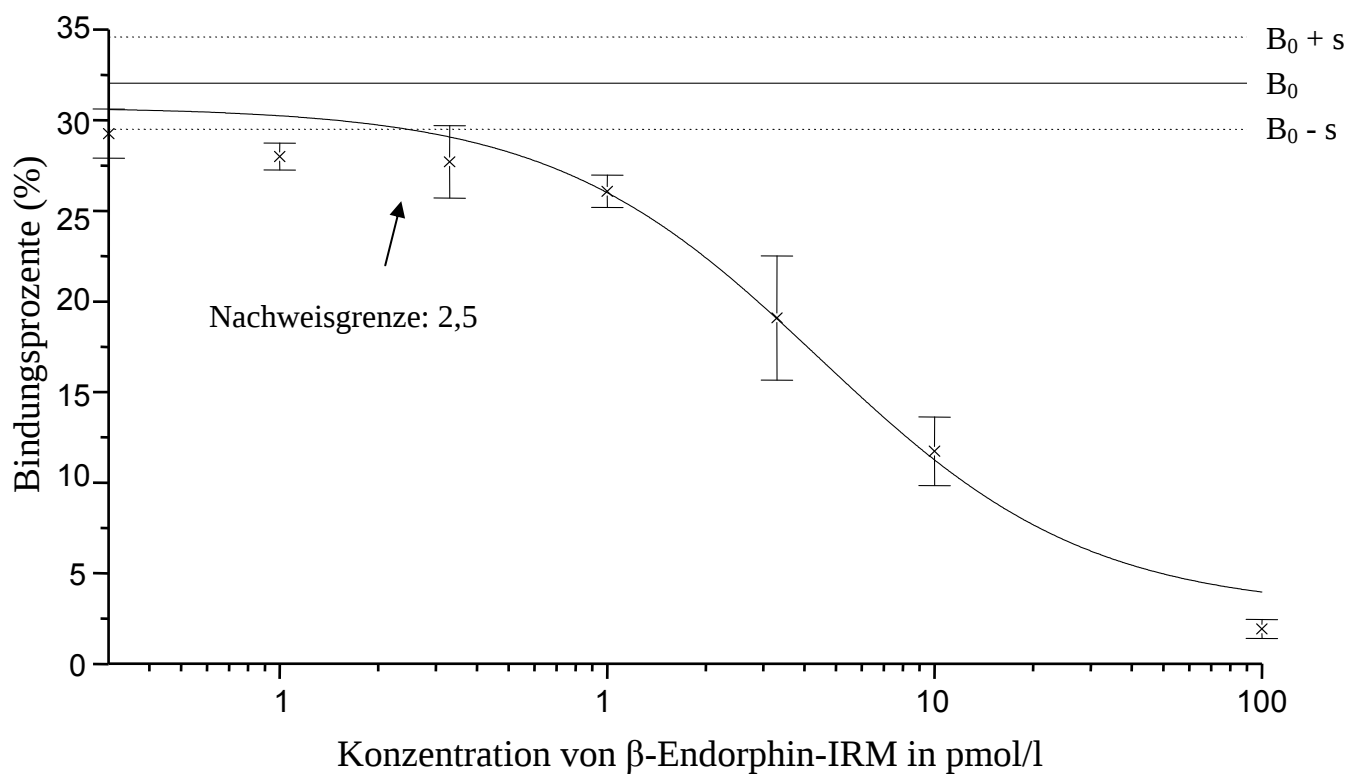


Abb. 4.6-3: Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration des β -Endorphin immuno-reaktiven Materials (84E) im Plasma der Probanden 1-8

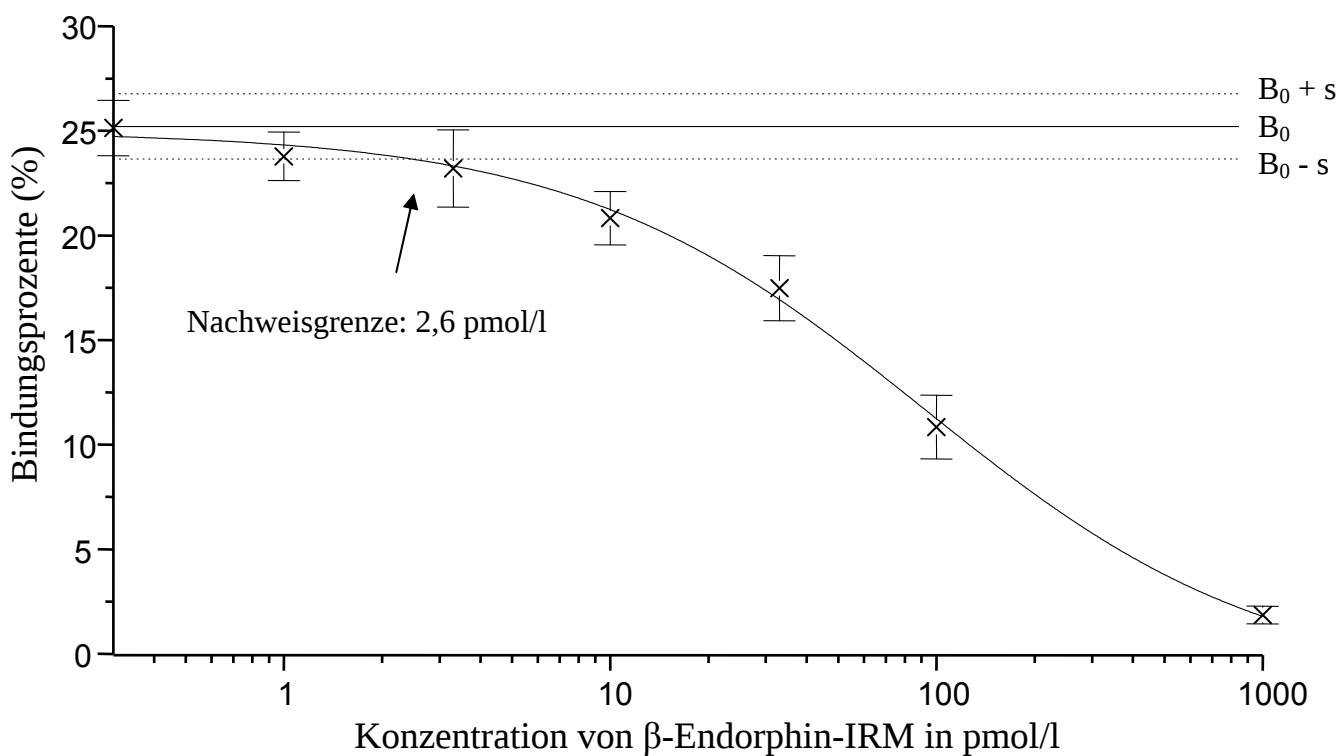


Abb. 4.6-4: Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration des β -Endorphin immuno-reaktiven Materials (84E) im Plasma der Probanden 9-16

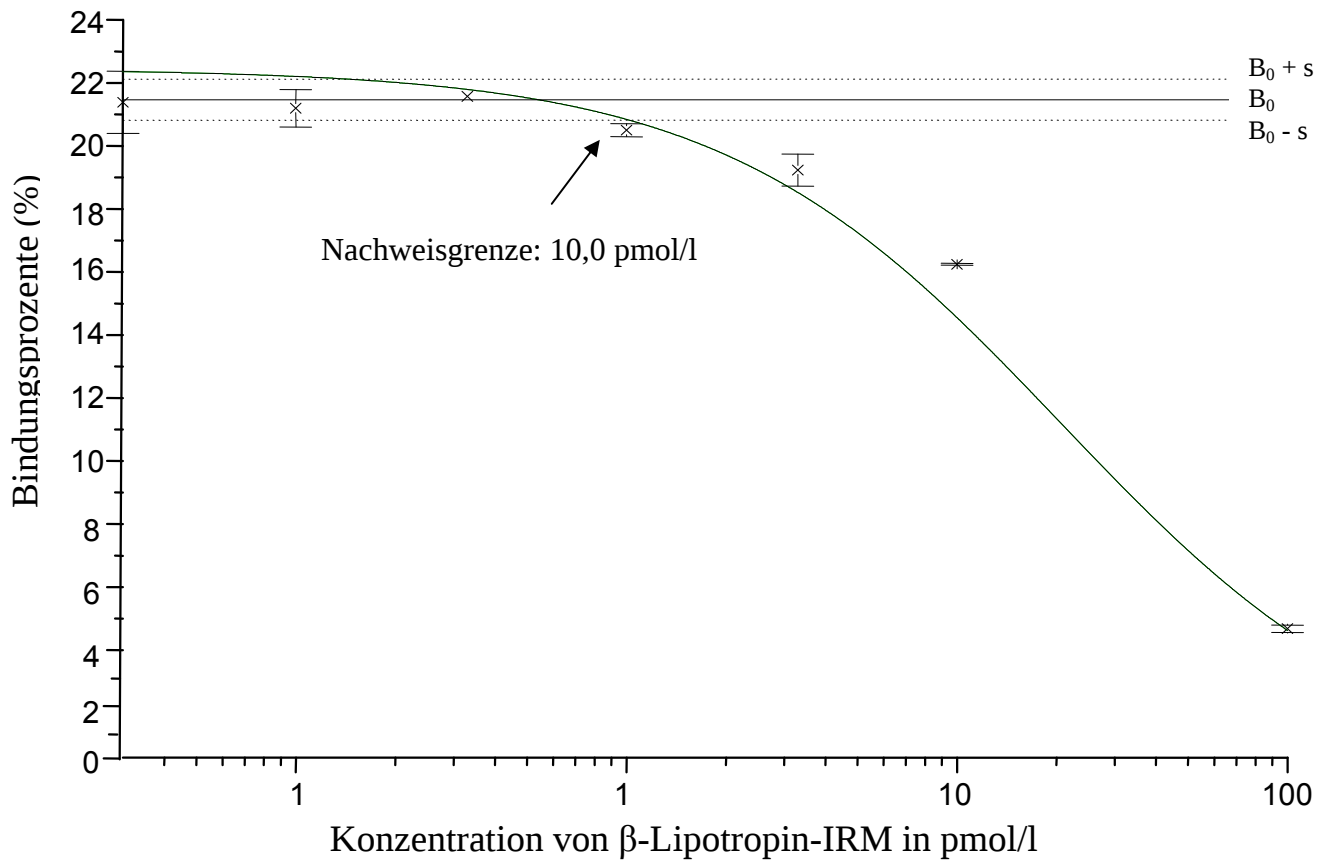


Abb. 4.6-5: Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration des β -Lipotropin immuno-reaktiven Materials im Plasma der Probanden 1-8

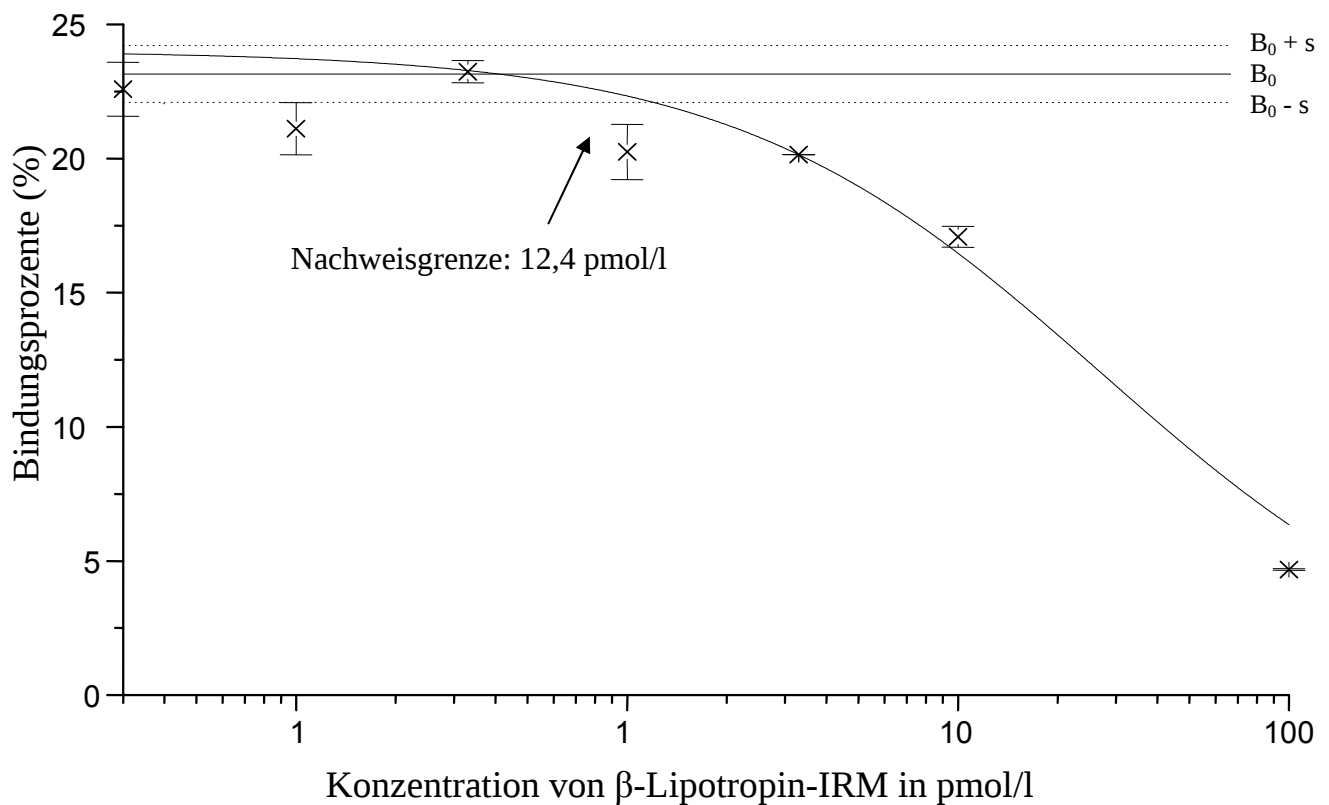


Abb. 4.6-6: Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration des β -Lipotropin immuno-reaktiven Materials im Plasma der Probanden 9-16

4.7 Bestimmung des Adrenocorticotropen Hormons, des Cortisols, des Tumornekrosefaktors- α , des Interleukins-1 β und des β -Endorphins-IRM (Nichols[®])

4.7.1 Bestimmung des Adrenocorticotropen Hormons

ACTH wurde mit Hilfe eines käuflichen Two-Site-Immunometric-Chemilumineszenz-Assays (Nichols[®] Institute, San Juan Capistrano, USA) bestimmt. Für diesen Assay werden ein monoklonaler Antikörper, gerichtet gegen den N-Terminus des ACTH, und ein polyklonaler Antikörper, gerichtet gegen den C-Terminus des ACTH, verwendet. Die Nachweisgrenze der Assays betrug 0,11 pmol/l.

4.7.2 Bestimmung des Cortisols

Die Bestimmung des Cortisols erfolgte mit einem Enzymimmunoassay (DSL Deutschland GmbH, Sinsheim). Die Nachweisgrenze lag bei 27,6 nmol/l.

4.7.3 Bestimmung des Tumornekrosefaktors- α

Tumornekrosefaktor- α wurde ebenfalls mit einem Enzymimmunoassay (Biosource Europe S.A.) bestimmt. Die Nachweisgrenze dieses Assays lag bei 3 pg/ml.

4.7.4 Bestimmung des Interleukins-1 β

Die Bestimmung des IL-1 β erfolgte mit einem käuflichen Immunoassay (Quantikine[®] HS High Sensitivity, R&D Systems, Minneapolis, USA). Die Nachweisgrenze lag bei < 0,1 pg/ml.

4.7.5 Bestimmung des β -Endorphin-IRM (Nichols[®])

Die Konzentration des β -Endorphin-IRM wurde zusätzlich zu den oben beschriebenen Nachweisverfahren mit einem käuflichen Radioimmunoassay (β -Endorphin Directional Insert, Nichols[®] Institute, San Juan Capistrano, USA) bestimmt. Es handelt sich hierbei um einen Solid Phase Two-site Radioimmunoassay. Die Nachweisgrenze lag bei 4 pmol/l.

Vergleichend sind die verschiedenen, in dieser Arbeit verwendeten Nachweismethoden für β -Endorphin-IRM (One-site RIA, Two-site RIA und RIA nach Nichols[®]) in Abschnitt 5.2 dargestellt.

4.8 Berechnung der Fläche unter der Plasmaspiegelkurve (AUC)

Als Maß für die Menge eines POMC-Derivats, welches in das kardiovaskuläre Kompartiment freigesetzt wurde, diente die Fläche unter der Plasmaspiegelkurve (AUC) zwischen den Zeitpunkten t_A und t_D (Abbildung 4.8-1).

Die Berechnung der Teilflächeninhalte erfolgte mit dem Computerprogramm Origin[®]. Die Summe der einzelnen Flächen ergibt eine gute Näherung der AUC (Poch and Juan, 1990).

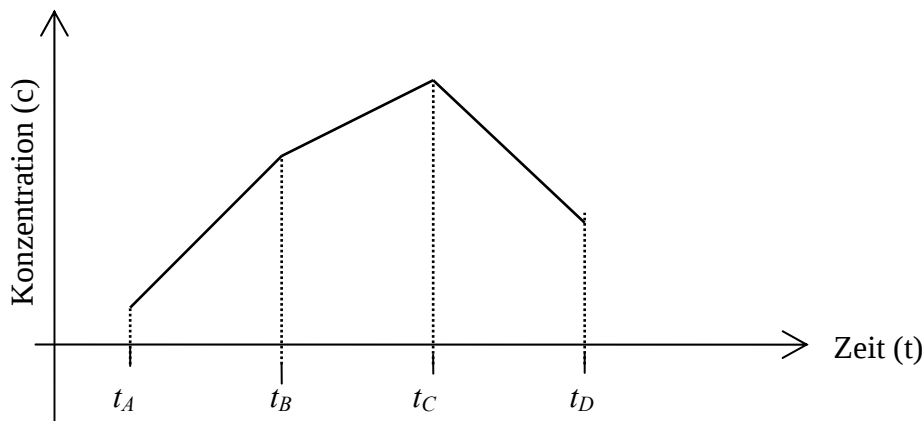


Abb. 4.8-1: Ermittlung der AUC (area under the curve): Die Flächeninhalte der einzelnen Trapeze werden errechnet und addiert.

4.9 Statistische Auswertungsverfahren

4.9.1 Hodges-Lehmann-Schätzer

Bei der vorliegenden Studie wurden die Daten explorativ gewonnenen; da von einer Normalverteilung der Daten nicht ausgegangen werden konnte, mussten zur Berechnung von Differenzen zweier benachbarter Messdaten parameterfreie Methoden eingesetzt werden. Der Vorteil der Anwendung parameterfreier Testmethoden (z.B. Berechnung von Hodges-Lehmann-Schätzern) besteht darin, dass hinsichtlich der Form der Verteilung der gewonnenen Messdaten keinerlei Voraussetzungen vorliegen müssen.

Es war nun von Interesse zu untersuchen, ob sich die zu bestimmten Abnahmezeiten gewonnenen Messdaten (z.B. Messdaten zu den Zeitpunkten t_A und t_B) signifikant unterscheiden

oder nicht. Aus diesem Grund wurde aus den Paardifferenzen zeitlich benachbarter Messdaten so genannte Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}$ berechnet - ein aus den Stichproben (z.B. Messdaten zu den Zeitpunkten t_A und t_B) ermittelter Schätzwert. Dieser gibt eine Verschiebung ϕ der Häufigkeitsverteilungen von Messdaten zu benachbarten Abnahmezeitpunkten an, für deren Differenz (hier Konzentrationsdifferenz) er zugleich Schätzer ist (Abbildung 4.9.1-1).

Zu jedem Schätzer lässt sich ein Konfidenzintervall angeben, dessen Grenzen aus den Differenzen der Messdaten berechnet wurden. Das Konfidenzintervall beinhaltet die „wahre aber unbekannte Differenz“ mit einer vorgegebenen Wahrscheinlichkeit, der Vertrauenswahrscheinlichkeit. Als Vertrauenswahrscheinlichkeit wurde hier 95 % gewählt. Das bedeutet, dass in 95 % der Fälle das Konfidenzintervall die wahre Differenz einschließt. In 5 % ($\alpha \leq 0,05$) aller Fälle wird die Behauptung, die wahre Wahrscheinlichkeit liege im Vertrauensbereich, falsch sein. Die Größe α wird als Irrtumswahrscheinlichkeit bezeichnet.

Zur Berechnungen des Hodges-Lehmann-Schätzers $\hat{\theta}$ und des Konfidenzintervalls siehe Hollander and Wolfe (1973).

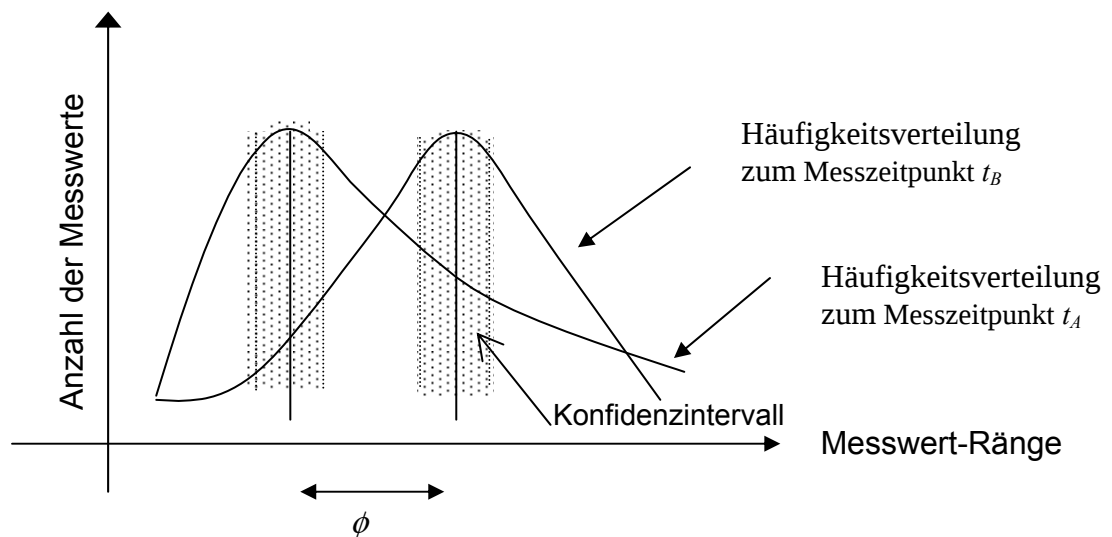


Abb. 4.9.1-1: Häufigkeitsverteilung von Messwerten zu zwei verschiedenen Messzeitpunkten. Die Verschiebung ϕ entspricht der Differenz der Maxima der dargestellten Häufigkeitsverteilungen. Der Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}$ ist ein Schätzer für diese Verschiebung.

4.9.2 Rangkorrelation nach Spearman

Die Messdaten der vorliegenden Studie wurden explorativ gewonnen und waren somit nicht zwingend normalverteilt. Aus diesem Grund wurde für die Prüfung auf Korrelationen zwischen zwei Reihen von Messwerten ebenfalls ein parameterfreier Test, in dieser Arbeit der Rangkorrelations-Koeffizient nach Spearman, eingesetzt.

Die Berechnung des Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten erfolgt nach folgender Gleichung (Sachs, 1984):

$$r_s = 1 - \frac{6 \sum_{i=1}^n D_i^2}{n(n^2 - 1)} \quad (4.9.2-1)$$

Hierbei ist r_s der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman, D_i sind die Differenzen der Rangplätze $x_i - y_i$ und n ist der Stichprobenumfang.

