

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie

**Effekte einer systemischen Entzündungsreaktion auf die  
viszerale Schmerzwahrnehmung und -verarbeitung: Eine fMRT-Studie**

Inaugural - Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Julian Kleine-Borgmann  
aus Essen  
(2016)

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer  
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. rer. medic. S. Benson  
2. Gutachter: Herr Priv.-Doz. Dr. med. C. Mönninghoff

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 2017

## Publikationen

Benson S, Rebernik L, Wegner A, **Kleine-Borgmann J**, Engler H, Schlamann M, Forsting M, Schedlowski M, Elsenbruch S (2015). Neural circuitry mediating inflammation-induced central pain amplification in human experimental endotoxemia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 222-231

## Publizierte Abstracts

1. Benson S, Wegner A, Kullmann J, **Kleine-Borgmann J**, Schedlowski M, Elsenbruch S (2013). Experimental endotoxemia as a model to study neuro-immune mechanisms in human visceral and somatic pain. *Gastroenterology*, 144 (5, Suppl. 1), S931.
2. Benson S, Wegner A, Kullmann J, **Kleine-Borgmann J**, Grigoleit JS, Schedlowski M, Elsenbruch S (2013). Afferent immune-to-brain communication in human pain: A brain imaging study on experimental endotoxemia in a visceral pain model. *Brain Behavior and Immunity* 32, e17.
3. Rebernik L, Benson S, Wegner A, **Kleine-Borgmann J**, Schlamann M, Elsenbruch S, (2014). Ist die zentralnervöse Verarbeitung von Schmerz modalitätsspezifisch? Ein Vergleich zweier klinisch relevanter experimenteller Schmerzmodelle bei gesunden Probanden. *49. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Psychologie*; Abstractband, S. 585.
4. Benson S, Rebernik L, Wegner A, **Kleine-Borgmann J**, Schlamann M, Engler H, Schedlowski M, Elsenbruch S (2014). Experimental endotoxemia alters neural processing of visceral stimuli: A brain imaging study in healthy volunteers. *Brain Behavior and Immunity* 40, e49.
5. **Kleine-Borgmann J**, Wegner A, Rebernik L, Schlamann M, Schedlowski M, Elsenbruch S, Benson S (2014). Viszerale Schmerzsensitivität und zentralnervöse Schmerzverarbeitung nach einer experimentell induzierten systemischen Immunaktivierung: eine fMRT-Studie. *Der Schmerz* 28 (Suppl. 1), 90.
6. Rebernik L, Benson S, Bingel U, **Kleine-Borgmann J**, Schlamann M, Elsenbruch S (2014). Erfolgt die Verarbeitung von Schmerzreizen modalitätsspezifisch? Eine experimentelle fMRT-Studie zu viszerale und somatische Schmerzreizen. *Der Schmerz* 28 (Suppl. 1), 93.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>6</b>
1.1	Inflammation als ursächlicher Faktor abdomineller Schmerzen .....	6
1.2	Experimentell induzierte Immunaktivierung durch Lipopolysaccharid .....	8
1.2.1	Signalwege der LPS-induzierten Immunaktivierung .....	9
1.3	Nozizeption bei viszeralem Schmerz.....	11
1.4	Tierexperimentelle Untersuchungen zur Schmerzsensitivität nach LPS-induzierter Immunaktivierung .....	13
1.5	Effekte einer experimentell induzierten systemischen Immunaktivierung durch LPS beim Menschen .....	14
1.5.1	Effekte auf immunologische und neuroendokrine Parameter .....	14
1.5.2	Effekte auf Befinden, Stimmung und Kognition .....	15
1.5.3	Effekte auf die somatische Schmerzsensitivität .....	16
1.5.4	Effekte auf die viszerale Schmerzsensitivität .....	17
1.5.5	Effekte im Geschlechtervergleich.....	17
1.6	Hypothesen.....	18
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>20</b>
2.1	Stichprobe.....	20
2.2	Studiendesign .....	20
2.3	Versuchsablauf .....	21
2.4	Lipopolysaccharid .....	22
2.5	Das viszerale Schmerzmodell .....	23
2.6	Gemessene Parameter .....	24
2.6.1	Vitalzeichen .....	24
2.6.2	Blutproben .....	25
2.6.3	Fragebögen .....	26
2.7	Bildgebung und statistische Auswertung .....	27
2.7.1	fMRT-Daten .....	27
2.7.2	Nicht-fMRT-Daten.....	28

2.8	Förderung .....	29
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
3.1	Beschreibung der Merkmale der Stichprobe.....	30
3.2	Immunreaktion .....	31
3.3	Rektale Wahrnehmungs- und Schmerzschwelle, Schmerzbewertung .....	33
3.4	BOLD-Analyse .....	35
3.4.1	Baselinephase .....	35
3.4.2	Testphase.....	36
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>55</b>
8.1	Abbildungen .....	55
8.2	Tabellen .....	55
<b>9</b>	<b>Appendix .....</b>	<b>56</b>
9.1	Symptomcheckliste für Magen- und Darmbeschwerden.....	56
9.2	Publikation .....	57
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>58</b>

## 1 Einleitung

Abdominelle Schmerzen sind ein charakteristisches Symptom einer Reihe gastrointestinaler Erkrankungen. Zu diesen zählen unter anderem die funktionellen gastrointestinalen Störungen, in die auch das Reizdarmsyndrom (RDS) eingeordnet werden kann. Die pathophysiologischen Ursachen des viszeralen Schmerzes sind bisher jedoch unvollständig verstanden, wobei eine Zusammenwirkung biologischer und psychosozialer Faktoren angenommen wird. Auf die mögliche Relevanz entzündlicher Faktoren bei der Entstehung einer viszeralen Hyperalgesie weisen verschiedene korrelative Befunde bei Patienten mit RDS sowie Ergebnisse aus tier- und humanexperimentellen Studien hin. Dabei werden verschiedene Signalwege diskutiert, über die Zytokine auf die Schmerzverarbeitung wirken können, wobei einige Befunde eine besondere Relevanz zentralnervöser Prozesse bei der Entstehung der Hyperalgesie nahelegen. Mittels der intravenösen Injektion von Endotoxinen wie Lipopolysaccharid (LPS) kann eine nähere Untersuchung dieser Mechanismen im Experiment erfolgen.

### 1.1 Inflammation als ursächlicher Faktor abdomineller Schmerzen

Abdomineller Schmerz ist einer der häufigsten Gründe für eine ärztliche Konsultation in der klinischen Praxis (Wilder-Smith, 2011). Chronische Schmerzen führen nicht nur zu einer finanziellen Belastung des Gesundheitssystems durch häufige Arztbesuche, sondern sind vielmehr Ursache einer deutlichen Einschränkung des persönlichen Soziallebens, Alltagslebens und Berufslebens (Breivik et al., 2006).

Die klinische Relevanz viszeraler Schmerzen wird insbesondere im Kontext der funktionellen gastrointestinalen Störungen deutlich. Chronische oder remittierende abdominelle Schmerzen sind Leitsymptome vieler funktioneller gastrointestinaler Störungen, insbesondere des RDS. Das RDS hat global eine geschätzte Prävalenz von circa 11%, in westlichen Ländern eine höhere Prävalenz von etwa bis 20% (Endo et al., 2015). Moderate bis schwere Formen der Erkrankung schränken dabei die Lebensqualität erheblich und in ähnlichem Ausmaß ein wie schwerwiegende somatische Erkrankungen oder Depressionen (Eisler et al., 2002). Ein weiteres Charakteristikum des Reizdarmsyndroms ist eine veränderte Wahrnehmung viszeraler Schmerzen, die in einer großen Zahl der untersuchten Fälle mit reduzierten Schmerzschwellen für viszerale Stimuli einherzugehen scheint (Posserud et al., 2007). Eine befriedigende Erklärung für die Ursache dieser abdominellen Schmerzen und einer veränderten Schmerzwahrnehmung existiert bislang nicht, wobei nach aktuellen Krankheitstheorien ein Zusammenwirken biologischer und psychosozialer Faktoren angenommen wird (Eisenbruch, 2011). Eine Hypothese, die zunehmenden Stellenwert in dieser

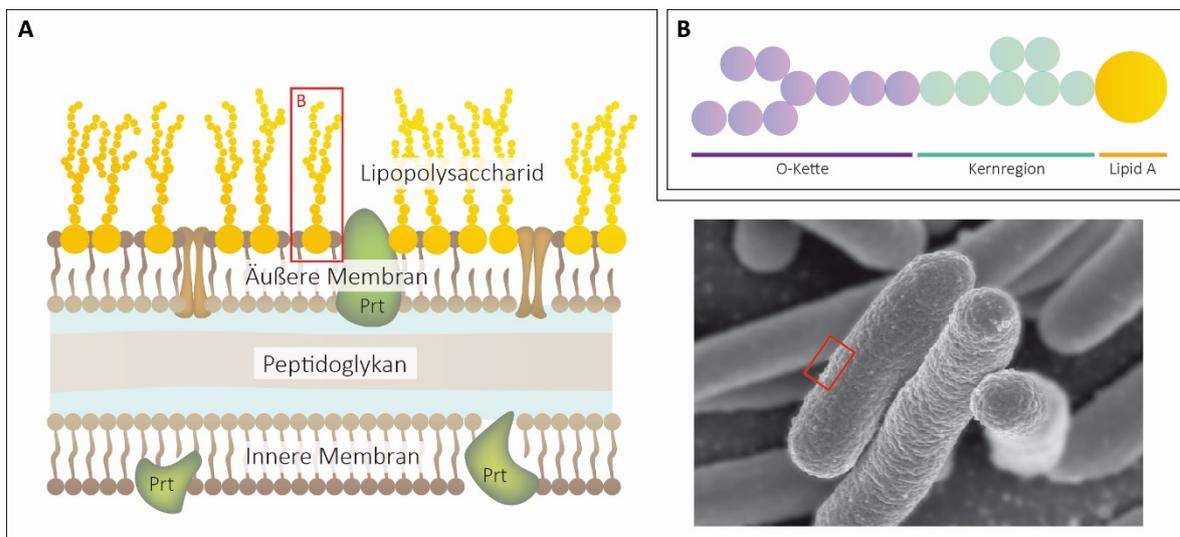
Diskussion erhält, ist der Einfluss inflammatorischer Prozesse auf die Entstehung und Verarbeitung viszeraler Schmerzen (Cryan & Dinan, 2012; Ohman & Simren, 2010; Wilder-Smith, 2011). So weisen korrelative Befunde klinischer Studien auf die Bedeutsamkeit entzündlicher Faktoren hin. Erste Hinweise für eine Immunaktivierung als bedeutsamer Faktor für die Entstehung einer Hyperalgesie erbrachten Studien, die ein postinfektiös diagnostiziertes Reizdarmsyndrom untersuchten. Eingeschlossen wurden Patienten, bei denen nach einer zuvor aufgetretenen akuten Enteritis eine Entzündungsreaktion in einer Rektumbiopsie nachweisbar war. Neben einer viszeralen Hyperalgesie ließ sich interessanterweise bei diesen Patienten auch noch Monate nach der infektiösen Phase eine Entzündungsreaktion mit erhöhter Zellzahl und -Aktivität in der Rektumbiopsie finden (Gwee et al., 1999). In folgenden Studien, die auch Reizdarmsyndrom-Patienten ohne vorherige akute Infektion einschlossen, ergaben sich ebenfalls Hinweise auf eine Immunaktivierung: So fand sich bei diesen Patienten ein entzündlich verändertes Zellbild in der Rektumbiopsie mit einer erhöhten Anzahl an intraepithelialer und T-Lymphozyten sowie enterochromaffiner Zellen, eine Degeneration des Plexus myentericus sowie eine gesteigerte Expression der sensiblen Fasern des *Transient Receptor Potential Vanilloid 1* (TRPV1)-Nozizeptors. Darüber hinaus ließen sich bei Patienten mit nicht-postinfektiösem RDS erhöhte Konzentrationen an antibakteriellen Botenstoffen ( $\beta$ -2-Defensin) im Stuhl nachweisen (Elsenbruch, 2011). Diese Befunde einer lokalen Immunaktivierung bei Reizdarmsyndrom-Patienten konnten im Verlauf durch Hinweise auf eine systemische Immunaktivierung ergänzt werden. So konnten erhöhte Plasma-Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine, insbesondere von Tumornekrosefaktor- (TNF-) $\alpha$ , Interleukin- (IL-)1 $\beta$ , IL-6 und IL-8, im Sinne einer Low-Grade-Inflammation bei Reizdarmsyndrom-Patienten nachgewiesen werden (Al-Khatib & Lin, 2009; Bashashati et al., 2014). Zhou et al. (2009) zeigten darüber hinaus einen Zusammenhang zwischen einer systemischen Immunreaktion und einer erhöhten Permeabilität der intestinalen Mukosa bei betroffenen Patienten. Zusammenfassend weisen diese Befunde auf eine bedeutende Rolle einer Immunaktivierung, repräsentiert durch lokale und systemische Entzündungsmediatoren, für das Verständnis einer möglicherweise pathologisch veränderten viszeralen Perzeption und Schmerzverarbeitung bei RDS-Patienten hin.

Zur experimentellen Untersuchung dieser These bietet sich das Modell der experimentell induzierten Immunaktivierung an. Wie Gwee et al. (1999) beschrieben, tritt insbesondere nach Infektionen mit gramnegativen Bakterien, wie *Salmonella typhi*, *Campylobacter jejuni* oder *Shigella*-Arten, das postinfektiöse Reizdarmsyndrom auf. Zur Imitation einer ähnlichen Immunantwort eignet sich die Verwendung gereinigter, aufbereiteter bakterieller Moleküle. Ein solches Molekül stellt das Lipopolysaccharid da, ein Molekül der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, auf das im Folgenden noch näher eingegangen werden soll. In Kongruenz zu den beschriebenen Erhöhungen von Zytokin-Plasma-Konzentrationen bei

RDS-Patienten führt die intravenöse Applikation von LPS zu einer Produktion ähnlicher Zytokine. Im Folgenden soll ein Überblick über das Modell und die bisherige Verwendung in anderen Studien gegeben werden.

## 1.2 Experimentell induzierte Immunaktivierung durch Lipopolysaccharid

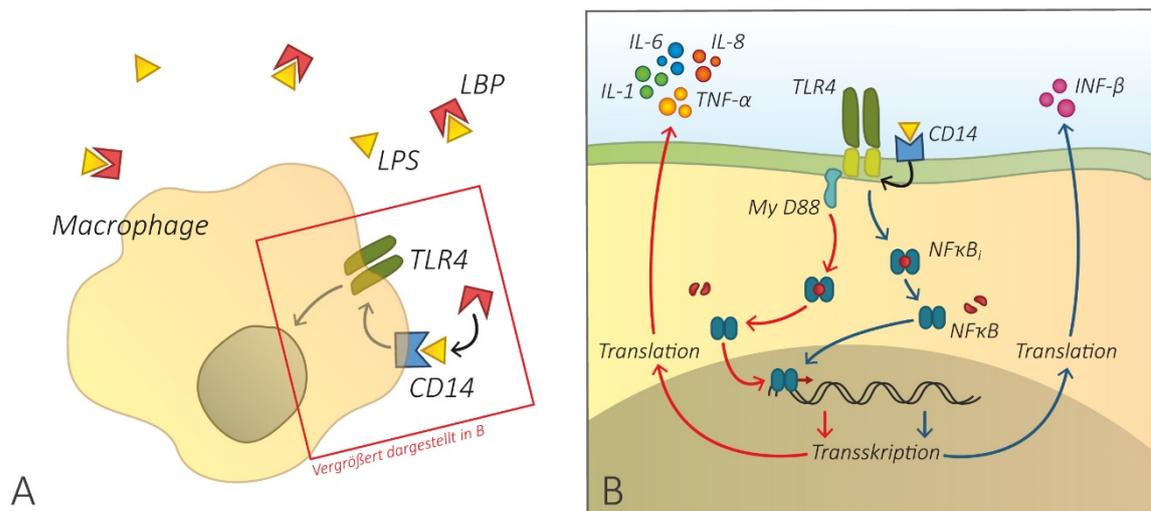
Lipopolysaccharid ist ein Endotoxin, das auf der Außenseite gramnegativer Bakterien vorkommt. Endotoxine werden seit Langem in der experimentellen Forschung zur Untersuchung immunologischer, endokriner und metabolischer Prozesse eingesetzt. Da die Anwendung im Experiment etabliert ist, sind die zu erwartenden Effekte beim Menschen umfassend beschrieben: Nach einer Latenzzeit von etwa 120 Minuten kommt es dosisabhängig zu Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit, Inappetenz und einer erhöhten Schmerzempfindlichkeit mit reduzierten Schmerzschwellen. Im Blut führt die humanexperimentelle Applikation von LPS zu einem Anstieg proinflammatorischer Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) sowie zu Anstiegen der Hormone Cortisol und Dehydroepiandrosteron (DHEA) im Plasma (Für Übersichtsarbeiten, siehe Bahador & Cross, 2007; Benson et al., 2012a; Schedlowski et al., 2014). Eine detaillierte Erörterung der einzelnen Effekte des Lipopolysaccharids soll in Abschnitt 1.5 erfolgen.



**Abbildung 1 – Lipopolysaccharid** Vereinfachtes Schema zur Veranschaulichung des natürlichen Vorkommens und der Struktur von Lipopolysaccharid. LPS findet sich auf verschiedenen Arten von gramnegativen Bakterien, wie *Escherichia coli* (Elektronenmikroskopische Aufnahme in **A**). Es ist verankert auf der äußeren Seite der Membran des Bakteriums. LPS besteht aus drei Elementen, der lipidhaltigen Verankerung (Lipid A), einer Kernstruktur aus Zuckermolekülen (Kernregion) und einer variablen Kette aus Zuckermolekülen (O-Kette) (**B**). *Modifiziert nach (Beutler & Rietschel, 2003), Elektronenmikroskopische Aufnahme: National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID). Prt = Membranprotein*

### 1.2.1 Signalwege der LPS-induzierten Immunaktivierung

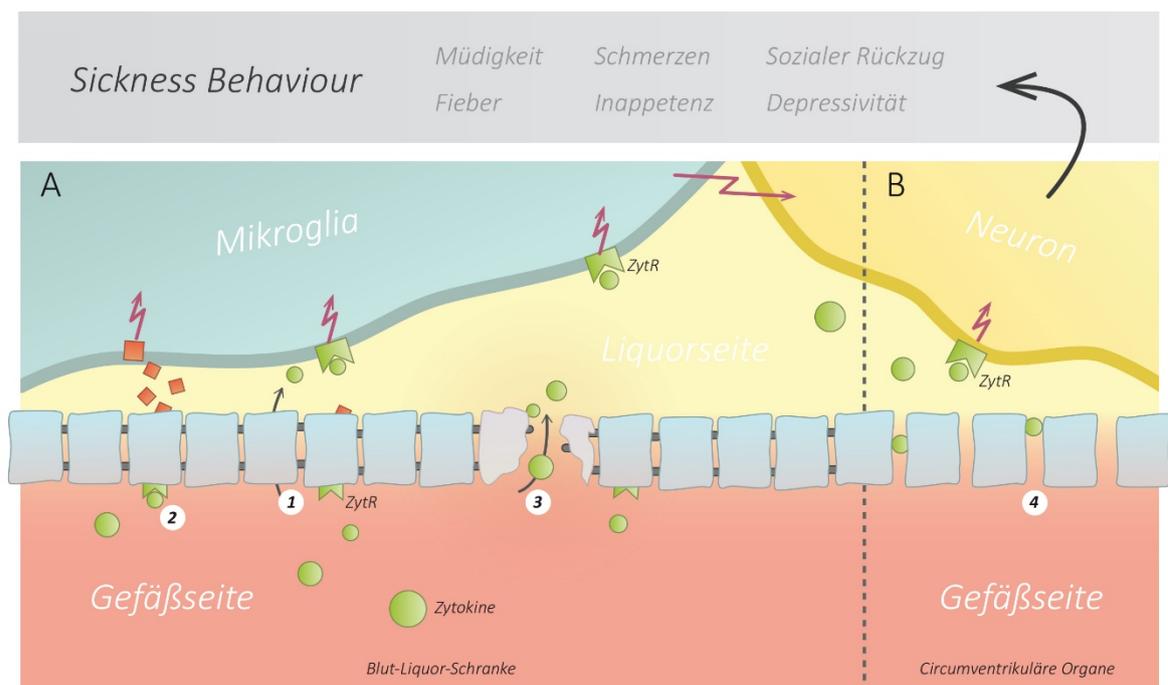
Die Wirkung des LPS wird über einen Rezeptor der *Toll-like-Rezeptor*-familie vermittelt, den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) (Poltorak et al., 1998). Die Toll-like-Rezeptoren interagieren mit Antigenen durch die Erkennung molekularer Muster (PAMPs, *Pathogene-associated molecular patterns*) und sind in der Lage, über verschiedene Mechanismen die Synthese von Proteinen zu initiieren (Akira & Takeda, 2004). Abbildung 2 beschreibt den Ablauf der Signalkaskade bei Bindung des LPS an TLR4-Komplexe gewebständiger Makrophagen und dendritischer Zellen.



