

Universität Ulm

Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie

Prof. Dr. med. H. Gündel

Sektion für Molekulare Psychosomatik

Prof. Dr. S.O. Reber

Individuelle Auswirkungen von Bissverletzungen auf die
Entstehung einer Glukokortikoid – Resistenz in Milzzellen
männlicher C57BL/6 – Mäuse unter dem Einfluss von
chronischem psychosozialen Stress

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

von Sandra Daniela Faller

- geboren in Memmingen -

2017

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Stefan Reber
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Holger Barth
Tag der Promotion:	18. Mai 2018

Für Julian

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Stress	1
1.1.1 Die interagierenden Stresssysteme	2
1.1.2 Das vegetative Nervensystem	2
1.1.3 Die HPA – Achse	2
1.2 Akute versus chronische Stressreaktion	4
1.2.1 Einfluss von akutem Stress auf das Immunsystem	4
1.2.2 Einfluss von chronischem Stress auf das Immunsystem	6
1.2.3 Das GC – Signalling	7
1.3 GC – Resistenz im Allgemeinen und insbesondere von CSC	9
1.4 Fragestellung	14
2 MATERIAL UND METHODEN	15
2.1 Material	15
2.2 Methoden	17
2.2.1 Tiere	17
2.2.2 Modell der chronisch subordinierten Koloniehaltung	17
2.2.3 Experimentelles Design	19
2.2.4 Dekapitierung und Entnahme der Milz	19
2.2.5 In vitro Stimulation der isolierten Milzzellen	20
2.2.6 Präparation des Fells und Anfertigen der Bildaufnahmen	22
2.2.7 Aufbereitung und Auswertung der Fellaufnahmen	23
2.2.8 Auswertung und Statistik	27
3 ERGEBNISSE	28
3.1 Vorversuche zur Etablierung eines Bisswundenscores	28
3.2 Etablierung der Milzzellstimulation am Standort Ulm	32
3.2.1 Absolutes Milzgewicht und Anzahl isolierter Milzzellen	32

3.2.2	Cell viability isolierter Milzzellen	33
3.2.3	GC – Resistenz isolierter Milzzellen	35
3.3	Analyse von Bissverletzungen nach 19 Tagen CSC	37
3.4	Effekte nach 19 Tagen CSC	39
3.4.1	Körpergewichtsentwicklung	39
3.4.2	Milzzellparameter	40
3.5	Bissverletzungen und Milzparameter nach 19 Tagen CSC	45
3.5.1	Bissverletzungen und absolutes Milzgewicht	46
3.5.2	Bissverletzungen und basale cell viability isolierter Milzzellen	47
3.5.3	Bissverletzungen und GC - Resistenz isolierter Milzzellen	48
3.6	Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse	49
4	DISKUSSION	50
4.1	Standardisierte Quantifizierung von Bisswunden mittels Score	50
4.1.1	Erarbeitung eines Protokolls zur Erfassung von Bisswunden	51
4.1.2	Erfolgreiche Etablierung des Bisswundenscores	52
4.2	Erfolgreiche Etablierung der Milzzellstimulation	53
4.3	Veränderungen nach 19 Tagen CSC	54
4.3.1	Ausmaß und Verteilung von Bissverletzungen	54
4.3.2	Körpergewichtsentwicklung	55
4.3.3	Absolutes und relatives Milzgewicht	56
4.3.4	Anzahl isolierter Milzzellen	58
4.3.5	Cell viability isolierter Milzzellen	61
4.3.6	GC – Resistenz isolierter Milzzellen	63
5	ZUSAMMENFASSUNG	72
6	LITERATURVERZEICHNIS	74
	ANHANG	82
	DANKSAGUNG	97
	LEBENS LAUF	99

Abkürzungsverzeichnis

11 β – HSD	11 β – hydroxysteroid dehydrogenase
ACK – Lyse – Puffer	Ammonium – Chlorid – Kalium – Lyse – Puffer
ACTH	adrenocorticotrophic hormone
ANOVA	two way analysis of variance
AP – 1	activator protein 1
BWAT	Bates – Jensen Wound Assessment Tool
CBG	corticosteroid binding globulin
CD	cluster of differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
CORT	Kortikosteron (corticosterone)
CRH	corticotropin – releasing hormone
CSC	Chronisch subordinierte Koloniehaltung (chronic subordinate colony housing)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleinacid)
E. coli	Escherichia coli O111:B4
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPM	elevated plus – maze
EtOH	Ethanol
FCS	fetal calf serum
FKBP51	FK51 binding protein
GC	Glukokortikoide (glucocorticoids)
GR	Glukokortikoidrezeptor
GRE	glucocorticoid responsive elements
HBSS	Hanks´ balanced salt solution
HPA - Achse	Hypothalamus – Hypophysen – Nebennierenrinden – Achse (hypothalamo – pituitary – adrenocortical axis)
hsp	Hitzeschockprotein
IFN – γ	Interferon γ
IL – 4	Interleukin 4
IL – 6	Interleukin 6
IL – 10	Interleukin 10

IL – 13	Interleukin 13
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KM	Knochenmark
LDB	light – dark box
LPS	Lipopolysaccharid
MDSCs	myeloid derived suppressor cells
MR	Mineralokortikoidrezeptor
MTS	CellTiter 96 [®] A _{queous} One Solution Cell Proliferation Assay
NA	Noradrenalin
Na ₂ EDTA	Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure
NAD(P)H	Nicotinamid – Adenin – Dinukleotid (Phosphat)
NaOH	Natriumhydroxid
NFκB	nuclear factor kappa light chain enhancer‘ of activated B – cells
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NN	Nebennieren
NNR	Nebennierenrinde
PES	Phenazin Ethosulfat
PF	Stressmodell „paired fighting”
PTBS	Posttraumatische Belastungsstörung
PUSH	Pressure Ulcer Scale for Healing
RPMI	Zellkulturmedium benannt nach Roswell Park Memorial Institute
RST	Stressmodell „restraint stress“
SDR	Stressmodell „social disruption“
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SHC	Einzel gehaltenen Kontrolltiere (single housed controls)
SRO	Stressmodell „social reorganization”
Th2 – Lymphozyten	T – Helfer – Lymphozyten Subtyp 2
TLR	toll – like – receptor
TNF – α	Tumornekrosefaktor α
Tregs	Regulatorische T – Zellen

1 Einleitung

1.1 Stress

Stress spielt in der heutigen Gesellschaft in verschiedensten Lebensbereichen, wie auch Alters - und Gesellschaftsschichten eine äußerst bedeutsame Rolle. Eine 2009 durchgeführte Bevölkerungsbefragung der Techniker Krankenkasse von 1014 Befragten zu „Ausmaß, Ursachen und Auswirkungen von Stress in Deutschland“ ergab, dass acht von zehn Befragten intermittierend unter Stress leiden. Etwa 30% der Befragten äußerten, „häufig oder sogar ständig unter Druck“ zu stehen [31, S. 12].

Eine 2013 erhobene Studie (n=5793) erfasste eine Prävalenz „starker Belastung durch chronischen Stress“ von 11% in einer Altersgruppe der 18 bis 64 – Jährigen [34, S. 750]. Frauen zeigten hierbei mit 13,9% eine signifikant höhere Prävalenz als die männlichen Befragten (8,2%). Auch ein niedriger sozioökonomischer Status und insbesondere ein geringes Maß an sozialer Unterstützung führten zu einer überdurchschnittlich hohen Stressbelastung [34].

Allerdings stellt Stress für die Menschen im 21. Jahrhundert nicht nur eine allgegenwärtige Alltagsbelastung dar. Auch in der Pathogenese verschiedenster Erkrankungen spielt der Einfluss von chronischem Stress eine mittlerweile anerkannte Rolle mit enormer Belastung für das Gesundheitssystem. Neben somatischen Krankheitsbildern wie Infektionen [44, 58], Wundheilungsstörungen [45, 54] sowie kardiovaskulären Erkrankungen [59, 68] zählen hierzu auch psychische Erkrankungen wie die Depression [48, 87] und Angststörungen [43].

Genauere Untersuchungen, über welche Veränderungen der Zusammenhang zwischen Stress und Krankheiten im Organismus vermittelt wird, sind hinsichtlich der Prävention sowie der Behandlung verschiedenster Krankheitsbilder von enormer klinischer Relevanz. Der Einfluss von Stress induziert über die Aktivierung eines körpereigenen Stresssystems Veränderungen unterschiedlichster Organfunktionen. Der nachfolgende Abschnitt soll dem Leser einen grundlegenden Überblick über die Komponenten dieses Stresssystems und deren Funktionsweisen verschaffen.

1.1.1 Die interagierenden Stresssysteme

Das Stresssystem setzt sich aus zwei interagierenden Komponenten zusammen. Einerseits dem vegetativen Nervensystem, primär vertreten durch das sympathische Nervensystem, und andererseits der Hypothalamus – Hypophysen – Nebennierenrinden – Achse (*hypothalamo – pituitary – adrenocortical (HPA) axis*). Beide werden durch übergeordnete Strukturen des zentralen Nervensystems kontrolliert, entfalten ihre peripheren Wirkungen allerdings über unterschiedliche Mechanismen [92]. Das Zusammenspiel der aufgeführten Regulationssysteme dient unter kurzfristiger Stressexposition einer physiologischen, wie auch emotionalen Anpassung des Organismus.

1.1.2 Das vegetative Nervensystem

Das vegetative Nervensystem besteht aus den drei Bestandteilen sympathisches, parasympathisches und enterisches Nervensystem, wobei die beiden Bestandteile Sympathikus und Parasympathikus nahezu alle Organe des Körpers innervieren.

Durch ihre meist gegensätzliche Wirkung auf die Organfunktion wurde der Begriff des „funktionellen Antagonismus“ geprägt. Hierbei liegt dem trophotrop wirksamen Parasympathikus im Sinne des „*rest and digest*“ - Prinzips eine Regenerationsfunktion zu Grunde, während der Sympathikus über seine ergotrope Funktion eine Leistungssteigerung im Rahmen der sogenannten „*fight or flight*“ - Reaktion vermittelt. Dies unterstreicht die wichtige Rolle des Sympathikus unter akuter Stressexposition [33].

Die Kontrolle des vegetativen Nervensystems erfolgt über ein komplexes Netzwerk aus zentralen Strukturen, in welchem der Hypothalamus eine bedeutsame Funktion einnimmt [37].

Während über das autonome Nervensystem eine schnelle Anpassung erfolgt, setzt die über die HPA – Achse vermittelte, hormonale Stressantwort vergleichsweise langsam ein [50].

1.1.3 Die HPA – Achse

Die HPA – Achse stellt neben dem sympathischen Nervensystem die zweite Komponente des Stresssystems dar. Über eine kaskadenartige Verschaltung der zentralen Strukturen Hypothalamus und Hypophyse wird durch die Hormone *corticotropin – releasing hormone* (CRH) und *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH) die systemische Freisetzung von Glukokortikoiden (*glucocorticoids*; GC) aus der Nebennierenrinde (NNR) stimuliert. Dabei regulieren GC über negative Feedback – Schleifen auf den Ebenen des Hippocampus, des Hypothalamus und der Hypophyse ihre eigene Freisetzung; ein bedeutsamer Mechanismus,

welcher den Körper vor überschießender Aktivität der HPA – Achse schützt. Neben dem Einfluss von Stress wird die Sekretion von GC unter basalen Bedingungen durch eine zirkadiane Rhythmik bestimmt. Unter physiologischen Bedingungen erreichen GC ihre maximale Konzentration im Blut zu Beginn der Wachphase [13, 73].

Lipophile GC bilden gemeinsam mit Mineralokortikoiden und Sexualhormonen die Familie der Steroidhormone [13], wobei von Menschen vorwiegend Kortisol und von Nagern überwiegend Kortikosteron (*corticosterone*; CORT) als Hauptglukokortikoid synthetisiert wird [36].

Freigesetzte GC werden im Blut entweder an ein Carrierprotein, das *corticosteroid binding globulin* (CBG) oder an Albumin gebunden transportiert, wobei lediglich ungebundene GC biologisch aktiv sind, was im Blut einem Anteil von etwa 5 % entspricht [61]. Des Weiteren spielen Enzyme aus der Familie der *11 β – hydroxysteroid dehydrogenasen* (11 β – HSD) eine wichtige Rolle für die biologische Verfügbarkeit der GC. Während die 11 β – HSD Typ 1 humanes Kortison in die aktive Form Kortisol umwandelt und somit die biologische Verfügbarkeit von GC steigert, senkt die 11 β – HSD Typ 2 die Aktivität von GC durch enzymatische Umwandlung von Kortisol zu Kortison. Gleiches Prinzip gilt in Nagetieren, in welchen CORT die biologisch aktive Form ist, wohingegen 11 – Dehydrokortikosteron die inaktive Form bildet [19].

Ihre Wirkung vermitteln GC über die Bindung an intrazelluläre Rezeptoren. Es bestehen zwei Subtypen, der Mineralokortikoidrezeptor (MR) und der Glukokortikoidrezeptor (GR), welche hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung sowie ihrer Affinität zu GC Unterschiede aufweisen. MR kommen vor allem in mineralokortikoidsensitiven Organen wie der Niere und dem Pankreas, aber auch im zentralen Nervensystem vor. Sie sind bereits bei niedrigen GC - Konzentrationen besetzt und vermitteln unter basalen Bedingungen vor allem über den Hippocampus die negative Feedbackschleife der GC. Im Gegensatz dazu vermitteln ubiquitär exprimierte GR die Wirkungen von hohen endogenen GC - Konzentrationen und spielen somit beim negativen Feedback – Mechanismus während des zirkadianen Peaks sowie unter dem Einfluss von Stress eine bedeutende Rolle [13, 18, 39, 74].

In inaktiver Form sind die Rezeptoren als Multirezeptorkomplex an Hitzeschockproteine (hsp) wie hsp90 und hsp70, sowie an Immunophiline wie *FK51 binding protein* (FKBP51) beziehungsweise FKBP52 gebunden. Die Bindung von Steroidhormonen bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors und ermöglicht die Einwanderung des Liganden – Rezeptor – Komplexes in den Zellkern. In Form von Homo – oder Heterodimeren erfolgt die Bindung an spezifische Promotorregionen, den *glucocorticoid responsive elements*

(GREs), wodurch entsprechende Zielgene entweder vermehrt oder vermindert exprimiert werden. Eine direkte Interaktion mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren ist ebenfalls möglich [61, 93]. Neben der langsam vermittelten, Genom abhängigen Wirkung von GC werden schnelle, Genom unabhängige Effekte durch Bindung an membranständige G – Protein - gekoppelte Rezeptoren diskutiert [91].

1.2 Akute versus chronische Stressreaktion

Welche spezifische Wirkung von GC vermittelt wird, ist unter anderem abhängig vom entsprechenden Zielgewebe. Die übergeordnete Aufgabe besteht darin, körpereigene Parameter optimal an sich verändernde Einflüsse anzupassen und eine bestmögliche körperliche Leistungsfähigkeit zu garantieren. Unter dem Einfluss von Stress, laut Hans Selye die nichtspezifische Antwort des Körpers auf jegliche Anforderung [51, 83], wird dieser adaptive Prozess auch durch den Begriff „*allostasis*“ beschrieben. Im Gegensatz dazu bezeichnet „*allostatic load*“ die schädigende Belastung des Körpers durch Stress, welche bei dauerhaft anhaltender Abweichung der Parameter von ihrem physiologischen Normalbereich entstehen kann [69]. Welche langfristigen Effekte durch GC vermittelt werden, hängt somit stark von deren Kinetik ab.

Vor allem in Bezug auf das Immunsystem besteht ein bidirektionaler Effekt in Abhängigkeit von der Dauer, aber auch der Intensität des zu Grunde liegenden Stressors.

1.2.1 Einfluss von akutem Stress auf das Immunsystem

Unter dem Einfluss von akutem Stress vermitteln die oben genannten Stresssysteme über die Wirkung von Katecholaminen und GC eine Aktivierung des Immunsystems.

Beispielhaft stellten Dhabhar *et al.* fest, dass eine kurzfristige, im Zeitraum von etwa zwei Stunden liegende, physiologische Erhöhung von Noradrenalin (NA) und vor allem von CORT eine gesteigerte Immunaktivität bewirkt. Dies zeigte sich in männlichen Ratten an einer verstärkten kutanen Hypersensibilisierungsreaktion sowie einer gesteigerten Einwanderung von Lymphozyten in regionale Lymphknoten nach Antigenexposition über die Haut [24].

Nachfolgende Abbildung skizziert immunologische Veränderungen unter akuter Stressexposition mit besonderem Hinblick auf Leukozyten. Freigesetztes NA führt zu einer verstärkten Proliferation und Auswanderung von Leukozyten aus dem Knochenmark (KM),

der Milz und der Lunge in das Blut – und Lymphsystem. Die zeitlich versetzte Ausschüttung von GC vermittelt die Umverteilung der Leukozyten in periphere Gewebe, in welchen unter akuter Stressexposition eine erhöhte Gefahr für Verletzungen oder Infektionen besteht. Entscheidend sind dabei die gegensätzlichen Effekte, welche aus der erhöhten Immunaktivierung resultieren. Während eine verbesserte Abwehrfunktion des Körpers gegenüber Verletzungen oder Infektionen, für welche unter akuter Stressexposition ein erhöhtes Risiko besteht, als adaptive Schutzfunktion im Sinne des „Allostasekonzeptes“ gesehen werden kann, wird gleichzeitig das Risiko für Entzündungen und Autoimmunerkrankungen durch eine übermäßige Immunaktivität erhöht [22, 23].

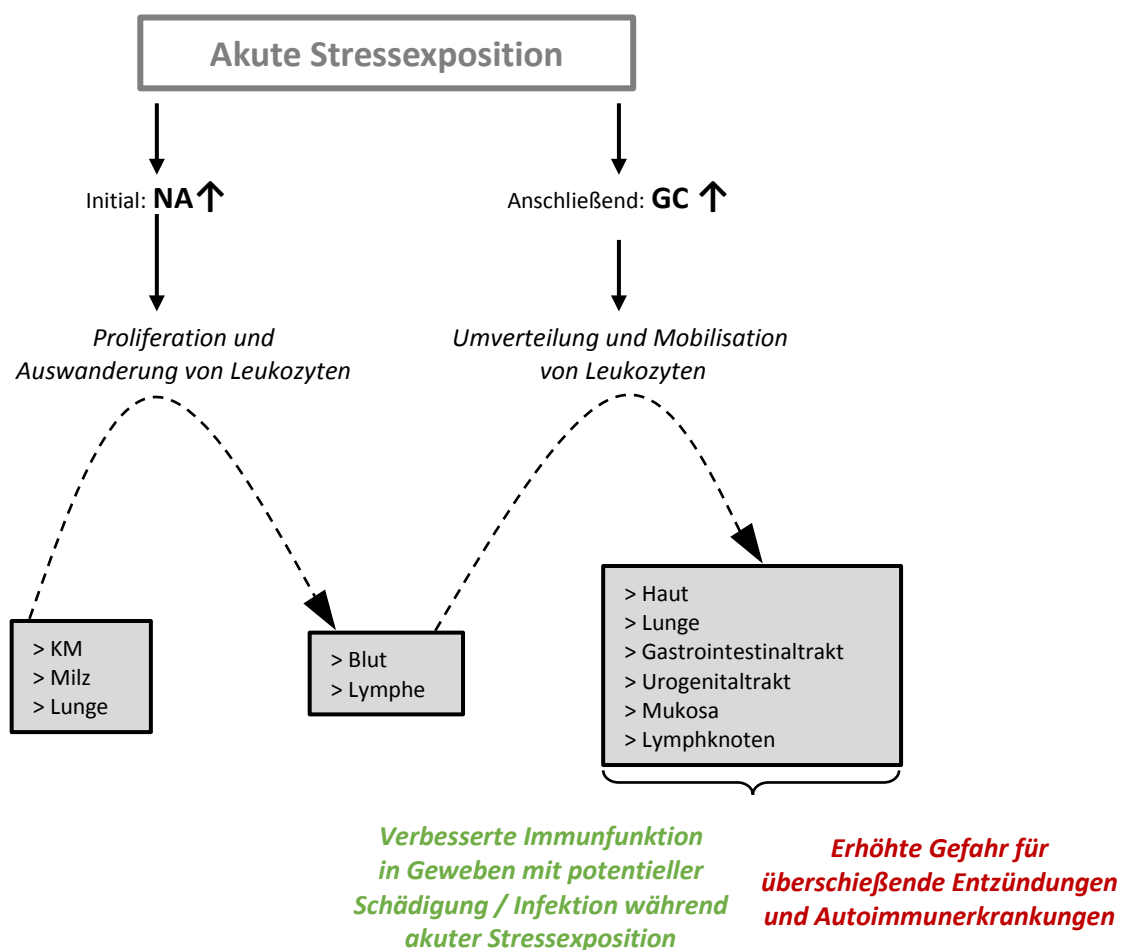


Abbildung 1: Schematische Darstellung immunologischer Veränderungen nach akuter Stressexposition

Neben einer verbesserten Abwehrfunktion in potenziell gefährdeten Organen (grün) erhöht die gesteigerte immunologische Aktivität jedoch auch das Risiko für überschießende Entzündungen und Autoimmunerkrankungen (rot).

NA = Noradrenalin, GC = Glukokortikoide, KM = Knochenmark

1.2.2 Einfluss von chronischem Stress auf das Immunsystem

Im Gegensatz zu einer gesteigerten immunologischen Aktivität unter akuter Stressexposition steht der inhibitorische Einfluss auf das Immunsystem, wenn der auslösende Stressor besonders langanhaltend oder mit hoher Intensität auf den Körper einwirkt. Chronisch erhöhte Plasmakonzentrationen sowie pharmakologische Dosen von GC vermitteln ihre immunsuppressive und antiinflammatorische Wirkung über verschiedene Mechanismen.

Beispielsweise versteht man unter dem Begriff „Transrepression“ die Genom - unabhängige Bindung von monomeren GR an Transkriptionsfaktoren wie dem *nuclear factor kappa – light – chain – enhancer‘ of activated B – cells* (NFκB) oder dem *activator protein 1* (AP – 1) [13], woraufhin deren proinflammatorische Aktivität gehemmt wird. Mittels direkter genomischer Interaktion mit der Desoxyribonukleinsäure (*desoxyribonucleinacid*; DNA) wird die Synthese proinflammatorischer Mediatoren wie der Phospholipase A2 oder der Cyclooxygenase gehemmt [65]. Auch die Zytokinexpression wird beeinflusst. So verschiebt die Gabe des hochpotenten, synthetischen GC Dexamethason das Muster von proinflammatorischen Zytokinen wie Tumornekrosefaktor α (TNF – α) und Interferon γ (IFN – γ) zu Gunsten deren antiinflammatorischer Gegenspieler wie Interleukin 4 (IL – 4), Interleukin 10 (IL – 10) und Interleukin 13 (IL – 13) [46].

Während die kurzfristige, physiologische Erhöhung von CORT die Sensibilisierungsreaktion in männlichen Ratten nach Antigenexposition steigerte, führten eine chronische Verabreichung von CORT über sechs Tage oder eine Hochdosisgabe von CORT oder Dexamethason zu einer reduzierten Reaktion auf eine kutane Antigenexposition [24]. Des Weiteren zeigt sich die verminderte Immunfunktion unter dem Einfluss von chronischem Stress am Beispiel der Haut anhand einer erhöhten Inzidenz kutaner Plattenepithelkarzinome [76] sowie durch eine kompromittierte Wundheilung mit reduzierter Einwanderung von Immunzellen in eine Wunde [60].

Ähnlich wie im Rahmen von kurzfristig erhöhten GC – Konzentrationen stehen sich auch unter dem Einfluss langfristig erhöhter oder pharmakologischer Konzentrationen von GC unterschiedliche Effekte gegenüber. Somit sinkt im Vergleich zur akuten Stressexposition die Gefahr für Entzündungszustände und Autoimmunprozesse, während durch die reduzierte körpereigene Abwehrfunktion das Risiko für Infektionen oder Neoplasien steigt.

