

Aus der Klinik und Poliklinik für Neurologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Verhaltensänderung nach Stressexposition im Tibiafrakturmodell der posttraumatischen  
Entzündung

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Laura Krämer  
aus Eberbach

Mainz, 2020

Tag der Promotion:

30.06.2020

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>4</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>5</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1. Zielsetzung und Forschungsfrage .....	11
<b>2. Literaturdiskussion</b> .....	<b>12</b>
2.1. Stress und PTSD in Zusammenhang mit CRPS .....	12
2.2. Temperaturentwicklung der betroffenen Extremität bei CRPS.....	18
2.3. Das Komplexe Regionale Schmerzsyndrom im Tiermodell .....	23
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1. Material.....	26
3.2. Methoden .....	30
3.3. Statistische Methoden .....	43
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
4.1. Fear Conditioning und Extinktion .....	45
4.2. Sensibilitätstests in Bezug auf Fear Conditioning .....	46
4.3. Messung des Ödems .....	50
4.4. Verhaltenstests in Bezug auf Ängstlichkeit .....	52
4.5. Sensibilitätstests in Bezug auf Temperaturtypen .....	55
<b>5. Wissenschaftliche Diskussion</b> .....	<b>68</b>
5.1. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit anderen Studien des Tibiafrakturmodells .....	70
5.2. Der Einfluss von Stress auf die posttraumatische Entzündung.....	72
5.3. Temperaturverhalten der betroffenen Extremität .....	79
5.4. Einordnung des Gesamtergebnisses im Kontext der Wissenschaft.....	83
5.5. Limitation der Arbeit und Ausblicke für die weitere Forschungsarbeit.....	85
<b>6. Zusammenfassung</b> .....	<b>87</b>
<b>Referenzen</b> .....	<b>89</b>
<b>Anhang</b> .....	<b>95</b>
<b>Danksagung</b> .....	<b>100</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA.....	<i>Einfaktorielle Varianzanalyse</i>
CGRP .....	<i>Calcitonin-gene Related Peptide</i>
CPIP .....	<i>Ischemic reperfusion injury model</i>
CRH.....	<i>Corticotropin-Releasing-Hormone</i>
CRPS .....	<i>Komplexes Regionales Schmerzsyndrom</i>
DSM-IV.....	<i>Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders-IV</i>
EPM.....	<i>Elevated Plus Maze</i>
ET.....	<i>Endothelin</i>
IASP .....	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IL-1 $\beta$ .....	<i>Interleukin-1 beta</i>
IL-6 .....	<i>Interleukin-6</i>
KG.....	<i>Körpergewicht</i>
NaCl .....	<i>Natriumchlorid</i>
NGF .....	<i>Nervenwachstumsfaktor</i>
NO .....	<i>Stickstoffmonoxid</i>
PGE .....	<i>Prostaglandin E2</i>
PGI2 .....	<i>Prostacyclin</i>
PTSD.....	<i>Posttraumatische Belastungsstörung</i>
RSD.....	<i>Sympathische Reflexdystrophie</i>
SIP.....	<i>Sympathetically independent pain</i>
SMP.....	<i>Symathetically maintained pain</i>
TNF- $\alpha$ .....	<i>Tumornekrosefaktor-alpha</i>
VAS .....	<i>Visuelle Analogskala</i>

## Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1** Ermittlung der Schmerzschwelle beim Fear Conditioning
- Abb. 2** Schema Open Field Arena
- Abb. 3** Schema Elevated Plus Maze
- Abb. 4** Fear Conditioning und Extinktion
- Abb. 5** Von Frey Test für mechanische Sensibilität
- Abb. 6** Unweighting und Belastungsdifferenz
- Abb. 7** Plantar Test (Hot Plate)
- Abb. 8** Pfortendicke rechts und links nach Fraktur
- Abb. 9** Elevated Plus Maze Eintrittsfrequenz
- Abb. 10** Open Field Test
- Abb. 11** Übersicht der Temperaturentwicklung der rechten Pfote
- Abb. 12** Verteilung der Temperaturtypen im Gesamtkollektiv
- Abb. 13** Von Frey Test für mechanische Sensibilität bei Temperaturtypen
- Abb. 14** Unweighting bei Temperaturtypen
- Abb. 15** Plantar Test (Hot Plate) bei Temperaturtypen
- Abb. 16** Kälteempfindlichkeit und Allodynie
- Abb. 17** Ödementwicklung nach Fraktur bei Temperaturtypen
- Abb. 18** Gewicht vor und nach Fraktur bei Temperaturtypen
- Abb. 19** Anteil der Temperaturtypen in Bezug auf Stresslevel
- Abb. 20** Vergleich gesunde Seite (links) mit betroffener Seite (rechts) nach Fraktur

## Tabellenverzeichnis

- Tab. 1 TSE-Multi-Conditioning-System Fear Condition Einstellungen**
- Tab. 2 Geschlechterverteilung bei verschiedenen Behandlungen**
- Tab. 3 Kontrollexperiment Schmerzempfindlichkeit Multi-Conditioning-Systemeinstellungen**
- Tab. 4 Von Frey Testprotokoll**
- Tab. 5 Durchschnittliches Gewicht der Versuchstiere**

## **1. Einleitung**

Das Komplexe Regionale Schmerzsyndrom – kurz CRPS – ist eine chronische, meist posttraumatische Schmerzstörung, die heute überwiegend den Erkrankungen des autonomen Nervensystems mit starker inflammatorischer Komponente zugeordnet wird (Bruehl, 2015). Jede Form von chronischem Schmerz stellt eine erhebliche Einschränkung für das Individuum und dessen Umfeld dar und wird auch als eigenständiges Krankheitsbild verstanden. Schmerz ist eine subjektive Empfindung, die nur schwer anhand von objektiven Kriterien festzumachen ist, was dazu führt, dass sich Patienten häufig hilflos und unverstanden fühlen und unter Umständen sogar dem Vorwurf ausgesetzt sind, dass ihr Schmerz nicht real oder übertrieben sei (Keßler and Bardenheuer, 2018). Dies führt, neben der Belastung durch den Schmerz an sich, zu einem verheerenden Kreislauf aus sozialem Rückzug und Isolation, was wiederum die Krankheitsbewältigung behindert. Der Schmerz erhält sich auf diese Weise selbst und wächst zu einem multifaktoriellen Geschehen heran, das therapeutisch eine sehr schwierige und langwierige Aufgabe werden kann und bei dem vielmehr der Umgang mit dem Schmerz und weniger die vollständige Genesung im Vordergrund stehen sollte. Cicely Saunders, die Begründerin der Palliativmedizin, prägte in diesem Zusammenhang in den 1960er Jahren den Begriff des „Total Pain“. Demnach setze sich der Schmerz aus vier Komponenten zusammen: physisch, psychisch, sozial und spirituell (Richmond, 2005, Clark, 1999). Auch die Behandlung solle auf all diese Dimensionen ausgerichtet sein.

Chronische Schmerzsyndrome stellen Medizin und Wissenschaft vor große Herausforderungen. Das Krankheitsbild CRPS entsteht am häufigsten nach Frakturen. Jedoch können auch Operationen, Quetschverletzungen oder Stauchungen zu einem CRPS führen (Bruehl, 2015). Angaben zur Inzidenz des CRPS reichen von 5,5 bis 26,2 Fällen von 100.000 pro Jahr (de Mos et al., 2007). Bezüglich der Prävalenz in der Allgemeinbevölkerung existieren retrospektive Studien, die belegen, dass Frauen in 75-80 % der Fälle betroffen sind und dass überwiegend die obere Extremität betroffen ist. Patienten sind meist zwischen 50-70 Jahre alt. Die meisten Fälle von CRPS treten nach Frakturen auf, aber auch Quetschungen, Verstauchungen oder Operationen kommen in Frage (Sandroni et al., 2003, de Mos et al., 2007). In zwei prospektiven Studien konnte gezeigt werden, dass nach Fraktur etwa 3,8-7 % der Patienten ein CRPS entwickeln (Moseley et al., 2014, Beerthuisen et al., 2012).

Derzeit existieren folgende Diagnosekriterien, die helfen sollen ein CRPS zu erkennen und es von einem physiologischen Anpassungsvorgang auf ein stattgehabtes Trauma zu differenzieren („Budapestkriterien“) (Harden et al., 2010b, Birklein, 2018) :

- 1.) Andauernder Schmerz, dessen Intensität nicht kohärent zum verursachenden Trauma ist
- 2.) Mindestens ein Symptom (Anamnese) aus drei Kategorien der folgenden vier:
  - Sensibilitätsstörungen wie Hyperalgesie oder Allodynie
  - vasomotorische Störungen wie Änderung der Hauttemperatur oder Hautfarbe
  - Ödematöse oder sudomotorische Störungen
  - Motorische Dysfunktion oder trophische Veränderungen
- 3.) Mindestens ein nachgewiesenes Zeichen (Untersuchung) aus zwei Kategorien der folgenden:
  - Nachweis von Sensibilitätsstörungen wie Hyperalgesie oder Allodynie
  - Nachweis vasomotorischer Störungen wie Änderung der Hauttemperatur oder Hautfarbe
  - Nachweis eines Ödems oder einer sudomotorischen Störung
  - Nachweis motorischer Dysfunktion und trophischer Veränderungen
- 4.) Keine andere Diagnose erklärt die Symptome

Diese Kriterien werden im klinischen Alltag verwendet, um ein Komplexes Regionales Schmerzsyndrom zu diagnostizieren. Im Vergleich zu den zuvor verwendeten IASP-Diagnosekriterien ist die Sensitivität bei den Budapest-Kriterien weiterhin hoch (0,99). Die Spezifität konnte aber deutlich verbessert werden (0,68 im Vergleich zu 0,36 zuvor). Hierdurch kann der Überdiagnostizierung des CRPS entgegen gewirkt werden (Bruehl et al., 1999, Harden et al., 2010b).

Typische Symptome des CRPS sind eine livide, ödematös veränderte Extremität. Auch eine veränderte Propriozeption, Hyperalgesie und Allodynie sowie ein pathologisches Schwitzverhalten an der betroffenen Extremität, trophische Störungen wie vermehrtes Nagel- oder Haarwachstum und Dystonien oder Tremor sind typisch. Im Verlauf entwickeln sich im gelenknahen Abschnitt kleinfleckige Osteoporoseherde. Zentrales Symptom ist der brennende, einschließende, neuropathische Schmerz, der durch das

initiale Trauma nicht mehr zu erklären ist und weder einem Dermatom, noch dem Innervationsgebiet eines peripheren Nerven zugeordnet werden kann (Guthmiller and Dulebohn, 2017).

Eine wichtige Rolle scheint zudem das Ausmaß der Entzündung und der Immunantwort zu spielen, welche auf das initiale Trauma hin folgt, womit sich die Diskrepanz zwischen stattgehabten Trauma und Ausmaß der Symptome teilweise erklären lässt. Hierbei sind vor allem B-Zellaktivierung, IL-1 $\beta$  und Substanz P in der Diskussion. Dies konnte tierexperimentell nachgewiesen werden (Bruehl, 2015, Li et al., 2009).

CRPS lässt sich in eine akute und in eine chronische Phase einteilen. Akute Mechanismen finden vor allem peripher statt und äußern sich in Form von entzündlichen Anpassungsvorgängen. Es erfolgt eine periphere Sensibilisierung, die eine Steigerung afferenter nozizeptiver Signale bewirkt, wodurch es einer Hyperalgesie kommt, andererseits zur zentralen Sensibilisierung auf thermische und mechanische Reize. Hierbei sind vor allem Immunmediatoren wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Bradykinin, PGE (2) und NGF beteiligt (Cheng and Ji, 2008). Bei der Chronifizierung steht eine neuroplastische Veränderung im zentralen Nervensystem im Vordergrund. Durch eine Gewebeverletzung werden intrazelluläre Signalkaskaden in Bewegung gesetzt, die auf spinaler Ebene dazu führen, dass die Erregungsschwelle herabgesetzt wird, wodurch die Empfindlichkeit auf Schmerzreize verstärkt wird und sich das „Schmerzgebiet“ erweitert (Ji and Woolf, 2001). Bei der akuten Form, die bei einem Großteil der Patienten innerhalb eines Jahres regredient ist und bei der die inflammatorische Komponente im Vordergrund steht, entwickelt sich häufig zunächst ein CRPS vom warmen Typ, das heißt eine im Vergleich zur Gegenseite wärmere Extremität. Die Patienten, die einen chronifizierenden CRPS-Typ aufweisen, zeigen vor allem efferente autonome Symptome und entwickeln - auch wenn zu Beginn der Erkrankung eine überwärmte betroffene Extremität vorlag - im Verlauf häufig eine kältere Extremität (Bruehl, 2015). Etwa 70 % der CRPS-Fälle zeigen initial einen warmen Beginn, während 30 % einen kalten Beginn zeigen, der häufig mit einer schlechteren Prognose assoziiert ist (Maihofner, 2014).

Es existiert außerdem ein pathophysiologischer Erklärungsansatz, der sich auf Veränderungen des sympathischen Nervensystems stützt. In der Vergangenheit sprach man daher auch von „sympathischer Reflexdystrophie“. Die pathophysiologische Theorie bestand in der Annahme, es käme nach dem Trauma zu einer übersteigerten Antwort des Sympathikus. Dies bildete das Fundament der

Behandlung mittels Sympathikusblock. In späteren Studien fand man Katecholaminrezeptoren auf Nozizeptoren, was zu der These führte, dass erhöhte Katecholaminspiegel durch ein psychisches Trauma oder Stress direkt zur Schmerzverstärkung führen. Dieser Mechanismus wird daher als sympathiko-afferente Kopplung bezeichnet (Drummond et al., 2014).

Ein Aspekt, der noch immer unklar bleibt ist die Frage inwiefern Angst und chronischer Stress die Entstehung eines CRPS beeinflussen. Häufig wird eine Koinzidenz von Angsterkrankungen oder depressiven Erkrankungen beobachtet (Feldman et al., 1999, Hardy and Merritt, 1988, Harden et al., 2003). Dabei stellt sich letzten jedoch immer die Frage, ob der psychische Zustand Ursache oder Folge des chronischen Schmerzsyndroms ist. Prospektive Studien sind in dieser Hinsicht rar und am Menschen methodisch und auch ethisch schwierig durchzuführen (de Mos et al., 2009). Eine prospektive Studie würde das gezielte Herbeiführen eines CRPS erforderlich machen. Hierfür ist ein Trauma, wie etwa eine Fraktur nötig.

Zur Entschlüsselung wichtiger Pathomechanismen des CRPS wurde von der Forschungsgruppe Kingery, Guo und Li ein Tiermodell entwickelt, welches insbesondere die akute Form des CRPS in Form einer posttraumatischen Entzündungsreaktion widerspiegeln soll: das Tibiafrakturmodell. Es wurde zunächst an Ratten, später auch an der Maus angewandt und soll auch in dieser Studie als methodische Grundlage dienen, um den Einfluss von Stress auf die posttraumatische Entzündung genauer zu untersuchen (Guo et al., 2004).

## 1.1. Zielsetzung und Forschungsfrage

Mithilfe eines vor über zehn Jahren etablierten Tibiafrakturmodells der Maus (TFM) soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob ein erhöhtes Stressniveau, welches durch Angstkonditionierung erreicht werden, die posttraumatische Entzündung beeinflussen. In der Vergangenheit wurde bereits gezeigt, dass Mäuse im TFM ähnliche Symptome entwickeln wie Patienten in der akuten Phase des CRPS. Auch wurde vereinzelt gezeigt, dass es beim Versuchstier ebenso zur Chronifizierung bestimmter Symptome wie etwa der mechanischen Allodynie bis maximal 18 Wochen nach Fraktur kommen kann (Gallagher et al., 2013, Guo et al., 2004, Guarnieri et al., 2012).

Dieser Ansatz bietet die Möglichkeit, prospektive Daten zu erheben. Zudem besteht beim Menschen die Schwierigkeit, dass die Vergangenheit jedes Individuums sehr unterschiedlich aussehen kann. Das Ausmaß des bereits Erlebten, vor allem der bereits erlebten „Critical Life Events“, unterliegt einer sehr großen Spannweite, sodass die Vergleichbarkeit innerhalb einer Patientengruppe eingeschränkt ist. Bei der Maus hingegen wird durch die standardisierten Haltungsbedingungen gewährleistet, dass jedes Tier mit ähnlichen Voraussetzungen in das Experiment eingebracht wird.

Die Ausprägung der Symptome soll nach durchgeführter Fraktur zwischen Tieren mit erhöhte Stressniveau und Kontrollen verglichen werden.

Bezüglich der CRPS-typischen Symptome soll in dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf die Entwicklung der Temperatur der betroffenen Extremität, sowie auf den Zusammenhang zwischen Angstkonditionierung und Temperaturentwicklung gelegt werden. Beim Menschen wurde ein „warmes“ und ein „kaltes“ CRPS beschrieben, welche häufig auch ineinander überzugehen scheinen, wobei auch initial „kalte“ CRPS-Formen beschrieben sind (Bruehl et al., 2016).

Wie verhält sich die Temperaturentwicklung im Mausmodell? Gibt es eine ähnliche Unterscheidung in „warme“ und „kalte“ CRPS-artige Krankheitsbilder? Inwiefern besteht ein Zusammenhang zwischen Stressniveau und Temperaturentwicklung?

Zudem soll der Frage nachgegangen werden, ob das Temperaturverhalten der betroffenen Extremität einen Einfluss auf die Ausprägung der weiteren CRPS-typischen Symptome wie Ödementwicklung, Allodynie oder motorische Funktionseinschränkung haben.

## **2. Literaturdiskussion**

### **2.1. Stress und PTSD in Zusammenhang mit CRPS**

Die Pathogenese des Komplexen Regionalen Schmerzsyndroms ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Seitdem das Krankheitsbild bekannt ist besteht in Expertenkreisen die Debatte über einen Zusammenhang von psychischen Faktoren und CRPS.

In der Vergangenheit wurde CRPS (damals noch Morbus Sudeck) als rein psychosomatische Krankheit betrachtet, die der damaligen Lehrmeinung entsprechend bei Patienten mit sogenannter Sudeck-Persönlichkeit auftrat. Merkmale, welche in diesem Zusammenhang häufig auftraten seien eine neurotisch-depressive Persönlichkeit, sowie eine Häufung des Posttraumatischen Belastungssyndroms im betroffenen Patientenkollektiv (Thali, 1989). Diese Fehlannahme führte dazu, dass CRPS einerseits unterdiagnostiziert und darüber hinaus falsch behandelt wurde.

Obwohl das Verständnis mehr und mehr davon abrückt, CRPS als rein psychische oder somatoforme Erkrankung anzusehen, sind Psychotherapie und Verhaltenstherapie fester Bestandteil der Behandlung (de Mos et al., 2009).

Studien, die einen Zusammenhang aufzeigen sind rar und methodisch meist nicht valide, da sie häufig keine prospektive Datensammlung aufweisen. Hierbei stellt sich die Frage, ob psychische Erkrankungen wie Depressionen oder Angsterkrankungen Ursache oder Folge im Entstehungsprozess eines chronischen Schmerzsyndroms im Allgemeinen sind, nicht nur in Bezug auf CRPS. Zum einen ließe sich eine Kausalkette bilden an deren Anfang ein psychisch vorbelasteter Patient steht, der eine Fraktur oder Verletzung erleidet und aufgrund seiner mangelnden Bewältigungsstrategien eine chronische Schmerzstörung entwickelt. Hier wäre die psychische Komponente ursächlich beteiligt. Andererseits könnte der langwierige Schmerz und die belastende Krankheitserfahrung bei einer chronischen Schmerzstörung erst zu einer psychischen Belastung führen, die dann letztlich in einer Depression oder Angsterkrankung endet. Um die Zusammenhänge tatsächlich einordnen zu können, ist daher eine prospektive, randomisierte Studie unabdingbar (Bruehl and Carlson, 1992).

Nur wenige Studien konzentrieren sich bei dem Einfluss psychologischer Faktoren wirklich auf die Beteiligung dieser bei der Entstehung des CRPS. Die meisten zeigen vielmehr eine Beteiligung an der Aufrechterhaltung des Krankheitsbildes (de Mos et al., 2009).

In einer methodisch sehr gut durchgeführten niederländischen Studie untersuchte man prospektiv den Zusammenhang zwischen psychischen Faktoren und der Entstehung eines CRPS Typ I. Hierzu wurden in verschiedenen niederländischen Notaufnahmen Patienten mit einer Fraktur in die Studie eingeschlossen und gebeten, direkt nach dem Frakturereignis eine Symptom-Checkliste-90 auszufüllen, um das psychologische Profil der Probanden zu erfassen. Anschließend erfolgte eine Langzeitbeobachtung der Patienten für drei Monate. Nach dieser Zeit entwickelten 7 % der Probanden ein CRPS. Es wurde bei dieser Studie kein Zusammenhang zwischen psychischen Faktoren und CRPS beobachtet. Im Vergleich zur Normalbevölkerung schnitten die Patienten mit einem CRPS durchschnittlich in den Bereichen Depressivität, Ängstlichkeit und Somatisierungsneigung mit einer höheren Punktzahl ab. Im Vergleich zu anderen chronischen Schmerzpatienten erreichten die CRPS-Patienten niedrigere Punktzahlen (Beerthuisen et al., 2011).

Nicht untersucht wurde der Zusammenhang mit den sogenannten „Stressful Life Events“, der jedoch in anderen Studien belegt ist (Speck et al., 2017).

Allerdings ist ein solcher Zusammenhang in einer prospektiven Studie kaum umsetzbar. In einer Studie wurden Probanden herangezogen, die bereits volljährig waren. Das Hauptmanifestationsalter des Komplexen Regionalen Schmerzsyndroms liegt jedoch zwischen 50 und 70 Jahren. Auch wenn das Frakturrisiko, beispielsweise bei der distalen Radiusfraktur, mit zunehmendem Alter steigt, sind dennoch auch Patienten zwischen 18 und 50 Jahren von Frakturen betroffen (Nellans et al., 2012). Diese Altersklasse ist zwar auch unter den CRPS-Patienten vertreten, jedoch weitaus seltener als die Altersgruppe 50-70 Jahre. Dies könnte, ebenso wie die Tatsache, dass Menschen unter 30 Jahren seltener von psychischen Erkrankungen wie zum Beispiel Depressionen betroffen sind, zu einer Verzerrung der Ergebnisse beigetragen haben (Faravelli et al., 2013).

Der Zusammenhang zwischen Depressionen oder Angsterkrankungen und chronischem Schmerz ist zahlreich belegt. Neben der bestehenden Korrelation zwischen Depressionen und Angsterkrankungen, belegen diverse Studien, dass Patienten mit höherem Angstlevel oder mit Depressionen zu einer verlängerten und verstärkten Schmerzerfahrung, sowie zu Hyperalgesie und zu einer verminderten Alltagskompetenz aufgrund des Schmerzes neigen (Lerman et al., 2015, Thibodeau et al., 2013, Smith and Zautra, 2008).

Neurobiologische Studien, die sich der funktionellen MR-Bildgebung bedienen, versuchen zu zeigen, dass bestimmte Regionen des Gehirns, die für Emotionen, Angstregulation und Depression verantwortlich sind, bei betroffenen Patienten durch einen Schmerzreiz aktiviert werden. Zu diesen Regionen zählen die Amygdala, die anteriore Inselregion sowie Teile des Gyrus cinguli. Diese Abschnitte sind Teil des limbischen Systems, das für die Regulation von Emotionen, den psychomotorischen Antrieb und das Gedächtnis mitverantwortlich ist. Diese Aktivierung erfolgt noch bevor die eigentliche Schmerz Wahrnehmung beginnt, wodurch das Schmerzempfinden beeinflusst wird (Strigo et al., 2008).

Eine interessante Fragestellung, die man sich bei der Entstehung einer chronischen Schmerzstörung stellt, ist der Weg der Chronifizierung. Akute Schmerzen wie sie jeder Mensch erlebt sind überaus wichtige Schutzmechanismen, die dazu führen, dass sich das Individuum vor Gefahr zu schützen vermag. Verhalten, welches Schmerzen provoziert wird unterlassen. Wieso aber gibt es Fälle, in denen der Schmerz bleibt oder sich gar verschlimmert, obwohl das pathophysiologische Korrelat bereits verschwunden ist?

Ein Modell, das die Chronifizierung zu erklären versucht, ist das „Fear Avoidance Modell“. Es wurde erstmals 1983 eingeführt. Demnach gibt es zwei Arten mit Schmerz umzugehen: Konfrontation oder Vermeidung. Die Konfrontation werde vor allem von Individuen gepflegt, die den Schmerz als temporären Zustand wahrnehmen und möglichst schnell in ihren Alltag zurückkehren möchten. Sie testen die Schmerzgrenze, um herauszufinden wie belastbar sie sind. Anders der „Schmerzvermeider“. Die Angst vor Schmerz führt zum Vermeiden von Aktivität, die mit einem Schmerzereignis einhergehen könnte, was in Inaktivität, sozialem Rückzug und einem dauerhaften Invalidenstatus endet. Dieser Zustand wird durch ein Ausbleiben von Schmerzen negativ verstärkt und die Angst vor möglichen Schmerzen steigt noch weiter. Wenn nun doch Schmerzen auftreten, werden diese umso stärker wahrgenommen, denn die persönliche Schmerzschwelle sinkt durch die ausbleibende Schmerzerfahrung. Ob ein Individuum nun eher konfrontativ oder vermeidend mit Schmerz umgeht, liegt in vielen Einzelfaktoren begründet. Beispielsweise führen sogenannte „Stressful Life Events“ oder passive Coping-Strategien eher zum Vermeidungsverhalten. Auch depressive Patienten neigen durch ihre psychomotorische Verlangsamung und mangelnde Initiative eher zur Schmerzvermeidung (Lethem et al., 1983).

Im speziellen Fall des CRPS zeigen sich auch Korrelationen zu „Stressful Life Events“. Als „Stressful Life Event“ oder auch „Critical Life Event“ bezeichnet man allgemein ein psychisch belastendes Ereignis, welches mit Angst und erlebter Hilflosigkeit verbunden ist, wie etwa körperliche Gewalt, Tod einer nahestehenden Person, sexueller Missbrauch oder Vernachlässigung. Ein solches Ereignis erfordert eine sozialpsychologische Neuanpassung (Nugent, 2013, Holmes and Rahe, 1967). In einer niederländischen Studie verglich man Patienten, die an CRPS der oberen Extremität litten, mit solchen, die aufgrund einer akuten Handverletzung auf eine chirurgische Intervention warteten. Die CRPS-Patienten wiesen signifikant häufiger „Stressful Life Events“ auf als die Kontrollgruppe. Bei den männlichen Probanden fielen in der psychologischen Testung erhöhte Angstlevel, bei den weiblichen Probanden vermehrt Depressionen in der Gruppe der CRPS-Patienten auf (Geertzen et al., 1998). Was genau unter „Stressful Life Events“ verstanden wurde, ist nicht näher definiert worden.

In eine ähnliche Richtung, wenn auch drastischer, geht die Posttraumatische Belastungsstörung (PTSD). Sie verfügt über feste DSM-IV Diagnosekriterien und ist daher objektivierbar.

In einer Studie der Universitätsmedizin Mainz und der Universität Erlangen-Nürnberg stellte man fest, dass PTSD bei CRPS-Patienten signifikant häufiger als in der Normalbevölkerung, sowie in der Kontrollgruppe von Patienten mit nicht CRPS-bedingtem Extremitätenschmerz, vorkam. Die Probanden wurden hierfür mithilfe eines Fragebogens (Posttraumatic Stress Diagnostic Scale) evaluiert (Speck et al., 2017). Harden et al. zeigten, dass ein erhöhter Stresspegel vor einer Knieendoprothese zu einem vermehrten Auftreten von CRPS nach der Operation führte, wobei dieser Zusammenhang für Depressionen nicht nachgewiesen werden konnte (Harden et al., 2003).

Des Weiteren existieren Veröffentlichungen, die postulieren, dass Patienten, die vor Beginn ihres CRPS bereits zu einer ängstlichen Persönlichkeitsstruktur neigten, signifikant häufiger ein Komplexes Regionales Schmerzsyndrom entwickeln. Hierfür wurden Patienten unmittelbar nach einer distalen Radiusfraktur einer psychologischen Testung unterzogen, die das Ausmaß von Ängstlichkeit erfasste. Anschließend erfolgte eine Immobilisation durch eine Gipsschiene, woraufhin nach zwei Monaten überprüft wurde, welche Patienten die IASP-Diagnosekriterien für ein CRPS I erfüllten (Dilek et al., 2012).

Dies lässt sich anhand des „Fear Avoidance Modells“ (Lethem et al., 1983) erklären, wenn man davon ausgeht, dass eine hohe Ängstlichkeit in verschiedenen Lebensbereichen auch zu verstärkter Angst vor Schmerz führt.

Auf neurophysiologischer Ebene zeigt eine Theorie zur Pathophysiologie des CRPS einen Zusammenhang mit der Aktivität des sympathischen Nervensystems auf. Im Entstehungsprozess des CRPS steht zu Beginn eine Gewebeverletzung, wodurch aus Keratinozyten proinflammatorische Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) und NGF freigesetzt wird (Thacker et al., 2007). Diese führen zu einer Expression von  $\alpha$ 1-Adrenozeptoren auf Immunzellen, sowie auf kutanen peripheren Nervenfasern. An den nozizeptiven Afferenzen werden Adrenozeptoren hochreguliert, was zur Erregbarkeit der Schmerzfasern durch Noradrenalin führt. Hierdurch wird wiederum das proinflammatorische Interleukin 6 ausgeschüttet. Es entsteht ein Kreislauf aus chronischer Entzündung und Schmerz (Drummond et al., 2014, Schlereth et al., 2014). Experimente hierzu zeigten im direkten Vergleich, dass subkutan injizierte Katecholamine bei gesunden Individuen keinen Schmerzreiz hervorrufen, während bei stattgehabten Nervenschädigungen eine Antwort der Schmerzfasern auf Katecholamine zu verzeichnen ist. Postuliert wird, dass eine Nervenschädigung zur Ausschüttung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren führt, welche dann eine Veränderung der Genexpression hervorrufen. Dies hat zur Folge, dass Adrenozeptoren vermehrt auf den primär afferenten nozizeptiven Fasern exprimiert werden und ein erhöhter Katecholaminspiegel (Noradrenalin und Adrenalin) zu direkten neuropathischen Schmerzempfindungen führen kann (Perl, 1999).

Dieser Mechanismus ist Grundlage des sogenannten „sympathetically maintained pain“ (SMP), Schmerzstörungen, die aufgrund einer Kopplung des afferenten Schmerzsystems und dem vegetativen Nervensystems durch Neurotransmitter wie Noradrenalin unterhalten werden. Man spricht in diesem Zusammenhang von einer sympathiko-afferenten Kopplung. Für dieses Modell spricht, dass Fallberichte von Patienten existieren, die auf eine chemische oder mechanische Blockade des Sympathikus mit einer Schmerzreduktion reagieren (Davis et al., 1991). Große randomisierte, kontrollierte Studien existieren allerdings nicht, sodass die Effektivität dieser Therapieform nicht belegt ist (Schlereth et al., 2014).

Von einigen Wissenschaftlern wird eine Einteilung in Schmerzstörungen, die durch den Sympathikus unterhalten werden (SMP) und in solche, die unabhängig von der Sympathikusaktivität bestehen (SIP), vorgenommen. CRPS oder die früheren Bezeichnungen „Morbus Sudeck“, „Kausalgie“ und „Sympathische Reflexdystrophie“

(RSD) werden im Allgemeinen zum „sympathetically maintained pain“ gezählt (Raja et al., 1991).

Von Harden et al. wurde untersucht, ob bei CRPS-Patienten ein erhöhter Katecholaminspiegel im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen auftritt (Harden et al., 2004). Vor dem Hintergrund des vom Sympathikus aufrecht erhaltenen Schmerzes (SMP) und dem möglichen Zusammenhang mit dem Komplexen Regionalen Schmerzsyndrom scheint diese Frage sehr passend, da bei Patienten mit psychischen Störungen wie beispielsweise Depressionen oder Panikstörungen ebenfalls gezeigt werden konnte, dass die Katecholaminspiegel im Vergleich zur gesunden Allgemeinbevölkerung deutlich erhöht sind (Light et al., 1998, Oh et al., 2015). Bei gesunden Individuen ist der Katecholaminspiegel nicht gleichbleibend hoch. Er schwankt je nach persönlicher Verfassung und Situation. Bei Stressphasen – seien sie psychischer oder körperlicher Natur – steigt der Spiegel, bei Phasen der Entspannung sinkt er wieder ab. Kommt es jedoch zu einer psychischen Erkrankung oder zu einer chronischen Schmerzerkrankung, ist der Katecholaminspiegel permanent erhöht und kann sich somit schlechter an Stress oder Entspannung anpassen. In der Studie von Harden et al. wurden Noradrenalin und Adrenalin bei gesunden Probanden und bei CRPS-Patienten aus dem nicht betroffenen Arm bestimmt. Es zeigten sich bei den CRPS-Patienten signifikant höhere Noradrenalinspiegel. Der Adrenalinspiegel war nicht signifikant erhöht. Neben der Spiegelbestimmung wurden außerdem standardisierte Tests zur Detektion von psychischen Erkrankungen durchgeführt. Hierbei zeigten sich eine positive Korrelation zwischen hohen Adrenalinspiegeln und Depressionen sowie der schlechten Umsetzung und der negativen Einstellung gesundheitsförderlichen Maßnahmen gegenüber (Harden et al., 2004). Aus dieser Studie geht hervor, dass ein Zusammenhang zwischen dem chronischen Schmerz bei CRPS und erhöhten Noradrenalinspiegeln besteht. Unklar ist jedoch, ob der erhöhte Noradrenalinspiegel Folge des Schmerzsyndroms und der psychischen Belastung ist, oder ob der erhöhte Noradrenalinspiegel im Vorfeld die Entstehung des CRPS begünstigt hat. Da der Noradrenalinspiegel in dieser Studie nicht vor Beginn des CRPS gemessen wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, welcher Aspekt Ursache und welcher Folge ist.