**Abbildung 2 – Über TLR4-Komplexe vermittelte LPS-Wirkung** LPS wird im Plasma durch LPS-bindendes Protein (LBP) gebunden und an CD14-Oberflächenproteine abgegeben (A). CD14 bildet einen Komplex mit TLR4, über den dann My D88-abhängige (B, *rot*) und -unabhängige (B, *blau*) Signaltransduktionen initiiert werden. So wird der Transkriptionsfaktor NFκB durch Abbau des Inhibitors IκB aktiviert und löst My D88-abhängig die Synthese proinflammatorischer Botenstoffe (insbesondere TNF-α, IL-1, IL-1β, IL-6, IL-8, *frühe Reaktion*) und My D88-unabhängig die Synthese u. a. von Interferonen (INF-β, *späte Reaktion*) aus. *Zusammenstellung nach Akira und Takeda (2004); Beutler und Rietschel (2003); Murphy et al. (2009); Poltorak et al. (1998)*

Die nach Aktivierung der Signalkaskade durch Proteinbiosynthese entstandenen Zytokine, Interleukine und anderen proinflammatorischen Polypeptide wirken auf verschiedenen Wegen auf das zentrale Nervensystem. So binden sie lokal an Zytokinrezeptoren, die auch an afferenten Axonen des autonomen und somatischen Nervensystems vorkommen und somit afferente Informationen an entsprechende Kerngebiete des zentralen Nervensystems weiterleiten. Ein direkter Übertritt von Zytokinen aus dem Blut in den Liquor cerebrospinalis ist aufgrund ihrer Molekulargröße nicht möglich, jedoch kann ein aktiver Transport über die Blut-Liquor-Schranke erfolgen (Banks, 2009). Darüber hinaus können Zytokine an circumventrikulären Organen auch mittels Diffusion aus dem Blut in den Liquor übertreten und auf Mikrogliazellen wirken, die inflammatorische Signalstoffe produzieren und somit Neurone

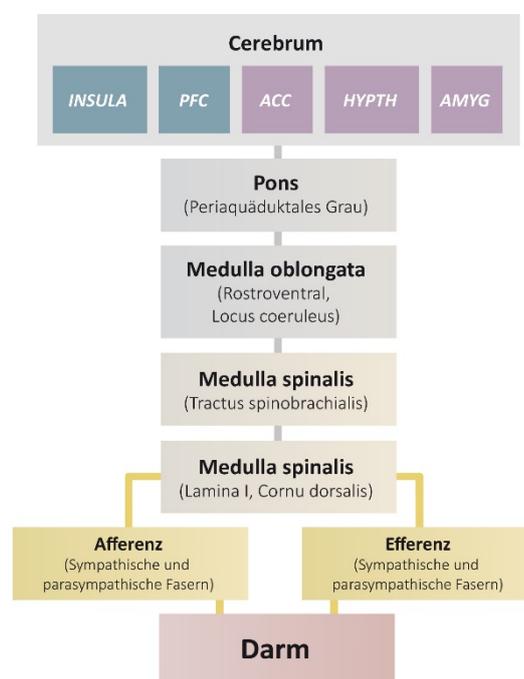
aktivieren können (Hopkins, 2007). Zuletzt sind auch Endothelzellen der Gefäße außerhalb des Liquorraumes im Stande, mittels Rezeptoren Zytokine zu binden und daraufhin, beispielsweise durch Prostaglandine, Neurone zu aktivieren (Hopkins, 2007). Diese Aktivierung führt zu einer Stimulation der kortikotropen Hormonachse und Entwicklung charakteristischer Symptome, wie Fieber, Schmerzen und Abgeschlagenheit (K. J. Tracey, 2010), allgemein als *Sickness Syndrome* oder *Sickness Behaviour* beschrieben. Zusammenfassend geht das weitreichend beschriebene Modell von einer durch Zytokine ausgelösten Symptomatik aus, die eine soziobiologisch relevante Verhaltensänderung beinhaltet und einen Schutzkomplex darstellt. Im Rahmen dessen kann durch eine Einschränkung der körperlichen und sozialen Aktivität Energie für immunologische Prozesse bereitgestellt werden. Auch das Symptom der Hyperalgesie zählt zu diesem beschriebenen Komplex (Benson et al., 2012b). Die Wirkstellen von Zytokinen am zentralen Nervensystem und deren Wirkung im Rahmen des Sickness Syndrome soll Abbildung 3 abschließend zusammenfassen.



**Abbildung 3 – Übertritt von Zytokinen in das zentrale Nervensystem** Dargestellt sind die Wege des Übertritts von Zytokinen durch die Blut-Liquor-Schranke (A) und durch das Endothel im Bereich der circumventrikulären Organe (B). Mittels aktiver Transporter (1) gelangen Zytokine dynamisch auf die Liquor-Seite und können über eine Rezeptorbindung an Gliazellen auf diese und dadurch nachfolgend auf Neurone wirken. Durch eine Bindung von Zytokinen an Rezeptoren des Endothels (2) wird die Ausschüttung von Prostaglandinen bewirkt. Prostaglandine haben ebenfalls eine Wirkung auf Gliazellen. Darüber hinaus führen Pathologien (z. Bsp. durch entzündliche ZNS-Erkrankungen) zu Störungen der Blut-Liquor-Schranke, so dass Zytokine diese direkt passieren können (3). An circumventrikulären Organen im Bereich des dritten und vierten Ventrikels ist das Endothel für Zytokine durch Diffusion passierbar (4). Vereinfacht dargestellt führt die Aktivierung der neuronalen Netzwerke und der kortikotropen Hormonachse (nicht dargestellt) zum sogenannten „Sickness Behaviour“. ZytR = Zytokin-Rezeptoren. Mod. nach Schedlowski et al. (2014); K. J. Tracey (2010).

### 1.3 Nozizeption bei viszeralem Schmerz

Zum Verständnis der Ergebnisse dieser Arbeit ist neben der Kenntnis der LPS-Signalkaskade auch die der afferenten Signalübertragung insbesondere der im Experiment eingesetzten viszerale Dehnungsreize im Rektum bis hin zu den zentralen Netzwerken des Gehirns von Bedeutung. Die darin involvierten Signalwege wurden umfassend beschrieben und als Gehirn-Darm-Achse (*Gut-Brain-Axis*) in der Literatur zusammengefasst (Mayer et al., 2006b). Im Folgenden sowie in Abbildung 4 werden die wichtigsten Anteile dieser Achse, wie in den Übersichtsarbeiten von Mayer et al. (2006b) und Mayer und Tillisch (2011) detaillierter beschrieben, kurz dargestellt.

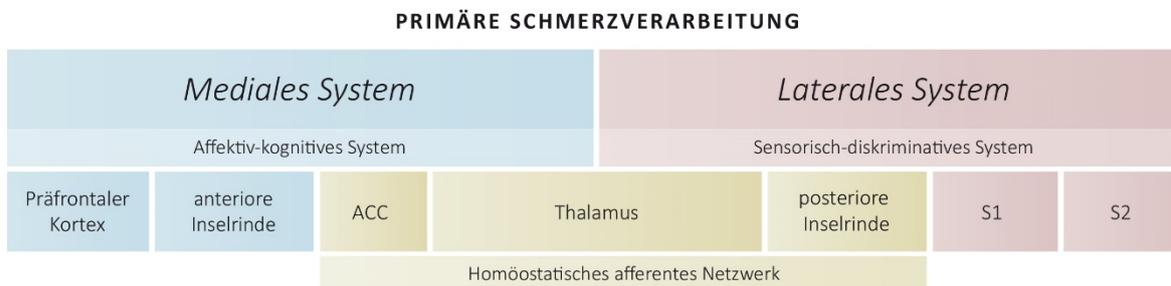


**Abbildung 4 – Signalverarbeitung von Reizen aus dem Enddarm** Reize aus dem Enddarm werden über sympathische und parasympathische Afferenzen zur Lamina I des Cornu posterior des Rückenmarks, sowie über den Nervus vagus (nicht dargestellt) vermittelt. Die Fasern der Lamina I verlaufen weiter im Tractus spinobrachialis zur rostroventralen Medulla oblongata und zum Locus coeruleus, über das periaquäduktale Grau zu den kortikalen Einheiten. Inselrinde (*Insula*) und präfrontaler Kortex (*PFC*) werden dabei zur sensorisch-kognitiven Verarbeitung gezählt (*blau*). Der anteriore cinguläre Kortex (*ACC*), Hypothalamus (*Hyph*) und die Amygdala (*Amyg*) werden der emotional-affektiven Verarbeitung zugeordnet. Über die kortikalen Zentren findet die descendierende Schmerzmodulation statt, die schließlich über die Zentren zu den Efferenzen geleitet wird. *Mod. nach Mayer et al. (2006b) und Mayer und Tillisch (2011).*

Afferente Fasern finden sich im intestinalen System in enger Nachbarschaft zu immunologisch aktiven Zellen. Durch Zytokine und Chemokine mit nozizeptiver Funktion, wie Substanz P, können diese sensiblen Axone direkt parakrin aktiviert werden (Wilder-Smith, 2011). Diese Afferenzen aus dem gastrointestinalen Trakt enden über sympathische (pa-

ravertebrale Ganglien) und parasymphatische Fasern (Nn. splanchnici) in der Lamina spinalis I im Hinterhorn des Rückenmarks. Im Tractus spinoparabrachialis werden die Informationen zum Locus coeruleus sowie der ventrorostralen Medulla, zum periaquäduktalen Grau des Pons und schließlich zu cerebralen Arealen geleitet. Zu diesen zählen unter anderem die Inselrinde, der frontale und sensomotorische Kortex, der anteriore cinguläre Kortex, Hypothalamus und Amygdala. Über diese Netzwerke finden schließlich die Verarbeitung und die efferente, deszendierende Schmerzmodulation statt. Diese wird in vegetativen Efferenzen über Pons, Medulla oblongata (periaquäduktales Grau, ventrorostrale Medulla) und schließlich das autonome Nervensystem in der Medulla spinalis an das Intestinum fortgeleitet. Neben dieser beschriebenen Nervenleitung werden Afferenzen und Efferenzen auch über den Nervus vagus und seine Kerngebiete vermittelt (Mayer et al., 2006b; Tillisch & Labus, 2011). Dabei scheinen insbesondere subdiaphragmale Anteile des N. vagus LPS-vermittelte Afferenzen an Areale der Schmerzverarbeitung zu leiten (Anand et al., 2007). Die für den viszeralen Schmerzreiz bedeutsamen Areale werden vereinfacht eingeteilt in das laterale und mediale Schmerzsystem, wie Abbildung 5 darstellt. Dieses besteht wiederum aus einer sensorisch-diskriminativen und einer affektiv-kognitiven Komponente. Anatomisch erreichen die beschriebenen Fasern über obige Wege zunächst den Nucleus tractus solitarii. Von dort aus projizieren sie auf den ventromedialen Thalamus, die anteriore und posteriore Inselrinde, den primär- und sekundär-sensorischen Kortex, den anterioren cingulären Kortex sowie den orbitofrontalen Kortex (Mayer et al., 2006a). Während die anteriore Inselrinde und der orbitofrontale Kortex vor allem als emotional verarbeitendes Netzwerk angesehen wird, zählen die übrigen Areale zu primär schmerzverarbeitenden Zentren. Zum lateralen Schmerzsystem werden unter anderem der laterale Thalamus, der primär- und sekundär-sensorische Kortex (S1, S2) sowie die posteriore Inselrinde gezählt. Durch Befunde bildgebender Studien mittels Positronen-Emissionstomographie (PET) wird angenommen, dass dieses System die sensorisch-diskriminative Komponente der Schmerzwahrnehmung darstellt und somit Intensität, Dauer und Ort des Schmerzreizes verarbeitet (Coghill et al., 1999). Dem medialen Teil, bestehend aus medialem Thalamus, anteriorer Inselrinde, cingulärem Kortex und präfrontalem Kortex, wird dagegen eine affektiv-kognitive Verarbeitung zugesprochen. Diese Komponente, insbesondere der anteriore cinguläre Kortex, ist für eine Schmerzbewertung und -Einschätzung verantwortlich (Rainville et al., 1999). Angesichts neuerer Studien scheint diese „einfache“ Auffassung jedoch unvollständig, da neben der Verarbeitung schmerzhafter Stimuli insbesondere die Kerngebiete des Thalamus, die Inselrinde und der anteriore cinguläre Kortex auch eine Rolle im Rahmen der Verarbeitung schmerzloser Reize spielen und der Aufrechterhaltung der allgemeinen Homöostase dienlich sind. Daher werden diese Strukturen als afferentes

homöostatisches Netzwerk aufgefasst, das mit Afferenzen aus dem Hirnstamm Verbindungen zu primär- und sekundär-sensorischem Kortex beinhaltet (Mayer et al., 2006a; Tillisch & Labus, 2011; Tillisch et al., 2011).



**Abbildung 5 – Übersichtsgrafik der schmerzverarbeitenden Areale** Aufteilung in mediales (blau) und laterales (rot) Schmerzsystem mit Darstellung des homöostatischen afferenten Netzwerkes (gelb), das in die beiden Systeme integriert wird und neben schmerzverarbeitender Funktion auch im Rahmen nicht-schmerzhafter Prozesse aktivierbar ist. Modifiziert nach Mayer und Tillisch (2011) und Mayer et al. (2006a).

#### 1.4 Tierexperimentelle Untersuchungen zur Schmerzsensitivität nach LPS-induzierter Immunaktivierung

Der Arbeitsgruppe um Coelho et al. (2000b) gelang in einer Serie von Studien der Nachweis verschiedener Effekte einer LPS-Applikation auf die Schmerzsensitivität bei Nagetieren. In einer Arbeit untersuchte die Arbeitsgruppe den Effekt einer intraperitonealen Anwendung von LPS bei Ratten. Hier zeigten sich in Versuchen mit rektalen Dehnungsreizen nach LPS-Anwendung reduzierte Schmerzschwellen im Sinne einer viszeralen Hyperalgesie, gemessen anhand der Anzahl elektromyografisch erfassbarer Kontraktionen der Darmmuskulatur. Darüber hinaus führte die periphere, peritoneale Verabreichung von LPS zu einer Erhöhung der TNF- $\alpha$ - und IL-1 $\beta$ -Plasmakonzentrationen sowie zu einer Mastzelldegranulation. In einer anschließenden Studie konnten Coelho et al. (2000a) ferner nachweisen, dass die in der vorherigen Studie beobachtete Hyperalgesie LPS-vermittelt über den systemischen Anstieg der beiden proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  zentral entstand. Denn eine intraventrikuläre Injektion von rekombinantem IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  führte zu einer viszeralen Hyperalgesie wie bei der intraperitoneal angewendeten LPS-Dosis beobachtet wurde, während kongruente Rezeptor-Antagonisten intraventrikulär injiziert die LPS-induzierte Hyperalgesie abschwächen konnten.

Interessanterweise scheint auch der die LPS-Wirkung vermittelnde TLR4-Rezeptor (siehe Abschnitt 1.2.1) selbst über die Biosynthese proinflammatorischer Proteine hinaus eine Bedeutung für die Wahrnehmung und Entstehung von Schmerz zu haben. So konnten DeLeo

et al. (2004) eine vermehrte und temporär über das Akutereignis andauernde TLR4-Expression nach Durchtrennung eines Spinalnervens bei Nagetieren dokumentieren. Auch in späteren Studien konnte der Zusammenhang der Entstehung und Wahrnehmung von neuropathischen Schmerzen mit Rezeptoren der Toll-Like-Familie, insbesondere TLR4, bestätigt werden (Dantzer et al., 2000).

Weitere Untersuchungen zu den nervalen Signalwegen der LPS-induzierten Hyperalgesie zeigten, dass verschiedene Fasertypen viszeraler Afferenzen durch LPS in Ratten unterschiedliche Entladungsmuster aufwiesen (Liu et al., 2005). So ergab sich neben der Feststellung einer etwa 15-minütigen afferenten Sensitivierung – mit erhöhter Zahl an afferenten Entladungen von Fasern – der Hinweis einer Signalvermittlung sowohl über vagale als auch über spinale Afferenzen.

Diese ausgewählten tierexperimentellen Studien legten den Grundstein für die Annahme einer immunbedingt modulierten viszeralen Hyperalgesie. In retrospektiver Zusammenschau zeigten sie bereits die heutig näher verstandenen Signalwege einer Endotoxinämie über die Entstehung und Wirkung von Zytokinen bis hin zum Verständnis einer viszeralen Hyperalgesie.

## **1.5 Effekte einer experimentell induzierten systemischen Immunaktivierung durch LPS beim Menschen**

Zur weiteren Untersuchung, insbesondere der für diese Arbeit vorrangigen viszeralen Hyperalgesie, bietet sich das Modell der experimentell induzierten systemischen Immunaktivierung mittels Endotoxin an. Die Effekte einer solchen intravenösen Applikation von LPS beim Menschen sind umfassend beschrieben (Bahador & Cross, 2007; Grigoleit et al., 2010; Schedlowski et al., 2014).

### **1.5.1 Effekte auf immunologische und neuroendokrine Parameter**

Die intravenöse Applikation von LPS bei Gesunden führt zu einer transienten systemischen Entzündungsreaktion, die durch die Produktion und Freisetzung von immunologischen und neuroendokrinen Parametern charakterisiert ist. Die folgende Darstellung bezieht sich auf die Übersichtsarbeiten von Andreasen et al. (2008), Bahador und Cross (2007), Schedlowski et al. (2014). Im Einzelnen kommt es zu einem Anstieg der Körpertemperatur, zu einer Leukozytose sowie zu einer Zunahme der Plasma-Konzentrationen proinflammatorischer (TNF- $\alpha$ , IL-6) und später inhibierender Zytokine wie IL-10 (Bahador & Cross, 2007). Zudem findet sich eine Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA), charakterisiert durch einen Anstieg von Cortisol in Plasma und Speichel sowie durch eine Aktivierung des Sympathikus mit konsekutiv erhöhten Noradrenalin-Spiegeln. Der zeitliche Verlauf dieser Inflammation lässt sich in drei grobe Abschnitte

gliedern. Zunächst kommt es zu einem Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 sowie zu einer Leukozytose mit einem Maximum der Plasma-Konzentrationen bzw. Zellzahl zum Zeitpunkt eineinhalb bis drei Stunden nach Injektion. Hier findet sich zudem eine Erhöhung der Körpertemperatur. Die Plasmaspiegel der neuroendokrinen Parameter (Cortisol und Noradrenalin) sind etwa eine Stunde später maximal erhöht. In einer zweiten Phase der Reaktion, etwa zwei bis vier Stunden nach Injektion, ergibt sich im Plasma ein Anstieg des gegenregulatorischen, antiinflammatorischen IL-10, während die Spiegel der proinflammatorischen Zytokine sinken. Zuletzt erfolgt die Normalisierung der immunologischen Parameter etwa sechs Stunden nach Injektion, während sich die Leukozytose innerhalb von 24 Stunden zurückbildet. Auch die Körpertemperatur sinkt innerhalb von 24 Stunden zurück auf die Ausgangswerte (Grigoleit et al., 2010).

### **1.5.2 Effekte auf Befinden, Stimmung und Kognition**

Die Immunreaktion, die durch die Injektion von Endotoxinen ausgelöst wird, hat Einfluss auf das subjektive Befinden und die Stimmung. Dies untersuchten eine Reihe von Studien unter Anwendung verschiedener Endotoxine, wie LPS von *Escherichia coli*-, *Salmonella typhi*- oder *Salmonella abortus equi*-Stämmen. So führt die Endotoxinämie zu einer Dys-thymie zum Zeitpunkt der obig beschriebenen Zytokinpiegel-Maxima im Plasma und korreliert mit dem IL-6-Spiegel (Reichenberg et al., 2001; Wright et al., 2005). Darüber hinaus scheint diese Reduktion der Stimmung durch psychischen Stress beeinflussbar zu sein, wie Brydon et al. (2009) durch die Anwendung eines Konzentrations- und eines sozialen Tests zeigten. Zu weiteren Symptomen einer experimentellen Endotoxinämie zählen das Gefühl einer sozialen Isoliertheit, vermehrte Ängstlichkeit sowie eine Fatigue-Symptomatik (Eisenberger et al., 2010). Erste funktionelle Magnetresonanztomographie- (fMRT-)Studien zu Veränderungen der Stimmung und Befindlichkeit unter Endotoxinämie sahen einen Zusammenhang zwischen zirkulierenden proinflammatorischen Zytokinen und der Aktivierung der Inselrinde (Eisenberger et al., 2009). Zeitgleich zeigten die Probanden eine vermehrt depressive Stimmung, wobei dieser Effekt bei Frauen stärker ausgeprägt war als bei Männern (Eisenberger et al., 2009). Der Einfluss von LPS auf die Kognition ist Bestandteil intensiver Forschung. So scheinen Endotoxine keinen Einfluss auf das Arbeitsgedächtnis zu haben (van den Boogaard et al., 2010), auch für die soziale kognitive Funktion sind keine Beeinträchtigungen durch eine Endotoxinämie beschrieben (Kullmann et al., 2014). Interessanterweise konnte in einer fMRT-Studie nach Injektion von Typhus-Vakzin eine inflammatorische Modulation der Aktivität der Substantia nigra bei der Ausführung einfacher kognitiver Aufgaben sowie eine psychomotorische Verlangsamung (gemessen an der Reaktionszeit) beobachtet werden (Brydon et al., 2008). Der Verdacht einer veränderten Aktivität der Substantia nigra ergab sich auch in einer anderen fMRT-Studie, in der das humane

Verhalten auf neuartige Reize (Fotos) untersucht wurde (Harrison et al., 2015). Ferner scheinen einige dieser beschriebenen Effekte in einer Dosisabhängigkeit zu stehen. Dies wurde für die Dysthymie, für einzelne neuropsychologische Funktionen (Grigoleit et al., 2011) sowie für druckschmerzhaft Reize (s. unten) beschrieben.

### **1.5.3 Effekte auf die somatische Schmerzsensitivität**

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe (Wegner et al., 2014) wurden die Auswirkungen von LPS auf die Perzeption und Bewertung somatischer Schmerzen untersucht. In einer randomisierten, kontrollierten Studie wurden N=59 männliche Probanden auf die Wahrnehmung verschiedener Schmerzmodalitäten unter dem Gesichtspunkt der Dosisabhängigkeit von LPS-Effekten untersucht (zwei Dosen, 0,4 ng/kg bzw. 0,8 ng/kg Körpergewicht). Es zeigte sich in der Algometrie verschiedener Muskelgruppen eine Hyperalgesie drei Stunden nach Injektion der höheren LPS-Dosis. Hier ergab sich zudem eine positive Korrelation mit Konzentrationen von IL-6 im Plasma der Probanden. Die Testung weiterer somatischer Schmerzmodalitäten, wie Berührung oder Nadelstiche, ergaben keine Veränderung. Für die Wahrnehmung von Kältereizen wurde unter hoher Dosis von LPS (2,0 ng/kg Körpergewicht) eine Hyperalgesie berichtet (de Goeij et al., 2013).