Aus den auf Korrelation zu überprüfenden Messreihen werden, durch Zuordnung von Rangzahlen, Rangreihen gebildet und es werden die Differenzen D_i der Rangplätze berechnet. Die Differenzen werden quadriert; die Summe der Quadrate wird gebildet ($\sum_{i=1}^n D_i^2$) und in Gleichung 4.9.2-1 eingesetzt.

Bei gleicher Rangordnung sind alle Differenzen gleich Null, r_s wird 1, es liegt also eine starke positive Korrelation vor. Bei genau entgegengesetzter Rangordnung ergibt sich ein r_s von -1, es liegt also eine starke negative Korrelation vor. $r_s = 0$ bedeutet, dass keine Korrelation zwischen den beiden Messreihen vorliegt.

Die Signifikanz von r_s ist abhängig von der Anzahl der Wertepaare. Tabelle 4.9.2-1 gibt für 16 Wertepaare ($n = 16$), mit einer zweiseitigen Fragestellung und bei vorgegebenem Signifikanzniveau die Grenze an, ab der eine signifikante Korrelation zwischen den Messgrößen besteht (Sachs, 1984).

Tab. 4.9.2-1: Signifikanzniveau α und zugehöriger Grenzwert des Korrelationskoeffizienten r_s (für 16 Wertepaare und zweiseitige Fragestellung), ab dem eine signifikante Korrelation zwischen den Messgrößen besteht

Signifikanzniveau α	0,002	0,01	0,02	0,05	0,1
Korrelationskoeffizient r_s	0,7265	0,6324	0,5824	0,5000	0,4265

5 Ergebnisse

5.1 Charakteristika der Probanden

Die Verteilung der Quartile von Alter, Größe, Gewicht und Body-Mass-Index (BMI) der 16 Probanden sind in Tabelle 5.1-1 dargestellt. Die Grundgesamtheiten der weiblichen und männlichen Probanden wurde mit dem *U*-Test von Wilcoxon, Mann und Whitney auf signifikante Unterschiede hinsichtlich Alter, Größe, Gewicht und BMI geprüft (Sachs, 1984). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5.1-1 dargestellt. Die männlichen und weiblichen Probanden unterschieden sich signifikant in der Größe ($P < 0,05$), nicht jedoch in Alter, Gewicht und BMI.

Tab. 5.1-1: Quartile, Minimal- und Maximalwerte von Alter, Größe, Gewicht und BMI der 16 Probanden und Geschlechtsunterschiede (NS = nicht signifikant)

	Probanden (<i>n</i> = 16)					Geschlechts- unterschiede
	<i>Minimum</i>	<i>1. Quartil</i>	<i>Median</i>	<i>3.Quartil</i>	<i>Maximum</i>	<i>P</i>
Alter (a)	22,6	25,9	27,3	28,7	40,5	NS
Größe (cm)	164	171	175	180	196	<0,05
Gewicht (kg)	50	61	70	78	109	NS
BMI (kg/m ²)	18,6	20,4	22,8	23,7	35,2	NS

5.2 β -Endorphin Radioimmunoassays

Die Konzentrationen von β -Endorphin-IRM, authentischem β -Endorphin (β -Endorphin (1-31)) und β -LPH-IRM aller 256 Plasmaproben (16 Probanden, vier Gruppen, vier Messzeitpunkte) wurden mit folgenden Radioimmunoassays bestimmt:

1. *Fluid-Phase One-Site RIA (β -Endorphin-IRM), Antikörper 84E*
2. *Fluid-Phase One-Site RIA (β -LPH -IRM), Antikörper 93E*
3. *Fluid-Phase Immunoprecipitation Two-Site RIA (β -Endorphin 1-31), Antikörper 11P und 3E7*
4. *Solid-Phase Two-site RIA (β -Endorphin-IRM) entwickelt vom Nichols[®] Institute*

Die Konzentrationen von β -Endorphin-IRM (Nichols®) und von β -LPH-IRM (93E) sämtlicher untersuchter Plasmaproben korrelierten positiv ($r = 0,51$ mit $P < 0,01$). Die Berechnung der Korrelationen zu einzelnen Messzeitpunkten ergab folgendes Ergebnis (Abbildung 5.2-1):

Basalwerte (t_A ; Gruppen I und II):	$r = -0,27$ mit $P = 0,14$
Werte 15 min nach Applikation von CRH (t_B ; Gruppen I und II):	$r = 0,64$ mit $P < 0,01$
Werte 30 min nach Applikation von CRH (t_C ; Gruppen I und II):	$r = 0,58$ mit $P < 0,01$

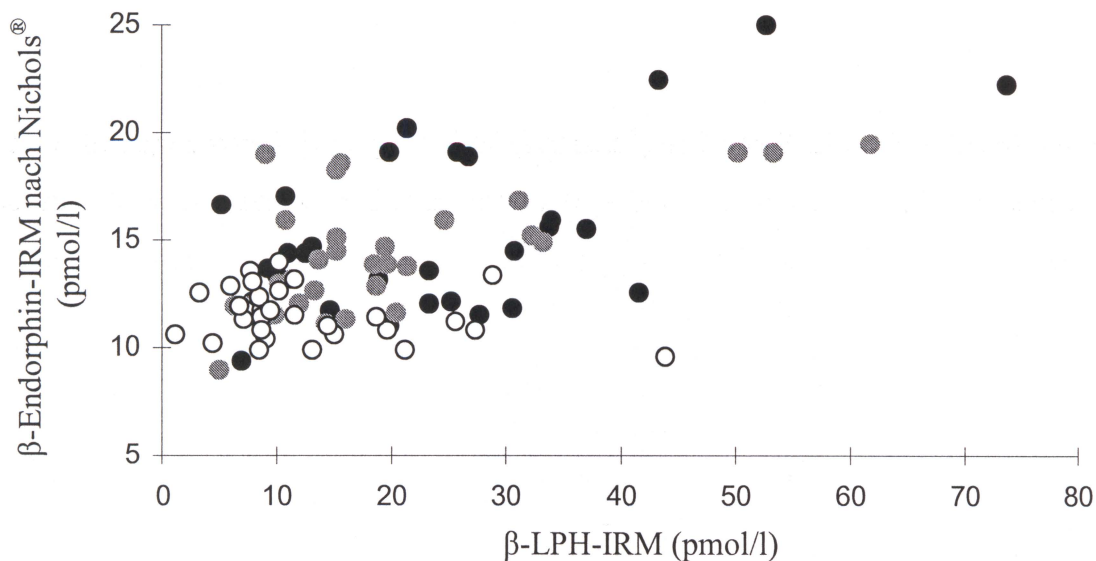


Abb. 5.2-1: Beziehung zwischen der Konzentration von β -LPH-IRM und der Konzentration von β -Endorphin-IRM (Nichols®) bestimmt in Plasmaproben, die zu drei verschiedenen Zeitpunkten abgenommen wurden (○ : Basalwerte ($n = 32$); ◐ : Konzentrationen 15 min nach intravenöser Applikation von CRH ($n = 32$); ● : Konzentrationen 30 min nach intravenöser Applikation von CRH ($n = 32$)).

Die Konzentrationen von β -Endorphin-IRM (Nichols®) und von ACTH sämtlicher untersuchter Plasmaproben korrelierten positiv ($r = 0,79$ mit $P < 0,01$). Die Berechnung der Korrelationen zu einzelnen Messzeitpunkten ergab folgendes Ergebnis (Abbildung 5.2-2):

Basalwerte (t_A ; Gruppen I und II):	$r = 0,34$ mit $P = 0,06$
Werte 15 min nach Applikation von CRH (t_B ; Gruppen I und II):	$r = 0,70$ mit $P < 0,01$
Werte 30 min nach Applikation von CRH (t_C ; Gruppen I und II):	$r = 0,72$ mit $P < 0,01$

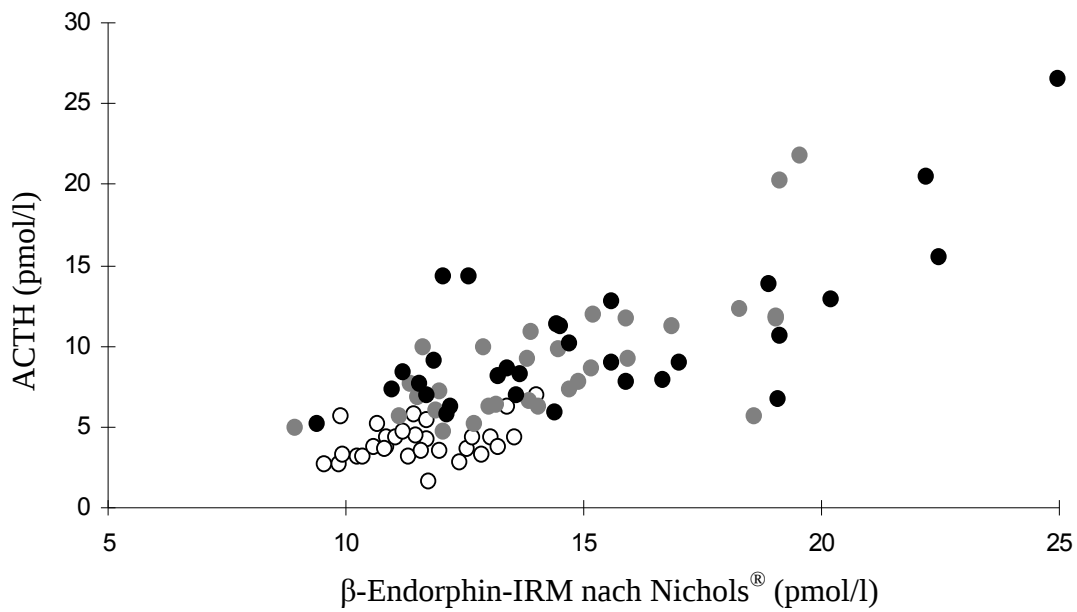


Abb. 5.2-2: Beziehung zwischen der Konzentration von β -Endorphin-IRM (Nichols®) und der Konzentration von ACTH bestimmt in Plasmaproben, die zu drei verschiedenen Zeitpunkten abgenommen wurden (○: Basalwerte ($n = 32$); ◐: Konzentrationen 15 min nach intravenöser Applikation von CRH ($n = 32$); ●: Konzentrationen 30 min nach intravenöser Applikation von CRH ($n = 32$)).

Zwischen den mit dem Nichols®-Assay und den mit den RIA-Systemen 84E und 3E7 gemessenen Konzentrationen lagen keine signifikanten Korrelationen vor ($r_{(Nic; END-IRM)} = 0,10$ mit $P = 0,22$; $r_{(Nic; END-(1-31))} = 0,16$ mit $P = 0,05$).

5.3 Konzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols im kardiovaskulären Kompartiment

5.3.1 Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Plasmakonzentrationen

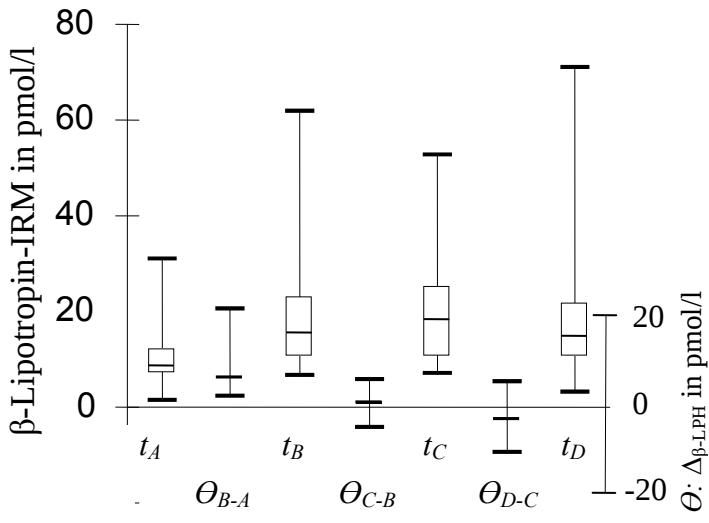
Die Konzentrationen von β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM (84E), β -Endorphin-IRM (Nichols[®]), β -Endorphin (1-31), ACTH und Cortisol im Blutplasma der Probanden wurden in Gruppen I (CRH/Naloxon), II (CRH/Placebo), III (Placebo/Naloxon) und IV (Placebo/Placebo) zu den Messzeitpunkten t_A (Basalwert), t_B (15 Minuten nach Gabe von CRH oder Placebo), t_C (30 Minuten nach Gabe von CRH oder Placebo) und t_D (fünf Minuten nach Gabe von Naloxon oder Placebo) bestimmt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 5.3-1 bis 5.3-6 in Form von box- und whisker-plots dargestellt. Für jeden Messzeitpunkt sind Minima und Maxima (untere und obere Linie), sowie das erste, zweite (Median) und dritte Quartil (untere Begrenzung des Kastens, Linie innerhalb des Kastens und obere Begrenzung des Kastens) erkennbar. Die Konzentrationsänderungen von Messdaten zweier benachbarter Messzeitpunkte wurden mit Hilfe von Hodges-Lehmann-Schätzern $\hat{\theta}$ und ihren jeweiligen 95 % Konfidenzintervallen berechnet und sind ebenfalls in den Abbildungen 5.3-1 bis 5.3-6 dargestellt. Der Konzentrationsunterschied benachbarter Messwerte ist signifikant, wenn das 95 % Konfidenzintervall komplett oberhalb oder komplett unterhalb der Abszisse, diese als Minimum oder Maximum mit eingeschlossen, liegt. Quartile und Hodges-Lehmann-Schätzer mit ihren 95 % Konfidenzintervallen sind tabellarisch im Anhang aufgeführt.

Aus den Abbildungen 5.3.1 bis 5.3.6 ist zu entnehmen, dass 15 Minuten nach Verabreichung von 100 μg CRH, zum Messzeitpunkt t_B , die Konzentrationen von β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM (84E), β -Endorphin-IRM (Nichols[®]), β -Endorphin (1-31), und ACTH im Vergleich zum Basalwert (t_A) signifikant angestiegen sind. Die Konzentrationen von Cortisol stiegen nach Gabe von CRH sowohl zwischen den Messzeitpunkten t_A und t_B als auch zwischen t_B und t_C signifikant an (Abbildungen 5.3-1 bis 5.3-6, I und II).

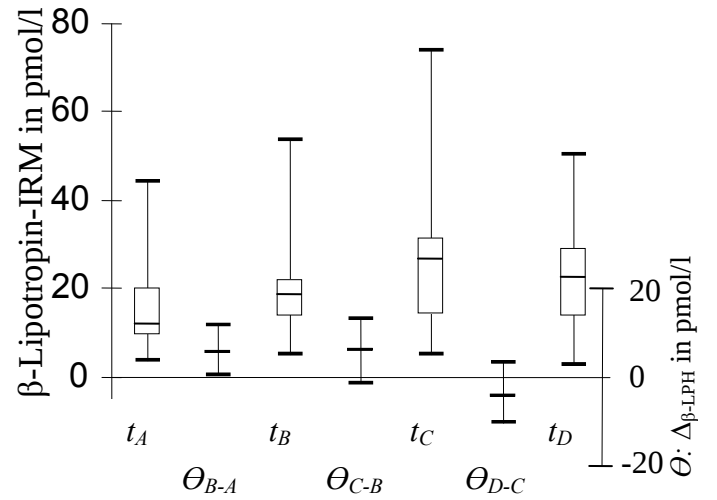
Fünf Minuten nach Verabreichung von Naloxon, zum Messzeitpunkt t_D , kam es zu keiner signifikanten Änderung der Konzentrationen der bestimmten POMC-Derivate und des Cortisols (Abbildungen 5.3.1 bis 5.3.6, I und III).

Nach intravenöser Injektion physiologischer Kochsalzlösung wurden ebenfalls keine signifikanten Änderungen der Konzentrationen der bestimmten POMC-Derivate und des Cortisols beobachtet (Abbildungen 5.3-1 bis 5.3-6).

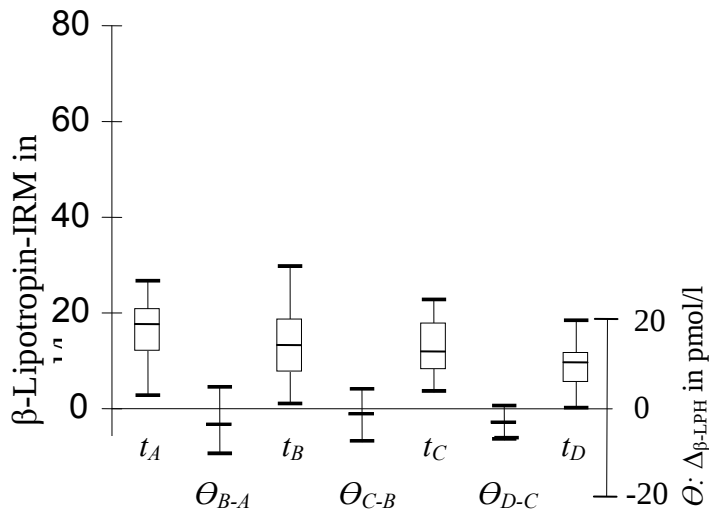
I: CRH/Naloxon



II: CRH/Placebo



III: Placebo/Naloxon



IV: Placebo/Placebo

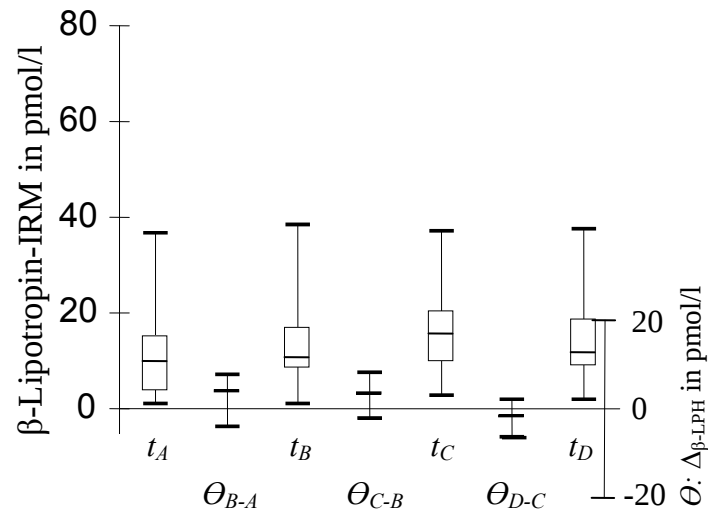
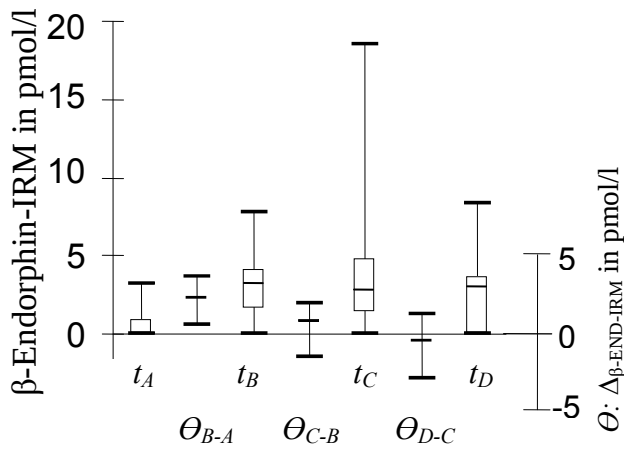
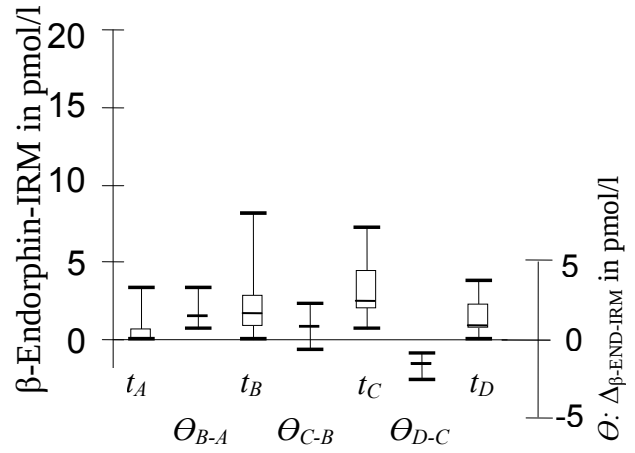


Abb. 5.3-1: Box- und whisker-plots der Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Konzentrationen von β -Lipotropin-IRM im Blutplasma in den Gruppen I bis IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D sowie Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}_{B-A}$, $\hat{\theta}_{C-B}$ und $\hat{\theta}_{D-C}$ mit den 95 % Konfidenzintervallen (Erklärung im Text)

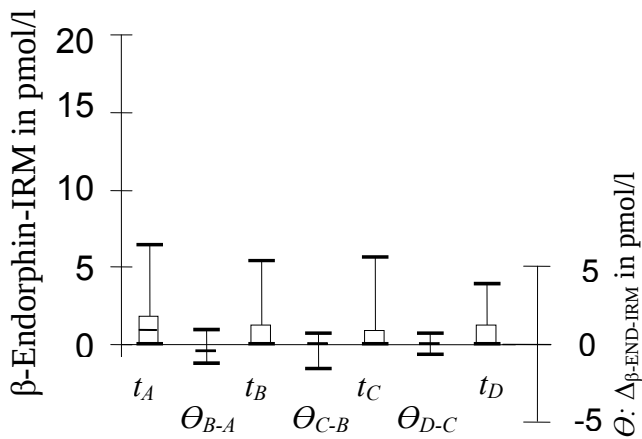
I: CRH/Naloxon



II: CRH/Placebo



III: Placebo/Naloxon



IV: Placebo/Placebo

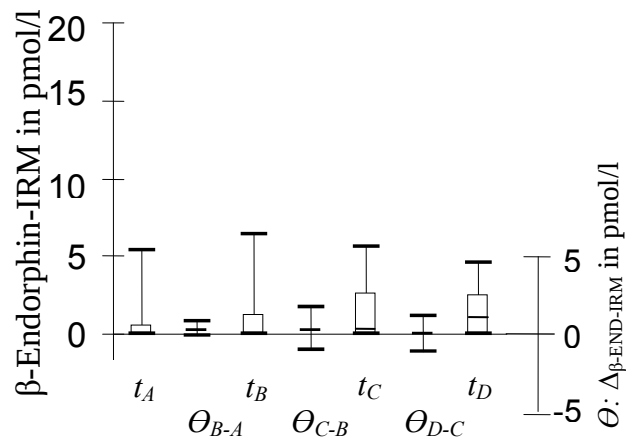
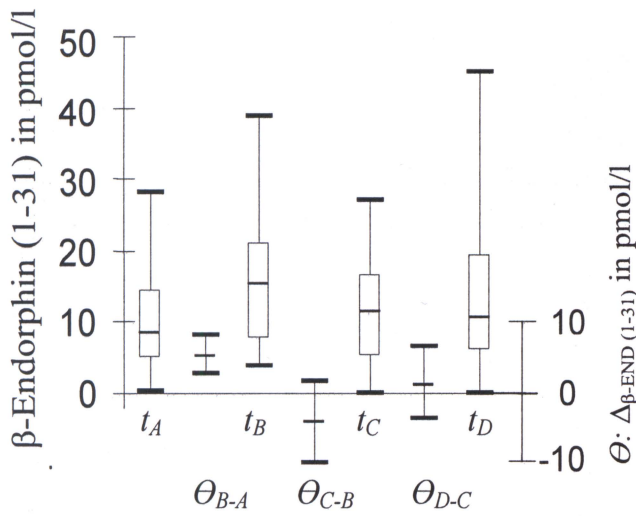
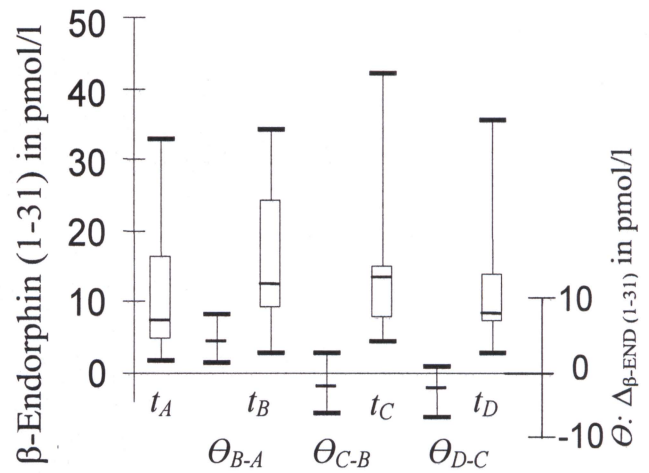