Die für den Organismus entscheidende Frage lautet, wo sich zwischen diesen beiden Extremen unter dem Einfluss von chronischem Stress und langfristig veränderten

GC – Signalwegen ein Gleichgewicht einstellt und in wie weit dadurch die Entstehung von Krankheiten begünstigt wird.

Bei vielen Krankheiten, die in Zusammenhang mit chronischem Stress gebracht werden, wird eine erhöhte Sekretion von GC im Sinne einer chronisch überaktiven HPA – Achsen – Aktivität gemessen. Hierzu zählen beispielsweise Infektionserkrankungen des oberen Atemwegssystems [38] oder das Erleiden eines akuten Herzinfarktes [62], aber auch psychiatrische Krankheitsbilder wie die Depression [21, 42].

Im Gegensatz zu dieser lange angenommenen Meinung, chronischer Stress mache über eine Überaktivität der HPA – Achse und anhaltende Überproduktion von GC krank, deklarieren Raison und Miller eine insgesamt verminderte GC – Signalweiterleitung (GC - Signalling) als eine mögliche Ursache für die Pathogenese verschiedener, insbesondere chronisch entzündlicher Krankheiten unter dem Einfluss von chronischem Stress [75]. Sowohl im Bereich der GC – Freisetzung, als auch im Bereich der GC – Wirkung finden ihrer Meinung nach adaptive Veränderungen statt, welche die immunsuppressiven Effekte von anhaltend hohen beziehungsweise pharmakologischen GC – Dosen beschränken.

1.2.3 Das GC – Signalling

Für dieses Zusammenspiel zwischen GC – Freisetzung aus der NNR und GC – Wirkung in verschiedensten Geweben des Körpers definierten Raison und Miller den Begriff „GC – Signalling“. Insuffizientes GC – Signalling umfasst dabei jeden Zustand, „in which the signalling capacity of glucocorticoids is inadequate to restrain relevant stress – responsive systems“ [67, S. 1555]. Zwei Mechanismen oder deren Kombination führen dabei zum Zustand des insuffizienten GC – Signallings. Einerseits eine verminderte hormonale Bioverfügbarkeit von Steroiden im Sinne eines „Hypocorticismus“ oder andererseits eine reduzierte Sensitivität von GC – Rezeptoren mit vermindertem Ansprechen verschiedener Gewebe auf GC [67].

Raisons und Millers Hypothese – Krankheitsentstehung durch reduzierte hormonale Bioverfügbarkeit von GC unter dem Einfluss von chronischem Stress – wird durch unterschiedliche Studien gestützt. Zu Erkrankungen, welche in Zusammenhang mit einem basalen Hypocorticismus stehen, gehören beispielsweise die Posttraumatische Belastungsstörung (PTBS) [102], das chronische Erschöpfungssyndrom [20], die Fibromyalgie [15] sowie Idiopathische Schmerzsyndrome [94]. Im Gegensatz dazu steht bei der Major Depression eine verminderte Sensitivität von GC – Rezeptoren im Fokus der

Pathogenese, ein Zustand, der in Zusammenhang mit einer vermehrten Expression proinflammatorischer Zytokine steht und durch ein vermindertes negatives Feedback von GC auf höherliegende zentrale Regulationsstrukturen zu Störungen innerhalb der HPA – Achse führt [49, 53, 64, 67].

Eine reduzierte Sensitivität von Rezeptoren bis hin zur einer Resistenz gegenüber GC liegt jedoch nicht nur auf Grund der Pathogenese oben genannter Erkrankung im Fokus aktueller Forschung. Auch in der medikamentösen Therapie allergischer oder entzündlicher Erkrankungen mit synthetischen GC wird dieser Mechanismus beobachtet und birgt für die betroffenen Patienten große Gefahren mit möglicherweise lebensgefährlichen Folgen. Beispielhaft für eine allergische Erkrankung ist das Schwere Asthma. Eine gesteigerte Zytokin – und Chemokinproduktion in Alveolarmakrophagen insbesondere schwer betroffener Patienten trotz des Einflusses von GC spricht für eine reduzierte Ansprechrate auf deren antiinflammatorischen Effekte [11]. Auch in Bezug auf die Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (*chronic obstructive pulmonary disease*, COPD) wurde ein reduziertes Ansprechen auf den inhibitorischen Einfluss von Dexamethason in Alveolarmakrophagen nachgewiesen [17], ein Zustand, welcher jedoch durch die Gabe von Theophyllin positiv beeinflusst werden kann [14].

Die aufgeführten Krankheiten sowie therapeutischen Probleme verdeutlichen, welche große klinische Relevanz hinter dem Begriff der „GC – Resistenz“ steht. Intensive Forschung ist notwendig, um ursächliche Mechanismen zu untersuchen, Screeningmethoden für ein frühzeitiges Erkennen gefährdeter Patienten zu etablieren und mögliche therapeutische Ansätze zu entwickeln.

Der nächste Abschnitt vermittelt dem Leser einen Überblick über bisherige tierexperimentelle Erkenntnisse zur Entstehung der GC – Resistenz unter dem Einfluss von chronischem Stress. Besonderer Fokus soll dabei auf Veränderungen von Immunzellen der Milz gelegt werden.

1.3 GC – Resistenz im Allgemeinen und insbesondere von CSC

Die Ausbildung einer GC – Resistenz wurde tierexperimentell in verschiedensten Stressmodellen untersucht. Während alle der nachfolgend genannten Stressmodelle einen adäquaten Stressor darstellen, um in den untersuchten Mäusen eine HPA – Achsenaktivierung mit erhöhten Plasma – CORT – Werten zu induzieren, kann die Entstehung einer GC – Resistenz nicht in jedem Modell beobachtet werden.

Bereits im Jahr 2000 zeigten Sheridan *et al.* eine erhöhte Mortalität in männlichen C57BL/6 – Mäusen auf die nasale Applikation von A/PR8 Viren nach SRO – Exposition (Stressmodell „*social reorganization*“; *Neuorganisation der sozialen Hierarchie in einer bestehenden Population aus fünf Tieren durch Austausch der jeweils dominanten Maus für insgesamt vier Zyklen über einen Zeitraum von acht Nächten*) im Vergleich zu RST – Tieren (Stressmodell „*restraint stress*“; *16-stündige Immobilisation während der Wachphase in vier aufeinanderfolgenden Nächten*). Ursächlich konnten sie eine verminderte *in vitro* Sensitivität von isolierten, Concanavalin A stimulierten Milzzellen auf CORT nach SRO – Exposition nachweisen. Die somit gestörte Immunregulation führte zu einer zellvermittelten Entzündung in den Lungen der betroffenen Tiere und folglich zu einer erhöhten Mortalität [35, 84]. Während RST als rein physischer Stressor keine GC – Resistenz vermittelt [66, 84], führen andere Modelle mit zusätzlicher psychosozialer Stresskomponente zur Entstehung der GC – Resistenz. Neben dem SRO – Paradigma lässt sich dieser Effekt auch in den Modellen SDR (Stressmodell „*social disruption*“; *2-stündiges Einbringen eines aggressiven Eindringlings in eine bestehende Population aus fünf Tieren in insgesamt 6 Zyklen über einen Zeitraum von einer Woche*) und PF (Stressmodell „*paired fighting*“; *30-minütiges Zusammenbringen eines Tieres mit einem Angreifer für insgesamt 6 Zyklen über einen Zeitraum von einer Woche*) beobachten [5, 84, 89].

Ein weiteres, klinisch relevantes Tiermodell für die nähere Untersuchung eines veränderten GC – Signallings stellt das von Reber *et al.* entwickelte Modell der chronisch subordinierten Koloniehaltung (*chronic subordinate colony housing*, CSC) dar [51, 71, 81]. Im Gegensatz zu den bisher genannten Paradigmen bietet das CSC – Modell jedoch durch seine 19-tägige Laufzeit die Gelegenheit, Veränderungen in der GC – Signaltransduktion auch nach längerfristiger Stressexposition zu betrachten.

Chronisch psychosozialer Stress, welcher auf männliche C57/BL6 – Mäuse während ihrer Exposition im CSC einwirkt, erhöht das Risiko für diverse affektive wie somatische

Pathologien in den gestressten Tieren im Vergleich zu einzeln gehaltenen Kontrolltieren (*single housed controls*, SHC). Beispielhaft seien ein verstärktes Angstverhalten auf der *elevated plus – maze* (EPM) [71, 86] oder in der *light – dark box* (LDB) [72] sowie die Entstehung einer Kolitis [71] oder ein erhöhtes Darmkrebsrisiko [63] nach 19 Tagen CSC genannt.

Erwartungsgemäß lassen sich in CSC – Tieren auch Stress induzierte Veränderungen im Bereich der HPA – Achse nachweisen. Eine Zellhyperplasie vermittelte Zunahme der absoluten Organgewichte von Hypophyse und Nebennieren (NN) sowie eine erhöhte ACTH – Konzentration im Plasma sprechen für Veränderungen auf verschiedenen Ebenen der Stressachse nach CSC – Exposition [28, 30]. Vergleichbare morgendliche Plasma – CORT – Spiegel zwischen SHC und CSC – Tieren und eine verminderte *in vitro* Sensitivität von NN – Zellen auf ACTH in gestressten Tieren deuten auf möglicherweise adaptive Anpassungsvorgänge zum Schutz vor systemischen Auswirkungen einer überschießenden GC – Aktivität hin. Zudem wird in CSC – Tieren eine Störung der zirkadianen GC – Ausschüttung mit fehlendem Anstieg der Blutkonzentration von CORT zu Beginn der Wachphase beobachtet, was für ein verändertes GC – Signalling durch basalen Hypocorticismus nach 19-tägiger CSC – Exposition spricht [71].

Neben einem Hypocorticismus lässt sich in Tieren nach CSC – Exposition zudem eine verminderte GC – Sensitivität als zweite Komponente eines gestörten GC – Signallings nachweisen. So ist der eigentlich inhibitorische Effekt von CORT auf die Zellaktivität isolierter Gesamtmilzzellen nach *in vitro* Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) in CSC – Tieren im Vergleich zu den Kontrollen abgeschwächt [71]. Zudem zeigten Schmidt *et al.* eine reduzierte *in vitro* GC – Sensitivität in anti – CD3 stimulierten T – Lymphozyten nach Isolation aus peripheren Lymphknoten von CSC – Tieren. Die GC – Resistenz entwickelte sich dabei in Abhängigkeit vom Subtyp der T – Lymphozyten. Während die Produktion der Zytokine TNF – α , Interleukin 6 (IL – 6) und IFN γ durch die Hinzugabe von Dexamethason erfolgreich gehemmt wurde, reagierten IL – 4 und IL – 10 produzierende T – Lymphozyten insensitiv auf die supprimierende Wirkung von Dexamethason, was für die Ausbildung einer GC – Resistenz speziell in Th2 – Lymphozyten (T – Helfer – Lymphozyten Subtyp 2) nach 19-tägiger CSC Exposition spricht [81].

Durch die Einschränkung der normalerweise immunmodulierenden Effekte von GC zeigt sich ein immunologisches Ungleichgewicht zu Gunsten einer vermehrten Entzündungsaktivität in CSC – Tieren im Vergleich zu den nicht gestressten Kontrollen [51]. Neben der Entstehung einer spontanen Kolitis sprechen eine vermehrte *in vitro*

Zytokinsekretion von mesenterialen Lymphknotenzellen nach anti – CD3 Stimulation [71], ein Abfall regulatorischer T – Lymphozyten sowie eine gesteigerte Reaktivität von T – Lymphozyten aus peripheren Lymphknoten für eine verstärkte immunologische Aktivität. Diese wird zudem durch eine erhöhte Zellzahl an B – Lymphozyten in Lymphknoten sowie eine Zunahme von Keimzentren und Sekundärfollikeln in der Milz unterstrichen [81].

Dabei stellt die chronisch subordinierte Koloniehaltung nicht das einzige Tiermodell dar, in welchem durch den Einfluss von chronischem Stress eine systemische Entzündungsreaktion induziert wird. Quan *et al.* zeigten, dass Tiere auch nach oben erwähnter SDR - Exposition auf Grund massiver, entzündlich bedingter Schäden in diversen Organen eine erhöhte Mortalität während eines durch LPS – Gabe induzierten endotoxischen Schocks aufweisen [66]. Eine reduzierte Translokation des GR – Proteins vom Zellplasma in den Kern nach Hinzugabe von CORT in isolierten Splenozyten aus SDR – Tieren spricht für ein gestörtes GC – Signalling als Ursache für die beobachtete Hyperinflammation [65].

In Bezug auf das SDR – Paradigma wurden bereits einige Erkenntnisse gesammelt, welche die GC – Resistenz in Milzzellen speziell für dieses Modell näher charakterisieren. Neben einem deutlich erhöhten Milzgewicht konnte nach *in vitro* Stimulation mit LPS eine verminderte Proliferationshemmung sowie eine gesteigerte IL – 6 Produktion in isolierten Milzzellen trotz Hinzugabe von CORT nachgewiesen werden. Die reduzierte CORT – Sensitivität in den Milzzellen wird dabei nicht durch B – Lymphozyten vermittelt, sondern allein durch CD11+ Makrophagen (*cluster of differentiation*, CD) [89]. Die dabei gesteigerten IL – 6 – Spiegel vermitteln jedoch nicht die Entstehung der GC – Resistenz, sondern sind lediglich Ausdruck einer erhöhten Zellaktivität [88].

Untersuchungen von Engler *et al.* sprechen dafür, dass die Entstehung der GC – Resistenz in stimulierten Milzzellen nach Exposition im SDR durch eine Migrationsbewegung reifer, GC – insensitiver CD11b+ Zellen vom Knochenmark in die Milz vermittelt wird. Während die CORT – Sensitivität in Knochenmarkszellen mit Abnahme reifer CD11b+ Zellen steigt, sinkt die CORT – Sensitivität in der Milz während der Stressexposition mit zunehmender Zahl an einwandernden CD11b+ Zellen [26]. Die vermehrte Einwanderung von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in die Milz sowie in die Blutbahn wird von einer kompensatorisch gesteigerten Myelopoese dieser Zelllinien im Knochenmark begleitet, woraus insgesamt eine Verbesserung der schnellen, angeborenen Immunität resultiert [25].

Interessanterweise zeigen Untersuchungen, dass die Exposition im SDR – Modell in gestressten Tieren zwar eine Milzvergrößerung sowie ein vermehrtes Einwandern CD11+ Zellen in die Milz mit gesteigerter Zellaktivität bewirkt, ohne die Zugabe von LPS allerdings keine Resistenz gegenüber CORT in Milzzellen gemessen werden kann [3].

Ein wichtiger Einflussfaktor, ob und in welchem Ausmaß eine GC - Resistenz entsteht, ist das Vorhandensein von Bissverletzungen. Avitsur *et al.* zeigten, dass Tiere, welche während der Stressexposition von anderen Käfiggenossen im Rahmen von Rankämpfen durch Bisswunden verletzt wurden, eine höhere Resistenz gegenüber CORT in isolierten Milzzellen aufweisen als unverwundete Tiere [6]. Da in dieser Studie zusätzlich gezeigt wurde, dass die GC – Resistenz nach SDR – Exposition besonders stark in Tieren mit submissiven Verhaltensweisen zu beobachten war, wird vermutet, dass ein derartiges Stresscoping das Risiko für Bissverletzungen und somit für die Entstehung der GC – Resistenz erhöht. Eine direkte Verbindung zwischen Bissverletzungen und den gezeigten Verhaltensweisen der Tiere während der Stressexposition wurde jedoch nach aktuellem Kenntnisstand nicht untersucht. Zudem fehlen Untersuchungen zum individuellen Zusammenhang zwischen der Menge und der Intensität von Bisswunden und dem Ausmaß der entstandenen GC – Resistenz. Gleiche Plasma – CORT – Werte zwischen subordinierten und nicht subordinierten sowie zwischen verletzten und unverletzten Tieren sprechen gegen die Ausbildung einer GC – Resistenz in Abhängigkeit von unterschiedlichen GC – Spiegeln [6].

Grundlegend für die Ausbildung der GC – Resistenz scheint, wie eingangs erwähnt, neben der Art des Stressmodells auch die zeitliche Komponente der Stressexposition zu sein. Damit sich diese im Rahmen von SDR entwickelt, ist eine Stressexposition über mindestens sechs Zyklen notwendig, während nach ein oder drei Zyklen keine Effekte messbar sind. Sechs Zyklen sind jedoch ausreichend, um nicht nur unmittelbar nach Beendigung des Modells, sondern auch noch bis zehn Tage danach eine langfristig anhaltende GC – Resistenz zu induzieren [4].

Neben der Gesamtanzahl an Zyklen ist zudem die tägliche Dauer der Stressexposition entscheidend. SDR für täglich zwei Stunden über insgesamt sechs Zyklen induziert eine Splenomegalie sowie eine GC – Resistenz. Werden die täglichen Zeitintervalle jedoch sukzessiv auf bis zu 14 Stunden am Tag gesteigert, verschwinden diese Effekte [6]. Insbesondere in Bezug auf das CSC – Modell ist diese Beobachtung von Bedeutung, da

letztgenanntes Paradigma der zeitlichen Stressexposition im CSC sehr ähnlich ist. Somit bietet das CSC – Modell im Vergleich zum SDR – Paradigma die Möglichkeit, die Entstehung einer GC – Resistenz unter dem Einfluss einer deutlich längeren und dabei dauerhaft einwirkenden Stressexposition zu untersuchen.

Unterschiedlichste Faktoren wie individuelle Verhaltensweisen und mögliche Begleitverletzungen der Tiere während der Stressexposition, aber auch die Art und die zeitliche Kinetik des verwendeten Stressmodells spielen eine Schlüsselrolle in der Ausbildung einer GC – Resistenz in LPS stimulierten Milzzellen. Insbesondere in Bezug auf das CSC – Modell sind zukünftige Untersuchungen notwendig, um ursächliche Mechanismen einer GC – Resistenz und deren möglicherweise adaptiven Hintergründe speziell für dieses Tiermodell näher bestimmen zu können.

1.4 Fragestellung

Reber *et al.* zeigten, dass eine 19-tägige Exposition im CSC – Modell neben affektiven und somatischen Störungen auch ein vermindertes GC – Signalling in den gestressten Tieren induziert. Neben einem Hypocorticismus weisen die Tiere eine Resistenz gegenüber GC auf, welche sich unter anderem in isolierten Milzzellen zeigt [51, 71].

Allerdings fällt die von Reber *et al.* gemessene GC – Resistenz in Splenozyten von CSC – Tieren im Vergleich zum Ausmaß der beschriebenen GC – Resistenz in Milzzellen von Tieren aus anderen Stressmodellen wie dem SDR nahezu verschwindend gering aus [71, 89]. Dies verwundert, da beides Modelle für die Induktion von sozialem Stress sind. Allerdings ist bekannt, dass neben der Qualität des Stressors auch die zeitliche Kinetik des verwendeten Stressmodells sowie Verletzungen durch Bisswunden die Ausbildung einer GC – Resistenz beeinflussen [6, 84].

Im Rahmen dieser Dissertation soll untersucht werden, ob die verhältnismäßig lange Dauer des CSC – Modells an sich oder die während der CSC – Exposition bisher nicht erfassten Bissverletzungen die deutliche Diskrepanz im Ausmaß der induzierten GC – Resistenz im Vergleich zu anderen Tiermodellen erklären. In Anlehnung an das SDR – Modell soll für die Bestimmung der GC – Resistenz ein Protokoll der AG Engler dienen, welches 2007 auch von Reber *et al.* verwendet wurde [26, 71]. Danach werden Milzzellen isoliert, *in vitro* mittels Zugabe von LPS stimuliert und deren Zellaktivität anschließend unter dem Einfluss unterschiedlicher CORT – Konzentrationen gemessen. In dieser Arbeit soll allerdings auf ein Zellpooling mehrerer Tiere verzichtet werden, um interindividuelle Unterschiede in der Entstehung der GC – Resistenz zwischen den verschiedenen Versuchstieren erfassen und mit deren Bisswunden korrelieren zu können.

Während in bisherigen Untersuchungen zum SDR – Modell lediglich eine Differenzierung zwischen verletzten und unverletzten Tieren anhand einer äußerlichen Fellinspektion erfolgte [6], soll in dieser Arbeit eine Methode zur detaillierten und individuellen Quantifizierung von Bissverletzungen entwickelt und etabliert werden. Somit wird es erstmals ermöglicht, das Ausmaß einer GC – Resistenz in Milzzellen und die Intensität von Bissverletzungen als Einflussfaktor unter der Fragestellung eines dosisabhängigen Zusammenhangs zu betrachten. Mit der Bestimmung des Organgewichts sowie der Zellzahlen soll die Untersuchung der Milz vervollständigt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Material für die Milzzellstimulation

Material	Firma	Katalog-Nr.
95 % EtOH (Ethanol)	Apotheke Uni Ulm	
Aqua bidest	Apotheke Uni Ulm	
MTS (CellTiter 96 [®] A _{queous} One Solution Cell Proliferation Assay)	Promega	G3580
CORT (Kortikosteron)	Sigma - Aldrich	C2505
FCS (Fetal calf serum)	Biochrom	S0615
HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)	Sigma - Aldrich	H6648
KHCO ₃ (Kaliumhydrogencarbonat)	Sigma Aldrich	#237205
LPS / E. coli (Lipopolysaccharid Escherichia coli O111:B4)	Sigma - Aldrich	L4391
Na ₂ EDTA (Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure)	AppliChem	A3553
NaOH (Natriumhydroxid)	VWR International	#28244.295
NH ₄ Cl (Ammoniumchlorid)	Sigma - Aldrich	A9493
Penicillin / Streptomycin	Invitrogen	#15070-063
RPMI 1640 (Zellkulturmedium)	Sigma - Aldrich	R8758
Trypanblaulösung	Sigma - Aldrich	T8154
Mikrotiterplatte 48 Wells	BD Biosciences	#351178
Mikrotiterplatte 96 Wells	BD Biosciences	#353072
Nalgene [™] MF75 [™] Sterile Filtereinheit 0,2µm	Thermo Scientific	#157-0020
Neubauer Zählkammer	Carl Roth	T728.1
Spritze 2 ml	Braun	#4606027V
Zellfilter 70 µm	BD Biosciences	#352350
Zellkulturschalen 60 mm	Carl Roth	PK38.1
Zentrifugenröhrchen 50 ml	VWR International	#21008-940

Tabelle 2: Hergestellte Medien für die Milzzellstimulation

HBSS = Hanks' balanced salt solution, FCS = fetal calf serum,
 RPMI = Zellkulturmedium, EDTA = Ethylendiamintetraessigsäure,
 ACK – Lyse – Puffer = Ammonium – Chlorid – Kalium – Lyse – Puffer,
 Na₂EDTA = Natrium - Ethylendiamintetraessigsäure, NaOH = Natriumhydroxid,
 NH₄Cl = Ammoniumchlorid, KHCO₃ = Kaliumhydrogencarbonat

Lösung	Bestandteile
HBSS + FCS	500 ml HBSS 50 ml FCS (hitzeinaktiviert)
RPMI+ 1640	500 ml RPMI 1640 50 ml FCS (hitzeinaktiviert) 50 µg/ml Streptomycin 50 U/ml Penicillin
0,5 M EDTA – Lösung *pH 8	93,05 g Na ₂ EDTA in 350 ml Aqua bidest mittels NaOH pH 8 einstellen auf 500 ml mit Aqua bidest auffüllen
10x ACK – Lyse – Puffer *0,2 µm steril filtriert	41,45 g NH ₄ Cl 5 g KHCO ₃ 10 ml 0,5 M EDTA - Lösung
1x ACK – Lyse – Puffer	2 ml 10x ACK – Lyse – Puffer 18 ml Aqua bidest

Tabelle 3: Sonstige Geräte und Materialien

Material	Firma	Modell
Analysenwaage	Sartorius	AZ214
Inkubator	Thermo Scientific	BB15
Kamera	Sony	DSLR-A350
Mikrotiter Plattenleser	BMG Labtech	FLUOstar OPTIMA
Präzisionswaage	Sartorius	Talent TE601
Sterilbank	Thermo Scientific	MSC Advantage
Zellzähler	Biorad	TC20
Zentrifuge	Thermo Scientific	Megafuge 40R

2.2 Methoden

2.2.1 Tiere

Als Versuchstiere dienten männliche C57BL/6 – Mäuse im Alter von 36–45 Tagen mit einem Gewicht von 18–22 g von Charles River (Sulzfeld, Deutschland). Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere für mindestens sieben Tage in Einzelkäfigen (16 x 22 x 14 cm) gehalten. Als dominante Residents wurden ältere, männliche CD1 – Mäuse mit einem Gewicht von 30–35 g von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet, welche vor ihrem Einsatz im CSC auf Dominanz und Aggressivität getestet wurden. Um schwerwiegende körperliche Verletzungen der Versuchsmäuse zu vermeiden, wurden übermäßig bissige Residents vom Versuch ausgeschlossen. Die dominanten Mäuse wurden mehrmals verwendet, wobei die Haltung zwischen den Versuchen in Einzelkäfigen erfolgte. Die Haltung aller Tiere erfolgte unter Standardbedingungen (Licht – / Dunkelzyklus 12/12 Stunden, Beginn der Lichtphase 6:00 Uhr; Temperatur 20 ± 2 °C; Luftfeuchtigkeit ca. 40 %), wobei der Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum* war. Für die Durchführung der Versuche lag gemäß den üblichen Regularien eine Tierversuchsgenehmigung mit dem Aktenzeichen 35/9185.81-3 und der Versuchsnummer 1136 vor.