In einer Studie der Arbeitsgruppe um Hutchinson et al. (2013) zu somatischem Schmerz konnte gezeigt werden, dass eine systemische Anwendung von Low-Dose-Lipopolysaccharid (0,4 ng/kg Körpergewicht) die Wirkung von intradermal appliziertem Capsaicin verstärken kann. In dieser randomisiert-kontrollierten, doppelblinden Cross-over-Studie wurden verschiedene Parameter nach der Schmerzstimulation durch Capsaicin gemessen. Capsaicin ist ein direkter Agonist von TRPV1-Nozizeptoren, die neuropathischen und somatischen Schmerz vermitteln. Zwölf gesunde männliche Probanden erhielten randomisiert entweder eine intravenöse Low-Dose-LPS-Injektion oder eine Kochsalzinjektion. Zu den erfassten Parametern zählten neben Plasmaspiegeln an Zytokinen (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10) und Blutbildwerten die spontane Schmerzstärke (erfasst auf einer visuellen Analogskala), eine sensible Allodynie (getestet mit einem weichen Pinsel), eine punktuelle Hyperalgesie (getestet mit Von-Frey-Filamenten) sowie eine Rötung nach Capsaicin-Anwendung. Es gab keine signifikanten Veränderungen der Parameter unter alleiniger LPS-Wirkung. Interessanter Weise konnte jedoch zum bereits beschriebenen Peak der LPS-Wirkung etwa drei Stunden nach Applikation und Capsaicin-Injektion eine signifikante Verstärkung aller Parameter erfasst werden, mit Ausnahme der subjektiven Schmerzbewertung. Demnach schien eine Endotoxinämie die nozizeptive Wirkung von peripher appliziertem Capsaicin zu verstärken. Neben einer möglichen direkten para- oder autokrinen Stimulation von TRPV1-Rezeptoren diskutierten die Autoren überwiegend einen zentralen Mechanismus. Dafür

sprechen die beiden zentral verstandenen Phänomene der Hyperalgesie und Allodynie sowie die Verzögerung der Endotoxinwirkung, scheinbar aufgrund der zu durchlaufenden Zytokin-Signalkaskade.

#### **1.5.4 Effekte auf die viszerale Schmerzsensitivität**

Bis vor kurzem existierten nur tierexperimentelle Daten, die eine Wirkung von LPS auf die viszerale Schmerzsensitivität postulierten (siehe Abschnitt 1.4). Die erste Untersuchung zum Einfluss einer Endotoxinämie auf die Entstehung einer viszeralen Hyperalgesie beim Menschen (Benson et al., 2012b bildete eine Vorstudie zu dieser Arbeit) konnte die im Tierexperiment dokumentierten Befunde replizieren. In einem randomisierten, kontrollierten, verblindeten Experiment erhielten in einem Crossover-Design insgesamt N=11 gesunde männliche Probanden an zwei Untersuchungstagen eine Low-Dose-Gabe von LPS (0,4 ng/kg Körpergewicht) bzw. Placebo (Kochsalzlösung). Die Untersuchung viszeraler Schmerzen erfolgte mittels rektaler Distensionen über einen Ballon, dessen Volumen druckgesteuert verändert wurde. Mit Hilfe einer visuellen Analogskala (VAS) wurde die subjektive Bewertung der getesteten Schmerzstimuli gemessen. In der LPS-Bedingung zeigten sich signifikant reduzierte Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen im Vergleich zur Placebo-Bedingung. Die Reduktion der Schmerzschwellen war dabei korreliert mit einem Anstieg von IL-6 und IL-10. Die subjektive Schmerzbewertung war bei Reizen deutlich oberhalb der Wahrnehmungsschwelle (25 mmHg, 40 mmHg) hingegen unverändert, lediglich Stimuli in Nähe der Wahrnehmungsschwelle (10 mmHg) wurden als schmerzhafter bewertet. Zusammenfassend führte eine experimentell induzierte systemische Immunaktivierung durch LPS zu einer viszeralen Hyperalgesie und gesteigerter Wahrnehmung von moderaten Schmerzreizen. Die zugrundeliegenden Mechanismen der LPS-induzierten viszeralen Hyperalgesie konnten in dieser Pilotstudie jedoch nicht geklärt werden.

#### **1.5.5 Effekte im Geschlechtervergleich**

Die bislang verfügbaren humanexperimentellen Daten zur Schmerzwahrnehmung unter Endotoxinämie stammen überwiegend von männlichen Probanden. In zwei aktuell (nach Abschluss der vorliegenden Studie) publizierten Arbeiten wurden gezielt Geschlechterunterschiede in den Effekten von LPS auf die Schmerzsensitivität untersucht. Karshikoff et al. (2015) zeigten eine vergleichbare Zunahme der Sensitivität gegenüber Druckschmerzreizen (mittels Algometrie) sowie Hitze- und Kältereizen nach Gabe einer LPS-Dosis von 0,6 ng/kg Körpergewicht. In einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe wurden ebenfalls keine Unterschiede im Hinblick auf eine LPS-induzierte Hypersensitivität gegenüber viszeralen und Druckschmerzreizen zwischen Männern und Frauen beobachtet (Wegner et al., 2015). Zusammenfassend scheint das Geschlecht keinen Einfluss auf die Schmerzsensitivität

während der experimentellen Endotoxinämie zu haben. Immunologisch fanden sich bei weiblichen Probanden im Vergleich zu männlichen eine verstärkte Immunantwort und HHNA-Aktivierung, charakterisiert durch höhere Konzentrationen an IL-8 sowie Noradrenalin und Cortisol im Plasma (Karshikoff et al., 2015; van Eijk et al., 2007).

## 1.6 Hypothesen

Die viszerale Hyperalgesie ist ein zentrales Symptom verschiedener gastrointestinaler Erkrankungen, insbesondere der bislang ätiologisch ungeklärten funktionellen Schmerzsyndrome, wie dem Reizdarmsyndrom. Korrelative Befunde deuten dabei auf eine immunologische Komponente im Sinne einer systemischen, niedragschwelligen Immunaktivierung als ein potentiell wichtiger Faktor in der Pathophysiologie der viszeralen Hyperalgesie hin. Dies wird durch mehrere tierexperimentelle Studien unterstützt, die eine erhöhte viszerale Schmerzsensitivität bzw. reduzierte viszerale Schmerzschwellen in Reaktion auf eine experimentell induzierte systemische Immunaktivierung dokumentierten. In einer humanexperimentellen Verhaltensstudie unserer Arbeitsgruppe (Benson et al., 2012b) konnte erstmals auch bei gesunden Probanden gezeigt werden, dass eine LPS-induzierte systemische Immunaktivierung zu reduzierten viszeralen Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen sowie einer veränderten Schmerzbewertung führt. Zum Zeitpunkt der Datenerhebung für die vorliegende Studie waren diese Daten jedoch noch nicht in unabhängigen Stichproben repliziert. In den vergangenen Jahren konnten mehrere human-experimentelle Endotoxin-Studien mittels fMRT eine veränderte neurale Aktivität in Reaktion auf unterschiedliche Aufgaben wie eine soziale Kognitionsaufgabe (Kullmann et al., 2014), kognitive Tasks (Brydon et al., 2008) sowie während der Verarbeitung von Belohnung und emotionalen oder neuartigen Stimuli (Eisenberger et al., 2010; Eisenberger et al., 2009; Harrison et al., 2015; Inagaki et al., 2015) dokumentieren. Die neurale Aktivität in Reaktion auf viszerale (Schmerz-)Reize bzw. Korrelate der viszeralen Hyperalgesie nach LPS-induzierter Immunaktivierung wurden bisher jedoch nicht humanexperimentell untersucht. Ausgehend von dieser Befundlage sollten folgende Hypothesen in dieser Arbeit getestet werden:

- I. In tierexperimentellen Studien sowie in einer früheren humanexperimentellen Studie dieser Arbeitsgruppe konnte eine Veränderung der viszeralen Schmerzsensitivität im Sinne einer Reduktion viszeraler Schmerzschwellen während einer Endotoxin-Anwendung gezeigt werden (Benson et al., 2012b). Ein Ziel der vorliegenden randomisierten, kontrollierten Doppelblind-Studie war es, die Befunde der genannten Vorstudie in einer unabhängigen Studienpopulation zu replizieren. Ausgehend von diesen Befunden erwarteten wir, dass eine LPS-induzierte systemische Immunaktivierung zu einer signifikanten Reduktion der viszeralen Schmerzschwellen bei Probanden der LPS-Gruppe

im Vergleich zu Probanden der Kontrollgruppe führt. Als zusätzliche Zielparameter wurden auch viszerale Wahrnehmungsschwellen sowie subjektive Bewertungen der Schmerzhaftigkeit mittels VAS erfasst. In Anlehnung an die Befunde von Benson et al. (2012b) wurden signifikant reduzierte Wahrnehmungsschwellen sowie höhere VAS-Werte (im Sinne einer höheren Schmerzbewertung) erwartet.

- II. Die Effekte einer LPS-induzierten systemischen Immunaktivierung auf die zentrale Verarbeitung (bzw. auf das *Blood-Oxygen-Level-Dependent-* (BOLD-)Signal in primär schmerzverarbeitenden Arealen des Gehirns) viszeraler (Schmerz-) Reize wurde bisher nicht untersucht. Entsprechend der in Abschnitt 1.3 erläuterten Neuroanatomie der Gehirn-Darm-Achse erwarteten wir, dass während einer LPS-induzierten Immunaktivierung signifikant stärkere BOLD-Signale in Arealen zu beobachten sind, die dem medialen und lateralen Schmerzsystem zugeordnet werden. Für das mediale (affektiv-kognitive) System sind dies der präfrontale Kortex, die anteriore Inselrinde, der anteriore cinguläre Kortex und Kernbereiche des Thalamus. Für das laterale (sensorisch-diskriminative) System sind dies die posteriore Inselrinde, der primär- und sekundär-sensorische Kortex und Kerngebiete des Thalamus. Explorativ wurden zudem die BOLD-Signale während nicht-schmerzhafter viszeraler Reize erfasst.
- III. In explorativen Analysen innerhalb der LPS-Gruppe sollte darüber hinaus untersucht werden, ob LPS-induzierte Anstiege der Konzentration pro-inflammatorischer Zytokine im Plasma mit einer Veränderung des BOLD-Signals in den oben genannten Hirnarealen korreliert sind.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Stichprobe

Die Rekrutierung der Probanden erfolgte über öffentliche Aushänge auf den Campi des Universitätsklinikums Essen und der benachbarten Universitäten. In einem Aufklärungsgespräch vor Studienbeginn erhielten die Probanden detaillierte Informationen zu Studienablauf und -ziel. Alle Probanden durchliefen im Rahmen des Einschlussverfahrens eine ärztliche Voruntersuchung einschließlich einer körperlichen Untersuchung und einer Abnahme von Blutproben zur Bestimmung verschiedener Laborparameter (s. unten).

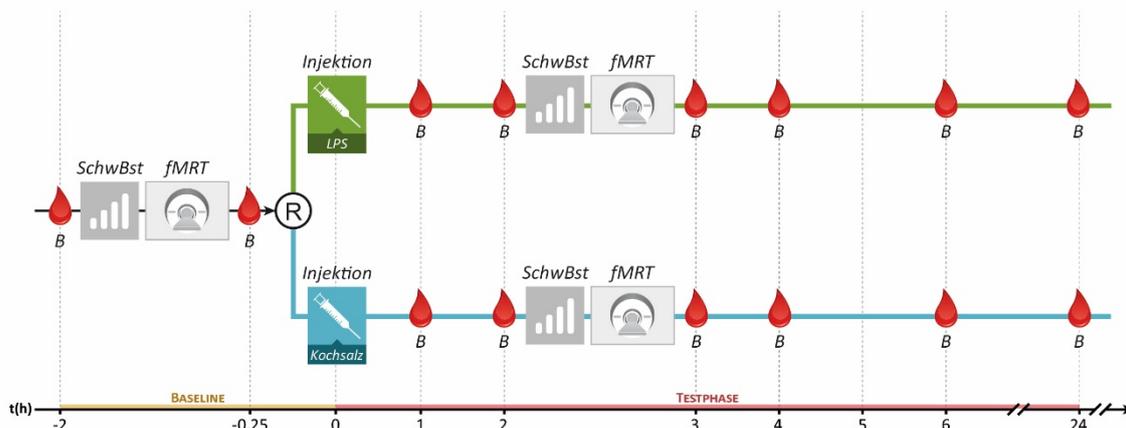
Eingeschlossen wurden männliche, rechtshändige Probanden im Alter von 18 bis 45 Jahren. Ausschlusskriterien waren ein BMI  $<18$  bzw.  $\geq 29$  kg/m<sup>2</sup>, akute und/oder schwerwiegende Erkrankungen, insbesondere neurologische, psychiatrische, immunologische oder endokrinologische Vorerkrankungen, die regelmäßige Einnahme von freiverkäuflichen und verschreibungspflichtigen Medikamenten, Nikotinkonsum, ein regelmäßiger Alkoholkonsum ( $>4$  Einheiten pro Woche), eine pathologische Abweichung der im Blut gemessenen Laborparameter [Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, mittleres korpuskuläres Volumen (MCV), mittlere Hämoglobinkonzentration (MHC), mittlere korpuskuläre Hämoglobinkonzentration (MCHC), Thrombozyten, Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff, Harnsäure, Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT),  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase ( $\gamma$ -GT), alkalische Phosphatase (AP), Quick-Wert, C-reaktives Protein (CRP)], die Erfüllung MRT-spezifischer Ausschlusskriterien (wie erhöhte Ängstlichkeit, Klaustrophobie, nicht-MRT-konforme Implantate u. ä.), eine durch die MRT-Strukturmesung nachgewiesene oder bekannte strukturelle Abnormität des Gehirns. Ferner führte ein erhöhter Summenscore von  $>10$  Punkten im Symptomfragebogen für gastrointestinale Symptome (GI-Symptomsscore, s. unten und Anhang) im letzten Monat und/oder ein Gesamtwert  $>11$  Punkten bei Berücksichtigung beider Subskalen (Angst, Depression) der Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS) zum Ausschluss.

Für diese Studie lag ein positives Votum der Ethik-Kommission der Universität Duisburg-Essen vor (Studie 09-4271). Alle Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis in die Studienteilnahme und erhielten eine Aufwandsentschädigung von € 300,-.

### 2.2 Studiendesign

Abbildung 6 zeigt das randomisierte, doppelblinde und Placebo-kontrollierte Studiendesign. Am Studientag erfolgte nach einer Baselinemessung mit Bestimmung der Schmerzschwellen und fMRT-Messung die Randomisierung in LPS- und Placebo-Gruppe und nach-

folgend die Injektion von LPS oder Placebo (Kochsalzlösung). Während der Testphase wurden die Bestimmung der viszeralen Schwellen und die fMRT-Untersuchung analog zur Baselinephase erneut durchgeführt. Die durchgeführten Blutabnahmen während der Studie sind in Abbildung 6 mit *B* gekennzeichnet.



**Abbildung 6 – Studiendesign** Die Abbildung zeigt das randomisierte, doppelblinde und Placebo-kontrollierte Studiendesign. SchwBst = Schmerzschwellenbestimmung; fMRT = funktionelle Magnetresonanztomografie-Messung; B = Blutentnahme

### 2.3 Versuchsablauf

Die Studienteilnahme gliederte sich in fünf Termine: Ein Termin zur medizinischen Voruntersuchung des Probanden, eine Blutentnahme 48 Stunden vor Studienbeginn (zum Ausschluss einer entzündlichen Erkrankung), ein Haupttermin zur eigentlichen Teilnahme an der Studie, eine Blutentnahme 24 Stunden nach Injektion und eine weitere ärztliche Nachuntersuchung etwa eine Woche im Anschluss an die Studienteilnahme. Die Voruntersuchung im Vorfeld der Studie umfasste eine ärztliche Anamnese, allgemeinmedizinische Untersuchung und eine Blutentnahme (für die erfassten Laborparameter siehe S. 20). Nach Laboranalyse und Einschluss des Probanden folgte der wissenschaftliche Untersuchungstag, der die eigentlichen Messungen beinhaltet (s. unten). 24 Stunden nach Injektion von LPS oder Placebo wurde eine erneute Blutentnahme (für die erfassten Laborparameter siehe S. 20) durchgeführt. Im Zeitraum von circa einer Woche nach dem Studientag erfolgte zusätzlich eine abschließende ärztliche Anamnese und Untersuchung mit Blutentnahme und Laboranalyse (für die erfassten Laborparameter siehe S. 20).

Am Studientag selbst umfasste ein Messdurchlauf der Studie insgesamt acht Stunden pro Proband, wobei pro Versuchstag zwei Probanden untersucht wurden. Alle Studientage begannen vormittags zwischen 8.30 und 10.30 Uhr. Bei Ankunft erhielten die Teilnehmer nach kurzer Einweisung einen peripher-venösen Zugang im Bereich des Unterarms, über den nach einer 15-minütigen Ruhephase eine erste Blutentnahme (-2 Std.) erfolgte. Weitere Blutentnahmen erfolgten zu den Zeitpunkten -0.25, +1, +2, +3, +4, +6 und +24 Std. bezogen

auf die Injektion. Zum Zeitpunkt jeder Blutentnahme wurden zudem Blutdruck, Herzfrequenz und tympanale Temperatur gemessen sowie mittels Fragebögen zu den Zeitpunkten -0.25, +3 und +6 die momentane Ängstlichkeit und Befindlichkeit bestimmt (nähere Angaben s. unten). In der Baselinephase (vor der Randomisierung und Injektion von LPS bzw. Placebo) erfolgte die Applikation eines rektalen Ballonkatheters zur Bestimmung der individuellen Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen. Anhand der individuellen Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen wurden die im darauffolgenden Baseline-fMRT-Paradigma angewandten Reizintensitäten (schmerzhaft, nicht schmerzhaft) festgelegt. Das fMRT-Paradigma wird in Abschnitt 2.5 und in Abbildung 7 näher erläutert. Im Anschluss an die Baseline-fMRT-Untersuchung wurden die Probanden randomisiert und erhielten entweder eine intravenöse Injektion Lipopolysaccharid (LPS; 0.4 ng/kg Körpergewicht; LPS-Gruppe) oder eine intravenöse Injektion des gleichen Volumens isotonischer Kochsalzlösung (Placebo-Gruppe). Nach zwei Stunden Wartezeit folgte die Testphase, da in diesem Zeitraum erhöhte systemische Zytokinspiegel zu erwarten waren (Grigoleit et al., 2010). In der Testphase wurden wie in der Baselinephase die viszerale Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen bestimmt und das fMRT-Paradigma absolviert. Dabei wurden die in der Baseline-Messung bestimmten Intensitäten für die Applikation viszeraler Stimuli während der fMRT-Messung übernommen. Im Anschluss an das hier beschriebene, auf viszerale Stimuli gerichtete Paradigma wurde im Rahmen der Studie auch ein somatischer Kontrollstimulus (Pinprick) eingesetzt sowie die Resting-State-Aktivität erfasst. Die Ergebnisse sind nicht Teil der vorliegenden Arbeit und werden an anderer Stelle (Benson et al., 2015; Labrenz et al., 2015) beschrieben. Dadurch, dass diese Messungen jeweils im Anschluss an das beschriebene Paradigma erfolgten, ist nicht mit einer Konfundierung der hier berichteten Ergebnisse zu rechnen. Nach Abschluss der Messungen erfolgte vor Verlassen des Labors am Studientag eine letzte Blutentnahme sechs Stunden nach Injektion zur Prüfung einer rückläufigen Entzündungsreaktion (Blutbild). Ferner wurden alle Probanden auf die bestehende Fahrtauglichkeit hingewiesen.

## **2.4 Lipopolysaccharid**

Das verwendete Lipopolysaccharid stammte von *Escherichia coli*-Stämmen (United States Pharmacopeia, LOT G3E069, Rockville, Maryland, USA). Wie von Grigoleit et al. (2011) im Detail beschrieben, folgte nach Lösung in sterilem Wasser und Filterung durch eine 0,2 µm-Membran eine Sicherheitstestung durch das Paul-Ehrlich-Institut (Bundesinstitut für Impfstoffe und biomedizinische Arzneimittel, Langen, Deutschland). Bis zur Verwendung lagerte das LPS gelöst in endotoxinfreien Borosilikatgläsern bei einer Temperatur von -20 °C und wurde für die Injektion mit sterilem Wasser verdünnt.