Abb. 5.3-2: Box- und whisker-plots der Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Konzentrationen von β -Endorphin-IRM (84E) im Blutplasma in den Gruppen I bis IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D sowie Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}_{B-A}$, $\hat{\theta}_{C-B}$ und $\hat{\theta}_{D-C}$ mit den 95 % Konfidenzintervallen (Erklärung im Text)

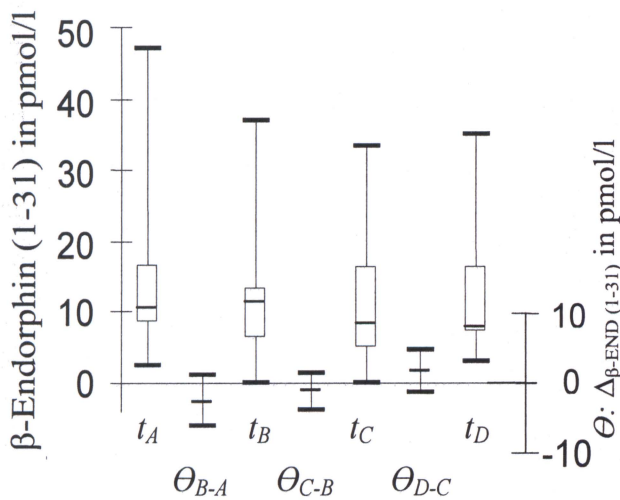
I: CRH/Naloxon



II: CRH/Placebo



III: Placebo/Naloxon



IV: Placebo/Placebo

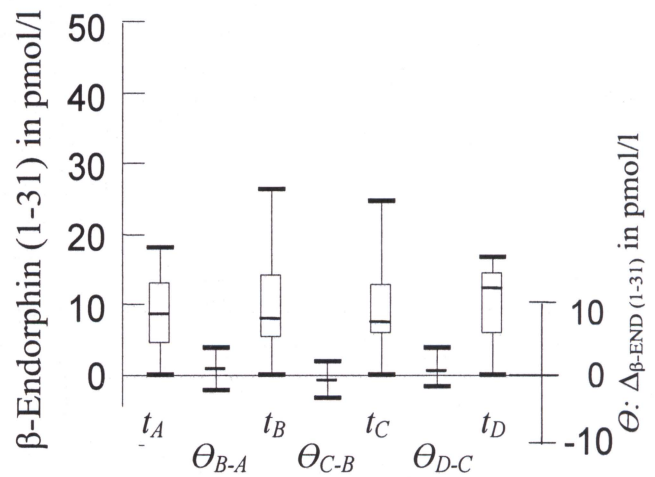


Abb. 5.3-3:

Box- und whisker-plots der Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Konzentrationen von β -Endorphin (1-31) im Blutplasma in den Gruppen I bis IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D sowie Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}_{B-A}$, $\hat{\theta}_{C-B}$ und $\hat{\theta}_{D-C}$ mit den 95 % Konfidenzintervallen (Erklärung im Text)

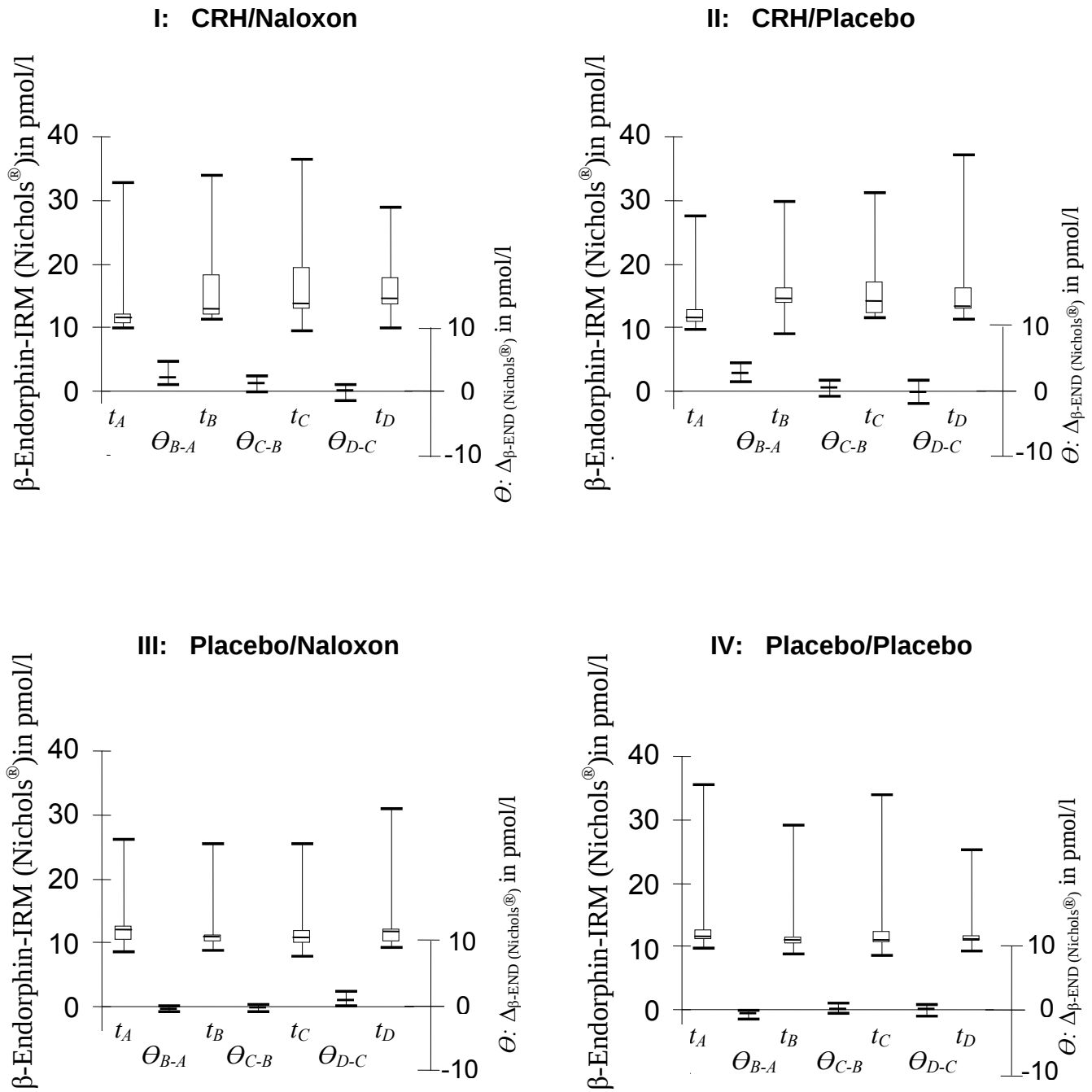


Abb. 5.3-4: Box- und whisker-plots der Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Konzentrationen von β -Endorphin-IRM (Nichols®) im Blutplasma in den Gruppen I bis IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D sowie Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}_{B-A}$, $\hat{\theta}_{C-B}$ und $\hat{\theta}_{D-C}$ mit den 95 % Konfidenzintervallen (Erklärung im Text)

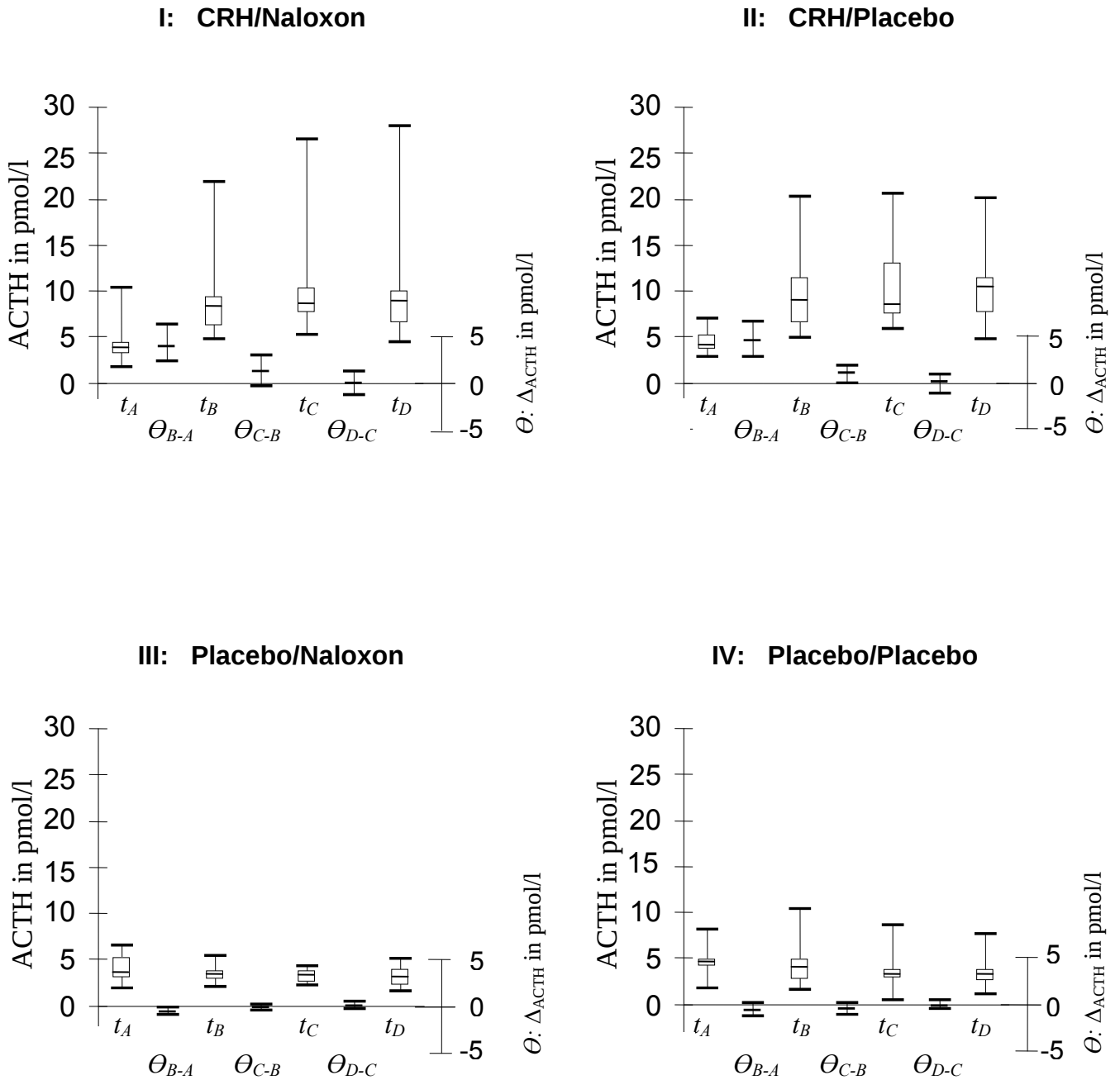


Abb. 5.3-5: Box- und whisker-plots der Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Konzentrationen von ACTH im Blutplasma in den Gruppen I bis IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D sowie Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}_{B-A}$, $\hat{\theta}_{C-B}$ und $\hat{\theta}_{D-C}$ mit den 95 % Konfidenzintervallen (Erklärung im Text)

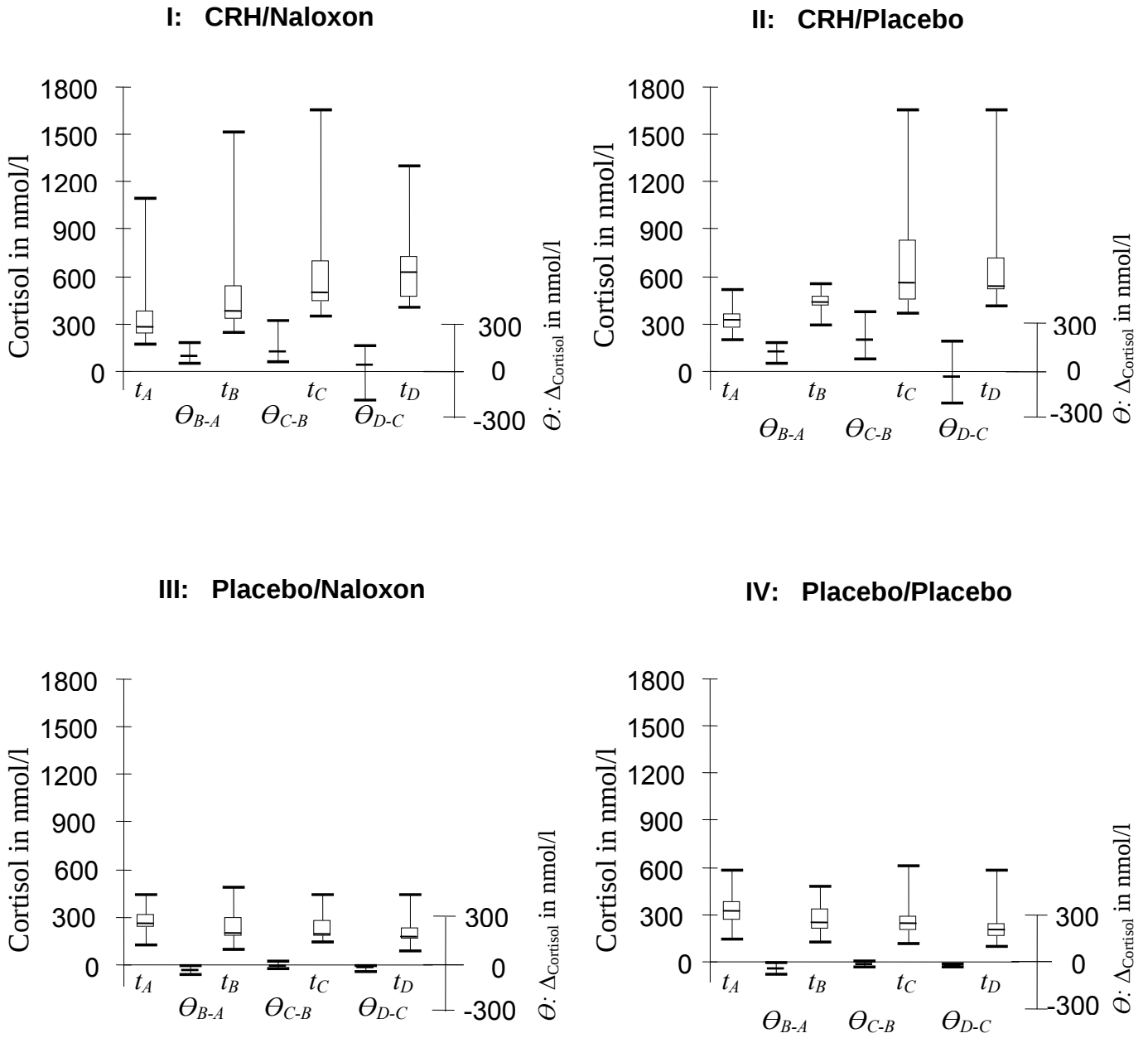


Abb. 5.3-6: Box- und whisker-plots der Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Konzentrationen von Cortisol im Blutplasma in den Gruppen I bis IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D sowie Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}_{B-A}$, $\hat{\theta}_{C-B}$ und $\hat{\theta}_{D-C}$ mit den 95 % Konfidenzintervallen (Erklärung im Text)

5.3.2 Flächen unter den Plasmaspiegelkurven (AUC)

Die Flächen unter den Plasmaspiegelkurven (AUC), als Maß für die freigesetzten Mengen der untersuchten POMC-Derivate, waren in den Gruppen I (CRH/Naloxon) und II (CRH/Placebo) signifikant größer als in den Gruppen III (Placebo/Naloxon) und IV (Placebo/Placebo). Als Beispiel sind in der Abbildung 5.3.1-1 die AUC des ACTH im Blutplasma eines Probanden dargestellt.

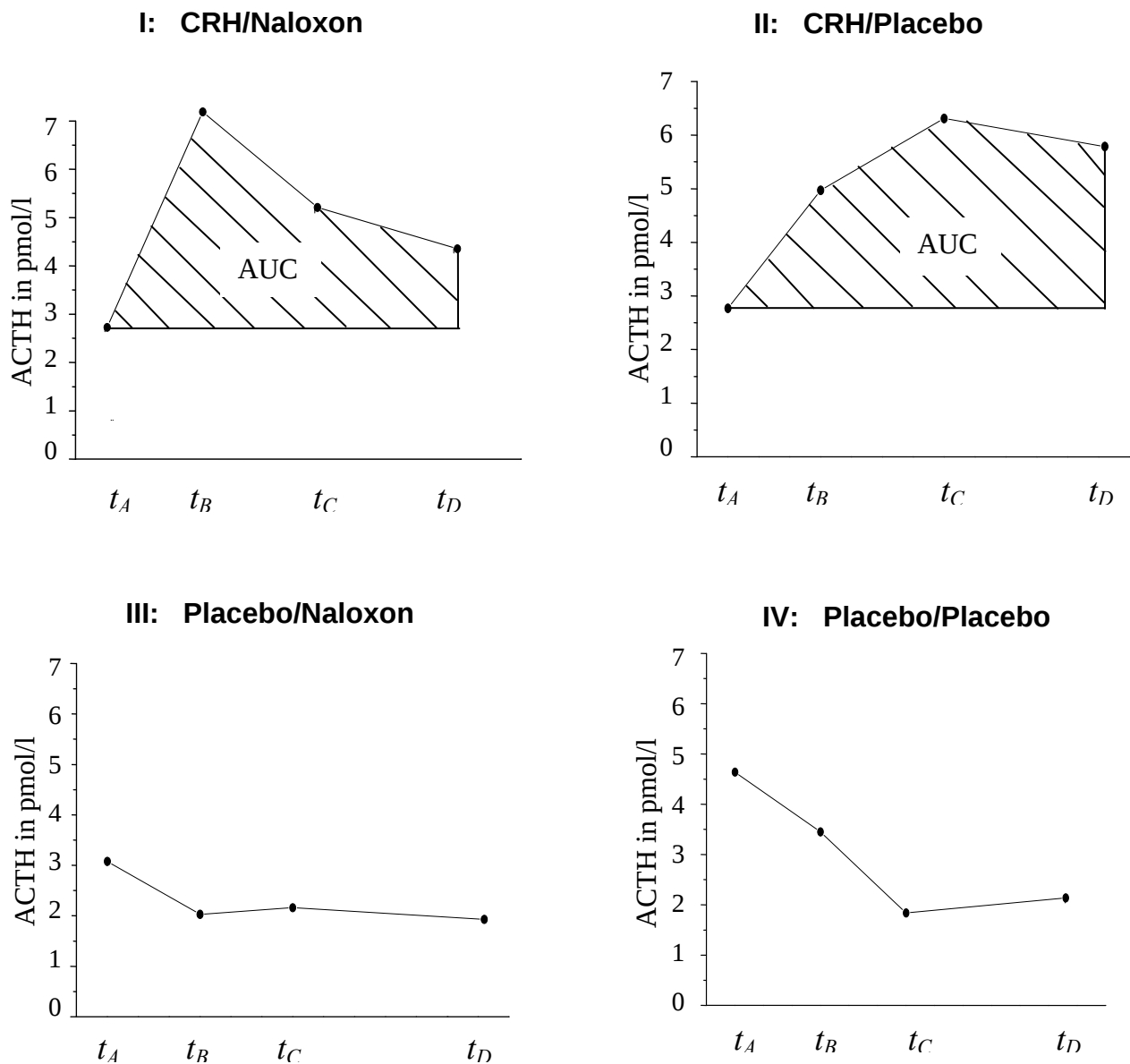


Abb. 5.3.1-1: AUC der Konzentrationen des ACTH im Blutplasma am Beispiel eines Probanden; III und IV: Die Berechnung einer Fläche machte keinen Sinn, da die Plasmakonzentrationen des ACTH zu den Zeitpunkten t_B , t_C und t_D kleiner waren als der Ausgangswert zum Zeitpunkt t_A .

5.4 Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate

5.4.1 Korrelationen der Konzentrationen der POMC-Derivate untereinander

Es ergaben sich keine signifikanten Korrelationen zwischen den Konzentrationen von β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31) und β -LPH-IRM, weder bei der Betrachtung aller Messzeitpunkte, noch bei der getrennten Untersuchung der Basalwerte und der Werte nach Verabreichung von CRH.

Die Konzentrationen von β -LPH-IRM und von ACTH sämtlicher untersuchter Plasmaproben korrelierten positiv ($r = 0,65$ mit $P < 0,01$). Die Berechnung der Korrelationen zu einzelnen Messzeitpunkten ergab folgendes Ergebnis (Abbildung 5.4.1-1):

Basalwerte (t_A ; Gruppen I und II):	$r = 0,29$ mit $P = 0,11$
Werte 15 min nach Applikation von CRH (t_B ; Gruppen I und II):	$r = 0,80$ mit $P < 0,01$
Werte 30 min nach Applikation von CRH (t_C ; Gruppen I und II):	$r = 0,74$ mit $P < 0,01$

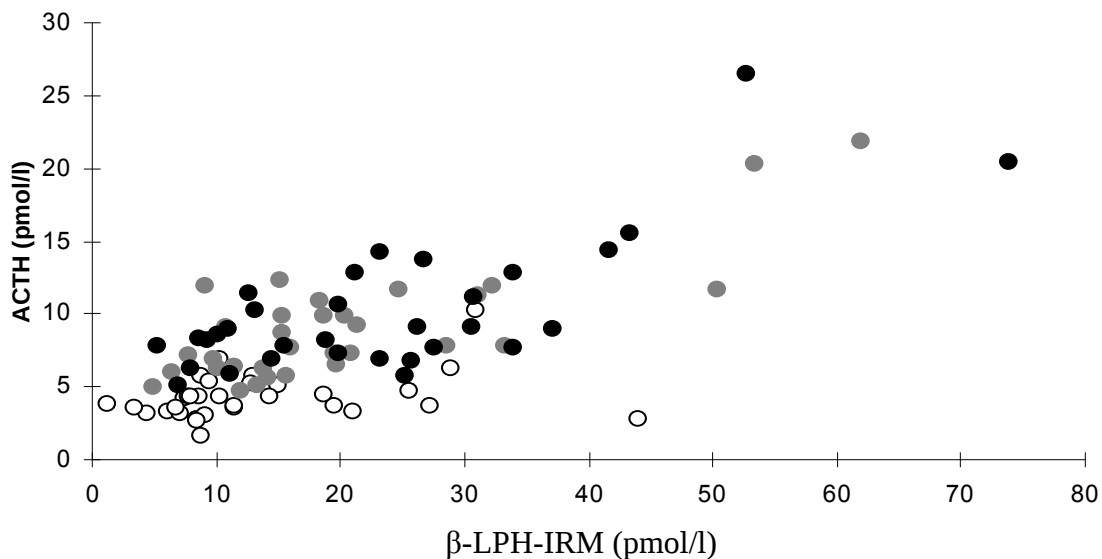


Abb. 5.4.1-1: Beziehung zwischen der Konzentration von β -LPH-IRM und der Konzentration von ACTH bestimmt in Plasmaproben, die zu drei verschiedenen Zeitpunkten abgenommen wurden (○: Basalwerte ($n = 32$); ●: Konzentrationen 15 Minuten nach intravenöser Applikation von CRH ($n = 32$); ●: Konzentrationen 30 Minuten nach intravenöser Applikation von CRH ($n = 32$))

5.4.2 Korrelationen der Konzentrationen der POMC-Derivate mit der Konzentration des Cortisols

Ohne vorherige Applikation von CRH bestanden signifikante Korrelationen zwischen den Konzentrationen von ACTH und Cortisol (t_A der Gruppen I und II sowie Gruppen III und IV; $r = 0,48$ mit $P < 0,01$). Eine Korrelation ergab sich jedoch nicht für die Konzentrationen 15 und 30 Minuten nach intravenöser Applikation von CRH ($r = 0,15$ mit $P = 0,24$). Die Konzentrationswerte sind in Abbildung 5.4.2-1 graphisch dargestellt.