2.2.2 Modell der chronisch subordinierten Koloniehaltung

Als Stressmodell wurde das im Jahr 2007 von Reber *et al.* etablierte Modell der 19-tägigen chronisch subordinierten Koloniehaltung gewählt, um bei den Versuchstieren chronischen psychosozialen Stress zu induzieren [71].

Die Einteilung der Tiere in eine Kontrollgruppe (SHC) und eine Stressgruppe (CSC) erfolgte anhand des Körpergewichts. Dazu wurden alle Tiere nach einer einwöchigen Eingewöhnungsphase an Tag 1 gewogen und in zwei Gruppen mit jeweils gleichem Gewichtsmittelwert eingeteilt. Während der Versuchsdauer wurden die Kontrolltiere in Standardeinzelkäfigen gehalten und außer durch den wöchentlichen Käfigwechsel nicht gestört.

Zwei Stunden vor Beginn der Stressexposition wurde der Resident in einen Beobachtungskäfig (Plexiglas, 38 x 22 x 35 cm) gesetzt, um ihm einen territorialen Vorteil zu verschaffen. Durch Hinzusetzen der vier Versuchstiere wurde die Stressgruppe komplettiert. Das Verhalten der Tiere wurde während der ersten 60 Minuten analysiert, um sicherzustellen, dass die Versuchstiere dem Resident gegenüber eine unterwürfige Position einnahmen.



Abbildung 2: Versuchstiere während der CSC – Exposition

Stehen auf den Hinterbeinen durch zwei Versuchstiere (linker Bildrand) im Rahmen eines submissiven Copingverhaltens gegenüber dem Resident (unterer Bildrand).

CSC = Chronisch subordinierte Koloniehaltung

Um während der 19-tägigen Stressexposition Gewöhnungseffekte zwischen den Versuchstieren und dem Resident zu verhindern, wurden die Tiere wie in Abbildung 3 ersichtlich, an den Tagen 8 und 15 jeweils zu einem neuen Resident gesetzt. Das Körpergewicht wurde am Tag 1 vor Beginn der CSC – Exposition und am Tag 20 unmittelbar vor der Dekapitierung bestimmt. Die Tötung der Tiere erfolgte am Tag 20.

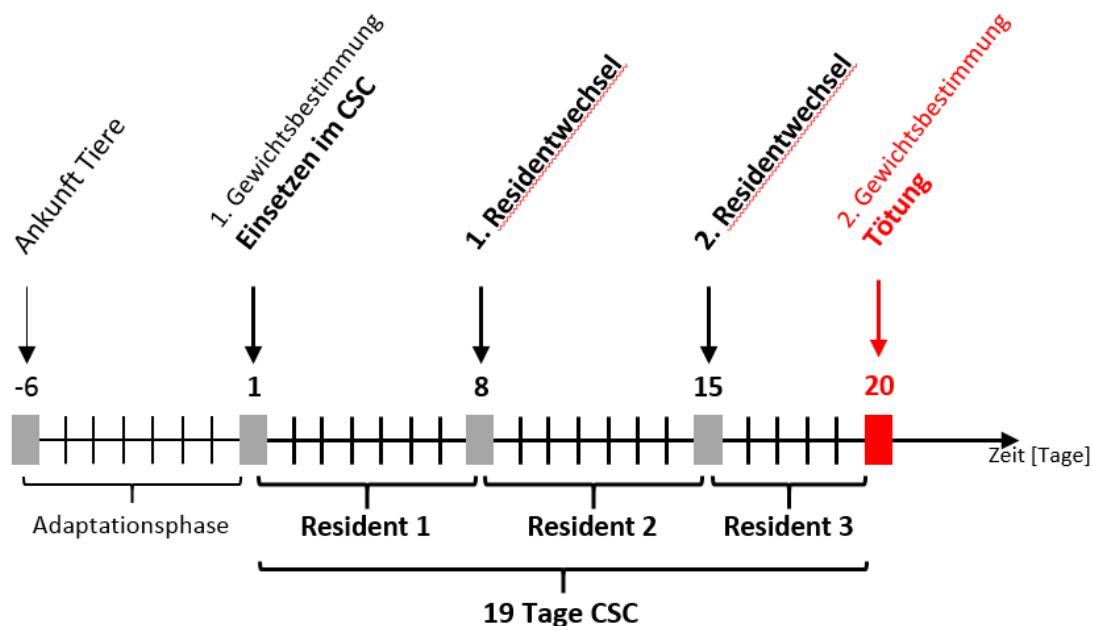


Abbildung 3: Schematischer Ablauf des CSC – Paradigmas

CSC = Chronisch subordinierte Koloniehaltung

2.2.3 Experimentelles Design

Zielsetzung dieser Arbeit war es, Effekte der 19-tägigen CSC – Exposition auf die Sensitivität von isolierten Milzzellen auf GC zu untersuchen. Des Weiteren sollten Auswirkungen des CSC – Paradigmas auf den Zusammenhang zwischen individuellen Bissverletzungen und verschiedenen Parameter der Milz bestimmt werden.

Dazu wurden die Tiere, wie unter 2.2.2 beschrieben, in eine Stress – und eine Kontrollgruppe eingeteilt. Die Tiere wurden sowohl bei dem durchgeführten Etablierungsversuch/Experiment 1, als auch nach der Durchführung des Experiments 2 an Tag 20 zwischen 08:00 und 10:00 Uhr gewogen und anschließend durch Dekapitierung getötet. Bei allen Tieren wurde die Milz herauspräpariert, gewogen und bis zur *in vitro* Stimulation in eisgekühlter HBSS aufbewahrt. Zudem wurde bei allen CSC – Tieren das Fell abpräpariert und Fotoaufnahmen angefertigt, welche anschließend der Auswertung von Bissverletzungen dienten.

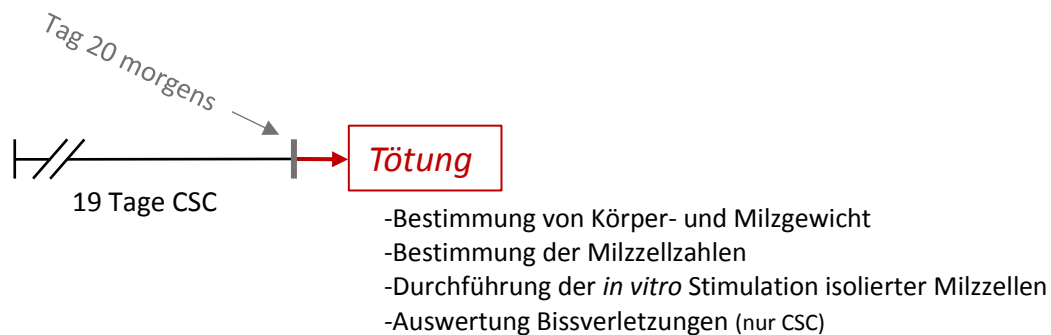


Abbildung 4: Ablauf der Datenerhebung nach Beendigung der CSC - Exposition

CSC = Chronisch subordinierte Koloniehaltung

2.2.4 Dekapitierung und Entnahme der Milz

Am Ende des jeweiligen Versuchs wurden die Tiere mit Kohlenstoffdioxid (CO₂) betäubt und nach Bestimmung des Körpergewichts dekapitiert. Die Zeit zwischen dem Eingreifen in den Käfig und der Dekapitierung wurde unter zwei Minuten gehalten, um einen stressbedingten Hormonanstieg, beispielsweise von CORT oder NA, im Blut zu vermeiden. Aus diesem Grund erfolgte die Tötung aller vier CSC – Tiere eines Käfigs zeitgleich. Im Anschluss an die Dekapitierung wurde die Milz durch einen ventralen Bauchschnitt entnommen und nach Entfernen des umliegenden Fettgewebes gewogen. Die Aufbewahrung der Milz bis zu der *in vitro* Stimulation erfolgte in eisgekühlter HBSS.

2.2.5 *In vitro* Stimulation der isolierten Milzzellen

Um eine Einzelzellsuspension zu erhalten, wurde die Milz nach ihrer Aufbewahrung in eisgekühlter HBSS mit dem Stempel einer Spritze in 5 ml HBSS homogenisiert und die erhaltene Suspension durch einen 70 µl Cell Strainer in ein Tube überführt. Nach Hinzugabe weiterer 25 ml HBSS wurde die Zellsuspension für 12 min bei 1600 U/min und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die noch im Pellet enthaltenen Erythrozyten durch Zugabe von 1 ml 1x ACK – Lyse – Puffer für 2 min bei Raumtemperatur lysiert. Zum Abstoppen des Lysevorgangs wurden 30 ml HBSS/10% FCS hinzugegeben und die Zellsuspension für 10 min bei 1600 U/min und 4°C zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes und Hinzugabe von 5 ml HBSS wurde die Zellsuspension erneut durch einen 70 µl Cell Strainer in ein weiteres Tube überführt, wodurch die Zellreste der lysierten Erythrozyten entfernt wurden. Nachdem die Zellsuspension erneut zentrifugiert (10 min bei 1600 U/min und 4°C) und der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Resuspension des Zellpellets in 15 ml Zellkulturmedium (benannt nach Roswell Park Memorial Institute; RPMI+ 1640).

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte automatisch in einem Zellzähler mittels Trypanblau – Assay. Hierzu wurden 10 µl der Zellsuspension im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau gemischt.

Anschließend wurden nach erneuter Zentrifugation (10 min bei 1600 U/min und 4°C) und dem Verwerfen des Überstandes die im Pellet enthaltenen Milzzellen jedes Tieres anhand der gemessenen Zellzahl mit einer entsprechenden Menge RPMI 1640 + auf eine Zelldichte von 5×10^6 Zellen / ml verdünnt.

Auf 96er Wellplatten wurden schließlich in Doppelbestimmung pro Tier 24 Wells mit jeweils 50 µl Zellsuspension ausplattiert, was einer Zellzahl von 25×10^4 Zellen pro Well entspricht. Während eine Hälfte basal mit 45 µl RPMI+ 1640 Medium behandelt wurde, wurde die andere Hälfte der Wells mit 45 µl LPS – Lösung (gelöst in RPMI+ 1640 Medium, finale Konzentration im Well 1 µg/ml) versetzt und die enthaltenen Zellen stimuliert. Um die GC – Sensitivität der basal oder mittels LPS – stimulierten Zellen zu bestimmen, wurden beide Ansätze jeweils mit 5 µl einer Verdünnung versetzt, welche CORT in sechs verschiedenen Konzentrationen enthielt. Das vorher in 95 %igen EtOH gelöste CORT wurde kurz vor der Stimulation mittels RPMI+ 1640 Medium verdünnt, sodass die finalen Endkonzentrationen in den Wells 0 µM, 0,005 µM, 0,05 µM, 0,1 µM, 0,5 µM und 5 µM betrugen. Neben physiologischen wurden die Zellen somit auch mit pharmakologischen CORT – Konzentrationen behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen für

48 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach der Inkubationsphase wurde die *cell viability* als Maß für die Menge sowie die Stoffwechselaktivität der enthaltenen Zellen mit Hilfe des CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Prolifereation Assays (MTS, Promega, Madison; USA) gemessen. Für diese kolorimetrische Bestimmung der *cell viability* wurden jeweils 20 µl der MTS – Tetrazolium – Verbindung zu den im Well enthaltenen Zellen gegeben. Die MTS – Tetrazolium – Verbindung setzt sich aus 3 - (4,5-dimethylthiazol-2-yl) - 5 - (3-carboxymethoxyphenyl) - 2 - (4sulfophenyl) - 2H - tetrazolium und Inner Salt, sowie Phenazin Ethosulfat (PES) zusammen. Die anfänglich gelbe Farblösung wird unter Verbrauch von Nicotinamid – Adenin – Dinukleotid (Phosphat) (NAD(P)H) zu rotbraun gefärbtem Formazan reduziert, welches im Kulturmedium löslich ist. Das für diese Reaktion notwendige NAD(P)H wird von Dehydrogenasen stoffwechselaktiver Zellen gebildet. Nach 3-stündiger Inkubation mit MTS bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte mittels eines Plattenlesers die kolorimetrische Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die dabei gemessene Absorption ist direkt proportional zur Menge des gebildeten Formazans und somit indirekt proportional zur *cell viability* der im Well enthaltenen Zellen. Zusätzlich wurde für jede Stimulationsbedingung die Extinktion (Background) gemessen. Diese Wells enthielten die entsprechenden Lösungen und Medien, jedoch keine Zellen, um mögliche Interferenzen mit dem kolorimetrischen Assay bestimmen und diese bei späteren Berechnungen berücksichtigen zu können.

In Anlehnung an andere Studien wurde die unter der Bedingung CORT = 0 µM gemessene Differenz zwischen der basalen und der LPS stimulierten *cell viability* zur weiteren Bestimmung der GC – Resistenz auf den Ausgangswert 100% festgelegt. Die Differenzen der *cell viability* unter dem Einfluss der restlichen CORT – Konzentrationen wurden anschließend im prozentualen Verhältnis zu diesem Ausgangswert berechnet. Somit sollte eine Ergebnisverzerrung durch grundlegende Baselineunterschiede zwischen den einzelnen Tieren verhindert werden.

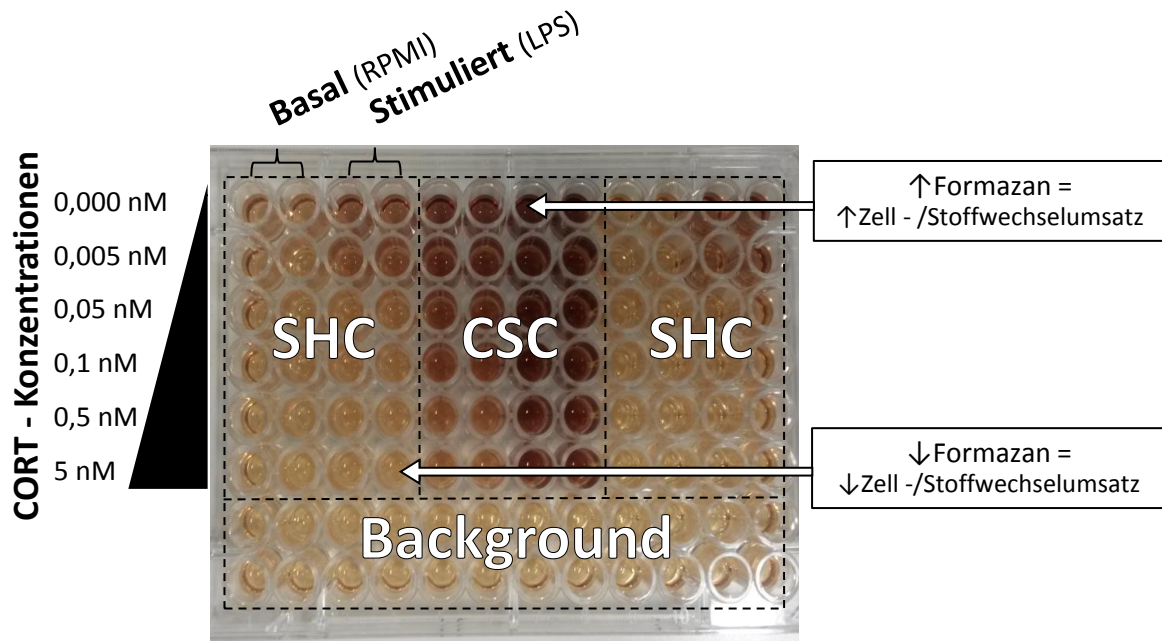


Abbildung 5: Plattenbelegung mit Milzzellsuspensionen nach Inkubation mit MTS

Im oberen Bereich der Abbildung sichtbar sind die Milzzellsuspensionen von zwei SHC – Tieren sowie einem CSC – Tier. In Doppelbestimmung wurden die Zellen basal mit Medium sowie unter stimulierten Bedingungen mit LPS behandelt und jeweils mit CORT unterschiedlicher Konzentrationen versetzt. In Wells mit hohem Zell – bzw. Stoffwechselumsatz wird nach MTS – Zugabe mehr Formazan gebildet, was an der rotbraunen Verfärbung erkennbar ist, während in Wells mit wenig Zell – bzw. Stoffwechselumsatz die anfänglich gelbe Färbung erhalten bleibt. Zum Vergleich sind im unteren Abschnitt Wells gezeigt, die lediglich Medium und MTS ohne Zellen enthalten und als Background dienen.

CORT = Kortikosteron, RPMI = Zellkulturmedium, LPS = Lipopolysaccharid, SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, MTS = Cell Proliferation Assay

2.2.6 Präparation des Fells und Anfertigen der Bildaufnahmen

Bei allen CSC – Tieren wurde zudem auf der dorsalen Körperseite das Fell entfernt. Dies erfolgte mittels stumpfen Ablösens der Subkutis (mit den oberflächlichen Hautschichten Epidermis und Dermis) von der darunterliegenden Körperfazie. Wie in Abbildung 6 sichtbar, wurde die abgelöste Hautpartie vom Körper abgeklappt, sodass zum einen die Unterseite der subkutanen Hautschicht, als auch die Oberseite der dorsalen Körperfazie mit der darunterliegenden Muskulatur nebeneinander liegend sichtbar waren. Für jedes CSC – Tier wurde diese Ansicht anschließend unter standardisierten Bedingungen fotografiert und die Aufnahme gespeichert.



Abbildung 6: Unbearbeitete Aufnahme eines präparierten Tierkörpers

2.2.7 Aufbereitung und Auswertung der Fellaufnahmen

Ziel im zweiten Teil der Arbeit war es, die gemessenen Milzparameter in Abhängigkeit von Bisswunden zu betrachten. Hierfür sollte ein standardisiertes Vorgehen zur objektiven Quantifizierung von äußerlichen Verletzungen durch Bisse entwickelt werden. Wie unter 2.2.6 bereits beschrieben, wurde dazu nach entsprechender Präparation eine Fotoaufnahme jedes CSC – Tieres im RAW – Format angefertigt. Dieses Bild wurde im Anschluss mit Hilfe von Bildbearbeitungsprogrammen (Grafiksoftware UFRaw (Version 0.18) sowie GNU Image Manipulation Software (Version GIMP 2.6.12)) für die spätere Auswertung anhand eines dafür ausgearbeiteten Scores vorbereitet.

Dazu wurde im Imageprogramm GIMP2 ein beschriftetes Gitternetz erstellt, welches im Anschluss über das importierte Bild gelegt wurde, um sowohl die Fellunterseite, als auch die Dorsalansicht des Tierkörpers zur einfacheren Auswertung in jeweils 20 gleich große Rechtecke zu unterteilen. Nach Import eines Bildes in das Bildbearbeitungsprogramm wurde die vorher angefertigte Gitterschablone an die Größe des fotografierten Fells angepasst, ausgeschnitten und das bearbeitete Bild gespeichert (siehe Abbildung (s. Abb.) 7).



Abbildung 7: Bearbeitete Fellaufnahme mit Gitterschablone

Auf der linken Seite der Abbildung ist die Unterseite der vom Körper abgelösten Subkutis (A – E), auf der rechten Seite die dorsale Körperfaszie mit darunterliegender Muskulatur (F – K) sichtbar. Das Gitterraster unterteilt beide Anteile in jeweils 20 gleich große Rechtecke und erleichtert somit die spätere Auswertung.

Die ausführlichen Anleitungen zum Erstellen der Vorlage sowie zum Import und zur Bearbeitung der Bilder sind als Protokolle im Anhang der Arbeit beigefügt.

Die objektive Auswertung der angefertigten Bildausschnitte hinsichtlich Bissverletzungen erfolgte im Anschluss mit Hilfe eines hierfür ausgearbeiteten Scores. Die Rechtecke A – E der Gitterschablone dienen der Beurteilung der Fellunterseite, die Rechtecke F – K der Beurteilung der dorsalen Rumpfansicht. Jedes Kästchen wurde einzeln für sich betrachtet und je nach Verletzungsmuster mit einer bestimmten Anzahl an Punkten bewertet. Dabei wurde folgendes Scoringssystem etabliert:

Zur Beurteilung der Verletzungen im Bereich der Fellunterseite wurde jedes Rechteck A – E anhand der drei Kriterien „Ausmaß der betroffenen Fläche“, „Intensität der Bissverletzung“ und „Ausmaß der begleitenden Eiterbildung“ mit folgender Punkteskala bewertet:

Tabelle 4: Punkteverteilung für Bissverletzungen im Bereich der Fellunterseite

Ausmaß der betroffenen Fläche	
0 Punkte	= Keine Bissverletzung
1 Punkt	= Einzelner Biss
2 Punkte	= Einzelne Bisse oder schlierenartiger Befall
3 Punkte	= Flächiger Befall
4 Punkte	= Kompletter Befall
Intensität der Bissverletzung	
0 Punkte	= Keine Bissverletzung
1 Punkt	= Leicht (Rosa Färbung der Verletzung)
2 Punkte	= Mittelstark (Rote Färbung der Verletzung)
3 Punkte	= Stark (Dunkelrote Färbung der Verletzung)
4 Punkte	= Nekrotisch (Schwarze Färbung der Verletzung)
Ausmaß der begleitenden Eiterbildung	
0 Punkte	= Keine Eiterbildung
1 Punkt	= Leichte Eiterbildung
2 Punkte	= Starke Eiterbildung

Mittels der Kästchen F – K erfolgte die Begutachtung der Verletzungen im Bereich der Dorsalen Körperfaszie anhand der zwei Kriterien „Ausmaß der betroffenen Fläche“ und „Intensität der Verletzungen“ mit folgender Punkteskala:

Tabelle 5: Punkteverteilung für Bissverletzungen im Bereich der Dorsalen Körperfaszie

Ausmaß der betroffenen Fläche	
0 Punkte	= Fläche nicht betroffen
1 Punkt	= $< \frac{1}{3}$ der Fläche betroffen
2 Punkte	= $\frac{1}{3}$ bis $\frac{2}{3}$ der Fläche betroffen
3 Punkte	= $> \frac{2}{3}$ der Fläche betroffen
Intensität der Bissverletzung	
0 Punkte	= Nicht betroffen
1 Punkt	= Leicht betroffen (Hellrote/Rosa Färbung der Verletzung oder wenig Eiter)
2 Punkte	= Stark betroffen (Dunkelrote Färbung der Verletzung oder viel Eiter)

Anschließend erfolgte für jedes Tier die Summation aller Punkte, sodass über die berechnete Gesamtpunktzahl ein objektiver Vergleich zwischen den CSC - Tieren hinsichtlich Ausmaß und Stärke der Bissverletzungen möglich war.