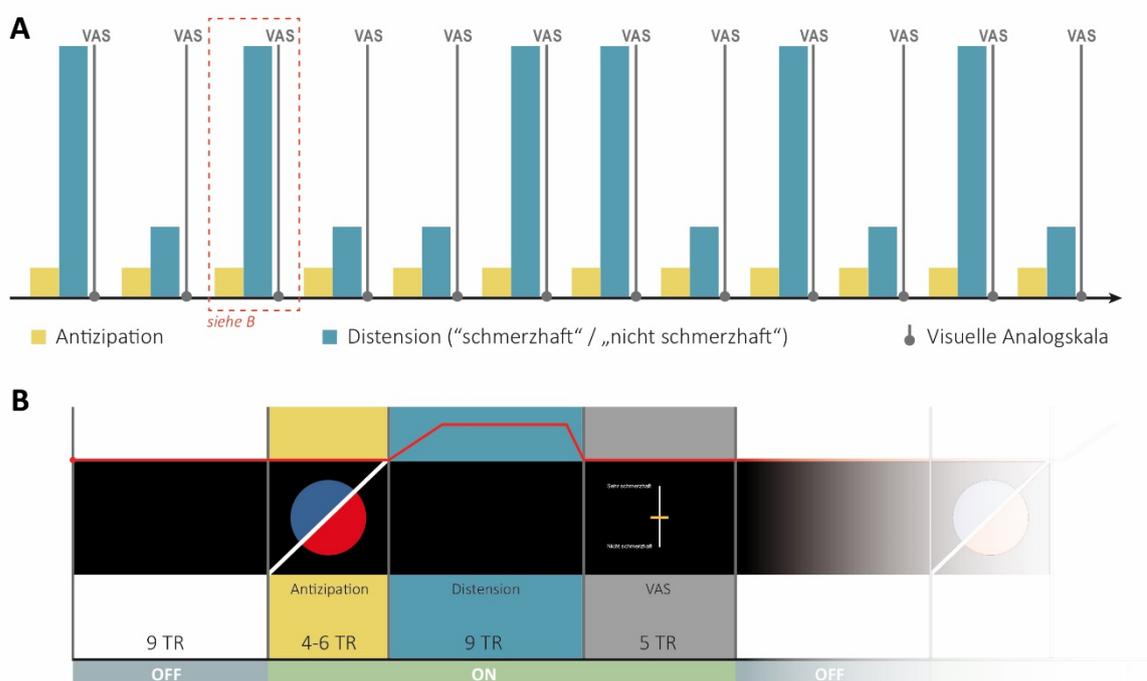
## 2.5 Das viszerale Schmerzmodell

Zur Anwendung schmerzhafter und nicht schmerzhafter viszeraler Reize wurde ein Modell der viszeralen Distensionen mittels Ballon-Katheter genutzt, modifiziert nach Lucas et al. (2006). Dabei wurden über einen rektal platzierten Ballon-Katheter mittels Barostat-System (modifiziertes Isobar 3-System; G&J Electronics, Toronto, Ontario, Kanada) Druckreize appliziert. Um das Modell MRT-kompatibel zu gestalten, befand sich das Barostat-System außerhalb des Scanner-Raumes und der Ballon-Katheter wurde über einen 3 m langen aus Polyethylen bestehenden Schlauch (3 mm Außendurchmesser, 1,8 mm Innendurchmesser) verbunden. Der den Ballon bildenden Polyethylen-Beutel (zylindrische Form, 10 cm Länge, 8 cm Durchmesser bei vollständiger Entfaltung, 500 ml Fassungsvermögen) wurde fest an den Katheter fixiert. Der Ballon-Katheter wurde etwa 5 cm von der Linea anocutanea entfernt im Rektum positioniert.

Die Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen wurden wie in früheren Studien der Arbeitsgruppe (Benson et al., 2014; Elsenbruch et al., 2010a; Elsenbruch et al., 2010b; Schmid et al., 2015) durch ein doppelt-randomisiertes, treppenförmig aufsteigendes Distensionsprotokoll ermittelt, bei dem die einzelnen Reize jeweils für eine Dauer von 10 s appliziert wurden (Benson et al., 2012b). Die Druckabstände zum nächsten Reiz betragen zwischen 2 und 10 mm Hg. Die einzelnen Distensionsreize wurden durch die Probanden während der Applikation auf einer Ratingskala mit sechs Items bewertet: 1 = "Keine Wahrnehmung", 2 = "Fragliche Wahrnehmung", 3 = "Sichere Wahrnehmung", 4 = "Unangenehme Wahrnehmung", 5 = "Sehr unangenehme Wahrnehmung", 6 = "Schmerzhaft (Abbruch)". Die Wahrnehmungsschwelle wurde definiert als Druck beim Wechsellpunkt von Item 2 zu 3, die Schmerzschwelle wurde als Druck beim Wechsellpunkt von Item 5 zu 6 definiert. Für die Applikation von Reizen während der fMRT-Messung wurden zudem ein „schmerzhafter“ und ein „nicht schmerzhafter“ Stimulus definiert. Der mit 6 bewertete Reiz abzüglich 5 mm Hg diente als „schmerzhafter“ Stimulus, da nach einer identischen LPS-Applikation in einer Vorstudie eine viszerale Hyperalgesie mit einer Reduktion der Schmerzschwelle in diesem Bereich auftrat (Benson et al., 2012b) und aus ethischen Gründen keine Stimuli oberhalb der individuellen Schmerzschwelle appliziert werden sollten. Aus selbigem Grund war zudem der maximal applizierte Druck auf 50 mm Hg limitiert. Als „nicht schmerzhafter“ Stimulus wurde der Druck bei Erreichen der Wahrnehmungsschwelle verwendet.

Während der Messung der BOLD-Antwort im fMRT wurden insgesamt zwölf Reize, sechs „schmerzhafte“ und sechs „nicht schmerzhafte“, pseudorandomisiert appliziert. Die Festlegung der Drücke erfolgte individualisiert auf Basis der Messergebnisse in der Untersuchung der Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen während der Baselinephase. Um die antizipatorische neurale Aktivierung untersuchen zu können (nicht Bestandteil der vorliegenden Ar-

beit), wurden „schmerzhafte“ und „nicht schmerzhafte“ Stimuli durch unterschiedliche optische Signale (blauer Kreis für „nicht-schmerzhafte“ bzw. roter Kreis für „schmerzhafte“ Stimuli) auf einem Monitor mit Hilfe einer Software (Presentation, NeuroBehavioral Systems Inc., Berkeley, Kalifornien, USA) angekündigt. Unter Verwendung eines Eingabegerätes (LUMItouch, Photon Control Inc., Burnaby, British Columbia, Kanada) erfolgte die subjektive Bewertung des Reizes unmittelbar im Anschluss auf einer 100 mm-VAS (Nullpunkt „nicht schmerzhaft“, Endpunkt „sehr schmerzhaft“). Sowohl während der Baseline- als auch der Testphase war das Paradigma identisch. Abbildung 7 veranschaulicht das fMRT-Paradigma grafisch und gibt Aufschluss über den detaillierten zeitlichen Ablauf eines OFF- und ON-Blockes.



**Abbildung 7 – fMRT-Paradigma** In der fMRT-Messung wurden sechs „schmerzhafte“ und sechs „nicht schmerzhafte“ Reize (blau) appliziert, wobei beide Reizformen spezifisch angekündigt wurden (Antizipation, gelb). Nach jedem Reiz erfolgte eine Bewertung mittels visueller Analogskala (VAS, grau) durch die Probanden (A). In B dargestellt ist ein OFF-Block und ein ON-Block bestehend aus Antizipation, Distension und Bewertung mit den verwendeten Zeiten (TR, repetition time, 1 TR = 2000 ms). Der Distensionsdruck (schematisch durch die rote Linie dargestellt) wurde mit einer Inflation von 3 TR, einer Plateauphase von 5 TR und einer Deflation von 1 TR verändert.

## 2.6 Gemessene Parameter

### 2.6.1 Vitalzeichen

Zu den gemessenen Vitalparametern zählten die nicht-invasive, manuelle Blutdruckmessung mittels Oberarmmanschette (boso clinicus I, Bosch + Sohn GmbH und Co. KG, Jun-

gingen, Deutschland), die manuelle radiale Pulsmessung und die Messung der transtympanalen Temperatur (GENIUS™ 2 Infrarot-Ohrthermometer, Covidien, Mansfield, Massachusetts, USA). Alle Parameter wurden sowohl bei der ärztlichen Voruntersuchung als auch entsprechend des Studienprotokolls zu den Zeitpunkten -2, -0.25, +1, +2, +3, +4 und +6, +24 Stunden erfasst.

### **2.6.2 Blutproben**

Eine initiale Blutprobe erfolgte zur gesundheitlichen Überprüfung im Rahmen des Einschlussverfahrens vor Studienteilnahme (Für die bestimmten Laborparameter siehe Seite 20). Am Hauptuntersuchungstag wurden Blutproben zur Bestimmung des Differentialblutbildes, Zytokinen und Cortisol zu den Zeitpunkten -2, -0,25, +1, +2, +3, +4, +6, und +24 Stunden nach Injektion entnommen (siehe unten). Letztlich folgte eine kontrollierende, abschließende Blutentnahme während der Nachuntersuchung der Probanden (Für die bestimmten Laborparameter siehe Seite 20).

#### *Differentialblutbild*

Das Differentialblutbild wurde zu allen Messzeitpunkten mittels automatisiertem Analyseverfahren (KX-21N, Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland) aus Ethylen-diamintetraessigsäure- (EDTA-) behandelten Blutproben (2,7ml EDTA-Monovette, Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland) erstellt.

#### *Tumornekrosefaktor- $\alpha$ und Interleukin-6*

Zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-6 wurden zu den Messzeitpunkten -2, -0.25, +1, +2, +3, +4 und +6 Stunden Blutproben mittels 9ml EDTA-Monovetten (Sarstedt AG, Nürnberg, Deutschland) entnommen, für 10 Minuten bei 4°Celsius und 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert und bis zur endgültigen Analyse bei -80°C gelagert. Die Bestimmung der Plasma-Zytokinlevel erfolgte mittels antikörperbasiertem Nachweisverfahren (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) nach Anweisung des Herstellers (Quantikine® IL-6 and high-sensitive TNF- $\alpha$  ELISA, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota). Die durch die Assays nachweisbaren minimalen Dosen betragen durchschnittlich 0.70 pg/ml für IL-6 und 0.11 pg/ml für TNF- $\alpha$ .

#### *Cortisol*

Die Entnahme und Behandlung der Proben zur Bestimmung der Plasma-Cortisolspiegel erfolgte wie oben für die Zytokine beschrieben. Die Analyse wurde unter Verwendung von antikörperbasierten Nachweisverfahren (ELISA) nach Herstelleranweisung durchgeführt (Cortisol ELISA, IBL International, Hamburg, Deutschland). Die minimal nachweisbare Plasmakonzentration betrug durchschnittlich 0.138 nmol/l.

### 2.6.3 Fragebögen

Während der Studie fanden vier standardisierte Fragebögen Anwendung. Dabei wurden zwei Fragebögen messwiederholt eingesetzt [State-Version des State-Trait-Angst-Inventars (STAI-S), Mehrdimensionaler Befindlichkeitsfragebogen (MDBF)] und zwei im Rahmen des Ein- bzw. Ausschlussverfahrens [Hospital Anxiety and Depression Score (HADS), GI-Symptomscore].

#### *State-Trait Angstinventar (STAI)*

Das State-Trait Angstinventar umfasst zwei Tests, zum einen den STAI-S-Test zur Ermittlung der Zustandsangst und zum anderen den STAI-T-Test zur Ermittlung der allgemeinen Ängstlichkeit (Laux et al., 1981). Der STAI-S besteht aus 20 Items, die in einer vierstufigen Skala die Intensität von Angst bzw. Angstfreiheit abfragen. Die Bewertungen werden nach Umkehrung der invers gestellten Fragestellungen zu einem Summenscore zusammengefasst. Wie Laux et al. (1981) beschrieben, deuten höhere Summenscores (20 Punkte im Minimum, 80 Punkte im Maximum) auf eine stärker ausgeprägte Ängstlichkeit. Der STAI-S fand Anwendung zur Ermittlung der momentanen Zustandsangst während des Experiments zu den Messzeitpunkten -0.25, +3 und +6 Stunden.

#### *Mehrdimensionaler Befindlichkeitsfragebogen (MDBF)*

Der Mehrdimensionale Befindlichkeitsfragebogen beinhaltet in der verwendeten Kurzform A zwölf Items, die drei bipolare Dimensionen messen: Gute-Schlechte Stimmung (GS), Wachheit-Müdigkeit (WM) und Ruhe-Unruhe (RU). Die verwendeten Adjektive werden fünfstufig ansteigend bewertet (Steyer et al., 1997). Der MDBF diente zu den Messzeitpunkten -0.25, +3 und +6 Stunden der Verlaufsbeurteilung der drei gemessenen Dimensionen vor und nach LPS-Anwendung.

#### *Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS-D)*

Die von Zigmond und Snaith (1983) verfasste Hospital Anxiety and Depression Scale diente im Rahmen des Einschlussverfahrens in der deutschen aktualisierten Version als Screeningverfahren für allgemeine psychische Beeinträchtigungen. Durch insgesamt vierzehn Items, wovon sieben ängstliche und sieben depressive Symptomatik erfassen, wird ein Gesamtsummenscore errechnet, der als Anhalt für eine psychische Beeinträchtigung dient (Herrmann-Lingen et al., 2011). Die Cutoff-Werte lagen bei  $\geq 8$  Punkte für leichte und  $\geq 11$  Punkte für deutliche Auffälligkeiten (Zigmond & Snaith, 1983). Die HADS-D wurde während des Ein- und Ausschlussverfahrens zum Screening auf psychische Erkrankungen verwendet.

### GI-Symptomscore

Der verwendete Symptomscore (Lacourt et al., 2014) umfasst zwölf Items, die jeweils in einer Likertskala abgefragt werden (0=“niemals“, 1=“ein bis zwei Mal pro Woche“, 3=“mehr als drei Mal pro Woche“). Die Items umfassen verschiedene gastrointestinale Symptome wie Diarrhö, Völlegefühl, Übelkeit, Blähungen und weitere. Ein Summenscore von >10 Punkten führte zum Ausschluss des Probanden (Lacourt et al., 2014). Der GI-Symptomscore wurde während des Ein- und Ausschlussverfahrens zum Screening auf gastrointestinale Erkrankungen verwendet.

## 2.7 Bildgebung und statistische Auswertung

### 2.7.1 fMRT-Daten

Die Aufzeichnung der bildgebenden Daten erfolgte mittels eines 3 Tesla Magnetresonanztomografen unter Verwendung einer 32-Kanal-Kopfspule (MAGNETOM® Skyra, Siemens Healthcare, Erlangen, Deutschland). Mit einer 3D-MPRage T<sub>1</sub>-gewichteten Sequenz wurden zunächst die Strukturaufnahmen angefertigt (*TR* 1900 ms, *TE* 44.8 ms, *TI* 900 ms, *flip angle* 9°, *FOV* 239 x 239 mm<sup>2</sup>, 192 *Slices*, Schichtdicke 0.9 mm, Voxel-Größe 0.9 x 0.9 x 0.9 mm<sup>3</sup>, Matrix 256 x 256 mm<sup>2</sup>, *GRAPPA* r=2). Mittels einer Multi-echo echo-planar imaging-Sequenz (ME-EPI) mit 3 Echos erfolgte die Aufzeichnung der BOLD-Antwort (*TE1* 13.0 ms, *TE2* 28.9 ms, *TE3* 44.8 ms, *TR* 2000 ms, *flip angle* 90°, *FOV* 220 x 220 mm<sup>2</sup>, 36 transversale am Corpus callosum ausgerichtete Schnitte, Schichtdicke 3.0 mm, Voxel-Größe 2.8 x 2.8 x 3 mm<sup>3</sup>, *Slice gap* 0.6 mm, Matrix 80 x 80 mm<sup>2</sup>, *GRAPPA* r=3). Die Analyse der gewonnenen Daten erfolgte durch Nutzung der Software SPM8 (Statistical Parametric Mapping 8, Wellcome Trust Centre for Neuroimaging, UCL, London, Großbritannien) implementiert in MatLab R2012a (Mathworks Inc., Sherborn, Massachusetts, USA). Die gewonnenen Daten unterliefen einer Zeit- und Bewegungskorrektur und wurden an das Koordinatensystem MNIbrain des Montreal Neurological Institute angepasst. Zudem erfolgte eine Weichzeichnerkorrektur mit Hilfe eines isotropen 8mm Gauß'schen Weichzeichners sowie eine Hochpassfilterung. Die *first-level*-Analyse wurde unter Verwendung eines autoregressiven Modells (AR) durchgeführt, alle folgenden *first*- und *second-level*-Analysen erfolgten voxelbasiert. In der *first-level*-Analyse der EPI-Daten wurde ein allgemeines lineares Modell sowie eine regressive Analyse mittels *haemodynamic response function* (hrf) verwendet.

Die während der Baselinephase akquirierten Daten der gesamten Stichprobe (N=26) wurden mittels *one-sample* t-Test auf eine schmerzinduzierte BOLD-Antwort untersucht. Mit Hilfe eines *two-sample* t-Tests wurden die beiden Gruppen (LPS, Placebo) auf unterschiedliche BOLD-Antworten während der Baselinephase überprüft.

Die während der Testphase erhobenen Ergebnisse wurden zunächst individuell auf *first-level*-Ebene für jeden Stimulus („nicht schmerzhaft“, „schmerzhaft“) separat für die Kontraste Testphase > Baselinephase und Baselinephase < Testphase aufbereitet. Anschließend erfolgte die Analyse auf *second-level*-Ebene unter Verwendung der Subjekte als zufälliger Faktor und *non-sphericity correction*. Um die zentrale Hypothese der Arbeit zu überprüfen, wurden mittels *two-sample* t-Tests Gruppenunterschiede in den Veränderungen der BOLD-Antworten auf viszerale Distensionsreize von der Baseline zur Testphase in zuvor festgelegten *regions of interest* (ROI) (Kontraste  $LPS_{\text{Testphase}} > \text{Baselinephase} > \text{Placebo}_{\text{Testphase}} > \text{Baselinephase}$  und umgekehrt) untersucht. Zur grafischen Aufbereitung folgte die Berechnung der Änderungen der *peak-voxel*-Aktivierungen pro Gruppe und Messzeitpunkt für Regionen, in denen sich signifikante Ergebnisse in den vorherigen *two-sample* t-Tests fanden. Die ROIs wurden in Anlehnung an den aktuellen Stand der viszeralen und somatischen Schmerzforschung (Bingel & Tracey, 2008; Tillisch et al., 2011; I. Tracey & Mantyh, 2007) wie folgt gewählt: Anteriore Inselrinde, posteriore Inselrinde, Thalamus, somatosensorischer Kortex (S1, S2), anteriorer cingulärer Kortex (ACC), medialer cingulärer Kortex (MCC), dorsolateraler präfrontaler Cortex (DLPFC). Sekundäre ROIs beinhalteten das periaquäduktale Grau (PAG), Putamen und rostrale ventromediale Medulla zur explorativen Untersuchung des Systems der deszendierenden Schmerzhemmung. Die ROI-Analysen erfolgten unter Verwendung des WFU Pick Atlas (Version 2.5.2) sowie unter *familywise error* (FWE) *correction*. Alle hier verwendeten Ergebnisse haben ein Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  und sind FWE-korrigiert dargestellt als  $p_{\text{FWE}} < 0.05$ . Alle verwendeten Koordinaten entsprechen dem MNI-Schema.

Es wurden darüber hinaus explorativ Korrelationen untersucht zwischen prozentualen Signaländerungen der *peak-voxel*-Aktivierungen signifikanter ROIs und dem maximalen Anstieg der Plasmakonzentrationen von TNF- $\alpha$  und IL-6 zum Zeitpunkt +2 Stunden nach Injektion mittels der Berechnung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman.

### 2.7.2 Nicht-fMRT-Daten

Alle beschriebenen Daten wurden mittels IBM® SPSS® Statistics 22 (SPSS Software, International Business Machines Corporation (IBM), Armonk, New York, USA) und GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, Kalifornien, USA) analysiert.

Es wurde eine Testung auf Normalverteilung mittels Kolmogorov-Smirnow-Test durchgeführt. Nicht-normalverteilte Variablen (Zytokine) wurden vor der Analyse log-transformiert, um eine Normalverteilung herzustellen. Messwiederholte erfasste Parameter wie die viszeralen Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen, VAS-Schmerzbewertung, psychologische Testung mittels STAI-S und MDBF sowie physiologische Parameter wurden mittels messwiederholter Varianzanalyse (ANOVA) auf Zeit-, Gruppen- und Interaktionseffekte untersucht.

Bei Interaktionseffekten  $p < 0.1$  wurden post-hoc t-Tests angewandt. Bei multiplen t-Tests wurde eine mögliche Alphafehler-Kumulierung mittels Bonferroni-Methode korrigiert. Bei gerichteten Hypothesen zu den primären Outcomevariablen (viszerale Schmerzschwellen) wurde post-hoc einseitig getestet. Korrelationen wurden unter Verwendung des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman berechnet. Das Signifikanzniveau beträgt  $\alpha = 0.05$  (im Falle einseitiger Tests  $\alpha = 0.10$ ). Alle Daten werden, solange nicht anders beschrieben, in Form von Mittelwerten und Standardfehlern des Mittelwerts (SEM) präsentiert.

## **2.8 Förderung**

Das zu dieser Arbeit führende Experiment fand im Institut für Medizinische Psychologie und Verhaltensimmunbiologie, Universitätsklinikum Essen, Universität Duisburg-Essen sowie in der Klinik für Diagnostische und Interventionelle Radiologie, Universitätsklinikum Essen unter der Leitung von Prof. Sigrid Elsenbruch und Prof. Sven Benson statt. Die Studie wurde gefördert durch Beiträge der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG, BE-5173/2-1; EL-236/11-1) sowie durch ein IFORES-Stipendium der Medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen, Deutschland für Dr. Alexander Wegner, Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie, Universitätsklinikum Essen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Beschreibung der Merkmale der Stichprobe

Das durchschnittliche Alter aller Probanden betrug  $26.3 \pm 0.8$  Jahre, der durchschnittliche Body-Mass-Index lag bei  $22.9 \pm 0.5$  kg/m<sup>2</sup>. Alle Probanden wiesen mit Erwerb der allgemeinen Hochschulreife einen vergleichbaren schulischen Ausbildungsstand auf. 38.5% (N=10) Teilnehmer lebten in einer Partnerschaft. Alle Teilnehmer lagen mit einem durchschnittlichen HADS-Angstskalenwert von  $3.6 \pm 0.5$  und einem HADS-Depressionsskalenwert von  $1.1 \pm 0.2$  unterhalb des Cutoff-Wertes und wiesen somit keine Hinweise auf vermehrte Ängstlichkeit oder Depressivität auf. Im Symptomscore für Magen- und Darm-Beschwerden ergab sich für die Stichprobe ein mittlerer Summenscore von  $2.9 \pm 0.6$ . Die Stichprobe wies vor Injektion, d. h. während der Baseline-Phase, eine durchschnittliche rektale Wahrnehmungsschwelle von  $12.7 \pm 0.6$  mm Hg und eine rektale Schmerzschwelle von  $34.1 \pm 1.5$  mm Hg auf. Die beiden Gruppen (Placebo, LPS) unterschieden sich lediglich im Beziehungsstatus signifikant. In allen übrigen Eigenschaften ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Eine detaillierte Beschreibung der einzelnen Gruppen zeigt Tabelle 1.