Genau diese Problematik besteht auch bei vielen anderen Studien, die versuchen einen Zusammenhang zwischen psychischen Faktoren und CRPS herzustellen (Beerthuizen et al., 2009).

## 2.2. Temperaturentwicklung der betroffenen Extremität bei CRPS

Das Komplexe Regionale Schmerzsyndrom ist neben den Schmerzphänomenen Hyperalgesie und Allodynie noch durch eine Reihe weiterer Merkmale charakterisiert. Unter anderem ist ein Ödem, ein asymmetrisches Schwitzverhalten, trophische Veränderungen und vor allem ein auffälliger Temperaturunterschied der betroffenen Extremität zu verzeichnen. Ein Temperaturunterschied zwischen betroffener und nicht betroffener Seite von mindestens 1-2 °C bei wiederholter Messung ist laut den für die Diagnostik eines CRPS verwendeten Budapestkriterien zwar kein Beweis, aber wegweisend für die Diagnose CRPS. Hierbei spielt es keine Rolle, ob die betroffene Extremität kälter oder wärmer wird (Harden et al., 2007).

Die Temperatur der betroffenen Extremität ist keine statische Größe. Sie unterliegt dynamischen Änderungen und hängt unter anderem von der Umgebungstemperatur ab. Des Weiteren muss beim CRPS unterschieden werden zwischen primär „warmen“ und primär „kalten“ Subtypen (Niehof et al., 2008).

Eine Klassifikation in verschiedene Subtypen erscheint sinnvoll. Beim Subtyp des primär „warmen“ CRPS zeigt sich eine, verglichen mit der kontralateralen Extremität, höhere Temperatur. Sie ist gerötet, ödematös und zeigt eine vermehrte Schwitzneigung. Initial weisen etwa 70 % der CRPS-Patienten eine im Vergleich zur kontralateralen Seite wärmere Extremität auf. Dieser Subtyp zeigt eine warme, gerötete Haut und ein deutliches Ödem an der betroffenen Seite, sowie eine motorische Schwäche, die zwar nicht als Parese im neurologischen Sinn objektiviert werden kann, aber vom Patienten subjektiv als ein Nachgeben empfunden wird (Bruehl et al., 2016).

Dem gegenüber steht der Subtyp des „kalten“ CRPS. Dieser ist gekennzeichnet durch kühlere, livide verfärbte Haut, die zwar auch ödematös verändert sein kann, aber bei der das Ödem weit geringere Ausmaße annimmt, als beim „warmen“ Subtyp. Etwa 30 % der Patienten lassen sich zum initial „kalten“ Subtyp zuordnen. Diese Patienten weisen häufiger Dystonien in der betroffenen Gliedmaße auf (Bruehl et al., 2002, Eberle et al., 2009, Bruehl et al., 2016).

Je nach Studie finden sich unterschiedliche Verteilungsmuster von „warmen“ und „kalten“ Subtypen. Die ursprüngliche Annahme, dass mehr Patienten unter einem „warmen“ CRPS leiden, wird unter anderem durch eine große prospektive Studie revidiert, bei der von 112 untersuchten CRPS-Patienten nach 3 Monaten Follow Up 49 % ein „warmes“ CRPS und 51 % ein „kaltes“ CRPS aufwiesen. Diese Verteilung

könnte dem Übergang eines primär „warmen“ in ein „kaltes“ CRPS geschuldet sein, denn CRPS-Patienten, die einen chronifizierenden Verlauf aufweisen, zeigen zum Teil einen Übergang von einer primär wärmeren betroffenen Extremität zu einer kälteren (Bruehl et al., 2016).

Die Pathophysiologie hinter diesen Veränderungen scheint sich in inflammatorischen Prozessen zu finden. Bei einem peripheren Trauma werden Cytokine und Neuropeptide freigesetzt, die eine Kaskade zur Geweberegeneration in Bewegung setzen. Zu den für die Pathogenese des CRPS wichtigsten Neuropeptiden zählen hierbei das „Calcitonin Gene-Related Peptide“ (CGRP) und die Substanz P. Diese führen zu einer lokalen Entzündungsreaktion, die das typische Bild des „warmen“ CRPS charakterisiert: Überwärmung, Schwellung, Rötung und Schmerz. Wird dieser Prozess jedoch überbeansprucht, kommt es zur Sensibilisierung von Nozizeptoren, sodass letztendlich ein chronischer Schmerz resultiert. (Bruehl et al., 2016). Bei CRPS-Patienten konnte man erhöhte Konzentrationen des CGRP messen (Birklein et al., 2001).

In den epidermalen Keratinozyten zeigten sich erhöhte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  und Interleukin-6. Diese sind an den trophischen Änderungen bei von CRPS betroffenen Extremitäten beteiligt. Sie führen in der akuten Phase zur Hyperproliferation von Keratinozyten, wodurch sich die Haut deutlich verdickt. In der chronischen Phase des CRPS zeigt sich häufig eine pergamentartige und atrophe Haut an der betroffenen Extremität und die TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 Spiegel sind seltener erhöht als in der akuten Phase (Birklein et al., 2014).

Die beiden Subtypen sollten nicht strikt als zwei völlig verschiedene Ausprägungsformen des Krankheitsbildes verstanden werden. Ein typisches „warmes“ CRPS ist häufig in der Akutphase vorbestehend, die für die ersten sechs Monate nach dem Trauma andauert. Die inflammatorische Aktivität ist hier sehr hoch und erklärt dadurch die typischen Symptome. Ebenso wie die inflammatorische Aktivität zu Beginn stark ansteigt, fällt sie beim „warmen“ Subtyp auch wieder ab und das Symptombild des Patienten bessert sich. Bei diesem CRPS-Typ zeigt sich eine im Vergleich verkürzte Schmerzdauer von 4,7 Monaten. Beim „kalten“ CRPS hingegen ist die Schmerzdauer deutlich länger. Sie liegt bei 20 Monaten (Bruehl et al., 2016).

Eine Hypothese, die die Pathophysiologie des „kalten“ CRPS zu erklären versucht, beruht auf Vasokonstriktion durch eine Dysfunktion des Endothels in der betroffenen

Extremität. Die Vasomotorik wird durch die Mediatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), welche vasodilatierend wirken und das vasokonstriktiv wirkende Endothelin (ET) vermittelt (Alonso and Radomski, 2003b). NO und Endothelin fungieren als Antagonisten und inhibieren sich wechselseitig (Alonso and Radomski, 2003a, Cardillo et al., 2000).

Kommt es im Falle einer Entzündung oder eines Gewebedefekts unter anderem zur Freisetzung von Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ), wird das Enzym iNO-Synthase induziert. Es fällt vermehrt Stickstoffoxid an, welches mit Superoxidanionen zu Peroxynitrit reagiert, welches wiederum eine Endotheldysfunktion herbeiführt und zu einer Vasokonstriktion führt. Durch die Vasokonstriktion beim „kalten“ CRPS wird die Inflammation in gewisser Weise maskiert. Es konnte beobachtet werden, dass Patienten, die unter einem „kalten“ CRPS litten nach einer vasodilatierenden Therapie ein typisches „warmes“ CRPS entwickelten (Groeneweg et al., 2009).

Diese Hypothese stützend untersuchte eine niederländische Forschungsgruppe, ob die Konzentration der proinflammatorischen Cytokine Interleukin-6 und TNF- $\alpha$  im Vergleich von „warmen“ und „kalten“ CRPS-Typen auseinanderweichen. Hierbei wurden 66 CRPS-Patienten untersucht, wobei 39,6 % unter „kaltem“ und 18,7 % unter „warmem“ CRPS litten. Der Rest wurde der mittleren Gruppe zugeteilt, welche weder als besonders kalt, noch als besonders warm zu bezeichnen war. Unter den drei Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied im Hinblick auf die Konzentration der proinflammatorischen Cytokine festgestellt. Demnach ist eine „verborgene“ Entzündungsreaktion auch bei „kalten“ CRPS-Patienten durchaus denkbar und sollte in den Therapieansätzen berücksichtigt werden (Dirckx et al., 2015).

Dass das „kalte“ CRPS häufig eine chronifizierte Form darstellt, wird unter anderem durch periphere und zentrale Sensibilisierungsvorgänge erklärt, welche den für das Syndrom typischen Schmerz erklären. Jedoch ist beim chronischen CRPS nicht nur die neuropathische Komponente des Schmerzes relevant. Durch die Fehlregulation des Sympathikus und die dadurch hervorgerufene Vasokonstriktion ist die betroffene Extremität nicht nur in Bezug auf die Temperaturregulation minderversorgt. Auch die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff kann nicht hinreichend stattfinden, sodass es ebenso zu einem ischämischen Schmerz und zu Gewebeazidose kommen kann. Die hierbei entstehenden freien Radikale können die Nozizeptoren aktivieren, wodurch der Schmerz weiter unterhalten wird. Durch diese Gewebhypoxie erklärt sich ebenso die beim chronischen CRPS beobachteten trophischen Veränderungen wie etwa die pergamentartig verdünnte Haut, die Muskelatrophie und die Demineralisation des

Knochens (Koban et al., 2003). Bewiesen werden konnte die Gewebehypoxie der betroffenen Extremität durch die Messung der Hämoglobin-Sauerstoffsättigung des Gewebes, sowie der Messung des Lactatspiegels in der Haut der betroffenen Extremität (Birklein et al., 2000b, Koban et al., 2003).

In einer koreanischen Studie von 2016 untersuchte man zudem den Zusammenhang zwischen Temperaturunterschieden der betroffenen Extremität und der Symptombdauer. Hierbei wurden 296 Patienten eingeschlossen, die eine durchschnittliche Symptombdauer von 6 Monaten aufwiesen. Man untersuchte die Temperatur der betroffenen und der nicht betroffenen Extremität, wobei im Mittel ein Temperaturunterschied von  $-0,72\text{ °C}$  ermittelt wurde. Die Probanden wurden zudem in vier Kategorien aufgeteilt, die jeweils eine divergierende Symptombdauer aufwiesen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Temperaturdifferenz und der Symptombdauer nachgewiesen werden (Cho et al., 2016).

Eine andere Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen der Höhe der Temperaturdifferenz, dem „CRPS Severity Score“ und der Schmerzintensität anhand der visuellen Analogskala (VAS) (Harden et al., 2010a). In die Studie wurden 42 Patienten eingeschlossen, die die Diagnosekriterien für ein CRPS erfüllten. Zunächst wurde die Korrelation zwischen der Temperaturdifferenz der betroffenen und der nicht betroffenen Seite und der Schmerzintensität (VAS) ermittelt. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang bei der Untersuchung der Korrelation zwischen Höhe des „CRPS Severity Score“ und der Schmerzintensität (VAS) (Jeon et al., 2014).

Der „CRPS Severity Score“ enthält 17 Kriterien, um die Schwere des Krankheitsbildes festzulegen. Diese Kriterien umfassen unter anderem Allodynie, asymmetrische Schwellung, Unterschiede in der Hautfarbe oder eingeschränkte Beweglichkeit. Für jedes vorhandene Kriterium wird ein Punkt vergeben. Ein hoher Score wird demnach als schweres CRPS gedeutet (Harden et al., 2010a).

Der Temperaturunterschied zwischen betroffener und nicht betroffener Seite ist ein Aspekt der „Budapest Kriterien“ (Harden et al., 2010b). In der aktuellen S1-Leitlinie wird bei Einbezug der Temperaturunterschiede zur Diagnosefindung in Zweifelsfall eine wiederholte Messung der Hauttemperatur empfohlen (Birklein, 2018).

Untersucht wurden auch die Schwankungen der Temperaturunterschiede bei Alltagstätigkeiten und Änderung der Umgebungstemperatur, um das autonome Nervensystem unter realen Bedingungen zu testen. Auf diese Weise gelang die Aufzeichnung der Temperaturdynamik von CRPS-Patienten im Vergleich zu

Patienten, die an anderen Extremitätenschmerzen litten. Die CRPS-Patienten hatten im Durchschnitt stärkere Temperaturasymmetrien im Vergleich zu den Patienten mit anderen Extremitätenschmerzen oder im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Krumova et al., 2008).

Niehof et al. zeigten in einer Studie von 2006, dass die Spezifität der Temperaturdifferenzmessung erhöht werden kann, wenn man nicht nur die Temperatur beider Seiten in Ruhe unter akklimatisierten Bedingungen misst, sondern aktiv Patienten in einen Temperaturkreislauf einschließt. Hierzu wurden 12 CRPS-Patienten mit einem Ganzkörperanzug versehen, der aktiv auf 15 °C gekühlt und auf 45 °C erwärmt wurde. Zunächst wurde dabei eine Baseline Temperaturdifferenz erhoben und anschließend in zehnmütigen Abständen die Temperatur der Fingerspitzen beider Seiten erhoben. Als Kontrollgruppe wurden 8 gesunde Probanden herangezogen. Es konnte gezeigt werden, dass in der Messung der Basaltemperatur eine Zuordnung zu „warmen“ oder „kalten“ CRPS-Typen kaum möglich war. Durch die thermische Provokation hingegen war eine solche Zuordnung in warme, intermediäre und kalte Regulationstypen möglich (Niehof et al., 2006).

Bezüglich eines festlegbaren „absoluten“ Grenzwertes des Temperaturunterschiedes sprechen sich Wasner et al. für einen Wert über 2 °C aus. Lege man den Wert auf 2,2°C während sich parallel die Umgebungstemperatur ändert, sei dies sowohl sensibler als auch spezifischer als die einmalige Messung bei Raumtemperatur. Allerdings erkennen die Autoren zum Teil selbst die Schwierigkeit der klinischen Umsetzbarkeit an. Dennoch ist die Relevanz des Temperaturunterschiedes, auch als diagnostisches Hilfsmittel, vor allem dann gegeben, wenn eine hohe Aktivität des Sympathikus besteht, also unter anderem bei schwankenden Außentemperaturen. Der Temperaturunterschied der betroffenen und kontralateralen Seite wird dann besonders groß und diese Dynamik kann auch bei der Differenzierung eines CRPS von anderen Formen des Extremitätenschmerz hilfreich sein (Wasner et al., 2002).

Derzeit ist für die Diagnostik des CRPS und für die Zuordnung zu einem Subtyp die Temperaturdifferenz zwischen betroffener und nicht betroffener Seite zu Beginn der Erkrankung erforderlich. Eine Einteilung in den Subtyp des „primär warmen“ oder „primär kalten“ CRPS ist so möglich (Birklein, 2018)

### 2.3. Das Komplexe Regionale Schmerzsyndrom im Tiermodell

Ein Tiermodell, welches dem CRPS beim Menschen sehr nahekommt wurde an Ratten von der Forschungsgruppe Kingery und Clark beschrieben. Zunächst wurde ein Modell entwickelt, bei dem der Ischiasnerv durchtrennt wurde, wodurch am Tier CRPS ähnliche Symptome wie ein Ödem, Hyperalgesie und eine Überwärmung erzeugt werden konnten (Kingery et al., 2001, Kingery et al., 2003).

Später wurde dann auf eine Durchtrennung des Ischiasnerv abgesehen und eine Fraktur der Tibia durchgeführt. Es wurde, ähnlich wie in unserem Versuchsaufbau, die rechte Tibia frakturiert und das Bein dann für vier Wochen eingegipst. Vor der Fraktur und nach Entfernung des Gipses wurden überwiegend die gleichen Sensibilitätstests durchgeführt wie bei unseren Experimenten (Guo et al., 2004).

Diese Sensibilitätstests waren so ausgerichtet, dass sie Symptome, wie sie typischerweise beim CRPS vorkommen, auch bei der Maus zeigen konnten. Es wurde zum einen die Pfotendicke gemessen, wodurch die Stärke des Ödems ermittelt werden konnte. Außerdem wurde die Pfotentemperatur im Interdigitalraum gemessen, um die beim CRPS-typische Temperaturdifferenz nachzuweisen. Zur Feststellung von mechanischer Allodynie bediente man sich Von Frey Haaren unterschiedlicher Dicke, die von plantar appliziert wurden. Dadurch war es möglich eine Schwelle für mechanische Allodynie zu ermitteln. Der Belastungsschmerz wurde durch den Grad der Belastung im Vergleich zur kontralateralen Seite mithilfe von zwei Waagen ermittelt. Um herauszufinden, inwiefern nun tatsächlich die Fraktur Ursache der Symptome war und welchen Einfluss die Gipsimmobilisation hatte, wurde eine Kontrollgruppe herangezogen, die lediglich eine Gipsimmobilisation ohne Fraktur erhalten hatte. Es zeigten sich unmittelbar nach Entfernung des Gipses bei beiden Gruppen typische Zeichen einer akuten posttraumatischen Entzündung. Die betroffene Extremität war überwärmt, ödematös aufgetrieben, allodyn und wurde weniger belastet. Jedoch zeigte sich, dass bei den frakturierten Ratten insbesondere die Überwärmung und die Allodynie über einen längeren Zeitraum bestanden, während sich diese Symptome in der Kontrollgruppe früh zurückbildeten (Guo et al., 2004).

Dieses Tiermodell etablierte sich und wurde seitdem in zahlreichen Veröffentlichungen als Grundlage herangezogen (Li et al., 2010, Li et al., 2015, Li et al., 2009).

In diesem Tiermodell, welches in der Frakturdurchführung und der Sensibilitätstestung an das vorher beschriebene angelehnt ist, wurde bei der Ratte eine ähnliche Dynamik

festgestellt. Nachdem nach vier Wochen der Gips entfernt wurde, zeigten über 90 % der Tiere drei oder gar vier Zeichen eines CRPS (untersucht wurden mechanische Allodynie, ungleiche Belastung, Wärme und Ödem). Nach 16 Wochen wiesen dann 60 % der Mäuse mit Fraktur noch mindestens ein Symptom auf. Das am längsten persistierende Symptom war in dieser Untersuchung die mechanische Allodynie. Die typischen akuten Zeichen wie Überwärmung oder Schwellung hingegen waren nach dieser Zeit kaum noch nachweisbar, diese Symptom waren nur in der akuten Phase vier Wochen nach Fraktur vorhanden (Wei et al., 2016).

Eine weitere Studie, die sich anhand des Tibiafrakturmodells mit einer akuten und chronischen Phase der posttraumatischen Entzündung befasst, zeigte an 12-14 Wochen alten C57Bl/6J Mäusen, dass ein Übergang der akuten in die chronische Phase auch an der Genexpression des Rückenmarks beobachtet werden konnte. Die Mäuse wurden ebenfalls einer Fraktur und einer Gipsimmobilisation unterzogen. Der Versuchsaufbau entsprach im Wesentlichen dem der zuvor erläuterten Studie. Erstmals an der Maus wurde der Versuchsaufbau 2012 beschrieben (Guo et al., 2012). Die Mäuse wurden über einen längeren Zeitpunkt, also nach 3, 5, und 7 Wochen auf Temperatur, Ödementwicklung, Allodynie und Belastung des betroffenen Beins untersucht. Während die vasomotorischen Zeichen, also Temperatur und Ödem, nur zu Beginn vorhanden waren, hielt die Allodynie und die schmerzbedingte Belastungsdifferenz auch nach 7 Wochen noch an (Gallagher et al., 2013).

Eine Besonderheit bei vielen chronischen Schmerzsyndromen und auch beim CRPS ist die Dominanz des Krankheitsbildes bei weiblichen Patienten. Frauen sind etwa dreimal so häufig betroffen wie Männer (de Mos et al., 2007). Mithilfe des Tibiafrakturmodells der Maus wurden ähnliche Beobachtungen auch im Tiermodell gemacht. Weibliche Tiere zeigten eine niedrigere Schmerzschwelle nach der Fraktur und zudem eine stärkere motorische Einschränkung. Das Angstgedächtnis war bei den weiblichen Tieren ebenfalls gestört und erholte sich – selbst nachdem die Nozizeption wieder auf ein normales Maß gesunken war – nicht (Tajerian et al., 2015).

Die in diesem Tiermodell gezeigten Symptome repräsentieren, sei es nun bei der Ratte oder der Maus, die posttraumatische Entzündung, welche dem CRPS des Menschen gleicht, sehr zufriedenstellend. Durch die Fraktur und die Immobilisation entstehen nach drei bis vier Wochen ein posttraumatisches Ödem, eine Überwärmung der betroffenen Gliedmaße, Allodynie auf mechanische und thermische Reize, eine verminderte Belastbarkeit und gelenknahe Osteoporoseherde. Wollte man die

Versuchstiere mithilfe der CRPS-Diagnosekriterien einordnen, so wäre man sehr nahe bei einem CRPS. Allerdings muss bedacht werden, dass es sich lediglich um ein Anschauungsmodell handelt und das Modell insbesondere für die chronische Phase des CRPS Schwächen aufweist (Birklein et al., 2018).

Neben dem Tibiafrakturmodell existieren noch weitere chronische Schmerzmodelle, wie beispielsweise das „Ischemic reperfusion injury model (CPIP)“ oder das „Sciatic nerve ligation model“ (Bruehl, 2010, Birklein et al., 2018). Da das Tibiafrakturmodell jedoch sowohl im Hinblick der Ätiologie als auch der Symptomausprägung am ehesten dem menschlichen CRPS entspricht, wurde dieses Modell in der hier durchgeführten Studie verwendet, um weitere Aspekte des Krankheitsbildes näher zu untersuchen.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **Versuchstiere**

Für die Experimente wurden 129 Labormäuse des Stammes C57BL/6J verwendet. Es wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere herangezogen, wobei 62 Tiere männlich und 67 Tiere weiblich waren. Das durchschnittliche Alter zu Beginn der Experimente betrug 6-10 Wochen. Das durchschnittliche Alter betrug 4-7 Monate bei Durchführung der Sensibilitätstests. Das durchschnittliche Gewicht betrug im Alter von 6 Wochen 20-25 g. Zu einem späteren Zeitpunkt in einem Alter von 12 Wochen betrug das Gewicht 25-30 g. Die Tiere wurden in handelsüblichen Kunststoffkäfigen mit den Maßen 20 cm x 25 cm gehalten und erhielten Futter und Wasser ad libitum. Beim Einstreu handelte es sich um gewöhnliche Holzpellets. Die durchschnittliche Temperatur betrug 24 °C und die Luftfeuchtigkeit circa 40 %. Die Versuchstiere wurden in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Zyklus gehalten.

Mäuse, die in sozialer Isolation lebten (82 Mäuse), wurden 3-4 Wochen vor den Experimenten isoliert in 20 cm x 25 cm Einzelkäfige umgesetzt. Gruppentiere wurden jeweils zu fünf pro Käfig gehalten. Frisch gelieferte Tiere erhielten mindestens eine Woche Zeit, um sich einzugewöhnen.

Die Haltungsbedingungen und die Versuche entsprachen dem deutschen Tierschutzgesetz von 2006. Des Weiteren wurden die Richtlinien zu experimentellen Schmerzstudien an Tieren der International Association for the Study of Pain (IASP) eingehalten („Guidelines of the Committee for Research and Ethical Issues of IASP 1983“) und von der zuständigen Ethikkommission zugelassen. Die gesamte experimentelle Arbeit, sowie die Haltung der Tiere erfolgte in einer speziellen Mouse Behavior Unit (MBU) unter Aufsicht der dort zuständigen Tierärzte und Tierpfleger.

Die Gruppengrößen, in denen die Tiere gehalten wurden, wurden auf ein Minimum reduziert und es wurde darauf geachtet, den Tieren kein unnötiges Leid zuzufügen.

## Hersteller und technische Hilfsmittel

### Fear conditioning

System: TSE-Multi-Conditioning System  
Typnummer: 256060-CU-PACK-4  
Projektnummer: 4443  
230 V AC  
TSE Systems  
Bad Homburg

Von Frey Test: Von Frey Haare  
Hersteller: NorthCoast (Touch Test Sensory Evaluators)  
Evaluator Size 1,65-6,65

North Coast Medical, Inc  
8100 Camino Arroyo  
Gilroy, CA 95020

3700-003 Base Plattform  
Hersteller: UGO Basile mit Gitter  
UGO Basile  
VIA GIUSEPPE DI VITTORIO 2  
21036 Gemonio  
Italy

Kunststoffboxen 10cm x 10cm für insgesamt 12 Mäuse

Plantar Test: 37370-001 Plantar Test (Hargreaves Apparatus)  
Volt:100-240  
Hz: 50/60  
Watt: 50  
Hersteller: UGO Basile  
VIA GIUSEPPE DI VITTORIO 2  
21036 Gemonio Italy

3700-003 Base Plattform des Herstellers UGO Basile mit  
Glasboden

Unweighting: Incapacitance Meter Tester  
Hersteller: IITC Life Science  
Spannung: 110/220 V

IITC Life Science Inc.  
23924 Victory Blvd Woodland Hills, CA 91367  
818 710 8843  
Fax 818 992 5185

Thermometer: Physitemp BAT-12  
GTH 175/Pt  
Digitalthermometer Pt 1000 (-199,9°C...+199.9°C)

Physitemp Instruments, LLC  
154 Huron Avenue  
Clifton, New Jersey 07013

GHM Messtechnik GmbH  
Standort GREISINGER  
Hans-Sachs-Straße 26  
93128 Regenstauf  
Germany

Ödemtest: Lasersensor Precicura  
Hersteller: LIMAB

LIMAB GmbH  
Mitterlängstr.28  
D-82178 Puchheim

Waage: Hersteller: Sartorius Weighing Technology GmbH  
Otto-Brenner-Str. 20  
37079 Göttingen, Deutschland  
ED153-CW  
27303995

Elevated Plus: Analyse mit der Software EthoVision® XT Version 8.5  
Hersteller: Noldus  
Noldus Information Technology by  
Wageningen - The Netherlands

Open Field: Analyse mit der Software EthoVision® XT Version 8.5  
Hersteller: Noldus  
Noldus Information Technology by  
Wageningen - The Netherlands

Leeres water maze (Durchmesser= 120cm)

## Pharmaka

### **Antibiotikum:**

Bei dem verwendeten Antibiotikum handelte es sich um den Wirkstoff Enrofloxacin, Handelsname Baytril®. Das Medikament wurde in verdünnter Lösung subkutan appliziert. 0,006 ml Baytril® enthalten 0,15 mg des Wirkstoffes. Die Konzentration sollte 5 µg pro kg Maus betragen, das bedeutet 0,15 mg bei einer Maus mit dem Gewicht 30 g.

Zur Herstellung einer Lösung für 10 Mäuse wurden 60 µl Baytril® mit 940 µl Natriumchloridlösung gemischt. Zur Entnahme wurden handelsübliche Pipetten des Herstellers Accumax verwendet. Die Dosis dieser Lösung betrug pro Maus 1 ml.

### **Analgetikum:**

Bei dem verwendeten Schmerzmittel handelte es sich um den Wirkstoff Buprenorphin, Handelsname Temgesic®. Auch dieses Medikament wurde verdünnt und subkutan injiziert. 1ml Temgesic® enthalten 0,3 mg des Wirkstoffes. Die Konzentration sollte 0,05 µg pro Kilogramm Maus betragen, das heißt 0,0015 mg bei einer Maus mit einem Gewicht von 30 g.

Zur Herstellung der Lösung für 10 Mäuse wurden 0,1 ml Temgesic® mit 10 ml Natriumchloridlösung gemischt. Die Dosis dieser Lösung betrug pro Maus 0,5 ml.

### **Inhalationsanästhetikum:**

Diverse Tests und die Fraktur wurden unter Inhalationsnarkose durchgeführt. Dabei wurde das Inhalationsanästhetikum mit dem Wirkstoff Isofluran verwendet. Es wurde ein Produkt des Herstellers Abbvie Deutschland mit dem Handelsnamen Forene® verwendet. Die Konzentration der Lösung betrug 100 %. Zur Verabreichung wurde ein speziell für Isoflurane geeigneter Verdampfer (Vapor 19.3) der Marke Dräger genutzt. Die Isoflurankonzentration im Isofluran-Sauerstoffgemisch wurde auf 2 Vol.% eingestellt.

## 3.2. Methoden

### **Fear Conditioning**

Da es bei den Experimenten um den Einfluss von Angst auf das Verhalten der Maus gehen sollte, mussten die Mäuse zunächst von naiven zu „gestressten“ Tieren werden. Dazu wurde das Fear Conditioning Modell gewählt, welches im Wesentlichen auf dem Prinzip der klassischen Konditionierung basiert.

Bei 38 % der Tiere wurde ein Fear Conditioning durchgeführt. Bei 32,6 % wurde kein Fear Conditioning durchgeführt (naiv) und bei 29,4 % wurde lediglich ein einmaliger Stromstoß, ein sogenannter „Reminder“ appliziert (Tab. 2), um später den Einfluss von Stress auf die posttraumatische Entzündung zu untersuchen. Diese Gruppe wurde als Kontrollgruppe bezeichnet und wird bei den Verhaltenstests in Bezug auf Ängstlichkeit relevant werden. Der „Reminder“ wurde hier mit abgeschwächter Stromstärke (0,2 mA bei Weibchen, 0,3 mA bei Männchen) appliziert und ist als nicht konditionierender Stimulus zu verstehen und die Kontrollgruppe als Sham-Kontrolle. Der Versuchsaufbau war zwar gleich, jedoch wurden die Tiere keinem Fear Conditioning und keiner Extinktion unterzogen.

Die Versuchstiere wurden für das Fear Conditioning einzeln in die TSE-Multi-Conditioning Kammer (TSE Systems) auf ein Metallgitter gesetzt, welches von einer transparenten Kunststoffarena umgrenzt wurde. Die Maße betragen hier 20 cm x 20 cm. Die Dicke der Metallstäbe betrug etwa 0,5 cm und der Abstand zwischen den Stäben lag bei 1 cm.

Vor und nach jedem Experiment wurden die Kammern gründlich mit einer 70 % Ethanollösung gereinigt und getrocknet, um das Verhalten der Mäuse nicht durch Gerüche der vorherigen Maus zu beeinflussen.

Hintergrundgeräusche wurden nicht eingestellt. Um das Verhalten der Mäuse beobachten zu können, waren in den Kammern Kameras direkt über der Arena in der sich die Maus befand angebracht, die mithilfe der Software AV-Recording System® ein Video der Maus aufzeichnete.

In der TSE-Software wurden zunächst zwei Minuten Habituationszeit eingestellt, in der bereits das Freezing gemessen wurde. Freezing ist definiert als die Abwesenheit jeglicher Bewegung außer Atembewegungen. Anschließend wurde der erste Elektroschock appliziert, der eine Sekunde dauerte und je nach Geschlecht der Maus

0,3 mA bei weiblichen Tieren oder 0,4 mA bei männlichen Tieren betrug. Es folgte eine Pause von 20 Sekunden bis erneut ein Elektroschock abgegeben wurde, ebenfalls wieder eine Sekunde lang mit der gleichen Stromstärke. Zum Abschluss wurde wieder zwei Minuten lang das Freezing der Mäuse gemessen. Zur besseren Übersicht sind die Einstellungen in Tab.1 nochmals aufgeführt.

Die optimale Stärke und Häufigkeit der Elektroschocks wurde mithilfe eines Kontrollexperiments ermittelt („Kontrollexperiment Schmerzempfindlichkeit“).

**Tab.1 TSE-Multi-Conditioning-System  
Fear Conditioning Einstellungen**

1.Phase	Habituation	120 sec	
2.Phase	E-Stimulus	1 sec	0,3/0,4 mA
3.Phase	Pause	20 sec	
4.Phase	E-Stimulus	1 sec	0,3/0,4 mA
5.Phase	Ruhe	120 sec	

Am ersten Tag nach der Angstkonditionierung, dem „Retention“-Tag, wurde das Freezing gemessen, ebenso die Extinktion am zweiten bis fünften Tag nach der Konditionierung.

Am fünften Tag wurde nach der Messung der Extinktion ein weiterer Elektroschock – ein „Reminder“ – appliziert, dessen Länge eine Sekunde betrug. Die Stromstärke war 0,1 mA schwächer als die vorherigen Elektroschocks. Bei den weiblichen Tieren betrug die Stromstärke 0,2 mA, bei den männlichen 0,3 mA. Im Anschluss verharrten die Tiere noch zwei Minuten in der Kammer.

Am darauffolgenden Tag wurde wieder das Freezing für zwei Minuten gemessen, in diesem Fall wird es als „Reinstatement“ bezeichnet.