Die ausführliche Anleitung zur Auswertung der Bissverletzungen mit entsprechenden Bildbeispielen ist als Protokoll im Anhang der Arbeit beigefügt.

2.2.8 Auswertung und Statistik

Die Graphen wurden mittels Sigma Plot (Version 11.0, SPSS Inc., Chicago, IL; USA) erstellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Statistikprogramm SPSS (Version 21, SPSS Inc., Chicago, IL; USA).

Alle Datensätze wurden mittels Kolmogorov – Smirnov – Test mit Signifikanzkorrektur nach Lilliefors auf Normalverteilung getestet. In normalverteilten Datensätzen wurden Ausreißer mittels Grubb's – Test ermittelt und von weiteren Analysen ausgeschlossen; anschließend erfolgte die Analyse mittels entsprechender parametrischer Tests. Beim einfachen Vergleich (ein Faktor, zwei unabhängige Stichproben) wurde der parametrische T – Test für unabhängige Stichproben verwendet, bei mehreren Faktoren und unabhängigen Gruppen wurden die Daten mittels einer *two way analysis of variance (ANOVA)* analysiert. Analog hierzu wurden nicht normalverteilte Datensätze an Hand von Tests für nicht parametrische Daten verglichen. Hierzu standen der Mann – Whitney – U – Test (ein Faktor, zwei unabhängige Stichproben), der Wilcoxon – Test (ein Faktor, zwei abhängige Stichproben) sowie der Friedman – Test (ein Faktor, mehrere abhängige Stichproben) zur Verfügung.

Korrelationen der verschiedenen Milzparameter mit den Bissverletzungen wurden mittels Spearman – Korrelations – Test nach Rängen analysiert. Die Ergebnisse der Milzzellstimulation unter verschiedenen CORT – Konzentrationen wurden als abhängige Gruppen gesehen. Bei allen Tests, welche bei mehr als zwei Gruppen einen signifikanten Haupteffekt zeigten, wurden anschließende Bonferroni *post hoc* Tests durchgeführt. Alle normalverteilten Datensätze werden als Balkendiagramme (Mittelwert + Standardfehler des Mittelwertes (SEM)) gezeigt, alle nicht normalverteilten Datensätze sind als Box Plots dargestellt (Median, Mittelwert, 25. und 75. Perzentil, bei Datensätzen mit $n \geq 10$ zusätzlich das 10. und 90. Perzentil sowie Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen).

Die gewählten Signifikanzniveaus liegen bei $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***).

3 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene Milzparameter, unter anderem die Entstehung einer GC – Resistenz in isolierten Splenozyten, nach chronisch psychosozialer Stressexposition im CSC – Modell untersucht und zusätzlich der Einfluss von individuellen Bissverletzungen betrachtet werden.

Um mögliche Verletzungen durch Bisse hinsichtlich Ausmaß und Intensität erfassen und vergleichen zu können, musste zunächst eine standardisierte Methode zur objektiven Begutachtung von Bisswunden entwickelt werden. Zudem sollte die Bestimmung der GC – Resistenz in isolierten Milzzellen mittels *in vitro* Stimulation mit LPS erstmals am Standort Ulm durchgeführt werden.

3.1 Vorversuche zur Etablierung eines Bisswundenscores

Zunächst wurden in Vorversuchen von insgesamt 29 CSC – Tieren Fotoaufnahmen angefertigt, nachdem, wie im Methodenteil beschrieben, im Bereich des Rückens das Fell durch stumpfe Präparation von der darunterliegenden Körperfazie abgelöst worden war.

Da die Fellunterseite bei einigen Tieren natürlich vorkommende, schwarze Pigmentverfärbungen aufwies und auch die Grundfarbe der Fellunterseite individuelle Unterschiede zeigte, erwies sich eine digitale Auswertung der Bissmuster durch automatische Bestimmung der Farbintensität mittels Software als nicht möglich. Anhand der Beispielbilder wurden deshalb Parameter erarbeitet, nach welchen eine standardisierte und manuelle Begutachtung der Verletzungen durch einen Beobachter erfolgen sollte.

Als entscheidende Kriterien zur Einschätzung einer Bisswunde konnten dabei zum einen durch eigene Beobachtungen und zum anderen durch Literaturrecherche sowohl das „Ausmaß der betroffenen Fläche“ als auch die „Schwere der einzelnen Bisse“ ermittelt werden. Zur Beurteilung des Schweregrades wurden im Bereich der Fellunterseite neben der Farbintensität der Bisse auch die teils begleitende Ausbildung von Eiter als Bewertungskriterium festgelegt. Eingehende eigene Beobachtungen ergaben, dass für Verletzungen im Bereich des Körpers der Parameter Eiterbildung vernachlässigt werden konnte, da sich auf keinem der angefertigten Bilder Eiter im Bereich der dorsalen Körperfazie zeigte. Um das Ausmaß der betroffenen Fläche besser abschätzen zu können, wurde eine optische Unterteilung der entsprechenden Bildausschnitte mit Hilfe eines standardisierten Rasters festgelegt.

Im Gegensatz zur alleinigen Betrachtung der Fellunterseite stellte sich die Mitberücksichtigung der dorsalen Körperfazie als notwendig heraus, da sich in den Vorversuchen bei einigen Tieren auch dort Läsionen durch tiefergehende Bissverletzungen zeigten.

Anschließend konnte durch detaillierten Vergleich der erstellten Aufnahmen die im Methodenteil aufgeführte Punkteabstufung für die einzelnen Kriterien erarbeitet werden. Mittels Summation der jeweils vergebenen Punkte lässt sich für jedes Tier eine Gesamtpunktzahl ermitteln, welche den individuellen Schweregrad der Bissverletzungen widerspiegelt.

Um das erarbeitete Protokoll auf seine Funktionsweise zu prüfen und das beschriebene Vorgehen zu etablieren, sollten die Bisswunden der Tiere aus den Vorversuchen mittels Score beurteilt und das Ergebnis anschließend mit der Einschätzung zweier unabhängiger Beobachter verglichen werden. Dazu wurden die aufgenommenen Beispielbilder anhand des erarbeiteten Punktescores ausgewertet und anhand der ermittelten Gesamtpunktzahl eine Platzierungsreihenfolge erstellt. Das Tier mit der höchsten Gesamtpunktzahl und somit den schwerwiegendsten Bissverletzungen erhielt die höchste Platzierung. Tiere gleicher Punktzahl belegten denselben Platz, Tiere ohne sichtbare Bissverletzungen gemeinsam den Platz null. Zudem wurden alle Beispielbilder jeweils zwei unabhängigen, gegenüber den von mir ermittelten Scoreergebnissen unwissenden Beobachtern vorgelegt. Beide erstellten anhand ihrer subjektiven Einschätzung der Bissverletzungen ebenfalls eine Platzierungsreihenfolge.

Die von mir anhand des Scores ermittelte Platzierung wurde anschließend für jedes Tier mit der durch den Beobachter festgelegten Platzierung korreliert (s. Abb. 8). Die statistische Auswertung mittels Spearman – Korrelationstest nach Rängen ergab in beiden Fällen einen signifikanten Zusammenhang (jeweils $P \leq 0,001$).

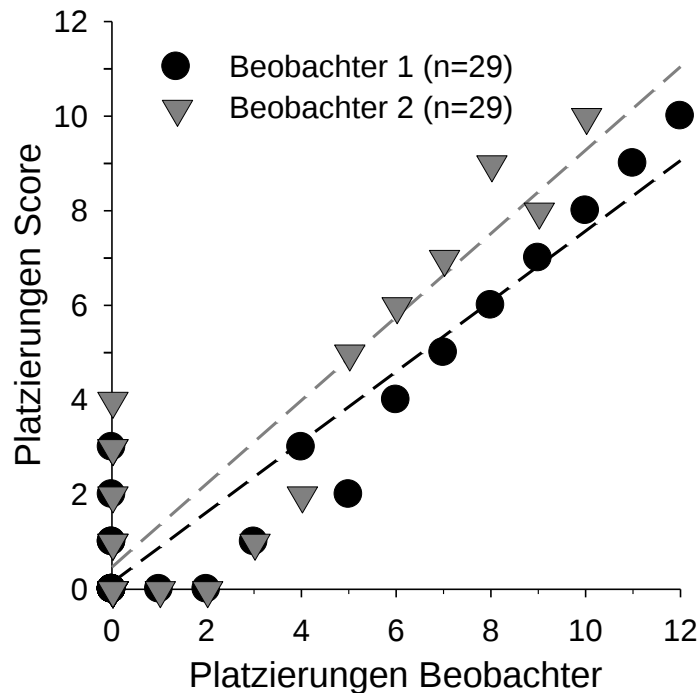


Abbildung 8: Etablierung des Bisswundenscores mittels Korrelationsanalyse

Beispielbilder von 29 CSC – Tieren wurden mittels Bisswundenscore sowie der Einschätzung zweier Beobachter bezüglich des Ausmaßes von Bisswunden beurteilt und jeweils eine Platzierungsreihenfolge ermittelt. Die Daten sind dargestellt als XY – Koordinaten der Platzierungen mit entsprechender Regressionslinie. Einzelne Punkte in der Abbildung kommen übereinanderliegend zur Darstellung (Statistik: Spearman – Korrelationstest nach Rängen).

CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung

Die in Abbildung 9 dargestellten Aufnahmen von zwei CSC – Tieren sollen zudem beispielhaft den unterschiedlichen, für jedes Tier individuellen Schweregrad an Bissverletzungen verdeutlichen. Das obere Bild dient als Beispiel für CSC – Tiere mit einem optisch geringen Schweregrad an Bissverletzungen, was sich nach standardisierter Begutachtung mittels Score in niedrigen Punktzahlen widerspiegelt. Im Gegensatz dazu weist das CSC – Tier in der unteren Aufnahme deutlich mehr Verletzungen auf und steht somit mit höheren Punktzahlen beispielhaft für CSC – Tiere mit schwerwiegenden Bissverletzungen.

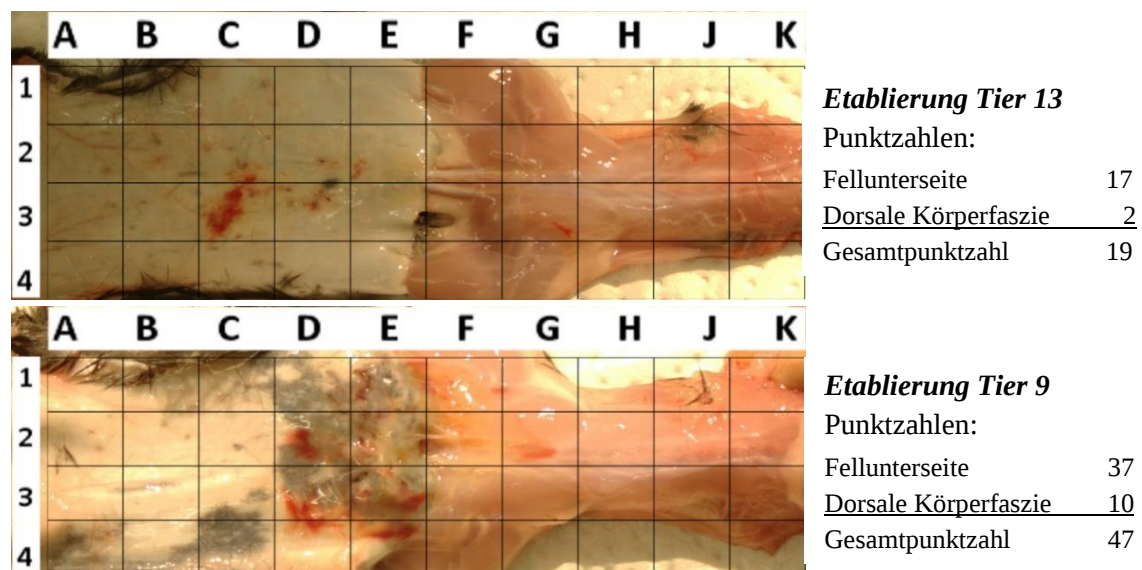


Abbildung 9: Optische Darstellung von Bissverletzungen unterschiedlicher Intensität

Nach Dekapitierung beider CSC – Tiere wurden Aufnahmen der Fellunterseite und der dorsalen Körperfaszie angefertigt und anschließend hinsichtlich des Schweregrads der Bissverletzungen mit Hilfe des Scores ausgewertet. Das obere Bild zeigt die Aufnahme von Tier 13, das untere Bild die Aufnahme von Tier 9 des Etablierungsversuches. Die im Score ermittelten Punktwerte sind jeweils neben den Bildern dargestellt.

CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung

Während der durchgeführten Vorversuche konnte gezeigt werden, dass bei keinem der ebenfalls untersuchten SHC – Tiere Verletzungen im Bereich des Fells, der Subkutis oder der Körperfaszie mit darunterliegender Muskulatur festgestellt werden konnten. Aus diesem Grund wurden bei den nachfolgenden Versuchen lediglich CSC – Tiere bezüglich Bissverletzungen untersucht und ausgewertet.

3.2 Etablierung der Milzzellstimulation am Standort Ulm

In einem ersten Etablierungsversuch/Experiment 1 wurde sichergestellt, dass die zuvor in Regensburg durchgeführte *in vitro* Stimulation von isolierten Milzzellen mit LPS unter dem Einfluss verschiedener CORT – Konzentrationen am Standort Ulm reproduziert werden konnte. Die erhobenen Ergebnisse finden sich in den nachfolgenden Abschnitten.

3.2.1 Absolutes Milzgewicht und Anzahl isolierter Milzzellen

Nach Dekapitierung am Morgen von Tag 20 nach Beginn der CSC – Exposition wurde bei 20 SHC und 16 CSC – Tieren die Milz entnommen und das Organgewicht bestimmt (s. Abb. 10 A)). Die statistische Analyse mittels Mann – Whitney – U – Test zeigte ein signifikant erhöhtes Milzgewicht der CSC – Tiere im Vergleich zu den SHC – Tieren ($P \leq 0,001$). Im Anschluss erfolgte die Isolation der Milzzellen. In der Gesamtzellzahl pro Milz (s. Abb. 10 B)) sowie der Anzahl lebender Zellen pro Milz (s. Abb. 10 C)) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den SHC und den CSC – Tieren.

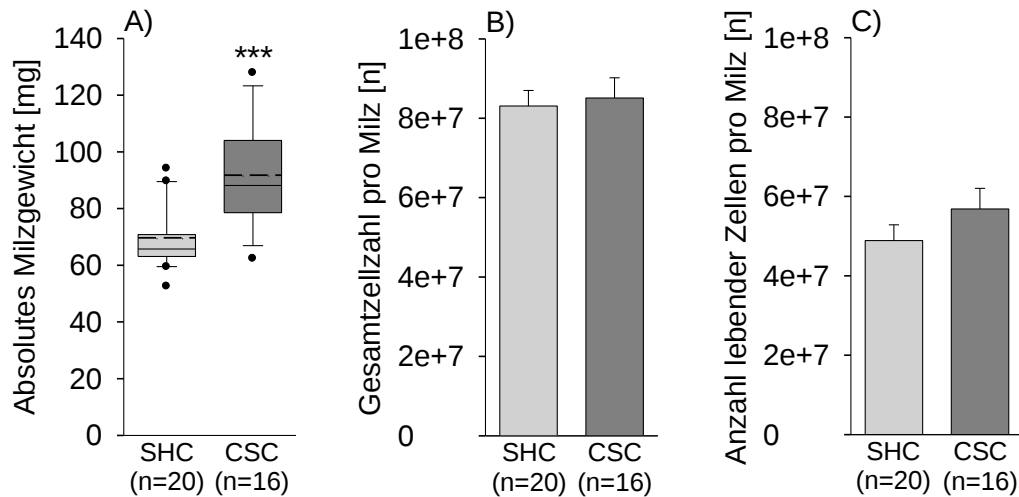


Abbildung 10: Etablierung/Experiment 1: A) Absolutes Milzgewicht, B) Gesamtzellzahl und C) Anzahl lebender Zellen pro Milz

Nach Dekapitierung der Tiere wurden die Milzen entnommen, von Fett befreit und gewogen. Die Milzzellen wurden isoliert und mit Hilfe eines Zellzählers gezählt. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. A) Die Daten sind als Mediane mit 10, 25, 75. und 90. Perzentil sowie als Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen, angegeben die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert dar. B) und C) Die Daten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt. *** $P < 0,001$ vs. entsprechende SHC – Gruppe (Statistik: Mann – Whitney – U – Test in A), T – Test in B) und C)).

SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SEM = Standardfehler des Mittelwertes

3.2.2 *Cell viability* isolierter Milzzellen

Anschließend erfolgte die Stimulation der isolierten Zellen. Die statistische Auswertung der *cell viability* ohne exogen zugefügtes CORT mittels Wilcoxon – Test zeigte sowohl für die SHC – Tiere ($P \leq 0,001$) als auch für die CSC – Tiere ($P \leq 0,001$) einen signifikanten Anstieg zwischen basaler und LPS stimulierter Bedingung (s. Abb. 11 A)). Zudem ergab die Analyse mittels Mann – Whitney – U – Test eine signifikant erhöhte *cell viability* in den CSC – Tieren im Vergleich zu den SHCs unter basalen ($P = 0,002$), wie auch unter LPS stimulierten ($P = 0,002$) Bedingungen. Kein Unterschied zwischen SHC und CSC – Tieren zeigte sich in der Differenz zwischen basaler und LPS vermittelter *cell viability* (s. Abb. 11 B)).

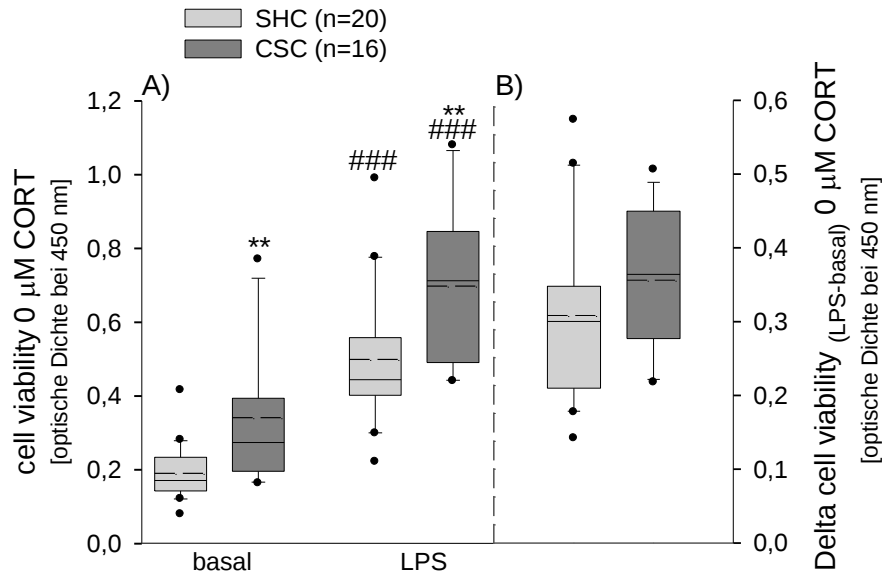


Abbildung 11: Etablierung/Experiment 1: Basale und LPS stimulierte *cell viability* ohne exogenen Einfluss von CORT

Nach Dekapitierung der Tiere wurden die isolierten Milzzellen unter basalen und LPS stimulierten Bedingungen (1 μ g/ml) ohne Zufuhr von exogenem CORT kultiviert und nach 48-stündiger Inkubation die *cell viability* mit Hilfe eines kolorimetrischen Assays bestimmt. Dargestellt ist die A) *cell viability* unter basalen sowie LPS stimulierten Bedingungen sowie die B) Differenz der *cell viability* zwischen LPS stimulierter und basaler Bedingung jeweils bei einer CORT Konzentration von 0 μ M. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind als Mediane mit 10, 25, 75. und 90. Perzentil sowie als Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen angegeben, die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert dar. **P<0,01 vs. entsprechende SHC – Gruppe, ### P<0,001 vs. entsprechende basale Bedingung (Statistik: Wilcoxon – Test im Vergleich zwischen basal und LPS, Mann – Whitney – U – Test im Vergleich zwischen SHC und CSC – Gruppe).

SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, CORT = Kortikosteron, LPS = Lipopolysaccharid

3.2.3 GC – Resistenz isolierter Milzzellen

Die statistische Auswertung mittels Friedman – Test zeigte sowohl für die SHC ($X^2(5) = 83,457$; $P \leq 0,001$), als auch für die CSC - Tiere ($X^2(5) = 46,536$; $P \leq 0,001$) eine signifikante Änderung der *Delta cell viability* in Abhängigkeit der zugesetzten CORT – Konzentration. Die durchgeführte *post hoc* Analyse erbrachte für die SHC – Tiere eine signifikante Verringerung der *Delta cell viability* ab einer CORT – Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ ($P=0,026$) im Vergleich zur *Delta cell viability* bei $0 \mu\text{M}$. Die *Delta cell viability* der drei höchsten CORT – Konzentrationen waren im Vergleich zum Ausgangswert ($0 \mu\text{M}$ CORT) ebenfalls signifikant vermindert (jeweils $P \leq 0,001$). Bei den CSC – Tieren ergab die *post hoc* Analyse eine signifikante Verminderung der *Delta cell viability* für die CORT - Konzentrationen $0,5 \mu\text{M}$ ($P \leq 0,001$) und $5 \mu\text{M}$ ($P=0,002$) im Vergleich zur *Delta cell viability* bei $0 \mu\text{M}$ CORT. Direkte Vergleiche der *Delta cell viability* zwischen SHC und CSC – Tieren innerhalb einer CORT – Konzentration mittels Mann – Whitney – U – Tests zeigten signifikant erhöhte Werte der CSC – Tiere bei jeder getesteten CORT – Konzentration ($0,005 \mu\text{M}$ $P=0,023$; $\text{CORT} \geq 0,05 \mu\text{M}$ $P \leq 0,001$) (s. Abb. 12).

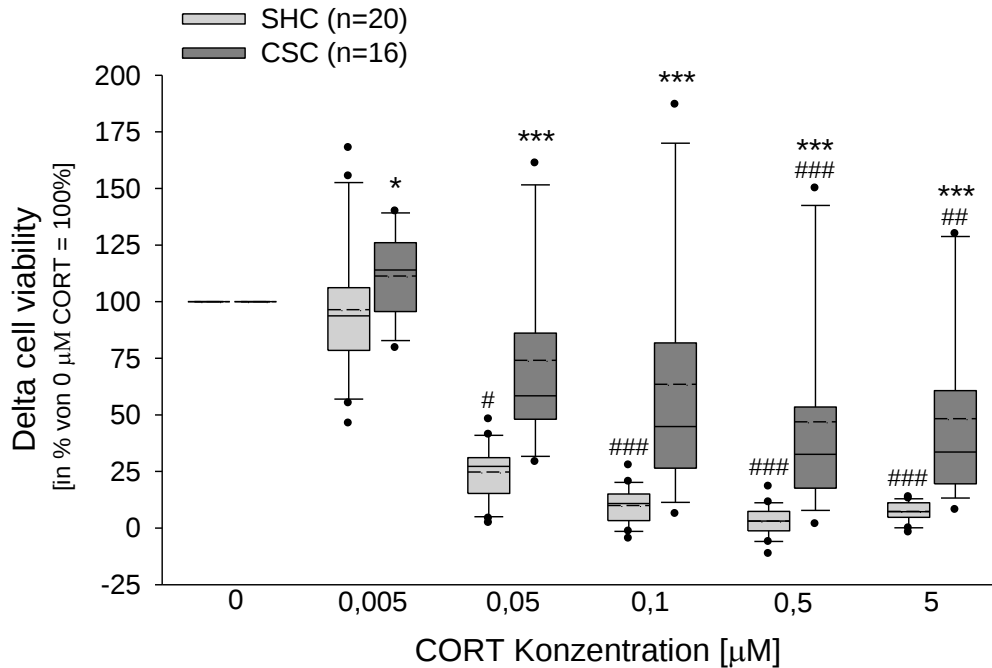


Abbildung 12: Etablierung/Experiment 1: Delta *cell viability* unter dem Einfluss verschiedener CORT – Konzentrationen

Nach Dekapitierung der Tiere wurden die isolierten Milzzellen unter basalen und LPS stimulierten (1µg/ml) Bedingungen in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an CORT kultiviert und nach 48-stündiger Inkubation die *cell viability* mit Hilfe eines kolorimetrischen Assays bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale *cell viability* unter den verschiedenen CORT – Konzentrationen in Bezug zur *cell viability* unter der Bedingung CORT = 0 µM (Ausgangswert = 100%). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind als Mediane mit 10, 25, 75. und 90. Perzentil sowie als Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen angegeben, die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert dar. *P<0,05, ***P<0,001 vs. entsprechende SHC – Gruppe, #P<0,05, ##P<0,01, ### P<0,001 vs. *cell viability* unter 0 µM CORT (Statistik: Friedman – Test im Vergleich zwischen 0 µM CORT und den weiteren CORT – Konzentrationen, Mann – Whitney – U – Test im Vergleich zwischen SHC und CSC – Gruppe).

SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, CORT = Kortikosteron, LPS = Lipopolysaccharid

3.3 Analyse von Bissverletzungen nach 19 Tagen CSC

Nach Beendigung der 19-tägigen CSC – Exposition wurde bei allen Stresstieren des Etablierungsversuchs/Experiments 1 (n=16) und des Experiments 2 (n=12) mit Hilfe des ausgearbeiteten und etablierten Scores der individuelle Schweregrad der Bissverletzungen bestimmt.

Tabelle 6: Etablierung/Experiment 1: Analyse von Bissverletzungen mittels Bisscore

Nach Dekapitierung der 16 CSC – Tiere wurden Aufnahmen der Fellunterseite und der dorsalen Körperfaszie angefertigt und anschließend hinsichtlich des Schweregrads der Bissverletzungen mit Hilfe des Bisscores ausgewertet. Dargestellt sind die individuell ermittelten Punktzahlen der beiden Bereiche „Fellunterseite“ und „Dorsale Körperfaszie“ sowie die Gesamtpunktzahl mit den jeweils berechneten Medianen und Mittelwerten.

CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung

Käfig	Tiernummer	Fellunterseite	Dorsale Körperfaszie	Gesamt
Käfig 1	<i>Tier 1-1</i>	0	0	0
	<i>Tier 1-2</i>	2	2	4
	<i>Tier 1-3</i>	4	2	6
	<i>Tier 1-4</i>	0	0	0
Käfig 2	<i>Tier 1-5</i>	6	2	8
	<i>Tier 1-6</i>	3	5	8
	<i>Tier 1-7</i>	37	9	46
	<i>Tier 1-8</i>	30	8	38
Käfig 3	<i>Tier 1-9</i>	37	10	47
	<i>Tier 1-10</i>	55	12	67
	<i>Tier 1-11</i>	40	12	52
Käfig 4	<i>Tier 1-12</i>	37	12	49
Käfig 5	<i>Tier 1-13</i>	17	2	19
	<i>Tier 1-14</i>	80	26	106
	<i>Tier 1-15</i>	77	13	90
	<i>Tier 1-16</i>	19	0	19
Median		24,50	6,50	28,50
Mittelwert		27,75	7,19	34,94

Tabelle 7: Experiment 2: Analyse von Bissverletzungen mittels Bisscore

Nach Dekapitierung der 12 CSC – Tiere wurden Aufnahmen der Fellunterseite und der dorsalen Körperfaszie angefertigt und anschließend hinsichtlich des Schweregrads der Bissverletzungen mit Hilfe des Bisscores ausgewertet. Dargestellt sind die individuell ermittelten Punktzahlen der beiden Bereiche „Fellunterseite“ und „Dorsale Körperfaszie“ sowie die Gesamtpunktzahl mit den jeweils berechneten Medianen und Mittelwerten.

CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung

Käfig	Tiernummer	Fellunterseite	Dorsale Körperfaszie	Gesamt
<i>Käfig 1</i>	<i>Tier 2-1</i>	0	0	0
	<i>Tier 2-2</i>	5	2	7
	<i>Tier 2-3</i>	10	3	13
	<i>Tier 2-4</i>	12	0	12
<i>Käfig 2</i>	<i>Tier 2-5</i>	9	4	13
	<i>Tier 2-6</i>	14	4	18
	<i>Tier 2-7</i>	0	0	0
	<i>Tier 2-8</i>	2	4	6
<i>Käfig 3</i>	<i>Tier 2-9</i>	14	0	14
	<i>Tier 2-10</i>	11	2	13
	<i>Tier 2-11</i>	16	4	20
	<i>Tier 2-12</i>	37	5	42
Median		10,50	2,50	13,00
Mittelwert		10,83	2,33	13,16

3.4 Effekte nach 19 Tagen CSC

Nach Durchführung des Etablierungsversuchs wurde ein 19-tägiger CSC – Versuch mit Tötung am Morgen von Tag 20 durchgeführt. Die Resultate bezüglich der ausgewerteten Bissverletzungen wurden bereits gemeinsam mit denen des Etablierungsversuches unter 3.3 gezeigt, die Untersuchung des Körpergewichts sowie der verschiedenen Milzparameter folgt nun.

3.4.1 Körpergewichtsentwicklung

Die Bestimmung des Körpergewichts erfolgte an Tag 1 vor Beginn der CSC – Exposition sowie an Tag 20 unmittelbar vor der Dekapitierung. Die statistische Analyse der Körpergewichtsentwicklung (Differenz Gewicht an Tag 20 – Gewicht an Tag 1) mittels T – Test zeigte keine Unterschiede zwischen den SHC und den CSC – Tieren (s. Abb. 13).

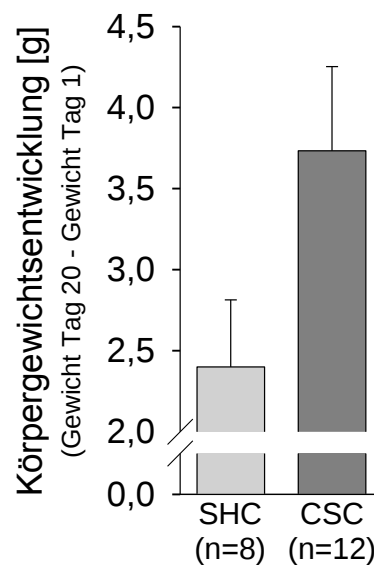


Abbildung 13: Experiment 2: Entwicklung des Körpergewichts

Die Tiere wurden vor Beginn des CSC – Paradigmas an Tag 1 sowie unmittelbar vor der Dekapitierung an Tag 20 gewogen. Dargestellt ist die Differenz zwischen den Körpergewichten von Tag 20 und Tag 1. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (Statistik: T – Test). SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SEM = Standardfehler des Mittelwertes

3.4.2 Milzzellparameter

3.4.2.1 Absolutes und relatives Milzgewicht

Nach der Dekapitierung wurden die Milzen der 8 SHC und 12 CSC – Tiere entnommen und gewogen. Die statistischen Analysen mittels T – Test zeigten weder beim absoluten (s. Abb. 14 A)), noch beim relativen (s. Abb. 14 B)) Milzgewicht Unterschiede zwischen den SHC und den CSC – Tieren.

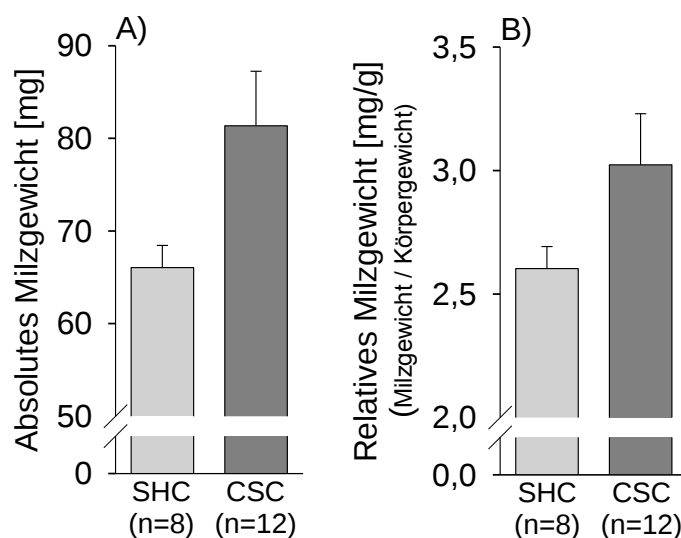


Abbildung 14: Experiment 2: A) Absolutes und B) relatives Milzgewicht

Unmittelbar nach der Dekapitierung an Tag 20 wurden die Milzen der SHC und CSC – Tiere entnommen, von Fett befreit und gewogen. Dargestellt sind A) das absolute Milzgewicht sowie B) das relative Milzgewicht bezogen auf das Körpergewicht an Tag 20. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind als Mittelwerte + SEM dargestellt (Statistik: T - Test).

SHC = Einzel gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SEM = Standardfehler des Mittelwertes

3.4.2.2 Anzahl isolierter Milzzellen

Anschließend erfolgte die Isolation der Milzzellen. Weder bei der Gesamtzellzahl pro Milz mittels T – Test (s. Abb. 15 A)), noch bei der Anzahl lebender Zellen pro Milz mittels Mann – Whitney – U – Test (s. Abb. 15 B)) zeigten sich Unterschieden zwischen den SHC und den CSC – Tieren.

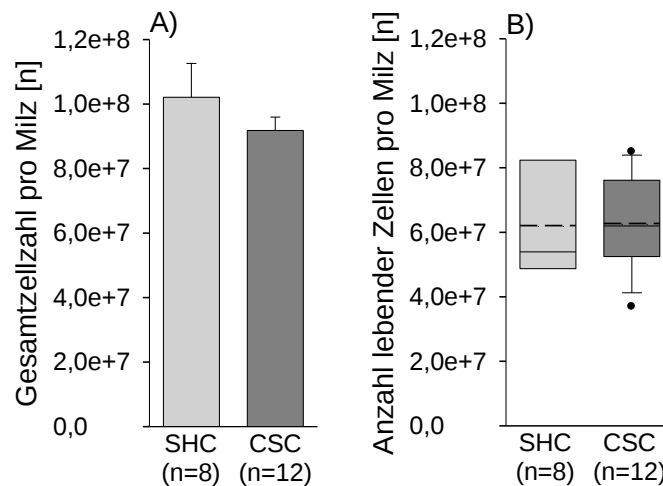


Abbildung 15: Experiment 2: A) Gesamtzellzahl und B) Anzahl lebender Zellen pro Milz

Nach Dekapitierung der Tiere wurden die Milzzellen isoliert und mit Hilfe eines Zellzählers gezählt. Dargestellt sind A) die Gesamtzellzahl sowie B) die Anzahl lebender Zellen pro Milz. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind als Mittelwerte + SEM (A)) bzw. als Mediane mit 10, 25, 75. und 90. Perzentil sowie als Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen angegeben, die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert dar (B)) (Statistik: T – Test in A), Mann – Whitney – U – Test in B)).

SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, SEM = Standardfehler des Mittelwertes

3.4.2.3 *Cell viability* isolierter Milzzellen

Nach ihrer Isolation wurden die Zellen mit LPS stimuliert. Die statistische Auswertung mittels Wilcoxon – Test ergab sowohl für die SHC – Tiere ($P=0,021$), als auch für die CSC – Tiere ($P=0,002$) einen signifikanten Anstieg der *cell viability* zwischen basaler und LPS stimulierter Bedingung (s. Abb. 16 A)). Unterschiede zwischen SHC und CSC – Tieren innerhalb einer Bedingung sowie in der Differenz zwischen basaler und LPS vermittelter *cell viability* (s. Abb. 16 B)) zeigten sich nicht.

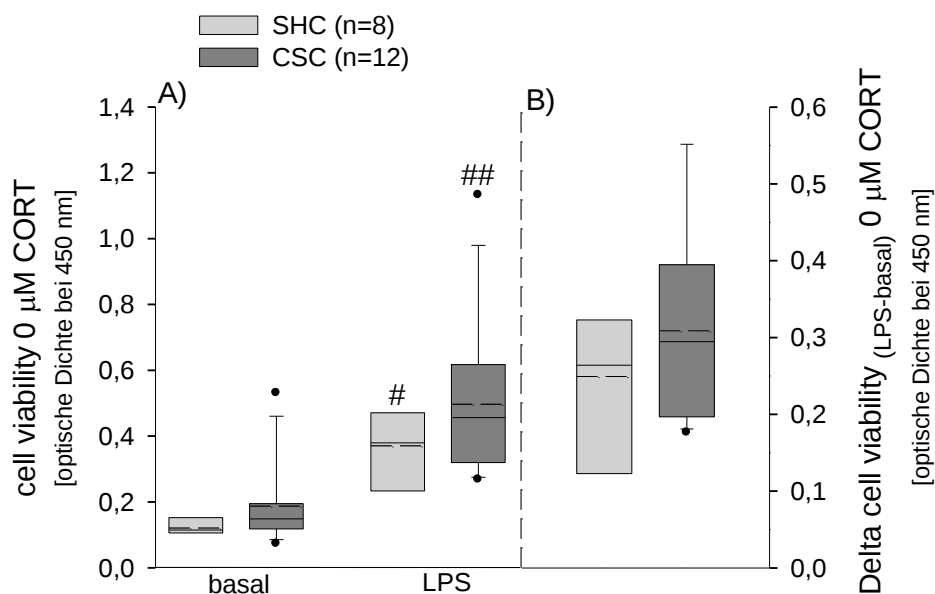


Abbildung 16: Experiment 2: Basale und LPS stimulierte *cell viability* ohne exogenen Einfluss von CORT

Nach Dekapitierung der Tiere wurden die isolierten Milzzellen unter basalen und LPS stimulierten Bedingungen (1 μ g/ml) ohne Zufuhr von exogenem CORT kultiviert und nach 48-stündiger Inkubation die *cell viability* mit Hilfe eines kolorimetrischen Assays bestimmt. Dargestellt ist die A) *cell viability* unter basalen sowie LPS stimulierten Bedingungen sowie die B) Differenz der *cell viability* zwischen LPS stimulierter und basaler Bedingung jeweils bei einer CORT Konzentration von 0 μ M. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind als Mediane mit 10, 25, 75. und 90. Perzentil sowie als Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen angegeben, die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert dar. # $P<0,05$, ## $P<0,01$ vs. entsprechende basale Bedingung (Statistik: Wilcoxon – Test bei Vergleich basal und LPS, Mann – Whitney – U – Test bei Vergleich SHC und CSC – Gruppe).

SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, CORT = Kortikosteron, LPS = Lipopolysaccharid

3.4.2.4 GC – Resistenz isolierter Milzzellen

Sowohl für die SHC ($X^2(5) = 33,429$; $P \leq 0,001$), als auch für die CSC – Tiere ($X^2(5) = 55,095$; $P \leq 0,001$) ergab die statistische Analyse mittels Friedmann – Test eine signifikante Änderung der *Delta cell viability* in Abhängigkeit von der hinzugegebenen CORT – Konzentration. Die durchgeführte *post hoc* Analyse zeigte sowohl für die SHC als auch für die CSC – Tiere eine signifikante Verringerung der *Delta cell viability* ab einer CORT - Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ (SHC $P=0,020$, CSC $P=0,001$) im Vergleich zur *Delta cell viability* unter $0 \mu\text{M}$ CORT. Gleiches zeigte sich für die *Delta cell viability* bei den zwei höchsten CORT – Konzentrationen (SHC $0,5 \mu\text{M}$ $P \leq 0,001$ und $5 \mu\text{M}$ $P=0,002$; CSC $0,5 \mu\text{M}$ und $5 \mu\text{M}$ $P \leq 0,001$). Die Vergleiche der *Delta cell viability* zwischen den SHC und den CSC – Tieren innerhalb einer CORT – Konzentration mittels Mann – Whitney – U – Tests zeigten signifikant erhöhte Werte der CSC - Tiere bei einer CORT – Konzentration von $5 \mu\text{M}$ ($P=0,039$) (s. Abb. 17).

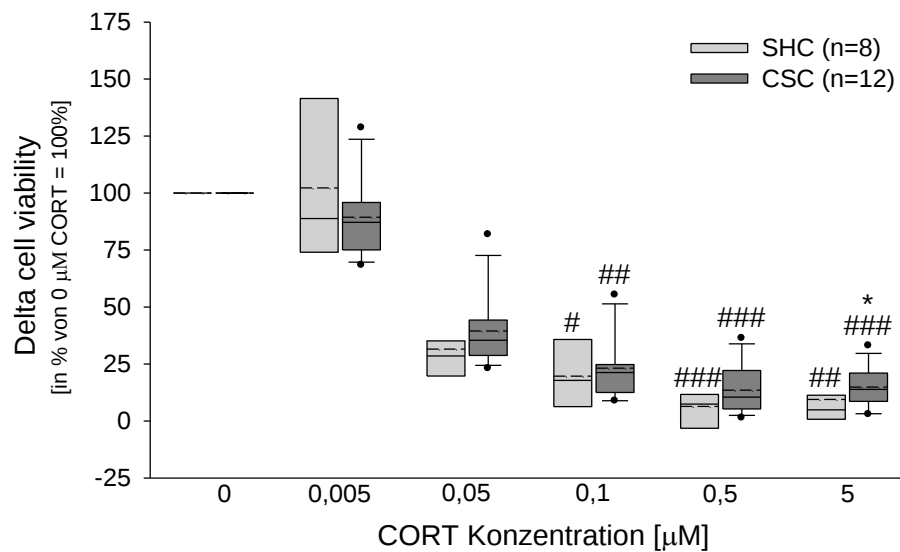


Abbildung 17: Experiment 2: Delta cell viability unter dem Einfluss verschiedener CORT – Konzentrationen

Nach Dekapitierung der Tiere wurden die isolierten Milzzellen unter basalen und LPS stimulierten (1µg/ml) Bedingungen in Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen an CORT kultiviert und nach 48-stündiger Inkubation die *cell viability* mit Hilfe eines kolorimetrischen Assays bestimmt. Dargestellt ist die prozentuale *cell viability* unter den verschiedenen CORT – Konzentrationen in Bezug zur *cell viability* unter der Bedingung CORT = 0 µM (Ausgangswert = 100%). Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind als Mediane mit 10, 25, 75. und 90. Perzentil sowie als Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen angegeben, die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert dar. *P<0,05 vs. entsprechende SHC - Gruppe, #P<0,05, ##P<0,01, ###P<0,001 vs. *cell viability* unter 0 µM CORT (Statistik: Friedman – Test im Vergleich zwischen 0 µM CORT und den weiteren CORT – Konzentrationen, Mann – Whitney – U – Test im Vergleich zwischen SHC und CSC – Gruppe).

SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, CORT = Kortikosteron, LPS = Lipopolysaccharid

3.5 Bissverletzungen und Milzparameter nach 19 Tagen CSC

Im Anschluss wurde für alle CSC – Tiere der Einfluss von individuellen Bisswunden auf die Parameter absolutes Milzgewicht, basale *cell viability* und GC – Resistenz in isolierten Milzzellen betrachtet. Dazu wurden die CSC – Tiere des Etablierungsversuchs/Experiment 1 mit denen aus Experiment 2 gepoolt, da alle Tiere unter gleichen Bedingungen gehalten und für die Bestimmung der einzelnen Parameter dieselben Methoden angewandt wurden.

3.5.1 Bissverletzungen und absolutes Milzgewicht

Die statistische Analyse mittels Spearman – Korrelations – Test nach Rängen zeigte für die CSC – Gruppe einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß an Bissverletzungen und dem absoluten Milzgewicht ($P=0,044$; s. Abb. 18).

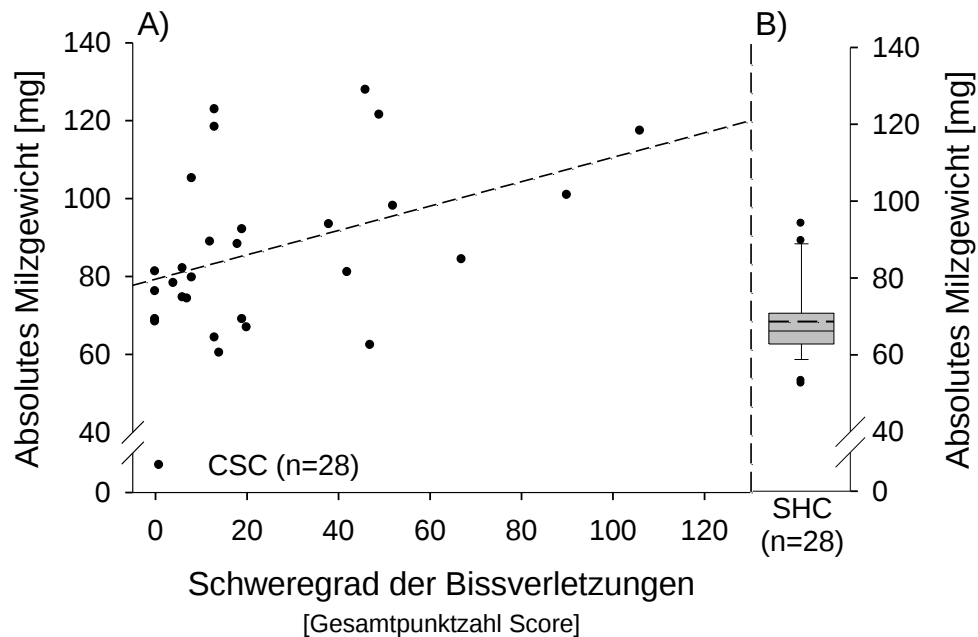


Abbildung 18: Zusammenhang zwischen Bissverletzungen und dem absoluten Milzgewicht

Nach Dekapitierung erfolgte bei allen Tieren die Bestimmung des absoluten Milzgewichts und bei allen CSC – Tieren die Bestimmung des Schweregrads der Bissverletzungen. Dargestellt ist A) für alle CSC – Tiere der Zusammenhang zwischen dem absoluten Milzgewicht und dem Ausmaß an Bissverletzungen sowie B) für alle SHC – Tiere das absolute Milzgewicht. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind dargestellt als A) XY – Koordinaten mit entsprechender Regressionslinie und als B) Mediane mit 10, 25, 75. und 90. Perzentil sowie als Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen, die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert dar (Statistik: Spearman – Korrelations – Test nach Rängen).

SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung

3.5.2 Bissverletzungen und basale *cell viability* isolierter Milzzellen

Die statistische Analyse mittels Spearman – Korrelations – Test nach Rängen ergab für die CSC – Gruppe einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß an Bissverletzungen und der basalen *cell viability* isolierter Milzzellen ohne den Einfluss von exogenem CORT ($P=0,010$; s. Abb. 19).