Soziodemografische und psychologische Merkmale für Probanden der LPS- und Placebo-Gruppe			
	<i>LPS</i> (N=14)	<i>Placebo</i> (N=12)	<i>P</i>
Alter (Jahre)	26.9 ± 1.2	25.7 ± 0.7	0.41
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	22.8 ± 0.8	23.2 ± 0.6	0.71
Schulbildung > 12 Jahre % (N)	100% (14)	100% (12)	
In Partnerschaft lebend % (N)	21,4% (3)	58,3% (7)	0.02
HADS Skalenwert für Ängstlichkeit	4.1 ± 0.7	3.0 ± 0.6	0.27
HADS Skalenwert für Depression	1.5 ± 0.4	0.8 ± 0.2	0.10
Magen- und Darm-Beschwerden-Score	3.6 ± 1.0	2.0 ± 0.5	0.21
Rektale Wahrnehmungsschwelle (mmHg), Baseline-Phase	12.0 ± 0.7	13.5 ± 0.9	0.20
Rektale Schmerzschwelle (mmHg), Baseline-Phase	34.6 ± 2.3	33.5 ± 2.0	0.73

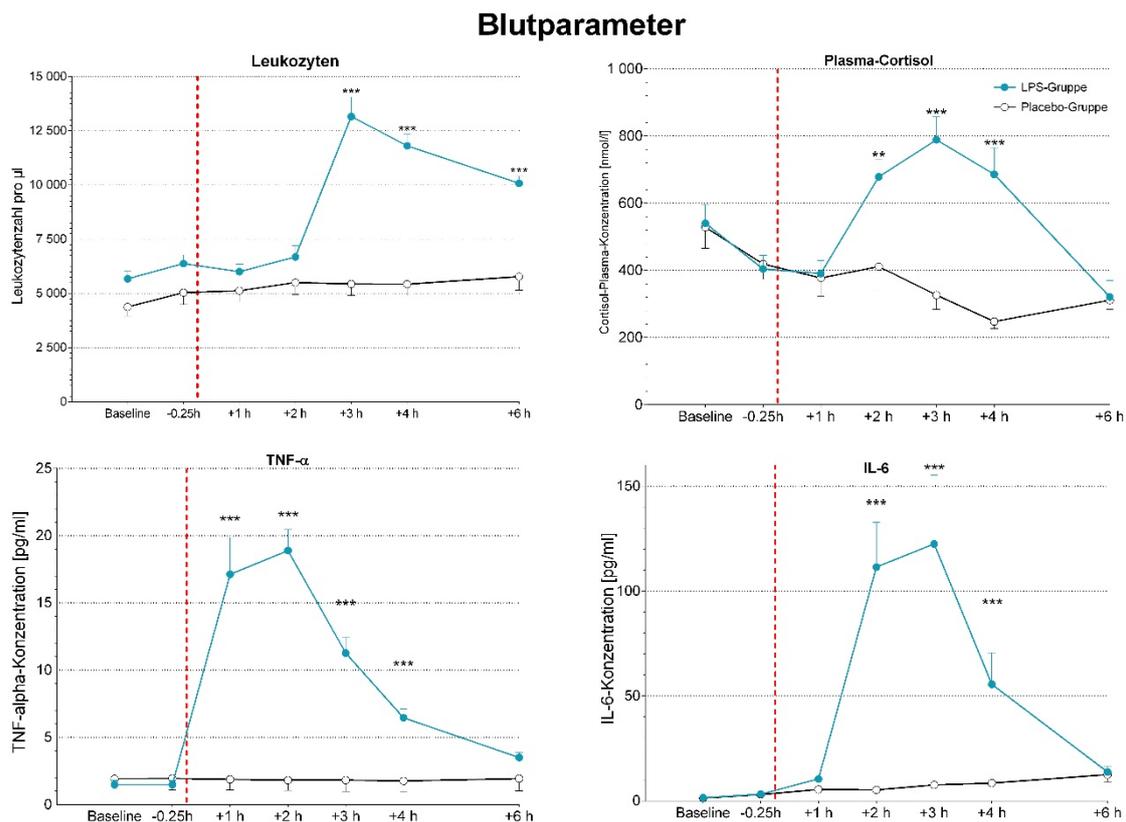
**Tabelle 1 – Merkmale der Stichprobe** Die Tabelle zeigt soziodemografische und psychologische Merkmale der in der Studie eingeschlossenen Stichprobe. Dargestellt sind, soweit nicht anders angegeben, die Werte unter Angabe des Standardfehlers des Mittelwerts (SEM).

### 3.2 Immunreaktion

Wie erwartet führte die Applikation von LPS zu einer systemischen Immunaktivierung, charakterisiert durch die Veränderung verschiedener Laborparameter im Blut, der Körpertemperatur sowie der Herzfrequenz.

#### Blutparameter

Zu beobachten waren ein signifikanter Anstieg der Leukozyten ( $F=14.1$ ,  $p<0.001$ , Interaktionseffekt) im Blutbild sowie der proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , ( $F=29.1$ ,  $p<0.001$ , Interaktionseffekt) und IL-6 ( $F=28.6$ ,  $p<0.001$ , Interaktionseffekt) bei Probanden der LPS-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe. Darüber hinaus war ein signifikanter Anstieg des Plasma-Cortisols ( $F=8.5$ ,  $p=0.001$ , Interaktionseffekt) zu verzeichnen. 24 Stunden nach der Anwendung von LPS ließ sich eine Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP,  $1.9 \pm 0.7$  mg/dl,  $F=49.5$ ,  $p<0.001$ , Interaktionseffekt) bei Probanden der LPS-Gruppe erheben. Alle erhobenen Parameter sind in Abbildung 8 zusammengefasst.

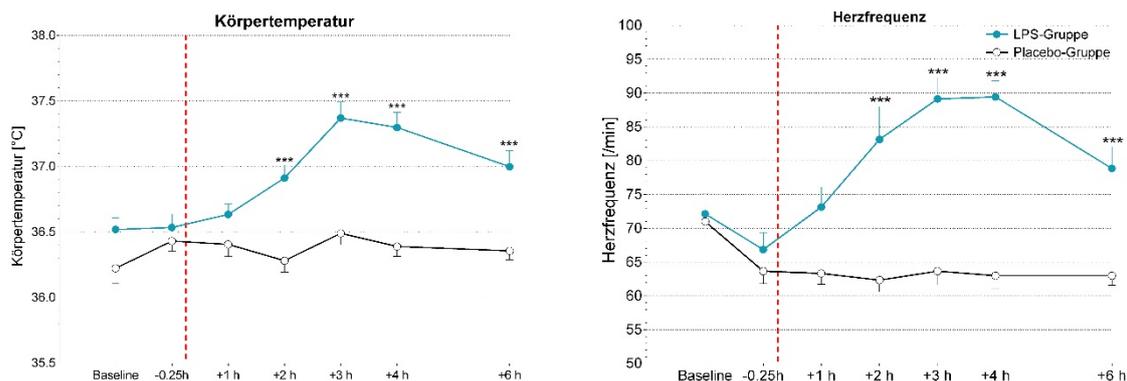


**Abbildung 8 – Blutparameter** Leukozytenzahl, Plasma-Cortisol-Konzentration, TNF- $\alpha$ -Konzentration und IL-6-Konzentration im Blut in der Baselinephase, 15 Minuten vor Injektion sowie 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden nach Injektion von Low-Dose-Lipopolysaccharid (0,4 ng/kg Körpergewicht, gekennzeichnet durch die rote Linie) (\*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , *posthoc Bonferroni-Tests*).

### Vitalparameter

Neben einem geringen Anstieg der Körpertemperatur ( $F=4.1$ ,  $p<0.009$ , Interaktionseffekt) zeigte sich in der LPS- im Vergleich zur Placebo-Gruppe auch eine erhöhte Herzfrequenz ( $F=11.5$ ,  $p<0.001$ , Interaktionseffekt), während keine signifikanten Effekte für den systolischen und diastolischen Blutdruck beobachtet wurden (Abbildung 9).

### Vitalzeichen

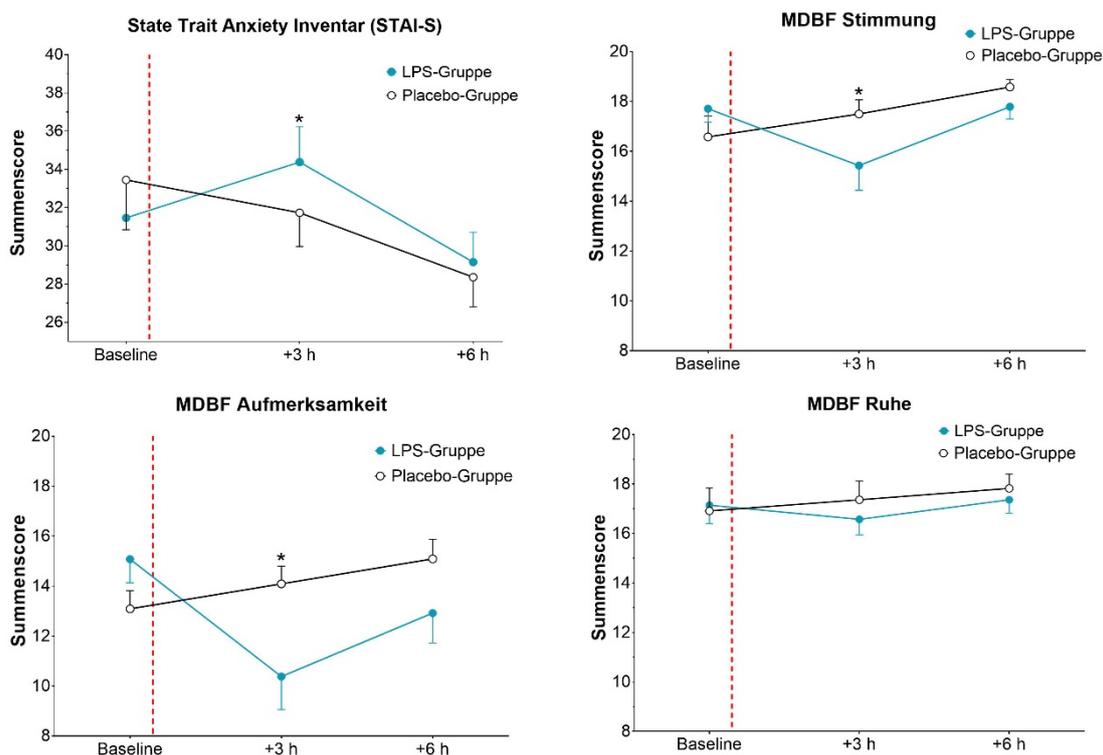


**Abbildung 9 – Vitalzeichen** Körpertemperatur tympanisch und Herzfrequenz in der Baselinephase, 15 Minuten vor Injektion sowie 1, 2, 3, 4 und 6 Stunden nach Injektion von Low-Dose-Lipopolysaccharid (0,4 ng/kg Körpergewicht, gekennzeichnet durch die rote Linie) (\*\*\*)  $p<0.001$ , *posthoc Bonferroni-Tests*).

### Stimmung und Befindlichkeit

Durch Auswertung des Mehrdimensionalen Befindlichkeitsfragebogens (MDBF) ließen sich in der dritten Stunde nach Injektion des LPS eine Reduktion der positiven Stimmung ( $F=3.7$ ,  $p=0.042$ , Interaktionseffekt) und der Aufmerksamkeit ( $F=11.5$ ,  $p<0.001$ , Interaktionseffekt) bei Probanden der LPS-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe erfassen, wohingegen keine signifikante Interaktion für die MDBF Subskala Ruhe zu beobachten war. Zudem war ein Anstieg der Zustandsangst bei Probanden der LPS-Gruppe zu verzeichnen (State-Trait Angstinventar – STAI-S;  $F=5.0$ ,  $p=0.003$ , Interaktionseffekt). Die Auswertung der Fragebögen ist in Abbildung 10 zusammengefasst.

### Stimmung und Befindlichkeit

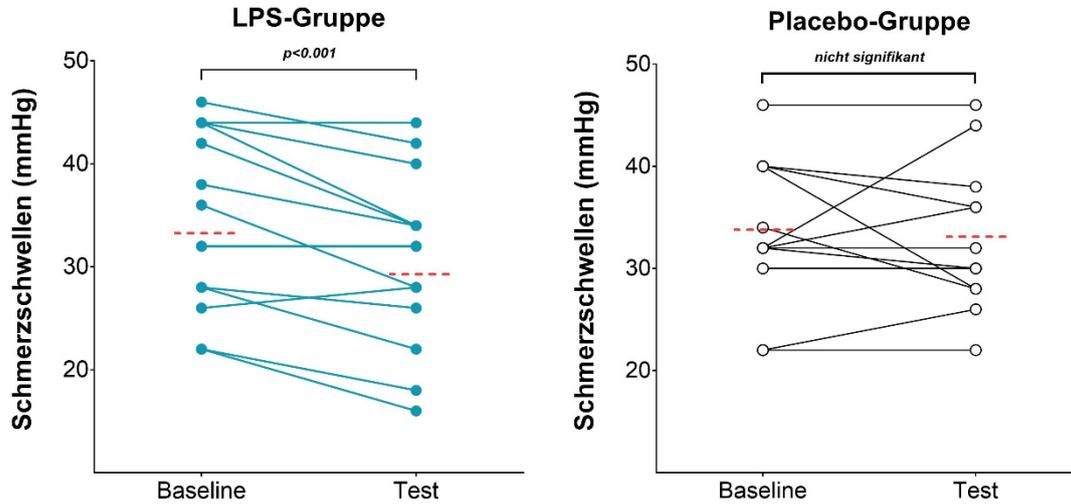


**Abbildung 10 – Stimmung und Befindlichkeit** Ergebnisse des Mehrdimensionalen Befindlichkeitsfragebogens (MDBF) und des State-Trait-Anxiety Inventars (STAI-S) in der Baselinephase sowie 3 und 6 Stunden nach Injektion von Low-Dose-Lipopolysaccharid (0,4 ng/kg Körpergewicht, gekennzeichnet durch die rote Linie) (\*  $p < 0.05$ , *posthoc Bonferroni-Tests*).

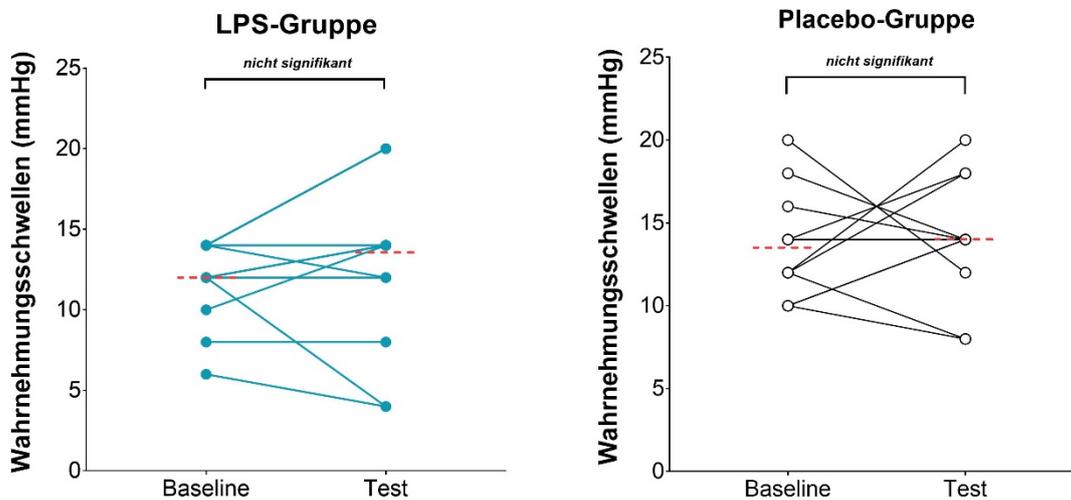
### 3.3 Rektale Wahrnehmungs- und Schmerzschwelle, Schmerzbewertung

Die Messung der Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen erfolgte während der Baseline- und der Testphase (vor und nach der Injektion von LPS bzw. Placebo). Es zeigte sich eine Reduktion der Schmerzschwellen von der Baseline- zur Testphase ( $F=5.4$ ,  $p=0.028$ , Zeiteffekt;  $F=3.2$ ,  $p=0.085$ , Interaktionseffekt, siehe Abbildung 11). Die rektalen Schmerzschwellen beider Gruppen unterschieden sich weder in der Baselinemessung (LPS-Gruppe:  $34.6 \pm 2.3$  mmHg, Placebo-Gruppe  $33.5 \pm 2.1$  mmHg) noch in der Testphase (LPS-Gruppe  $30.7 \pm 2.2$  mmHg; Placebo-Gruppe  $33.0 \pm 2.1$  mmHg). Jedoch wurde parallel zur BOLD-Analyse ergänzend auch das Ausmaß der Änderungen der Schmerzschwellen von der Baselinephase zur Testphase (berechnet als  $\Delta$ , delta-Werte) zwischen den Experimentalgruppen verglichen. Hierbei ergaben sich signifikant größere delta-Werte der Schmerzschwellen bei Probanden der LPS-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe (LPS-Gruppe:  $\Delta = -3.9 \pm 0.9$  mmHg; Placebo-Gruppe:  $\Delta = -0.5 \pm 1.7$  mmHg;  $t = -1.80$ ,  $p = 0.043$ ; einseitiger t-Test). Hinsichtlich der Wahrnehmungsschwellen konnte keine signifikante Änderung beobachtet werden (siehe Abbildung 12). In der Schmerzbewertung zeigten beide Gruppen

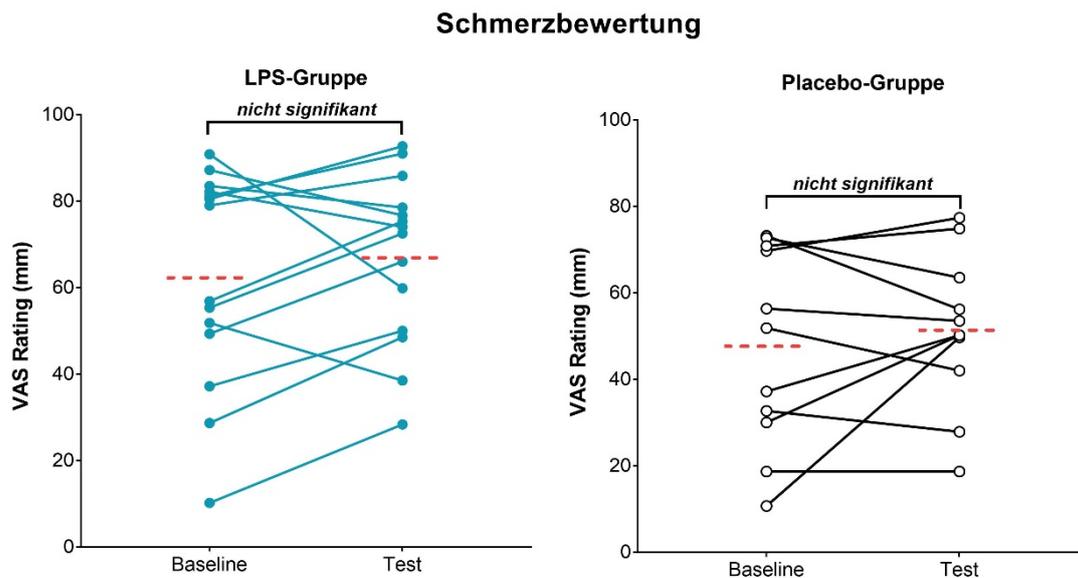
keine signifikanten Unterschiede nach Injektion für „schmerzhafte“ ( $F=1.7$ ,  $p=0.21$ , Zeiteffekt;  $F=0.2$ ,  $p=0.87$ , Interaktionseffekt) oder „nicht schmerzhafte“ Stimuli ( $F=1.8$ ,  $p=0.20$ , Zeiteffekt;  $F=0.2$ ,  $p=0.63$ , Interaktionseffekt) (siehe Abbildung 13).



**Abbildung 11 – Rektale Schmerzschwellen** Darstellung der rektalen Schmerzschwellen der LPS- und Placebo-Gruppe im Vergleich Baseline- zu Testphase. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme der Schmerzschwellen nach LPS-Injektion bei Probanden der LPS-Gruppe.



**Abbildung 12 – Rektale Wahrnehmungsschwellen** Darstellung der rektalen Wahrnehmungsschwellen der LPS- und Placebo-Gruppe im Vergleich Baseline- zu Testphase. Es zeigt sich keine signifikante Änderung der Wahrnehmungsschwellen nach LPS-Injektion.



**Abbildung 13 – Schmerzbewertung** Darstellung der Schmerzbewertung der LPS- und Placebo-Gruppe auf der visuellen Analogskala im Vergleich Baseline- zu Testphase. Es zeigt sich keine signifikante Änderung der Schmerzbewertung nach LPS-Injektion.

### 3.4 BOLD-Analyse

Die BOLD-Analyse erfolgte in zwei analytischen Schritten. Zunächst wurde für die Baselinephase in der gepoolten Gesamtstichprobe mittels *one-sample* t-Tests untersucht, ob die zu erwartenden BOLD-Antworten in Reaktion auf die schmerzhaften Stimuli zu beobachten waren. In einem zweiten Schritt erfolgte ein Gruppenvergleich zwischen LPS- und Placebo-Gruppe zur Auswertung der LPS-Effekte auf die viszerale Schmerzverarbeitung.