**Tab. 2 Geschlechterverteilung bei verschiedenen Behandlungen**

**Geschlecht \* Behandlung Kreuztabelle**

Anzahl

		Behandlung			Gesamt
		Fear Conditioning	kein Fear Conditioning	Einmaliger „Reminder“	
Geschlecht	männlich	29	14	19	62
	weiblich	20	28	19	67
Gesamt		49	42	38	129

### **Kontrollexperiment Schmerzempfindlichkeit**

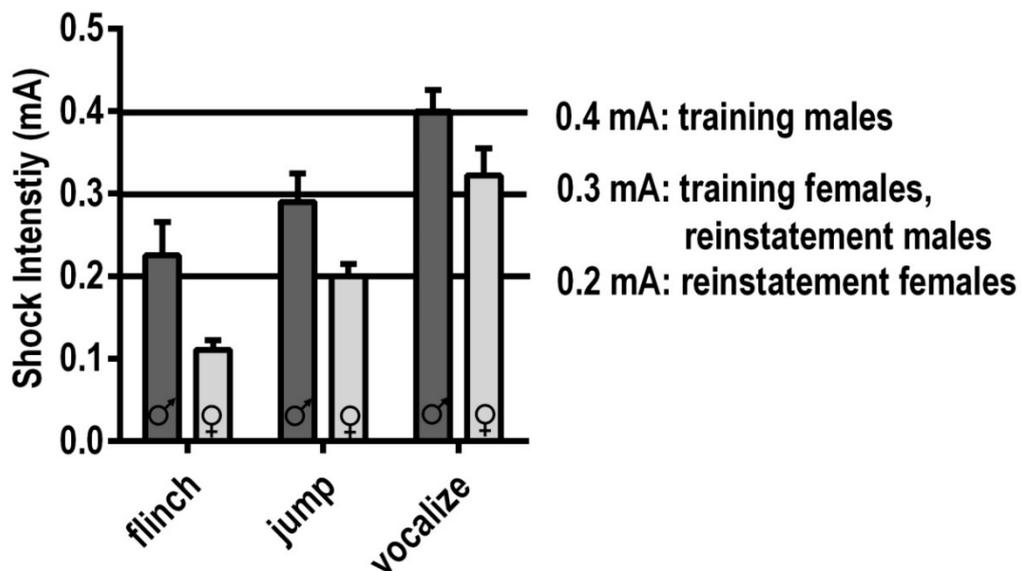
Für dieses Kontrollexperiment wurden insgesamt 40 Mäuse verwendet. Davon waren 20 Tiere männlich und 20 weiblich. Das Experiment diente der Optimierung der Stromstärke für das Fear Conditioning (Abb. 1). Die Tiere wurden jeweils einzeln in eine Kammer des TSE-Multi-Conditioning-Systems gesetzt. Die Türen wurden geschlossen und das Licht gedimmt (200 Lux). Es wurden keine speziellen Hintergrundgeräusche eingestellt. Die Mäuse erhielten eine Habituationszeit von zwei Minuten. Anschließend wurde mit einem Elektroschock der Stärke 0,1 mA begonnen. Die Dauer der Applikation betrug eine Sekunde. Anschließend wurden im Abstand von 30 Sekunden Elektroschocks in aufsteigender Stärke appliziert. Zunächst 0,2 mA, dann 0,3 mA, 0,4 mA und schließlich 0,5 mA. Zur besseren Übersicht sind in Tab. 3 die Einstellungen aufgeführt. Dabei wurde die Reaktion der Mäuse beobachtet, was durch eine Videoaufnahme ermöglicht wurde. Es wurde ein Bewertungssystem herangezogen, welches aus den Zahlen null bis drei bestand. Null stand hierbei für keine sichtbare Reaktion, eins für ein Zucken (flinching), zwei für eine deutliche Reaktion mit Sprung (jumping) und drei für eine sehr starke, hörbare Reaktion (Vokalisation) als Zeichen von Schmerz. Diese Stärke gilt als zu starker Reiz (Lehner et al., 2010). Da die Weibchen empfindlicher waren als die Männchen wurde die Stromstärke für das Fear Conditioning auf 0,4 mA bei den Männchen und 0,3 mA bei den Weibchen festgelegt. Es wurden beim Fear Conditioning jeweils drei Stromstöße abgegeben (Laxmi et al., 2003). Der „Reminder“-Schock wurde auf 0,3 mA bei den Männchen und 0,2 mA bei den Weibchen festgelegt, da naive Tiere auf diese Stromstärke keine Angstkonditionierung zeigten.

**Tab. 3 Kontrollexperiment Schmerzempfindlichkeit  
Multi-Conditioning-System Einstellungen**

Phase 1	Habituation	120 sec	
Phase 2	E-Stimulus	1 sec	0,1 mA
Phase 3	Pause	30 sec	
Phase 4	E-Stimulus	1 sec	0,2 mA
Phase 5	Pause	30 sec	
Phase 6	E-Stimulus	1 sec	0,3 mA
Phase 7	Pause	30 sec	
Phase 8	E-Stimulus	1 sec	0,4 mA
Phase 9	Pause	30 sec	
Phase 10	E-Stimulus	1 sec	0,5 mA



### Pain Sensitivity Testing



**Abb. 1: Ermittlung der Schmerzschwelle beim Fear Conditioning**

Reaktionen (flinching, jumping, vocalizing) bei verschiedenen Stromstärken (0,1-0,5 mA). Die Schmerzschwelle wurde für Männchen (n=20) und Weibchen (n=20) getrennt ermittelt. Die Weibchen sind bei allen Stromstärken empfindlicher als die Männchen. Die ermittelte Trainingsstärke für Männchen betrug 0,4 mA und für Weibchen 0,3 mA.

## Verhaltenstests

Alle Verhaltenstests wurden zunächst vor und dann ein bis dreimal nach der Fraktur durchgeführt. Zum einen 3 Wochen im Anschluss an die Fraktur, nachdem den Tieren der Gips abgenommen wurde. Bei einigen der Versuchstiere wurden manche Verhaltenstests auch 6 und 12 Wochen nach der Fraktur nochmals durchgeführt.

### **Sensibilitätstest mit Von Frey Filamenten**

Mithilfe der Von Frey Filamente konnte die mechanische Sensibilität der hinteren Pfoten gemessen werden (Wei et al., 2016, Kingery et al., 2003). Dazu wurden die Mäuse auf ein Gitter gesetzt (Base Platform 37000-003, UGO Basile). Jedes Tier saß dabei einzeln in einer transparenten Kunststoffbox (Maße 10 cm x 10 cm).

Nach einer Habituationsphase von 30 Minuten wurde mit dem Test begonnen. Mit Von Frey Filamenten unterschiedlicher Stärken (Touch Test Sensory Evaluators, North Coast Medical) wurde bei den Mäusen ein kraftkonstanter mechanischer Druck zwischen dem ersten und dem zweiten Metatarsalen plantar appliziert. Mit der geringsten Stärke wurde hier begonnen. Wenn keine Reaktion der Maus feststellbar war, ging man zur nächsthöheren Stärke über. Wenn eine Reaktion erkennbar war, nutzte man danach wieder die nächstgeringere Stärke. So fuhr man fort bis letztlich drei deutliche Reaktionen bei einer bestimmten Filamentstärke verzeichnet wurden. Dieses Verfahren bezeichnet man als Simplified Up-Down Messung (Bonin et al., 2014, Chaplan et al., 1994). Der gesamte Test wurde zuerst am rechten und dann am linken Hinterlauf durchgeführt.

Vor und nach jedem Versuch wurden die Versuchsgeräte gründlich mit 70 % Ethanolölösung gereinigt.

**Tab.4: Von Frey Testprotokoll**

2,44 (0,04 g)	Rechts nur post-Fraktur	
2,83 (0,07 g)	Rechts nur post-Fraktur	
3,22 (0,16 g)	Rechts	Links
3,61 (0,4 g)	Rechts	Links
3,84 (0,6 g)	Rechts	Links
4,08 (1,0 g)	Rechts	Links
4,17 (1,4 g)	Rechts	Links
4,31 (2,0 g)	Rechts	Links
4,56 (4,0 g)	Rechts	Links

### **Test zur Kälteempfindlichkeit**

Mithilfe dieses Tests sollte die Empfindlichkeit der Pfote gegenüber Kältereizen festgestellt werden. Ebenso wie die anderen Verhaltenstests wurde der Test wieder vor und nach der Fraktur durchgeführt.

Bei der Durchführung des Tests wurden die Tiere auf ein Gitter gesetzt (Base Platform 37000-003, UGO Basile). Dabei saßen sie einzeln in einer der 12 transparenten Kunststoffboxen mit den Maßen 10 cm x 10 cm. Den Tieren wurden 30 Minuten Habituationszeit gegeben, bevor mit dem Test begonnen wurde.

Dem üblichen Acetontest (Vissers and Meert, 2005, van der Wal et al., 2015) wurde von uns ein Kaltwassertest vorgezogen, da bei vorangegangenen Versuchen aufgefallen war, dass die adhäsiven Eigenschaften des Acetons die Ergebnisse verfälschen.

Um die Berührungsempfindlichkeit zu testen, wurde zunächst Wasser mit Zimmertemperatur (24 °C) aus einer 10 ml Spritze in leichtem konstanten Strahl auf die Hinterpfoten appliziert. Dabei war darauf zu achten, mit der Spritze nicht die Pfote zu berühren. Die Reaktion der Maus wurde beobachtet. Bei gesunden Tieren führt dies nicht zu einer Wegziehreaktion. Lag eine Allodynie vor, konnte sie mithilfe dieses Tests

detektiert werden. Dies wurde untersucht, um nicht mechanische Allodynie mit Kälteallodynie zu verwechseln.

Anschließend wurde der Versuch mit dem 4 °C kalten Wasser wiederholt, nun jedoch dreimal pro Seite. Wieder wurde die Reaktion der Maus beobachtet. Es wurde ein Bewertungssystem von null bis drei verwendet, um die Reaktionen zu charakterisieren: 0=keine Reaktion, 1= schwache Reaktion, 2= starke Reaktion, 3= langanhaltende starke Reaktion. Vor und nach den Experimenten wurden die Versuchsgeräte gründlich mit 70 % Ethanolösung gereinigt.

## **Plantar Test**

Der Plantar Test sollte die Wärmeempfindlichkeit der plantaren Seite der Hinterläufe testen. Dieser Test entspricht im Wesentlichen dem Prinzip des „Hot Plate“ Experiments (Tjolsen et al., 1991). Der Test wurde vor und nach der Fraktur durchgeführt.

Dazu wurden die Tiere auf eine Plexiglasscheibe gesetzt, wobei sich die Mäuse einzeln in transparenten Kunststoffboxen mit den Maßen 10 cm x 10 cm befanden. Der Test wurde erst nach 30 Minuten Habituationszeit begonnen. Die Messung erfolgte nach der Hargreaves Methode mithilfe eines Wärmegenerators (UGO Basile, 37370—002), der per Infrarotsensor registriert, ob sich die Pfote über der Wärmeplatte befindet. Der Beginn der Wärmeapplikation konnte manuell gesteuert werden. Der Hargreaves-Apparat, der mit dem Wärmegenerator verschaltet war, begann bei Beginn der Wärmeapplikation mit der Zeitmessung. Sobald die Maus die Pfote wegzog, wurde dies durch den Infrarotsensor registriert, die Zeit wurde gestoppt und gleichzeitig die Wärmezufuhr abgebrochen.

Die Zeiten bis zum Erreichen der Rückzugsschwelle der Maus wurden manuell notiert. Auf jeder Körperseite wurde dieser Test dreimal durchgeführt. Allerdings nicht direkt hintereinander, sondern mit fünfminütigen Pausen, um an der plantaren Haut eine kurze Regenerationsphase zu gewährleisten.

Bei diesem Test war sorgfältig darauf zu achten, dass die Tiere ihre Pfote tatsächlich aufgrund eines Schmerzreizes wegzogen und nicht zufällig aufgrund ihres Bewegungsdrangs wegliefen.

Vor und nach jedem Experiment wurde das Versuchsmaterial gründlich mit einer 70 % Ethanolösung gereinigt.

## **Unweighting**

Dieser Test diente dazu, die Belastung der Hinterläufe zu ermitteln.

Dazu wurde eine Apparatur mit zwei parallel geschalteten Waagen verwendet, der sogenannte „Incapacitance Meter Tester“ für Mäuse, Ratten und Vögel (IITC Life Science). Mithilfe eines speziellen Nagetiereinsatzes konnte die Maus so platziert werden, dass lediglich ihre Hinterläufe auf den das Gewicht messenden Plattformen standen. Die dynamische Gewichtsverteilung wird automatisch für fünf Sekunden gemessen. Zuerst wurde die links gemessene Belastung, dann die rechts gemessene Belastung angezeigt. Der Test wurde pro Maus fünfmal wiederholt. Es wurde darauf geachtet, die Maus nicht übermäßigem Stress auszusetzen. Daher war man bemüht, den Test möglichst ruhig aber zügig durchzuführen. Der Schwanz wurde stramm, aber für die Maus nicht schmerzhaft zwischen den Fingern gehalten.

Nach jeder Maus wurde der Versuchsapparat gründlich mit einer 70 % Ethanollösung gesäubert.

## **Ödemmessung**

Um eine Aussage bezüglich der ödematösen Schwellung des betroffenen Beins zu machen, musste vor und nach der Fraktur die Dicke des Beines im Bereich distal der Tibia gemessen werden.

Mithilfe einer Lasermesstechnik (Wei et al., 2016) wurde das gestreckte Bein erfasst. Der Lasersensor (PreciCura® SR, Limab) besaß eine Messspanne bis 200 mm mit einer Auflösung von 0,01 mm.

Zunächst wurde die Baseline angezeigt, die den Durchmesser des Laserpunktes auf dem Untergrund entsprach. Nun wurde der distale Teil des Hinterbeins der Maus unter dem Laserpunkt fixiert. Der angezeigte Wert vergrößerte sich, da der Laserstrahl auf dem Gewebe der Maus diffus reflektiert wurde. Die Reflexionen wurden wiederum durch einen CCD-Detektor eingefangen, was die Dickemessung des Beins ermöglicht. Die Pfotendicke ergab sich demnach aus der Differenz des gemessenen Wertes und der Baseline. Das Messprinzip des Lasersensors beruht auf der optischen Triangulation. Der auf das Messobjekt projizierte Laserpunkt wird von dessen Oberfläche diffus reflektiert. Durch ein Objektiv wird das Licht auf einen CCD-Detektor (charged-coupled device) gelenkt. Die Lichtenergie, die am Detektor ankommt, variiert abhängig vom Abstand des Messobjektes. Ein Prozessor konvertiert die gemessene

Pixelposition in eine Millimeterposition durch eine im Sensor gespeicherte Kalibrierungstabelle.

Es wurde zuerst das rechte Bein direkt unter dem Laserpunkt fixiert, anschließend das linke Bein in gleicher Weise. Jedes Bein wurde zweimal gemessen.

### **Hauttemperaturmessung**

Sowohl vor als auch nach der Fraktur wurde an beiden Pfoten der Maus die Temperatur gemessen. Dabei wurde die Maus vor der Messung mithilfe des Inhalationsanästhetikums Isofluran kurz narkotisiert. Hierzu wurde ein Verdampfer des Herstellers Dräger verwendet (Vapor 19.3). Das Isofluran wurde auf 2 Vol. % eingestellt und mit reinem Sauerstoff gemischt.

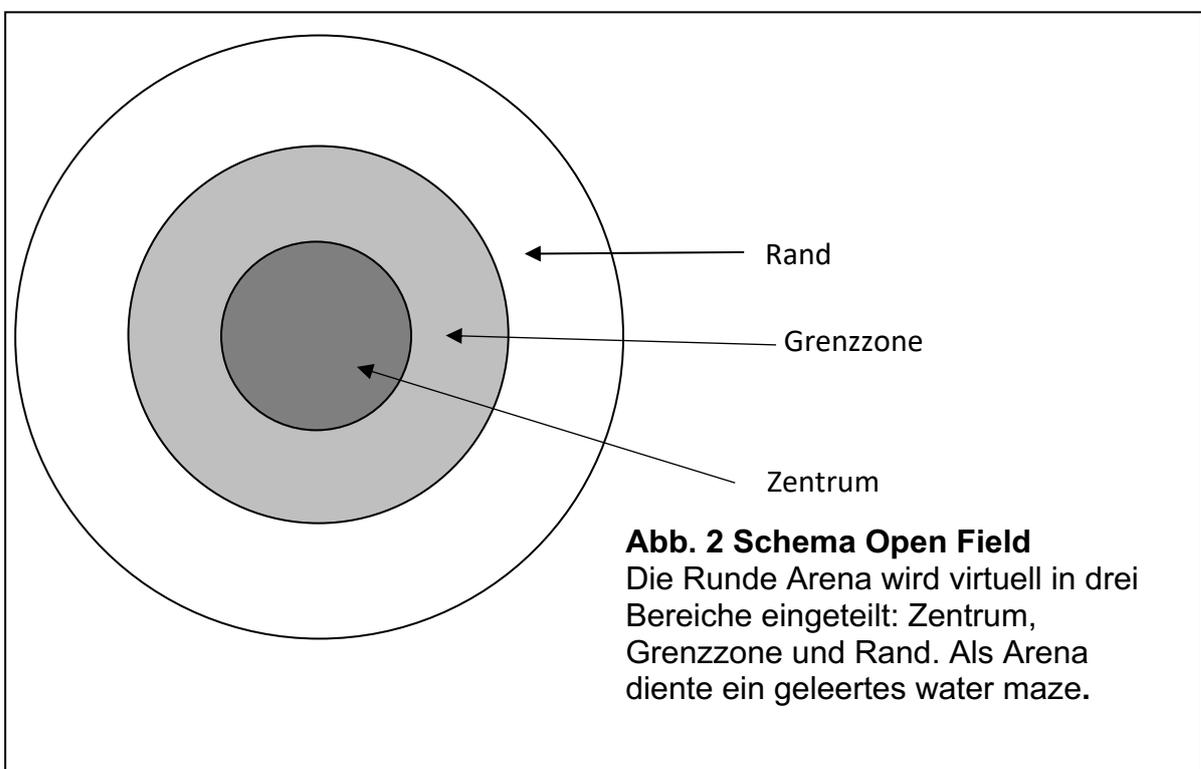
Bei der Messung war darauf zu achten, dass möglichst zügig gearbeitet wurde, um den Einfluss des Inhalationsanästhetikums auf die Temperatur gering zu halten. Die Maus wurde auf den Rücken gelegt und mithilfe eines Thermometers (Physitemp) die Temperatur in den Zwischenzehenräumen gemessen.

Hierbei wurde an der rechten Pfote begonnen. Man begann im Interdigitalraum der fünften und vierten Metatarsalen (lateral) zu messen, anschließend maß man zwischen zweiter und dritter Metatarsale (zentral) und schließlich medial zwischen erster und zweiter Metatarsale (medial). Dies wurde in gleicher Weise nochmals rechts wiederholt, anschließend wurde mit der linken Pfote in gleicher Weise verfahren (Kingery et al., 2003). Pro Pfote ergaben sich demnach sechs Temperaturwerte. Aus diesen wurde ein Mittelwert gebildet.

Nach der Messung wurde die Maus alleine in einen Käfig gesetzt, um dort in Ruhe aufwachen zu können. Nachdem die Maus wieder wach war, wurde sie noch etwa 15 Minuten beobachtet, um sicher zu stellen, dass es keine weiteren Komplikationen gab.

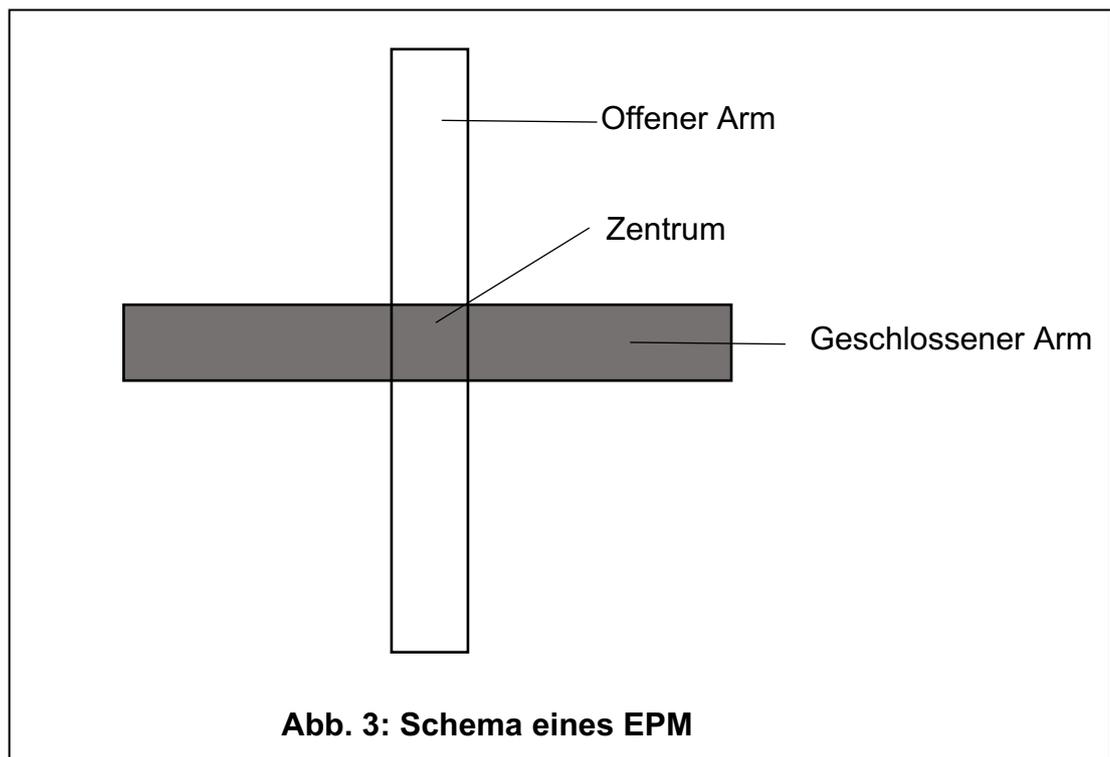
## Open Field

Ein Verhaltenstest, der zur Erfassung des Angstlevels der Maus diente, ist der Open Field Test. Hierzu wurde die Maus in das Zentrum einer runden Arena gesetzt, die virtuell in die Zonen Zentrum, Grenzbereich und Randbereich eingeteilt wurde. Die Maus wurde hierbei für sieben Minuten gefilmt und dieser Film dann analysiert (EthoVision®, Noldus). Die Videotracking-Software ist in der Lage, Verhalten, Bewegungen und die Aktivität des Versuchstieres zu analysieren. Im speziellen Fall des Open Field analysierte sie zum einen die gesamte zurückgelegte Strecke, die Zeit, die die Maus im Zentrum der Arena, die Zeit im Grenzbereich, sowie die Zeit, die sie im äußeren Randbereich verbrachte. Die Maße der Arena betragen insgesamt 120 cm im Durchmesser (water maze), das Zentrum hatte einen Durchmesser von 40 cm und der Grenz- und Randbereich hatten einen Durchmesser von 80 cm. Das Experiment diente der Erfassung der Aversion der Maus gegenüber offenen Flächen. Eine stressbelastete, ängstliche Maus wird sich möglicherweise vor allem in den Randbereichen aufhalten, da die Wände ihr subjektiv mehr Schutz bieten als das freie Feld im Zentrum.



## Elevated Plus Maze (EPM)

Dieser Test wurde mit einer plusförmigen Arena durchgeführt, die aus zwei zur Seite hin offenen Armen bestand und zwei zur Seite hin geschlossenen Armen. Die Arme besaßen eine Länge von 30 cm. Das Zentrum war quadratisch mit den Maßen 5 cm x 5 cm. Die Maus wurde zu Beginn des Experiments in die Mitte der Arena gesetzt. Über dem Versuchsansatz befand sich eine Kamera, die den Weg der Maus aufzeichnete und als Grundlage für die Analyse diente (EthoVision®, Noldus).



Es war darauf zu achten, dass der Test mit einem Gestell durchgeführt wurde, dessen Grundfarbe weiß ist, da das Programm einen möglichst hohen Kontrast benötigt und die Mäuse ein dunkles Fell besitzen. Das Experiment sollte jedes Mal mit der gleichen Lichtintensität durchgeführt werden (70 Lux). Zum Zeitpunkt der Testdurchführung sollte im Raum absolute Stille herrschen und der Experimenteur sollte den Raum verlassen. Die Zeit (sec.), in der sich die Maus entweder in einem der geschlossenen Arme, einem der offenen Arme oder im Zentrum der Arena befand, wurde gemessen. Des Weiteren wurde die Frequenz der Eintritte in die verschiedenen Zonen und die gesamte zurückgelegte Strecke gemessen. Die Untersuchungszeit betrug fünf Minuten.

## Gewichtsbestimmung

Kurz vor der Fraktur und drei Wochen danach – nachdem der Gips abgenommen wurde – musste das Gewicht der Maus erfasst werden. Hierzu wurde eine Waage des Herstellers Sartorius verwendet.

**Tab. 5 Durchschnittliches Gewicht der Versuchstiere**

	<b>Gewicht vor Fraktur (g)</b>	<b>Gewicht nach Fraktur (g)</b>
<b>Männchen</b>	29,35	25,35
<b>Weibchen</b>	22,11	20,97

## Frakturdurchführung

Das Frakturmodell war an Versuchen zu CRPS orientiert, die an Ratten und Mäusen in der Vergangenheit schon durchgeführt wurden (Wei et al., 2016, Guo et al., 2012). Zunächst wurde das Versuchstier mit Isofluran, einem Inhalationsanästhetikum, narkotisiert. Über einen Verdampfer (Vapor 19,3®, Dräger) wurde das Gas mit reinem Sauerstoff gemischt und eine Konzentration von 1,5-2,5 % angestrebt. Nach circa 2 Minuten wurde die Narkosetiefe mit dem Zwischenzehenreflex geprüft. Wenn der Reflex nicht mehr ausgelöst werden konnte, wurde die Narkosetiefe als ausreichend befunden und es konnte mit der Fraktur begonnen werden. Die Maus wurde bei Narkoseeinleitung auf dem Bauch gelagert. Zunächst wurde ein etwa 30 cm langes Leukoplast zusammengefaltet, sodass es nicht am Fell der Maus festklebte. Dieses wurde zwei- bis dreimal um den Bauch oberhalb der Hinterläufe geschlungen, stramm genug, um nicht von der Maus abgestreift werden zu können, jedoch nicht zu fest, um der Maus genug Bewegungs- und Atmungsfreiheit zu lassen. Anschließend wurde das Band noch einmal um die Tibia geschlungen und zuletzt am Bauch fixiert. Dieser Schritt war nötig um den Gips später besser befestigen zu können und um der Maus ein Polster zu schaffen, um Verletzungen durch den Gips zu vermeiden.

Nun wurde die Maus auf den Rücken gedreht. Mit einem Stück Watte wurde die rechte Tibia gepolstert, anschließend noch einmal der Zwischenzehenreflex geprüft, um sicherzustellen, dass die Narkosetiefe noch ausreichte. Mit einer Klemme wurde die mit Watte gepolsterte rechte Tibia gefasst, gleichzeitig mit Daumen und Zeigefinger der anderen Hand an Sprunggelenk und Hüfte fixiert und die Klemme dann um circa 45° zur Seite geneigt bis die Tibia spürbar frakturierte.

Nun wurde ein etwa 30 cm langes Stück Cast Tape in der Mitte halbiert, um es zu verschmälern. Anschließend wurde noch ein 1 cm langes schmales Stück des Cast Tapes abgeschnitten. Die eine Hälfte des 30 cm langen Tapes wurde der Maus um den Bauch geschlungen und an dem zuvor befestigten Leukoplast fixiert. Das 1 cm lange Stück wurde verwendet, um der Maus den Vorderfuß in leichter Flexionsstellung zu fixieren. Zuletzt wurde das zweite Stück des Tapes um die Tibia gewickelt und oberhalb der Hüfte fixiert. Der Gips wurde an der Tibia möglichst locker gewickelt, um ein Kompartmentsyndrom zu verhindern. Der Vorderfuß der Maus wurde hierbei freigelassen. Um den Komfort der Maus zu erhöhen, wurde im Winkel zwischen Femur und Flanke der Gips ein wenig eingeschnitten, sodass die Maus mehr Bewegungsfreiheit hatte.

Vor Ende der Narkose wurden Medikamente subkutan injiziert. Zunächst ein Opioid (Buprenorphin 0,05 µg/kg KG), anschließend isotonische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl), um die Maus in der Zeit nach der Operation ausreichend mit Flüssigkeit zu versorgen und zuletzt ein Antibiotikum aus der Klasse der Gyrasehemmer (Enrofloxacin (Baytril®) 5 µg/kg KG), um etwaige Infektionen zu umgehen.

Von dem Analgetikum und der Kochsalzlösung wurden jeweils 0,5 ml, von dem Antibiotikum 1 ml in die Nackenfalte injiziert.

Die Isofluranzufuhr wurde abgestellt und die Maus zum Erwachen in ihren Käfig gesetzt und beobachtet bis sie wieder zu sich kam. Sämtliche Hindernisse (wie etwa Versteckmöglichkeiten) wurden aus dem Käfig entfernt, damit die Maus sich besser bewegen konnte.

Sowohl nach 12 als auch nach 24 Stunden wurde der Zustand der Maus erneut kontrolliert und das Analgetikum und die Kochsalzlösung wurden nochmals in der gleichen Dosierung nachgespritzt.

Der Gips wurde für 3 Wochen belassen und anschließend – wieder in Narkose – abgenommen. Während dieser 3 Wochen wurde 2-3-mal pro Woche kontrolliert, ob der Gips noch festsaß und die Maus bezüglich ihres Gesundheitszustandes untersucht.

Zur Entfernung des Gipses wurde mit einer Schere vorsichtig zunächst das Bauchteil des Gipses aufgeschnitten und abgenommen. In der Regel konnte der Gips am Bein der Maus leicht abgezogen werden. War dies nicht der Fall, wurde der Gips sehr vorsichtig an der Seite aufgeschnitten, um die Maus hierbei nicht zu verletzen. Die Maus wurde anschließend wieder in ihren Käfig gesetzt und der Gesundheitszustand beobachtet.

Die Temperatur und das Ödem wurden nach dem Entfernen des Gipses gemessen, während die anderen Verhaltenstests erst nach ein bis zwei Tagen durchgeführt wurden, um dem eventuell verfälschenden Effekt der zuvor stattgehabten Narkose entgegen zu wirken.

### 3.3. Statistische Methoden

Die Daten, die während der Versuchsdurchführung erhoben wurden, wurden zunächst in Excel Tabellen überführt (Microsoft Office Excel 2016 für Mac). Es wurden einfache Berechnungen wie etwa die Ermittlung von Differenzen durchgeführt.

Zur weiteren Datenauswertung und der graphischen Darstellung wurden alle Datensätze in das Statistikprogramm SPSS (IBM® SPSS® Statistics Version 23) importiert. Für die durchgeführten Tests wurde zunächst ein Signifikanzniveau von 5 % ( $\alpha = 0,05$ ) festgelegt.

Neben der deskriptiven Datenbeschreibung durch Mittelwerte, Minima und Maxima, wurden alle stetigen Variablen zunächst mithilfe des Shapiro-Wilk Tests auf Normalverteilung geprüft. Bei  $p > 0,05$  wurde die Nullhypothese beibehalten, das heißt, die Daten wurden als normalverteilt betrachtet.

Anschließend wurde mithilfe des Levene-Tests die Varianzhomogenität getestet, welcher in SPSS® Statistics Teil der einfaktoriellen Varianzanalyse ist. Bei  $p > 0,05$  wurde die Nullhypothese beibehalten, die Varianzhomogenität wurde angenommen.

Im Falle einer Normalverteilung wurde anschließend untersucht, ob zwischen zwei Gruppen ein statistisch signifikanter Unterschied besteht. Hierzu wurde der t-Test zum Vergleich der Mittelwerte bei nicht-verbundenen Stichproben durchgeführt. Der p-Wert

zur Definition der statistischen Signifikanz (alpha-Level) betrug hier ebenfalls 0,05 (5 %-Signifikanzniveau).

Wurden bei normalverteilten Daten mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen, wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem post-hoc Test durchgeführt.

Bei fehlender Varianzhomogenität wurde eine Welch-ANOVA und ein Games-Howell post-hoc Test durchgeführt.

Für die nicht-normalverteilten Daten wurde der Mann-Whitney-U-Test als nicht-parametrischer Test für den Vergleich von zwei Gruppen verwendet. Waren die miteinander zu vergleichenden Gruppen hierbei  $n > 6$  wurde zur Auswertung die asymptotische Signifikanz verwendet. Waren die Gruppengrößen kleiner, wurde die exakte Signifikanz verwendet.