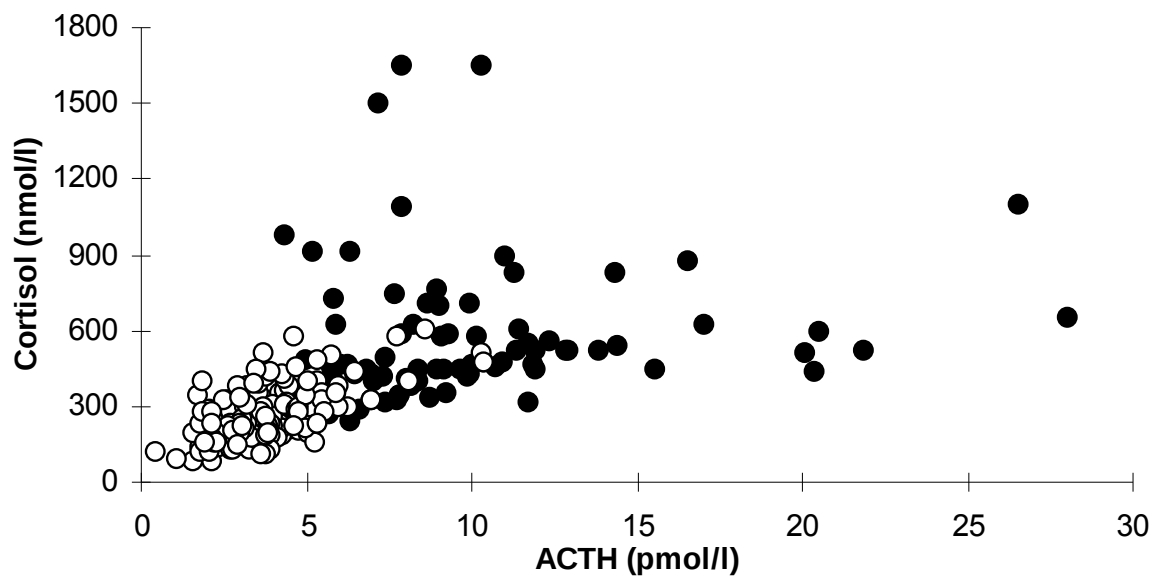


Abb. 5.4.2-1: Beziehungen zwischen der Konzentration von ACTH und der Konzentration von Cortisol; ○ : Konzentrationen ohne vorherige intravenöse Applikation von CRH (t_A der Gruppen I und II sowie Gruppen III und IV; $n = 150$); ● : Konzentration 15 und 30 Minuten nach intravenöser Applikation von CRH (t_B und t_C der Gruppen I und II; $n = 64$))

5.5 Einfluss von CRH und Naloxon auf die Temperatur- und Druckschmerzschwellen

In jeder der Gruppen I bis IV wurden die Temperatur- und Druckschmerzschwellen zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D bestimmt.

Die Schmerzschwellen zu den vier Messzeitpunkten der vier Gruppen sind in Form von box- und whisker-plots in den Abbildungen 5.5-1 und 5.5-2 dargestellt. Die jeweiligen Hodges-Lehmann-Schätzer mit ihren 95 % Konfidenzintervallen sind ebenfalls abgebildet.

Die Quartile der Temperatur- und Druckschmerzschwellen sowie die Hodges-Lehmann-Schätzer mit ihren 95 % Konfidenzintervallen sind in tabellarischer Form im Anhang dargestellt.

In den Gruppen I (CRH/Naloxon) und II (CRH/Placebo) ist 15 Minuten nach Verabreichung von 100 µl CRH (zum Zeitpunkt t_B) ein signifikanter Anstieg der Druckschmerzschwellen erkennbar (Abbildung 5.5-2). In den Gruppen III (Placebo/CRH) und IV (Placebo/Placebo) kommt es nach Applikation des Placebos nicht zu einer Veränderung der Druckschmerzschwellen.

Die Temperaturschmerzschwellen ändern sich weder nach Applikation von CRH noch nach Applikation von Placebo signifikant (Abbildung 5.5-1).

Weder die Temperatur- noch die Druckschmerzschwellen änderten sich fünf Minuten nach intravenöser Verabreichung von Naloxon, zum Messzeitpunkt t_D , signifikant.

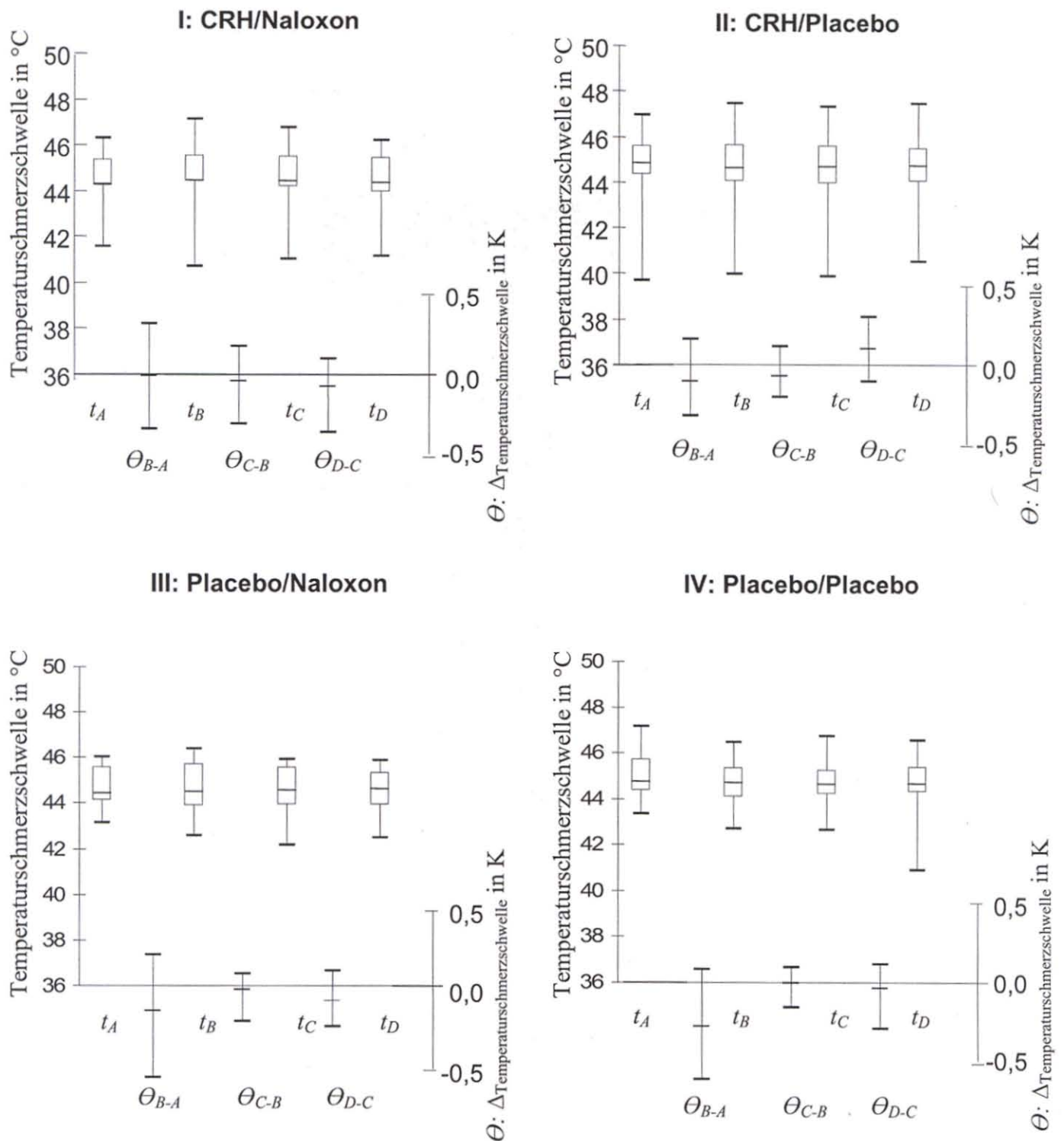
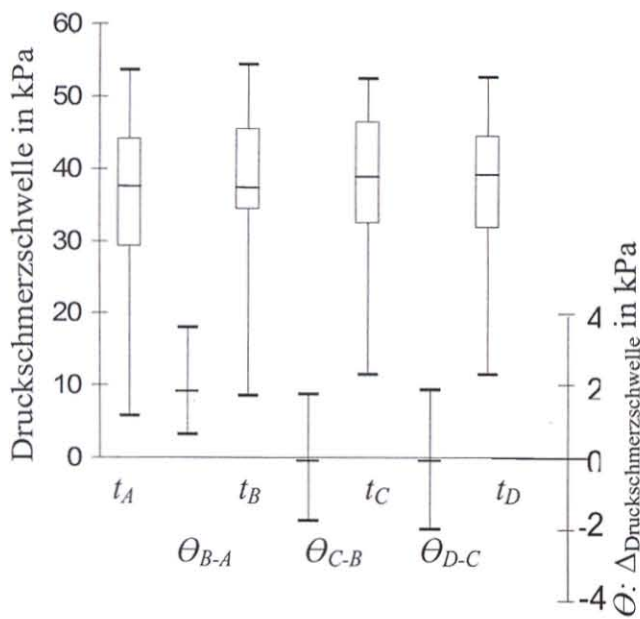
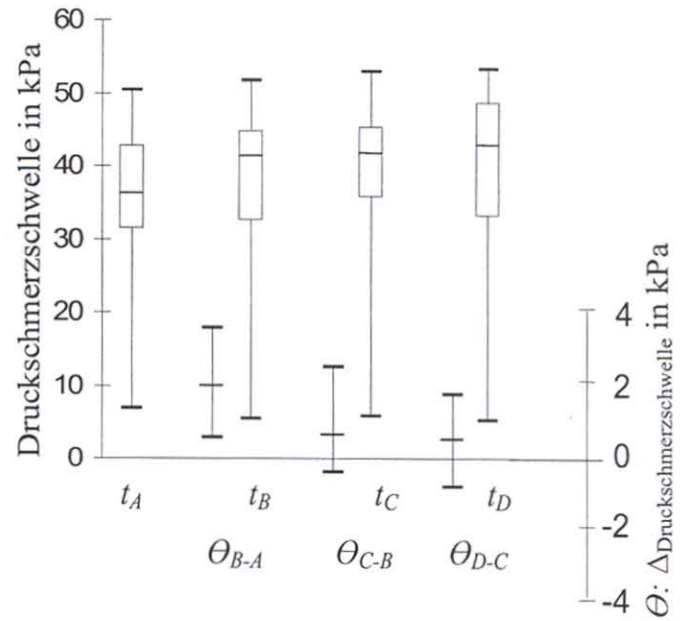


Abb. 5.5-1: Box- und whisker-plots der Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Temperaturschmerzschwellen in den Gruppen I bis IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D sowie Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}_{B-A}$, $\hat{\theta}_{C-B}$ und $\hat{\theta}_{D-C}$ mit den 95 % Konfidenzintervallen

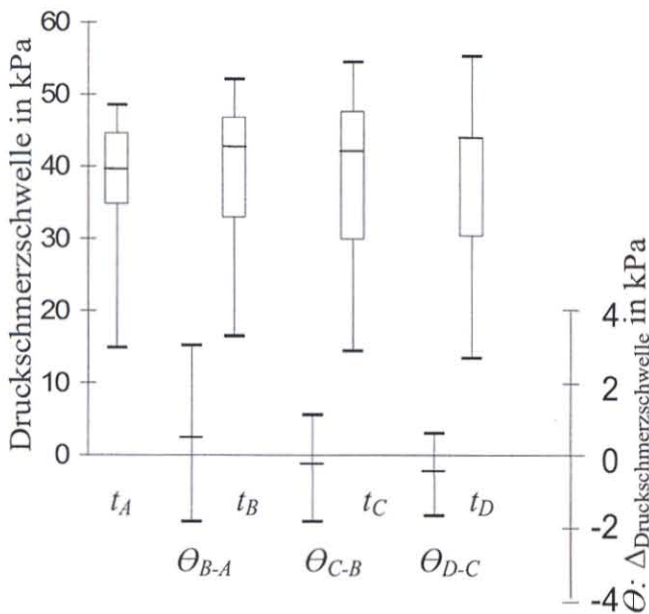
I: CRH/Naloxon



II: CRH/Placebo



III: Placebo/Naloxon



IV: Placebo/Placebo

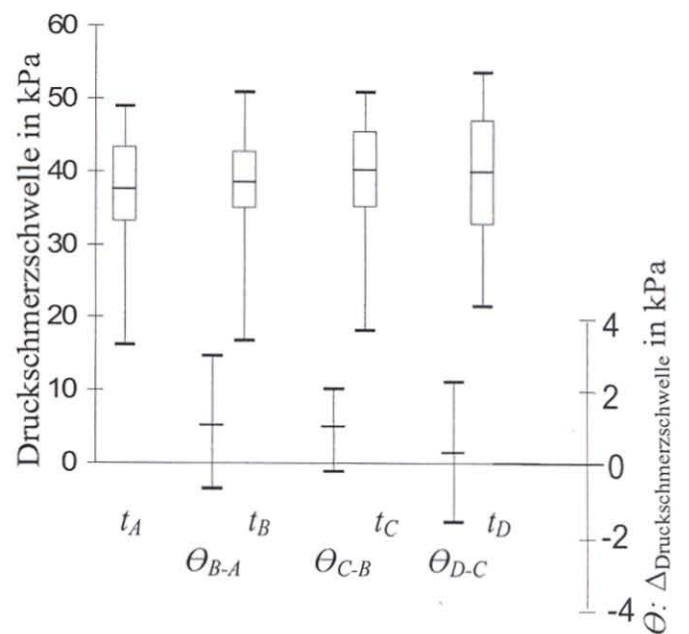


Abb. 5.5-2: Box- und whisker-plots der Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Druckschmerzschwellen in den Gruppen I bis IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D sowie Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}_{B-A}$, $\hat{\theta}_{C-B}$ und $\hat{\theta}_{D-C}$ mit den 95 % Konfidenzintervallen

5.6 Korrelationen zwischen den Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate bzw. des Cortisols und den Temperatur- und Druckschmerzschwellen

Die Korrelationen zwischen den Druck- und Temperaturschmerzschwellen und den Konzentrationen von POMC-Derivaten, Cortisol, TNF- α und IL-1 β wurden mit Hilfe des Spearman-Rangkorrelationskoeffizienten für jeden Messzeitpunkt berechnet (siehe 4.9.2). Alle Korrelationen mit den zugehörigen Wahrscheinlichkeiten sind im Anhang dargestellt.

5.6.1 Korrelationen der Konzentrationen der POMC-Derivate mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen

Zwischen den Konzentrationen der bestimmten POMC-Derivate (β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM (84E), β -Endorphin-IRM (Nichols[®]), β -Endorphin (1-31), ACTH) und den gemessenen Temperatur- und Druckschmerzschwellen konnten zu keinem Messzeitpunkt signifikante Korrelationen nachgewiesen werden.

5.6.2 Korrelationen der Konzentration von Cortisol im Blutplasma mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen

Zwischen den Druckschmerzschwellen und den Konzentrationen von Cortisol wurde keine signifikante Korrelation gefunden.

Eine signifikante Korrelation konnte zwischen den Temperaturschmerzschwellen und der Konzentration von Cortisol in den Gruppen III (Placebo/Naloxon) und IV (Placebo/Placebo) beobachtet werden (Tabelle 5.6.2-1).

Tab. 5.6.2-1: Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) zwischen Temperaturschmerzschwellen und Cortisolkonzentrationen in den Gruppen III und IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D

	t_A	t_B	t_C	t_D
III	$r_s = 0,44$ $P = 0,09$	$r_s = 0,68$ $P = 0,00$	$r_s = 0,63$ $P = 0,01$	$r_s = 0,65$ $P = 0,01$
IV	$r_s = 0,39$ $P = 0,14$	$r_s = 0,48$ $P = 0,06$	$r_s = 0,45$ $P = 0,08$	$r_s = 0,52$ $P = 0,04$

In Abbildung 5.6.2-1 sind die Temperaturschmerzschwellen der 16 Probanden gegen die jeweiligen Konzentrationen von Cortisol, ermittelt vor Beginn der Schmerzschwellenbestimmung, abgebildet (Gruppen III und IV).

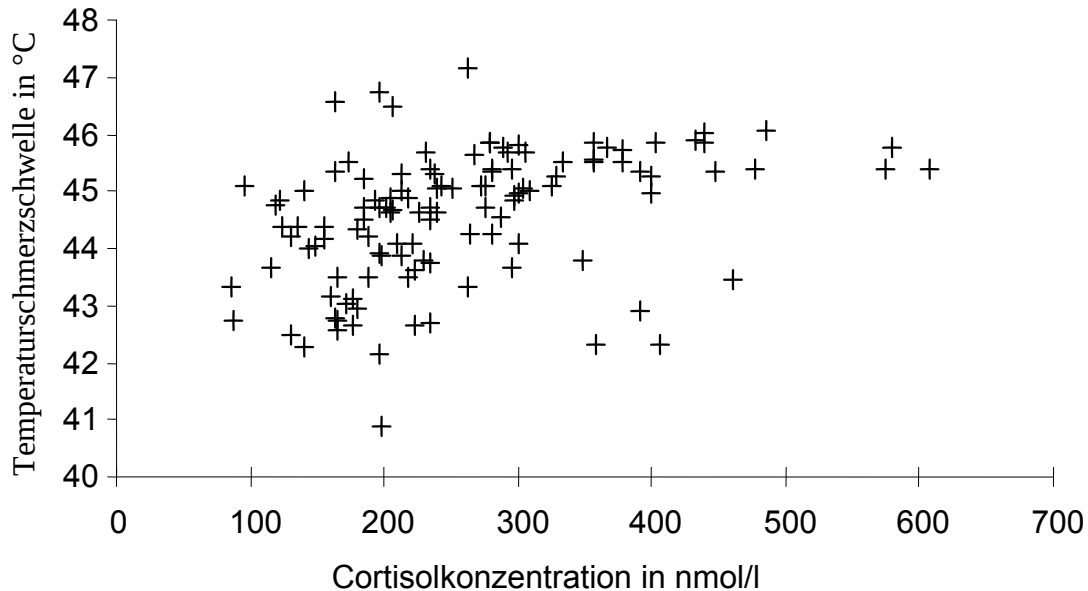


Abb. 5.6.2-1: Beziehung zwischen der Temperaturschmerzschwelle und der Konzentration von Cortisol in den Plasmaproben der 16 Probanden in den Gruppen III und IV ($n = 128$) zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D

Die getrennte Betrachtung der Korrelationen zwischen den Temperaturschmerzschwellen und den Konzentrationen von Cortisol der weiblichen und männlichen Probanden zeigte, dass die positiven Korrelationen ausschließlich auf Korrelationen in der Gruppe der weiblichen Probanden zurückzuführen waren (Tabelle und Abbildung 5.6.2-2).

Tab. 5.6.2-2: Korrelationskoeffizienten nach Spearman (r_s) zwischen den Temperaturschmerzschwellen und den Konzentrationen von Cortisol der weiblichen (w) und männlichen (m) Probanden in den Gruppen III und IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D

	t_A		t_B		t_C		t_D	
	w	m	w	m	w	m	w	m
III	$r_s = 0,85$ $P = 0,01$	$r_s = 0,24$ $P = 0,56$	$r_s = 0,78$ $P = 0,04$	$r_s = 0,29$ $P = 0,49$	$r_s = 0,61$ $P = 0,15$	$r_s = 0,24$ $P = 0,57$	$r_s = 0,72$ $P = 0,07$	$r_s = 0,55$ $P = 0,16$
IV	$r_s = 0,36$ $P = 0,43$	$r_s = 0,08$ $P = 0,84$	$r_s = 0,75$ $P = 0,05$	$r_s = 0,21$ $P = 0,62$	$r_s = 0,71$ $P = 0,07$	$r_s = 0,57$ $P = 0,14$	$r_s = 0,68$ $P = 0,09$	$r_s = 0,26$ $P = 0,54$

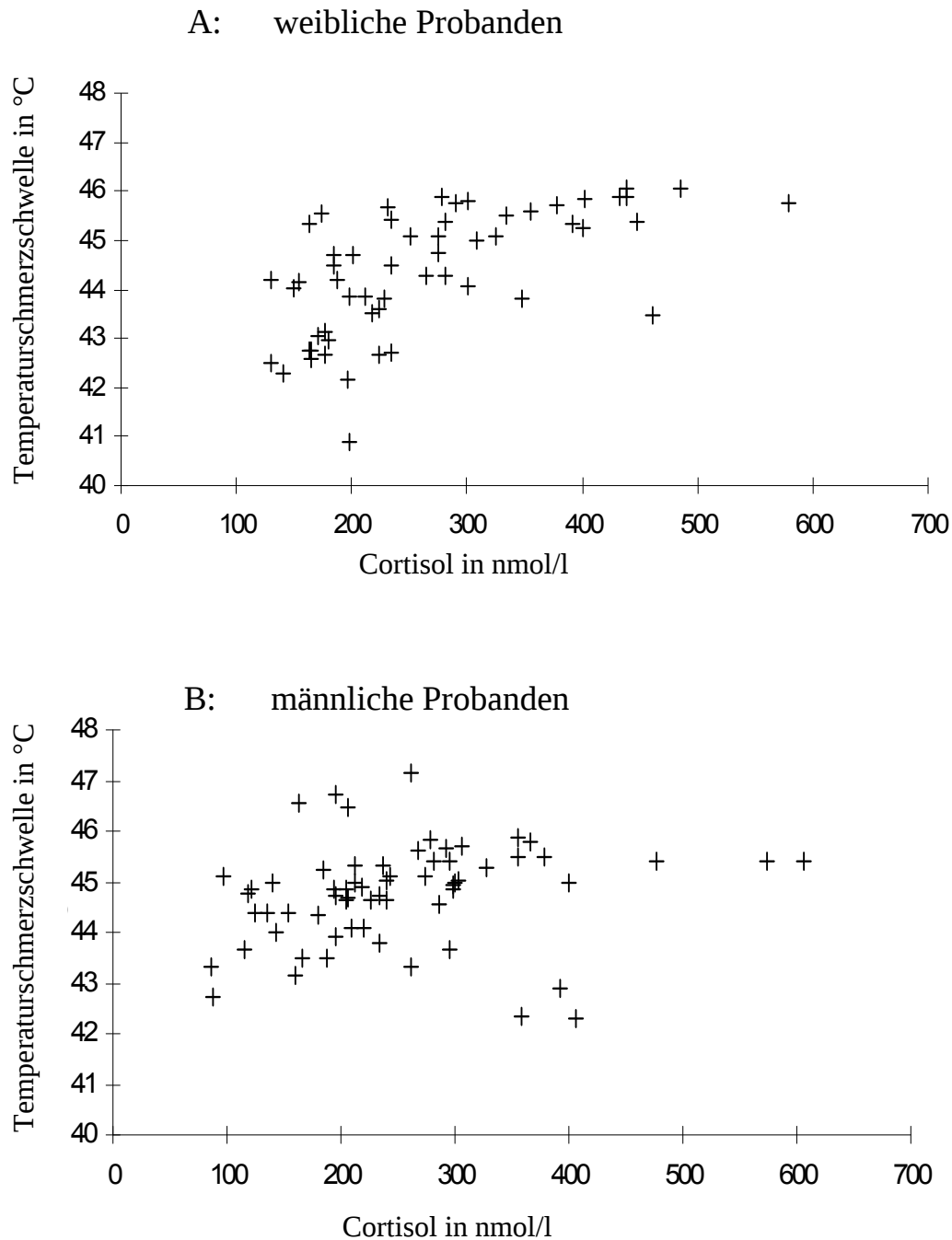


Abb. 5.6.2-2: Beziehung zwischen der Temperaturschmerzschwelle und der Konzentration von Cortisol für weibliche (A, $n = 64$) und männliche (B, $n = 64$) Probanden in den Gruppen III und IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D

In den Gruppen I (CRH/Naloxon) und II (CRH/Placebo) wurden keine signifikanten Korrelationen zwischen Temperaturschmerzschwellen und den Konzentrationen von Cortisol beobachtet.