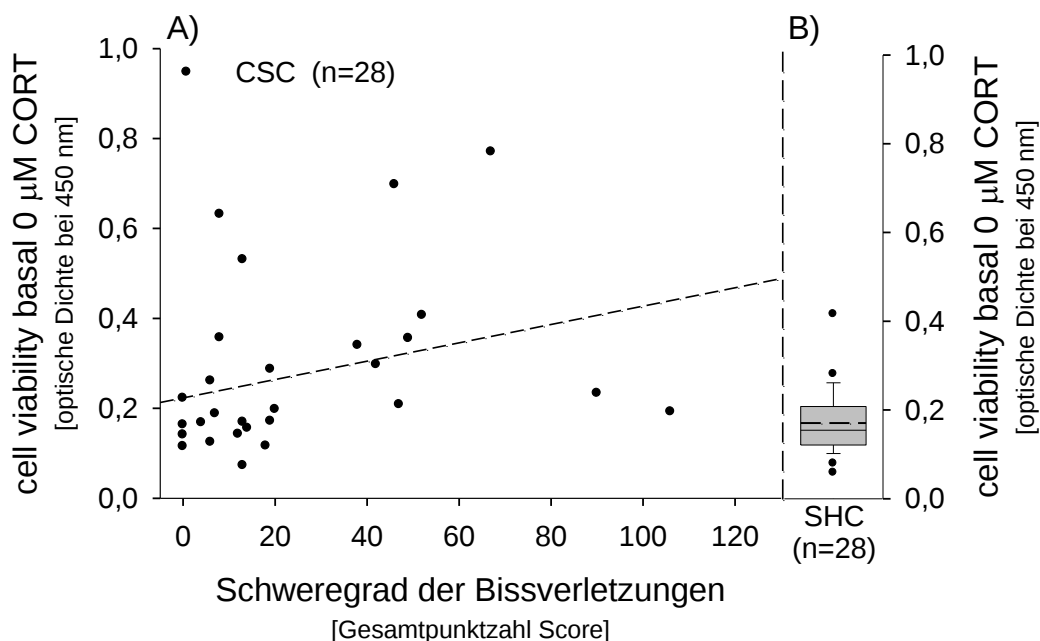


Abbildung 19: Zusammenhang zwischen Bissverletzungen und basaler *cell viability* ohne exogenen Einfluss von CORT

Nach Dekapitierung erfolgte bei allen Tieren die Messung der basalen *cell viability* von isolierten Milzzellen und bei allen CSC – Tieren die Bestimmung des Schweregrads der Bissverletzungen. Dargestellt ist A) für alle CSC – Tiere der Zusammenhang zwischen basaler *cell viability* unter 0 µM CORT und dem Ausmaß an Bissverletzungen sowie B) für alle SHC – Tiere die basale *cell viability* unter 0 µM CORT. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind dargestellt als A) XY – Koordinaten mit entsprechender Regressionslinie und als B) Mediane mit 10, 25, 75. und 90. Perzentil sowie als Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen, die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert dar (Statistik: Spearman – Korrelations – Test nach Rängen).

SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, CORT = Kortikosteron

3.5.3 Bissverletzungen und GC - Resistenz isolierter Milzzellen

Die statistische Analyse mittels Spearman – Korrelations – Test nach Rängen ergab für die CSC – Gruppe einen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Ausmaß an Bissverletzungen und dem Ausmaß der GC – Resistenz in den isolierten Milzzellen ($P \leq 0,001$, s. Abb. 20).

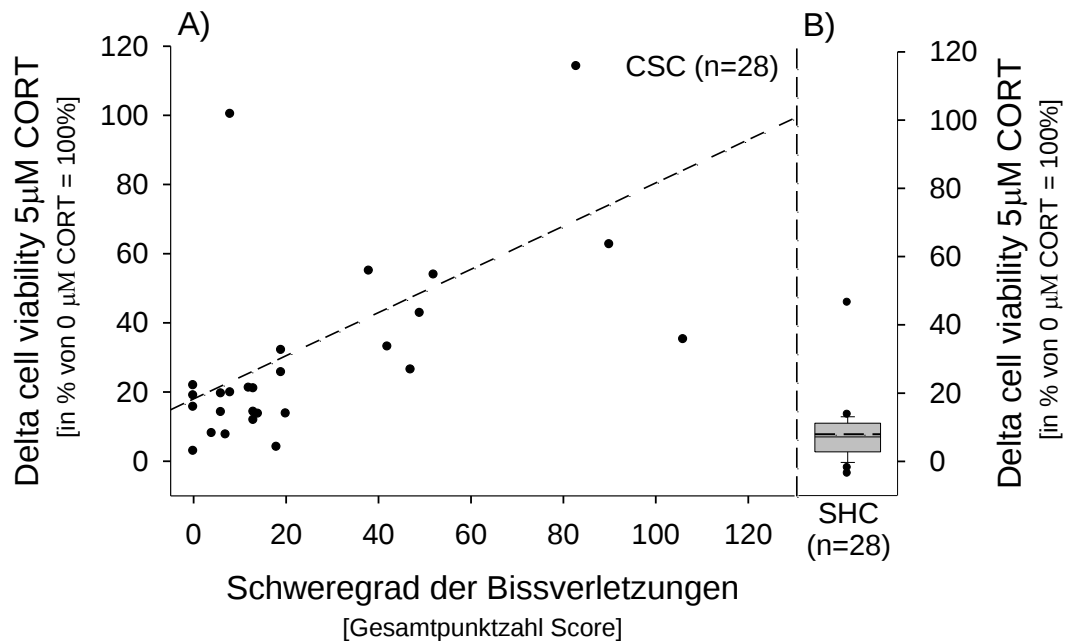


Abbildung 20: Zusammenhang zwischen Bissverletzungen und GC – Resistenz

Nach Dekapitierung erfolgte bei allen Tieren die Messung der GC – Resistenz in den isolierten Milzzellen und bei allen CSC – Tieren die Bestimmung des Schweregrads der Bissverletzungen. Dargestellt ist A) für alle CSC – Tiere der Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der GC – Resistenz als *Delta cell viability* unter 5 µM CORT und dem Ausmaß an Bissverletzungen sowie B) für alle SHC – Tiere die GC – Resistenz als *Delta cell viability* unter 5 µM CORT. Die Zahlen in Klammern geben die Anzahl der Tiere an. Die Daten sind dargestellt als A) XY – Koordinaten mit entsprechender Regressionslinie und als B) Mediane mit 10, 25, 75. und 90. Perzentil sowie als Ausreißer außerhalb dieser Perzentilengrenzen, die gestrichelte Linie stellt den Mittelwert dar (Statistik: Spearman – Korrelations – Test nach Rängen).

SHC = Einzeln gehaltene Kontrolltiere, CSC = Stresstiere nach chronisch subordinierter Koloniehaltung, CORT = Kortikosteron, GC – Resistenz = Glukokortikoid – Resistenz

3.6 Schematische Zusammenfassung der Ergebnisse

Nachfolgende Schemazeichnung stellt zusammenfassend die in dieser Arbeit im CSC – Modell neu gewonnenen Erkenntnisse den bisher bekannten Mechanismen zur Ausbildung einer GC – Resistenz aus dem SDR – Modell gegenüber. Eine detaillierte Beschreibung erfolgt im Diskussionsteil (s. Seite 66, 67).

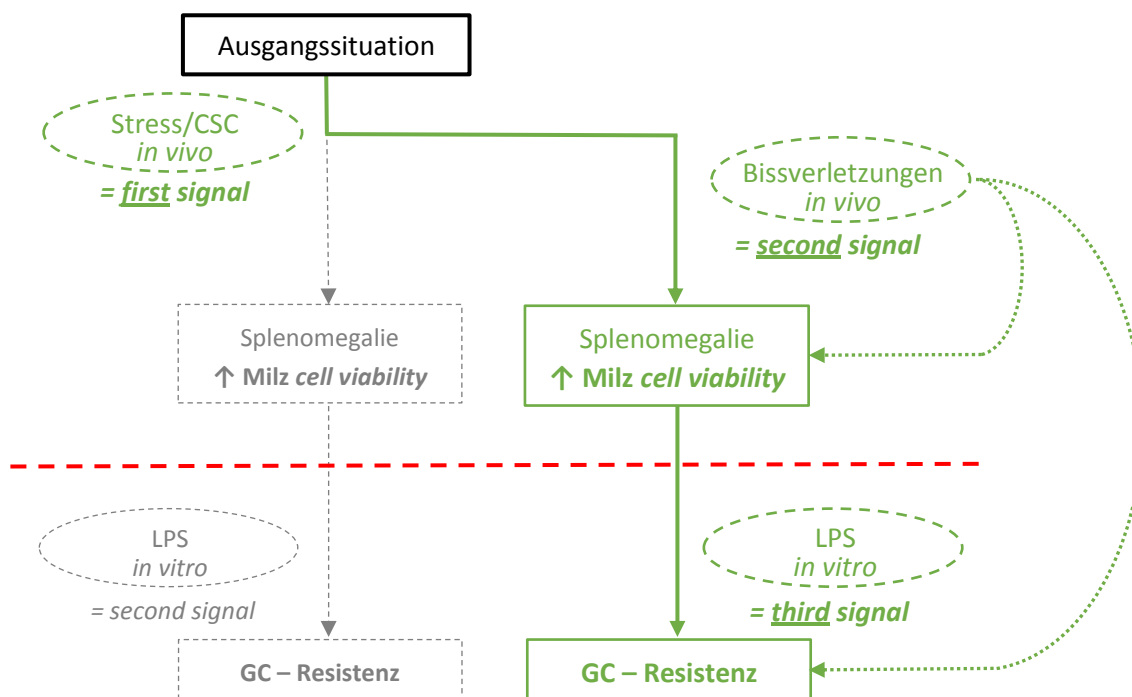


Abbildung 21: Ergänzung von bisher bekannten Mechanismen zur Ausbildung einer GC – Resistenz durch neue Erkenntnisse

In grüner Farbe wird das bisherige Konzept aus dem SDR – Modell um die neuen Erkenntnisse aus dieser Arbeit in Bezug auf das CSC – Modell erweitert. Hierbei kommt vor allem dem direkt proportionalen Einfluss von Bissverletzungen auf das Ausmaß der Splenomegalie, der Milz cell viability und der GC – Resistenz eine entscheidende Rolle zu.

- > bisherige Erkenntnisse aus dem SDR
- > neue Erkenntnisse anhand der Arbeit aus dem CSC
-> direkt proportionaler Zusammenhang

SDR = social disruption, CSC = chronisch subordinierte Koloniehaltung,
 GC – Resistenz = Glukokortikoid– Resistenz, LPS = Lipopolysaccharid,
 $\uparrow$ = Anstieg

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, nach 19-tägiger CSC – Exposition ausgewählte Milzparameter zu bestimmen und die Fragestellung zu beantworten, auf welche Weise diese durch das Auftreten von Bissverletzungen beeinflusst werden.

Hierfür konnte ein Protokoll erarbeitet und etabliert werden, welches durch die Verwendung bestimmter Kriterien - betroffene Fläche, Farbintensität sowie begleitende Entzündungsreaktion - eine detaillierte Beurteilung von Bisswunden im Bereich der Subkutis sowie der darunterliegenden Körperfazie mittels Bisscore ermöglicht.

Die genaue Untersuchung der Milz mit Bestimmung des Milzgewichts, der Zellzahlen, der basalen und LPS induzierten Zellaktivität sowie des Ausmaßes der GC - Resistenz ergab starke Unterschiede innerhalb der Gruppe der Versuchstiere, wobei bei einigen keine oder lediglich minimale Veränderungen im Vergleich zu den einzeln gehaltenen Kontrollen festgestellt werden konnten. Im Gegensatz dazu wurden bei anderen Stresstieren nach 19 Tagen CSC - Exposition eine Splenomegalie, eine erhöhte basale und LPS induzierte Zellaktivität sowie eine ausgeprägte GC – Resistenz in den isolierten Gesamtmilzzellen nachgewiesen. Zusammenfassende Korrelationen zwischen den Ergebnissen des erhobenen Bisscores und dem Milzgewicht, der basalen Zellaktivität sowie dem Ausmaß der GC – Resistenz ließen auf einen direkten Einfluss von Bissverletzungen auf die genannten Milzparameter schließen. Trotz erhöhtem Milzgewicht war jedoch die Anzahl der isolierten Splenozyten unabhängig vom Vorhandensein von Bissverletzungen konstant.

4.1 Standardisierte Quantifizierung von Bisswunden mittels Score

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine standardisierte und reproduzierbare Methode zur unkomplizierten und objektiven Quantifizierung von Bissverletzungen einzelner Tiere entwickelt werden, welche während der CSC – Exposition durch hierarchische Kämpfe unter den Käfiggenossen und dem Resident entstehen. Neben der Auswahl geeigneter Kriterien zur Wundbeurteilung musste zunächst ein möglichst einfaches und effizientes Vorgehen zur Fellpräparation und Dokumentation erarbeitet werden.

Die einzeln gehaltenen Kontrolltiere konnten dabei vernachlässigt werden, da bei ihnen in den Vorversuchen erwartungsgemäß keinerlei Verletzungen nachweisbar waren.

4.1.1 Erarbeitung eines Protokolls zur Erfassung von Bisswunden

Im Gegensatz zu anderen Tierstudien, in welchen zur optischen Begutachtung von Verletzungen eine Entfernung der Fellhaare durch Epilation [52] oder lediglich eine oberflächliche Beurteilung ohne Entfernung des Fells erfolgt [40], wurde in dieser Arbeit das stumpfe Ablösen des Fells gemeinsam mit der Subkutis von der darunterliegenden Körperfazie bevorzugt. Dieses Vorgehen bietet den Vorteil, dass eine zusätzliche Betrachtung der Körperfazie ermöglicht wird und somit die Tiefe der erlittenen Bissverletzungen weitaus besser beurteilt werden kann. Auf Grund einiger Vorteile im Vergleich zur unmittelbaren Beurteilung der Bisswunden direkt nach der Tötung der Tiere habe ich mich zudem für das Fotografieren der Tierkörper unter standardisierten Bedingungen mit anschließendem Archivieren der einzelnen Aufnahmen entschieden. Somit können die archivierten Bilder auch zu einem späteren Zeitpunkt eingesehen und in Ruhe ausgewertet werden. Außerdem ermöglicht dieses Vorgehen einen optischen Vergleich der Bissverletzungen von Tieren zeitlich getrennter Versuche.

Nach Festlegung der Methode zur Fellpräparation musste ein standardisiertes Protokoll zur Erfassung der Bissverletzungen erarbeitet werden. In Anbetracht verschiedener Studien sollten hierfür sowohl quantitative als auch qualitative Aspekte zur Wundbeurteilung einbezogen werden. In der Erfassung von Hautwunden bei Patienten durch verschiedene Punktesysteme wie dem *Bates – Jensen Wound Assessment Tool* (BWAT) spielt die Größe des betroffenen Hautareals eine wichtige Rolle. In Scores wie dem *Pressure Ulcer Scale for Healing* (PUSH) wird die Größe des betroffenen Hautareals im Vergleich zu anderen Parametern sogar mehrfach gewichtet [55]. Somit sollte auch im Bisscore dieser Arbeit die Größe der Bissverletzung als Beurteilungskriterium herangezogen werden. Um dabei die Größe einer Bisswunde möglichst genau und realistisch bemessen und diese in Relation zur individuellen Körpergröße des Tieres setzen zu können, wird zur Auswertung die Fellunterseite und die dorsale Körperfazie optisch durch ein digitales Raster untergliedert. Für jedes einzelne dieser kleinen Gitterfelder wird dann durch den Begutachter der Anteil der betroffenen Fläche beurteilt und als Punktwert zwischen null und maximal vier angegeben.

Des Weiteren stellt die Verletzungstiefe ein wichtiges Merkmal einer Wunde dar und deutet auf deren Schweregrad hin. Wundeinteilungen an menschlicher Haut reichen hierbei von oberflächlichen Rötungen bis hin zu tiefreichenden Schäden in das subkutane Gewebe, die Muskulatur oder die Knochen [55]. Bei Katzen und Hunden beispielsweise dient neben der Menge an thorakalen Verletzungen deren Penetrationstiefe als Maßstab für die Auswahl

einer geeigneten Therapieoption [12]. Im Gegensatz zur häufig praktizierten Epilation der Fellhaare ermöglicht das in dieser Arbeit angewandte Abziehen des Fells die Mitbeurteilung der darunterliegenden Körperfazie, wodurch die Tiefe einer Bissverletzung als Kriterium besser erfasst werden kann. Zudem wird die Schwere der Bissverletzung durch die unterschiedlich starke Farbintensität der Läsionen in steigenden Punktwerten von null bis maximal vier erfasst.

In einem *tail – biting score* für Schweine wird des Weiteren die Entstehung einer Entzündungsreaktion mit möglicher Keimbesiedelung an der Bissstelle als Hinweis für die Schwere einer Verletzung erfasst [100]. Diese Beobachtung wird auch im hier erarbeiteten Score als weiteres Kriterium bedacht und die Ausbildung von Eiter als Anzeichen einer Inflammation bzw. begleitenden Infektion mit Punktwerten zwischen null und zwei beurteilt.

Insgesamt wurden somit neben der Größe der Verletzung auch die Tiefe, die Intensität sowie eine potenziell begleitende Entzündungsreaktion als Kriterien für die Beurteilung von Bisswunden erarbeitet und im Bisscore berücksichtigt.

Durch das beschriebene Vorgehen werden allerdings lediglich Bissverletzungen im Bereich des Rückens erfasst, während die ventrale Bauchseite sowie die Extremitäten unberücksichtigt bleiben. Diese Fokussierung wurde aber bewusst gewählt, da Litvin *et al.* zeigten, dass bei Mäusen speziesspezifisch zwar Attacken auf alle oben genannten Körperteile beobachtet werden, tatsächliche Wundverletzungen jedoch nur am Rücken der Tiere auftreten. Potenziell lebensbedrohliche Verletzungen durch Bisse insbesondere am vulnerablen Bauch der Tiere in direkter Nähe zu den inneren Organen wurden nicht gefunden [52].

Anhang dieser Kenntnisse wurde das beschriebene Protokoll erarbeitet und in Vorversuchen bei insgesamt 29 CSC – Tiere angewendet.

4.1.2 Erfolgreiche Etablierung des Bisswundenscores

Um die Validität des erarbeiteten Bisscores zu überprüfen, wurden die angefertigten Fotoaufnahmen der 29 CSC – Tiere sowohl mittels Score ausgewertet, als auch unabhängig davon zwei Beobachtern vorgelegt. Anhand der erhobenen Gesamtpunktzahl im Score sowie durch die subjektive Einschätzung der Beobachter wurden Rangfolgen zum Schweregrad der Verletzungen festgelegt und diese miteinander korreliert. Zwischen den Einschätzungen beider Beobachter und den anhand des Bisscores erhobenen Resultaten konnte jeweils ein signifikanter Zusammenhang gezeigt werden.

Das in dieser Dissertation erarbeitete Protokoll zur objektiven und standardisierten Auswertung von Bisswunden mittels Bisscore stellt somit eine einfach reproduzierbare und effektive Methode dar, um individuelle Bissverletzungen einzelner Tiere erfassen und quantifizieren zu können.

Die in Abbildung 9 gezeigten Beispielaufnahmen verdeutlichen optisch das variable Ausmaß an Bissverletzungen innerhalb der verschiedenen CSC – Tiere. Die ebenfalls dargestellten Punktzahlen zeigen, dass mit Hilfe des etablierten Bisscores unterschiedlich stark ausgeprägte Verletzungen durch dementsprechend abgestufte Punktzahlen erfasst werden.

Abschließend wurde als Teil dieser Arbeit das beschriebene Vorgehen in Anleitungen festgehalten, um die standardisierte Auswertung von Bissverletzungen auch in nachfolgenden Versuchen zu garantieren. Die angefertigten Protokolle finden sich am Ende der Arbeit im Anhang. Zusätzlich wurden sie der Arbeitsgruppe auch in digitaler Form überlassen.

4.2 Erfolgreiche Etablierung der Milzzellstimulation

Neben der Erarbeitung des Bisscores sollte die Isolation und Stimulation von Milzzellen am Standort Ulm etabliert werden. Grundlage hierfür war ein Protokoll der Arbeitsgruppe Engler [26]. Da die Durchführung bereits während des ersten Etablierungsversuches gut gelang, wurden die erhobenen Ergebnisse als Etablierung/Experiment 1 gesammelt und werden gemeinsam mit den entsprechenden Resultaten des Experiments 2 in den nachfolgenden Abschnitten diskutiert. Zur Vereinfachung wird der Versuch Etablierung/Experiment 1 im nachfolgenden Teil der Arbeit als Experiment 1 bezeichnet.

4.3 Veränderungen nach 19 Tagen CSC

4.3.1 Ausmaß und Verteilung von Bissverletzungen

Bei allen CSC – Tieren der Experimente 1 (n=16) und 2 (n=12) wurden individuelle Bissverletzungen durch den zuvor etablierten Bisscore erfasst. Die detaillierte Darstellung der Punkteverteilung (siehe Tabellen 6 und 7) zeigt, dass die durchschnittliche Punktzahl für den Bereich der Fellunterseite in beiden Experimenten etwa 80% der erhobenen Gesamtpunktzahl entspricht, während die erhobene Punktzahl im Bereich der dorsalen Körperfazie lediglich zu einem geringen Anteil zur Gesamtpunktzahl beiträgt. Dies lässt darauf schließen, dass der überwiegende Teil der beobachteten Bissverletzungen oberflächlich lokalisiert ist und nur wenige Wunden das subkutane Gewebe durchdringen. Untersuchungen zum *resident – intruder* – Modell ergaben, dass Bisswunden am Rücken der Tiere auftraten, während der besonders vulnerable ventrale Bauchbereich unversehrt blieb [52]. Neben dieser topographischen Verteilung sprechen auch die hier für das CSC – Paradigma erhobenen Resultate bezüglich der Verletzungstiefe dafür, dass gegenseitige Attacken während hierarchischer Rangkämpfe zwar zu Bisswunden führen, diese jedoch selten tiefgehende Verletzungen und somit lebensbedrohliche Folgen nach sich ziehen.

Des Weiteren weisen die erhobenen Daten deutliche Schwankungen auf. Vier der insgesamt 28 erfassten CSC – Tiere weisen keinerlei Bissverletzungen auf, während andere sehr hohe Gesamtpunktzahlen erreichen. Auf Grund von erkennbaren Differenzen zwischen den einzelnen Käfigen scheint diese Beobachtung zum einen auf einem unterschiedlich stark ausgeprägten Aggressionsverhalten der eingesetzten Residents zu beruhen. Dies unterstreicht, wie entscheidend die Auswahl geeigneter Residents ist, um auch zwischen den verschiedenen Käfigen vergleichbare Versuchsbedingungen zu garantieren. Die Beobachtungen zu Beginn der Versuche sowie die Videoaufnahmen stellen hierfür wichtige Hilfsmittel dar.

Zum anderen bestehen jedoch auch innerhalb eines Käfigs erkennbare interindividuelle Schwankungen, welche auf ein unterschiedliches Copingverhalten der einzelnen Tiere während der Stressexposition zurückgeführt werden können. In Bezug auf das SDR – Modell wird angenommen, dass vor allem Tiere mit einem submissiven Copingstil, wie dem unterwürfigen Stehen auf den Hinterbeinen, und mit reduziertem sozialen Interaktionsverhalten ein erhöhtes Risiko für Bissverletzungen aufweisen [6]. Kaliste – Korhonen *et al.* differenzierten für NIH/S – Mäuse noch weiter, dass vor allem die

aggressiv – subordinierten Tieren durch ihr kämpferisches Verhalten vermehrt in Auseinandersetzungen verwickelt sind und dabei in ihrer unterlegenen Rolle mehr Bissverletzungen erleiden als ihre nicht aggressiv – subordinierten Käfiggenossen [40]. Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Bisscores steht nun eine Methode zur Verfügung, um Bisswunden in weitaus detaillierterer Weise als bisher zu erfassen und Zusammenhänge mit individuellen Verhaltensweisen noch eingehender zu betrachten. In den neuesten Untersuchungen zum CSC – Modell wurde nachgewiesen, dass im Gegensatz zu einer proaktiven Verhaltensstrategie (eigenes Attackieren, Besteigen, Verfolgen) ein reaktives Coping (subordiniert: Fliehen, Vermeiden und submissiv: Spähen, Unterwerfen) das Risiko für Attacken durch den Resident erhöht. Mit Hilfe detaillierter Verhaltensanalysen und genauer Quantifizierung von Bisswunden mittels des hier erarbeiteten Scores konnte zudem gezeigt werden, dass trotz vergleichbarer Anzahl an erlittenen Attacken lediglich die subordinierten CSC – Tiere ein erhöhtes Maß an Bissverletzungen aufweisen [27]. Bisherige Annahmen, Bissverletzungen fänden sich vor allem bei Tieren mit submissivem Copingverhalten [6] konnten somit widerlegt werden.