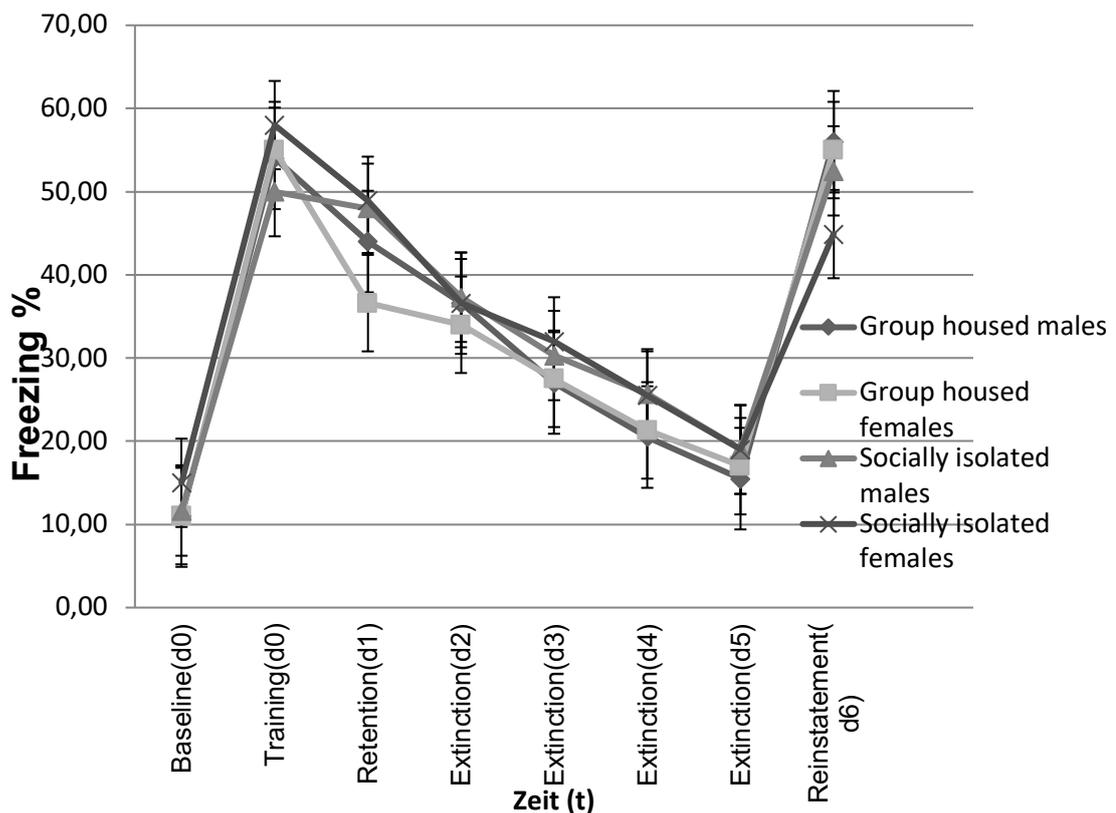
Die graphische Veranschaulichung der Ergebnisse und der Gruppenunterschiede wurde zum größten Teil mit Balkendiagrammen umgesetzt. Vereinzelt erwiesen sich andere Diagrammtypen wie etwa ein Torten- oder Punktdiagramm als geeigneter. Die angezeigten Fehlerbalken in den Balkendiagrammen zeigen stets  $\pm 1$  SE (Standardfehler).

Die Darstellung der nicht normalverteilten Daten erfolgte mithilfe von Boxplots.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Fear Conditioning und Extinktion

Die Angstkonditionierung wurde bei vier verschiedenen Gruppen durchgeführt. Es wurden jeweils 20 Männchen und Weibchen verwendet von denen wiederum jeweils 10 entweder sozial isoliert waren oder in der Gruppe lebten. Alle Gruppen zeigten eine ähnliche Extinktion bis unter 20 % (Abb. 4). Die Reaktion auf die Angstkonditionierung unterschied sich nicht signifikant zwischen Männchen und Weibchen. Ebenso wenig führte die Art der Haltung zu signifikanten Unterschieden in der Extinktion. Daher entschieden wir uns, die Geschlechter und die Art der Haltung im weiteren Verlauf zu poolen.



**Abb. 4: Fear Conditioning und Extinktion**

Angstreaktion bei Fear Conditioning in vier verschiedenen Gruppen (Group housed males n=10, Group housed females n=10, Socially isolated males n=10, Socially isolated females n=10). „Freezing“ von der Baseline (d0) über Training (d1) und Extinktion bis unter 20 % über fünf Tage (d1-d5). Am sechsten Tag erneute Stromstoßapplikation mit „Reminder“ (Reinstatement d6) mit erneuter Zunahme des „Freezing“. Aufgrund des Pain sensitivity Tests (Abb. 1) wurde das Training der Männchen wurde mit 0,4 mA, das der Weibchen mit 0,3 mA durchgeführt. Der „Reminder“ erfolgte mit 0,3mA bei den Männchen und mit 0,2 mA bei den Weibchen.

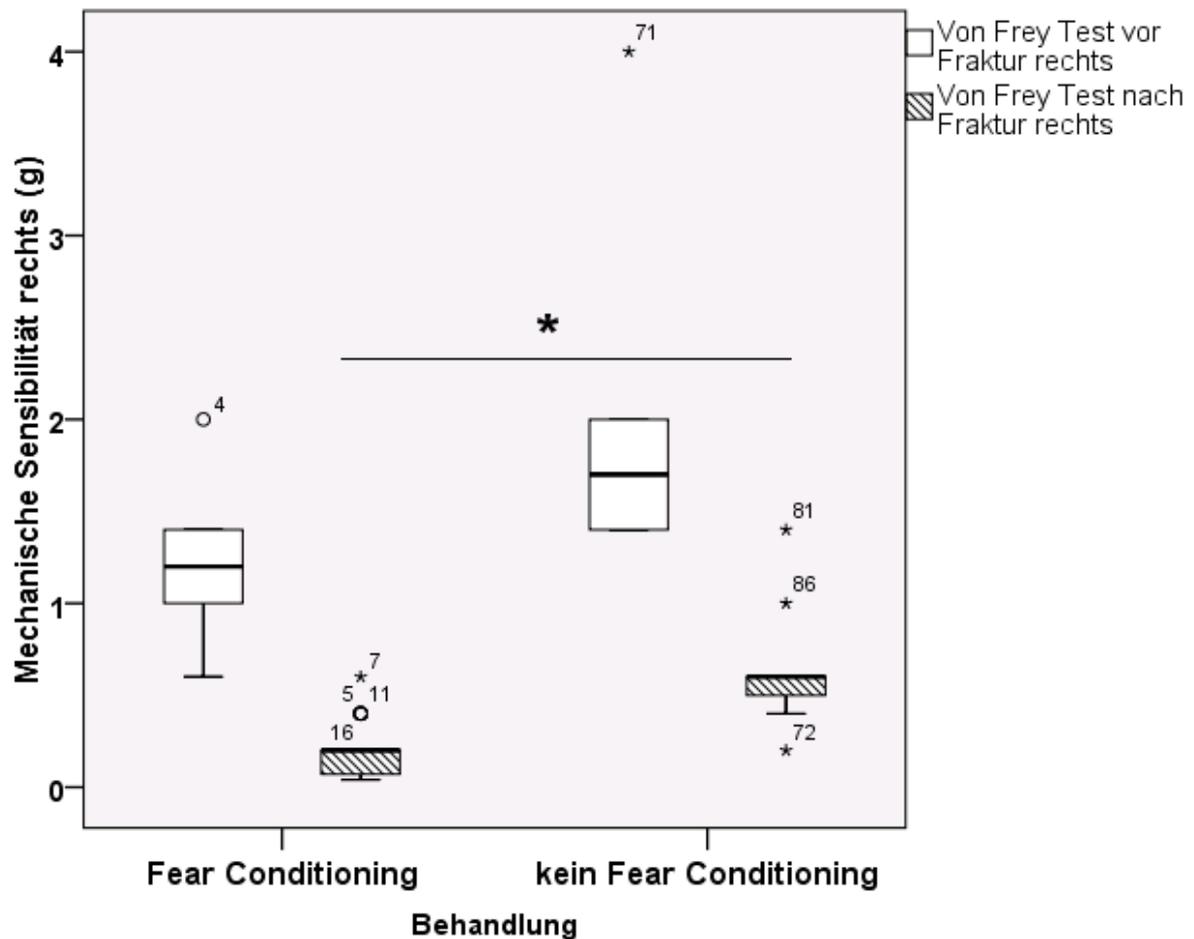
#### 4.2. Sensibilitätstests in Bezug auf Fear Conditioning

Um die Auswirkungen des Fear Conditionings auf die Verhaltenstests zu ermitteln, werden im Folgenden zwischen Versuchsgruppen mit vorherigem Fear Conditioning und solchen verglichen, die kein Fear Conditioning erhalten haben (naiv).

Im Von Frey Test zur Ermittlung der mechanischen Allodynie (Abb. 5) wird wie zu erwarten deutlich, dass die Fraktur zu einer deutlicheren mechanischen Allodynie führt, sowohl bei den Tieren mit Fear Conditioning (n=38), als auch bei den Tieren ohne Fear Conditioning (n=12). Die Gruppe mit Fear Conditioning ist nach Fraktur um 86 % empfindlicher, während die Gruppe ohne Fear Conditioning lediglich um etwa 65 % empfindlicher ist. Nach Testung mit dem Mann-Whitney-U-Test liegt ein signifikanter Unterschied vor.

Weiterhin zeigt sich, dass nach der Fraktur das betroffene Bein weniger belastet wird. Dies ist nicht nur nach Entfernung des Gipses drei Wochen nach der Fraktur zu beobachten, sondern hält auch sechs Wochen nach Fraktur weiter an. Im Unweighting-Experiment (Abb. 6) zeigt sich, dass die Gruppe mit Fear Conditioning (n=34) sowohl drei als auch sechs Wochen nach Fraktur eine höhere Belastungsdifferenz aufweist, als die Gruppe ohne Fear Conditioning (n=12). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Es fällt zudem auf, dass die Gruppe mit Fear Conditioning nach sechs Wochen eine 27 % geringere Belastungsdifferenz im Vergleich zum Zeitpunkt drei Wochen nach Fraktur aufweist, die Gruppe ohne Fear Conditioning hingegen eine Verringerung der Belastungsdifferenz um 64 % zeigt.

## Von Frey Test für mechanische Sensibilität



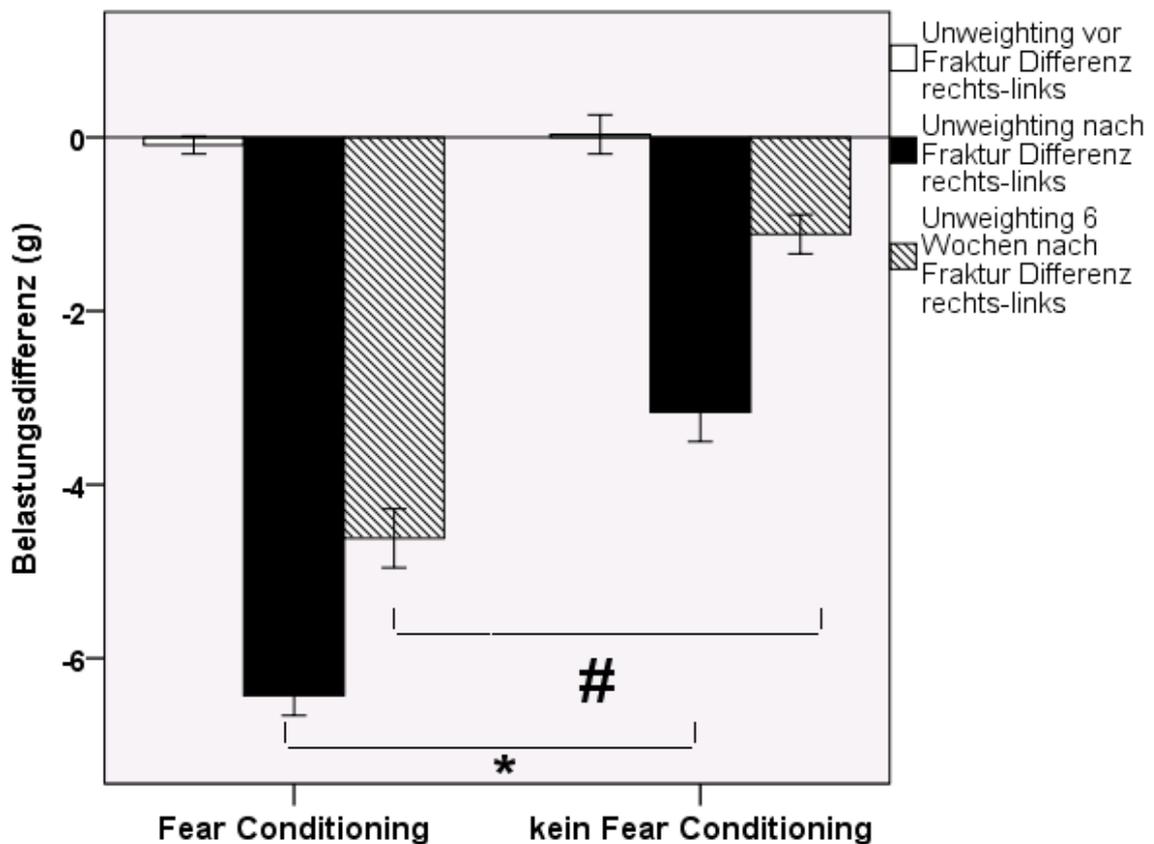
**Abb. 5: Von Frey Test für mechanische Sensibilität**

Messung der mechanischen Sensibilität der rechten Pfote mit Von Frey Haaren jeweils vor, sowie drei Wochen nach Tibiafraktur. Verglichen wird eine Gruppe mit Fear Conditioning (n=38) mit einer Gruppe ohne Fear Conditioning (n=12). Nach Fraktur ist die mechanische Sensibilität bei der angstkonditionierten Gruppe signifikant stärker ausgeprägt.

Die Daten zur mechanischen Sensibilität sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests nicht normalverteilt, weshalb der Mann-Whitney-U-Test verwendet wurde.

\*p = 0,000 für mechanische Sensibilität rechts nach Fraktur bei Fear Conditioning vs. kein Fear Conditioning

## Unweighting



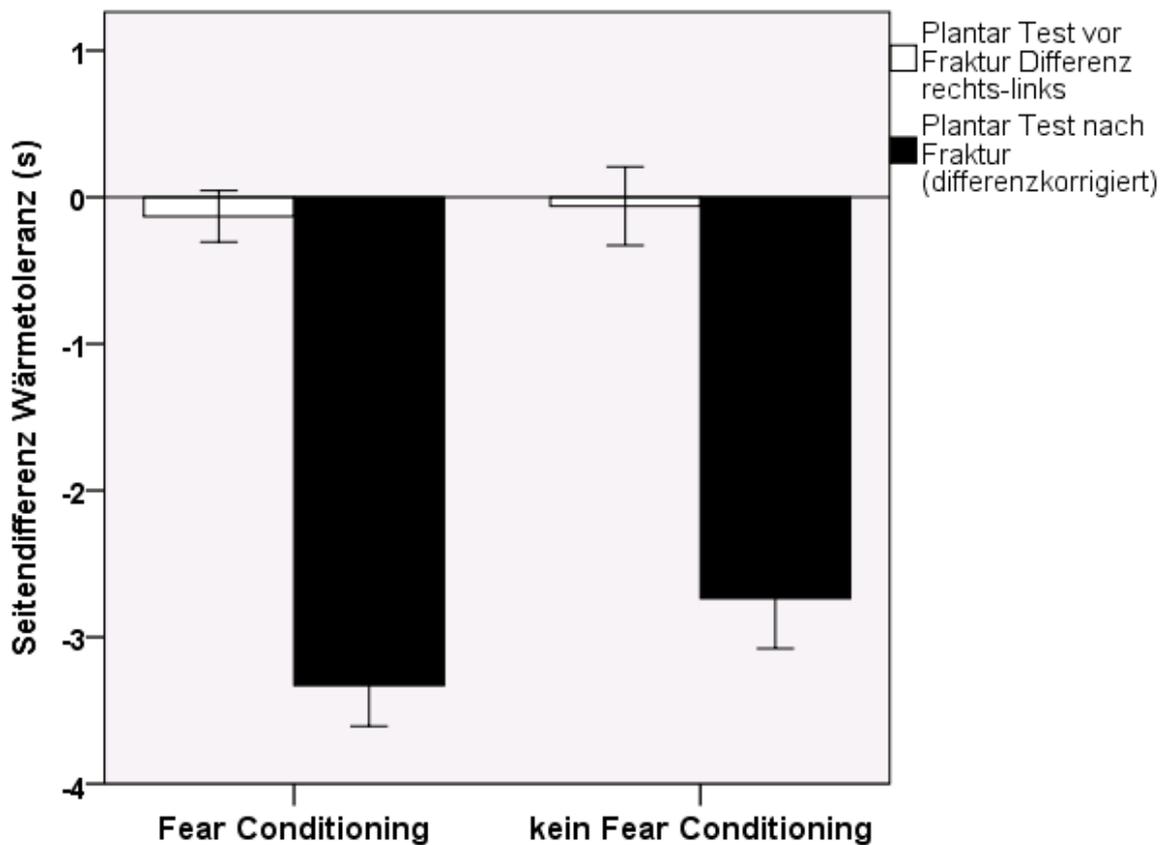
### Abb. 6: Unweighting und Belastungsdifferenz

Belastungsdifferenz (rechtes Bein – linkes Bein) in Gramm zu drei verschiedenen Zeitpunkten (vor Fraktur, 3 Wochen nach Fraktur, 6 Wochen nach Fraktur). Eine Gruppe erhielt ein Fear Conditioning (n=34) vor der Frakturdurchführung, bei der anderen wurde kein Fear Conditioning durchgeführt (n=12). Die Daten ab dem Zeitpunkt nach Fraktur wurden durch die Vordifferenz korrigiert. Nach drei und nach 6 Wochen belasteten die angstkonditionierten Tiere das rechte Bein signifikant weniger. Die Daten der Belastungsdifferenz sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests als normalverteilt anzusehen.

\*p = 0,000 für Fear Conditioning nach Fraktur vs. kein Fear Conditioning nach Fraktur  
 #p = 0,000 für Fear Conditioning 6 Wochen nach Fraktur vs. kein Fear Conditioning 6 Wochen nach Fraktur

Bei der Testung der Wärmeempfindlichkeit (Abb. 7) zeigt sich ebenfalls, dass nach der Fraktur das betroffene Bein im Vergleich zum gesunden deutlich kürzer auf der sich erwärmenden Platte belassen wurde. Die Gruppe, die vorher ein Fear Conditioning erhalten hatte (n=36) ist hierbei um 18 % empfindlicher als die Gruppe, die kein Fear Conditioning erhalten hatte (n=12). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant, jedoch ist eine Tendenz sichtbar.

### Plantar Test (Hot Plate)



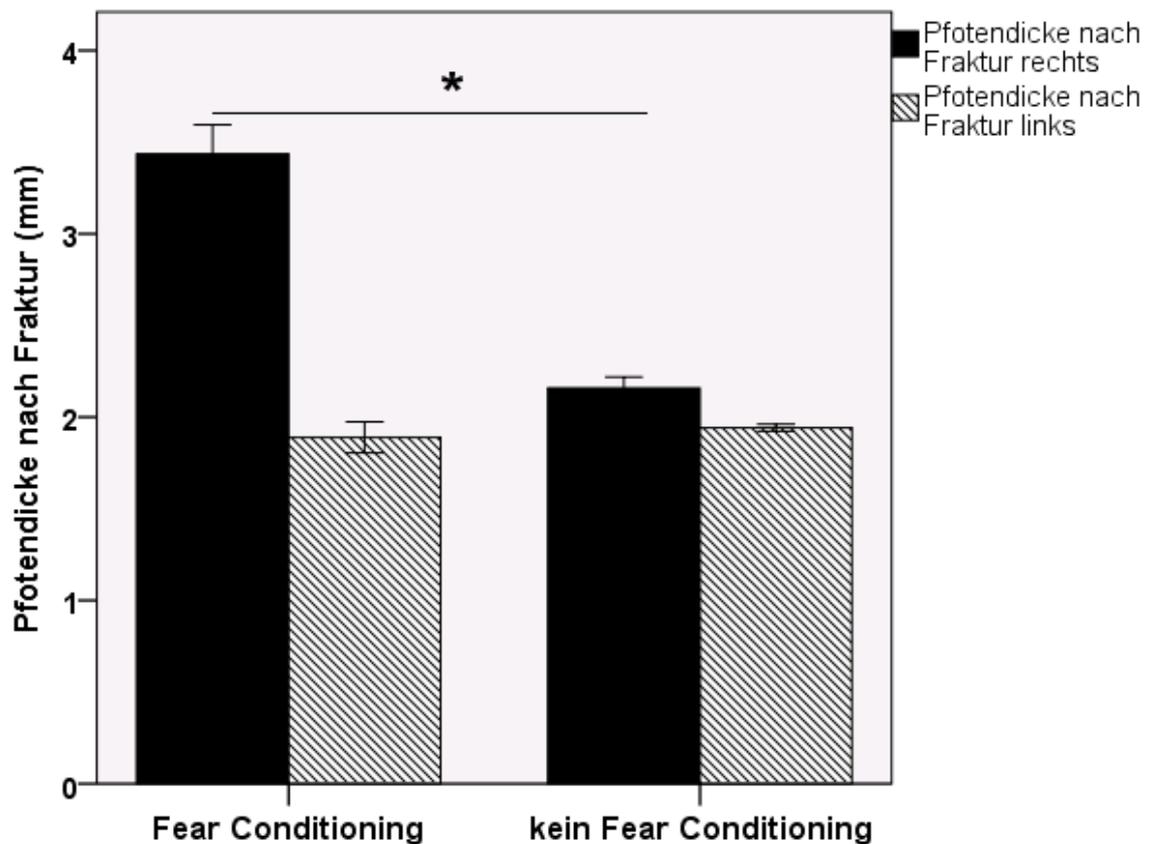
### Abb. 7: Plantar Test (Hot Plate)

Seitendifferenz der Wärmetoleranz (rechtes Bein – linkes Bein) in Sekunden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten (vor Fraktur und 3 Wochen nach Fraktur). Eine Gruppe erhielt ein Fear conditioning (n=36) vor der Frakturdurchführung, bei der anderen Gruppe wurde kein Fear conditioning durchgeführt (n=12). Die Daten zum Zeitpunkt nach Fraktur wurden durch die Vordifferenz korrigiert. Die angstkonditionierte Gruppe zeigt eine größere Seitendifferenz.

Die Daten der Seitendifferenz der Wärmetoleranz sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests als normalverteilt anzusehen.

$p = 0,262$  für Seitendifferenz Wärmetoleranz bei Fear Conditioning vs. kein Fear Conditioning

### 4.3. Messung des Ödems



**Abb. 8: Pfotendicke rechts und links nach Fraktur**

Ipsi- und kontralateraler Pfotendurchmesser in Millimetern nach Tibiafraktur. Eine Gruppe erhielt ein Fear Conditioning (n=43) vor der Frakturdurchführung, in der anderen Gruppe wurde kein Fear Conditioning durchgeführt (n=12). Die angstkonditionierten Tiere weisen im Vergleich eine stärkere Schwellung auf.

Die Daten der Pfotendicke nach Fraktur sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests als normalverteilt anzusehen.

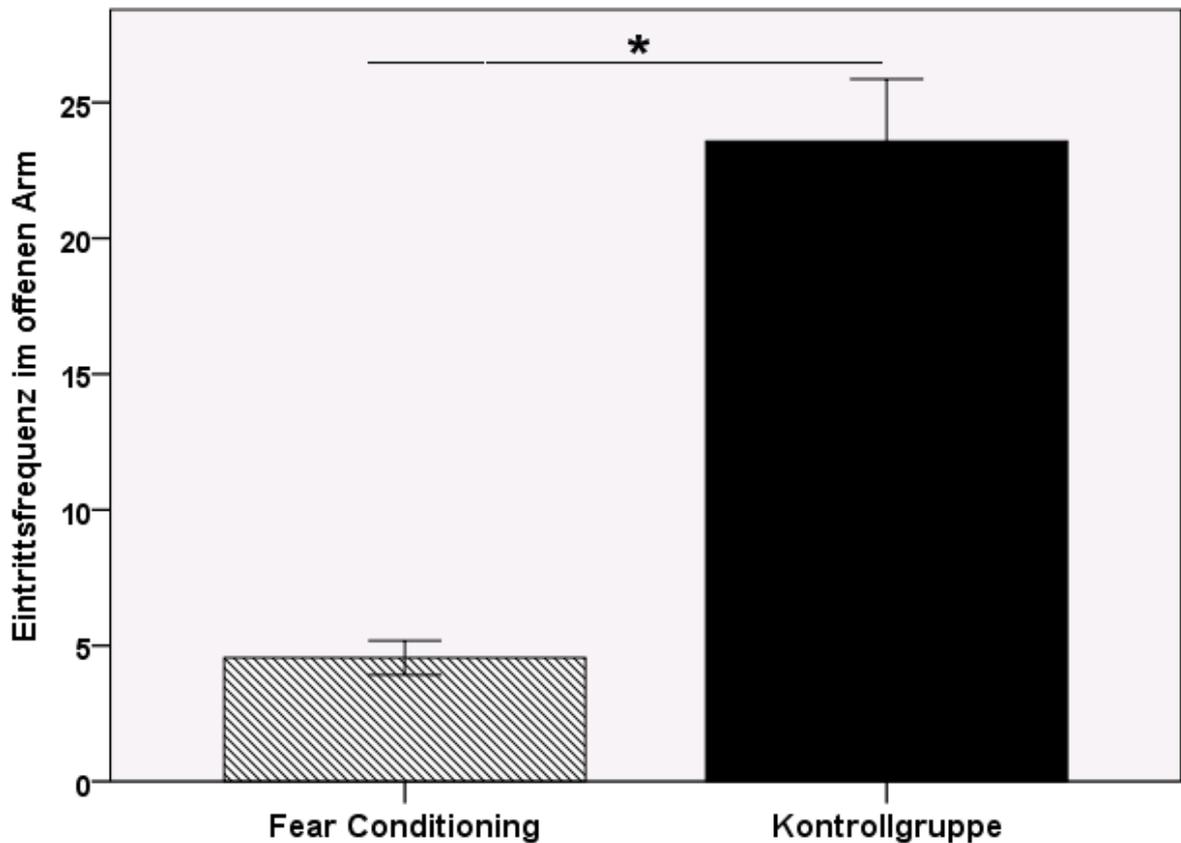
$p = 0,000$  für Pfotendicke rechts bei Fear Conditioning vs. kein Fear Conditioning

$p = 0,747$  für Pfotendicke links bei Fear Conditioning vs. kein Fear Conditioning

Es wurde ebenfalls getestet wie sich der Pfortendurchmesser durch die Fraktur verändert. Der anterior-posterior Durchmesser wurde vor und nach der Fraktur ermittelt. Die Messungen fanden zu zwei verschiedenen Zeitpunkten statt, sowohl vor als auch nach der Fraktur. Die Pfortendicke rechts und links ist in Abbildung 8 abgebildet. In der Gruppe, die ein Fear Conditioning (n=49) erhalten hatte ist der Durchmesser nach Fraktur 37 % größer als in der Gruppe ohne Fear Conditioning (n=12). Dieser Unterschied ist statistisch signifikant. Auf der linken Seite besteht kein signifikanter Unterschied. Der Unterschied zwischen links und rechts ist bei den Mäusen mit Fear Conditioning wesentlich deutlicher ausgeprägt und beträgt etwa 45 %, während es bei der Gruppe ohne Fear Conditioning nur etwa 10 % sind.

#### 4.4. Verhaltenstests in Bezug auf Ängstlichkeit

##### Elevated Plus Maze



##### **Abb. 9: Elevated Plus Maze Eintrittsfrequenz**

Häufigkeit der Eintritte in den offenen Arm des plusförmigen Labyrinths bei zwei verschiedenen Gruppen: Eine Gruppe erhielt ein Fear Conditioning (n=18), die Kontrollgruppe nur einen leichteren einmaligen Stromstoß („Reminder“) (n=26). Die angstkonditionierte Gruppe weist eine signifikant niedrigere Eintrittsfrequenz auf. Die Daten der Eintrittsfrequenz sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests als normalverteilt anzusehen.

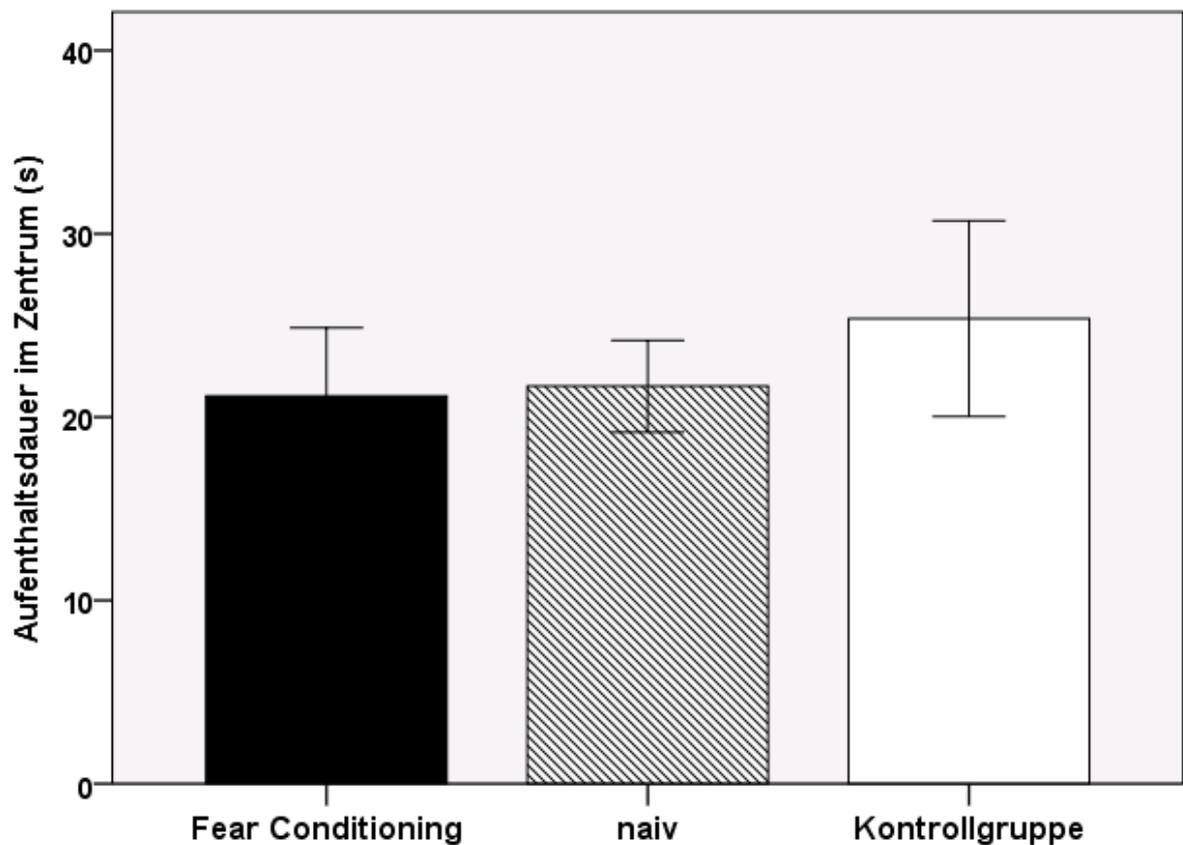
\*p = 0,000 für Fear Conditioning vs. Kontrollgruppe

Im Verhaltenstest des Elevated Plus Maze wurde die Eintrittsfrequenz in den offenen Arm des plusförmigen Labyrinths ermittelt (Abb. 9). Es wurden zwei verschiedene Gruppen miteinander verglichen: Eine Gruppe erhielt ein Fear Conditioning vor der Testung (n=18), eine andere nur einen einmaligen leichteren Stromstoß (Männchen 0,3 mA, Weibchen 0,2 mA) (n=26), wodurch diese Gruppe als Kontrolle fungierte. Durch den einmaligen leichteren Stromstoß wird bei den Versuchstieren zwar nicht der Effekt eines Fear Conditionings erreicht, doch dadurch, dass die Tiere hier einem ähnlichen Versuchsablauf ausgesetzt wurden, ist diese als besser geeignete Kontrollgruppe anzusehen, da etwaige Bias durch den der Maus zugeführten Stress durch das Experiment an sich verhindert werden können.

Die Gruppe mit Fear Conditioning zeigte die niedrigere Eintrittsfrequenz. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist die Eintrittsfrequenz auf 20 % reduziert. Der Unterschied ist zu der Kontrollgruppe ohne Fear Conditioning statistisch signifikant.