5.7 Plasmakonzentrationen der Zytokine und Korrelationen der Zytokinkonzentrationen mit den Konzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols sowie mit den Schmerzschwellen

In keiner der Gruppen I bis IV und zu keinem der Messzeitpunkte t_A bis t_D konnten signifikante Veränderungen der Konzentrationen von TNF- α oder IL-1 β beobachtet werden.

Des Weiteren ergaben sich weder signifikante Korrelationen zwischen den Konzentrationen von TNF- α und IL-1 β und den Konzentrationen der untersuchten POMC-Derivate und des Cortisols noch mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen.

5.8 Veränderungen der Herzfrequenzen und Korrelationen zwischen den Herzfrequenzen und den Temperatur- und Druckschmerzschwellen

Die Herzfrequenzen der Probanden wurden parallel zu den Schmerzschwellen gemessen. Die Quartile, Minimal- und Maximalwerte sowie die Hodges-Lehmann-Schätzer mit ihren 95 % Konfidenzintervallen der parallel zu den Temperaturschmerzschwellen gemessenen Herzfrequenzen sind in der Abbildung 5.8-1 dargestellt. In den Gruppen I (CRH/Naloxon) und II (CRH/Placebo) ist zwischen den Messzeitpunkten t_A und t_B ein signifikanter Anstieg der Herzfrequenzen, gefolgt von einem signifikanten Abfall zwischen den Messzeitpunkten t_B und t_C , zu verzeichnen.

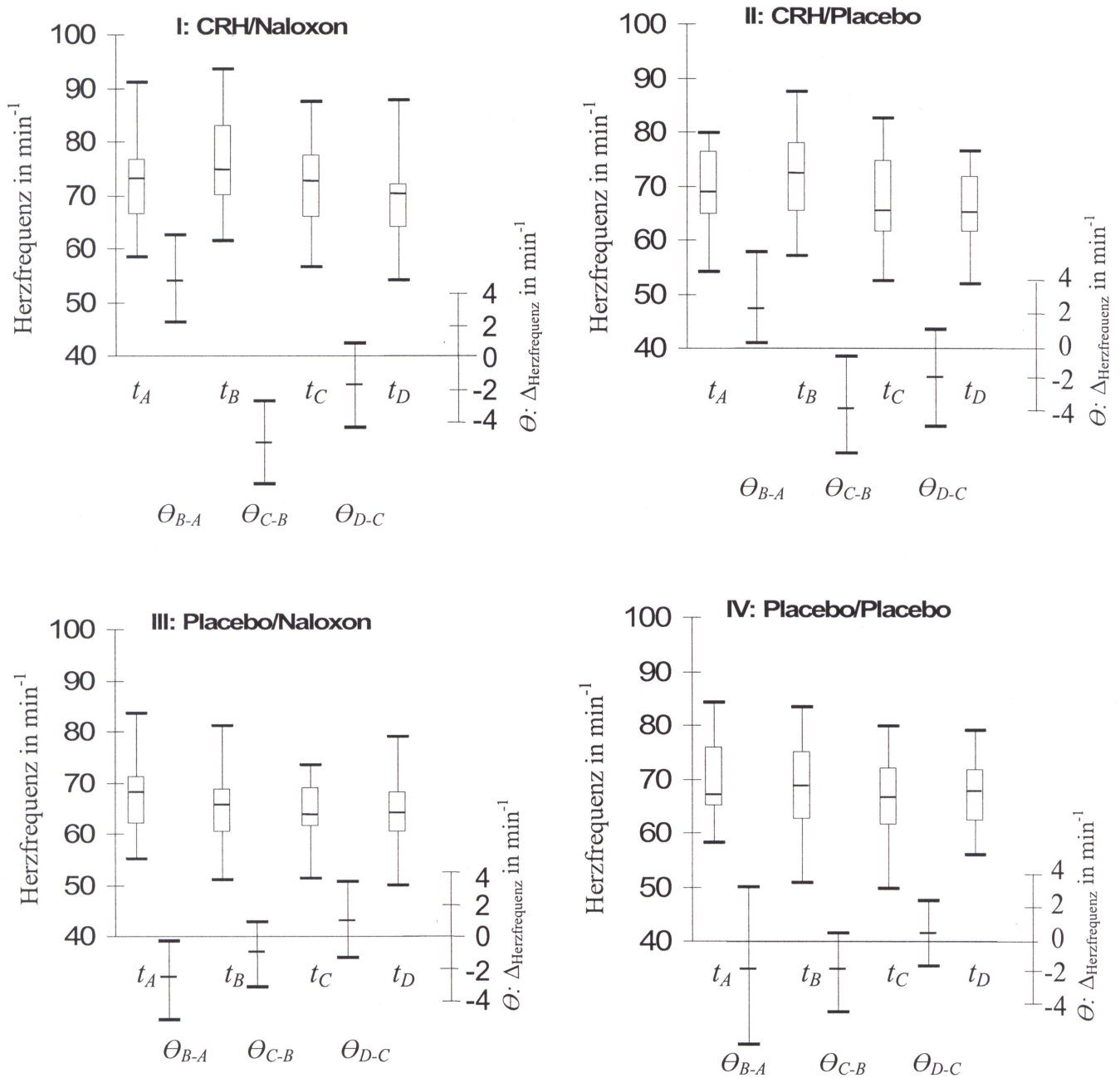
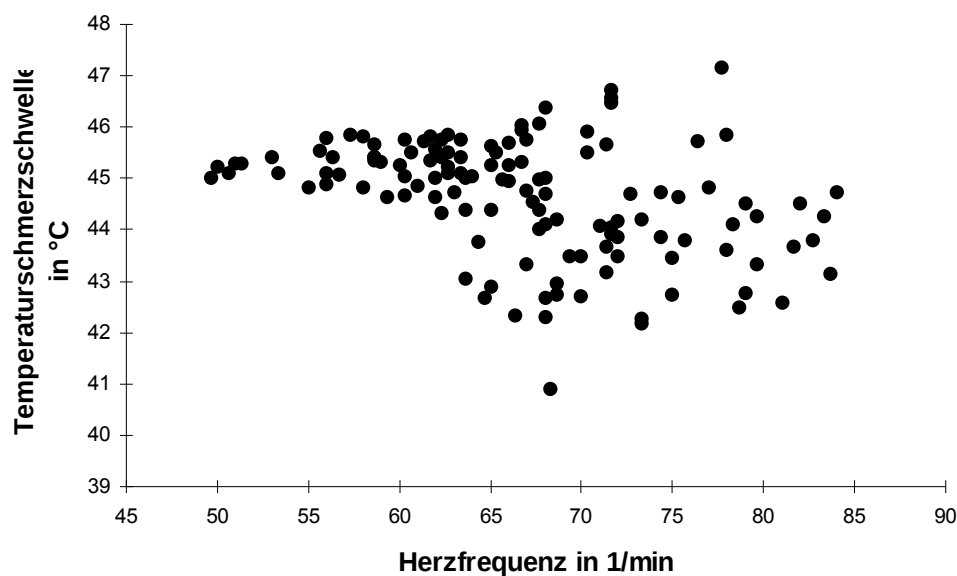


Abb. 5.8-1: Box- und whisker-plots der Quartile, Minimal- und Maximalwerte der Herzfrequenzen in den Gruppen I bis IV zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D sowie Hodges-Lehmann-Schätzer $\hat{\theta}_{B-A}$, $\hat{\theta}_{C-B}$ und $\hat{\theta}_{D-C}$ mit den 95 % Konfidenzintervallen

5.8.1 Korrelation der Herzfrequenz mit der Temperaturschmerzschwelle

In den Gruppen III (Placebo/Naloxon) und IV (Placebo/Placebo) liegen zu allen Messzeitpunkten negative Korrelationen zwischen der Herzfrequenz und der Temperaturschmerzschwelle vor (r_s (III; t_A) = -0,53 mit $P = 0,04$; r_s (III; t_B) = -0,52 mit $P = 0,04$; r_s (III; t_C) = -0,49 mit $P = 0,05$; r_s (III; t_D) = -0,49 mit $P = 0,05$; r_s (IV; t_A) = -0,48 mit $P = 0,06$; r_s (IV; t_B) = -0,60 mit $P = 0,01$; r_s (IV; t_C) = -0,55 mit $P = 0,03$; r_s (IV; t_D) = -0,35 mit $P = 0,18$). Abbildung 5.8.1-1 veranschaulicht die Korrelation zwischen Temperaturschmerzschwelle und Herzfrequenz zu den Messzeitpunkten t_A bis t_D der Gruppen III (Placebo/Naloxon) und IV (Placebo/Placebo). Die Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman und die Wahrscheinlichkeiten P für das Zutreffen der Null-Hypothese sind im Anhang dargestellt.



5.8.1-1: Beziehung zwischen Temperaturschmerzschwelle und Herzfrequenz (Gruppen III und IV)

5.8.2 Korrelation der Herzfrequenz mit der Druckschmerzschwelle

In den Gruppen I, II und III ergaben sich keine Korrelationen zwischen Herzfrequenz und Druckschmerzschwelle ($P > 0,10$). In der Gruppe IV (Placebo/Placebo) bestehen schwach negative Korrelationen zu allen vier Messzeitpunkten ($P \leq 0,10$). Die Ergebnisse der statistischen Auswertung sind im Anhang dargestellt.

6 Diskussion

Die hier vorliegende Studie ist das erste Experiment an Menschen, in dem unter kontrollierten Bedingungen der Einfluss von Veränderungen der Plasmakonzentrationen von β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31) und β -LPH-IRM nach intravenöser Applikation von CRH auf zwei verschiedene Schmerzmodalitäten, den Druck- und den Temperaturschmerz, untersucht wurde. Diese Studie wurde durchgeführt, da bisher in keinem Experiment am Menschen versucht wurde, die vermutete analgetische Wirkung von CRH (via β -Endorphinfreisetzung) mit Naloxon zu antagonisieren.

6.1 Diskussion zum Studienkonzept

6.1.1 Auswahl der Tageszeit

Die Freisetzung von CRH aus dem Hypothalamus unterliegt einem zirkadianen Rhythmus mit Maximalwerten in den frühen Morgenstunden (gegen 6 Uhr). Um Interferenzen zwischen pharmakologischer und endogener Stimulation der HPA-Achse möglichst gering zu halten, erfolgten die Versuche nachmittags zu vergleichbaren Tageszeiten (14-19 Uhr).

6.1.2 Auswahl der Medikamente

CRH (Corticotropin releasing hormone)

Im Studienkonzept der hier vorliegenden Studie war ursprünglich die intravenöse Applikation von 300 μ g CRH vorgesehen. Wegen eines deutlichen Anstiegs der Herzfrequenz und einer Gesichtsrötung war eine Verblindung nicht möglich. Aus diesem Grund wurde die Dosierung von CRH auf 100 μ g reduziert und liegt damit in der gleichen Größenordnung wie in bisherigen Studien (Lautenbacher et al., 1999; Hargreaves et al., 1987a; Schürmeyer et al., 1984).

Naloxon

β -Endorphin bindet mit hoher Affinität sowohl an μ - als auch an δ -Opioidrezeptoren (Pater-son et al., 1983; Holaday et al., 1989). Naloxon, ein potenter Antagonist an μ - und δ -Opioidrezeptoren, ist somit geeignet, einen Einfluss von β -Endorphin auf die Schmerz-wahrnehmung zu untersuchen.

Um den Einfluss von Naloxon an κ -Opioidrezeptoren möglichst gering zu halten, sollte des-sen Dosis nicht zu hoch gewählt werden. Aus diesem Grund wurde eine Naloxon-Dosis von 1,2 mg (i.v.) gewählt.

6.1.3 Auswahl der Messzeitpunkte

Die Konzentrationen von β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM (84E), β -Endorphin (1-31), β -Endorphin-IRM (Nichols[®]), ACTH, Cortisol, TNF- α und IL-1 β wurden zu folgenden Mess-zeitpunkten bestimmt:

- t_A : Basalwerte (nach einer Entspannungsphase von 20 Minuten)
- t_B : 15 Minuten nach Applikation des ersten Medikaments (CRH oder Placebo)
- t_C : 30 Minuten nach Applikation des ersten Medikaments
- t_D : 5 Minuten nach Applikation des zweiten Medikaments (Naloxon oder Placebo)

Da die Konzentrationen von ACTH und β -Endorphin im Blutplasma etwa 30 Minuten und die Konzentrationen von Cortisol etwa 45 Minuten nach intravenöser Applikation von 100 μ g CRH ansteigen (Stalla et al., 1984; Lautenbacher et al., 1999; Gibson et al., 1994), wurden die Messzeitpunkte auf 15 und 30 Minuten nach CRH-Applikation festgesetzt.

Die Blockade der Opioidrezeptoren nach intravenöser Injektion von Naloxon tritt bereits nach ein bis zwei Minuten ein. Die Bestimmung der Konzentrationen der untersuchten Peptide und der Schmerzschwellen fünf Minuten nach Gabe von Naloxon schien deshalb sinnvoll.

6.2 β -Endorphin-Radioimmunoassays

In vielen bisherigen Studien war eine Unterscheidung zwischen β -Endorphin (1-31) und β -Endorphin-IRM im Blutplasma mit Hilfe von Radioimmunoassays aufgrund des Fehlens spezifischer, ausschließlich β -Endorphin (1-31) nachweisender Radioimmunoassays lange Zeit nicht möglich. Bisherige RIA-Systeme, wie der vom Nichols[®]-Institut entwickelte β -Endorphin-IRM-RIA, wiesen hohe Kreuzreaktivitäten mit anderen POMC-Derivaten, wie β -LPH oder N-Acetyl- β -Endorphin auf.

In der vorliegenden Studie wurde gezeigt, dass die Konzentrationen von β -LPH (93E RIA) positiv mit den Konzentrationen von β -Endorphin-IRM (Nichols[®]) korrelieren. β -LPH stellt also den größten Anteil des mit dem Nichols[®]-RIA gemessenen β -Endorphin-IRM dar.

6.3 Konzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols im kardiovaskulären Kompartiment

6.3.1 Einfluss von CRH auf die Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols

Wie erwartet stiegen die absoluten Konzentrationen und die Flächen unter den Plasmaspiegelkurven (AUC) von β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31), ACTH und Cortisol nach intravenöser Applikation von CRH signifikant an. Der Anstieg der Konzentrationen zwischen den Abnahmezeitpunkten t_A und t_B (15 Minuten nach intravenöser Applikation von CRH) war signifikant. Die Cortisolkonzentrationen stiegen auch, wie erwartet zeitverzögert zwischen t_B und t_C (30 Minuten nach intravenöser Applikation von CRH) signifikant an.

Da die Freisetzung von Cortisol durch ACTH stimuliert wird, folgte wie erwartet der Anstieg der Konzentrationen des Cortisols dem des ACTH.

Die Ergebnisse stimmen mit der in der Literatur beschriebenen Freisetzungskinetik von POMC-Derivaten und Cortisol im Blutplasma von Gesunden nach Injektion von 100 μ g CRH überein (Stalla et al., 1984; Lautenbacher et al., 1999; Hargreaves et al., 1987a).

6.3.2 Einfluss von Naloxon auf die Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols

Die Applikation von Naloxon (1,2 mg i.v.) führte zum Messzeitpunkt t_D (5 Minuten nach Applikation von Naloxon) zu keiner signifikanten Veränderung der Konzentrationen von β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31), ACTH und Cortisol.

Es wurde beschrieben, dass Naloxon die HPA-Achse durch Hemmung der inhibitorischen Wirkung der Opioide auf die CRH-Freisetzung im Hypothalamus stimuliert und somit zu einem Anstieg der Konzentrationen von POMC-Derivaten und Cortisol im Plasma führt (Delitala et al. 1994; Schluger et al., 1998; Wand et al., 1998). Die Konzentrationen von ACTH im Blutplasma erreichten jedoch erst 30 Minuten nach Injektion von Naloxon Maximalwerte, die Cortisolkonzentrationen sogar erst nach 60 Minuten (Wand et al., 1998). 5 Minuten nach Gabe von Naloxon (t_D) ist demnach nicht mit einem signifikanten Anstieg der Konzentrationen zu rechnen.

6.4 Beziehungen zwischen den Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols

6.4.1 Korrelationen der Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate untereinander

Die Konzentrationen von β -LPH-IRM und ACTH korrelierten nach intravenöser Applikation von CRH positiv miteinander. Unter Ruhebedingungen (zum Zeitpunkt t_A) lagen keine signifikanten Korrelationen zwischen den Konzentrationen von β -LPH-IRM und ACTH vor.

Diese Ergebnisse stimmen mit den von Kuhn et al., 1984, beschriebenen Befunden überein. Das Fehlen einer signifikanten Korrelation zwischen den Konzentrationen von β -LPH-IRM und ACTH zum Zeitpunkt t_A war wahrscheinlich dadurch bedingt, dass zu diesem Zeitpunkt ein Teil der Peptidkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Es lagen keine signifikanten Korrelationen zwischen den Konzentrationen von β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31) und β -LPH-IRM vor.

Das Fehlen von Korrelationen zwischen den Konzentrationen von β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM und β -Endorphin (1-31) zum Zeitpunkt t_A lässt sich dadurch erklären, dass hier ein Teil der Peptidkonzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze lag.

Nach intravenöser Applikation von CRH könnten die unterschiedlichen Halbwertszeiten von β -LPH und β -Endorphin bewirkt haben, dass keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden konnten (Foley et al., 1979). Außerdem wurde nach intravenöser Applikation von CRH eine bevorzugte Freisetzung von β -Endorphin beschrieben (Watson et al., 1988; Gibson et al., 1994).

6.4.2 Korrelationen der Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate mit der Konzentration des Cortisols

Da ACTH die Konzentration von Cortisol im Blutplasma reguliert, lag, wie erwartet, eine positive Korrelation zwischen den Konzentrationen von ACTH und Cortisol zum Zeitpunkt t_A vor.

15 und 30 Minuten nach intravenöser Applikation von CRH bestanden keine signifikanten Korrelationen zwischen den Konzentrationen von ACTH und Cortisol. Die Ausschüttung von ACTH nach CRH-Stimulation erfolgt relativ schnell mit Maximalwerten nach ca. 30 Minuten, gefolgt von einem relativ schnellen Abfall der ACTH Konzentrationen; die Konzentrationen von Cortisol hingegen erreichen erst 45 bis 60 Minuten nach CRH-Stimulation Maximalwerte und fallen relativ langsam wieder ab (Stalla et al., 1984).

6.5 Einfluss von CRH und Naloxon auf die Temperatur- und Druckschmerzschwellen

6.5.1 Einfluss von CRH auf Temperatur- und Druckschmerzschwellen

Nach intravenöser Applikation von 100 μ g CRH konnte zum Messzeitpunkt t_B ein signifikanter Anstieg der Druckschmerzschwellen beobachtet werden. Hingegen blieben die Temperaturschmerzschwellen zu allen Messzeitpunkten unverändert.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass durch Temperatur- und Druckreize unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden (siehe Treede et al., 1992). So scheint mechanisch indu-

zierter Schmerz über zentrale Mechanismen verarbeitet zu werden (Sang et al., 1996; Voerman et al., 2000), wohingegen periphere Mechanismen eine wichtige Rolle in der Verarbeitung thermischer Schmerzreize spielen sollen (Kuraishi et al., 1985; Koppert et al., 1999).

CRH könnte an verschiedenen Stellen des zentralen und des peripheren Nervensystems in die Schmerzverarbeitung eingreifen (Lariviere and Melzack, 2000) und dort die Druckschmerzschwelle beeinflussen.

Wirkung des CRH auf das periphere Nervensystem

Auf den peripheren Enden subkutaner sensorischer Neurone konnten keine CRH-Rezeptoren nachgewiesen werden (Mousa et al., 1996), so dass eine lokale Wirkung von CRH auf die Temperaturschmerzsensibilität ohnehin ausgeschlossen werden kann. Es wurden jedoch CRH-Rezeptoren auf sensorischen (Schäfer et al., 1997) und sympathischen (Dunn and Berridge, 1990) Ganglien nachgewiesen. Im Blutkreislauf zirkulierendes CRH könnte somit den afferenten Input ins ZNS und dadurch die Schmerzwahrnehmung beeinflussen.

Wirkung des CRH auf das zentrale Nervensystem

Viele Autoren behaupten, CRH könne nach intravenöser Applikation nur außerhalb des ZNS wirksam sein (Wei et al., 1986; Poree et al., 1989; Ayesta and Nikolarakis, 1989). Studien weisen jedoch darauf hin, dass CRH die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und zentral wirksam ist (s.u.). Ein Transportmechanismus für CRH vom ZNS in das kardiovaskuläre System wurde beschrieben (Martins et al., 1996), und Martins et al. schließen nicht aus, dass ein kleiner Anteil von CRH die Blut-Hirn-Schranke in der Gegenrichtung passieren kann. In der Tat konnte ein Übertreten von CRH vom kardiovaskulären System in das ZNS bereits gezeigt werden (Kastin and Akerstrom, 2002). So kann angenommen werden, dass im Nanogamm-Bereich liegende Mengen von CRH, deren Wirkung nach direkter Applikation ins ZNS nachgewiesen wurde (Kita et al., 1993; Bianchi et al., 1991 and 1995), die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und zu einer zentralen Wirkung führen. Ein kleiner Anteil des in der vorliegenden Studie intravenös verabreichten CRH könnte somit die Blut-Hirn-Schranke überwinden und auf Rückenmarksebene oder in anderen Regionen des ZNS Einfluss auf die Druckschmerzsensibilität nehmen.