Die höheren Scorepunktzahlen des Experiments 1 zeigen zudem, dass diese Tiere im Vergleich zu denen aus Experiment 2 in deutlich stärkerem Ausmaß gebissen wurden. Auf Grundlage dieser beiden Experimente bietet sich damit die Möglichkeit, nicht nur den Einfluss von Bissverletzungen auf die verschiedenen Milzparameter wie die GC – Resistenz nach CSC – Exposition zu untersuchen, sondern auch den Einfluss unterschiedlich stark ausgeprägter Bisswunden vergleichend zu betrachten.

4.3.2 Körpergewichtsentwicklung

Das in dieser Arbeit verwendete Modell der chronisch subordinierten Koloniehaltung stellt ein präklinisch gut etabliertes Tiermodell dar, um den Einfluss von chronischem psychosozialen Stress zu untersuchen [71, 85, 95]. Die Ausbildung einer sozialen Hierarchie innerhalb den Versuchstieren eines Käfigs und dem Resident bildet die natürliche Grundlage für dieses Stressmodell. Dabei stellt sich für die Versuchstiere die Herausforderung, sich an viele neue Bedingungen anzupassen. Zum einen wird den subordinierten CSC – Tieren durch den dominanten Resident häufig der Zugang zu Futter und Wasser verwehrt, zum anderen werden sie zusätzlich physisch durch eine gesteigerte körperliche Aktivität während der Rangkämpfe sowie psychisch durch die permanent drohende Gefahr potenzieller Attacken belastet. Diese Kombination aus dauerhaftem psychosozialen Druck, vermehrter Bewegung

und verminderter Nahrungsaufnahme führt dazu, dass in vielen Versuchsmäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren eine geringere Zunahme des Körpergewichts nach 19-tägiger CSC – Exposition beobachtet wird [63, 71, 82]. Auch in anderen Tiermodellen dient eine reduzierte Körpergewichtsentwicklung als physiologischer Indikator für eine wiederholte beziehungsweise chronische Stressbelastung [41, 78, 90, 103].

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse anderer Studien, welche nach Stressexposition keine Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung zwischen gestressten Tieren und Kontrollen feststellen konnten [10, 70, 77]. Selbst für das CSC – Modell lässt sich die oben beschriebene reduzierte Körpergewichtszunahme in den gestressten Tieren nicht in jedem Fall reproduzieren [29, 95]. Slattery *et al.* zeigten, dass ein signifikant niedrigeres Körpergewicht in den CSC – Tieren im Vergleich zu den SHC – Tieren lediglich in der Anfangsphase am dritten und am zehnten Versuchstag gemessen werden konnte, während die Tiere in den Folgetagen vermehrt an Gewicht zunahmen und bis zum Ende des Versuches an Tag 19 den anfänglichen Gewichtsunterschied im Vergleich zu den Kontrolltieren ausgeglichen hatten [86]. Es wird vermutet, dass mit zunehmender Versuchsdauer eine gewisse Anpassung an den einwirkenden Stressor die Kinetik im Körpergewicht der gestressten Tiere erklärt.

Auch in dieser Arbeit wurde das Körpergewicht der Versuchstiere aus Experiment 2 vor Beginn des Stressmodells sowie direkt nach Beendigung an Tag 20 gemessen. Bei vergleichbaren Gewichten zu Beginn des Versuchs konnte nach 19-tägiger CSC – Exposition kein Unterschied in der Körpergewichtsentwicklung zwischen SHC und CSC – Tieren gemessen werden. Es ließ sich sogar eine leichte Tendenz zu einer vermehrten Gewichtszunahme in den gestressten Tieren feststellen. Dieses Ergebnis unterstreicht erneut die schwankenden Resultate bezüglich des Körpergewichts nach CSC - Exposition und zeigt, dass die Bestimmung der Körpergewichtsentwicklung als Stressparameter kein verlässlicher Indikator ist.

4.3.3 Absolutes und relatives Milzgewicht

Zusätzlich zum Einfluss von chronischem psychosozialen Stress auf das Körpergewicht der Versuchstiere wurden in dieser Arbeit Veränderungen im Bereich der Milz untersucht. Neben der Entfernung alter Erythrozyten und Thrombozyten im Bereich der roten Pulpa erfüllt das Milzgewebe der weißen Pulpa als sekundär lymphatisches Organ eine wichtige Funktion im Immunsystem. Als immunologische Filterstation ist die Milz in die

Blutzyklulation eingeschalten und dient als Ort für die Präsentation potentiell schädlicher Antigene sowie der daraus resultierenden Aktivierung von Immunzellen. Daher eignet sich die Milz als lymphatisches Organ gut, um immunologische Veränderungen unter dem Einfluss von Stress zu untersuchen.

Zur Bestimmung des Organgewichts wurden die Milzen der Tiere entnommen und gewogen, sowie in Experiment 2 zudem als relatives Milzgewicht in Bezug zum Körpergewicht berechnet. In Einklang zu Ergebnissen anderer Stressmodelle wie dem SDR – Paradigma oder dem PF – Modell [5, 89], konnte auch in dieser Arbeit bei den CSC – Tieren aus Experiment 1 ein signifikant erhöhtes Milzgewicht im Vergleich zu den SHC – Tieren festgestellt werden. Allerdings liegt das Milzgewicht der SDR – Tiere mit circa 150 mg im direkten Vergleich deutlich über den durchschnittlich 100 mg der CSC – Tiere aus Experiment 1 [89]. Neben der zum SDR vergleichbar geringer ausgeprägten Splenomegalie in Experiment 1 waren zudem in den CSC – Tieren aus Experiment 2 keine Unterschiede sowohl im absoluten wie auch im relativen Milzgewicht im Vergleich zu den entsprechenden SHC – Tieren messbar. Mögliche Schwankungen in den Milzgewichten der Kontrolltiere zwischen den Experimenten erklären diesen Effekt nicht, da die absoluten Organgewichte innerhalb der verschiedenen Kontrollgruppen sowohl in dieser Arbeit als auch in der SDR – Studie vergleichbare Werte zeigen [89].

Auch innerhalb des SDR – Modells zeigten sich bereits Unterschiede im Ausmaß der entstandenen Splenomegalie. Während nach sechs Zyklen SDR – Exposition über täglich zwei Stunden eine signifikante Zunahme im Milzgewicht beobachtet wurde, war dieser Effekt trotz gleichbleibender Anzahl an Zyklen nicht mehr nachweisbar, wenn die Dauer der täglichen Stressexposition auf insgesamt 14 Stunden SDR pro Tag gesteigert wurde. Hierfür wurde angenommen, dass auf Grund der längeren Expositionsdauer adaptive Mechanismen der Entstehung einer Splenomegalie entgegen wirken [6].

Die hier für das CSC – Modell erhobenen Daten widerlegen diese bisherige Annahme. Zum einen zeigen die erhöhten Milzgewicht der Tiere aus Experiment 1, dass trotz 19-tägiger ununterbrochener Stressexposition im CSC – Modell mögliche adaptive Veränderungen in den Tieren die Ausbildung einer Splenomegalie nicht verhindern. Zum anderen verdeutlichen die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen den Experimenten 1 und 2, dass selbst unter gleichen standardisierten Versuchsbedingungen mit identischer zeitlicher Stresskinetik der Parameter Milzgewicht durch einen bisher nicht berücksichtigten Faktor beeinflusst wird.

Weitere Untersuchungen zum SDR – Modell zeigten, dass das Milzgewicht lediglich in den Tieren erhöht war, welche dem direkten physischen Kontakt des aggressiven Eindringlings ausgesetzt waren (*SDR physical contact*). Trotz gleichermaßen erhöhter CORT – Werte resultierte der allein sensorische Kontakt in Tieren, welche durch ein Gitter über visuelle, olfaktorische und akustische Reize Zeugen des SDR – Paradigmas wurden (*SDR sensory contact*), sogar in verminderten Milzgewichten [7]. Diese Beobachtung führte zur These, die Entstehung einer Splenomegalie benötige den Einfluss physischen Kontakts. Da jedoch in Experiment 2 dieser Arbeit alle Tiere in physischem Kontakt zu ihrem Resident standen und trotzdem keine Zunahme im Milzgewicht beobachtet wurde, scheint ein im Rahmen des physischen Kontakts auftretender und bisher nicht erfasster Einflussfaktor diesen Zusammenhang zu vermitteln.

Wir vermuten, dass der bisher für das Milzgewicht nicht betrachtete Einfluss von Bissverletzungen hierfür entscheidend ist. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde für jedes CSC – Tier der Experimente 1 und 2 das Milzgewicht mit dem individuell bestimmten Schweregrad der Bissverletzungen korreliert. Während ein Zusammenhang vor allem bei niedrigen Bisscorewerten wie aus Experiment 2 fraglich ist, spricht eine signifikant positive Korrelation zwischen beiden Parametern für die Annahme unserer Vermutung, dass Bissverletzungen – insbesondere ab einem gewissen Schweregrad – einen direkten Einfluss auf das Milzgewicht ausüben.

4.3.4 Anzahl isolierter Milzzellen

Nachdem in verschiedenen Modellen eine Zunahme des Milzgewichts unter dem Einfluss von Stress gezeigt wurde, stellt sich die Frage, durch welche Mechanismen diese Gewichtsveränderungen vermittelt werden. Engler *et al.* stellten fest, dass es während SDR zu einer Einwanderung von CD11b⁺ Zellen, Monozyten und Neutrophilen, aus dem Knochenmark in die Milz kommt, während im Knochen kompensatorisch die Myelopoese dieser Zellreihen aktiviert wird [26]. Insgesamt steigt die absolute Anzahl von Monozyten in der Milz nach sechs Zyklen SDR um den Faktor 7,5 an [4]. In Einklang dazu zeigt sich in den Milzen von PF - Tieren eine reduzierte Anzahl an Lymphozyten, vor allem vermittelt durch geringere Zahlen an CD4⁺ T – Zellen, bei einem gleichzeitigen Anstieg von Monozyten und Neutrophilen [5]. Nach Stressexposition durch SDR oder PF scheint sich somit in der Milz das Gleichgewicht zwischen Zellen des angeboren und des adaptiven

Immunsystems zu Gunsten der unspezifischeren, dafür aber schneller verfügbaren angeborenen Immunität zu verschieben.

Während nach 19-tägiger CSC – Exposition in peripheren Lymphknoten eine gesteigerte Zytokinproduktion durch T – Lymphozyten im Sinne einer vermehrten immunologischen Aktivität des adaptiven Immunsystems gemessen wird [82], beobachteten Schmidt *et al.* in der Milz eine Abnahme im prozentualen Anteil von B – und T – Zellen. Gleichzeitig zeigte sich auch hier analog zu den Resultaten aus anderen Stressmodellen ein Anstieg an CD11b⁺ Zellen sowie eine Zunahme regulatorischer T – Zellen (Tregs) [79].

In dieser Arbeit ergab die Bestimmung der Milzzellzahlen keine Unterschiede zwischen den SHC und den CSC – Tieren sowohl für Gesamtzahl an Zellen, als auch für die Anzahl lebender Splenozyten. Erwartungsgemäß zeigten die SHC – Tiere beider Experimente vergleichbare Milzzellzahlen. Im Gegensatz dazu scheint es zunächst verwunderlich, dass trotz höherer Milzgewichte der Stresstiere aus Experiment 1 auch in den CSC – Gruppen beider Experimente ähnliche Zellzahlen gemessen wurden.

Unter dem Einfluss von chronischem Stress, beispielweise durch RST, zeigte sich in sekundär lymphatischen Organen wie der Milz eine gesteigerte erythropoetische Aktivität verbunden mit einem Anstieg heranreifender Erythrozyten [97]. Gleichzeitig konnten eine Zunahme der roten Pulpa sowie ein Anstieg des Milzgewichts beobachtet werden [96]. Möglicherweise vermittelt auch nach 19-tägiger CSC – Exposition eine gesteigerte extramedulläre Blutbildung die gemessene Splenomegalie. Die in dieser Arbeit konstante Zellzahl ließe sich dadurch erklären, dass durch Zugabe des ACK – Lyse – Puffers vor Bestimmung der Zellzahl eine möglicherweise erhöhte Anzahl an Erythrozyten in der anschließenden Zellzählung nicht erfasst werden kann. Allerdings spricht die fehlende Zunahme des Milzgewichts in den CSC – Tieren aus Experiment 2 gegen die Annahme dieser Hypothese.

Zum anderen sprechen die konstanten Gesamtzellzahlen aus dieser Arbeit sowie die von Schmidt *et al.* gezeigten Veränderungen der Zellpopulationen in der Milz für eine Gleichgewichtsverschiebung der Milzzellpopulationen von Zellen des adaptiven Immunsystems zu Gunsten von Zellen des angeborenen Immunsystems bei insgesamt konstant gehaltener Gesamtzellzahl nach 19-tägiger CSC – Exposition [79]. Während die auswandernden Lymphozyten eine Größe von etwa 7-18 µm besitzen, sind die einwandernden Monozyten mit etwa 12-20 µm deutlich größer und tragen somit auch bei gleichbleibender Zellzahl zu einer Volumen – und Gewichtszunahme der Milz bei [101]. Aktuelle Ergebnisse zum CSC – Modell ergaben bezüglich der Zusammensetzung der

Milzzellpopulation eine Reduktion von B – Zellen ($CD19^+$) und T – Helferzellen ($CD3^+/4^+$) bei gleichzeitiger Zunahme von $CD11b^+$ Zellen und stützen somit die oben genannte Hypothese [27].

4.3.5 *Cell viability* isolierter Milzzellen

Nach Bestimmung der Zellzahlen wurden die isolierten Splenozyten gemäß dem Protokoll der Arbeitsgruppe Engler für 48 Stunden *in vitro* mit dem Bakterienantigen LPS stimuliert [26]. Anschließend wurde nach 3-stündiger Inkubation mit MTS die Absorption im Überstand der Zellsuspension bestimmt. Die bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessene optische Dichte spiegelt als *cell viability* die Anzahl sowie die Stoffwechselaktivität der im Well enthaltenen Zellen wieder.

Die in den Abbildungen 11 und 16 dargestellten Resultate zeigen die basale und LPS induzierte *cell viability* unter 0 µM CORT und entsprechen somit der Zellaktivität ohne jeglichen Einfluss von exogen zugeführten GC. Für beide Experimente 1 und 2 konnte gezeigt werden, dass sowohl in den SHC wie auch in den CSC – Tieren die Zugabe von LPS zu einem signifikanten Anstieg der *cell viability* führt. Dies bestätigt, dass in allen Gruppen unabhängig von der Stressexposition die Stimulation mit LPS eine höhere Zellzahl, hauptsächlich vermittelt durch eine geringere Apoptoserate, bewirkt.

Genauere Vergleiche zwischen den Ergebnissen beider Experimente zeigen allerdings auch Unterschiede auf. In Experiment 2 lassen sich sowohl für die basale, wie auch die unter LPS Stimulation gemessene *cell viability* keine Unterschiede zwischen den SHC und den CSC – Tieren feststellen.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse aus Experiment 1. Hier weisen die isolierten Splenozyten der CSC – Tiere unter dem Einfluss von LPS eine signifikant höhere Zellaktivität als die der Kontrolltiere auf. Zudem zeigen die erhobenen Daten, dass selbst ohne exogene Stimulation mittels LPS unter basalen Bedingungen eine gesteigerte Stoffwechselaktivität besteht. In weitere Untersuchungen zum CSC – Modell konnten diese Resultate bereits reproduziert werden, wobei hierbei in vergleichbarer Intensität wie in Experiment 1 Bissverletzungen bei den CSC – Tiere erfasst wurden [27].

Im Gegensatz dazu weisen die Tiere aus Experiment 2 weitaus weniger Bissverletzungen auf, was vermutlich die fehlende Aktivitätssteigerung der isolierten Zellen erklärt.

Der in dieser Arbeit in Abbildung 19 gezeigte direkt proportionale Zusammenhang zwischen dem Ausmaß an Bissverletzungen und der basalen *cell viability* stützt diese Annahme und lässt zusammenfassend auf folgende Behauptungen schließen: Zunächst scheint die alleinige Exposition gegenüber psychosozialem Stress im CSC – Modell ohne den zu Grunde liegenden Einfluss von schwerwiegenderen Bissverletzungen zu keiner vermehrten immunologischen Aktivität in Milzzellen zu führen. Des Weiteren scheint ein geringes Ausmaß an Bisswunden – wie in Experiment 2 beobachtet – die *cell viability* der isolierten

Milzzellen nicht signifikant zu verändern. Vielmehr sprechen insbesondere die gemeinsam dargestellten Daten aus beiden Experimenten dafür, dass erst nach Überschreiten eines gewissen Schwellenmaßes an Bisswunden ein signifikanter Zusammenhang besteht und Bisswunden im Sinne einer dosisabhängigen Beziehung die immunologische Aktivität in Splenozyten stimulieren.

Insgesamt deuten die für beide Stressmodelle CSC und SDR in den grundsätzlichen Effekten übereinstimmenden Ergebnisse bezüglich Parametern wie dem Milzgewicht oder der Zellaktivität auf generelle, paradigmunenabhängige Effekte nach chronisch psychosozialer Stressexposition hin.

Während im CSC - Modell ein signifikant erhöhter Anstieg im Delta der Zellaktivität (LPS – basal bei 0 μ M CORT) in dieser Arbeit lediglich als minimaler und in den noch zu veröffentlichenden Daten als starker Trend beobachtet wurde [27], ist dies für das SDR – Modell allgemein beschrieben und zeigt sich beispielsweise in einem gesteigerten Deltaanstieg der *cell viability* sowie der IL – 6 Sekretion nach LPS Stimulation [3, 4, 6, 89]. Ähnlich wie auch schon beim Milzgewicht scheint sich auch hier im CSC zwar ein tendenziell gleichgerichteter, im Vergleich zum SDR in der Intensität jedoch geringerer Effekt zu zeigen. Die für das CSC aufgeführte Korrelation zwischen Milzzellaktivität und Bissverletzungen lässt somit auf Grund der paradigmunenabhängigen Effekte den Rückschluss zu, dass die deutlich stärker ausgeprägten Ergebnisse im SDR vermutlich auf ein höheres Ausmaß an Bissverletzungen zurückzuführen sind. Auch wenn nach SDR eine erhöhte basale Zellaktivität *in vitro* ohne exogenen Einfluss von CORT nach aktuellem Kenntnisstand bisher in der Literatur nicht beschrieben ist, lässt sich dies nun anhand der Erkenntnisse aus dem CSC – Modell auch auf das SDR – Modell übertragen. Eine gesteigerte antimikrobielle Aktivität von monozytären Milzzellen gegenüber *E. coli* Bakterien nach SDR – Exposition stärkt diese Annahme [2, 8].

4.3.6 GC – Resistenz isolierter Milzzellen

4.3.6.1 Eigene Ergebnisse im Kontext bisheriger Erkenntnisse

Neben der Bestimmung der *cell viability* unter basalen wie auch unter LPS stimulierten Bedingungen ohne Zugabe von exogenen GC wurde diese auch unter dem Einfluss unterschiedlicher CORT – Konzentrationen bestimmt. Zur besseren Vergleichbarkeit und in Anlehnung an vorausgegangene Untersuchungen zur GC – Resistenz wurden in dieser Arbeit fünf verschiedene Dosierungen von 0,005 μM bis 5 μM sowie zur besseren Vergleichbarkeit als Ausgangswert 0 μM CORT gewählt. Hiermit sind sowohl physiologisch basale (0,005 μM , 0,05 μM und 0,1 μM) und Stress äquivalente (0,5 μM) wie auch pharmakologische (5 μM) Konzentrationen vertreten. Zur Bestimmung der GC – Resistenz wurde für alle CORT – Konzentrationen das Delta der *cell viability* zwischen basaler und LPS stimulierter Bedingung berechnet. Um mögliche Baselineunterschiede der verschiedenen Tiere auszugleichen, wurden die berechneten Differenzen in das prozentuale Verhältnis zum Delta der *cell viability* unter CORT = 0 μM gesetzt, welche somit für jedes Tier den Ausgangswert 100% ergibt.

Zur Bestimmung der GC – Resistenz finden sich in der Literatur unterschiedliche Maßstäbe hinsichtlich einer möglichen Dateninterpretation. Beispielsweise orientierten sich Avitsur und Stark daran, ab welcher CORT – Konzentration ein signifikanter Abfall im Delta der *cell viability* im Vergleich zum Ausgangswert festzustellen ist, was bei den GC resistenten Stresstieren – wenn überhaupt – erst bei hohen CORT – Konzentrationen der Fall ist [6, 89]. Im Gegensatz dazu werden in anderen Arbeiten die Werte der Stresstiere innerhalb einer CORT – Konzentration direkt mit denen der Kontrolltiere verglichen, wobei diese im Falle einer entstandenen GC – Resistenz deutlich höher liegen [5].

Ähnlich wie bei den bereits diskutierten Milzparametern ließen sich in dieser Arbeit auch für die GC – Resistenz grundlegende Unterschiede zwischen den beiden Experimenten feststellen. In beiden Versuchen wiesen die Kontrolltiere ein Ansprechen auf den inhibitorischen CORT – Einfluss ab Konzentrationen von 0,05 μM und 0,1 μM auf. Ähnlich sensitiv reagierten auch die isolierten Splenozyten der CSC – Tiere aus Experiment 2, welche gleich wie die entsprechende Kontrollgruppe ab der dritthöchsten CORT – Konzentration (0,1 μM) ein signifikant erniedrigtes Delta der *cell viability* im Vergleich zum Ausgangswert zeigten. Lediglich innerhalb der höchsten CORT – Dosis war die Sensitivität der CSC – Tiere im direkten Vergleich zu den SHC – Tiere etwas vermindert,

was insgesamt für eine lediglich minimal eingeschränkte GC – Sensitivität in diesen Tieren trotz Exposition im CSC – Modell spricht.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse aus Experiment 1: Ein signifikantes Ansprechen auf die zugefügten GC im Vergleich zum Ausgangswert war bei diesen CSC – Tieren erst unter dem Einfluss der beiden höchsten CORT – Konzentrationen (0,5 μM und 5 μM) festzustellen. Gleichzeitig war im direkten Vergleich zwischen der Stress – und der Kontrollgruppe die Delta *cell viability* in den Milzzellen der CSC – Tiere bei jeder getesteten CORT – Dosis signifikant erhöht.

Die in Experiment 1 erhobenen Daten belegen somit, dass auch nach 19-tägiger Stressexposition im CSC – Modell die Ausbildung einer GC – Resistenz in vergleichbarem Ausmaß wie nach Exposition in anderen Stressmodellen wie dem SDR oder dem PF möglich ist [5, 89] und die Entstehung einer GC – Resistenz somit als paradigmengreifender Effekt gesehen werden kann.

Außerdem kann nun die eingangs gestellte Frage beleuchtet werden, weshalb in der von Reber *et al.* veröffentlichten Publikation die GC – Resistenz in den isolierten Milzzellen der CSC – Tiere im Vergleich zu den bisherigen Ergebnissen aus dem SDR nahezu verschwindend gering ausgefallen ist [71]. Die zunächst angenommene Vermutung, die verhältnismäßig lange Expositionsdauer des CSC – Paradigmas führe möglicherweise über adaptive Vorgänge zu milder ausgeprägten Effekten kann anhand der Ergebnisse aus Experiment 1 verworfen werden. Vielmehr widerlegen die hier gezeigten Daten, dass die ausbleibende Entstehung einer GC – Resistenz nach SDR über bis zu 14 Stunden pro Tag allein durch die bisher angenommene veränderte zeitliche Kinetik zu erklären ist [6].