Beim Open Field Test wurde die Aufenthaltsdauer im Zentrum der Plattform ermittelt (Abb. 10). Insgesamt wurden drei Gruppen miteinander verglichen: Die Kontrollgruppe wurde nach einem einmaligen „Reminder“ getestet (n=20), die zweite Gruppe war angstkonditioniert (n=18) und die dritte Gruppe wurde komplett naiv getestet (n=30). Die längste Aufenthaltsdauer zeigte die Kontrollgruppe, die einen „Reminder“ erhalten hatte mit 25 Sekunden Aufenthaltsdauer im Zentrum, die kürzeste Aufenthaltsdauer zeigte die angstkonditionierte Gruppe. Zwischen den Gruppen zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

## Open Field



### Abb. 10: Open Field Test

Aufenthaltsdauer im Zentrum der Open Field Plattform bei drei verschiedenen Gruppen. Die Kontrollgruppe erhielt nur einen einmaligen „Reminder“ (n= 20). Eine andere Gruppe erhielt ein Fear conditioning (n= 18). Die dritte wurde komplett naiv (n= 30) getestet. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Daten der Aufenthaltsdauer sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests als normalverteilt anzusehen

$p = 0,711$  für Unterschied zwischen den Gruppen

#### 4.5. Sensibilitätstests in Bezug auf Temperatortypen

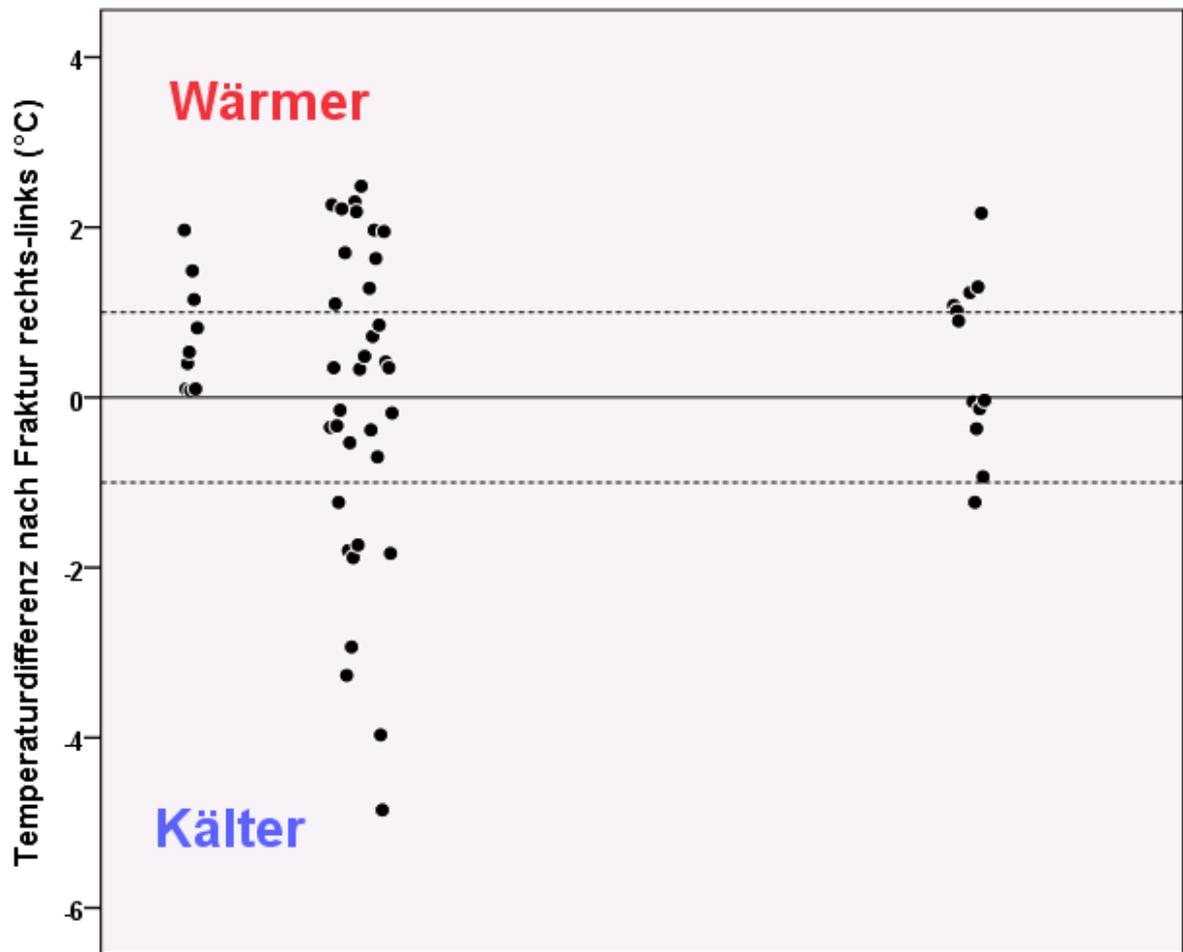
Neben dem Einfluss des Fear Conditionings auf die Verhaltenstests, soll auch die Temperatur in der betroffenen Extremität untersucht werden. Beim CRPS des Menschen werden warme und kalte Subtypen beschrieben.

In Abbildung 11 ist eine Übersicht der Temperaturentwicklung an der betroffenen Extremität dargestellt. Nach Bildung der Seitendifferenz (rechte Pfote – linke Pfote) fällt auf, dass viele Tiere wärmer werden, obwohl auch einige dabei sind, die entweder keine Temperaturentwicklung zeigen, oder aber kälter werden. Unterteilt wurden die Tiere in Kältetypen ( $< -1^{\circ}\text{C}$  Differenz), Wärmetyphen ( $> +1^{\circ}\text{C}$  Differenz) und Indifferenztypen (Differenz  $< 1$  und  $> (-1)$ ). Bei der Berechnung wurde die Differenz zwischen rechts und links verwendet und nicht die des gleichen Beins vor und nach der Fraktur, da nur auf diese Weise sichergestellt werden konnte, dass die Messung jeweils am gleichen Tag erfolgt war.

Insgesamt sind 20 % dem kälter werdenden Subtyp und 32,7 % dem wärmer werdenden Subtyp zuzuordnen. Die restlichen 47,3 % werden zum Indifferenztyp gezählt (Abb. 12).

Von den kälter werdenden Tieren sind 45 % Weibchen und 55 % Männchen. Bei den wärmer werdenden sind 67 % Männchen und 33 % Weibchen. Diese Verteilung zugunsten der Männchen ist jedoch auch auf einen insgesamt leichten Überhang an Männchen im Temperaturtestkollektiv zurückzuführen. Von den 55 Tieren waren 56 % Männchen und 44 % Weibchen (Abb. 12 A).

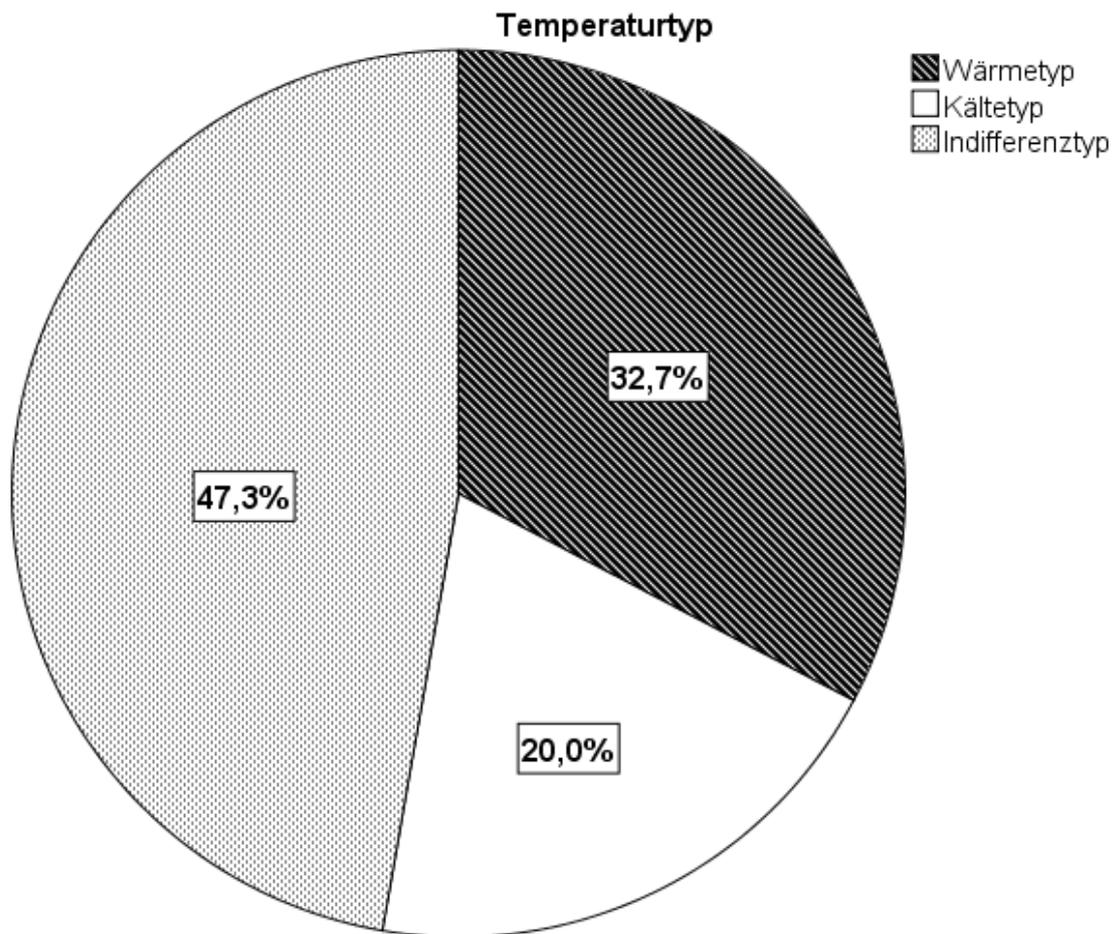
## Temperaturentwicklung nach Fraktur



**Abb. 11: Übersicht der Temperaturentwicklung der rechten Pfote**

Messung der Pfortemperatur ipsi- und kontralateral nach Tibiafraktur (n=55). Es wurde die Temperaturdifferenz (rechts – links) gebildet. 20 % der untersuchten Tiere wurden kälter (n=11), 32,7 % wärmer (n=18) und 47,3 % wurden dem Indifferenztyp zugeordnet (n=26). Dieser wurde festgelegt, wenn die Temperaturdifferenz kleiner als 1 °C war.

## Übersicht zur Verteilung der Temperaturtypen im Gesamtkollektiv



**A)**

**Temperaturentwicklung rechts \* Geschlecht Kreuztabelle**

Anzahl

		Geschlecht		Gesamt
		männlich	weiblich	
Temperatur rechts	Indifferenztyp	13	13	26
	Kältotyp	6	5	11
	Wärmotyp	12	6	18
Gesamt		31	24	55

**B)**

**Temperaturentwicklung rechts \* Fear Conditioning Kreuztabelle**

Anzahl

		FC		Gesamt
		Fear Conditioning	Kein Fear Conditioning	
Temperatur rechts	Indifferenztyp	20	6	26
	Kältetyp	9	2	11
	Wärmetyt	14	4	18
Gesamt		43	12	55

**Abb. 12: Verteilung der Temperaturtypen im Gesamtkollektiv**

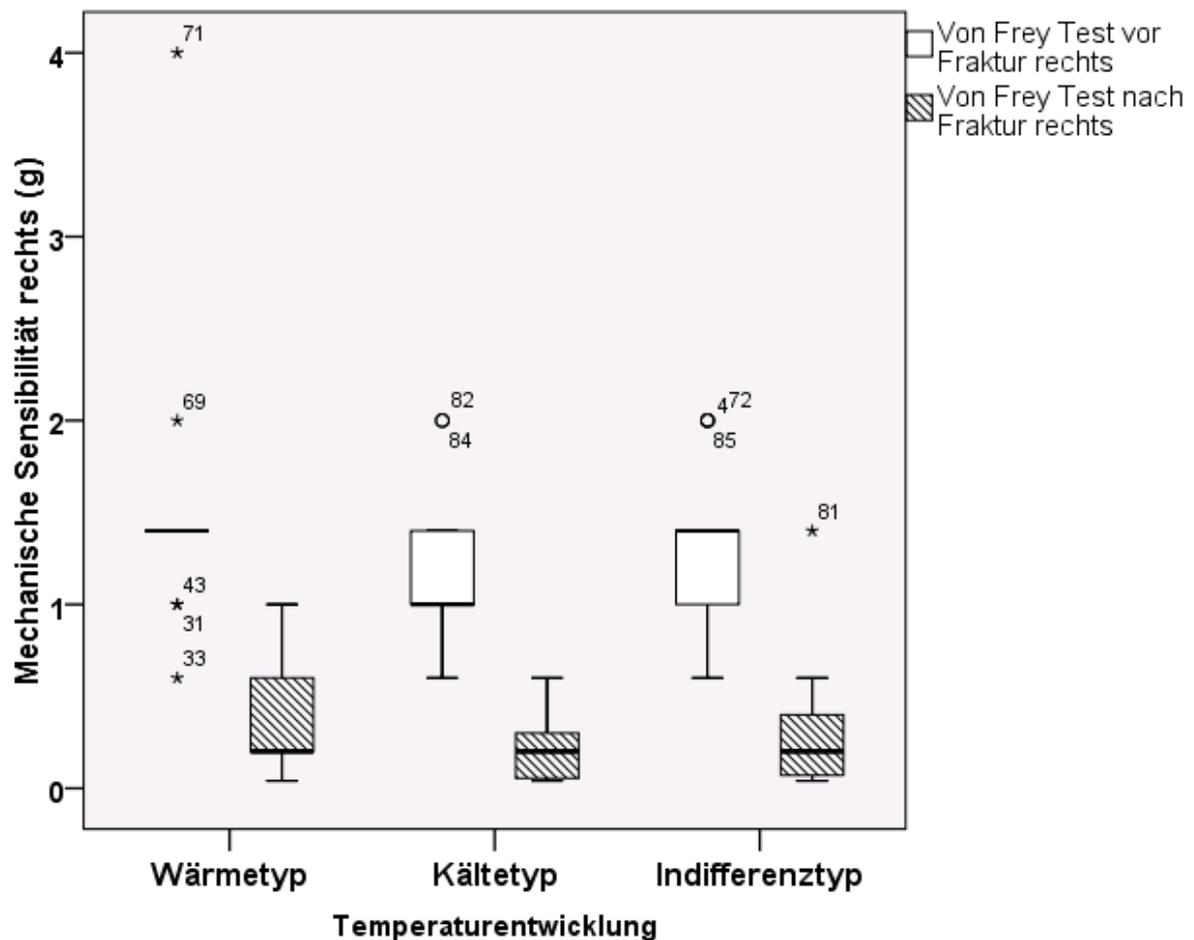
Anteil der jeweiligen Wärme,-Kälte,- und Indifferenztypen im gesamten Untersuchungskollektiv. 20 % der untersuchten Tiere wurden kälter (n=11), 32,7 % wärmer (n=18) und 47,3 % wurden dem Indifferenztyp zugeordnet (n=26). Die Kreuztabellen zeigen die jeweilige Verteilung der Temperaturtypen (Temperatur rechts) innerhalb der Geschlechter (A) beziehungsweise innerhalb des vorher durchgeführten oder nicht durchgeführten Fear Conditionings (B).

Betrachtet man den Einfluss des jeweiligen Temperaturtyps auf die Ergebnisse der Verhaltenstests, zeigt sich beim Von Frey Test (Abb. 13), dass die Fraktur in allen Temperaturtypen zu einer verstärkten mechanischen Allodynie führt.

Die Gruppen „Wärmetyt“ (n=15), „Kältetyp“ (n=11) und „Indifferenztyp“ (n=22) definieren sich durch die Temperaturentwicklung an der betroffenen Extremität nach Frakturdurchführung (Abb. 11), wobei bei den „Wärmetyten“ die Sensibilität gegenüber einem mechanischen Reiz um 75 % zunimmt und bei den „Kältetyten“ sogar um 83 %. Bei allen Gruppen wurde die mechanische Sensibilität jeweils vor, sowie drei Wochen nach Fraktur gemessen.

Es wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test durchgeführt, welcher zeigte, dass zum Zeitpunkt nach der Fraktur keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen bestanden.

## Von Frey Test für mechanische Sensibilität



**Abb. 13: Von Frey Test für mechanische Sensibilität bei Temperatortypen**

Messung der mechanischen Sensibilität der rechten Pfote mit Von Frey Haaren jeweils vor, sowie drei Wochen nach Tibiafraktur. Verglichen werden drei Gruppen: „Wärmetypp“ (n=15), „Kältetypp“ (n=11) und „Indifferenztyp“ (n=22). Es zeigen sich keine signifikanten Gruppenunterschiede.

Die Daten zur mechanischen Sensibilität sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests nicht normalverteilt. Es wurde daher der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

$p = 0,121$  für mechanische Sensibilität rechts nach Fraktur bei Wärmetypp vs. Kältetypp

$p = 0,248$  für mechanische Sensibilität rechts nach Fraktur bei Indifferenztyp vs. Kältetypp

$p = 0,472$  für mechanische Sensibilität rechts nach Fraktur bei Wärmetypp vs. Indifferenztyp

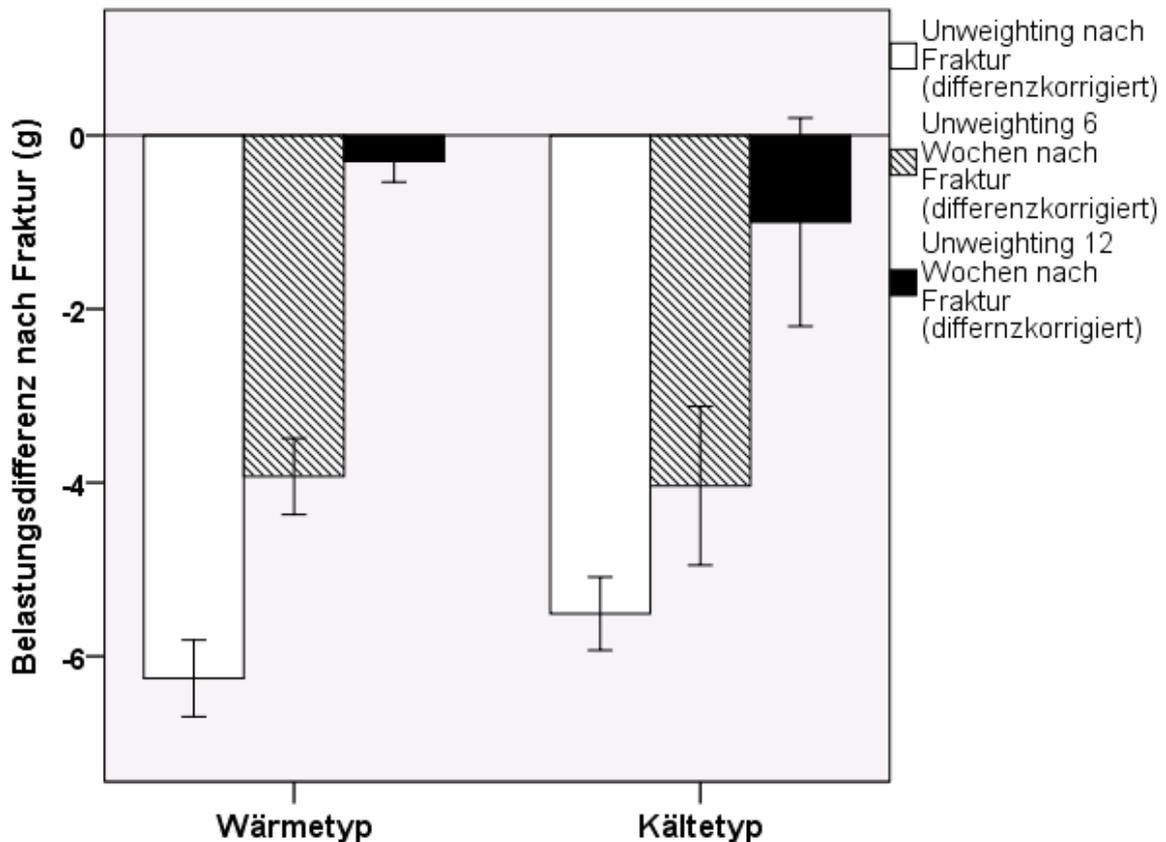
Beim Unweighting Test (Abb. 14) wird die Belastung des betroffenen Beins ins Verhältnis zum gesunden Bein gesetzt und zu zwei verschiedenen Zeitpunkten verglichen: 3 Wochen nach Fraktur, sowie 6 Wochen und 12 Wochen nach Fraktur. Hier werden die beiden Temperatortypen Wärmetyt (n= 15) und Kältetyt (n=11) miteinander verglichen. Beide Gruppen zeigten 3 Wochen nach Fraktur eine stärkere Belastungsdifferenz als 6 Wochen nach Fraktur.

Der Wärmetyt zeigt 3 Wochen nach der Fraktur zunächst eine höhere Belastungsdifferenz als der Kältetyt. Dieser Unterschied ist statistisch jedoch nicht signifikant.

Nach 6 Wochen zeigte sich jedoch eine Tendenz, dass sich der Wärmetyt besser regeneriert hat. Er weist eine um 37 % verbesserte Belastungsdifferenz auf, während der Kältetyt sich nur um 27 % verbessert hat. Zum Zeitpunkt 12 Wochen nach Fraktur war beim Wärmetyt kaum noch eine Belastungsdifferenz nachweisbar, während sie beim Kältetyt noch 1 g beträgt. Die Unterschiede sind statistisch jedoch nicht signifikant.

Weiterhin wurde im Plantar Test die Wärmeempfindlichkeit der betroffenen Extremität nach Fraktur ermittelt (Abb. 15). Hier wurde drei Wochen nach Fraktur die Seitendifferenz der Wärmetoleranz (rechtes Bein- linkes Bein) in den Gruppen Wärmetyt (n=16) und Kältetyt (n=10) verglichen. Es zeigte sich lediglich ein Unterschied von 7 % in der Seitendifferenz. Es konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.

## Unweighting



**Abb. 14: Unweighting bei Temperaturtypen**

Belastungsdifferenz (rechtes Bein – linkes Bein) in Gramm zu drei verschiedenen Zeitpunkten: 3 Wochen nach Fraktur, 6 Wochen und 12 Wochen nach Tibiafraktur. Es wurden Wärmetyt (n= 15) und Kältetyt (n=11) verglichen. Die Daten ab dem Zeitpunkt nach Fraktur wurden durch die Vordifferenz korrigiert. 3, 6 und 12 Wochen zeigt sich eine stetig abnehmende Belastungsdifferenz bei beiden Gruppen. Nach 12 Wochen ist noch deutlichere Belastungsdifferenz beim Kältetyt vorhanden.

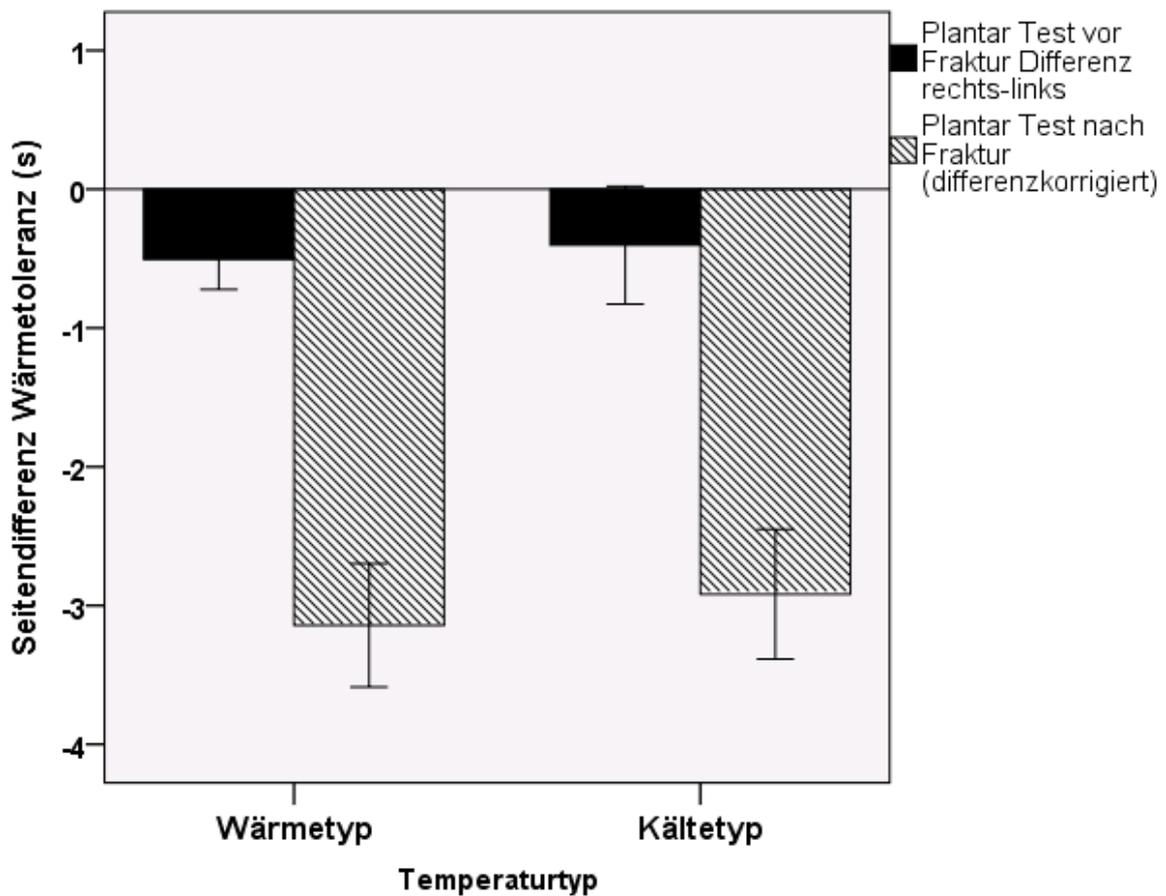
Die Daten der Belastungsdifferenz sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests als normalverteilt anzusehen.

$p = 0,584$  für Belastungsdifferenz nach Fraktur bei Wärmetyt vs. Kältetyt

$p = 0,993$  für Belastungsdifferenz 6 Wochen nach Fraktur bei Wärmetyt vs. Kältetyt

$p = 0,841$  für Belastungsdifferenz 12 Wochen nach Fraktur bei Wärmetyt vs. Kältetyt

## Plantar Test (Hot Plate)



### Abb. 15: Plantar-Test (Hot Plate) bei Temperaturtypen

Seitendifferenz der Wärmetoleranz in Sekunden (rechtes Bein – linkes Bein) drei Wochen nach Tibiafraktur in den Gruppen Wärmetypp (n=16) und Kältetypp (n=10). Die Daten zum Zeitpunkt nach Fraktur wurden durch die Vordifferenz korrigiert.

Die Daten der Seitendifferenz der Wärmetoleranz sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests als normalverteilt anzusehen.

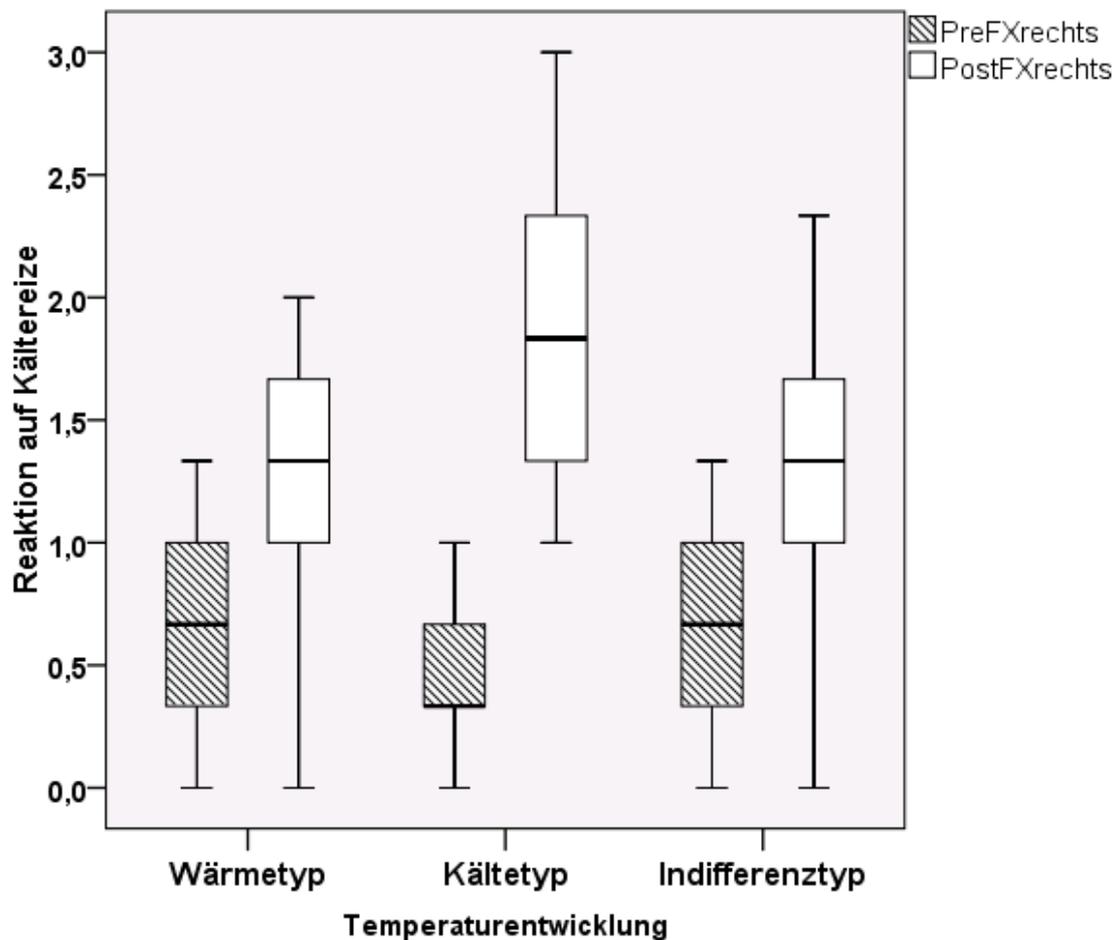
$p = 0,727$  für Seitendifferenz Wärmetoleranz vor Fraktur bei Wärmetypp vs. Kältetypp

$p = 0,732$  für Seitendifferenz Wärmetoleranz nach Fraktur bei Wärmetypp vs. Kältetypp

Zudem wurde die Reaktion auf einen Kältereiz untersucht (Abb.16).

Hier wurde drei Wochen nach der Fraktur (PostFxrechts) die Reaktion auf den Kältereiz am rechten Bein im Vergleich zum Zeitpunkt vor Fraktur(PreFxrechts) in drei verschiedenen Gruppen (Wärmetyt n=19, Kältetyt n=10, Indifferenztyp n=56) verglichen. Die Reaktion bei diesem Test wurde folgendermaßen definiert: 1= Fuß wegziehen, 2= Fuß lecken, 3= maximal Reaktion mit Vokalisierung des Schmerzes. Alle drei Gruppen zeigten eine deutliche Zunahme der Reaktion, wobei der Kältetyt hier am deutlichsten heraussticht.

### Kälteempfindlichkeit und Allodynie

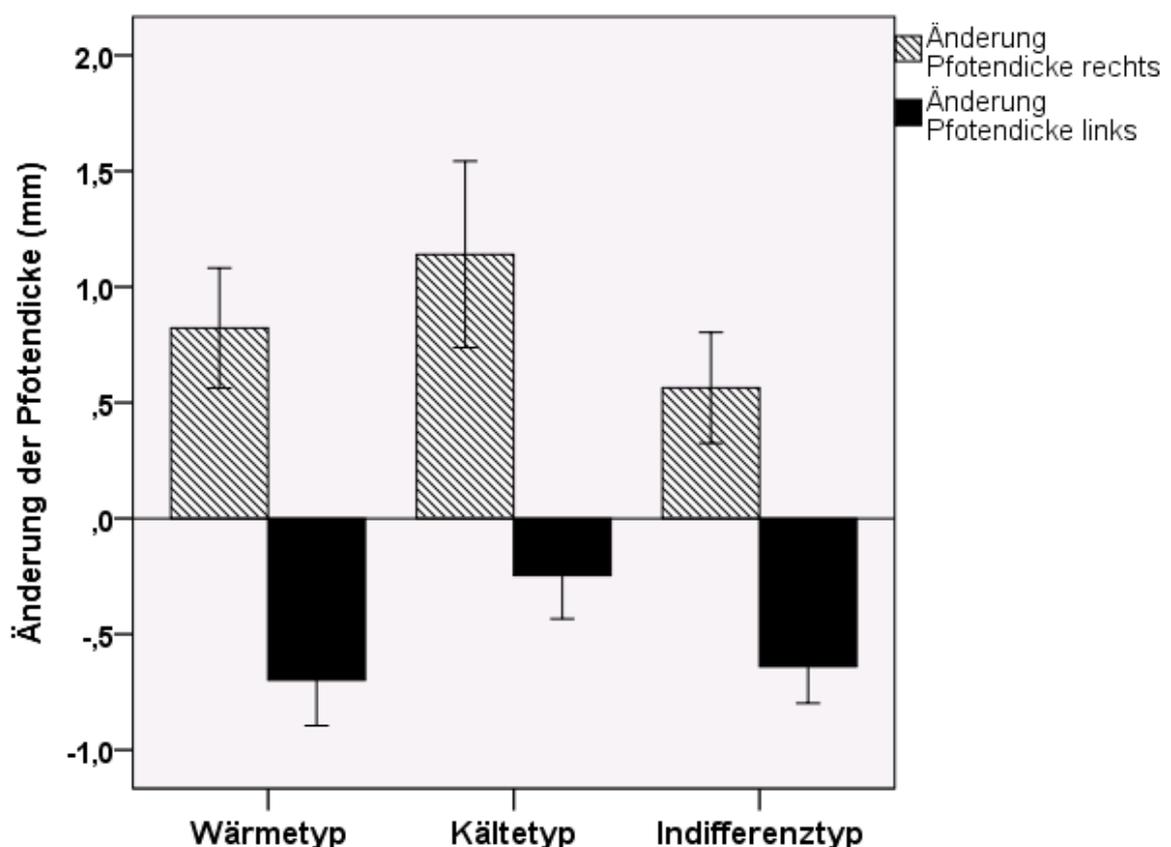


#### Abb. 16: Reaktion auf Kältereize und Allodynie

Reaktion auf einen Kältereiz (4°C kaltes Wasser) am rechten Bein nach Fraktur im Vergleich zum Zeitpunkt vor Fraktur in drei verschiedenen Gruppen (Wärmetyt n=19, Kältetyt n=10, Indifferenztyp n=56). Der Kältetyt zeigt hier die stärkste Reaktion.