In der Literatur wird ein modulierender Effekt von CRH auf die Schmerzsensibilität auf Rückenmarksebene beschrieben. Immunhistologische Studien wiesen das Vorhandensein von CRH in Nervenfasern im Hinterhorn des Rückenmarks nach (Puder and Papka, 2001), wo die Mehrzahl der schmerzleitenden, primär afferenten C-Fasern endet.

In den Nervenendigungen dieser primär afferenten C-Fasern konnte CRH sowie Substanz P und exzitatorische Aminosäuren nachgewiesen werden. Sowohl Substanz P als auch exzitatorischen Aminosäuren werden durch schmerzhaft stimuli in das Hinterhorn freigesetzt (Urban et al., 1994). In verschiedenen Studien wird beschrieben, dass CRH und Neurokinine wie Substanz P zusammen mit exzitatorischen Aminosäuren die Erregbarkeit auf Rückenmarksebene modulieren (Urban et al., 1994; Liu et al., 2004), und es wird angenommen, dass CRH die Freisetzung von Substanz P aus den primären Afferenzen moduliert. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte ein analgetischer Effekt von CRH im Hinterhorn gezeigt werden (Amit and Galina, 1986).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen, dass CRH eine Wirkung auf die Druckschmerzschwelle, nicht jedoch auf die Temperaturschmerzschwelle hat. In der Literatur wird beschrieben, dass die Freisetzung von Substanz P im Hinterhorn des Rückenmarks durch mechanische, nicht jedoch durch thermische Reize stimuliert wird (Kuraishi et al., 1985). Es konnte bereits gezeigt werden, dass Substanz P- und Neurokinin (NK)-1-Rezeptoren wichtige Mediatoren in der Verarbeitung mechanischer Schmerzreize sind (Pitcher and Henry, 2004). Außerdem scheinen NK-1-Rezeptoren zur mechanischen, nicht jedoch zur thermischen Schmerzsensibilität im Fall von verletzungsbedingtem neuropathischem Schmerz beizutragen (Mansikka et al., 2000). Die Wirkung von CRH auf Rückenmarksebene könnte so die in der vorliegenden Studie beobachtete Verminderung des Druckschmerzes und den fehlenden Einfluss auf den Temperaturschmerz erklären.

6.5.2 Einfluss von Naloxon auf die Temperatur- und Druckschmerzschwellen

Naloxon (1,2 mg i.v.) führte fünf Minuten nach Applikation (t_D) weder zu Veränderungen der Temperatur- noch der Druckschmerzschwellen.

Die Druckschmerzschwellen werden durch Gabe von CRH erhöht. Dieser Effekt ist nicht durch Naloxon antagonisierbar. Eine β -Endorphin-vermittelte Veränderung der Druckschmerzschwellen kann somit ausgeschlossen werden.

6.6 Korrelationen der Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate bzw. des Cortisols mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen

6.6.1 Korrelationen der Konzentrationen der POMC-Derivate im Blutplasma mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen

Zwischen den Konzentrationen der POMC-Derivate (β -LPH-IRM, β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31), ACTH) und den Temperatur- und Druckschmerzschwellen konnten zu den Abnahmezeitpunkten t_A , t_B , t_C und t_D keine signifikanten Korrelationen nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen, dass die intravenöse Gabe von 100 μ g CRH zu einem Anstieg der Druckschmerzschwellen führt. Die Veränderungen der Konzentrationen der POMC-Derivate korrelierten jedoch nicht mit den Veränderungen der Druckschmerzsensibilität. Außerdem stieg die Druckschmerzsensibilität nach intravenöser Verabreichung von Naloxon nicht an. Die Freisetzung von β -Endorphin und der anderen hier untersuchten POMC-Derivate in das kardiovaskuläre Kompartiment kann demzufolge die Erhöhung der Druckschmerzschwelle nach CRH-Gabe nicht erklären. Andere Mechanismen müssen demnach für den analgetischen Effekt verantwortlich sein.

Nach intravenöser Gabe von CRH wurden nur geringe Konzentrationen von β -Endorphin (1-31) im Blutplasma gemessen (kleiner als 50 pmol/l). Die Bindung von β -Endorphin (1-31) an Opioidrezeptoren erfolgt nach dem Massenwirkungsgesetz (6.6.1-1)

$$K_D = \frac{C_{\text{Opioid}} \cdot C_{\text{Opioidrezeptor}}}{C_{\text{Opioid / Opioid-Rezeptor-Komplex}}} \quad (6.6.1-1)$$

Die Gleichgewichtskonstante K_D für die Bindung von β -Endorphin (1-31) an geklonte μ - oder δ -Opioidrezeptoren liegt im Nanomol-Bereich ($K_D \approx 10^{-9}$ mol/l) (Kieffer, 1995).

Von einer β -Endorphin-Konzentration von 50 pmol/l ausgehend ergibt sich nach Gleichung (6.6.1-2):

$$C_{\text{Opioid / Opioid-Rezeptor-Komplex}} \approx 0,05 \cdot C_{\text{Opioid-Rezeptor}} \quad (6.6.1-2)$$

Demzufolge kann β -Endorphin (1-31), das sich im kardiovaskulären System befindet, nur mit etwa 5 % der peripheren Opioid-Rezeptoren interagieren. Es kann also angenommen werden,

dass die hier gemessenen Plasmakonzentrationen von β -Endorphin (1-31) zu gering sind, um analgetisch wirksam zu sein. Diese Annahme stimmt mit dem Ergebnis einer Studie überein, in der nach Gabe von CRH vergleichbare Konzentrationen von β -Endorphin-IRM im Blutplasma nachgewiesen wurden und in der keine analgetische Wirkung beobachtet wurde (Lautenbacher et al., 1999). Ebenfalls stimmt diese Annahme mit der Tatsache überein, dass weder nach Infusion von β -Endorphin, die, im Vergleich zur intravenösen Applikation von CRH, zu einem 100fach höherem β -Endorphin Plasmaspiegel führte (Lacoumenta et al., 1987), noch bei Patienten unter postoperativem Schmerz (Matejec et al., 2003 and 2006) eine analgetische Wirkung von β -Endorphin gezeigt werden konnte.

Jedoch lässt die Konzentration von β -Endorphin (1-31) im Blutplasma keine Rückschlüsse auf die Konzentration von β -Endorphin (1-31) im peripheren Gewebe zu. Hohe lokale β -Endorphin (1-31)-Konzentration im Bereich von Opioidrezeptoren im peripheren Gewebe sind möglich. So kann eine analgetische Wirkung von β -Endorphin (1-31) im peripheren Gewebe, wie schon beschrieben (Janson et al., 2003; Schäfer et al., 1994), nicht ausgeschlossen werden.

6.6.2 Korrelationen der Konzentration von Cortisol im Blutplasma mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen

Zwischen den Konzentrationen von Cortisol und den Temperaturschmerzschwellen konnten zu allen Messzeitpunkten in den Gruppen III (Placebo/Naloxon) und IV (Placebo/Placebo) bei den weiblichen Probanden signifikante Korrelationen nachgewiesen werden.

Die Cortisolkonzentrationen im Blutplasma scheinen Einfluss auf die Temperaturschmerzschwellen zu haben. Eine Erhöhung der Cortisolkonzentrationen durch die Temperaturschmerzschwellenmessungen kann ausgeschlossen werden, da die Blutabnahmen stets vor der Schmerzschwellenbestimmung erfolgten.

Cortisol wirkt antiinflammatorisch; eine leichte Entzündung, ausgelöst durch die wiederholten Messungen der Temperaturschmerzschwellen an der selben Stelle, könnte die unterschiedlichen Einflüsse von Cortisol auf die Temperatur- bzw. Druckschmerzschwellen erklären.

CRH scheint die Korrelationen zwischen Cortisolkonzentrationen und Temperaturschmerzschwellen zu stören. Ursache dafür könnte ein von Cortisol unabhängiger Einfluss von CRH auf die Temperaturschmerzwahrnehmung sein.

Unklar bleibt, warum nur bei den weiblichen Probanden eine Korrelation zwischen der Temperaturschmerzschwelle und der Cortisolkonzentration beobachtet wurde.

Al'Absi et al. beobachteten positive Korrelationen zwischen Konzentration von Cortisol und Temperaturschmerzschwellen bei männlichen Probanden unter Ruhebedingungen (al'Absi und Petersen, 2002, 2003). In der Studie von al'Absi et al., 2002, wurden die Korrelationen mit Hilfe der Methode der linearen Regression bestimmt. Da die Messdaten der Probanden nicht auf eine Normalverteilung überprüft wurden, ist das Ergebnis dieser erhaltenen Konzentrationen fragwürdig.

In anderen Studien wurden Korrelationen zwischen Konzentrationen von Cortisol und Schmerzsensibilitäten bei Frauen beschrieben (Heim et al., 1998; Theorell et al., 2000).

6.7 Plasmakonzentrationen der Zytokine und Korrelationen der Zytokinkonzentrationen mit den Konzentrationen der POMC-Derivate und des Cortisols sowie mit den Schmerzschwellen

Weder nach CRH- noch nach Naloxongabe veränderten sich die Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α im Blutplasma signifikant. Des Weiteren ergaben sich keine signifikanten Korrelationen der Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α mit den Konzentrationen der POMC-Derivate oder den Temperatur- und Druckschmerzschwellen.

Da keine Korrelationen zwischen den Konzentrationen von IL-1 β und TNF- α und POMC-Derivaten beobachtet wurden, konnte die in der Literatur beschriebene Stimulation der HPA-Achse durch proinflammatorische Zytokine in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden. Die Konzentrationen der Zytokine waren wahrscheinlich zu gering, um eine Wirkung auf die HPA-Achse zu haben, ebenso schienen die untersuchten Zytokine weder die Temperatur- noch die Druckschmerzschwellen zu beeinflussen.

6.8 Veränderungen der Herzfrequenzen während der Versuche und Korrelationen der Herzfrequenz mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen

In den Gruppen I (CRH/Naloxon) und II (CRH/Placebo) stieg von Messzeitpunkt t_A bis t_B die Herzfrequenz signifikant an, von t_B nach t_C fiel die Herzfrequenz wieder signifikant ab. In der Gruppe III (Placebo/Naloxon) fiel die Herzfrequenz zwischen t_A und t_B signifikant ab. In der Gruppe IV (Placebo/Placebo) lag keine signifikante Änderung der Herzfrequenz vor.

Es wurde beschrieben, dass hohe Dosen von CRH (5 µg/kg KG) zu einer Erhöhung der Herzfrequenz führen (Schürmeyer et al., 1984). In der hier vorliegenden Studie wurde durch die intravenöse Applikation von 100 µg CRH ein wenige Minuten andauernder Anstieg der Herzfrequenz hervorgerufen.

Der Abfall der Herzfrequenz von t_A nach t_B in der Gruppe III könnte durch eine stressbedingte Erhöhung der Herzfrequenz zum Zeitpunkt t_A bedingt sein. Auch in der Gruppe IV kam es zwischen t_A und t_B zu einem Abfall der Herzfrequenz, der jedoch nicht signifikant war.

In den Gruppen III (Placebo/Naloxon) und IV (Placebo/Placebo) korrelierten die Herzfrequenzen signifikant negativ mit den gemessenen Temperaturschmerzschwellen.

Al’Absi et al. (2002) erhielten ein ähnliches Ergebnis, indem sie eine negative Korrelation zwischen den Ruheherzfrequenzen und den Schmerzschwellen (Kältereize) von Probanden nachweisen konnten.

Unklar bleibt, ob eine Abhängigkeit zwischen den Temperaturschmerzschwellen und den Herzfrequenzen besteht oder ob beide Größen von einer dritten Größe gleichermaßen beeinflusst werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von CRH zu einem kurzzeitigen Anstieg der Herzfrequenz führt, dies jedoch keinen Einfluss auf die Temperaturschwellen hat. CRH könnte durch seine Wirkung auf die Herzfrequenz die Korrelationen zwischen Herzfrequenz und Temperaturschmerzschwelle stören.

7 Zusammenfassung

Die Stressantwort des Organismus beinhaltet u.a. die Freisetzung von CRH (Corticotropin releasing hormone) aus dem Hypothalamus, welche die Expression von Proopiomelanocortin (POMC) und die Sekretion von POMC-Derivaten wie Adrenocorticotropin (ACTH), β -Lipotropin (β -LPH) und β -Endorphin aus der Hypophyse in das kardiovaskuläre System stimuliert. Es wurde gezeigt, dass Stress zu Analgesie führt. Dieses wurde auf die Wirkung des β -Endorphins als Opioidpeptid zurückgeführt. Die nach Applikation von CRH beobachtete Analgesie wurde mit demselben Mechanismus erklärt, jedoch wurde bisher in keiner Studie am Menschen versucht, die analgetische Wirkung des CRH durch einen Opioidantagonisten aufzuheben.

Deshalb untersuchten wir die Wirkung von 100 μ g intravenös verabreichtem CRH mit bzw. ohne nachfolgende intravenöse Gabe von 1,2 mg Naloxon auf die Temperatur- und Druckschmerzsensibilität von 16 gesunden Probanden in einer doppelblind randomisierten, placebokontrollierten Studie. Um weiterhin die Möglichkeit eines analgetischen Effekts von CRH über die Freisetzung von POMC-Derivaten zu prüfen, wurden die Konzentrationen von β -Endorphin-immunoreaktivem Material (IRM), authentischem β -Endorphin (β -Endorphin (1-31)) und β -LPH-IRM zusammen mit Temperatur- und Druckschmerzschwellen vor, 15 und 30 Minuten nach intravenöser Applikation von CRH (oder Placebo) und fünf Minuten nach intravenöser Applikation von Naloxon (oder Placebo), welches 40 Minuten nach CRH-Injektion verabreicht wurde, gemessen.

CRH führte zum Anstieg der Konzentrationen von β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31), ACTH und β -LPH-IRM im Blutplasma. Die Applikation von CRH war ohne Auswirkung auf die Temperaturschmerzschwellen, wohingegen die Druckschmerzschwellen durch CRH signifikant erhöht wurden. Durch Naloxon konnte dieser Effekt nicht beeinflusst werden. Weder die Konzentrationen von β -Endorphin-IRM noch von β -LPH-IRM, ACTH oder β -Endorphin (1-31) korrelierten mit den Temperatur- und Druckschmerzschwellen. Wir schlossen aus diesen Ergebnissen, dass CRH den Druckschmerz, nicht jedoch den Temperaturschmerz beeinflusst; POMC-Derivate wie β -Endorphin-IRM, β -Endorphin (1-31) oder β -LPH sind nicht für diesen Effekt verantwortlich.

Abstract

Mammalian stress response includes the hypothalamic release of corticotropin releasing hormone (CRH), which stimulates pituitary proopiomelanocortin (POMC) gene expression and secretion of POMC derivatives such as adrenocorticotrophic hormone (ACTH), β -lipotropin (β -LPH) or β -endorphin into the cardiovascular system. Stress has been shown to provoke analgesia, which has been interpreted as an opioid effect elicited by β -endorphin. Analgesia observed upon CRH administration has been explained by the same mechanism; this, however, has not been confirmed by reversal of CRH-induced analgesia by an opioid antagonist in humans.

Therefore, we studied the effects of 100 μ g intravenously administered CRH followed by subsequent administration of 1.2 mg naloxone on heat and pressure pain sensitivity in 16 healthy volunteers, using a double blind, crossover and placebo-controlled design. To further evaluate analgesic effects of CRH via release of POMC derivatives, we determined plasma concentrations of β -endorphin immunoreactive material (IRM), authentic β -endorphin (β -endorphin(1-31)), β -LPH IRM, in parallel with heat and pressure pain thresholds before, 15 and 30 minutes after treatment with CRH (or placebo) and 5 minutes after naloxone (or placebo) administration which was administered 40 minutes after CRH (or placebo) injection.

CRH increased levels of β -endorphin-IRM, β -endorphin(1-31) and β -LPH-IRM. Furthermore, CRH did not induce increases of heat pain thresholds, but increases of pressure pain thresholds, which, however, were not decreased by naloxone. Neither β -endorphin-IRM nor β -LPH IRM or β -endorphin(1-31) levels correlated with heat or pressure pain thresholds. We conclude that CRH does not modulate heat, but pressure pain sensitivity; POMC derivatives like β -endorphin IRM, β -endorphin(1-31), ACTH or β -LPH do not mediate this effect.

Veröffentlichungen der dargestellten Befunde:

Kongressbeiträge:

Matejec R, Hotz C, Uhlich H, Bödeker R-H, Hempelmann G, und Teschemacher H

Die analgetische Wirkung des CRH (Corticotropin releasing hormone) ist nicht β -Endorphin-vermittelt.

Wissenschaftlicher Arbeitstag der DGAI (Deutsche Gesellschaft für Anästhesie und Intensivmedizin), Würzburg, 18.2. bis 19.2.2005

Publikationen (*full papers*):

Matejec R, Uhlich H, Hotz C, Mühling J, Harbach HW, Bödeker R-H, Hempelmann G, and Teschemacher H

Corticotropin releasing hormone reduces pressure pain sensitivity in humans without involvement of β -endorphin(1-31), but does not reduce heat pain sensitivity

Neuroendocrinol 82, 185-197, 2005

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

8 Anhang

8.1 Häufigkeitsverteilung der gemessenen Plasmakonzentrationen der POMC-Derivate, des Cortisols, des TNF- α und des IL-1 β sowie der Temperatur- und Druckschmerzschwellen

Konzentration von β -LPH-IRM in pmol/l

Gruppe	Zeit	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
CRH/ Naloxon	t_A	1,15	6,95	8,46	12,32	30,88
	t_B	6,42	10,58	15,33	23,07	61,84
	t_C	6,93	10,64	19,77	25,34	52,72
	t_D	2,87	10,30	16,14	21,61	70,87
CRH/ Placebo	t_A	3,36	9,24	12,10	19,90	44,02
	t_B	4,93	13,60	18,86	21,77	53,36
	t_C	5,18	14,00	26,12	31,45	73,73
	t_D	2,75	13,58	22,67	29,18	50,45
Placebo/ Naloxon	t_A	2,59	11,59	17,56	21,03	26,42
	t_B	0,96	7,31	13,12	18,77	29,68
	t_C	3,63	7,61	11,19	17,69	22,41
	t_D	0,00	5,11	9,92	11,94	18,12
Placebo/ Placebo	t_A	0,67	3,69	9,94	15,12	36,35
	t_B	1,05	8,30	10,58	17,03	38,05
	t_C	2,75	9,58	15,24	20,42	37,04
	t_D	1,71	8,90	12,27	18,52	37,33

Konzentration von β -Endorphin-IRM in pmol/l

Gruppe	Zeit	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
CRH/ Naloxon	t_A	0,00	0,00	0,00	0,98	3,27
	t_B	0,00	1,59	3,08	4,14	7,79
	t_C	0,00	1,39	2,81	4,79	18,52
	t_D	0,00	0,00	2,96	3,71	8,32
CRH/ Placebo	t_A	0,00	0,00	0,00	0,69	3,31
	t_B	0,00	0,81	1,90	2,84	8,12
	t_C	0,67	1,93	2,54	4,48	7,18
	t_D	0,00	0,68	1,22	2,33	3,79
Placebo/ Naloxon	t_A	0,00	0,00	0,99	1,87	6,47
	t_B	0,00	0,00	0,06	1,24	5,40
	t_C	0,00	0,00	0,00	0,93	5,58
	t_D	0,00	0,00	0,00	1,24	3,88
Placebo/ Placebo	t_A	0,00	0,00	0,00	0,62	5,37
	t_B	0,00	0,00	0,00	1,22	6,45
	t_C	0,00	0,00	0,27	2,70	5,59
	t_D	0,00	0,00	1,10	2,52	4,60

Konzentration von β -Endorphin (1-31) in pmol/l

Gruppe	Zeit	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
CRH/ Naloxon	t_A	0,23	4,90	8,49	14,39	28,14
	t_B	3,75	7,57	15,34	20,86	38,80
	t_C	0,00	5,10	11,32	16,49	27,04
	t_D	0,00	5,97	10,44	19,42	45,18
CRH/ Placebo	t_A	1,50	4,61	7,65	16,42	32,69
	t_B	2,55	8,84	12,84	24,33	34,14
	t_C	4,33	7,60	14,22	14,90	41,98
	t_D	2,54	7,12	8,54	13,92	35,61
Placebo/ Naloxon	t_A	2,44	8,37	10,31	16,53	47,09
	t_B	0,00	6,30	11,31	13,40	36,82
	t_C	0,00	4,80	8,68	16,20	33,18
	t_D	2,74	6,88	8,26	16,34	34,88
Placebo/ Placebo	t_A	0,00	4,11	9,09	13,11	17,90
	t_B	0,00	4,96	8,42	14,21	26,26
	t_C	0,00	5,59	7,48	12,78	24,44
	t_D	0,00	5,52	12,60	14,50	16,54

Konzentration von β -Endorphin-IRM (Nichols®) in pmol/l

Gruppe	Zeit	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
CRH/ Naloxon	t_A	9,86	10,64	11,52	12,17	32,67
	t_B	11,12	11,93	13,39	18,36	33,73
	t_C	9,39	12,93	14,17	19,38	36,26
	t_D	9,85	13,57	14,84	17,94	28,89
CRH/ Placebo	t_A	9,55	10,84	11,57	12,75	27,54
	t_B	8,94	13,67	14,57	16,14	29,71
	t_C	11,53	12,15	14,46	17,22	31,05
	t_D	11,15	12,93	13,33	16,34	36,96
Placebo/ Naloxon	t_A	8,53	10,26	10,99	12,56	26,12
	t_B	8,67	10,06	10,90	11,33	25,43
	t_C	7,84	9,83	10,71	11,82	25,48
	t_D	9,14	10,11	11,16	12,14	30,98
Placebo/ Placebo	t_A	9,52	10,94	11,45	12,64	35,46
	t_B	8,81	10,39	11,34	11,55	29,13
	t_C	8,51	10,58	10,89	12,33	33,92
	t_D	9,19	10,71	11,11	11,64	25,09

Konzentration von ACTH in pmol/l

Gruppe	Zeit	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
CRH/ Naloxon	t_A	1,69	3,21	3,70	4,39	10,27
	t_B	4,73	6,22	7,78	9,45	21,86
	t_C	5,21	7,67	8,51	10,37	26,51
	t_D	4,36	6,49	8,75	10,09	27,99
CRH/ Placebo	t_A	2,77	3,67	4,36	5,29	6,97
	t_B	4,97	6,56	9,29	11,41	20,32
	t_C	5,91	7,50	9,05	13,10	20,53
	t_D	4,68	7,63	10,23	11,48	20,09
Placebo/ Naloxon	t_A	1,84	3,04	3,94	5,26	6,43
	t_B	2,03	2,86	3,39	3,74	5,34
	t_C	2,16	2,52	3,35	3,78	4,26
	t_D	1,55	2,26	3,24	3,97	5,15
Placebo/ Placebo	t_A	1,79	4,09	4,72	4,99	8,10
	t_B	1,55	2,62	3,91	4,90	10,39
	t_C	0,43	2,76	3,31	3,82	8,59
	t_D	1,08	2,46	3,34	3,81	7,70