#### 3.4.1 Baselinephase

Mittels *one-sample* t-Tests wurde in einer konfirmatorischen Auswertung für die gepoolte Stichprobe (N=26) zum Zeitpunkt vor der Injektion (Baselinephase) innerhalb der ROIs die BOLD-Antwort auf die Applikation des schmerzhaften Stimulus (rektale Distension) analysiert. Wie erwartet zeigten sich hierbei signifikante Aktivierungen in Regionen der primären somatosensorischen Wahrnehmung und Schmerzverarbeitung. Dazu zählten insbesondere der somatosensorische Cortex (S2), der dorsolaterale präfrontale Cortex (DLPFC), die Inselrinde, sowie das anteriore und mediale Cingulum (ACC, MCC) wie in Tabelle 2 dargestellt.

**Durch viszeralen Schmerzreiz induzierte BOLD-Antwort  
der gesamten Stichprobe (N=26) in der Baseline-Messung**

	MNI-Koordinaten				t-Wert	P <sub>FWE</sub>
	H	x	y	z		
Insula	R	40	18	-6	10.85	0.000
	L	-42	12	-6	7.83	0.000
DLPFC	R	46	46	22	7.63	0.000
S2	R	62	-16	22	6.49	0.000
ACC	R	6	28	28	5.35	0.001
MCC	R	4	28	30	5.34	0.001

**Tabelle 2 – one-sample-t-Test-Analyse der BOLD-Antwort** Dargestellt sind die Ergebnisse des *one-sample-t-Tests* und der ROI-Analyse bei Untersuchung der gesamten Stichprobe (N=26) und erfolgreichem Schmerzreiz durch viszerale Distension während der Baselinephase. *H=Hemisphäre, DLPFC=Dorsolateraler präfrontaler Cortex, S2=Sekundärer somatosensorischer Cortex, ACC=Anteriores Cingulum, MCC=Mediales Cingulum. P-Werte sind FWE-korrigiert dargestellt (FWE; family-wise-error-correction).*

### 3.4.2 Testphase

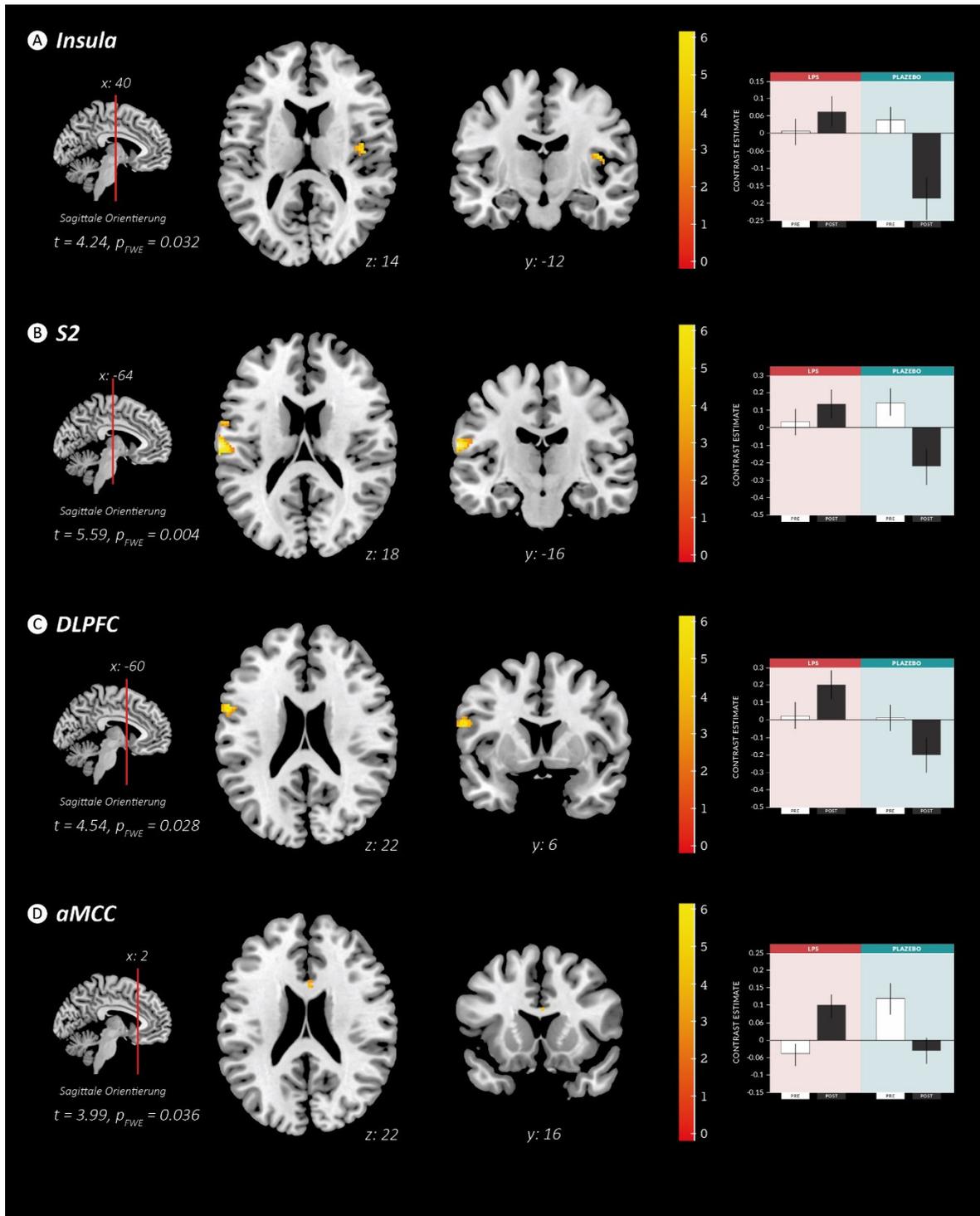
Um die LPS-Effekte auf die neurale Verarbeitung viszeraler Distensionen zu analysieren, wurden Veränderung der Aktivierungen vor und nach der LPS- bzw. Placebo-Injektion zwischen den beiden Experimentalgruppen mittels *two-sample t-Tests* verglichen. Hierbei zeigten Probanden der LPS-Gruppe im Vergleich zu Probanden der Placebo-Gruppe eine signifikant stärkere Veränderung der BOLD-Antwort auf schmerzhaft rektale Distensionen von der Baseline- zur Testphase (im Kontrast  $LPS_{\text{Testphase}} > \text{Baselinephase} > \text{Placebo}_{\text{Testphase}} > \text{Baselinephase}$ ). Im Einzelnen fanden sich stärkere BOLD-Antworten im sekundären somatosensorischen Cortex (S2,  $p_{\text{FWE}} = 0.004$ ), der posterioren Inselrinde ( $p_{\text{FWE}} = 0.032$ ), dem anterioren medialen Cingulum (aMCC,  $p_{\text{FWE}} = 0.036$ ), dem dorsolateralen präfrontalen Cortex (DLPFC,  $p_{\text{FWE}} = 0.028$ ), sowie im statistischen Trend im Thalamus ( $p_{\text{FWE}} = 0.064$ ) und im primären somatosensorischen Cortex (S1,  $p_{\text{FWE}} = 0.067$ ) (siehe Tabelle 3). Für den Gegenkontrast ergaben sich hingegen keine signifikanten Unterschiede. Auch bei der Untersuchung „nicht schmerzhafter“ Distensionsreize ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen Baseline- und Testphase im Kontrast  $LPS_{\text{Testphase}} > \text{Baselinephase} > \text{Placebo}_{\text{Testphase}} > \text{Baselinephase}$ . Die BOLD-Aktivierungen sind in Abbildung 14 dargestellt.

Explorativ wurden innerhalb der LPS-Gruppe die Zusammenhänge zwischen Plasma-Zytokinkonzentrationen (zwei Stunden nach LPS-Injektion) und den Peak-Voxel-Aktivierungen in den signifikanten ROIs analysiert. Hierbei zeigte sich, dass höhere Konzentration von TNF- $\alpha$  signifikant mit höheren Peak-Voxel-Aktivierungen im DLPFC ( $r=0.65$ ,  $p=0.011$ )

und im aMCC ( $r=0.61$ ,  $p=0.021$ ) assoziiert waren, sowie höhere IL-6 Plasmakonzentrationen mit einer stärkeren Aktivierung des DLPFC ( $r=0.54$ ,  $p=0.045$ ).

<b>BOLD-Signal während viszeraler Stimulation nach Injektion von LPS im Gruppenvergleich (LPS &gt; Placebo)</b>						
	<b>MNI-Koordinaten</b>					
	<b>H</b>	<b>x</b>	<b>y</b>	<b>z</b>	<b>t-Wert</b>	<b>P<sub>FWE</sub></b>
Posteriore Insula	R	40	-12	14	4.24	0.032
S1	R	18	-28	70	4.10	0.067
S2	L	-64	-16	18	5.59	0.004
DLPFC	L	-60	6	22	4.54	0.028
aMCC	R	2	16	22	3.99	0.036
Thalamus	L	-2	-12	-2	3.53	0.064

**Tabelle 3 – two-sample t-Test der BOLD-Antwort** Untersucht wurde der Kontrast LPS > Placebo zum Zeitpunkt zwei Stunden nach Injektion von LPS und unter Applikation des viszeralen Schmerzreizes (rektale Distension). Dargestellt sind die Ergebnisse des *two-sample-t*-Tests und der ROI-Analyse im Gruppenvergleich. *H*=Hemisphäre, *DLPFC*=Dorsolateraler präfrontaler Cortex, *S1*=Primärer somatosensorischer Cortex, *S2*=Sekundärer somatosensorischer Cortex, *aMCC*=Anteriores mediales Cingulum. *P*-Werte sind *FWE*-alpha-korrigiert dargestellt (*familywise-error-correction*;  $p<0.01$ ).



**Abbildung 14 – BOLD-Signale bei der Applikation rektaler Schmerzreize im Kontrast LPS<sub>Testphase</sub> > Baselinephase > Placebo<sub>Testphase</sub> > Baselinephase** In Teil A dargestellt zeigt sich eine signifikant stärkere Aktivierung der Inselrinde bei Probanden der LPS-Gruppe im Vergleich zu Probanden der Placebo-Gruppe ( $t = 4.24, p_{FWE} = 0.032$ ). Teil B visualisiert die Aktivierung des sekundär somatosensorischen Kortex ( $t = 5.59, p_{FWE} = 0.004$ ), während Teil C den DLPFC im angegebenen Kontrast darstellt mit signifikant stärkerem BOLD-Signal ( $t = 4.54, p_{FWE} = 0.028$ ). Der aMCC weist wie in Teil D veranschaulicht ebenfalls signifikant stärkere Aktivierungen auf ( $t = 3.99, p_{FWE} = 0.036$ ). Rechtsseitig findet sich die Darstellung der Contrast Estimates. Die sagittale Darstellung dient der Orientierung.

## 4 Diskussion

Die viszerale Hyperalgesie ist zentrales Symptom vieler gastrointestinaler Erkrankungen wie dem Reizdarmsyndrom, dessen Entstehungsmechanismen zum Zeitpunkt dieser Arbeit unvollständig erklärt sind. Korrelative Befunde bei an Reizdarmsyndrom erkrankten Patienten deuten auf die Relevanz immunologischer Mechanismen. Eine Infiltration von Entzündungszellen wie T-Lymphozyten in Rektumbiopsien dieser Studienpatienten im Sinne einer lokalen Inflammation sowie erhöhte Zytokinlevel im Plasma im Sinne einer systemischen Low-Grade-Immunaktivierung unterstützen diese These (Al-Khatib & Lin, 2009). Proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-8 können sowohl an peripheren, lokalen als auch an zentralen Zielstrukturen entlang der sog. Gehirn-Darm-Achse zu einer viszeralen Hyperalgesie beitragen (Ohman & Simren, 2010; Wilder-Smith, 2011) (siehe auch Abschnitt 1.3). So werden durch inflammatorische Mediatoren nozizeptive Afferenzen des N. vagus erregt und diese auf zentraler Ebene verarbeitet (Anand et al., 2007). Auch über die Medulla spinalis wirken sympathische und parasympathische Nervenfasern aus dem Intestinum und beeinflussen die Verarbeitung von Schmerz (Mayer & Tillisch, 2011). Letztlich interagieren Zytokine direkt an der Blut-Hirn-Schranke über aktive und passive Mechanismen mit Gliazellen und Neuronen des zentralen Nervensystems (Banks, 2009; Hopkins, 2007). Verschiedene Studien dokumentierten die Wirkung einer Endotoxinämie auf die Wahrnehmung verschiedener Schmerzmodalitäten. So scheint die Immunreaktion durch Endotoxine zwar keinen Einfluss auf kutane Stimuli wie Pinprick-(Nadelstich-) Reize zu haben (Hutchinson et al., 2013; Wegner et al., 2014). Für thermische, Druck- und viszerale Schmerzstimuli finden sich jedoch Belege einer durch Endotoxine induzierten Hyperalgesie (Benson et al., 2012b; Coelho et al., 2000b; Hutchinson et al., 2013; Wegner et al., 2014; Wegner et al., 2015).

Dass eine Endotoxinämie, vermittelt über die TLR-Rezeptorfamilie, zu einer viszeralen Hyperalgesie führt, wurde bereits vor längerer Zeit in tierexperimentellen Studien gezeigt (Coelho et al., 2000b; Dantzer et al., 2000; Liu et al., 2005). In jüngerer Zeit konnte eine Reduktion rektaler Schmerzschwellen im Sinne einer viszeralen Hyperalgesie auch beim Menschen durch die systemische Gabe niedrig-dosierten Endotoxins experimentell induziert werden (Benson et al., 2012b). Ausgehend von den beschriebenen tierexperimentellen Befunden sowie von der humanexperimentellen Vorstudie unserer Arbeitsgruppe (Benson et al., 2012b) erwarteten wir im Rahmen unserer ersten Hypothese, dass sich die zuvor beobachtete Reduktion der viszeralen Wahrnehmungs- und Schmerzschwellen nach LPS-Gabe in einer unabhängigen Studienpopulation reproduzieren lässt. Wie in früheren Studien unserer (Benson et al., 2012; Grigoleit, 2010; Wegner et al., 2014; 2015) und anderer

Arbeitsgruppen (Karshikoff et al., 2015) war auch in dieser randomisierten, kontrollierten und doppel-blinden Studie nach LPS-Gabe (im Vergleich zur Placebo-Gruppe) eine signifikante Zunahme der Plasma-Konzentrationen von TNF-alpha, IL-6 und Cortisol sowie ein leichter Anstieg der Körpertemperatur zu beobachten. Die erwartete signifikant stärkere Abnahme der viszeralen Schmerzschwellen nach LPS-Gabe (im Vergleich zur Placebo-Gabe) zeigte sich in der Varianzanalyse lediglich als statistischer Trend für den Interaktionseffekt zwischen Messzeitpunkt (Baseline- vs. Testphase) und Gruppe (LPS vs. Placebo). In einem ergänzend (analog zur Analyse der BOLD-Daten) berechneten Vergleich der Änderungs-(Delta-) Werte für die Schmerzschwellen von der Baseline- zur Testphase konnte jedoch gezeigt werden, dass die Veränderung der Schmerzschwellen bei Probanden der LPS-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant größer war. Jedoch sollte dieser Befund unter Vorbehalt betrachtet werden, da sich eine signifikante Schmerzschwellenreduktion nur unter einseitiger Testung ergab. Möglicherweise ist das Fehlen eines eindeutig signifikanten Ergebnisses für die Schmerzschwellenreduktion nach LPS-Gabe auch auf die vergleichsweise kleine Stichprobe (mit daraus resultierender geringer statistischer Power) und eine höhere Varianz im hier durchgeführten Zwischengruppendesign (gegenüber der vorherigen Crossover-Studie) zurückzuführen. Zwischenzeitlich konnte jedoch der frühere Befund einer LPS-induzierten Reduktion der viszeralen Schmerzschwellen in einer unabhängigen Studie (Wegner et al., 2015) reproduziert werden. Insgesamt ist also weiterhin davon auszugehen, dass eine Endotoxämie zu einer viszeralen Hyperalgesie im Sinne reduzierter Schmerzschwellen führt. Die resultierende „frühere“ Wahrnehmung viszeraler Reize könnte – wie im Kontext des *Sickness Syndromes* postuliert, vgl. Abschnitt 1.2.1 – evolutionsbiologisch sinnvoll sein, um toxische Reize möglichst früh zu erkennen und zu meiden. Entgegen unserer Erwartungen konnte für die sekundären Zielparameter (viszerale Wahrnehmungsschwelle, Bewertung der Stimuli mittels VAS) kein LPS-Effekt beobachtet werden. Dies steht im Einklang mit den Befunden einer weiteren Studie (Wegner et al., 2015) unserer Arbeitsgruppe, die unabhängig und parallel zu dieser Studie durchgeführt wurde. Zusammenfassend scheint eine LPS-induzierte Immunaktivierung insbesondere zu einer Reduktion der viszeralen Schmerzschwellen zu führen, wohingegen die von Benson et al. (2012b) postulierten Effekte auf viszerale Wahrnehmungsschwellen und VAS-Bewertungen nicht in unabhängigen Untersuchungen bestätigt werden konnten und entsprechend zurückhaltend interpretiert werden sollten.

Die zentralen Mechanismen einer LPS-induzierten systemischen Immunaktivierung, die zu einer Entstehung der viszeralen Hyperalgesie beitragen können, wurden bislang nur unzureichend untersucht. Im Rahmen unserer zweiten Hypothese erwarten wir, dass während einer LPS-induzierten Immunaktivierung signifikant stärkere BOLD-Signale in Arealen zu

beobachtet sind, die dem medialen und lateralen Schmerzsystem zugeordnet werden. Für das mediale (affektiv-kognitive) System sind dies der präfrontale Kortex, die anteriore Inselrinde, der anteriore cinguläre Kortex und Kernbereiche des Thalamus. Für das laterale (sensorisch-diskriminative) System sind dies die posteriore Inselrinde, der primär- und sekundär-sensorische Kortex und Kerngebiete des Thalamus.

In dieser Arbeit zeigte sich in der Analyse der fMRT-Daten, dass die Veränderung der BOLD-Antwort auf viszerale Schmerzreize von der Baseline- zur Testphase (nach der Injektion) in der LPS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Kontrast LPS > Placebo) in unterschiedlichen Arealen stärker war. So ließen sich nach LPS-Gabe signifikant stärkere Aktivierungen der posterioren Inselrinde, des somato-sensorischen Kortex (S2, sowie als Trend S1), des dorsolateralen präfrontalen Kortex, des anterioren medialen cingulären Kortex und im Trend des Thalamus beobachten.

Mit der neuronalen Verarbeitung viszeraler Schmerzreize werden unterschiedliche Hirnstrukturen und -netzwerke in Verbindung gebracht. Die primär schmerzverarbeitenden Areale für den viszeralen Schmerzreiz sind das laterale und mediale Schmerzsystem. Das laterale Schmerzsystem besteht aus lateralem Thalamus, dem primär- und sekundär-sensorischen Kortex (S1, S2) sowie der posterioren Inselrinde und gilt als sensorisch-diskriminative Komponente der Schmerzwahrnehmung (Coghill et al., 1999). Dem medialen System, bestehend aus medialem Thalamus, anteriorer Inselrinde, cingulärem Kortex und präfrontalem Kortex, wird dagegen eine affektiv-kognitive Verarbeitung zugesprochen. Diese Komponente, insbesondere der anteriore cinguläre Kortex, ist für eine Schmerzbewertung und -Einschätzung verantwortlich (Rainville et al., 1999). Beide Systeme werden über viszerale Afferenzen über die Medulla spinalis, die Medulla oblongata und den Nucleus tractus solitarii erreicht (Mayer et al., 2006a). Anteriore Inselrinde und der orbitofrontale Kortex werden zudem zu einem emotional verarbeitenden Netzwerk zusammengefasst (Mayer et al., 2006a).

In der Übertragung obiger Befunde auf dieses Theorem, zeigte insbesondere das laterale Schmerzsystem in der LPS-Gruppe eine vermehrte Aktivität in Reaktion auf viszerale Schmerzreize. Demnach scheint während einer LPS-induzierten Immunaktivierung insbesondere die sensorisch-diskriminative Komponente der Schmerzwahrnehmung beeinflusst zu werden. Dies steht im Einklang mit der beobachteten Reduktion der viszeralen Schmerzschwellen nach LPS-Gabe. Entgegen den Erwartungen, waren in diesem Experiment jedoch nur wenige Anteile des affektiv-kognitiven Schmerzsystems stärker aktiviert. Dazu kongruent scheint das Fehlen eines LPS-Effektes auf die affektiv-emotionale Schmerzbewertung in der Bewertung mittels VAS. Die in der Vorstudie (Benson et al., 2012) beobachtete alterierte Bewertung insbesondere niedrigschwelliger viszeraler Reize als unangenehmer und intensiver konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Neuere Studien sehen insbesondere für Kerngebiete des Thalamus, für die Inselrinde und den anterioren cingulären Kortex über die vorig genannten Aufgaben hinaus eine Relevanz für die Aufrechterhaltung der allgemeinen Homöostase. Daher werden diese Strukturen auch als afferentes homöostatisches Netzwerk aufgefasst, das mit Afferenzen aus dem Hirnstamm Verbindungen zu primär- und sekundär-sensorischem Kortex beinhaltet (Mayer et al., 2006a; Tillisch & Labus, 2011; Tillisch et al., 2011). Dieses Netzwerk kann im Allgemeinen sowohl durch schmerzhafte und nicht-schmerzhafte als auch emotionale Stimuli aktiviert werden (Mayer et al., 2006a). Interessanterweise konnte auch bei Patienten mit RDS eine vermehrte Aktivierung dieses Netzwerkes festgestellt werden (Tillisch et al., 2011). Dementsprechend ist eine mögliche Sensitivierung dieses Areals durch eine systemische Inflammation – sei es im Rahmen der hier angewandten experimentellen systemischen Immunaktivierung oder, wie korrelative Befunde zeigen, durch eine Low-Dose-Inflammation bei RDS-Patienten (vgl. Abschnitt 1.1) – diskutabel.