In Hinblick auf die Entwicklung eines Ödems nach Fraktur (Abb. 17) wurden wieder drei Gruppen verglichen: Wärmetyt (n=16), Kältetyt (n=9) und Indifferenztetyt (n=21). Es fällt auf, dass in allen Gruppen die Pfote rechts nach Fraktur an Umfang gewann, während sie links an Umfang verlor, was in Verbindung mit dem Gewichtsverlust der Tiere nach Fraktur gebracht werden könnte (Abb. 18). In den Gruppen war die Pfortendicke nach Fraktur beim Kältetyt am höchsten. Statisch signifikante Unterschiede konnten jedoch nicht festgestellt werden.

### Ödementwicklung nach Fraktur



#### Abb. 17: Ödementwicklung nach Fraktur bei Temperaturtypen

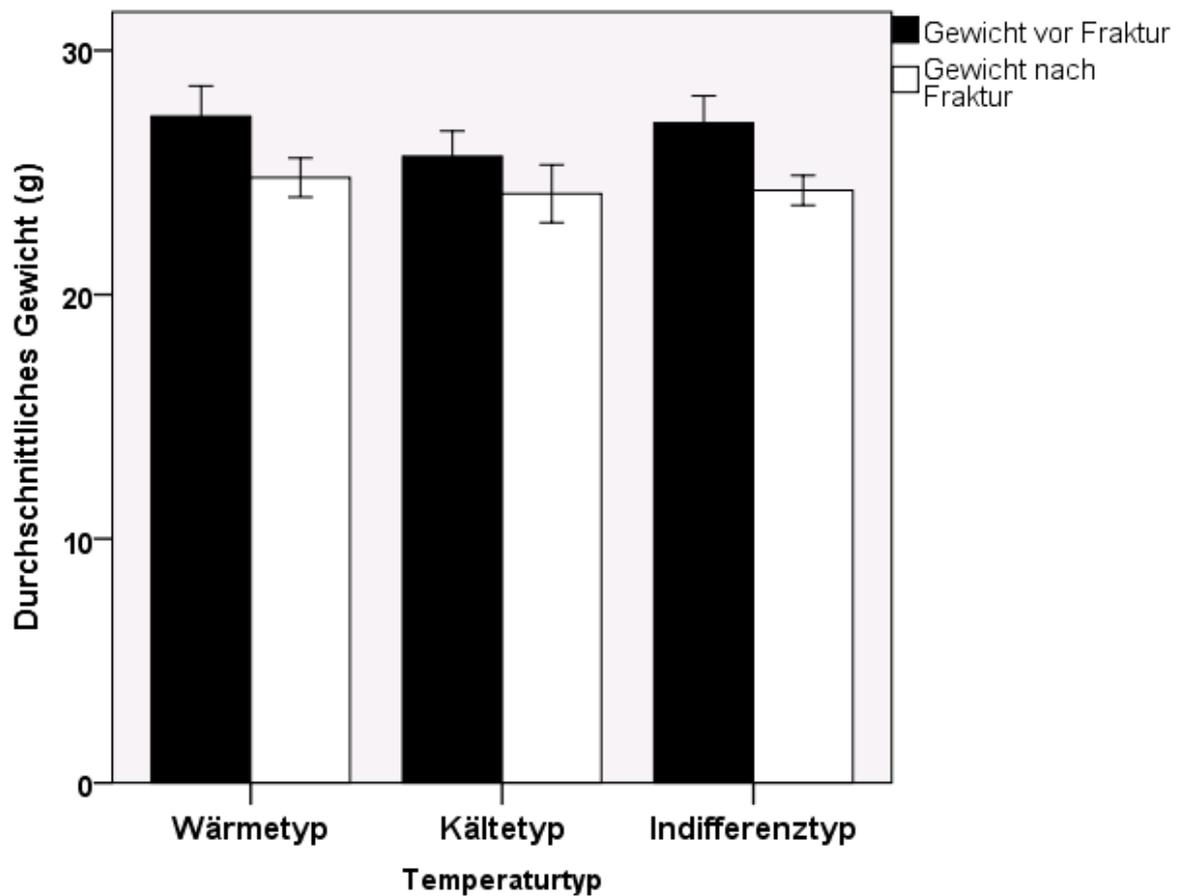
Änderung des Pfortendurchmessers ipsi- und kontralateral in Millimeter nach Tibiafraktur in 3 Gruppen: Wärmetyt (n=16), Kältetyt (n=9) und Indifferenztetyt (n=21). Alle Gruppen zeigten rechts einen erhöhten und links einen erniedrigten Durchmesser im Vergleich zum Zeitpunkt vor Fraktur.

Die Daten der Änderung der Pfortendicke sind nach Testung mithilfe des Shapiro-Wilk Tests als normalverteilt anzusehen.

$p = 0,415$  für Änderung der Pfortendicke rechts zwischen den Temperaturtypen

$p = 0,297$  für Änderung der Pfortendicke links zwischen den Temperaturtypen

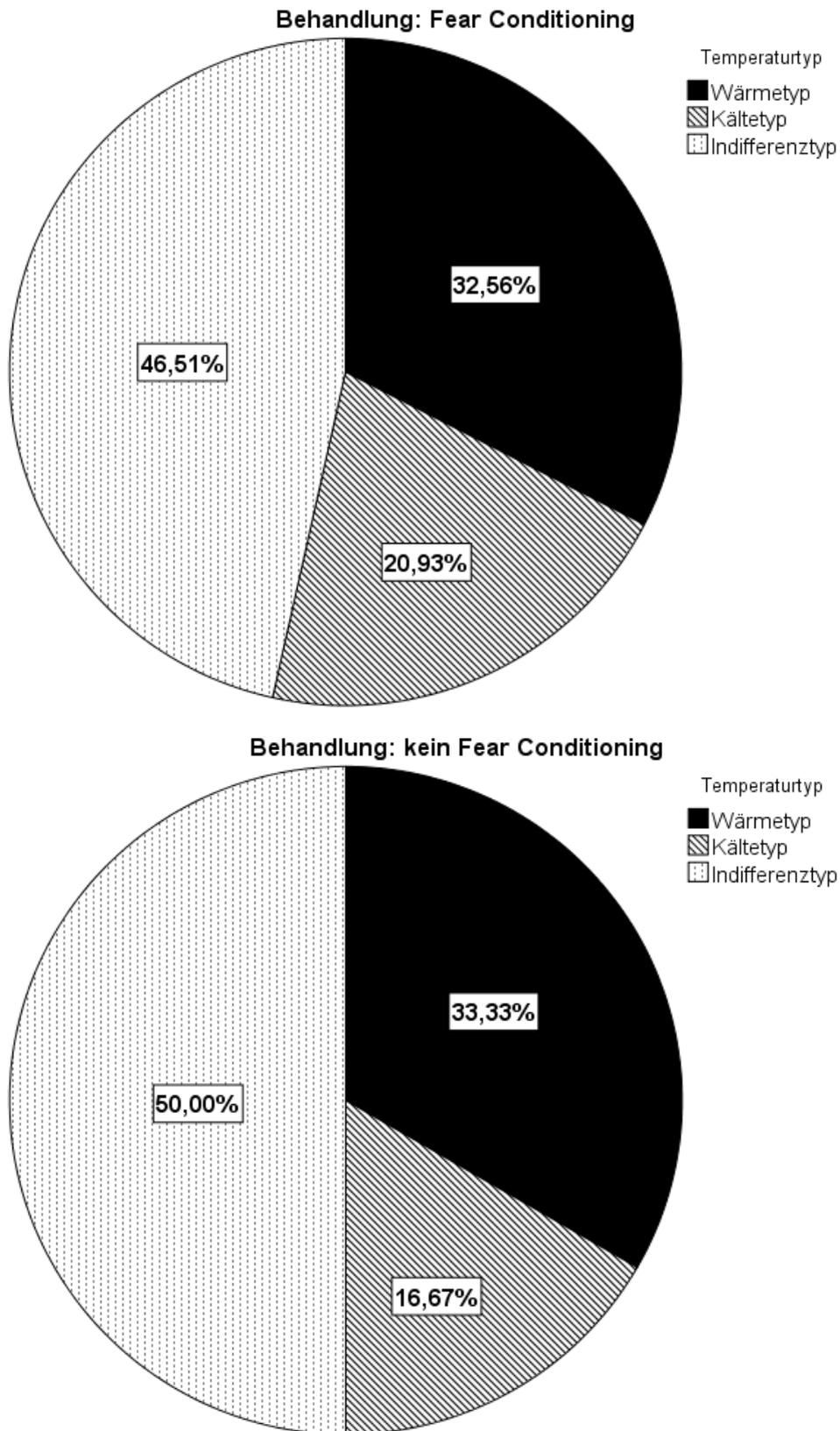
## Durchschnittliche Änderung des Gewichts



### Abb. 18: Gewicht vor und nach Fraktur bei Temperaturtypen

Gewicht vor Durchführung der Fraktur und nach der Fraktur in drei verschiedenen Gruppen: Wärmetypp (n=18), Kältetypp (n=11) und Indifferenztypp (n=26). Alle Gruppen haben nach der Fraktur an Gewicht verloren.

## Temperaturgruppen differenziert nach Stresslevel



**Abb. 19: Anteil der Temperaturtypen in Bezug auf Stresslevel**

Darstellung von Fear Conditioning (n=43) und kein Fear Conditioning (n=12) sowie dem jeweiligen Anteil der Temperaturtypen innerhalb dieser Gruppen.

Versucht man einen Zusammenhang zwischen der Angstkonditionierung und den Temperatortypen herzustellen, fällt auf, dass der Kältetyp zu Ungunsten des Indifferenztyps in der angstkonditionierten Gruppe etwas häufiger vertreten ist.

In der Gruppe mit Fear Conditioning entwickelten sich 20,93 % zu einem Kältetyp, während es bei der Gruppe ohne Fear Conditioning nur 16,67 % waren. In der Gruppe ohne Fear Conditioning sind zudem 50 % Indifferenztypen, während es bei den angstkonditionierten Tieren nur 46,51 % sind. Der Wärmetyt ist in beiden Gruppen etwa gleich häufig vertreten (Abb. 19).

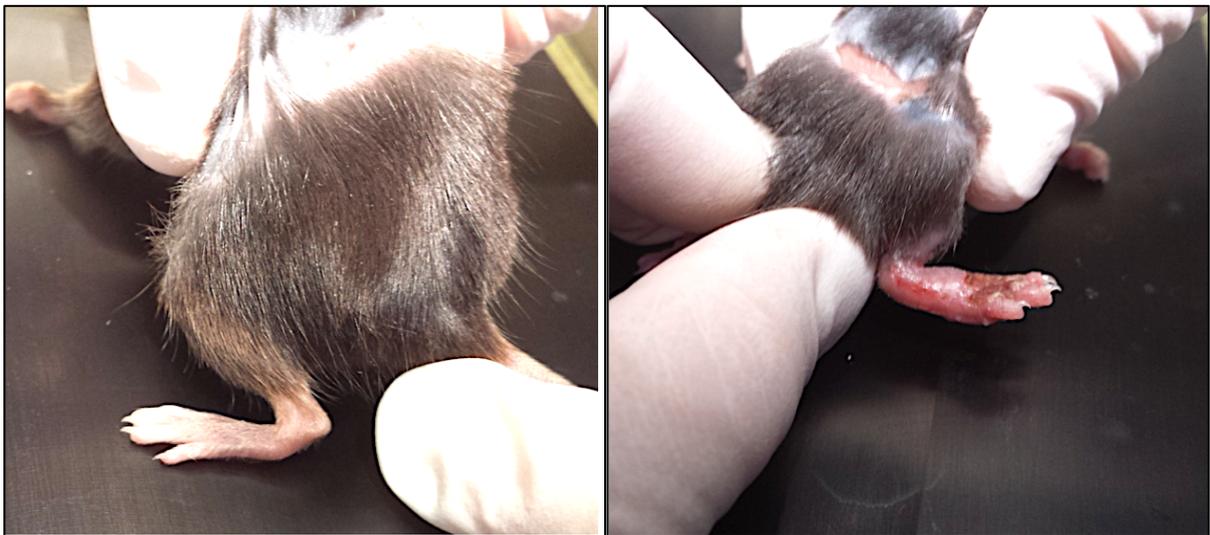
## **5. Wissenschaftliche Diskussion**

Das Komplexe Regionale Schmerzsyndrom ist eine zu Chronifizierung neigende Schmerzerkrankung, die beim Menschen gehäuft nach Knochenbrüchen oder Operationen in einer Extremität auftritt und neben chronischen neuropathischen Schmerzen, die weder einem Dermatome noch dem Innervationsgebiet eines peripheren Nerven zugeordnet werden können, zu weiteren charakteristischen Symptomen führt. Hierzu zählen Hyperalgesie und Allodynie, motorische Dysfunktion, trophische Störungen der Haut und der Nägel, sowie vasomotorische Störungen, die zu Temperaturänderung der betroffenen Extremität gegenüber der Gegenseite führen können (Bruehl, 2015, Birklein et al., 2000a).

Grundlage dieser Arbeit war ein bereits etabliertes Tibiafrakturmodell des CRPS. Zunächst wurde das Modell an Ratten, später auch an Mäusen angewandt. Es wurde in der Vergangenheit vielfach zur Entschlüsselung pathophysiologischer Prozesse des CRPS beim Menschen herangezogen (Guo et al., 2004, Li et al., 2009, Li et al., 2015). Wie in Abb. 20 zu erkennen ist, zeigten auch unsere Versuchstiere insbesondere in der akuten Phase eine posttraumatische Reaktion, die auf Entzündungsprozesse schließen lässt. Abbildung 20 soll den optischen Eindruck der Pfote kurz nach Abnahme des Gipsverbandes veranschaulichen. Die betroffene rechte Pfote war nach der Entfernung des Gipses drei Wochen nach der Fraktur deutlich ödematös geschwollen und gerötet. Im Vergleich zur Gegenseite wurde die Pfote vermutlich schmerzbedingt angehoben, um sie zu entlasten. Auch trophische Störungen der Haut sind an der Zehenbasis zu erkennen. Neben schorfartigen Auflagerungen ist auch eine verminderte Behaarung im Vergleich zur Gegenseite sichtbar (Abb. 20).

In dieser Studie wurde der Einfluss von Stress auf die Entwicklung der posttraumatischen Entzündung gelegt, wobei als Korrelat zu Stress im Tiermodell das hippocampal-abhängige Modell des Fear Conditionings verwendet wurde. Es wurde bereits an Mäusen mit Tibiafraktur angewandt (Tajerian et al., 2014). Zudem scheint die Posttraumatische Belastungsstörung (PTSD) eine Komorbidität des CRPS zu sein (Speck et al., 2017). Hierbei spielt die Dysfunktion des hippocampal-abhängigen Angstgedächtnisses eine zentrale Rolle (Speck et al., 2017, Desmedt et al., 2015).

Zudem wurden den Temperaturunterschieden zwischen der betroffenen und der nicht betroffenen Seite besonderes Augenmerk geschenkt. Auch beim Menschen kommt der Temperaturdifferenz eine besondere Bedeutung zu. Es werden „primär warme“ und „primär kalte“ CRPS-Subtypen unterschieden (Eberle et al., 2009, Veldman et al., 1993).



**Abb. 20: Vergleich der gesunden Seite (links) mit der betroffenen Seite (rechts) nach Fraktur**

Wenige Tage nach Abnahme des Gipses am rechten Bein wurde ein vergleichendes Foto aufgenommen. Der Gips wurde drei Wochen nach der Frakturdurchführung entfernt.

### 5.1. Vergleich der eigenen Ergebnisse mit anderen Studien des Tibiafrakturmodells

Die Mehrzahl der vorher durchgeführten Studien des Tibiafrakturmodells, an denen sich diese Studie orientierte, verwendeten den Stamm C57BL/6J (Gallagher et al., 2013, Guo et al., 2012). Auch wir verwendeten C57BL/6J Mäuse.

Es wurden insgesamt 129 Versuchstiere verwendet. Die Zusammensetzung der Geschlechter betrug 48 % Männchen und 52 % Weibchen.

Ein Großteil der vorher durchgeführten Studien nutzte lediglich männlicher Tiere (Guo et al., 2004, Wei et al., 2016). Allerdings zeigten Tajerian et al., dass es auch im Tibiafrakturmodell Unterschiede zwischen den Geschlechtern geben kann (Tajerian et al., 2015). Das Alter der Tiere entsprach bei Tajerian et al. 12-14 Wochen und die Tiere wurden in Vierergruppen gehalten. Nach der Frakturdurchführung zeigte sich bei den Weibchen eine stärkere mechanische Allodynie. Keine geschlechterspezifischen Unterschiede wurden hingegen bei Temperatur der Extremität und der Ödemmessung gefunden. Es zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern im Hinblick auf den Belastungsschmerz (Tajerian et al., 2015).

Da beim CRPS des Menschen sowohl Männer als auch Frauen betroffen sind, entschieden wir uns dafür, beide Geschlechter zu etwa gleichen Teilen in die Studie einzuschließen (Bruehl, 2015, de Mos et al., 2007, Sandroni et al., 2003).

Die Unterschiede bezüglich mechanischer Allodynie wurden in unseren Experimenten (Anhang) mithilfe der Von Frey Filamente – in der Form wie sie vorher gezeigt wurden – nicht festgestellt (Tajerian et al., 2015). Eine mögliche Ursache der abweichenden Ergebnisse könnte der Altersunterschied zwischen den Tieren in unserer Studie (durchschnittlich 20 Wochen) und den Tieren bei Tajerian et al. sein. Weiterhin waren die Mäuse bei Tajerian et al. nicht stressexponiert. In unserer Studie hingegen war die Stressexposition zentraler Bestandteil der Untersuchung. Möglich wäre eine Angleichung der Schmerzschwelle zwischen den Geschlechtern nach Stressexposition.

In früheren Experimenten betrug die Seitendifferenz der mechanischen Allodynie nach Fraktur meist zwischen 1-2 g (Guo et al., 2012, Tajerian et al., 2015). Unsere Experimente wiesen eine etwas geringere Seitendifferenz von etwa 0,6 g auf (Anhang). Die Beeinträchtigung der gesunden Seite wird über die zentrale Sensibilisierung, die mit dauerhafter, intensiver Stimulation peripherer Nozizeptoren einherzugehen scheint, erklärt (Birklein et al., 2018, Woolf and Salter, 2000). Durch

die permanente Erregung der peripheren Nozizeptoren wird die Erregbarkeit zentral im Rückenmark über eine Signalkaskade herabgesetzt. Dadurch breiten sich Allodynie und Hyperalgesie über das ursprünglich betroffene Gebiet hinaus aus.

Bei der Belastungsdifferenz zeigte sich in früheren Experimenten akut nach Fraktur eine Belastung des betroffenen Beins von etwa 50-60 % im Vergleich zur gesunden Gegenseite (Gallagher et al., 2013, Guo et al., 2012).

In unserer Studie betrug die Belastung der rechten Seite etwa 53 % nach 3 Wochen und etwa 65 % nach 6 Wochen (Abb. 6 und 14). Damit befinden sich unsere Ergebnisse in einem vergleichbaren Bereich.

Bei der Temperatur der betroffenen Seite wichen die Ergebnisse von den Erwartungen ab. Es zeigte sich, dass einige Tiere auch kältere Pfoten entwickelten im Vergleich zur Gegenseite. In einem späteren Kapitel soll dieser Aspekt näher erläutert werden.

Die Pfortendicke nach Fraktur betrug in der hier durchgeführten Studie bei den nicht angstkonditionierten Mäusen etwa 2,15 mm, was den Ergebnissen von Gallagher et al. nahekommt (Gallagher et al., 2013). Die angstkonditionierten Mäuse zeigten mit durchschnittlich 3,15 mm signifikant mehr Ödem (Abb. 8).

In einer Studie des Tibiafrakturmodells an Ratten wurde die Allodynie auf Hitzereize zwischen frakturierten Ratten und solchen, die nur eine Gipsimmobilisation erhalten hatten, verglichen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Guo et al., 2004). In unserem Plantar Test zeigte sich eine deutlichere Seitendifferenz. Es konnte durchschnittlich eine Differenz von 3,2 Sekunden gemessen werden (Anhang), während Guo et al. nur Differenzen unter einer Sekunde nachweisen konnten (Guo et al., 2004). Die Diskrepanz lässt sich möglicherweise durch die unterschiedlichen Versuchstiere erklären. Bei Guo et al. wurden Ratten getestet. Es sind größere und schwerere Tiere. Sie unterscheiden sich von Mäusen unter anderem in Sozialverhalten, Kognition und genetischen Aspekten (Ellenbroek and Youn, 2016). Die Sensibilität ist demnach nicht vergleichbar. Auch die Gruppen, die untereinander verglichen wurden, unterscheiden sich. In unserer Studie wurden gestresste und naive Tiere verglichen. Bei Guo et al. hingegen war nur eine Gruppe frakturiert.

Interessant ist zudem die Frage nach der Symptombdauer im Tibiafrakturmodell.

Im Tibiafrakturmodell wurde die mechanische Allodynie, die Belastbarkeit, Temperatur und Schwellung im betroffenen Bein 3, 6, 9, 12, 15 und 18 Wochen nach Fraktur untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die mechanische Allodynie das Symptom war,

das am längsten bestand und erst nach 18 Wochen den Ausgangswert wieder erreicht hatte. Die Belastbarkeit normalisierte sich nach 10 Wochen, während die Temperatur und das Ödem schon nach 6 Wochen wieder den Ausgangswert erreicht hatten (Gallagher et al., 2013, Wei et al., 2016, Guo et al., 2012).

Unter Vorlage dieser Erkenntnisse wurde der Von Frey Test und das Unweighting zur Ermittlung der mechanischen Allodynie und der Belastbarkeit bei einem Teil der Versuchstiere außerdem nach 6 Wochen und nach 12 Wochen wiederholt.

Beim Unweighting konnte gezeigt werden, dass nach 6 Wochen noch eine signifikante Belastungsdifferenz bestand. Allerdings war diese nach 12 Wochen nicht mehr nachweisbar (Abb. 6).

## 5.2. Der Einfluss von Stress auf die posttraumatische Entzündung

Das Komplexe Regionale Schmerzsyndrom ist eine multifaktorielle Erkrankung (Bruehl, 2010). Ein Aspekt, der schon seit Jahrzehnten zur Debatte steht, ist die Korrelation zwischen psychischen Auffälligkeiten und CRPS. Insbesondere der Zusammenhang mit „Stressful Life events“ und CRPS ist belegt (Speck et al., 2017). Bei CRPS-Patienten sind psychiatrische Auffälligkeiten wie etwa Depressionen oder Angsterkrankungen häufig zu beobachten (Feldman et al., 1999, Harden et al., 2003, Hardy and Merritt, 1988). Allerdings muss stets hinterfragt werden, ob diese nicht vielmehr Folge der chronischen Schmerzerkrankung statt deren Ursache sind (de Mos et al., 2009). Generell ist ein Zusammenhang zwischen chronischem Schmerz und daraus resultierender Angst, Depression und gedrückter Stimmung belegt. Ebenso gibt es Hinweise dafür, dass Depressionen die Schmerzintensität verstärken (Feldman et al., 1999).

Als „Critical Life Event“ oder „Stressful Life Event“ bezeichnet man allgemein ein psychisch belastendes Ereignis, welches mit Angst und erlebter Hilflosigkeit verbunden ist, wie etwa körperliche Gewalt, Tod einer nahestehenden Person, sexueller Missbrauch oder Vernachlässigung. Dies erfordert eine sozialpsychologische Neuanpassung (Nugent, 2013, Holmes and Rahe, 1967).

Die Akkumulation kritischer Lebensereignisse steht im Zusammenhang mit der Entwicklung einer posttraumatischen Belastungsstörung (PTSD). Ein Teil unserer Gruppe verglich CRPS-Patienten mit nicht-CRPS-Patienten mit anderem Extremitätenschmerz und gesunden Kontrollen. Es zeigte sich, dass PTSD signifikant mit CRPS assoziiert war (Speck et al., 2017).

Mit dem in dieser Studie verwendeten Studiendesign sollte der Einfluss von Stress und Angst auf das Tibiafrakturmodell näher beleuchtet werden. In dieser Studie wurde daher bei einigen Tieren eine Angstkonditionierung durchgeführt. Hierbei wurde ein Konditionierungsmodell verwendet, das auf kurzen wiederholt durchgeführten Stromimpulsen basiert. Wir entschieden uns für ein kontextbasiertes Konditionierungsmodell, da bei dieser Konditionierungsform der Hippocampus und das deklarative Gedächtnis involviert sind. Bei der Posttraumatischen Belastungsstörung wird eine Dysfunktion des hippocampal gesteuerten deklarativen episodischen Gedächtnisses ursächlich angenommen, wodurch das traumatische Ereignis und dessen Kontext nicht aktiv erinnert werden können. Zudem wird angenommen, dass gleichzeitig eine hyperaktive Amygdala bei sensorischen, bildhaften Reizen, die entfernt an das Trauma erinnern zu Hypermnesien in Form von Flashbacks führt, bei denen der Betroffene das Trauma erneut und intensiv durchlebt (Desmedt et al., 2015, Brewin et al., 1996). CRPS-Patienten geben häufig auch Symptome an, die auf eine posttraumatische Belastungsstörung hinweisen. Das Angstgedächtnis scheint hierbei eine zentrale Rolle zu spielen (Speck et al., 2017). Dieser Zusammenhang sollte durch das hippocampal-abhängige kontextbasierte Fear Conditioning näher beleuchtet werden und wurde von uns daher als Stressparadigma verwendet.

In unserer Studie wurde das Fear Conditioning den Versuchstieren vor den eigentlichen Verhaltens- und Sensibilitätstests zugefügt. Insgesamt wurde bei 38 % eine Angstkonditionierung durchgeführt, bei 32,6 % wurde hierauf verzichtet. Diese Gruppe diente als Kontrollgruppe. Bei den restlichen 29,4 % wurde statt dem Fear Conditioning lediglich ein einmaliger Stromstoß verabreicht, ein sogenannter „Reminder“ (Tab. 2).

Zu Beginn der Angstkonditionierung wurde bei 40 Tieren getestet, ob sich beim Angstverhalten (Freezing) und bei der Extinktion an fünf Tagen nach der Impulsabgabe signifikante Gruppenunterschiede zeigen. Dies war nicht der Fall (Abb. 4).

Ein ähnliches hippocampal-abhängiges Fear Conditioning wurde auch von Tajerian et al. bei C57BL/6 Mäusen benutzt. Nach drei Schockabgaben betrug das Freezing in unseren Experimenten prozentual etwa 60 %, bei Tajerian et al. schwankte es zwischen 60 % und 80 %, wobei die Weibchen deutlich mehr Freezing zeigten (Tajerian et al., 2015). Bei uns konnte dieser Unterschied nicht gezeigt werden,

allerdings wurden die Weibchen auch mit geringerer Stromstärke getestet, als die Männchen, was diese Diskrepanz erklären könnte. Ein Wert um etwa 60 % scheint allgemein realistisch und repräsentativ zu sein (Poole et al., 2016).

Tajerian et al. zeigten am Tibiafrakturmodell von C57BL/6 Mäusen sowohl ein erhöhtes angsttypisches Verhalten in den Verhaltenstests, als auch eine strukturelle Veränderung des Gehirns (Tajerian et al., 2014). Für die Verhaltenstests wurde das Zero Maze und das Open Field verwendet.

Wir nutzten in unseren Experimenten das Elevated Plus Maze anstatt dem Zero Maze. Beide Tests sollen Angstverhalten bei Nagetieren ermitteln. Zwar können geringe Unterschiede in den erhaltenen Daten auftreten, im Endeffekt scheinen beide Tests jedoch vergleichbar zu sein (Braun et al., 2011).

Wir nutzten des Weiteren ebenfalls den Open Field Test, allerdings betrug die Untersuchungszeit bei uns nur 7 Minuten, während Tajerian et al. für 10 Minuten untersuchten. In unserem Fall verbrachten die Mäuse zwischen 20 und 30 Sekunden im Zentrum des Open Fields, während es bei Tajerian et al. etwa 40 Sekunden waren. In Anbetracht der unterschiedlichen Gesamtuntersuchungsdauer sind diese Ergebnisse vergleichbar. Im Zero Maze verbrachten die Versuchstiere zwischen 47 und 72 Sekunden im offenen Quadranten, während sie bei uns im EPM im Durchschnitt etwa 50 Sekunden im offenen Arm zubrachten (Anhang). Dementsprechend scheinen unsere Ergebnisse ebenfalls vergleichbar. Ein Unterschied waren jedoch die Gruppen, die untereinander verglichen wurden. Wir untersuchten den Unterschied zwischen angstkonditionierten Mäusen und den Mäusen, die nur einen „Reminder“ erhalten hatten. Die Gruppe, die angstkonditioniert war, war signifikant ängstlicher und hatte die niedrigere Eintrittsfrequenz. Die Kontrollgruppe, die nur einen einmaligen leichten Stromstoß erhalten hatte, hatte eine höhere Eintrittsfrequenz. Es lässt sich also schlussfolgern, dass das Fear Conditioning vermutlich dazu beiträgt, das Angstverhalten der Maus zu steigern.

Im Open Field konnten wir, ähnlich wie auch Tajerian et al., keine signifikanten Unterschiede feststellen (Abb. 10).

In Hinblick auf die Sensibilitätstests zeigten sich Gruppenunterschiede zwischen den angstkonditionierten und den nichtangstkonditionierten Tieren. Meist war die betroffene rechte Extremität bei den angstkonditionierten Tieren deutlicher eingeschränkt. In einigen, wenn auch nicht allen, Verhaltenstests war dieser Unterschied auch nach Bonferroni-Korrektur signifikant.

Da insgesamt mehrere Tests durchgeführt wurden, ist eine Bonferroni-Korrektur eine Möglichkeit, den Fehler 1. Art zu minimieren, also die Wahrscheinlichkeit einen Unterschied zu finden, obwohl keiner besteht, zu reduzieren. Es wurden insgesamt 21 unverbundene t-Tests und einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) durchgeführt. Dementsprechend läge das Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur bei 0,2 %. Der p-Wert müsste folglich kleiner 0,002 sein, um von einem signifikanten Unterschied auszugehen.

Die mechanische Allodynie im Von Frey Test zeigte zum Zeitpunkt nach der Fraktur eine signifikant stärkere Empfindlichkeit auf den Reiz bei den angstkonditionierten Tieren (Abb. 5).

Die schmerzbedingte Minderbelastung des betroffenen Beins wurde im Unweighting Test untersucht. Hierbei zeigte sich ebenfalls eine signifikant verringerte Belastbarkeit bei den angstkonditionierten Tieren. Sechs Wochen nach der Fraktur zeigte sich im Vergleich zur Testung drei Wochen nach Fraktur eine verbesserte Belastbarkeit, die jedoch im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Fraktur trotzdem noch deutlich reduziert war (Abb. 6). Auch hier zeigte sich, dass die angstkonditionierten Tiere noch signifikant empfindlicher waren.

Bezüglich des Temperaturempfindens und der Hitzeschmerzschwelle zeigte sich im Plantar Test (Hot Plate) eine Tendenz. Die angstkonditionierten Tiere zeigten eine niedrigere Hitzeschmerzschwelle und blieben durchschnittlich etwa 0,8 Sekunden kürzer auf der heißen Platte stehen. Dieser Unterschied war nicht signifikant (Abb. 7). Die Pfotendicke nahm nach Fraktur bei den vorher angstkonditionierten Tieren um etwa 0,86 mm zu, während es in der Kontrollgruppe nur 0,2 mm waren. Dieser Unterschied war signifikant (Abb.8). Ein solcher Vergleich zwischen angstkonditionierten und nichtangstkonditionierten Tieren existiert in dieser Form noch nicht, weshalb keine Vergleichsmöglichkeit der einzelnen Werte mit Ergebnissen der Literatur besteht.

Aus der Zusammenschau dieser Versuchsergebnisse lässt sich schließen, dass die Tiere, die eine Angstkonditionierung durchlaufen haben, verstärkte Zeichen einer posttraumatischen Entzündung aufweisen: Sie sind empfindlicher gegenüber mechanischen Reizen, interpretieren einen thermischen Reiz früher als Schmerz, zeigen also früher eine Allodynie und sie weisen ein deutlicheres Belastungsdefizit auf. Zudem haben die angstkonditionierten Tiere in der akuten Phase nach der Fraktur ein deutlicher ausgeprägtes Ödem.

Zumindest im Tibiafrakturmodell der posttraumatischen Entzündung lässt sich also ein Trend dahingehend erkennen, dass erhöhter präorbider Stress Einfluss auf die Symptomausprägung hat.

Eine mögliche Erklärung für diesen beobachteten Zusammenhang könnte der Katecholaminspiegel beziehungsweise die Katecholaminsensibilität sein.