Konzentration von Cortisol in nmol/l

Gruppe	Zeit	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
CRH/ Naloxon	t_A	168,28	236,55	292,41	378,62	1089,66
	t_B	245,52	325,52	388,97	535,86	1506,21
	t_C	347,59	436,55	506,21	700,00	1655,17
	t_D	397,24	467,59	624,83	731,03	1293,79
CRH/ Placebo	t_A	195,86	271,03	318,62	363,45	515,86
	t_B	286,90	413,79	445,52	475,17	551,72
	t_C	358,62	446,90	569,66	827,59	1655,17
	t_D	411,03	507,59	537,93	716,55	1655,17
Placebo/ Naloxon	t_A	115,86	233,10	271,72	314,48	438,62
	t_B	88,28	175,86	219,31	298,62	485,52
	t_C	140,69	173,10	200,00	278,62	433,10
	t_D	85,52	160,69	180,69	232,41	438,62
Placebo/ Placebo	t_A	140,69	262,07	324,14	383,45	579,31
	t_B	121,38	204,14	257,93	333,10	477,24
	t_C	113,10	193,79	228,97	288,28	606,90
	t_D	96,55	159,31	208,28	244,83	573,79

Konzentration von TNF- α in pg/ml

Gruppe	Zeit	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
CRH/ Naloxon	t_A	2,63	5,83	7,93	15,96	77,44
	t_B	3,15	7,44	9,27	18,75	98,04
	t_C	3,66	7,32	8,54	13,86	87,52
	t_D	3,15	7,44	8,60	16,27	83,08
CRH/ Placebo	t_A	3,11	5,80	9,26	15,13	73,82
	t_B	3,15	7,93	10,59	13,78	84,69
	t_C	5,35	7,79	9,14	12,94	56,12
	t_D	5,35	7,87	9,51	13,16	77,44
Placebo/ Naloxon	t_A	3,13	4,92	7,22	10,43	73,82
	t_B	2,84	5,89	10,04	10,69	76,64
	t_C	3,41	6,97	8,83	13,48	71,81
	t_D	1,62	7,55	9,13	11,92	71,81
Placebo/ Placebo	t_A	3,15	5,73	7,59	9,48	90,75
	t_B	1,62	4,80	10,49	16,99	95,61
	t_C	5,35	7,76	9,65	13,30	82,28
	t_D	5,36	8,30	10,97	13,00	112,77

Konzentration von IL-1 β in pg/ml

Gruppe	Zeit	min.	1. Quart.	2. Quart.	3. Quart.	max
CRH/ Naloxon	t_A	0,00	0,16	0,28	0,35	0,47
	t_B	0,04	0,19	0,31	0,43	2,19
	t_C	0,02	0,15	0,35	0,65	4,20
	t_D	0,02	0,19	0,34	0,50	2,35
CRH/ Placebo	t_A	0,08	0,10	0,20	0,41	4,02
	t_B	0,02	0,17	0,22	0,33	1,02
	t_C	0,02	0,13	0,22	0,46	1,88
	t_D	0,04	0,10	0,25	0,50	4,77
Placebo/ Naloxon	t_A	0,00	0,16	0,23	0,43	1,45
	t_B	0,01	0,07	0,14	0,27	1,13
	t_C	0,00	0,14	0,25	0,37	0,65
	t_D	0,00	0,10	0,26	0,40	3,19
Placebo/ Placebo	t_A	0,01	0,12	0,22	0,38	1,48
	t_B	0,04	0,17	0,39	0,90	2,03
	t_C	0,03	0,11	0,27	0,45	5,48
	t_D	0,06	0,25	0,40	0,47	1,79

Temperaturschmerzschwellen in °C

Gruppe	Zeit	Minimum	1. Quartil	Median	3. Quartil	Maximum
CRH/ Naloxon	t_A	41,5	44,3	44,6	45,4	46,3
	t_B	40,7	44,4	44,8	45,5	47,1
	t_C	41,0	44,2	44,9	45,5	46,7
	t_D	41,1	44,0	44,8	45,5	46,2
CRH/ Placebo	t_A	39,7	44,3	44,8	45,6	47,0
	t_B	40,0	44,1	44,6	45,7	47,5
	t_C	39,9	44,0	44,6	45,6	47,3
	t_D	40,5	44,0	44,7	45,5	47,5
Placebo/ Naloxon	t_A	43,1	44,1	44,7	45,6	46,0
	t_B	42,6	43,9	44,8	45,7	46,4
	t_C	42,2	43,9	44,8	45,6	45,9
	t_D	42,5	43,9	44,8	45,4	45,9
Placebo/ Placebo	t_A	43,3	44,4	45,0	45,7	47,2
	t_B	42,7	44,1	45,0	45,4	46,5
	t_C	42,7	44,2	44,9	45,3	46,7
	t_D	40,9	44,3	45,0	45,4	46,6

Druckschmerzschwellen in kPa

Gruppe	Zeit	min.	1. Quart.	2. Quart.	3. Quart.	max
CRH/ Naloxon	t_A	5,7	29,1	37,3	44,0	53,5
	t_B	8,5	34,3	37,3	45,4	54,4
	t_C	11,5	32,3	38,9	46,3	52,3
	t_D	11,3	31,6	39,1	44,4	52,5
CRH/ Placebo	t_A	6,8	31,3	36,4	42,9	50,3
	t_B	5,3	32,6	41,4	44,7	51,6
	t_C	5,7	35,7	41,6	45,4	52,9
	t_D	5,1	33,0	42,7	48,8	53,2
Placebo/ Naloxon	t_A	14,9	34,6	38,5	44,6	48,5
	t_B	16,3	32,7	41,4	46,8	52,1
	t_C	14,5	29,9	41,0	47,6	54,5
	t_D	13,3	30,1	42,3	44,1	55,1
Placebo/ Placebo	t_A	16,0	33,1	38,0	43,2	48,9
	t_B	16,7	34,8	39,2	42,7	50,8
	t_C	18,1	35,0	40,5	45,4	50,7
	t_D	21,5	32,6	40,4	46,9	53,5

Herzfrequenzen in min⁻¹

Gruppe	Zeit	min.	1. Quart.	2. Quart.	3. Quart.	max
CRH/ Naloxon	t_A	58,3	66,3	72,7	76,8	91,0
	t_B	61,3	69,9	74,8	83,0	93,3
	t_C	56,3	65,8	71,7	77,4	87,3
	t_D	54,0	63,8	70,2	72,2	87,7
CRH/ Placebo	t_A	54,0	64,7	69,0	76,4	79,7
	t_B	57,0	65,2	72,3	78,2	87,3
	t_C	52,3	61,3	65,5	74,8	82,3
	t_D	51,7	61,3	65,3	71,9	76,3
Placebo/ Naloxon	t_A	55,0	62,0	67,5	71,3	83,7
	t_B	51,0	60,3	66,2	68,7	81,0
	t_C	51,3	61,5	63,8	69,1	73,3
	t_D	50,0	60,3	64,5	68,3	79,0
Placebo/ Placebo	t_A	58,0	64,8	67,8	75,8	84,0
	t_B	50,7	62,6	69,0	75,0	83,3
	t_C	49,7	61,3	67,3	72,0	79,7
	t_D	56,0	62,2	68,0	71,7	79,0

8.2 Hodges-Lehmann-Schätzer und 95 % Konfidenzintervall

β-LPH-IRM					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		6,01	0,77	-2,78
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	2,22	-4,32	-9,67
		obere Grenze	20,39	5,69	5,10
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		5,34	6,07	-4,50
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	0,30	-1,43	-10,36
		obere Grenze	11,61	12,85	3,11
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		-3,53	-1,49	-2,83
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-9,49	-6,93	-6,46
		obere Grenze	4,24	3,86	0,57
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		3,27	2,91	-1,57
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-3,98	-2,27	-6,00
		obere Grenze	6,81	7,56	1,76
β-Endorphin-IRM					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		2,28	0,79	-0,48
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	0,65	-1,52	-2,81
		obere Grenze	3,70	1,96	1,25
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		1,56	0,84	-1,59
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	0,72	-0,64	-2,59
		obere Grenze	3,29	2,30	-0,87
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		-0,41	0,00	0,01
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-1,27	-1,61	-0,71
		obere Grenze	0,93	0,75	0,72
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		0,20	0,20	0,00
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,14	-1,02	-1,17
		obere Grenze	0,77	1,75	1,20
β-Endorphin (1-31)					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		5,19	-4,36	0,84
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	2,61	-10,10	-3,78
		obere Grenze	7,99	1,63	6,40
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		4,22	-1,95	-2,35
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	1,28	-6,01	-6,50
		obere Grenze	7,98	2,54	0,79
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		-2,82	-1,13	1,46
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-6,03	-3,99	-1,48
		obere Grenze	1,00	1,14	4,63
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		0,61	-0,95	0,52
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-2,20	-3,35	-1,85
		obere Grenze	3,77	1,79	3,73

β-Endorphin-IRM (Nichols®)					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		2,08	1,14	-0,01
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	0,91	-0,10	-1,62
		obere Grenze	4,56	2,39	0,92
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		2,77	0,45	-0,09
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	1,48	-0,88	-2,00
		obere Grenze	4,38	1,58	1,63
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		-0,43	-0,29	1,05
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,91	-0,93	0,15
		obere Grenze	0,14	0,37	2,39
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		-0,53	0,14	-0,04
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-1,48	-0,54	-1,13
		obere Grenze	-0,09	1,03	0,81
ACTH					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		3,89	1,17	-0,10
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	2,35	-0,39	-1,29
		obere Grenze	6,29	2,92	1,16
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		4,58	1,09	0,09
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	2,83	0,00	-1,23
		obere Grenze	6,70	1,93	0,93
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		-0,61	-0,16	-0,08
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-1,06	-0,49	-0,36
		obere Grenze	-0,18	0,11	0,42
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		-0,66	-0,52	-0,14
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-1,30	-1,23	-0,54
		obere Grenze	0,05	0,18	0,40
Cortisol					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		95,17	121,38	34,48
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	44,14	56,55	-188,97
		obere Grenze	179,31	317,24	153,10
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		119,31	192,41	-38,62
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	48,28	75,86	-208,28
		obere Grenze	176,55	372,41	186,21
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		-41,38	-8,97	-22,07
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-66,21	-26,21	-45,52
		obere Grenze	-11,03	20,69	-6,90
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		-50,34	-18,62	-28,97
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-89,66	-38,62	-40,00
		obere Grenze	-12,41	-5,52	-20,69
TNF-α					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		1,09	-1,21	-0,02
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-3,01	-10,52	-3,43
		obere Grenze	10,18	1,81	3,44
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		1,44	-1,23	0,50
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,69	-19,68	-2,11
		obere Grenze	18,91	1,53	3,76
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		1,14	0,00	-0,18
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-1,10	-3,12	-3,12
		obere Grenze	3,02	5,02	1,23
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		0,84	0,96	1,29
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-2,12	-3,54	-1,21
		obere Grenze	6,95	3,48	4,32

IL-1β					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		0,06	-0,01	-0,03
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,03	-0,32	-0,73
		obere Grenze	0,43	0,69	0,36
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		0,02	0,07	0,05
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-1,10	-0,12	-0,20
		obere Grenze	0,17	0,42	0,52
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		-0,07	0,03	0,04
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,26	-0,20	-0,15
		obere Grenze	0,11	0,17	0,75
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		0,17	-0,09	0,09
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,10	-0,51	-0,52
		obere Grenze	0,57	0,24	0,53
Temperaturschmerzschwelle					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		0,0	0,0	-0,1
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,3	-0,3	-0,3
		obere Grenze	0,3	0,2	0,1
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		-0,1	-0,1	0,1
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,3	-0,2	-0,1
		obere Grenze	0,2	0,1	0,3
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		-0,1	0,0	-0,1
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,5	-0,2	-0,2
		obere Grenze	0,2	0,1	0,1
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		-0,3	0,0	0,0
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,6	-0,1	-0,3
		obere Grenze	0,1	0,1	0,1
Druckschmerzschelle					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		1,8	-0,1	-0,1
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	0,7	-1,8	-2,0
		obere Grenze	3,6	1,7	1,8
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		1,8	0,5	0,4
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	0,4	-0,5	-0,9
		obere Grenze	3,4	2,4	1,6
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		0,5	-0,2	-0,4
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-1,8	-1,8	-1,7
		obere Grenze	3,0	1,1	0,6
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		1,1	1,0	0,3
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-0,7	-0,2	-1,6
		obere Grenze	3,0	2,1	2,3
Herzfrequenzen					
			B-A	C-B	D-C
CRH/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		4,7	-5,2	-1,7
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	2,2	-7,8	-4,3
		obere Grenze	7,5	-2,7	0,8
CRH/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		2,3	-3,9	-2,0
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	0,2	-6,7	-5,0
		obere Grenze	5,7	-0,7	1,0
Placebo/ Naloxon	Hodges-Lehmann-Schätzer		-2,5	-1,0	1,0
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-5,2	-3,2	0,8
		obere Grenze	-0,3	0,8	3,3
Placebo/ Placebo	Hodges-Lehmann-Schätzer		-1,9	-1,8	0,3
	95 % Konfidenz- intervall	untere Grenze	-6,5	-4,5	-1,7
		obere Grenze	3,2	0,3	2,3

8.3 Korrelationskoeffizienten nach Spearman

β-LPH-IRM - Temperaturschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,06	-0,24	-0,45	-0,11	-0,34	-0,71	-0,06	-0,51
P	0,84	0,37	0,08	0,67	0,19	0,00	0,82	0,05
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,43	-0,39	-0,29	-0,15	0,34	0,09	0,29	0,15
P	0,09	0,13	0,28	0,58	0,20	0,75	0,27	0,59

β-LPH-IRM - Druckschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,22	-0,04	-0,25	0,41	-0,08	-0,08	-0,02	0,02
P	0,41	0,89	0,36	0,11	0,77	0,76	0,93	0,94
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,29	-0,36	-0,22	0,23	0,23	0,16	-0,28	-0,16
P	0,27	0,16	0,42	0,40	0,39	0,55	0,29	0,55

β-Endorphin-IRM - Temperaturschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	0,19	-0,19	-0,03	0,22	0,12	-0,44	-0,31	-0,07
P	0,49	0,48	0,92	0,42	0,66	0,09	0,24	0,79
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,15	-0,15	-0,08	-0,19	-0,20	0,10	-0,43	0,17
P	0,57	0,59	0,78	0,48	0,46	0,72	0,10	0,52

β-Endorphin-IRM - Druckschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	0,40	0,11	0,12	0,16	0,14	0,08	0,12	0,40
P	0,13	0,68	0,66	0,56	0,61	0,77	0,66	0,12
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	-0,25	0,13	0,16	0,60	-0,01	-0,11	-0,10	0,34
P	0,36	0,64	0,54	0,02	0,97	0,68	0,72	0,20

β-Endorphin (1-31) - Temperaturschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	0,03	0,23	0,01	0,31	0,29	-0,24	0,31	0,01
P	0,91	0,40	0,96	0,25	0,28	0,37	0,24	0,97
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,00	0,30	0,43	0,62	0,16	0,38	0,04	0,11
P	0,99	0,26	0,09	0,01	0,55	0,14	0,90	0,67

β-Endorphin (1-31) - Druckschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,16	0,14	-0,07	0,00	-0,36	-0,01	-0,27	-0,08
P	0,55	0,60	0,80	1,00	0,17	0,97	0,31	0,78
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	-0,32	0,06	0,12	0,01	0,12	-0,01	-0,06	0,08
P	0,22	0,83	0,66	0,96	0,67	0,96	0,82	0,78

β-Endorphin-IRM (Nichols®) - Temperaturschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,01	0,34	-0,24	-0,30	-0,29	0,04	-0,11	-0,12
P	0,97	0,20	0,36	0,27	0,28	0,88	0,70	0,67
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,08	0,01	-0,16	0,32	-0,04	0,15	0,05	0,09
P	0,78	0,97	0,56	0,23	0,87	0,58	0,86	0,75

β-Endorphin-IRM (Nichols®) - Druckschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	0,24	0,06	0,03	0,00	0,14	0,33	0,24	-0,06
P	0,38	0,81	0,91	0,99	0,59	0,21	0,37	0,82
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,19	0,15	-0,29	0,30	-0,23	0,15	-0,08	0,21
P	0,48	0,57	0,27	0,25	0,40	0,57	0,78	0,43

ACTH - Temperaturschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	0,34	-0,01	-0,04	-0,39	-0,26	-0,35	-0,55	-0,48
P	0,19	0,98	0,88	0,14	0,32	0,19	0,03	0,06
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,41	0,02	0,43	0,12	0,37	0,13	0,14	0,08
P	0,12	0,94	0,10	0,65	0,16	0,64	0,62	0,76

ACTH - Druckschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	0,14	0,08	-0,26	0,13	0,31	-0,11	0,21	-0,16
P	0,61	0,77	0,33	0,64	0,24	0,68	0,42	0,55
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	-0,17	0,18	-0,17	-0,29	-0,29	-0,16	-0,61	-0,09
P	0,53	0,50	0,53	0,28	0,27	0,54	0,01	0,75

Cortisol - Temperaturschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,16	0,44	0,09	0,45	0,18	0,33	0,15	0,10
P	0,56	0,09	0,74	0,08	0,52	0,21	0,59	0,70
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,44	0,39	0,68	0,48	0,63	0,45	0,65	0,52
P	0,09	0,14	0,00	0,06	0,01	0,08	0,01	0,04
Cortisol - Druckschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	0,08	0,11	-0,21	0,03	-0,13	0,16	-0,11	0,13
P	0,77	0,70	0,44	0,91	0,63	0,55	0,68	0,62
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,25	0,46	0,11	0,26	0,18	0,17	-0,03	0,20
P	0,35	0,07	0,68	0,33	0,50	0,52	0,91	0,46

TNF- α - Temperaturschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,19	0,02	-0,14	-0,15	0,06	-0,13	-0,03	-0,16
P	0,47	0,93	0,60	0,59	0,84	0,64	0,91	0,57
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,07	0,14	0,15	0,50	0,11	0,34	0,19	0,12
P	0,81	0,60	0,57	0,05	0,67	0,20	0,48	0,65
TNF- α - Druckschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	0,38	-0,39	0,41	-0,17	0,04	0,24	0,24	0,41
P	0,15	0,13	0,12	0,54	0,89	0,37	0,38	0,11
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	-0,07	-0,10	0,25	0,12	-0,07	0,16	0,04	-0,15
P	0,79	0,72	0,36	0,65	0,81	0,55	0,88	0,59

IL-1 β - Temperaturschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,46	-0,39	-0,23	-0,20	-0,11	-0,04	0,40	0,30
P	0,07	0,13	0,40	0,46	0,68	0,88	0,12	0,27
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	-0,02	-0,52	0,09	0,07	0,08	-0,29	0,05	-0,07
P	0,95	0,04	0,73	0,80	0,78	0,28	0,87	0,79

IL-1 β - Druckschmerzschwelle								
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,62	-0,74	-0,54	0,06	-0,63	-0,09	-0,35	0,04
P	0,01	0,00	0,03	0,82	0,01	0,74	0,19	0,90
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	-0,16	-0,56	-0,21	-0,58	0,37	-0,64	-0,24	-0,81
P	0,56	0,03	0,44	0,02	0,16	0,01	0,36	0,00

Cortisol - Temperaturschmerzschwelle (männliche Probanden)

	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,24	0,16	-0,60	0,24	-0,26	0,21	-0,48	-0,17
P	0,57	0,70	0,11	0,57	0,53	0,62	0,23	0,68
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,24	0,08	0,29	0,21	0,24	0,57	0,55	0,26
P	0,56	0,84	0,49	0,62	0,57	0,14	0,16	0,54

Cortisol - Temperaturschmerzschwelle (weibliche Probanden)

	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	0,00	0,43	0,46	0,43	-0,07	0,54	0,32	0,14
P	1,00	0,34	0,29	0,34	0,88	0,22	0,48	0,76
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	0,85	0,36	0,78	0,75	0,61	0,71	0,72	0,68
P	0,01	0,43	0,04	0,05	0,15	0,07	0,07	0,09

Herzfrequenz - Temperaturschmerzschwelle

	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,72	-0,20	-0,47	-0,42	-0,30	-0,33	-0,27	-0,29
P	0,00	0,45	0,07	0,10	0,26	0,22	0,31	0,28
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	-0,53	-0,48	-0,52	-0,60	-0,49	-0,55	-0,49	-0,35
P	0,04	0,06	0,04	0,01	0,05	0,03	0,05	0,18

Herzfrequenz - Druckschmerzschwelle

	t_A		t_B		t_C		t_D	
	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P	C/N	C/P
r_s	-0,38	0,00	-0,32	-0,09	-0,40	-0,11	-0,08	-0,33
P	0,15	1,00	0,23	0,75	0,13	0,70	0,78	0,21
	t_A		t_B		t_C		t_D	
	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P	P/N	P/P
r_s	-0,25	-0,56	-0,12	-0,44	-0,11	-0,43	0,00	-0,43
P	0,35	0,02	0,66	0,09	0,68	0,10	0,99	0,10

9 Literaturverzeichnis

al'Absi M, and Rokke PD

Can anxiety help us to tolerate pain?

Pain 46, 43-51, **1991**

al'Absi M, Petersen KL, and Wittmers LE

Adrenocortical and hemodynamic predictors of pain perception in men and women

Pain 96, 197-204, **2002**

al'Absi M, and Petersen KL

Blood pressure but not cortisol mediates stress effects on subsequent pain perception in healthy men and women

Pain 106, 285-295, **2003**

Amit Z, and Galina ZH

Stress-induced analgesia: adaptive pain suppression

Physiol Rev 66, 1091-1120, **1986**

Ayesta FJ, and Nikolarakis KE

Peripheral but not intracerebroventricular CRH produces antinociception which is not opioid mediated

Brain Res 503, 219-224, **1989**

Beaulieu S, Gagne B, and Barden N

Glucocorticoid regulation of the proopiomelanocortin messenger ribonuclein acid content of rat hypothalamus

Mol Endocrinol 2 727-731, **1988**

Bernton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RC, and Frein HG

Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells

Science 238, 519-521, **1987**

Besedovsky HO, and del Rey A

Neuroendocrine and metabolic responses induced by interleukin-1

J Neurosci Res 18, 172-178, **1987**

Besedovsky HO, del Rey A, Klusman I, Furnkane H, Monge Arditi G, and Kabiersch A

Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis

J Steroid Biochem Mol Biol 40, 613-618, **1991**

Bianchi M, Sacerdote P, Locatelli L, Mantegazza P, and Panerai AE

Corticotropin releasing hormone, Interleukin-1 α , and tumor necrosis factor- α share characteristics of stress mediators

Brain Res 546, 139-141, **1991**

Bianchi M, and Panerai AE

CRH and the noradrenergic system mediate the antinociceptive effect of central Interleukin-1 α in the rat

Brain Res Bull 36, 113-117, **1995**

Birnberg NC, Lissitzky J-C, Hinman M, and Herbert E

Glucocorticoids regulate proopiomelanocortin gene expression in vivo at the level of transcription and secretion

Proc Natl Acad Sci USA 80, 6982-6986, **1983**

Cato AC, and Wade E

Molecular mechanisms of anti-inflammatory actions of glucocorticoids

Bioassays 18, 371-378, **1996**

Chen R, Lewis KA, Perrin MH et al.