Für den dem medialen Schmerzsystem zugeschriebenen dorsolateralen präfrontalen Kortex, der ebenfalls eine stärkere Aktivierung im obig beschriebenen Kontrast zeigte, existieren ebenfalls ergänzende Befunde zur Funktion: Neben einer schmerzmodulatorischen Beteiligung wird dem DLPFC auch eine Funktion zur Selektion und Inhibition kognitiver Prozesse zugesprochen (MacDonald et al., 2000; Stein et al., 2012). So führte eine Inaktivität des DLPFC im Rahmen von Placeboanalgesie-Studien zu einer verminderten Analgesie, während eine stärkere Aktivierung zu einer Inhibition kognitiver Prozesse während multimodaler und emotional-kognitiver Aufgaben führte (Krummenacher et al., 2010; Kullmann et al., 2014; MacDonald et al., 2000; Moieni et al., 2015). Die hier gesehene vermehrte Aktivierung des DLPFC kann somit auf eine stärkere Selektion ablaufender Mechanismen hinweisen mit Hemmung momentan weniger priorisierter Abläufe, z. Bsp. im Sinne einer lebenswichtigen Reaktion zur Aufrechterhaltung der für die Homöostase notwendigen Prozesse unter der Herausforderung einer Entzündungsreaktion. Dies kann eine Erklärung für die annähernd fehlenden LPS-Effekte auf die affektiv-kognitive Verarbeitung viszeraler Stimuli sein.

Zusammenfassend war während der LPS-induzierten Immunaktivierung eine vermehrte Aktivität bei der Verarbeitung viszeraler Stimuli insbesondere des lateralen Schmerzsystems bzw. des afferenten homöostatischen Netzwerkes mit posteriorer Inselrinde, anteriorem medialen cingulären Kortex und lateralen Thalamuskernen, bei annähernd fehlender Veränderung der affektiv-emotionalen Schmerzverarbeitung zu beobachten. Es liegt nahe, dass es im Kontext des bereits diskutierten *Sickness Syndrome* im Sinne einer evolutionsbiologischen Kaskade zu einer Fokussierung auf die Schmerzwahrnehmung, zum Beispiel zur frühzeitigen Abwehr toxischer Stimuli, kommt. Mit dieser Theorie könnten möglicherweise auch die in diesem Experiment dokumentierten, reduzierten Schmerzschwellen in

Einklang zu bringen sein. Viszerale Noxen würden durch eine zentrale Hyperalgesie und konsekutive Senkung der Schmerzschwellen früher erkannt und könnten so zu einer Anpassung des Verhaltens beitragen. Für einen protektiven bzw. adaptiven Effekt des Sickness Syndromes sprechen auch weitere Befunde aus anderen Studien, die während einer Endotoxinämie auch eine Teilnahmslosigkeit und verminderte physische Aktivität zeigten (s. zusammenfassend Shattuck & Muehlenbein, 2015). Diese Phänomene können im sozialen Kontext zu einer Reduktion des Risikos durch Exposition interpretiert werden.

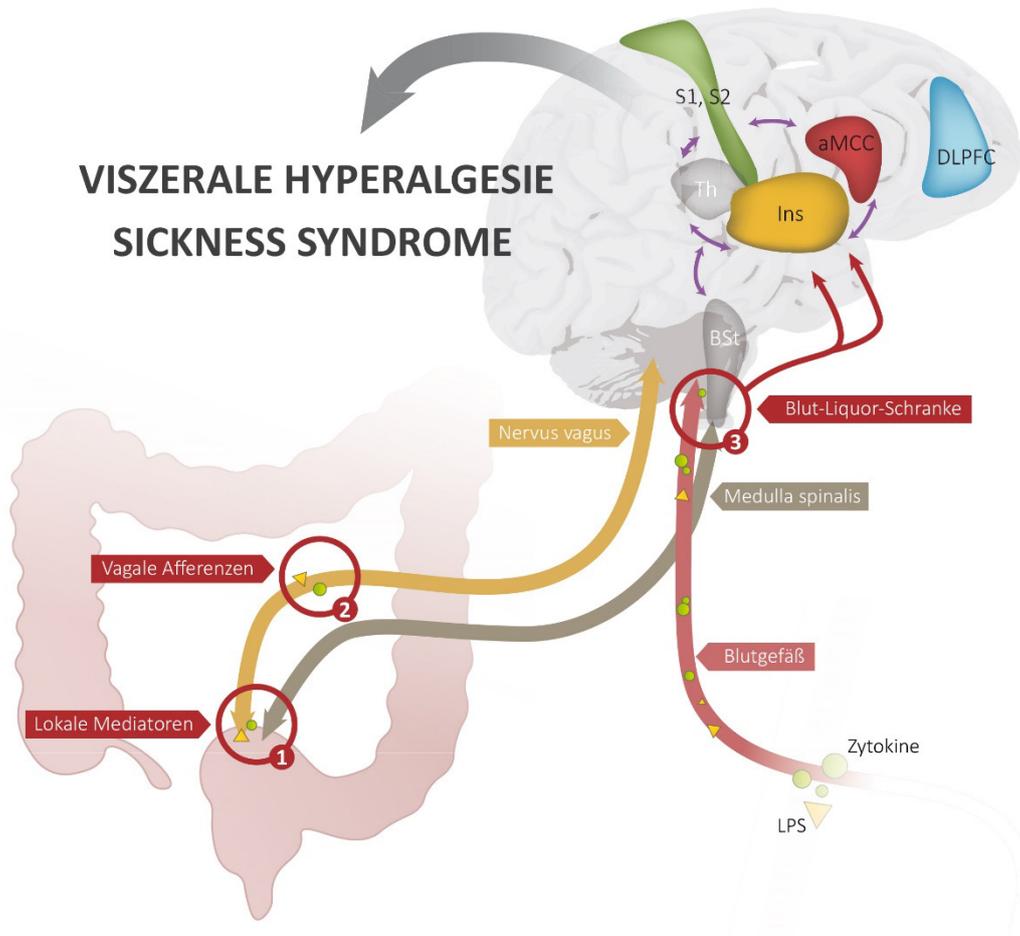
Im Rahmen der dritten Hypothese erwarteten wir ergänzend eine Korrelation der Plasmakonzentrationen proinflammatorischer Zytokine mit dem BOLD-Signal in schmerzverarbeitenden Arealen nach LPS-Gabe. Bereits in einer Vorstudie zu dieser Arbeit ohne den Einbezug einer bildgebenden Methodik fand sich eine Korrelation der Plasmazytokinspiegel mit der Abnahme der viszeralen Schmerzschwellen während der Endotoxinämie (Benson et al., 2012b). Ausgehend von der Annahme eines zentralen Mechanismus bei der Entstehung einer viszeralen Hyperalgesie und unter Berücksichtigung des Wirkungsweges von Endotoxinen ist daher zu vermuten, dass auch die Aktivierung schmerzverarbeitender Strukturen im Sinne eines stärkeren BOLD-Signals mit der Plasmakonzentration proinflammatorischer Zytokine korreliert. Ein bei der immunologischen Antwort auf die TLR4-Rezeptorbindung von LPS zentrales Zytokin ist der Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). TNF- $\alpha$  ist ein Bestandteil der Akute-Phase-Reaktion und wichtiger Signaltransmitter für die Entstehung von Fieber, die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse (HHNA) sowie die Proliferation und Mobilisation der zellulären Immunantwort durch Makrophagen und Granulozyten (Hehlgans & Pfeffer, 2005). Im Rahmen der experimentell induzierten systemischen Entzündungsreaktion konnte zuverlässig ein Peak der Plasmakonzentration etwa zwei Stunden nach LPS-Injektion nachgewiesen werden (Schedlowski et al., 2014). Daher wurde in dieser Arbeit eine Korrelation zwischen der Aktivierung schmerzverarbeitender Areale des ZNS und der Plasmakonzentration von TNF- $\alpha$  erwartet. Ein weiteres, für die Immunantwort bedeutendes Zytokin ist das Interleukin-6 (IL-6). IL-6 hat ebenso wie TNF- $\alpha$  eine bedeutende Rolle in der bakteriellen Abwehrreaktion. So ist IL-6 ein weiteres wichtiges Signalmolekül für die Akute-Phase-Reaktion des Körpers mit Induktion einer zellulären Immunreaktion insbesondere durch Lymphozyten und Makrophagen, sodass es eine synergistische Wirkung mit TNF- $\alpha$  eingeht (Jones, 2005). Die Konzentrationen von IL-6 sind ebenso nach etwa zwei Stunden nach Injektion von LPS im Experiment beim Menschen am höchsten (Schedlowski et al., 2014). Auch für IL-6 wurde eine Korrelation zu Aktivierungen obig aufgeführter Areale in der fMRT getestet. Für beide Zytokine waren in der vorliegenden Studie die Peak-Level bei +2 Stunden nach Injektion von LPS zu

beobachten. Wie erwartet zeigten sich positive Korrelationen von TNF- $\alpha$ -Plasma-Konzentrationen (nach +2h) und Peak-Voxel-Aktivierungen in DLPFC und aMCC sowie eine positive Korrelation zwischen IL-6-Plasmaspiegeln (nach +2h) und Peak-Voxel-Aktivierungen im DLPFC. Diese Korrelationen unterstützen, dass Zytokine eine zentrale Wirkung der durch LPS ausgelösten Immunreaktion vermitteln. Im Einzelnen weisen diese Korrelationen auf einen Zusammenhang zwischen der Endotoxinämie und den BOLD-Signalen während der viszeralen Stimulation hin. Interessanterweise sind TNF- $\alpha$  und IL-6 mit der Peak-Voxel-Aktivierung in unterschiedlichen Arealen assoziiert. Dies könnte ein Hinweis auf eine mögliche Spezifität von einzelnen Zytokinen auf einzelne Areale sein, wie sie beispielsweise im Sinne von unterschiedlichen Rezeptordichten bei anderen Neurotransmitterstoffen beobachtet wird. Obwohl diese Beobachtung bislang nicht weitreichend untersucht ist, gibt es Hinweise auf eine Spezifität von Zytokinrezeptoren und sogar LPS-abhängige Hochregulation der Rezeptordichte auch von IL-6R und TNF- $\alpha$ R im Tierversuch (Utsuyama & Hirokawa, 2002). Erhöhte systemische TNF- $\alpha$  und IL-6 Konzentrationen führen zu einer Veränderung der Körpertemperatur (pyretischer Effekt) und greifen in die neuroendokrine Regulation ein (Jones, 2005). Dies sind beides Effekte im Sinne einer homöostatischen Anpassung an die immunologische Belastungssituation des Organismus.

In der Zusammenfassung der erhobenen Befunde kann folgendes festgehalten werden: Die experimentell induzierte systemische Immunreaktion, ausgelöst durch 0,4 ng/kg Körpergewicht Lipopolysaccharid (*E. coli*) intravenös injiziert, führte zu einer verstärkten Aktivierung schmerzverarbeitender Areale des zentralen Nervensystems während der Applikation schmerzhafter viszeraler Stimuli. Eine veränderte Schmerzverarbeitung bei der Anwendung „nicht schmerzhafter“ Stimuli ließ sich entgegen den Erwartungen nicht zeigen. Auf einen viszeralen schmerzhaften Stimulus reagierten insbesondere Zentren, welche die Funktion der sensorisch-diskriminativen Schmerzverarbeitung übernehmen und gleichzeitig einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Homöostase des Organismus haben, wie die posteriore Inselrinde, der Thalamus und der anteriore cinguläre Kortex. Die verstärkte Aktivierung des DLPFC scheint die Annahme einer Fokussierung oder Differenzierung in dem Sinne zu stützen, dass der DLPFC kognitive Prozesse inhibiert und ebenfalls eine Rolle für die Homöostase spielt. Die Korrelation der im Plasma gemessenen Zytokin-Konzentrationen mit der Aktivierung des DLPFC bzw. ACC unterstützt eine zentrale Wirkung der Zytokine.

Diese Befunde lassen sich in das Konzept des Sickness Syndromes einordnen. Eine Endotoxinämie kann sowohl über direkte als auch indirekte Wege über TLR4-Rezeptoren und noxische Mediatoren zu einer verstärkten Nozizeption führen (Nicotra et al., 2012). Die vorliegende Arbeit zeigte den bedeutenden Einfluss einer systemischen Entzündungsreaktion

und einer erhöhten Konzentration zirkulierender proinflammatorischer Zytokine insbesondere auf die zentralen Mechanismen der Schmerzverarbeitung und Schmerzsensitivierung. Diese veränderte Schmerzverarbeitung kann als integraler Anteil des Zytokin-vermittelten Sickness Syndromes betrachtet werden (K. J. Tracey, 2010). Die Abbildung 15 soll zusammenfassend die Befunde dieser Arbeit in die aktuelle Datenlage zu viszeralem Schmerz unter Endotoxinämie einordnen.



**Abbildung 15 – Einordnung der Befunde in die aktuelle Datenlage** Endotoxine lösen durch die Bindung an TLR4-Rezeptoren eine Kaskade zur Proteinbiosynthese von Zytokinen aus, die lokal nozizeptiv wirken (1). Über eine Bindung an Rezeptoren des subdiaphragmalen Nervus vagus können Zytokine Neurone aktivieren und darüber schmerzinduzierend wirken (2). Eine direkte, zentrale Wirkung von Zytokinen auf Neurone des ZNS ist zudem beschrieben im Bereich der Blut-Liquor-Schranke im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen mit Schrankenstörung oder nach aktivem Transport der Zytokine über das Endothel (3). In dieser Arbeit zeigten nach LPS-Injektion bestimmte schmerzverarbeitende Netzwerke des ZNS eine verstärkte Aktivierung, insbesondere waren dies Areale des homöostatisch afferenten Netzwerkes und der DLPFC. Eine verstärkte Aktivierung dieser Areale ging mit einer veränderten sensorisch-diskriminativen Verarbeitung rektal applizierter Schmerzreize und einer Reduktion der viszeren Schmerzschwellen einher. Diese Prozesse können somit zu einer viszeren Hyperalgesie während einer systemischen Immunaktivierung beitragen und als Teil des sog. Sickness Syndromes zur Protektion des Organismus beitragen. *BSt = Medulla oblongata, Ins = Inselrinde, Th = Thalamus, aMCC = Anteriorer medialer cingulärer Kortex, DLPFC = Dorsolateraler präfrontaler Kortex, S1 = Primär-somatosensorischer Kortex, S2 = Sekundär-somatosensorischer Kortex, LPS = Lipopolysaccharid*

Die Interpretation der Befunde der vorliegenden Arbeit sollte unter Berücksichtigung bestimmter Limitationen geschehen. Der Stichprobenumfang war sehr gering, was möglicherweise auch die nur als Trend beobachteten Effekte der LPS-induzierten Immunaktivierung auf die viszerale Schmerzschwelle erklären kann. Generell besteht bei kleinen Stichproben ein erhöhtes Risiko für Typ-II-Fehler (fälschliche Zurückweisung einer korrekten Alternativhypothese), jedoch auch von Zufallsbefunden, die sich in späteren Studien nicht replizieren lassen. Demnach ist eine Replikation der Befunde dieser Studie in einer größeren und unabhängigen Stichprobe sinnvoll. Weiterführende Studien in größeren Stichproben könnten zudem weitere Analysen wie eine Untersuchung der neuronalen Konnektivität mittels DT-MRI (diffusion tensor magnetic resonance imaging) einschließen.

In Folgestudien sollten auch Probandinnen aufgenommen werden, wenngleich eine aktuelle Studie unserer Arbeitsgruppe einen vergleichbaren Effekt von LPS auf viszerale Schmerzschwelle bei gesunden Männern und Frauen darlegte (Wegner et al., 2015). Bei dieser Studie handelte es sich um eine präklinische Studie unter Ausschluss von Patienten. Insbesondere die korrelativen Befunde bei Patienten mit Reizdarmsyndrom weisen auf eine pathophysiologische Ähnlichkeit der Entstehung der viszeralen Hyperalgesie zum angewandten Modell hin. Daher sollten weitere Untersuchungen auch am RDS und an anderen funktionellen gastrointestinalen Störungen erkrankte Patientinnen und Patienten einschließen, um eine zentrale Vermittlung der viszeralen Hyperalgesie auch in diesem pathophysiologischen Rahmen näher zu untersuchen, wobei hier ethische Überlegungen immer im Vordergrund stehen müssen.

Unter klinischen Gesichtspunkten können diese Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der schmerzverarbeitenden Prozesse während einer systemischen Inflammation beitragen. Sie unterstützen die Bedeutung einer systemischen Low-Grade-Inflammation in der Pathophysiologie viszeraler Schmerzen, wie sie beispielsweise bei RDS-Patienten beobachtet wird (Al-Khatib & Lin, 2009; Bashashati et al., 2014), und weisen auf die Relevanz zentralnervöser Prozesse hin. Langfristig können die Befunde auch Hinweise für die Entwicklung pharmakologischer Interventionen beim RDS geben. So bietet das Modell der experimentellen Endotoxinämie die Möglichkeit der präklinischen Testung zentral wirksamer oder gerichteter Pharmaka auf immunologische Prozesse bei gesunden Probanden (Hutchinson, 2014).

## 5 Zusammenfassung

Die viszerale Hyperalgesie ist Kernsymptom gastrointestinaler Erkrankungen, insbesondere der funktionellen Syndrome, wie dem Reizdarmsyndrom, deren Pathophysiologie noch nicht umfassend geklärt ist. Klinische sowie tier- und human-experimentelle Befunde deuten auf eine ätiologische Relevanz immunologischer Prozesse, etwa im Rahmen einer niedrigschwelligen, systemischen Immunaktivierung hin. In dieser Studie wurde die Hypothese untersucht, dass eine experimentell induzierte systemische Immunaktivierung zu einer viszeralen Hyperalgesie sowie einer veränderten neuronalen Verarbeitung viszeraler Reize führt, insbesondere im Bereich des präfrontalen, des primär- und sekundär-sensorischen und des anterioren cingulären Kortex, der anterioren und posterioren Inselrinde und in Kerngebieten des Thalamus. In einem randomisierten, doppelblinden und Placebo-kontrollierten Studiendesign wurden N=26 männliche, gesunde Probanden mittels funktioneller Magnetresonanztomografie untersucht, wobei N=14 Probanden intravenös eine niedrige Dosis Lipopolysaccharid (LPS, 0,4 ng/kg) zur Induktion einer systemischen Immunaktivierung und N=12 Probanden Placebo erhielten. Mittels druckgesteuerter rektaler Distensionen wurden viszerale Schmerzreize appliziert. Die viszeralen Schmerzschwellen sowie die blood-oxygen level dependent (BOLD)-Antwort auf viszerale Distensionen wurden vor (Baseline) und zwei Stunden nach der LPS- bzw. Placeboapplikation gemessen. Während der Studie erfolgten wiederholte Blutabnahmen zur Bestimmung der Plasmakonzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen (TNF-alpha, Interleukin-6) und Cortisol. Den Erwartungen entsprechend ließ sich eine viszerale Hypersensitivität im Sinne reduzierter Schmerzschwellen bei Probanden der LPS-Gruppe nachweisen. In der Analyse der BOLD-Daten ergaben sich signifikant stärkere Aktivierungen der posterioren Inselrinde, des dorsolateralen präfrontalen Cortex (DLPFC), des anterioren midcingulären Cortex (aMCC) und des sekundär-somatosensorischen Cortex bei Probanden der LPS-Gruppe. Es fanden sich zudem signifikante Korrelationen zwischen der Interleukin-6-Konzentration im Plasma und einem stärkeren BOLD-Signal im Bereich des DLPFC sowie zwischen TNF-alpha-Konzentrationen im Plasma und stärkerem BOLD-Signal in den Regionen des DLPFC und des aMCC. Diese Ergebnisse deuten auf eine veränderte zentralnervöse Schmerzverarbeitung während einer experimentell induzierten systemischen Immunaktivierung hin. Insbesondere scheinen sensorisch-diskriminative sowie die Homöostase aufrecht erhaltende Zentren vermehrt involviert zu sein. Diese Ergebnisse können zu einem weiteren Verständnis der zentralnervösen Mechanismen der Schmerzverarbeitung während einer systemischen Immunaktivierung und potentiell der pathophysiologischen Mechanismen gastrointestinaler Schmerzen beitragen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Akira, S., Takeda, K. (2004). Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 499-511.
2. Al-Khatib, K., Lin, H. C. (2009). Immune activation and gut microbes in irritable bowel syndrome. *Gut Liver* 3, 14-19.
3. Anand, P., Aziz, Q., Willert, R., van Oudenhove, L. (2007). Peripheral and central mechanisms of visceral sensitization in man. *Neurogastroenterol Motil* 19, 29-46.
4. Andreassen, A. S., Krabbe, K. S., Krogh-Madsen, R., Taudorf, S., Pedersen, B. K., Møller, K. (2008). Human endotoxemia as a model of systemic inflammation. *Curr Med Chem* 15, 1697-1705.
5. Bahador, M., Cross, A. S. (2007). From therapy to experimental model: a hundred years of endotoxin administration to human subjects. *J Endotoxin Res* 13, 251-279.
6. Banks, W. A. (2009). The blood-brain barrier in psychoneuroimmunology. *Immunol Allergy Clin North Am* 29, 223-228.
7. Bashashati, M., Rezaei, N., Shafieyoun, A., McKernan, D. P., Chang, L., Ohman, L., Quigley, E. M., Schmulson, M., Sharkey, K. A., Simren, M. (2014). Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neurogastroenterol Motil* 26, 1036-1048.
8. Benson, S., Engler, H., Schedlowski, M., Elsenbruch, S. (2012a). Experimental endotoxemia as a model to study neuroimmune mechanisms in human visceral pain. *Ann N Y Acad Sci* 1262, 108-117.
9. Benson, S., Kattoor, J., Kullmann, J. S., Hofmann, S., Engler, H., Forsting, M., Gizewski, E. R., Elsenbruch, S. (2014). Towards understanding sex differences in visceral pain: enhanced reactivation of classically-conditioned fear in healthy women. *Neurobiol Learn Mem* 109, 113-121.
10. Benson, S., Kattoor, J., Wegner, A., Hammes, F., Reidick, D., Grigoleit, J. S., Engler, H., Oberbeck, R., Schedlowski, M., Elsenbruch, S. (2012b). Acute experimental endotoxemia induces visceral hypersensitivity and altered pain evaluation in healthy humans. *Pain* 153, 794-799.
11. Benson, S., Rebernik, L., Wegner, A., Kleine-Borgmann, J., Engler, H., Schlamann, M., Forsting, M., Schedlowski, M., Elsenbruch, S. (2015). Neural circuitry mediating inflammation-induced central pain amplification in human experimental endotoxemia. *Brain Behav Immun* 48, 222-231.
12. Beutler, B., Rietschel, E. T. (2003). Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. *Nat Rev Immunol* 3, 169-176.
13. Bingel, U., Tracey, I. (2008). Imaging CNS modulation of pain in humans. *Physiology (Bethesda)* 23, 371-380.
14. Breivik, H., Collett, B., Ventafridda, V., Cohen, R., Gallacher, D. (2006). Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *Eur J Pain* 10, 287-333.