2004 zeigten Drummond et al. in drei Fallstudien einen Zusammenhang zwischen der Sympathikusaktivität und der Schmerzintensität beim menschlichen CRPS. Verschiedene Möglichkeiten der Sympathikusaktivierung (Arousal) wie ein lautes Geräusch oder Stirnkühlung verstärkten in dieser Studie den Schmerz (Drummond, 2004). Nozizeptoren exprimieren  $\alpha$ -1-Rezeptoren auch in gesunder Haut (Dawson et al., 2011). Außerdem wurde gezeigt, dass noch erhaltene Nervenfasern nach einer peripheren Nervenverletzung empfindlicher auf  $\alpha$ -1-Agonisten reagieren, es also zu einer Sensibilisierung der auch im gesunden Zustand vorhandenen Adrenozeptoren kommt (Nam et al., 2000).

Später wurde getestet, ob nach einer chronischen Einengung des Ischiasnervs bei Ratten eine erhöhte  $\alpha$ -1-Rezeptorexpression auf den verbleibenden Nervenfasern in der Haut nachweisbar ist. Dies war der Fall, was die Autoren zu dem Schluss führte, dass dies Zeichen einer sympathiko-afferenten Kopplung ist, welche zu einer verstärkten Empfindlichkeit auf sympathische Reize führt und zum sogenannten „sympathisch unterhaltenen Schmerz“ (Drummond et al., 2014) beiträgt. 2013 wurden Ratten, deren Sympathikusaktivität medikamentös reduziert war im Tibiafrakturmodell mit Wildtypen verglichen. Die medikamentöse Sympathektomie wurde durch 6-Hydroxydopamin zur Reduktion des kutanen Noradrenalins oder Guanethidin zur Reduktion von Noradrenalin in den peripheren sympathischen Nervenfasern erreicht. Das Schmerzempfinden der Ratten mit chemischer Sympathektomie war im Vergleich zu den Wildtypen gedämpft. Auf zellulärer Ebene erklären Li et al. folgendes Prinzip: Auf den Keratinozyten befinden sich Adrenozeptoren. Keratinozyten setzen wichtige Mediatoren für die posttraumatische Entzündung frei wie etwa IL-6, TNF- $\alpha$  und NGF. Eine verstärkte Sympathikusaktivität führt demnach zu einer stärkeren IL-6 Ausschüttung und damit zu vermehrter posttraumatischer Entzündung und nozizeptiven Sensibilisierung (Li et al., 2013).

Um einen Zusammenhang zwischen der Sympathikusaktivität und psychischen Faktoren zu schaffen, konnten Harden et al. zeigen, dass bei CRPS-Patienten eine

Katecholamindiskrepanz im venösen Blut zwischen betroffener und nicht betroffener Seite herrscht. Meist war der Katecholaminspiegel auf der betroffenen Seite erniedrigt. Im Vergleich zu gesunden Kontrollen war der Katecholaminspiegel der nicht betroffenen Seite bei den CRPS-Patienten höher. Harden et al. konnten einen Zusammenhang zwischen der Höhe des Katecholaminspiegels und psychischen Auffälligkeiten zeigen. Es wurde eine positive Korrelation zwischen dem Depressions-Score und den Adrenalinspiegeln gefunden, sowie eine Reihe weiterer psychischer Auffälligkeiten wie Somatisierungsneigung oder Verdrängung, die in positiver Korrelation zum Adrenalinpiegel standen. Für den Noradrenalinpiegel wurde kein Zusammenhang gefunden (Harden et al., 2004). Fraglich bleibt, ob die erhöhten Katecholaminspiegel Folge des Schmerzsyndroms waren, oder ob sie zur Entstehung des CRPS beitrugen. Zwar deuten die hier zitierten Studien darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen Sympathikusaktivität und CRPS besteht, jedoch sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass fundierte, aussagekräftige Studien rar sind und dieser Zusammenhang von Seiten der Wissenschaft umstritten ist (O'Connell et al., 2016).

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse wäre eine mögliche Erklärung unserer gewonnenen Ergebnisse, dass durch das erfolgte Fear Conditioning ein erhöhtes Stresslevel und damit eine erhöhte Konzentration an Katecholaminen erzeugt wurde im Vergleich zu den nicht angstkonditionierten Mäusen. Es wäre möglich, dass durch die Stimulation sensibilisierter Adrenozeptoren auf den Keratinozyten vermehrt proinflammatorische Mediatoren freigesetzt wurden. Hierdurch wären die signifikant deutlicheren Symptome der posttraumatischen Entzündung bei den angstkonditionierten Tieren erklärbar.

Selbstverständlich bleibt diese Aussage jedoch spekulativ und sollte mithilfe weiterer Experimente verifiziert werden. Hierbei könnten gezielte Bestimmungen der Katecholaminspiegel der Maus vor und nach der Angstkonditionierung, sowie nach der Frakturdurchführung wichtige Hinweise liefern.

Wichtig wäre in einem künftigen Experiment die Katecholaminbestimmung im Urin oder Serum der Maus (Smith et al., 2013). Bei Patienten mit einer Panikstörung konnten im Vergleich zu gesunden Probanden erhöhte basale Dopamin- und Adrenalinkonzentrationen im Plasma nachgewiesen werden (Oh et al., 2015). In einem Review von 2001 wurde versucht, einen kausalen Zusammenhang zwischen hohem

Stress und Depressionen herzustellen. Ein langfristig erhöhter Stresspegel führt über eine Erhöhung der Cortisolausschüttung zu einer erhöhten Katecholaminkonzentration. Corticotropin-Releasing-Hormone (CRH) wird bei Stress ausgeschüttet und führt im Locus coeruleus zu erhöhter Tyrosinhydroxylaseaktivität. Diese wiederum steigert den Noradrenalinumsatz (Leonard, 2001). Eine solche CRH-Ausschüttung konnte auch im Tierexperiment an Ratten durch Elektroschocks am Fuß – ähnlich den unseren Experimenten – oder laute Geräusche nachgewiesen werden (Melia and Duman, 1991). Allerdings sollten Vergleiche zwischen Studien an Menschen und Tierexperimenten hier mit Vorsicht genossen werden, da die Aussagekraft von Tiermodellen limitiert ist.

Neben dem Zusammenhang zwischen Stress und einer möglichen erhöhten Sympathikusaktivität und der posttraumatischen Entzündung könnte das sympathische Nervensystem auch in Hinblick auf die Temperaturentwicklung in der betroffenen Extremität interessant sein. So wäre eine mögliche Erklärung, dass in der warmen akuten Phase eine verminderte Sympathikusaktivität zu einer Vasodilatation durch verminderte Stimulation von  $\alpha$ -1-Rezeptoren führt. Im Verlauf komme es zu einer Sensibilisierung der Adrenozeptoren und bei normaler Sympathikusaktivität in der chronischen Phase dann zu einer Vasokonstriktion, die typischerweise mit den Anzeichen eines kalten CRPS einhergehe (Bruehl, 2010).

In Anbetracht der gewonnenen Erkenntnisse lässt sich nun als Fazit festhalten, dass Stress und Angst in Form eines vorher durchlaufenen Fear Conditionings einen verstärkenden Einfluss auf die posttraumatische Entzündung im Tibiafrakturmodell der Maus zu haben scheint. Die Literatur liefert Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang mit der Aktivität des sympathischen Nervensystems. Es wird außerdem angenommen, dass Störungen des sympathischen Nervensystems die Entstehung verschiedener Temperaturtypen mitverursacht. Hierauf soll im nächsten Kapitel genauer eingegangen werden.

### 5.3. Temperaturverhalten der betroffenen Extremität

Bezüglich der Temperatur der betroffenen Seite wurde in den bisherigen Studien am Tibiafrakturmodell in der akuten Phase meist eine Überwärmung gegenüber der Gegenseite berichtet, die sich innerhalb der nächsten 9-20 Wochen wieder normalisierte (Guo et al., 2012, Guo et al., 2004).

Bei unseren Versuchstieren wurde nach Fraktur im Vergleich zu vorherigen Ergebnissen ein geringerer Mittelwert für die absolute Temperatur der rechten Pfote (28,26 °C) gemessen (Anhang). Daher wurden die Ergebnisse genauer betrachtet, wobei auffiel, dass es zu einem Tiere gab, deren betroffene Pfote wärmer wurde, was in Anbetracht der Entzündung und der Ergebnisse bisheriger Studien zu erwarten war. Interessanterweise zeigten sich zum anderen jedoch auch Tiere, deren Pfote schon in der akuten Phase drei Wochen nach Fraktur kälter wurde. Dementsprechend wurden die Tiere wie folgt typisiert: Tiere, deren rechte Pfote im Vergleich zum Zeitpunkt vor Fraktur über 1 °C wärmer wurde, zählten zum Wärmetyt. Tiere, deren rechte Pfote im Vergleich zum Zeitpunkt vor Fraktur über 1 °C kälter wurde, zählten zum Kältetyt. Alle Temperaturdifferenzen dazwischen galten als Indifferenztyp. Knapp die Hälfte der Versuchstiere ließ sich zum Indifferenztyp rechnen, während 32,7 % dem Wärmetyt angehörten. 20 % gehörten dem Kältetyt an (Abb.12).

Eine Erklärung für den Temperaturunterschied beim CRPS ist die Inflammation im betroffenen Gebiet, die zu einer Überwärmung führt. Neben aktivierten Keratinozyten in der Haut der betroffenen Extremität, die zu einer erhöhten Konzentration von proinflammatorischen Mediatoren wie IL-6, IL-1 $\beta$ , NGF und TNF- $\alpha$  führen, sind auch Substanz P und Calcitonin-gene Related Peptide (CGRP), die von den sensorischen C-Fasern freigesetzt werden, an der posttraumatischen Entzündung beteiligt (Wei et al., 2009, Guo et al., 2012, Li et al., 2009, Li et al., 2010).

Eine wichtige Rolle scheint zudem das sympathische Nervensystem zu spielen.

Kerantinozyten in der Haut enthalten Adrenozeptoren und können dadurch auf Reizungen des sympathischen Nervensystems reagieren. Es liegen Hinweise dafür vor, dass eine Stimulation dieser Keratinozyten zu einer erhöhten Freisetzung von IL-6 führt, welches wiederum eine Sensibilisierung der Nozizeptoren bewirkt (Li et al., 2013).

Eine verminderte Temperatur gegenüber der gesunden Seite ist bisher im Tibiafrakturmodell weniger gut erforscht. Daher muss bei der Diskussion auf Ergebnisse der Humanforschung zurückgegriffen werden.

Eine Endotheldysfunktion, die zu einer Störung der Vasodilatation führt, könnte verantwortlich sein für die kalte Extremität (Schattschneider et al., 2006). Durch eine beim Menschen pharmakologisch erzwungene Vasodilatation konnte bereits ein kaltes CRPS demaskiert werden, sodass sich anschließend alle Zeichen eines warmen CRPS zeigten (Groeneweg et al., 2009).

Lange Zeit wurde vermutet, dass die akute Form des CRPS, eher zu einem warmen CRPS führt, während sich die chronische, persistierende Form in ein kaltes CRPS umwandelt (Birklein et al., 1998, Wasner et al., 2001).

Ein Erklärungsansatz, der sich hinter dieser Theorie verbirgt, besteht in der Annahme, dass eine eingeschränkte Funktion des sympathischen Nervensystems dazu führt, dass in der frühen akuten Phase die Sympathikusfunktion reduziert ist, wodurch es zu einer Vasodilatation aufgrund der fehlenden Stimulation von  $\alpha$ -1-Rezeptoren kommt.

In der chronischen Phase hingegen führe dies eher zu einer Vasokonstriktion aufgrund der darauffolgenden Sensibilisierung der Adrenozeptoren und dadurch zum typischen kalten CRPS (Bruehl, 2010). Es gab weiterhin in der Forschung am menschlichen CRPS den Versuch, eine Einteilung in „Wärme“- und „Kältesubtyp“ vorzunehmen, die über den reinen Temperaturaspekt hinausging (Bruehl et al., 2016). Es zeigte sich hinsichtlich Schmerzintensität kein signifikanter Unterschied in den Temperaturgruppen.

Die Ergebnisse unserer Arbeit glichen in gewisser Weise den Ergebnissen von Bruehl et al. Bei der Von Frey Testung auf mechanische Allodynie zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen. Weder zwischen den warmen und kalten Subtypen, noch im Vergleich mit dem Indifferenztyp (Abb. 13).

Es konnte gezeigt werden, dass der warme Subtyp das betroffene Bein im Unweighting Test weniger belastete, als der kalte Subtyp, allerdings nicht in einem signifikanten Ausmaß (Abb. 14). Auch dies entspricht den von Bruehl et al. erhobenen Ergebnissen, denn auch bei den CRPS-Patienten war die motorische Funktionsfähigkeit beim warmen Kollektiv stärker eingeschränkt (Bruehl et al., 2016). In unserer Studie zeigte sich nach sechs Wochen jedoch, dass die Tiere vom Wärmetyt wesentlich schneller regenerierten, als die vom Kältetyt. Außerdem blieb beim Kältetyt sogar nach zwölf Wochen noch eine geringe Resteinschränkung zurück,

was beim Wärmetyt nicht der Fall war. Dies könnte als Hinweis auf eine schlechtere Remission der Kältetyten gesehen werden.

In Hinblick auf die Ödementwicklung zeigten Bruehls Patienten mit einer warmen Extremität ein deutlicheres Ödem. In unserer Studie am Tibiafrakturmodell wurde dies allerdings nicht gezeigt. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 17).

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte der abweichende Studienaufbau sein. Während in dieser Studie der Zeitpunkt der Ödemmessung in Bezug zur Krankheitsdauer gleich war, nämlich drei Wochen nach Fraktur, gab es bei Bruehl et al. Unterschiede. Die Patienten hatten bis zu Beginn der Studie bereits unterschiedlich lange an ihrem CRPS gelitten.

Die Entstehung eines kalten CRPS aus dem warmen CRPS heraus wurde nicht bewiesen. Ein kleiner Anteil von 15,9 % der Patienten mit einer Krankheitsdauer von weniger als sechs Monaten zeigte nämlich schon in der frühen Phase ein kaltes CRPS (Bruehl et al., 2016). Dies entspricht auch unseren Ergebnissen. Etwa 20 % der untersuchten Tiere im Tibiafrakturmodell wiesen drei Wochen nach Fraktur bereits eine kältere rechte Extremität auf (Abb. 11 + 12). Es wäre interessant gewesen zu untersuchen, wie sich die Temperatur der betroffenen Extremität im weiteren Verlauf verhält, um zu untersuchen, ob aus den primär warmen Subtypen eventuell noch kalte geworden wären. Dies wurde in unserer Studie nicht ermittelt, da mit der Temperatúrauswertung erst nach Abschluss der Experimente begonnen wurde und diese Entwicklung von uns nicht erwartet wurde.

Des Weiteren fällt bei den hier präsentierten Ergebnissen auf, dass die rechte Pfote zwar deutlich an Umfang gewinnt, die linke Seite jedoch an Umfang verliert. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte in der Gewichtsabnahme gesehen werden, die alle Tiere nach Fraktur betrifft (Abb. 18). Sie liegt zwischen zwei und drei Gramm und ist beim Indifferenztyp am deutlichsten zu erkennen. Dadurch nimmt voraussichtlich auch der Umfang der Pfote etwas ab. Auf der rechten Seite wird dieser Umstand jedoch durch die posttraumatische Entzündung verdeckt.

Eberle et al. rekrutierten kalte und warme CRPS-Patienten und zwar zu gleichen Anteilen. Es wurde darauf geachtet, dass der jeweilige Temperaturtyp bereits von Anfang an vorlag und sich keine Änderung im Verlauf der Erkrankung ereignet hatte. Während die Patienten mit einem warmen CRPS rötliche Haut hatten, waren diejenigen mit kaltem CRPS meist bläulich-livide bis zyanotisch (Eberle et al., 2009).

In der von uns durchgeführten Studie wurde der optische Eindruck der betroffenen Extremität nicht strukturiert erfasst, daher ist eine Aussage hierzu nicht möglich. Typische Zeichen der Inflammation waren jedoch vorhanden, wie man in Abbildung 20 erkennen kann.

Bei kalten CRPS-Patienten liegen vermehrt „Critical Life Events“ vor, außerdem sind chronische Schmerzen anderer Genese häufiger (Eberle et al., 2009).

Beim Menschen zeigt sich beim CRPS insbesondere in der chronischen Phase, eine Kälteallodynie. Kältereize werden hier als Schmerz missinterpretiert (Dimova and Birklein, 2018). Ein Experiment zur Ermittlung von Kälteallodynie wurde im Rahmen dieser Studie in der akuten Phase der posttraumatischen Entzündung durchgeführt (Abb. 16). Der Kältetyp weist nach Fraktur die deutlichste Reaktionszunahme bei Kältereizen auf, was dafürspricht, dass – ähnlich wie bei den Patienten mit chronischem CRPS – eine Kälteallodynie vorliegen könnte.

Wir führten zur Messung der Temperaturdifferenz seitengetrennte Temperaturermittlungen bei Raumtemperatur durch, was im Wesentlichen auch der Vorgehensweise der meisten anderen Studien glich, die hier zum Vergleich herangezogen werden. In unserer Studie lag der durchschnittliche Unterschied bei statischer Messung beim Wärmetyt bei 1,7°C und beim Kältetyp bei 2,1 °C.

Zwei Aspekte des CRPS und der posttraumatischen Entzündung im Tibiafrakturmodell wurden hier näher erläutert: Einerseits die Frage nach dem Vorhandensein verschiedenen Temperaturtypen, andererseits die Frage nach dem Einfluss von Angst oder Stress auf die Entstehung des Krankheitsbildes.

Es konnte sowohl gezeigt werden, dass im akuten Stadium der posttraumatischen Entzündung zwei unterschiedliche Temperaturtypen vorliegen und diese sich in einigen Sensibilitätstests tatsächlich – wenn auch nicht signifikant – unterscheiden. Außerdem zeigte sich, dass die angstkonditionierten Tiere in den Sensibilitätstests zum Großteil empfindlicher waren.

Nun bleibt die Frage offen, ob es zwischen der Angstkonditionierung der Tiere und dem Temperaturunterschied einen Zusammenhang gibt, denn in bisherigen Studien am Tibiafrakturmodell wurde nie beobachtet, dass manche Tiere eine kältere Extremität entwickeln. Ein möglicher Unterschied zu vorherigen Studien könnte sein, dass die Tiere ein Fear Conditioning erhalten haben. Daher wurde untersucht, ob

zwischen der Angstkonditionierung und dem jeweiligen Temperaturtyp ein Zusammenhang besteht.

Es zeigte sich hierbei nur eine schwache Tendenz. Vergleicht man die Verteilung der Temperaturtypen innerhalb der Gruppen Fear Conditioning und kein Fear Conditioning fällt auf, dass in der angstkonditionierten Gruppe der Anteil an Kältetypen nicht größer ist als bei den nicht angstkonditionierten Tieren (21 % im Gegensatz zu 16,67 %) (Abb. 19). Somit führt ein Fear Conditioning wie es von uns durchgeführt wurde nicht zu einem kalten oder warmen Phänotyp im Tibiafrakturmodell der Maus. Andere Ursachen müssen demnach verantwortlich sein. Welche Faktoren zur Entstehung des jeweiligen Temperaturtypen beitragen, ist auch beim CRPS des Menschen noch unklar.

Die Gruppengrößen in dieser Studie waren aufgrund der nicht vorhersehbaren Entwicklung zu einem bestimmten Temperaturtyp unterschiedlich. Für eine Korrelationsanalyse waren die Gruppengrößen zu klein. In künftigen Studien wäre eine Fokussierung auf diesen Aspekt durchaus interessant, insbesondere im Zusammenhang mit der Aktivität des sympathischen Nervensystems.

Zudem ist eine langfristige Überwachung der Pfotentemperatur – vor allem bei den Kältetypen – von zukünftigem Interesse.

#### 5.4. Einordnung des Gesamtergebnisses im Kontext der Wissenschaft

Die Zusammenschau der Studienergebnisse wirft nun die Frage der Einordnung der eigenen Ergebnisse auf.

Das in der vorliegenden Studie verwendete Tibiafrakturmodell an C57BL/6J Mäusen ist bereits seit über zehn Jahren etabliert und hat schon zahlreiche wegweisende Erkenntnisse im Bereich des CRPS liefern können. Die von uns erhobenen Ergebnisse im Bereich der mechanischen Allodynie, der Schwellung und der Belastbarkeit bewegen sich zum Großteil in bereits vorher ermittelten Wertebereichen (Gallagher et al., 2013, Guo et al., 2012).

Eine genaue Untersuchung des Einflusses der Angstkonditionierung auf die posttraumatische Entzündung wurde bislang nicht durchgeführt und sollte Gegenstand dieser Untersuchung sein. Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, die eine Angstkonditionierung erhalten hatten, stärkere Sensibilitätsstörungen und schmerzbedingt höhere Belastungsdifferenzen zeigten. Dies kann als Hinweis

gesehen werden, dass Stress – womöglich durch eine vermehrte Sympathikusaktivität und höhere Katecholaminspiegel – einen verstärkenden Effekt auf posttraumatische Entzündungsprozesse ähnlich einem CRPS hat. Eine Aussage bezüglich der Sympathikusaktivität kann in dieser Studie nicht getroffen werden, da keine Messungen wie etwa die des Serum- oder Urinkatecholaminspiegels vorgenommen wurden. Dennoch liefern die Studienergebnisse Hinweise dafür, dass Stress und Angst auch ursächlich eine Rolle bei der Entstehung des CRPS spielen könnten oder zumindest für die Intensität der Symptome mitverantwortlich sein könnten. Dennoch bleibt das Tibiafrakturmodell nur ein Modell, das nicht mit einem beim Menschen auftretenden CRPS gleichzusetzen ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt, der in dieser Arbeit erst retrospektiv entdeckt wurde, ist die Existenz verschiedener Temperaturtypen nach der Fraktur. Während vorherige Experimente, die das Tibiafrakturmodell verwendeten, lediglich eine im Durchschnitt erhöhte Temperatur nach Fraktur nachweisen konnten, wurde in dieser Studie eine abweichende Entwicklung beobachtet: 20 % der untersuchten Tiere entwickelten eine kalte Extremität, etwa 33 % eine warme. Demnach können die verschiedenen Temperaturtypen als Hinweis auf ein CRPS-ähnliches Krankheitsbild interpretiert werden, da auch beim CRPS des Menschen „primär warme“ und „primär kalte“ CRPS-Subtypen unterschieden werden können.

Die Brücke zwischen diesen beiden von uns festgestellten Zusammenhängen könnte unter Umständen in der Beteiligung des Sympathikus liegen.

Eine Korrelation zwischen prämorbidem Stress und der Entwicklung eines jeweiligen Temperaturtyps konnte in unserer Studie nicht beobachtet werden. Die Beteiligung des Sympathikus bei der Pathogenese des CRPS ist weiterhin stark umstritten, da kaum stichhaltige Studien existieren, die einen Zusammenhang belegen (O'Connell et al., 2016).

## 5.5. Limitation der Arbeit und Ausblicke für die weitere Forschungsarbeit

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss von Stress auf die posttraumatische Entzündung bei der Maus zu untersuchen. Zu Beginn wurden im Von Frey Test und im Unweighting Test insgesamt 85 Tiere untersucht, von denen über den gesamten Zeitraum 12 Tiere verstorben sind. Damit betrug die Mortalität 14,1 %. Die Ursachen hierfür waren in erster Linie die Narkose im Rahmen der Frakturdurchführung, bei der einige Mäuse einen Atemstillstand erlitten.

Zudem wurden einige Mäuse am Tag nach der Intervention tot im Käfig aufgefunden. Die Gründe hierfür sind nicht sicher. Eine denkbare Erklärung hierfür ist die atemdepressive Wirkung der Opioide (Pattinson, 2008). Buprenorphin ist jedoch für seinen „Ceiling“ Effekt (Sättigungseffekt) bekannt und geschätzt. Man versteht darunter eine trotz Dosissteigerung nicht weiter zunehmende pharmakologische Wirkung. Auch zur postoperativen Anwendung im Tiermodell scheint es geeignet zu sein und wird sehr häufig eingesetzt (Guarnieri et al., 2012, Roughan and Flecknell, 2002). Allerdings zeigte eine französische Studie geschlechtsspezifische Unterschiede der Buprenorphinwirkung, wobei die Weibchen empfindlicher reagierten als die Männchen und eine Verlangsamung der Atmung zeigten (Alhaddad et al., 2013). Dies könnte eine mögliche Erklärung für die vermehrten Todesfälle unter den Weibchen sein. Vergleicht man die vorzeitigen Todesfälle innerhalb der Gruppen, zeigte sich, dass die Mäuse mit Fear Conditioning eine 15,4 % Mortalität aufwiesen, während es bei den naiven nur 10 % waren.

Insbesondere bei den Untersuchungen der Temperaturtypen wurden die Kohorten sehr klein, da dies nicht vom ursprünglichen Versuchsaufbau beeinflussbar war. Eine Möglichkeit zur Verbesserung wäre eine größere Gesamtstichprobe, sodass die Kohorten später auf vergleichbare Größen angepasst werden können.

Eine Sham-Kontrollgruppe, die lediglich einen Gips ohne vorherige Fraktur erhält, wurde von uns nicht untersucht. Allerdings liegen hierfür vorherige Versuche im Tibiafrakturmodell vor, die zeigen, dass ebenfalls eine posttraumatische Entzündung entsteht, diese aber schwächer und kürzer ausgeprägt ist (Guo et al., 2004).

Schließlich bleibt die Frage bestehen, inwiefern das Tibiafrakturmodell der Maus überhaupt Hinweise auf ein menschliches CRPS liefern kann. Dieser Frage haben sich Birklein et al. in einem ausführlichen Review gewidmet (Birklein et al., 2018):

Ein Kritikpunkt ist beispielsweise die Inzidenz der posttraumatischen Entzündung. Sie kommt sowohl bei unseren, als auch in vorherigen Experimenten bei fast allen Versuchstieren vor, während die Inzidenz des CRPS beim Menschen nach einer Fraktur nur bei 3,8 -7 % der Fälle liegt (Moseley et al., 2014, Beerthuizen et al., 2012, Birklein et al., 2018). Das Tibiafrakturmodell ist ein durchaus geeignetes Modell der posttraumatischen Entzündung. Für das CRPS, wie es beim Menschen auftritt, eignet es sich jedoch nur bedingt, da ein CRPS eine Chronifizierung voraussetzt, die bei den Versuchstieren in der Regel ausbleibt.

Eine genauere Untersuchung des sympathischen Nervensystems wäre in einem ähnlichen Versuchsaufbau für die Zukunft interessant. So könnte das Fear Conditioning mit Katecholaminbestimmungen im Serum oder Urin verbunden werden, sodass sich die Aktivität des sympathischen Nervensystems quantifizieren lässt. Außerdem wäre interessant zu erfahren, ob auch bei den Temperaturtypen ein Unterschied im Katecholaminspiegel vorhanden ist.

Ein weiterer, durchaus wichtiger Aspekt wäre die durchschnittliche Aktivität oder Beweglichkeit der angstkonditionierten Tiere gegenüber der nicht-angstkonditionierten Tiere. Im Unweighting zeigte sich bei uns, dass die angstkonditionierten Tiere das betroffene Bein deutlich weniger belasten, was dafürspricht, dass die Beweglichkeit eingeschränkt war. Dadurch wäre die längere Symptombdauer möglicherweise erklärbar. In unseren Experimenten wurde die Aktivität jedoch nicht gemessen. Für künftige Studien sollte dieser Punkt mit einbezogen werden.

## **6. Zusammenfassung**

Das Tibiafrakturmodell der Maus ist ein seit über zehn Jahren etabliertes Tiermodell der posttraumatischen Entzündung, das in der Vergangenheit bereits Hilfestellungen bei der Entschlüsselung pathophysiologischer Prozesse beim Krankheitsbild CRPS liefern konnte. Verschiedene Aspekte des Krankheitsbildes bleiben jedoch noch ungeklärt. Unter anderem auch die Frage nach dem Einfluss psychischer Faktoren auf die Entstehung und die Ausprägungsform des CRPS.

Die Forschungsfrage dieser Arbeit bezog sich auf den Einfluss von Stress auf die posttraumatische Entzündung im Tibiafrakturmodell der Maus. Es wurde untersucht, inwiefern sich angstkonditionierte Mäuse nach einer Tibiafraktur in verschiedenen Verhaltenstests von nicht angstkonditionierten Mäusen unterscheiden.

Zu Beginn der Experimente wurde ein Teil der Versuchstiere einer klassischen Angstkonditionierung mithilfe elektrischer Fußstimulationen unterzogen.

Vor der Frakturdurchführung wurden die Mäuse erstmals Sensibilitätstests unterzogen. Untersucht wurden hierbei mechanische Allodynie, Belastbarkeit der Extremität, Reaktion auf thermische Reize (Hitze und Kälte), Ödem und Temperatur der betroffenen rechten Seite. Im Anschluss an die Fraktur der rechten Tibia erfolgte eine Gipsimmobilisation für drei Wochen. Nach Entfernung des Gipses wurden die Sensibilitätstests wiederholt. Die beiden zu vergleichenden Gruppen waren die Tiere mit Fear Conditioning und die Kontrollgruppe, die kein Fear Conditioning erhalten hatte. Es zeigte sich, dass die angstkonditionierten Tiere nach Fraktur überempfindlich auf sensible Reize reagierten und eine deutlichere schmerzbedingte Bewegungseinschränkung nachweisbar war. Die mechanische Allodynie bei den angstkonditionierten Tieren verringerte sich wesentlich deutlicher als bei der Kontrollgruppe. Die Belastbarkeit war im betroffenen Bein der angstkonditionierten Tiere schmerzbedingt signifikant stärker eingeschränkt als bei der Kontrollgruppe und es dauerte deutlich länger bis die Belastbarkeit wieder gegeben war. Bei der thermischen Sensibilität zeigte sich ebenfalls ein Trend. Die gestressten Tiere zeigten hier eine niedrigere Hitzeschmerzschwelle. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Weiterhin wiesen die angstkonditionierten Tiere eine stärkere Schwellung des betroffenen rechten Beins auf.

Bezüglich der Temperatur in der betroffenen Extremität zeigte sich interessanterweise, dass entgegen vorheriger Entdeckungen im Tibiafrakturmodell nicht nur überwärmte Extremitäten vorkamen, sondern auch kühlere. Dies war unabhängig vom Fear

Conditioning festzustellen. Dementsprechend wurden die Tiere in die Kategorien „Wärmetyt“, „Kältetyt“ und „Indifferenztetyt“ eingeteilt. Etwa ein Drittel der Tiere konnte dem Wärmetyt, 20 % dem Kältetyt zugeordnet werden. Die Tatsache, dass die verschiedenen Temperatortypen bereits direkt nach der Fraktur vorlagen, unterstützt die Einteilung in ein „primär warmes“ und „primär kaltes“ CRPS.

Ein Zusammenhang zwischen vorherigem Fear Conditioning und dem Temperatortyp konnte nicht festgestellt werden. Allerdings war die Kohortengröße einiger Temperatortypen für eine Korrelationsanalyse auch zu klein.

Im Gesamtbild liefert diese Studie Hinweise darauf, dass Stress und Angst, insbesondere in der akuten Phase, einen Einfluss auf die posttraumatische Entzündung und deren Symptome wie mechanische Allodynie, Belastungsdefizit, Ödementwicklung und Temperaturasymmetrie haben. Dies ist in dieser Form nicht auf CRPS beim Menschen übertragbar. Das Tibiafrakturmodell liefert jedoch eine wertvolle Forschungsgrundlage und erwies sich in der Vergangenheit insbesondere für die akute Phase des CRPS als geeignetes Modell.

Der Nachweis verschiedener Temperatortypen im Tibiafrakturmodell der Maus wurde bisher noch nicht beschrieben und liefert einen Anstoß für die weitere Forschungsarbeit, da es mit klinischen Beobachtungen an CRPS-Patienten in Einklang zu bringen ist und das Tibiafrakturmodell wieder einen Schritt näher an das Krankheitsbild des CRPS heranführt.