Expression cloning of a human corticotropin releasing factor receptor

Proc Natl Acad Sci USA 90, 8967-8971, **1993**

- Chrétien M**, Benjannet S, Dragon N, Seidah NG, and Lis M
Isolation of peptides with opiate activity from sheep and human pituitaries: relationship to β -lipotropin
Biochem Biophys Res Commun 72, 472-478, **1976**
- Chrousos GP**, and Gold PW
A healthy body in a healthy mind- and vice versa-the damaging power of 'uncontrollable' stress
J Clin Endocrinol Metab 83, 1842-1845, **1998**
- Cohen M**, Pickar D, Dubois M, and Bunney W
stress induced plasma endorphin immunoreactivity may predict post-operative morphine usage
Psychiatry Res 6, 7-12, **1982**
- Delitala G**, Trainer PJ, Oliva O, Fanciulli G, and Grossman AB
Opioid peptides and alpha-adrenoceptor pathways in the regulation of the pituitary-adrenal axis in men
J Endocrinol 141, 163-168, **1994**
- Dubois M**, Pickar D, Cohen M, Roth Y, MacNamara T, and Bunney W
Surgical stress in humans is accompanied by an increase in plasma β -endorphin immunoreactivity
Life Sci 29, 1249-1254, **1981**
- Dunn AJ**, and Berridge, CW
Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses?
Brain Res Rev 15, 71-100, **1990**
- Fagarasan MO**, Eskay R, and Axelrod J
Interleukin-1 potentiates the secretion of β -endorphin induced by secretagogues in a mouse pituitary cell line (AtT-20)
Proc Natl Acad Sci USA 86, 2070-2073, **1989**
- Filliol D**, Ghazizadeh S, Chluba J, Martin M, Matthes HWD, Simonin F, Berfort K, Gavériaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, and Kieffer BL
Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses
Nat Genet 25, 95-100, **2000**
- Fisher LA**
Corticotropin-releasing factor: endocrine and autonomic integration of response to stress
Trends Pharmacol Sci 10, 189-193, **1989**
- Foley KM**, Kourides IA, Inturrisi CE, Kaiko RF, Zaroulis CG, Posner JB, Houde RW, and Li CH
 β -Endorphin: analgesic and hormonal effects in humans
Proc Natl Acad Sci USA 76, 5377-5381, **1979**
- Fuchs PN**, Roza C, Sora L, Uhl G, Raja SN
Characterization of mechanical withdrawal responses and effects of mu-, delta- and kappa-opioid agonists in normal and mu-opioid receptor knockout mice, delta- and kappa-opioid agonists in normal and mu-opioid receptor knockout mice.
Brain Res 821, 480-486, **1999**
- Gibson S**, Crosby SR, Stewart MF, Jennings AM, McCall E, and White A
Differential release of proopiomelanocortin-derived peptides from the human pituitary: evidence from a panel of two-site immunoradiometric assays
J Clin Endocrinol Metab 78, 835-841, **1994**
- Grossman A**, Perry L, Schally AV, Rees LH, Nieuwenhuizen Kruseman AC, Tomlin S, Coy DH, Comaru-Scally AM, and Besser GM
New hypothalamic hormone, corticotropin-releasing factor, specifically stimulates the release of adrenocorticotrophic hormone and cortisol in man
Lancet 1, 921-922, **1982**
- Guillemin R**, Vargo T, Rossier J, Minick S, Ling N, Rivier C, Vale W, and Bloom F
 β -Endorphin and adrenocorticotropin are secreted concomitantly by the pituitary gland
Science 197, 1367-1369, **1977**

- Habib** KE, Weld KP, Rice KC, Pushkas J, Champoux M, Listwak S, Webster EL, Atkinson A, Schulkin J, Contoreggi C, Chrousos G, Mc Cann SM, Suomi SJ, Higley JD, and Gold PW
Oral administration of a corticotropin-releasing hormone receptor antagonist significantly attenuates behavioral, neuroendocrine, and autonomic responses to stress in primates
Proc Natl Acad Sci USA 97, 6079-6084, **2000**
- Harbach** HW, Hell K, Gramsch C, Katz N, Hempelmann G, and Teschemacher H
 β -endorphin (1-31) in the plasma of male volunteers undergoing physical exercise
Psychoneuroendocrinology (Oxford), 25 (6), 551-562, **2000**
- Hargreaves** K, Dionne R, and Mueller G
Plasma β -endorphin-like immunoreactivity, pain and anxiety following administration of placebo in oral surgery patients
J Dent Res 62, 1170-1173, **1983**
- Hargreaves** K, Dionne R, Mueller G, Goldstein D, and Dubner R
Naloxone, fentanyl, and diazepam modify plasma β -endorphin levels during surgery
Clin Pharmacol Ther 40, 165-171, **1986**
- Hargreaves** K, Mueller G, Goldstein D, Dubner R, and Dionne R
Corticotropin releasing factor (CRF) produces analgesia in humans and rats
Brain Res 422, 154-157, **1987a**
- Hargreaves** KM, Schmidt EA, Mueller GP, and Dionne, RA
Dexamethasone alters plasma levels of β -endorphin and postoperative pain
Clin Pharmacol Ther 42, 601-607, **1987b**
- Hargreaves** KM, Dubner R, and Costello AH
Corticotropin releasing factor (CRF) has a peripheral site of action for antinociception
Eur J Pharmacol 170, 275-279, **1989**
- Hargreaves** KM, Flores CM, Dionne RA, and Mueller GP
The role of pituitary β -endorphin in mediating CRF induced antinociception
Am J Physiol Endocrinol Metab 258, 235-242, **1990**
- Heim** C, Ehlert U, Hanker JP, and Hellhammer DH
Abuse-related posttraumatic stress disorder and alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in women with chronic pelvic pain
Psychosom Med 60, 309-318, **1998**
- Hell** K
Entwicklung hochspezifischer radioimmunometrischer Methoden zur Bestimmung von Human- β -Endorphin (1-31), (1-27) und (1-26).
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Medizin der JLU Gießen, **2000**
- Holaday** JW, Long JB, and Tortella FC
Opioid and stress: effects upon nociception, behavior, and autonomic function following electroconvulsive shock, circulatory shock, or central nervous system injury.
In: Taché Y, Morley JE, Brown MR (Eds), Neuropeptides and stress, Springer, Berlin, 256-275, **1989**
- Hollander** M, and Wolfe DA
Nonparametric Statistical Methods
John Wiley and Sons, Inc. New York, London, Sydney, Toronto, first edition, 33 ff, **1973**
- Holsboer** F
Neuroendocrinology of mood disorders
In: Bloom, FE, Kupfer, DJ, (Eds), Psychopharmacology: the fourth generation of progress
New York: Raven Press, 957, **1995**
- Horrocks** PM, Jones AF, Ratcliffe WA, Holder G, White A, Holder R, Ratcliffe JG, and London DR
Patterns of ACTH and cortisol pulsatility over twenty-four hours in normal males and females
Clin Endocrinol 32, 127-134, **1990**

- Hunter WM**, and Greenwood FC
Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity.
Nature (London), 194, 495-496, **1962**
- Janson W**, and Stein C
Peripheral opioid analgesia.
Curr Pharm Biotechnol 4, 270-274, **2003**
- Janssen SA**, Spinhoven P, and Brosschot JF
Experimentally induced anger, cardiovascular reactivity, and pain sensitivity
J Psychosom Res 51, 479-485, **2001**
- Kastin AJ**, and Akerstrom V
Differential interactions of urocortin/corticotropin-releasing hormone peptides with the blood-brain barrier.
Neuroendocrinol 75, 367-374, **2002**
- Kiang JG**, and Wei ET
Corticotropin-releasing factor inhibits thermal injury
J Pharmacol Exp Ther 243, 517-520, **1987**
- Kieffer BL**
Recent advances in molecular recognition and signal transduction of active peptides: receptors for opioid peptides
Cell Mol Neurobiol 15, 615-635, **1995**
- Kita A**, Imano K, and Nakamura H
Involvement of corticotropin-releasing factor in the antinociception produced by Interleukin 1 in mice
Eur J Pharmacol 237, 317-322, **1993**
- Koppert W**, Likar R, Geisslinger G, Zeck S, Schmelz M, and Sittl R
Peripheral antihyperalgesic effect of morphine to heat, but not mechanical, stimulation in healthy volunteers after ultraviolet-B irradiation.
Anesth Analg 88, 117-122, **1999**
- Kramer D**
Weiterentwicklung und Einsatz einer neuen Methode zur Bestimmung β -Endorphin immunoreaktiver Substanzen in menschlichem Plasma: Diskrepanz zwischen Peptid und Peptid-immunoreaktivem Material
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, **1988**
- Kuhn JM**, Seurin D, Bertagna X, Hadjiat R, Thieblot P, and Girard F
Les lipotropines (β - et γ -LPH)
Ann Endocrinol (Paris), 45, 369-374, **1984**
- Kuraishi Y**, Hirota N, Sato Y, Hino Y, Satoh M, and Takagi H
Evidence that substance P and somatostatin transmit separate information related to pain in the spinal dorsal horn.
Brain Res 325, 294-298, **1985**
- Lacoumenta S**, Yeo TH, Burrin JM, and Hall GM
 β -endorphin infusion fails to modulate the hormonal and metabolic response in surgery
Clin Endocrinol 26, 657-666, **1987**
- Lariviere WR**, and Melzack R
The role of corticotropin-releasing factor in pain and analgesia
Pain 84, 1-12, **2000**
- Lautenbacher S**, Wolf S, Both-Ortman B, Laschewski U, Vedder H, and Krieg J-C
Effects of high and low levels of cortisol on pain perception
Eur Neuropsychopharmacol 7, 274, **1997**

- Lautenbacher S**, Roscher S, Kohl G, Vedder H, and Krieg J-C
Corticotropin Releasing Hormone lacks analgesic properties: an experimental study in humans, using non-inflammatory pain
Pain 83, 1-7, **1999**
- Lee NM**, and Smith AP
A protein-lipid model of the opiate receptor
Life Sci 26, 1459-1464, **1980**
- Li CH**, Yamashiro D, Chung D, and Doneen BA
Isolation, structure, synthesis and morphine-like activity of β -endorphin from human pituitary glands
Ann N Y Acad Sci 297, 158-166, **1977**
- Liu J**, Yu B, Neugebauer V, Grigoriadis DE, Rivier J, Vale WW, Shinnick-Gallagher P, and Gallaphe JP
Corticotropin-releasing factor and urocortin I modulate excitatory glutamatergic synaptic transmission.
Neurosci 24, 4020-4029, **2004**
- Lytras N**, Grossman A, Perry L, Tomlin S, Waas JAH, Coy DH, Schally AV, Rees LH, and Besser GM
Corticotropin releasing factor responses in normal subjects and patients with disorders of the hypothalamus and pituitary
Clin Endocrinol 20, 71-84, **1984**
- Mansikka H**, Sheth RN, DeVries C, Lee H, Winchurch R, and Raja SN
Nerve-injury-induced mechanical but not thermal hyperalgesia is attenuated in neurokinin-1 receptor knockout mice.
Exp Neurol 162, 343-349, **2000**
- Martins JM**, Kastin AJ, and Banks WA
Unidirectional specific and modulated brain to blood transport of corticotropin-releasing hormone
Neuroendocrinol 63, 338-348, **1996**
- Matejec R**
Fragmente des Proopiomelanocortins in Blutplasma und Liquor cerebrospinalis präoperativ, unter Spinalanästhesie sowie unter postoperativer Schmerzbelastung
Inaugural-Dissertation, Fachbereich Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, **2002**
- Matejec R**, Ruwoldt R, Bödeker R-H, Hempelmann G, and Teschemacher H
Release of β -endorphin immunoreactive material under perioperative conditions into the blood or cerebrospinal fluid: significance for postoperative pain?
Anesth Analg 96, 481-486, **2003**
- Matejec R**, Harbach HW, Bödeker R-H, Hempelmann G, and Teschemacher H
Plasma levels of corticotroph-type POMC derivatives such as β -lipotropin, β -endorphin(1-31) or ACTH are correlated with severity of postoperative pain
Clin J Pain 22, 113-121, **2006**
- Matthes HWD**, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe, SJ, Kitchen, L, Befort K, Dierich A, Le-Meur M, Dollé P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, and Kieffer BL
Loss of morphinic-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the μ -receptor gene
Nature 383, 819-823, **1996**
- Matthes HWD**, Smadja C, Valverde O, Vonesch J-L, Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubié M, Severini C, Negri L, Roques BP, Maldonado R, and Kieffer BL
Activity of the δ -opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the κ -receptor is maintained in mice lacking the μ -receptor
J Neurosci 18, 7285-7295, **1998**
- McLennan AJ**, Drugan RC, Hyson RL, Maier SF, Madden JIV, and Barchas JD
Corticosterone: a critical factor in an opioid form of stress-induced analgesia
Science 215, 1530-1534, **1982**

- McLoughlin L**, Tomlin S, Grossman A, Lytras A, Schally AV, Coy D, Besser GM, and Rees LH
CRF-41 stimulates the release of β -lipotropin and β -endorphin in normal human subjects
Neuroendocrinol 38, 282-284, **1984**
- Meyer RA**, Davis KD, Cohen RH, Treede RD, and Campbell JN
Mechanically insensitive afferents (MIAs) in cutaneous nerves of monkey.
Brain Res 561, 252-262, **1991**
- Morrison MF**, Redei E, TenHave T, Parmelee P, Boyce AA, Sinha PS, and Katz IR
Dehydroepiandrosterone sulfate and psychiatric measures in a frail, elderly residential care population
Biol Psychiatry 47, 144-150, **2000**
- Mousa SA**, Schäfer M, Mitchell WM, Hassan AHS, and Stein C
Local upregulation of corticotropin-releasing hormone and interleukin-1 receptors in rats with painful hindlimb inflammation.
Eur J Pharmacol 311, 221-231, **1996**
- Orth DN**, Jackson RV, De Cherney GS, De Bold CR, Alexander AN, Rivier J, Rivier C, Spiess J, and Vale W
Effect of synthetic ovine corticotropin-releasing factor: dose response of plasma adrenocorticotropin and cortisol
J Clin Invest 71, 587-595, **1983**
- Paterson ST**, Robson ST, and Kosterlitz HW
Classification of opioid receptors
Br Med Bull 39, 31-36, **1983**
- Pickar D**, Cohen M, and Dubois M
The relationship of plasma cortisol and β -endorphin immunoreactivity to surgical stress and postoperative analgesic requirement
Gen Hosp Psychiatry 5, 93-98, **1983**
- Pitcher GM**, and Henry JL
Nociceptive response to innocuous mechanical stimulation is mediated via myelinated afferents and NK-1 receptor activation in a rat model of neuropathic pain.
Exp Neurol 186, 173-197, **2004**
- Poch G**, Juan H
Wirkung von Pharmaka
Thieme Verlag, zweite Auflage, p17, **1990**
- Poree LR**, Dickenson AH, and Wei ET
Corticotropin-releasing factor inhibits the response of trigeminal neurons to noxious heat
Brain Res 502, 349-355, **1989**
- Puder BA**, and Papka RE
Distribution and origin of corticotropin-releasing factor-immunoreactive axons in the female rat lumbosacral spinal cord.
J Neurosci Res 66, 1217-1225, **2001**
- Qiu C**, Sora I, Ren K, Uhl GR, and Dubner R
Enhanced δ -opioid receptor mediated antinociception in μ -opioid receptor-deficient mice
Eur J Pharmacol 387, 163-169, **2000**
- Ricciardi-Castagnoli P**, Pirami L, Righi M, Sacerdote P, Locatelli V, Bianchi M, Sassano M, Valsasini P, Shammah S, and Panerai AE
Cellular sources and effects of tumor necrosis factor alpha on pituitary cells and the central nervous system. In O'Dorisio MS and Panerai AE (Eds.), Neuropeptides and immunopeptides: messengers in a neuroimmune axis Vol 594, Ann N Y Acad Sci, New York, pp 156-168, **1990**

- Rivier C**, Brownstein M, Spiess J, Rivier J, and Vale W
In vivo corticotropin-releasing factor induced secretion of adrenocorticotropin, β -endorphin and corticosteron
Endocrinol 110, 272-278, **1982a**
- Rivier C**, Rivier J, and Vale W
Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor
Science 218, 377-379 **1982b**
- Sacerdote P**, Bianchi M, Ricciardi-Castagnoli P, and Panerai AE
Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 alpha increase pain thresholds in the rat
Ann N Y Acad Sci. 650, 197-201, **1992**
- Sachs L**
Angewandte Statistik,
Springer Verlag, sechste Auflage, 309-310, **1984**
- Sang CN**, Gracely RH, Max MB, and Bennett GJ
Capsaicin-evoked mechanical allodynia and hyperalgesia cross nerve territories: evidence for a central mechanism.
Anesthesiology 85, 491-496, **1996**
- Schäfer M**, Carter L, and Stein C
Interleukin-1 β and corticotropin-releasing factor inhibit pain by releasing opioids from immune cells in inflamed tissue.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 4219-4223, **1994**
- Schäfer M**, Mousa SA, Zhang Q, Carter L, and Stein C
Expression of corticotropin-releasing factor in inflamed tissue is required for intrinsic peripheral opioid analgesia
Proc Natl Acad Sci USA 93, 6096-6100, **1996**
- Schäfer M**, Mousa SA, and Stein C
Corticotropin-releasing factor in antinociception and inflammation
Eur J Pharmacol 323, 1-10, **1997**
- Schäfer M**
Cytokines and peripheral analgesia
Adv Exp Med Biol 521, 40-50, **2003**
- Schluger JH**, Ho A, Borg L, Porter M, Maniar S, Gunduz M, Perret G, King A, and Kreek MJ
Nalmefene causes greater hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation than naloxone in normal volunteers: implications for the treatment of alcoholism
Alcohol Clin Exp Res 22, 1430-1436, **1998**
- Schmidt R**, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjork E, and Handwerker H
Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin
J Neurosci 15, 333-341, **1995**
- Schürmeyer TH**, Avgerinos PC, Gold PW, Gallucci WT, Tomai TP, Cutler GB Jr., Loriaux DL, and Chrousos GP
Human corticotropin-releasing factor in man: pharmacokinetic properties and dose-response of plasma adrenocorticotropin and cortisol secretion
J Clin Endocrinol Metab 59, 1103-1108, **1984**
- Simonin F**, Valverde O, Smadja S, Slowe SJ, Kitchen L, Dierich A, LeMeur M, Roques BP, Maldonado R, and Kieffer BL
Disruption of the κ -opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective κ -agonist U50,488H and attenuates morphine withdrawal
EMBO J 17, 886-897, **1998**

- Stalla GK**, Hartwimmer J, Werder K, und Müller OA
Ovine (o) and human (h) corticotropin releasing factor (CRF) in man: CRF-stimulation and CRF-immunoreactivity
Acta Endocrinol 106, 289-297, **1984**
- Theorell T**, Hasselhorn HM, Vingrd E, and Andersson B
Interleukin 6 and cortisol in acute musculoskeletal disorders: results from a case-referent study in Sweden
Stress Med 16, 27-35, **2000**
- Treede RD**, Meyer RA, Raja SN, and Campbell JN
Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia.
Prog Neurobiol 38, 397-421, **1992**
- Urban L**, Thompson SW, and Dray A
Modulation of spinal excitability: co-operation between neurokinin and excitatory amino acid neurotransmitters.
Trends Neurosci 17, 432-438, **1994**
- Valdes M**, Garcia L, Tresserra J, de Pablo J, and de Flores T
Psychogenic pain and depressive disorders: an empirical study
J Affect Disord 16, 21-25, **1989**
- Vale W**, Spiess J, Rivier C, and Rivier J
Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and β -endorphin
Science 213, 1394-1397, **1981**
- Voerman VF**, van Egmond J, and Crul BJP
Elevated Detection Thresholds for mechanical stimuli in chronic pain patients:support for a central mechanism.
Arch Phys Med Rehabil 81, 430-435, **2000**
- Wand GS**, and Schumann H
Relationship between lasma adrenocorticotropin, hypothalamic opioid tone, and plasma leptin
J Clin Endocrinol Metab 83, 2138-2142, **1998**
- Watson SJ**, Lopez JF, Young EA, Vale W, Rivier J, and Akil H
Effects of low dose ovine corticotropin-releasing hormone in humans: endocrine relationships and beta-endorphin/ β -lipotropin responses
J Clin Endocrinol Metab 66, 10-15, **1988**
- Wei ET**, Kiang JG, Buchan P, and Smith TW
Corticotropin-releasing factor inhibits neurogenic plasma extravasation in the rat paw
J Pharmacol Exp Ther 238, 783-787, **1986**
- Wiedemann K**, and Teschemacher H
Determination of β -endorphin and fragments thereof in human plasma using high-performance liquid chromatography and a multiple radioimmunoassay system.
Pharm Res 3, 142-149, **1986**
- Willer JC**, Dehen H, and Cambier J
Stress-induced analgesia in humans: endogenous opioids and naloxone-reversible depression of pain reflexes
Science 212, 689-691, **1981**
- Wynn PC**, Aguilera J, Morell et al.
Properties and regulation of high-affinity pituitary receptors for corticotropin-releasig-factor receptors
Biochem Biophys Res Commun 110, 602-605, **1983**

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Dr. Dr. Reginald Matejec, Abteilung für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Überlassung des Themas und die klinische, wissenschaftliche und menschliche Förderung, für sein persönliche Engagement und die Unterstützung der Untersuchungen, welche die Grundlage der vorliegenden Arbeit bilden.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hansjörg Teschemacher, Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Möglichkeit, diese Promotion in seiner Abteilung durchführen zu können und seinen konstruktiven wissenschaftlichen Rat während der Forschungsarbeiten.

Frau Beate Dickopf gilt mein besonderer Dank für ihre wertvolle Unterstützung bei der Durchführung der Laborarbeiten und ihre stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

Ich danke Frau Weber und ihrem Team vom Lungenfunktionslabor, Justus-Liebig-Universität Gießen, für die Durchführung der käuflichen Assays.

Außerdem bedanke ich mich bei Herrn Dr. Bödeker vom Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen für seine Beratung in Fragen der statistischen Auswertung.

Meinen Eltern möchte ich für die moralische und finanzielle Unterstützung danken.

Meinen Freunden und vor allem Rui, danke für eure unerschöpfliche Geduld, Hilfe und Ablenkung bei unüberwindbaren Problemen.

Lebenslauf

Name: Christina Hotz
Adresse: Rue des Sablons 12, 2000 Neuchâtel, Schweiz
E-Mail: christina.a.hotz@gmx.de
Geburtsdatum/-ort: 20.05.1977 in Werne
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983 - 1987: Wienbrede Grundschule Werne
1987 - 1996: Anne-Frank-Gymnasium Werne, 6/1996: Abitur

Hochschulausbildung:

4/97 - 5/04: Studium der Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
3/99: Physikum
3/00: 1. Staatsexamen
4/00 - 10/00: Auslandssemester Universidade do Porto, Portugal
9/02: 2. Staatsexamen
11/02: Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie des Klinikums der Justus-Liebig Universität Gießen
4/03 - 3/04: Praktisches Jahr in Gießen, Nantes (Frankreich), Neuchâtel (Schweiz)
5/04: 3. Staatsexamen

Berufliche Tätigkeit:

02/05 – 9/05: Assistenzärztin Chirurgie, Hôpital de la Providence, Neuchâtel, Schweiz
10/05 – 9/06 Assistenzärztin Chirurgie, Hôpital de Pourtalès, Neuchâtel, Schweiz
ab 04/07 Assistenzärztin Innere Medizin, Hôpital de la Providence, Neuchâtel, Schweiz

7. November 2006: Geburt meines Sohnes Paul

Gießen, Mai 2007