15. Brydon, L., Harrison, N. A., Walker, C., Steptoe, A., Critchley, H. D. (2008). Peripheral inflammation is associated with altered substantia nigra activity and psychomotor slowing in humans. *Biol Psychiatry* 63, 1022-1029.
16. Brydon, L., Walker, C., Wawrzyniak, A., Whitehead, D., Okamura, H., Yajima, J., Tsuda, A., Steptoe, A. (2009). Synergistic effects of psychological and immune stressors on inflammatory cytokine and sickness responses in humans. *Brain Behav Immun* 23, 217-224.
17. Coelho, A. M., Fioramonti, J., Bueno, L. (2000a). Brain interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are involved in lipopolysaccharide-induced delayed rectal allodynia in awake rats. *Brain Res Bull* 52, 223-228.
18. Coelho, A. M., Fioramonti, J., Bueno, L. (2000b). Systemic lipopolysaccharide influences rectal sensitivity in rats: role of mast cells, cytokines, and vagus nerve. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 279, G781-790.
19. Coghill, R. C., Sang, C. N., Maisog, J. M., Iadarola, M. J. (1999). Pain intensity processing within the human brain: a bilateral, distributed mechanism. *J Neurophysiol* 82, 1934-1943.
20. Cryan, J. F., Dinan, T. G. (2012). Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 13, 701-712.
21. Dantzer, R., Konsman, J. P., Bluthé, R. M., Kelley, K. W. (2000). Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? *Auton Neurosci* 85, 60-65.
22. de Goeij, M., van Eijk, L. T., Vanelderen, P., Wilder-Smith, O. H., Vissers, K. C., van der Hoeven, J. G., Kox, M., Scheffer, G. J., Pickkers, P. (2013). Systemic inflammation decreases pain threshold in humans in vivo. *PLoS One* 8, e84159.
23. DeLeo, J. A., Tanga, F. Y., Tawfik, V. L. (2004). Neuroimmune activation and neuroinflammation in chronic pain and opioid tolerance/hyperalgesia. *Neuroscientist* 10, 40-52.
24. Eisenberger, N. I., Inagaki, T. K., Mashal, N. M., Irwin, M. R. (2010). Inflammation and social experience: an inflammatory challenge induces feelings of social disconnection in addition to depressed mood. *Brain Behav Immun* 24, 558-563.
25. Eisenberger, N. I., Inagaki, T. K., Rameson, L. T., Mashal, N. M., Irwin, M. R. (2009). An fMRI study of cytokine-induced depressed mood and social pain: the role of sex differences. *Neuroimage* 47, 881-890.
26. El-Serag, H. B., Olden, K., Bjorkman, D. (2002). Health-related quality of life among persons with irritable bowel syndrome: a systematic review. *Aliment Pharmacol Ther* 16, 1171-1185.
27. Elsenbruch, S. (2011). Abdominal pain in Irritable Bowel Syndrome: a review of putative psychological, neural and neuro-immune mechanisms. *Brain Behav Immun* 25, 386-394.
28. Elsenbruch, S., Rosenberger, C., Bingel, U., Forsting, M., Schedlowski, M., Gizewski, E. R. (2010a). Patients with irritable bowel syndrome have altered

- emotional modulation of neural responses to visceral stimuli. *Gastroenterology* 139, 1310-1319.
29. Elsenbruch, S., Rosenberger, C., Enck, P., Forsting, M., Schedlowski, M., Gizewski, E. R. (2010b). Affective disturbances modulate the neural processing of visceral pain stimuli in irritable bowel syndrome: an fMRI study. *Gut* 59, 489-495.
  30. Endo, Y., Shoji, T., Fukudo, S. (2015). Epidemiology of irritable bowel syndrome. *Ann Gastroenterol* 28, 158-159.
  31. Grigoleit, J. S., Kullmann, J. S., Wolf, O. T., Hammes, F., Wegner, A., Jablonowski, S., Engler, H., Gizewski, E., Oberbeck, R., Schedlowski, M. (2011). Dose-dependent effects of endotoxin on neurobehavioral functions in humans. *PLoS One* 6, e28330.
  32. Grigoleit, J. S., Oberbeck, J. R., Lichte, P., Kobbe, P., Wolf, O. T., Montag, T., del Rey, A., Gizewski, E. R., Engler, H., Schedlowski, M. (2010). Lipopolysaccharide-induced experimental immune activation does not impair memory functions in humans. *Neurobiol Learn Mem* 94, 561-567.
  33. Gwee, K. A., Leong, Y. L., Graham, C., McKendrick, M. W., Collins, S. M., Walters, S. J., Underwood, J. E., Read, N. W. (1999). The role of psychological and biological factors in postinfective gut dysfunction. *Gut* 44, 400-406.
  34. Harrison, N. A., Cercignani, M., Voon, V., Critchley, H. D. (2015). Effects of inflammation on hippocampus and substantia nigra responses to novelty in healthy human participants. *Neuropsychopharmacology* 40, 831-838.
  35. Hehlhans, T., Pfeffer, K. (2005). The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20.
  36. Herrmann-Lingen, C., Buss, U., Snaith, R. P. (2011): Hospital Anxiety and Depression Scale - Deutsche Version (HADS-D) (3. Auflage). Bern: Hans Huber.
  37. Hopkins, S. J. (2007). Central nervous system recognition of peripheral inflammation: a neural, hormonal collaboration. *Acta Biomed* 78 Suppl 1, 231-247.
  38. Hutchinson, M. R. (2014). Want more pain? Just add a dash of endotoxin to enhance your clinical pain model. *Brain Behav Immun* 41, 44-45.
  39. Hutchinson, M. R., Buijs, M., Tuke, J., Kwok, Y. H., Gentgall, M., Williams, D., Rolan, P. (2013). Low-dose endotoxin potentiates capsaicin-induced pain in man: evidence for a pain neuroimmune connection. *Brain Behav Immun* 30, 3-11.
  40. Inagaki, T. K., Muscatell, K. A., Irwin, M. R., Moieni, M., Dutcher, J. M., Jevtic, I., Breen, E. C., Eisenberger, N. I. (2015). The role of the ventral striatum in inflammatory-induced approach toward support figures. *Brain Behav Immun* 44, 247-252.
  41. Jones, S. A. (2005). Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol* 175, 3463-3468.
  42. Karshikoff, B., Lekander, M., Soop, A., Lindstedt, F., Ingvar, M., Kosek, E., Olgart Hoglund, C., Axelsson, J. (2015). Modality and sex differences in pain sensitivity during human endotoxemia. *Brain Behav Immun* 46, 35-43.

43. Krummenacher, P., Candia, V., Folkers, G., Schedlowski, M., Schonbachler, G. (2010). Prefrontal cortex modulates placebo analgesia. *Pain* 148, 368-374.
44. Kullmann, J. S., Grigoleit, J. S., Wolf, O. T., Engler, H., Oberbeck, R., Elsenbruch, S., Forsting, M., Schedlowski, M., Gizewski, E. R. (2014). Experimental human endotoxemia enhances brain activity during social cognition. *Soc Cogn Affect Neurosci* 9, 786-793.
45. Labrenz, F., Wrede, K., Forsting, M., Engler, H., Schedlowski, M., Elsenbruch, S., Benson, S. (2015). Alterations in functional connectivity of resting state networks during experimental endotoxemia - An exploratory study in healthy men. *Brain Behav Immun*
46. Lacourt, T. E., Houtveen, J. H., Doornen, L. J., Benson, S., Grigoleit, J. S., Cesko, E., Elsenbruch, S. (2014). Biological and psychological predictors of visceral pain sensitivity in healthy premenopausal women. *Eur J Pain* 18, 567-574.
47. Laux, L., Glanzmann, P., Schaffner, P., Spielberger, C. D. (1981): *Das State-Trait-Angstinventar. Theoretische Grundlagen und Handanweisung*. Weinheim: Beltz Test GmbH.
48. Liu, C. Y., Jiang, W., Muller, M. H., Grundy, D., Kreis, M. E. (2005). Sensitization of mesenteric afferents to chemical and mechanical stimuli following systemic bacterial lipopolysaccharide. *Neurogastroenterol Motil* 17, 89-101.
49. Lucas, A., Holtmann, G., Gerken, G., Pietsch, A., Braun-Lang, U., Gilani, K., Strassburger, K., Gesing, S., Janssen, O. E., Kavelaars, A., Heijnen, C. J., Schedlowski, M., Elsenbruch, S. (2006). Visceral pain and public speaking stress: neuroendocrine and immune cell responses in healthy subjects. *Brain Behav Immun* 20, 49-56.
50. MacDonald, A. W., 3rd, Cohen, J. D., Stenger, V. A., Carter, C. S. (2000). Dissociating the role of the dorsolateral prefrontal and anterior cingulate cortex in cognitive control. *Science* 288, 1835-1838.
51. Mayer, E. A., Naliboff, B. D., Craig, A. D. (2006a). Neuroimaging of the brain-gut axis: from basic understanding to treatment of functional GI disorders. *Gastroenterology* 131, 1925-1942.
52. Mayer, E. A., Tillisch, K. (2011). The brain-gut axis in abdominal pain syndromes. *Annu Rev Med* 62, 381-396.
53. Mayer, E. A., Tillisch, K., Bradesi, S. (2006b). Review article: modulation of the brain-gut axis as a therapeutic approach in gastrointestinal disease. *Aliment Pharmacol Ther* 24, 919-933.
54. Moieni, M., Irwin, M. R., Jevtic, I., Breen, E. C., Eisenberger, N. I. (2015). Inflammation impairs social cognitive processing: A randomized controlled trial of endotoxin. *Brain Behav Immun* 48, 132-138.
55. Murphy, K., Travers, P., Walport, M. (2009): *Janeway Immunologie (7. Auflage)*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

56. Nicotra, L., Loram, L. C., Watkins, L. R., Hutchinson, M. R. (2012). Toll-like receptors in chronic pain. *Exp Neurol* 234, 316-329.
57. Ohman, L., Simren, M. (2010). Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7, 163-173.
58. Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science* 282, 2085-2088.
59. Posserud, I., Syrous, A., Lindstrom, L., Tack, J., Abrahamsson, H., Simren, M. (2007). Altered rectal perception in irritable bowel syndrome is associated with symptom severity. *Gastroenterology* 133, 1113-1123.
60. Rainville, P., Carrier, B., Hofbauer, R. K., Bushnell, M. C., Duncan, G. H. (1999). Dissociation of sensory and affective dimensions of pain using hypnotic modulation. *Pain* 82, 159-171.
61. Reichenberg, A., Yirmiya, R., Schuld, A., Kraus, T., Haack, M., Morag, A., Pollmacher, T. (2001). Cytokine-associated emotional and cognitive disturbances in humans. *Archives of General Psychiatry* 58, 445-452.
62. Schedlowski, M., Engler, H., Grigoleit, J. S. (2014). Endotoxin-induced experimental systemic inflammation in humans: a model to disentangle immune-to-brain communication. *Brain Behav Immun* 35, 1-8.
63. Schmid, J., Langhorst, J., Gass, F., Theysohn, N., Benson, S., Engler, H., Gizewski, E. R., Forsting, M., Eisenbruch, S. (2015). Placebo analgesia in patients with functional and organic abdominal pain: a fMRI study in IBS, UC and healthy volunteers. *Gut* 64, 418-427.
64. Shattuck, E. C., Muehlenbein, M. P. (2015). Human sickness behavior: Ultimate and proximate explanations. *Am J Phys Anthropol* 157, 1-18.
65. Stein, N., Sprenger, C., Scholz, J., Wiech, K., Bingel, U. (2012). White matter integrity of the descending pain modulatory system is associated with interindividual differences in placebo analgesia. *Pain* 153, 2210-2217.
66. Steyer, R., Schwenkmezger, P., Notz, P., Eid, M. (1997): Der Mehrdimensionale Befindlichkeitsfragebogen (MDBF). Handanweisung. Göttingen: Hogrefe.
67. Tillisch, K., Labus, J. S. (2011). Advances in imaging the brain-gut axis: functional gastrointestinal disorders. *Gastroenterology* 140, 407-411 e401.
68. Tillisch, K., Mayer, E. A., Labus, J. S. (2011). Quantitative meta-analysis identifies brain regions activated during rectal distension in irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 140, 91-100.
69. Tracey, I., Mantyh, P. W. (2007). The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron* 55, 377-391.
70. Tracey, K. J. (2010). Understanding immunity requires more than immunology. *Nat Immunol* 11, 561-564.

71. Utsuyama, M., Hirokawa, K. (2002). Differential expression of various cytokine receptors in the brain after stimulation with LPS in young and old mice. *Exp Gerontol* 37, 411-420.
72. van den Boogaard, M., Ramakers, B. P., van Alfen, N., van der Werf, S. P., Fick, W. F., Hoedemaekers, C. W., Verbeek, M. M., Schoonhoven, L., van der Hoeven, J. G., Pickkers, P. (2010). Endotoxemia-induced inflammation and the effect on the human brain. *Crit Care* 14, R81.
73. van Eijk, L. T., Dorresteijn, M. J., Smits, P., van der Hoeven, J. G., Netea, M. G., Pickkers, P. (2007). Gender differences in the innate immune response and vascular reactivity following the administration of endotoxin to human volunteers. *Crit Care Med* 35, 1464-1469.
74. Wegner, A., Elsenbruch, S., Maluck, J., Grigoleit, J. S., Engler, H., Jager, M., Spreitzer, I., Schedlowski, M., Benson, S. (2014). Inflammation-induced hyperalgesia: effects of timing, dosage, and negative affect on somatic pain sensitivity in human experimental endotoxemia. *Brain Behav Immun* 41, 46-54.
75. Wegner, A., Elsenbruch, S., Rebernik, L., Roderigo, T., Engelbrecht, E., Jager, M., Engler, H., Schedlowski, M., Benson, S. (2015). Inflammation-induced pain sensitization in men and women: does sex matter in experimental endotoxemia? *Pain* 156, 1954-1964.
76. Wilder-Smith, C. H. (2011). The balancing act: endogenous modulation of pain in functional gastrointestinal disorders. *Gut* 60, 1589-1599.
77. Wright, C. E., Strike, P. C., Brydon, L., Steptoe, A. (2005). Acute inflammation and negative mood: mediation by cytokine activation. *Brain Behav Immun* 19, 345-350.
78. Zhou, Q., Zhang, B., Verne, G. N. (2009). Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome. *Pain* 146, 41-46.
79. Zigmond, A. S., Snaith, R. P. (1983). The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand* 67, 361-370.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

ACC	Anteriorer cingulärer Kortex
BMI	Body-Mass-Index
BOLD	Blood-Oxygen-Level-Dependent
DLPFC	Dorsolateraler präfrontaler Kortex
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunoabsorbant-Assay
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
FWE	Familywise Error Correction
HADS	Hospital Anxiety and Depression Scale
HHNA	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
IL	Interleukin
INF	Interferon
LPS	Lipopolysaccharid
MCC	Medialer cingulärer Kortex
MDBF	Mehrdimensionaler Befindlichkeitsfragebogen
MRT	Magnetresonanztomographie
N.	Nervus
OFC	Orbitofrontaler Kortex
PAG	Periaquäduktales Grau
PAMP	Pathogene-Associated-Molecular-Patterns
PET	Positronenemissionstomographie
RDS	Reizdarmsyndrom
ROI	Region of Interest
S1	Primär-sensorischer Kortex
S2	Sekundär-sensorischer Kortex
STAI-S	State-Trait-Angst-Inventar (State-Version)
TLR	Toll-Like-Receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRPV	Transient Receptor Potential Vanilloid
VAS	Visuelle Analogskala
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1 Abbildungen

Abbildung 1 – Lipopolysaccharid.....	8
Abbildung 2 – Über TLR4-Komplexe vermittelte LPS-Wirkung.....	9
Abbildung 3 – Übertritt von Zytokinen in das zentrale Nervensystem.....	10
Abbildung 4 – Signalverarbeitung von Reizen aus dem Enddarm.....	11
Abbildung 5 – Übersichtsgrafik der schmerzverarbeitenden Areale.....	13
Abbildung 6 – Studiendesign.....	21
Abbildung 7 – fMRT-Paradigma.....	24
Abbildung 8 – Blutparameter.....	31
Abbildung 9 – Vitalzeichen.....	32
Abbildung 10 – Stimmung und Befindlichkeit.....	33
Abbildung 11 – Rektale Schmerzschwellen.....	34
Abbildung 12 – Rektale Wahrnehmungsschwellen.....	34
Abbildung 13 – Schmerzbewertung.....	35
Abbildung 14 – BOLD-Signale bei der Applikation rektaler Schmerzreize.....	38
Abbildung 15 – Einordnung der Befunde in die aktuelle Datenlage.....	45

### 8.2 Tabellen

Tabelle 1 – Merkmale der Stichprobe.....	30
Tabelle 2 – <i>one-sample</i> -t-Test-Analyse der BOLD-Antwort.....	36
Tabelle 3 – <i>two-sample</i> t-Test der BOLD-Antwort.....	37

## 9 Appendix

### 9.1 Symptomcheckliste für Magen- und Darmbeschwerden

#### Symptomcheckliste für Magen- und Darmbeschwerden

Wie oft haben Sie in den letzten 3 Monaten unter folgenden Magen-Darm-Symptomen gelitten?

Bitte tragen Sie ein:

Versuchsperson: \_\_\_\_\_

0 = Nie

1 = 1 bis 2 Mal pro Monat

2 = 1 bis 2 Mal pro Woche

3 = Mehr als 2 Mal pro Woche

Datum der Erhebung: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ Durchfall

\_\_\_\_\_ Verstopfung

\_\_\_\_\_ Übelkeit

\_\_\_\_\_ Unterbauchschmerzen (unterhalb des Nabels)

\_\_\_\_\_ Oberbauchschmerzen (oberhalb des Nabels)

\_\_\_\_\_ Sodbrennen

\_\_\_\_\_ Gefühl der unvollständigen Entleerung nach dem Stuhlgang

\_\_\_\_\_ Starkes Völlegefühl nach dem Essen oder langsame Verdauung

\_\_\_\_\_ Erbrechen

\_\_\_\_\_ Starkes Aufstoßen, Rülpsen

\_\_\_\_\_ Starke Blähungen / Gefühl der abdominellen Aufblähung

\_\_\_\_\_ Appetitverlust

\_\_\_\_\_ Schmerzen im Brustraum (Brennen im Brustraum)

## 9.2 Publikation

Benson S, Rebernik L, Wegner A, **Kleine-Borgmann J**, Engler H, Schlamann M, Forsting M, Schedlowski M, Elsenbruch S (2015). Neural circuitry mediating inflammation-induced central pain amplification in human experimental endotoxemia. *Brain, Behavior, and Immunity*, 48, 222-231.

## 10 Danksagung

Für ihr Mitwirken an der Entstehung dieser Arbeit möchte ich folgenden Personen im Besonderen danken. Für seine herausragende, uneingeschränkte, wissenschaftliche und persönliche Betreuung und Unterstützung danke ich Herrn Prof. Sven Benson. Ich hätte mir keine bessere, konsequentere und engagiertere Begleitung durch eine bereichernde Zeit mit zahlreichen Gesprächen, Ratschlägen und Empfehlungen wünschen können. Meinen besonderen Dank möchte ich zudem Frau Prof. Sigrid Elsenbruch aussprechen für ihre ebenfalls herausragende Supervision und Unterstützung, insbesondere auch für die bedeutenden Möglichkeiten der Teilnahme an zahlreichen Veranstaltungen und Projektvorstellungen.

Darüber hinaus danke ich Dr. Alexander Wegner, Dr. Jennifer Kullmann, Laura Rebernik und Dr. Adriane Icenhour für ihre vielen persönlichen und wissenschaftlichen Ratschläge sowie für eine unvergessliche Zeit im, am und auch außerhalb des Scannerraumes!

Für die zuverlässige, hilfsbereite und freundliche Unterstützung im Vorfeld, während meiner Zeit am Institut und auch im Anschluss daran danke ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern sowie Doktorandinnen und Doktoranden des Instituts für Medizinische Psychologie und Verhaltensbiologie der Universität Duisburg-Essen, Deutschland.

Ohne Eltern und Freunde wäre diese Arbeit nicht möglich. Besonderen Dank widme ich meinen Eltern, Elke und Michael Kleine-Borgmann, für ihre Unterstützung und ihr uneingeschränktes Verständnis. Danken möchte ich zudem Armgard Boekstegers für langjährigen Rückhalt in vielen Lebenslagen sowie Dr. Regine und Dr. Arne Boekstegers für zahlreiche Gespräche und Hilfestellungen. Ich danke zudem Nora Schneider für ihre konsequente Motivationsarbeit und engagiertes Lektorat!

## **Curriculum Vitae**

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.