## Referenzen

- ALHADDAD, H., CISTERMINO, S., SAUBAMEA, B., SCHLATTER, J., CHIADMI, F., RISEDE, P., SMIRNOVA, M., COCHOIS-GUEGAN, V., TOURNIER, N., BAUD, F. J. & MEGARBANE, B. 2013. Gender and strain contributions to the variability of buprenorphine-related respiratory toxicity in mice. *Toxicology*, 305, 99-108.
- ALONSO, D. & RADOMSKI, M. W. 2003a. The nitric oxide-endothelin-1 connection. *Heart Fail Rev*, 8, 107-15.
- ALONSO, D. & RADOMSKI, M. W. 2003b. Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. *Heart Fail Rev*, 8, 47-54.
- BEERTHUIZEN, A., STRONKS, D. L., HUYGEN, F. J., PASSCHIER, J., KLEIN, J. & SPIJKER, A. V. 2011. The association between psychological factors and the development of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS1)--a prospective multicenter study. *Eur J Pain*, 15, 971-5.
- BEERTHUIZEN, A., STRONKS, D. L., VAN'T SPIJKER, A., YAKSH, A., HANRAETS, B. M., KLEIN, J. & HUYGEN, F. J. 2012. Demographic and medical parameters in the development of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS1): prospective study on 596 patients with a fracture. *Pain*, 153, 1187-92.
- BEERTHUIZEN, A., VAN 'T SPIJKER, A., HUYGEN, F. J., KLEIN, J. & DE WIT, R. 2009. Is there an association between psychological factors and the Complex Regional Pain Syndrome type 1 (CRPS1) in adults? A systematic review. *Pain*, 145, 52-9.
- BIRKLEIN, F. 2018. *Diagnostik und Therapie komplexer regionaler Schmerzsyndrome (CRPS), S1-Leitlinie, 2018; in: Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie.* [Online]. URL: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/030-116l\\_S1\\_Schmerzsyndrome\\_CRPS\\_2018-09.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/030-116l_S1_Schmerzsyndrome_CRPS_2018-09.pdf) [Accessed 27.07. 2019].
- BIRKLEIN, F., DRUMMOND, P. D., LI, W., SCHLERETH, T., ALBRECHT, N., FINCH, P. M., DAWSON, L. F., CLARK, J. D. & KINGERY, W. S. 2014. Activation of cutaneous immune responses in complex regional pain syndrome. *J Pain*, 15, 485-95.
- BIRKLEIN, F., IBRAHIM, A., SCHLERETH, T. & KINGERY, W. S. 2018. The Rodent Tibia Fracture Model: A Critical Review and Comparison With the Complex Regional Pain Syndrome Literature. *J Pain*, 19, 1102.e1-1102.e19.
- BIRKLEIN, F., RIEDL, B., CLAUS, D. & NEUNDORFER, B. 1998. Pattern of autonomic dysfunction in time course of complex regional pain syndrome. *Clin Auton Res*, 8, 79-85.
- BIRKLEIN, F., RIEDL, B., SIEWEKE, N., WEBER, M. & NEUNDORFER, B. 2000a. Neurological findings in complex regional pain syndromes--analysis of 145 cases. *Acta Neurol Scand*, 101, 262-9.
- BIRKLEIN, F., SCHMELZ, M., SCHIFTER, S. & WEBER, M. 2001. The important role of neuropeptides in complex regional pain syndrome. *Neurology*, 57, 2179-84.
- BIRKLEIN, F., WEBER, M. & NEUNDORFER, B. 2000b. Increased skin lactate in complex regional pain syndrome: evidence for tissue hypoxia? *Neurology*, 55, 1213-5.
- BONIN, R. P., BORIES, C. & DE KONINCK, Y. 2014. A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. *Mol Pain*, 10, 26.
- BRAUN, A. A., SKELTON, M. R., VORHEES, C. V. & WILLIAMS, M. T. 2011. Comparison of the elevated plus and elevated zero mazes in treated and untreated male Sprague-Dawley rats: effects of anxiolytic and anxiogenic agents. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 97, 406-415.
- BREWIN, C. R., DALGLEISH, T. & JOSEPH, S. 1996. A dual representation theory of posttraumatic stress disorder. *Psychol Rev*, 103, 670-86.
- BRUEHL, S. 2010. An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology*, 113, 713-25.
- BRUEHL, S. 2015. Complex regional pain syndrome. *Bmj*, 351, h2730.
- BRUEHL, S. & CARLSON, C. R. 1992. Predisposing psychological factors in the development of reflex sympathetic dystrophy. A review of the empirical evidence. *Clin J Pain*, 8, 287-99.

- BRUEHL, S., HARDEN, R. N., GALER, B. S., SALTZ, S., BACKONJA, M. & STANTON-HICKS, M. 2002. Complex regional pain syndrome: are there distinct subtypes and sequential stages of the syndrome? *Pain*, 95, 119-24.
- BRUEHL, S., HARDEN, R. N., GALER, B. S., SALTZ, S., BERTRAM, M., BACKONJA, M., GAYLES, R., RUDIN, N., BHUGRA, M. K. & STANTON-HICKS, M. 1999. External validation of IASP diagnostic criteria for Complex Regional Pain Syndrome and proposed research diagnostic criteria. International Association for the Study of Pain. *Pain*, 81, 147-54.
- BRUEHL, S., MAIHOFNER, C., STANTON-HICKS, M., PEREZ, R. S., VATINE, J. J., BRUNNER, F., BIRKLEIN, F., SCHLERETH, T., MACKEY, S., MAILIS-GAGNON, A., LIVSHITZ, A. & HARDEN, R. N. 2016. Complex regional pain syndrome: evidence for warm and cold subtypes in a large prospective clinical sample. *Pain*, 157, 1674-81.
- CARDILLO, C., KILCOYNE, C. M., CANNON, R. O., 3RD & PANZA, J. A. 2000. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension*, 35, 1237-41.
- CHAPLAN, S. R., BACH, F. W., POGREL, J. W., CHUNG, J. M. & YAKSH, T. L. 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 53, 55-63.
- CHENG, J. K. & JI, R. R. 2008. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. *Neurochem Res*, 33, 1970-8.
- CHO, C. W., NAHM, F. S., CHOI, E., LEE, P. B., JANG, I. K., LEE, C. J., KIM, Y. C. & LEE, S. C. 2016. Multicenter study on the asymmetry of skin temperature in complex regional pain syndrome: An examination of temperature distribution and symptom duration. *Medicine (Baltimore)*, 95, e5548.
- CLARK, D. 1999. 'Total pain', disciplinary power and the body in the work of Cicely Saunders, 1958-1967. *Soc Sci Med*, 49, 727-36.
- DAVIS, K. D., TREEDE, R. D., RAJA, S. N., MEYER, R. A. & CAMPBELL, J. N. 1991. Topical application of clonidine relieves hyperalgesia in patients with sympathetically maintained pain. *Pain*, 47, 309-317.
- DAWSON, L. F., PHILLIPS, J. K., FINCH, P. M., INGLIS, J. J. & DRUMMOND, P. D. 2011. Expression of  $\alpha$ 1-adrenoceptors on peripheral nociceptive neurons. *Neuroscience*, 175, 300-314.
- DE MOS, M., DE BRUIJN, A. G., HUYGEN, F. J., DIELEMAN, J. P., STRICKER, B. H. & STURKENBOOM, M. C. 2007. The incidence of complex regional pain syndrome: a population-based study. *Pain*, 129, 12-20.
- DE MOS, M., STURKENBOOM, M. C. & HUYGEN, F. J. 2009. Current understandings on complex regional pain syndrome. *Pain Pract*, 9, 86-99.
- DESMEDT, A., MARIGHETTO, A. & PIAZZA, P. V. 2015. Abnormal Fear Memory as a Model for Posttraumatic Stress Disorder. *Biol Psychiatry*, 78, 290-7.
- DILEK, B., YEMEZ, B., KIZIL, R., KARTAL, E., GULBAHAR, S., SARI, O. & AKALIN, E. 2012. Anxious personality is a risk factor for developing complex regional pain syndrome type I. *Rheumatol Int*, 32, 915-20.
- DIMOVA, V. & BIRKLEIN, F. 2018. [Complex regional pain syndrome (CRPS) : An update]. *Schmerz*, 32, 217-230.
- DIRCKX, M., STRONKS, D. L., VAN BODEGRAVEN-HOF, E. A., WESSELDIJK, F., GROENEWEG, J. G. & HUYGEN, F. J. 2015. Inflammation in cold complex regional pain syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand*, 59, 733-9.
- DRUMMOND, E. S., DAWSON, L. F., FINCH, P. M., BENNETT, G. J. & DRUMMOND, P. D. 2014. Increased expression of cutaneous alpha1-adrenoceptors after chronic constriction injury in rats. *J Pain*, 15, 188-96.
- DRUMMOND, P. D. 2004. Involvement of the sympathetic nervous system in complex regional pain syndrome. *Int J Low Extrem Wounds*, 3, 35-42.
- EBERLE, T., DOGANCI, B., KRAMER, H. H., GEBER, C., FECHIR, M., MAGERL, W. & BIRKLEIN, F. 2009. Warm and cold complex regional pain syndromes: differences beyond skin temperature? *Neurology*, 72, 505-12.

- ELLENBROEK, B. & YOUN, J. 2016. Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? *Dis Model Mech*, 9, 1079-1087.
- FARAVELLI, C., ALESSANDRA SCARPATO, M., CASTELLINI, G. & LO SAURO, C. 2013. Gender differences in depression and anxiety: the role of age. *Psychiatry Res*, 210, 1301-3.
- FELDMAN, S. I., DOWNEY, G. & SCHAFFER-NEITZ, R. 1999. Pain, negative mood, and perceived support in chronic pain patients: a daily diary study of people with reflex sympathetic dystrophy syndrome. *J Consult Clin Psychol*, 67, 776-85.
- GALLAGHER, J. J., TAJERIAN, M., GUO, T., SHI, X., LI, W., ZHENG, M., PELTZ, G., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2013. Acute and chronic phases of complex regional pain syndrome in mice are accompanied by distinct transcriptional changes in the spinal cord. *Mol Pain*, 9, 40.
- GEERTZEN, J. H., DE BRUIJN-KOFMAN, A. T., DE BRUIJN, H. P., VAN DE WIEL, H. B. & DIJKSTRA, P. U. 1998. Stressful life events and psychological dysfunction in Complex Regional Pain Syndrome type I. *Clin J Pain*, 14, 143-7.
- GROENEWEG, G., HUYGEN, F. J., CODERRE, T. J. & ZIJLSTRA, F. J. 2009. Regulation of peripheral blood flow in complex regional pain syndrome: clinical implication for symptomatic relief and pain management. *BMC Musculoskelet Disord*, 10, 116.
- GUARNIERI, M., BRAYTON, C., DETOLLA, L., FORBES-MCBEAN, N., SARABIA-ESTRADA, R. & ZADNIK, P. 2012. Safety and efficacy of buprenorphine for analgesia in laboratory mice and rats. *Lab Animal*, 41, 337.
- GUO, T. Z., OFFLEY, S. C., BOYD, E. A., JACOBS, C. R. & KINGERY, W. S. 2004. Substance P signaling contributes to the vascular and nociceptive abnormalities observed in a tibial fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*, 108, 95-107.
- GUO, T. Z., WEI, T., SHI, X., LI, W. W., HOU, S., WANG, L., TSUJIKAWA, K., RICE, K. C., CHENG, K., CLARK, D. J. & KINGERY, W. S. 2012. Neuropeptide deficient mice have attenuated nociceptive, vascular, and inflammatory changes in a tibia fracture model of complex regional pain syndrome. *Mol Pain*, 8, 85.
- GUTHMILLER, K. B. & DULEBOHN, S. C. 2017. Pain, Complex Regional Pain Syndrome (Reflex Sympathetic Dystrophy, RSD, CRPS). *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing StatPearls Publishing LLC.
- HARDEN, R. N., BRUEHL, S., PEREZ, R. S., BIRKLEIN, F., MARINUS, J., MAIHOFNER, C., LUBENOW, T., BUVANENDRAN, A., MACKEY, S., GRACIOSA, J., MOGILEVSKI, M., RAMSDEN, C., SCHLERETH, T., CHONT, M. & VATINE, J. J. 2010a. Development of a severity score for CRPS. *Pain*, 151, 870-6.
- HARDEN, R. N., BRUEHL, S., PEREZ, R. S. G. M., BIRKLEIN, F., MARINUS, J., MAIHOFNER, C., LUBENOW, T., BUVANENDRAN, A., MACKEY, S., GRACIOSA, J., MOGILEVSKI, M., RAMSDEN, C., CHONT, M. & VATINE, J.-J. 2010b. Validation of proposed diagnostic criteria (the "Budapest Criteria") for Complex Regional Pain Syndrome. *Pain*, 150, 268-274.
- HARDEN, R. N., BRUEHL, S., STANOS, S., BRANDER, V., CHUNG, O. Y., SALTZ, S., ADAMS, A. & STULBERG, S. D. 2003. Prospective examination of pain-related and psychological predictors of CRPS-like phenomena following total knee arthroplasty: a preliminary study. *Pain*, 106, 393-400.
- HARDEN, R. N., BRUEHL, S., STANTON-HICKS, M. & WILSON, P. R. 2007. Proposed new diagnostic criteria for complex regional pain syndrome. *Pain Med*, 8, 326-31.
- HARDEN, R. N., RUDIN, N. J., BRUEHL, S., KEE, W., PARIKH, D. K., KOOCH, J., DUC, T. & GRACEY, R. H. 2004. Increased systemic catecholamines in complex regional pain syndrome and relationship to psychological factors: a pilot study. *Anesth Analg*, 99, 1478-85; table of contents.
- HARDY, M. A. & MERRITT, W. H. 1988. Psychological evaluation and pain assessment in patients with reflex sympathetic dystrophy. *Journal of Hand Therapy*, 1, 155-164.
- HOLMES, T. H. & RAHE, R. H. 1967. The Social Readjustment Rating Scale. *J Psychosom Res*, 11, 213-8.

- JEON, S. G., CHOI, E. J., LEE, P. B., LEE, Y. J., KIM, M. S., SEO, J. H. & NAHM, F. S. 2014. Do severity score and skin temperature asymmetry correlate with the subjective pain score in the patients with complex regional pain syndrome? *Korean J Pain*, 27, 339-44.
- JI, R. R. & WOOLF, C. J. 2001. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol Dis*, 8, 1-10.
- KESSELE, J. & BARDENHEUER, H. 2018. Was ist das eigentlich, Schmerz? In: KIRSCH, J. (ed.) *Schmerz, lass' nach!: Eine Einführung in die Grundbegriffe der Schmerzmedizin*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- KINGERY, W. S., DAVIES, M. F. & CLARK, J. D. 2003. A substance P receptor (NK1) antagonist can reverse vascular and nociceptive abnormalities in a rat model of complex regional pain syndrome type II. *Pain*, 104, 75-84.
- KINGERY, W. S., GUO, T., AGASHE, G. S., DAVIES, M. F., CLARK, J. D. & MAZE, M. 2001. Glucocorticoid inhibition of neuropathic limb edema and cutaneous neurogenic extravasation. *Brain Res*, 913, 140-8.
- KOBAN, M., LEIS, S., SCHULTZE-MOSGAU, S. & BIRKLEIN, F. 2003. Tissue hypoxia in complex regional pain syndrome. *Pain*, 104, 149-57.
- KRUMOVA, E. K., FRETTLOH, J., KLAUENBERG, S., RICHTER, H., WASNER, G. & MAIER, C. 2008. Long-term skin temperature measurements - a practical diagnostic tool in complex regional pain syndrome. *Pain*, 140, 8-22.
- LAXMI, T. R., STORK, O. & PAPE, H. C. 2003. Generalisation of conditioned fear and its behavioural expression in mice. *Behav Brain Res*, 145, 89-98.
- LEHNER, M., WISLOWSKA-STANEK, A., MACIEJAK, P., SZYNDLER, J., SOBOLEWSKA, A., KRZASCIK, P. & PLAZNIK, A. 2010. The relationship between pain sensitivity and conditioned fear response in rats. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 70, 56-66.
- LEONARD, B. E. 2001. Stress, norepinephrine and depression. *J Psychiatry Neurosci*, 26 Suppl, S11-6.
- LERMAN, S. F., RUDICH, Z., BRILL, S., SHALEV, H. & SHAHAR, G. 2015. Longitudinal associations between depression, anxiety, pain, and pain-related disability in chronic pain patients. *Psychosom Med*, 77, 333-41.
- LETHEM, J., SLADE, P. D., TROUP, J. D. & BENTLEY, G. 1983. Outline of a Fear-Avoidance Model of exaggerated pain perception--I. *Behav Res Ther*, 21, 401-8.
- LI, W., SHI, X., WANG, L., GUO, T., WEI, T., CHENG, K., RICE, K. C., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2013. Epidermal adrenergic signaling contributes to inflammation and pain sensitization in a rat model of complex regional pain syndrome. *Pain*, 154, 1224-36.
- LI, W. W., GUO, T. Z., LI, X. Q., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2010. Fracture induces keratinocyte activation, proliferation, and expression of pro-nociceptive inflammatory mediators. *Pain*, 151, 843-52.
- LI, W. W., GUO, T. Z., SHI, X., SUN, Y., WEI, T., CLARK, D. J. & KINGERY, W. S. 2015. Substance P spinal signaling induces glial activation and nociceptive sensitization after fracture. *Neuroscience*, 310, 73-90.
- LI, W. W., SABSOVICH, I., GUO, T. Z., ZHAO, R., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2009. The role of enhanced cutaneous IL-1beta signaling in a rat tibia fracture model of complex regional pain syndrome. *Pain*, 144, 303-13.
- LIGHT, K. C., KOTHANDAPANI, R. V. & ALLEN, M. T. 1998. Enhanced cardiovascular and catecholamine responses in women with depressive symptoms. *Int J Psychophysiol*, 28, 157-66.
- MAIHOFNER, C. 2014. [Complex regional pain syndrome: A current review]. *Schmerz*, 28, 319-36; quiz 337-8.
- MELIA, K. R. & DUMAN, R. S. 1991. Involvement of corticotropin-releasing factor in chronic stress regulation of the brain noradrenergic system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 8382-8386.
- MOSELEY, G. L., HERBERT, R. D., PARSONS, T., LUCAS, S., VAN HILTEN, J. J. & MARINUS, J. 2014. Intense pain soon after wrist fracture strongly predicts who will develop complex regional pain syndrome: prospective cohort study. *J Pain*, 15, 16-23.

- NAM, T. S., YEON, D. S., LEEM, J. W. & PAIK, K. S. 2000. Adrenergic sensitivity of uninjured C-fiber nociceptors in neuropathic rats. *Yonsei Med J*, 41, 252-257.
- NELLANS, K. W., KOWALSKI, E. & CHUNG, K. C. 2012. The epidemiology of distal radius fractures. *Hand Clin*, 28, 113-25.
- NIEHOF, S. P., BEERTHUIZEN, A., HUYGEN, F. J. & ZIJLSTRA, F. J. 2008. Using skin surface temperature to differentiate between complex regional pain syndrome type 1 patients after a fracture and control patients with various complaints after a fracture. *Anesth Analg*, 106, 270-7, table of contents.
- NIEHOF, S. P., HUYGEN, F. J., VAN DER WEERD, R. W., WESTRA, M. & ZIJLSTRA, F. J. 2006. Thermography imaging during static and controlled thermoregulation in complex regional pain syndrome type 1: diagnostic value and involvement of the central sympathetic system. *Biomed Eng Online*, 5, 30.
- NUGENT, P. M. S. 2013. *CRITICAL LIFE EVENT* [Online]. PsychologyDictionary.org. Available: <https://psychologydictionary.org/critical-life-event/> [Accessed 31.01.2019].
- O'CONNELL, N. E., WAND, B. M., GIBSON, W., CARR, D. B., BIRKLEIN, F. & STANTON, T. R. 2016. Local anaesthetic sympathetic blockade for complex regional pain syndrome. *Cochrane Database Syst Rev*, 7, Cd004598.
- OH, J. Y., YU, B. H., HEO, J. Y., YOO, I., SONG, H. & JEON, H. J. 2015. Plasma catecholamine levels before and after paroxetine treatment in patients with panic disorder. *Psychiatry Res*, 225, 471-5.
- PATTINSON, K. T. 2008. Opioids and the control of respiration. *Br J Anaesth*, 100, 747-58.
- PERL, E. R. 1999. Causalgia, pathological pain, and adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 7664-7.
- POOLE, R. L., BRAAK, D. & GOULD, T. J. 2016. Concentration- and age-dependent effects of chronic caffeine on contextual fear conditioning in C57BL/6J mice. *Behavioural brain research*, 298, 69-77.
- RAJA, S. N., TREEDE, R. D., DAVIS, K. D. & CAMPBELL, J. N. 1991. Systemic alpha-adrenergic blockade with phentolamine: a diagnostic test for sympathetically maintained pain. *Anesthesiology*, 74, 691-8.
- RICHMOND 2005. Dame Cicely Saunders. *Bmj*, 33.
- ROUGHAN, J. V. & FLECKNELL, P. A. 2002. Buprenorphine: a reappraisal of its antinociceptive effects and therapeutic use in alleviating post-operative pain in animals. *Lab Anim*, 36, 322-43.
- SANDRONI, P., BENRUD-LARSON, L. M., MCCLELLAND, R. L. & LOW, P. A. 2003. Complex regional pain syndrome type I: incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. *Pain*, 103, 199-207.
- SCHATTSCHEIDER, J., HARTUNG, K., STENGEL, M., LUDWIG, J., BINDER, A., WASNER, G. & BARON, R. 2006. Endothelial dysfunction in cold type complex regional pain syndrome. *Neurology*, 67, 673-5.
- SCHLERETH, T., DRUMMOND, P. D. & BIRKLEIN, F. 2014. Inflammation in CRPS: role of the sympathetic supply. *Auton Neurosci*, 182, 102-7.
- SMITH, B. W. & ZAUTRA, A. J. 2008. The effects of anxiety and depression on weekly pain in women with arthritis. *Pain*, 138, 354-61.
- SMITH, E. A., SCHWARTZ, A. L. & LUCOT, J. B. 2013. Measurement of urinary catecholamines in small samples for mice. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 67, 45-9.
- SPECK, V., SCHLERETH, T., BIRKLEIN, F. & MAIHOFNER, C. 2017. Increased prevalence of posttraumatic stress disorder in CRPS. *Eur J Pain*, 21, 466-473.
- STRIGO, I. A., SIMMONS, A. N., MATTHEWS, S. C., CRAIG, A. D. & PAULUS, M. P. 2008. Association of major depressive disorder with altered functional brain response during anticipation and processing of heat pain. *Arch Gen Psychiatry*, 65, 1275-84.
- TAJERIAN, M., LEU, D., ZOU, Y., SAHBAIE, P., LI, W., KHAN, H., HSU, V., KINGERY, W., HUANG, T. T., BECERRA, L. & CLARK, J. D. 2014. Brain neuroplastic changes accompany anxiety and memory deficits in a model of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology*, 121, 852-65.

- TAJERIAN, M., SAHBAIE, P., SUN, Y., LEU, D., YANG, H. Y., LI, W., HUANG, T. T., KINGERY, W. & DAVID CLARK, J. 2015. Sex differences in a Murine Model of Complex Regional Pain Syndrome. *Neurobiol Learn Mem*, 123, 100-9.
- THACKER, M. A., CLARK, A. K., MARCHAND, F. & MCMAHON, S. B. 2007. Pathophysiology of peripheral neuropathic pain: immune cells and molecules. *Anesth Analg*, 105, 838-47.
- THALI, A. 1989. [Sudeck syndrome and its "psychosomatic disposition": a comparative clinico-psychologic study of the etiology in accident patients]. *Psychother Psychosom Med Psychol*, 39, 260-5.
- THIBODEAU, M. A., WELCH, P. G., KATZ, J. & ASMUNDSON, G. J. 2013. Pain-related anxiety influences pain perception differently in men and women: a quantitative sensory test across thermal pain modalities. *Pain*, 154, 419-26.
- TJOLSEN, A., ROSLAND, J. H., BERGE, O. G. & HOLE, K. 1991. The increasing-temperature hot-plate test: an improved test of nociception in mice and rats. *J Pharmacol Methods*, 25, 241-50.
- VAN DER WAL, S., CORNELISSEN, L., BEHET, M., VANEKER, M., STEEGERS, M. & VISSERS, K. 2015. Behavior of neuropathic pain in mice following chronic constriction injury comparing silk and catgut ligatures. *Springerplus*, 4, 225.
- VELDMAN, P. H., REYNEN, H. M., ARNTZ, I. E. & GORIS, R. J. 1993. Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: prospective study of 829 patients. *Lancet*, 342, 1012-6.
- VISSERS, K. & MEERT, T. 2005. A behavioral and pharmacological validation of the acetone spray test in gerbils with a chronic constriction injury. *Anesth Analg*, 101, 457-64, table of contents.
- WASNER, G., SCHATTSCHEIDER, J. & BARON, R. 2002. Skin temperature side differences--a diagnostic tool for CRPS? *Pain*, 98, 19-26.
- WASNER, G., SCHATTSCHEIDER, J., HECKMANN, K., MAIER, C. & BARON, R. 2001. Vascular abnormalities in reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): mechanisms and diagnostic value. *Brain*, 124, 587-99.
- WEI, T., GUO, T. Z., LI, W. W., KINGERY, W. S. & CLARK, J. D. 2016. Acute versus chronic phase mechanisms in a rat model of CRPS. *J Neuroinflammation*, 13, 14.
- WEI, T., LI, W. W., GUO, T. Z., ZHAO, R., WANG, L., CLARK, D. J., OAKLANDER, A. L., SCHMELZ, M. & KINGERY, W. S. 2009. Post-junctional facilitation of Substance P signaling in a tibia fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*, 144, 278-86.
- WOOLF, C. J. & SALTER, M. W. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science*, 288, 1765-9.

## Anhang

### Fear Conditioning Untersuchung Gruppenunterschiede

#### ANOVA Zeitpunkt Baseline

##### Einfaktorielle ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Geschlecht	Zwischen den Gruppen	4,283	16	,268	1,090	,374
	Innerhalb der Gruppen	24,802	101	,246		
	Gesamt	29,085	117			
Housing	Zwischen den Gruppen	3,946	16	,247	,983	,481
	Innerhalb der Gruppen	25,342	101	,251		
	Gesamt	29,288	117			

#### ANOVA Training

##### Einfaktorielle ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Geschlecht	Zwischen den Gruppen	8,014	27	,297	1,290	,205
	Innerhalb der Gruppen	13,805	60	,230		
	Gesamt	21,818	87			
Housing	Zwischen den Gruppen	8,276	27	,307	1,358	,162
	Innerhalb der Gruppen	13,543	60	,226		
	Gesamt	21,818	87			

#### ANOVA Reinstatement

##### Einfaktorielle ANOVA

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Geschlecht	Zwischen den Gruppen	3,470	18	,193	,691	,793
	Innerhalb der Gruppen	8,367	30	,279		
	Gesamt	11,837	48			
Housing	Zwischen den Gruppen	3,220	18	,179	,623	,853
	Innerhalb der Gruppen	8,617	30	,287		
	Gesamt	11,837	48			

## Deskriptive Statistik Sensibilitäts-und Verhaltenstests

### Von Frey

Statistiken

		Von Frey Test vor Fraktur rechts	Von Frey Test vor Fraktur links	Von Frey Test nach Fraktur rechts	Von Frey Test nach Fraktur links
N	Gültig	69	69	50	50
	Fehlend	60	60	79	79
Median		1,4000	1,4000	,2000	,8000
Standardabweichung		,59778	,52464	,26901	,40043
Varianz		,357	,275	,072	,160
Perzentile	25	1,0000	1,0000	,0700	,6000
	50	1,4000	1,4000	,2000	,8000
	75	1,4000	1,4000	,4000	1,0000

### Unweighting

Deskriptive Statistik

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert		Standardabweichung
	Statistik	Statistik	Statistik	Statistik	Standardfehler	Statistik
Unweighting vor Fraktur Differenz rechts-links	69	-1,4	1,6	-,070	,0770	,6397
Unweighting nach Fraktur (differenzkorrigiert)	48	-9,00	-1,40	-5,6000	,27444	1,90140
Unweighting 6 Wochen nach Fraktur (differenzkorrigiert)	53	-10,40	,00	-3,8566	,32592	2,37272
Gültige Werte (Listenweise)	46					

## Plantar

### Deskriptive Statistik

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert		Standardabweichung
	Statistik	Statistik	Statistik	Statistik	Standardfehler	Statistik
Plantar Test vor Fraktur Differenz rechts-links	69	-3,37	2,97	-,1101	,14528	1,20681
Plantar Test nach Fraktur (differenzkorrigiert)	48	-7,54	-,44	-3,1806	,22659	1,56989
Gültige Werte (Listenweise)	48					

## Ödem

### Deskriptive Statistik

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert		Standardabweichung
	Statistik	Statistik	Statistik	Statistik	Standardfehler	Statistik
Pfotendicke vor Fraktur rechts	59	1,76	3,48	2,4756	,05420	,41628
Pfotendicke vor Fraktur links	59	1,35	3,40	2,4021	,06432	,49407
Pfotendicke nach Fraktur rechts	55	1,35	5,33	3,1572	,14367	1,06546
Pfotendicke nach Fraktur links	55	,90	3,42	1,9007	,06603	,48966
Gültige Werte (Listenweise)	55					

## EPM

### Deskriptive Statistik

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert		Standardabweichung
	Statistik	Statistik	Statistik	Statistik	Standardfehler	Statistik
EPM Eintrittsfrequenz im offenen Arm	53	0	54	16,06	1,722	12,540
EPM Dauer im offenen Arm	53	,00	151,68	49,7570	5,34523	38,91383
Gültige Werte (Listenweise)	53					

## Open Field

### Deskriptive Statistik

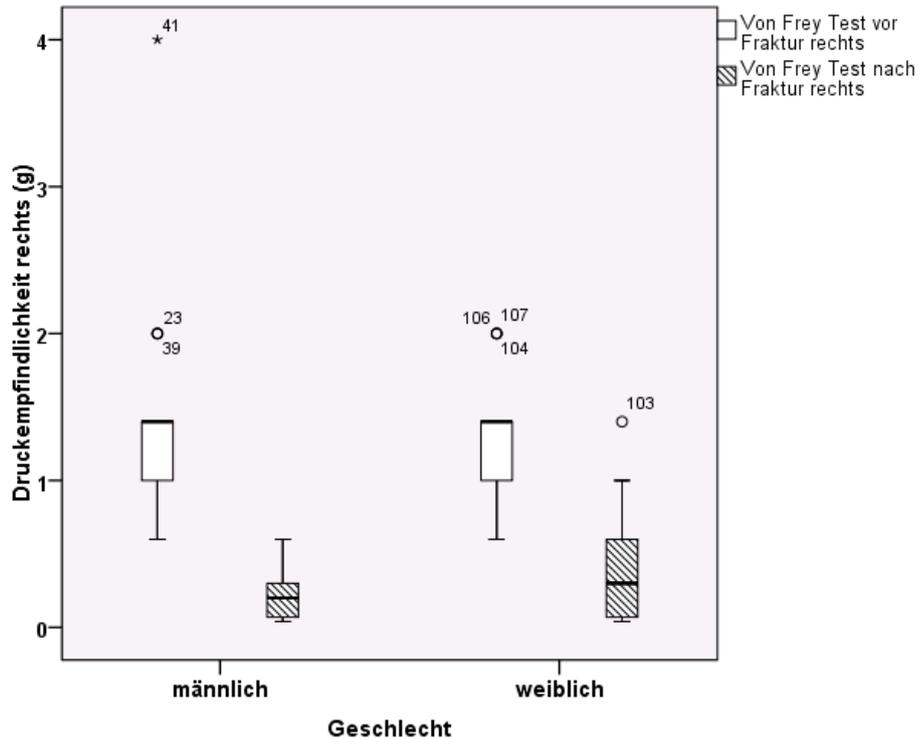
	N	Minimum	Maximum	Mittelwert		Standardabweichung
	Statistik	Statistik	Statistik	Statistik	Standardfehler	Statistik
Open Field Dauer im Zentrum	68	,00	118,00	22,6288	2,13443	17,60099
Gültige Werte (Listenweise)	68					

## Temperatur

### Deskriptive Statistik

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert		Standardabweichung
	Statistik	Statistik	Statistik	Statistik	Standardfehler	Statistik
Temperatur vor Fraktur rechts	68	24,48	29,77	26,2316	,12642	1,04252
Temperatur vor Fraktur links	68	24,57	31,17	26,1857	,14770	1,21797
Temperatur nach Fraktur rechts	55	24,47	32,32	28,2635	,25187	1,86792
Temperatur nach Fraktur links	55	24,53	31,45	28,0809	,25410	1,88448
Gültige Werte (Listenweise)	55					

## Von Frey Test Geschlechterunterschied



### Verarbeitete Fälle

		Fälle					
		Gültig		Fehlend		Gesamt	
		N	Prozent	N	Prozent	N	Prozent
Von Frey Test vor Fraktur rechts	männlich	32	51,6%	30	48,4%	62	100,0%
	weiblich	18	26,9%	49	73,1%	67	100,0%
Von Frey Test nach Fraktur rechts	männlich	32	51,6%	30	48,4%	62	100,0%
	weiblich	18	26,9%	49	73,1%	67	100,0%

### Statistiken

Geschlecht			Von Frey Test vor Fraktur rechts	Von Frey Test nach Fraktur rechts
männlich	N	Gültig	39	32
		Fehlend	23	30
	Median	1,4000	,2000	
	Standardabweichung	,70854	,16604	
	Varianz	,502	,028	
	Perzentile	25	1,0000	,0700
	50	1,4000	,2000	
	75	1,4000	,3500	
weiblich	N	Gültig	30	18
		Fehlend	37	49
	Median	1,4000	,3000	
	Standardabweichung	,40937	,36993	
	Varianz	,168	,137	
	Perzentile	25	1,0000	,0700
	50	1,4000	,3000	
	75	1,4000	,6000	

## Danksagung

Ich möchte meinen herzlichen Dank meinem Doktorvater aussprechen, der mich über die gesamte Phase hinweg gut betreut hat und diese Arbeit auf den richtigen Weg brachte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin ohne deren Fachkompetenz und Engagement diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Sie stand mir mit Rat und Tat zur Seite und hatte stets ein offenes Ohr für die Hürden mit denen ich mich konfrontiert sah.

Zudem möchte ich meinen Eltern für die finanzielle und mentale Unterstützung danken, die sie mir während des Medizinstudiums und darüber hinaus entgegenbrachten.

Außerdem danke ich meinem Freund, der mit mir viele gemeinsame Stunden in der Bibliothek verbrachte und mich stets motivierte.