Des Weiteren stützen die erhobenen Daten bisherige Erkenntnisse aus den SDR oder RST – Modellen. Hierfür wurde bereits gezeigt, dass trotz ähnlicher Stressintensität, gemessen an vergleichbaren CORT – Spiegeln im Plasma, der rein psychosoziale Stresseinfluss während SDR ohne direkten, anhaltenden physischen Kontakt der Versuchstiere zum dominanten Artgenossen sowie alleiniger Immobilisationsstress keine GC – Resistenz in Milzzellen induzierten [7, 57, 84]. Die Ergebnisse aus Experiment 2 lassen diese bisherige Theorie noch um zwei weitere Annahmen erweitern: Zum einen scheint auch eine zeitliche Intensivierung des psychosozialen Stresseinflusses wie im CSC – Modell nicht ausreichend zu sein, um die Entstehung einer GC – Resistenz zu vermitteln. Zum anderen kann der direkte physische Kontakt während der Stressexposition als alleiniger modulierender Einflussfaktor zur Ausbildung einer GC – Resistenz nach psychosozialem

Stress verworfen werden, da alle Tiere aus Experiment 2 zwar über 19 Tage einem direkten physischen Einfluss gegenüber dem Resident und ihren Käfiggenossen ausgesetzt waren, eine GC – Resistenz in diesen Tieren jedoch trotzdem nicht in entscheidendem Ausmaß festgestellt wurde.

In Einklang zu den bisherigen Ergebnissen aus dem SDR – Konzept sprechen nun auch die hier gezeigten Daten und die deutlichen Unterschiede zwischen den Experimenten dafür, dass der Einfluss von Verletzungen durch Bisswunden auch beim CSC – Modell der entscheidende Faktor für die Entstehung einer GC – Resistenz ist [6].

Zudem erweitern die vorliegenden Ergebnisse die aktuellen Erkenntnisse zum Einfluss von Bissverletzungen auf die GC – Resistenz, da durch die Etablierung des bereits vorgestellten Bisscores erstmalig eine detaillierte Quantifizierung von individuellen Bisswunden einzelner Tiere und deren Vergleich ermöglicht wird. Die im SDR bisher verwendete Einteilung der Stresstiere in „verwundet“ (tiefergehende Läsionen im Bereich des Fells, des Schwanzes oder des Genitalbereiches) oder „unverwundet“ (leichte oberflächliche Kratzer oder keine sichtbaren Verletzungen) anhand bloßer Inspektion der Felloberseite barg stets die Gefahr, mögliche Verletzungen zu übersehen [6]. Gleichzeitig lässt diese grobe Einteilung keinen Rückschluss zu, ob es sich beim Einfluss von Bissverletzungen auf die GC – Resistenz um ein On – Off – Phänomen handelt oder möglicherweise ein dosisabhängiger Zusammenhang besteht.

Die signifikante Korrelation zwischen dem Schweregrad an Bissverletzungen und der *Delta cell viability* unter 5 μ M CORT beider Experimente (s. Abb. 20) spricht – in ähnlicher Weise wie bereits für die basale *cell viability* gezeigt – für einen direkt proportionalen Einfluss von Bissverletzungen auf das Ausmaß der GC – Resistenz. Gleichzeitig deutet die ausgeprägte Streuung im linken Bereich des Graphen darauf hin, dass dieser Zusammenhang besonders ab einem bestimmten Schwellenmaß an Bissverletzungen, etwa ab einem Scorewert von 20 Punkten, bedeutsam wird. Diese Erkenntnisse lassen den Rückschluss zu, dass die bisher von Reber *et al.* für das CSC gezeigte, sehr gering ausgeprägte GC – Resistenz vermutlich auf ein sehr mildes Ausmaß an Bissverletzungen in den untersuchten Tieren zurückzuführen ist und legen nahe, dass alle nach CSC beschriebenen affektiven und somatischen Pathologien vornehmlich der psychosozialen Belastung und nicht den erlittenen Verletzungen geschuldet sind. Möglicherweise spielt jedoch auch eine unterschiedliche Sensitivität der Milzzellen gegenüber GC im Rahmen der zunächst *in vitro* noch erhaltenen zirkadianen Rhythmik eine Rolle, da die Tötung der von Reber *et al.* untersuchten Tiere am Abend erfolgte und somit die Stimulation der isolierten Zellen zu einem anderen Zeitpunkt

als in dieser Arbeit stattfand [71]. Zukünftig sind hier noch weitere Untersuchungen notwendig.

4.3.6.2 Der Weg zur GC - Resistenz

Allerdings stellt sich im weiteren Verlauf die Frage, ob Bissverletzungen für sich genommen oder das damit verbundene Eindringen von Bakterien die zu beobachtenden Veränderungen in den Milzzellparameter hervorrufen. Zumindest für Veränderungen des Milzgewichts sowie die Einwanderung von CD11b⁺ Zellen in die Milz scheinen Bakterien keine entscheidende Rolle zu spielen, da beide Parameter auch in sterilen Mauspopulationen die beschriebenen Veränderungen nach SDR – Exposition zeigten [1]. Zudem wurde festgestellt, dass Tiere nach SDR zwar eine Splenomegalie, eine vermehrte Mobilisation von CD11b⁺ Zellen in die Milz sowie eine gesteigerte *cell viability* in Splenozyten aufwiesen, ohne die Zugabe von LPS *in vitro* die Sensitivität für GC jedoch unverändert erhalten blieb. Erst nach Zugabe von LPS konnte die Entstehung einer GC – Resistenz *in vitro* nachgewiesen werden, wobei hierfür die Bindung von LPS an den *toll – like – receptor* (TLR) – 4 erfolgen muss [3].

Die Zusammenschau dieser Beobachtungen führte schließlich zu der Entwicklung des nachfolgenden Konzeptes, welches die aufeinanderfolgenden Veränderungen der verschiedenen Milzparameter auf dem Weg zum Vollbild einer GC – Resistenz aufzeigen soll [3, 65] (s. Abb. 21, graue Schriftfarbe): Die Exposition gegenüber chronischem psychosozialen Stress als sogenanntes „*first signal*“ bewirke eine Immunaktivierung im Sinne eines „Primings“, welche sich in der Einwanderung und einer gesteigerten Aktivität von CD11b⁺ Zellen in der Milz widerspiegeln soll (s. Abb. 21, ↑ Milz *cell viability*). Zur Ausbildung einer GC – Resistenz werde jedoch zwingenderweise die Stimulation mit LPS als „*second signal*“ benötigt, welche *in vitro* eine Infektion mit gramnegativen Bakterien simuliert [3].

Diese Veränderungen lassen sich auch auf molekularer Ebene nachvollziehen, wobei sich die über den GR vermittelte, immuninhibitorische Wirkung von GC und die proinflammatorische Wirkung von NFκB als Antagonisten gegenüberstehen und ohne jeglichen Einfluss von Stress oder LPS in einem ausgeglichenen Verhältnis zueinanderstehen. Unter dem Einfluss von Stress als „*first signal*“ kommt es jedoch zu ersten Veränderungen am GR, welche sich in einer verminderten zytoplasmatischen GR – Proteinexpression sowie in einer eingeschränkten nukleären Rezeptortranslokation

zeigen. Diese reduzierte Rezeptorfunktion bei gleichzeitig unveränderter Wirkungsweise von NFκB vermittelt eine Steigerung der immunologischen Zellaktivität, ohne dass bereits der Zustand einer GC – Resistenz erreicht wäre. Im Gegensatz dazu bewirkt die Stimulation mit LPS als „*second signal*“ eine vermehrte Proteinexpression von NFκB, welcher bei eingeschränkter GR – Funktion nicht mehr ausreichend entgegengewirkt werden kann, woraus schließlich eine Gleichgewichtsverschiebung zu Gunsten der proinflammatorischen Wirkung von NFκB mit Entwicklung einer GC – Resistenz resultiert [65].

In Einklang dazu stehen die aktuellsten Ergebnisse aus dem CSC – Paradigma, da auch für dieses Modell eine reduzierte basale (ohne Zugabe von LPS) GR – Proteinexpression nach Stressexposition nachgewiesen werden konnte. Zudem zeigte sich die Ausbildung einer GC – Resistenz erst nach zusätzlicher *in vitro* Stimulation mit LPS [27].

Allerdings ermöglichen die Ergebnisse zum CSC aus der vorliegenden Arbeit auch eine Erweiterung des bisher angenommenen Konzeptes. Die gezeigten Korrelationen unterstreichen den enormen Einfluss von Bissverletzungen auf die verschiedenen Milzparameter – ein Zusammenhang, welcher im bisherigen Konzept aus Ergebnissen des SDR – Modells keine Beachtung findet (s. Abb. 21, graue Schriftfarbe). Zudem erlauben die in Experiment 2 erhobenen Resultate den Rückschluss, dass die alleinige Exposition gegenüber psychosozialen Stress ohne, beziehungsweise mit lediglich minimal ausgeprägten Bissverletzungen, als „*first signal*“ keine Splenomegalie oder gesteigerte Milz *cell viability* vermittelt. Vielmehr ist die Stressexposition im Sinne des „*first signals*“ als zwingende Voraussetzung hierfür zu verstehen [84], während ein ausreichendes Maß an Bissverletzungen als eigentlicher Einflussfaktor in direkt proportionaler Weise die Entstehung einer Splenomegalie und einer erhöhten Milz *cell viability* beeinflusst. Diese Erkenntnisse sollten zukünftig im vorgestellten Konzept als weiteres „*signal*“ bedacht und Bissverletzungen deshalb als „*second signal*“ berücksichtigt werden. Somit bewirkt die *in vitro* Stimulation mit LPS erst an dritter Stelle als „*third signal*“ die Ausbildung einer GC – Resistenz (s. Abb. 21, grüne Schriftfarbe).

Des Weiteren ist aus den Ergebnissen dieser Arbeit ersichtlich, dass die erhobenen Daten innerhalb der Gruppe der Stresstiere, insbesondere in Experiment 1, erheblichen interindividuellen Schwankungen unterliegen, was – wie bereits erörtert – unterschiedlich stark ausgeprägten Bissverletzungen zuzuschreiben ist. Für das CSC – Modell konnte kürzlich gezeigt werden, dass das individuelle Copingverhalten der einzelnen Tiere in direkter Weise das Ausmaß an Bisswunden bedingt und somit indirekt die beschriebenen Veränderungen der Milzparameter im Grad ihrer Intensität beeinflusst. Ein subordinierter Copingstil im Sinne von Flucht – oder Vermeidungsverhalten gegenüber dem Resident birgt demnach die größte Gefahr für Verletzungen durch Bisswunden und daraus folgender Immunaktivierung und GC – Resistenz. Im Gegensatz zu diesen eher passiv – reagierenden Verhaltensweisen scheint hingegen ein pro – aktives Verhalten, beispielsweise eigenes Attackieren, einen gewissen „Schutz“ gegenüber diesen Stressfolgen zu vermitteln [27].

4.3.6.3 GC – Resistenz: Fluch oder Segen?

Nachdem nun die verschiedenen Einflussfaktoren sowie der Weg bis hin zu der Entwicklung einer GC – Resistenz in groben Zügen beleuchtet wurden, stellt sich abschließend die Frage: „Ist die Entstehung einer GC – Resistenz als adaptiv oder eher im Sinne eines maladaptiven Prozesses zu verstehen?“

Grundlegend kann gesagt werden, dass das oben beschriebene Verhalten eines subordinierten und somit passiveren Copings, welches über Bissverletzungen zu einer GC – Resistenz führt, als eher maladaptiv gewertet werden kann. Ein primär aktives Stressmanagement konnte in verschiedenen Tierstudien mit geringer ausgeprägten physiologischen Stressfolgen sowie einer schnelleren Erholung von diesen in Verbindung gebracht werden [47, 56, 99].

Während somit das der GC – Resistenz zu Grunde liegende Verhalten unter dem Einfluss von Stress nicht als optimal gewertet werden kann, sprechen einige Erkenntnisse dafür, dass auch die entstandene GC – Resistenz für sich betrachtet negative Folgen für den Organismus bringt. Nach Exposition im SRO – Modell wiesen die Tiere nach nasaler Virusapplikation eine deutlich erhöhte Mortalität im Vergleich zu den Stresstieren nach RST auf. Der erhöhten Sterblichkeitsrate lag eine überschießende Entzündungsreaktion im Bereich der Lunge zu Grunde, welche auf die Entstehung einer GC – Resistenz nach SRO zurückgeführt wurde und die nach RST – Exposition nicht festzustellen war [84]. Auch für das SDR – Modell konnte gezeigt werden, dass nach intraperitonealer Verabreichung von LPS die betroffenen Tiere vermehrt an einem endotoxischen Schock mit unkontrollierbarer,

systemischer Entzündungsreaktion und resultierenden Multiorganschäden, beispielsweise in der Lunge, dem Gehirn und der Milz starben. Dies war aller Wahrscheinlichkeit nach auf ein reduziertes Ansprechen auf immunmodulatorischen Einfluss von GC zurückzuführen [66]. Des Weiteren muss bedacht werden, dass eine erhöhte immunologische Aktivität vor allem in monozytären Zellen zwar die angeborene Immunität stärkt, ein gleichzeitig hemmender Einfluss auf Zellpopulationen des adaptiven Immunsystems, beispielsweise den T – Zellen, jedoch das Wachstum von Tumoren wie dem Fibrosarkom begünstigt [80].

Insgesamt scheint somit die Ausbildung einer GC – Resistenz die Gefahr für schwer kontrollierbare, teilweise systemische Entzündungsreaktionen sowie die Entstehung von Tumoren zu erhöhen.

Im Gegensatz dazu sind jedoch auch Argumente zu nennen, welche die Vorteile einer entstandenen GC – Resistenz in gebissenen Tieren unterstreichen. Die Ergebnisse aus dieser Arbeit konnten eindrücklich belegen, dass die GC – Resistenz keinen bloßen „Nebefund“ nach chronisch psychosozialer Stressexposition darstellt, sondern sich lediglich dann ausbildet, wenn Bissverletzungen ab einem bestimmten Schweregrad vorhanden sind. Berücksichtigt man dabei, dass diese Bissverletzungen potenziell das Risiko einer Infektion mit verschiedenen Bakterien bergen und zudem unter Stressexposition häufiger eine Keimtranslokation und – besiedelung stattfindet [9], erscheint eine gesteigerte immunologische Aktivität, welche nicht unmittelbar durch stressbedingt hohe GC – Konzentrationen gehemmt wird, als durchaus angebracht. Die nach SDR aus der Milz isolierten Makrophagen erwiesen sich dabei in ihrer antibakteriellen Aktivität gegen Keime des *E. coli* – Stammes als deutlich effektiver, als die der Kontrolltiere [8]. Da durch Bissverletzungen während oben genannter Stressparadigmen die Tiere somit in erster Linie durch akute Infektionen gefährdet sind, erscheint die relativ selektive Ausbildung der GC – Resistenz in der myeloiden Zellpopulation mit Stärkung der schnellen, angeborenen Immunantwort sinnvoll. Insbesondere der Gruppe der *myeloid derived suppressor cells* (MDSCs) wird eine spezielle Rolle im Sinne einer ersten Abwehrbarriere gegenüber eindringenden Keimen während verschiedener Entzündungszustände zugesprochen [16].

Neben einem adäquaten, immunologischen Schutz gegenüber systemischen Infektionen ist eine effiziente Immunaktivierung auch lokal im Bereich von Bissverletzungen von enormer Relevanz, um während der sogenannten Entzündungsphase den entscheidenden Antrieb für eine erfolgreiche und schnelle Wundheilung zu geben. Sowohl im Tiermodell, als auch in Humanstudien zeigte sich unter dem Einfluss von chronischem, insbesondere negativ

behafteten Stress eine kompromittierte Wundheilungsfähigkeit [45, 54, 60, 98]. Es wird vermutet, dass unter Stressexposition die anhaltende Aktivierung der HPA – Achse und die vermehrte Produktion und Freisetzung von GC eine Immunsuppression mit Hemmung der initialen Entzündungsphase bewirken, wodurch die nachfolgenden Schritte der Wundheilung nicht ausreichend stimuliert werden [13, 32]. Die Entstehung einer GC – Resistenz dient somit möglicherweise der Aufrechterhaltung einer adäquaten Entzündungsaktivität im Bereich von Bissverletzungen, um trotz stressbedingt hoher GC – Spiegel eine suffizient funktionierende Wundheilung zu gewährleisten. Diese stellt für die Tiere während der Stressexposition und unter dem Einfluss von Bissverletzungen eine lebensnotwendige Voraussetzung dar.

Zudem kann betont werden, dass die Ausbildung der GC – Resistenz in sehr differenzierter Weise auftritt und in ihrem Ausmaß einer fein abgestimmten Dosierung unterliegt. Zum einen ließ sich die GC – Resistenz nicht in allen Immunzellen, sondern lediglich selektiv in ausgewählten Zellpopulationen, beispielsweise in isolierten Milzzellen nachweisen, während gleichzeitig die Sensitivität auf GC in mononukleären Peritonealzellen vollständig erhalten blieb. Zum anderen unterliegt die GC – Resistenz auch einer zeitlichen Regulierung und war 30 Tage nach Beendigung der Exposition im SDR nicht mehr nachweisbar [4]. Dies spricht dafür, dass die GC – Resistenz lediglich in engem, zeitlichen Zusammenhang zu einer potenziellen Gefährdung durch Infektionen oder Wundheilungsstörungen auftritt. Die anschließende Rückkehr zu einer basalen immunologischen Aktivität und zu einem physiologischen Ansprechen auf GC reduziert das Risiko für anhaltend überschießende Immunreaktionen wieder auf ein normales Ausgangsniveau.

Des Weiteren ist sowohl im SDR, wie auch im CSC – Modell die GC – Resistenz *in vitro* nur in gebissenen Tieren und unter zusätzlicher Stimulation mit LPS nachweisbar, während ohne dessen Zugabe lediglich eine gesteigerte immunologische Aktivität mit weiterhin erhaltenem Ansprechen auf GC besteht [3, 27]. Da LPS ein Oberflächenantigen auf gramnegativen Bakterien ist, kann davon ausgegangen werden, dass auch *in vivo* erst eine Infektion mit Keimen aus dem gramnegativen Spektrum die Ausbildung einer GC – Resistenz triggert und diese somit nur in diesen Fällen auftritt, in denen eine tatsächliche Gefahr, beispielsweise durch bakterielle Translokation nach Bissverletzungen für den Organismus besteht.

Als abschließendes Argument für die adaptive Funktion der GC – Resistenz können die dargestellten Korrelationen der vorliegenden Arbeit genannt werden. Diese zeigen eindeutig, dass die untersuchten Milzparameter einschließlich der GC – Resistenz in einer

direkten, dosisabhängigen Weise mit dem Ausmaß der Bissverletzungen zusammenhängen. Die entstandene GC – Resistenz steht somit in ihrer Intensität in einem maßvollen und bedarfsgerechten Verhältnis zu den erlittenen Bisswunden und den damit verbundenen Risiken für Wundheilungsstörungen oder systemische Infektionen.

Somit vertrete ich zusammenfassend die Ansicht, dass die selektive und differenzierte Ausbildung einer GC – Resistenz, welche in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Einfluss von Bissverletzungen auftritt, die gestressten Tiere vor der akuten, lebensbedrohlichen Gefahr durch Infektionen und Wundheilungsstörungen schützt und das gleichzeitig erhöhte Risiko für eine unkontrollierbare Inflammation oder für die Entstehung von Tumoren in dieser Situation von untergeordneter Bedeutung ist.

5 Zusammenfassung

Der Einfluss von chronischem psychosozialen Stress gilt als anerkannter Risikofaktor für die Entstehung von verschiedensten Krankheiten, wobei in der Pathogenese eine reduzierte Glukokortikoid (GC) – Signaltransduktion, beispielsweise durch eine verminderte Hormonfreisetzung oder durch eine periphere Resistenz gegenüber GC, an Bedeutung gewinnt. Um die Mechanismen eines verminderten GC – Signallings unter dem Einfluss von psychosozialem Stress näher zu untersuchen, eignen sich entsprechende Tiermodelle wie das von Reber und Mitarbeitern etablierte Modell der chronischen subordinierten Koloniehaltung (CSC). Die 19-tägige Stressexposition induziert in den Versuchstieren neben einem Hypocorticismus auch eine periphere GC – Resistenz in isolierten Splenozyten.

Ziel dieser Arbeit war es zu klären, weshalb nach CSC – Exposition die GC – Resistenz in isolierten Milzzellen bisher in nicht annähernd vergleichbarer Intensität wie nach Exposition in anderen Tiermodellen nachgewiesen werden konnte. Da noch nicht berücksichtigte Bisswunden als möglicher Einflussfaktor vermutet wurden, sollte zudem ein einfaches und reproduzierbares Vorgehen zur standardisierten Quantifizierung von Bissverletzungen erarbeitet und etabliert werden. Durch die Bestimmung des Organgewichts, der Zellzahlen sowie der basalen und der mittels Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten immunologischen Aktivität der isolierten Zellen wurde die Untersuchung der Milz komplettiert.

Hierfür wurden die Milzen nach beendeter Stressexposition entnommen und gewogen sowie die Splenozyten isoliert und gezählt. Anschließend erfolgte *in vitro* die Zellkultivierung unter basalen und LPS Bedingungen sowie die Messung der Zellaktivität unter dem Einfluss verschiedener Kortikosteron (CORT) – Konzentrationen.

Die dabei erhobenen Ergebnisse imponierten zunächst durch eine große interindividuelle Streuung. Während in einem Teil der gestressten Tiere keine Veränderungen in den untersuchten Parametern nachgewiesen werden konnten, zeigten andere Tieren eine signifikante Zunahme im Milzgewicht, eine erhöhte Immunaktivität in den isolierten Splenozyten sowie eine GC – Resistenz, welche sich in ihrer Intensität vergleichbar mit der aus anderen Stressmodellen zeigte. Es kann somit von paradigmunenabhängigen Veränderungen nach chronischer psychosozialer Stressexposition ausgegangen werden.

Zudem wurde ein Protokoll erarbeitet, wodurch die Intensität der Bissverletzungen einzelner Tiere individuell erfasst wurde. Somit war es erstmals möglich, einen direkten,

dosisabhängigen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß an Bissverletzungen und den gemessenen Milzparametern aufzuzeigen und bisherige Erkenntnisse um folgendes Gesamtfazit zu ergänzen:

Da die alleinige Exposition im Stressmodell ohne den Einfluss von schwerwiegenderen Bissverletzungen zu keinen Veränderungen im Milzgewicht, der basalen und der LPS stimulierten Zellaktivität sowie der Sensitivität gegenüber GC führte, induzieren nicht die psychosoziale Stresskomponente des verwendeten Tiermodells an sich, sondern die mit Rankkämpfen einhergehenden Bisswunden die beobachteten Veränderungen in den verschiedenen Milzparametern. Des Weiteren verändert ein lediglich geringes Ausmaß an Bisswunden die untersuchten Parameter nicht. Vielmehr sprechen insbesondere die gesammelt betrachteten Daten aus beiden Experimenten dafür, dass erst nach Überschreiten eines gewissen Schwellenmaßes an Bisswunden ein signifikanter Zusammenhang besteht und Bisswunden im Sinne einer dosisabhängigen Beziehung das Ausmaß der entstandenen Splenomegalie, der Milzzellaktivität und der GC – Resistenz beeinflussen.

Zudem kann angenommen werden, dass es sich bei der Entstehung der GC – Resistenz um einen adaptiven Vorgang handelt, da hierdurch die Tiere – aller Wahrscheinlichkeit nach – von verbesserten Wundheilungschancen und einer erhöhten Widerstandsfähigkeit gegenüber systemischen Infektionen profitieren. Zur tatsächlichen Verifizierung dieser Vermutung sind in diesem Bereich noch weitere Untersuchungen notwendig.

Abschließend unterstreichen die erhobenen Ergebnisse, dass für zukünftige Tierstudien, insbesondere bezüglich immunologischer Fragestellungen nach psychosozialem Stress, ein besonderes Augenmerk auf potenzielle Verletzungen durch Bisswunden und deren jeweils unterschiedlich ausgeprägter Schweregrad gelegt werden sollte, da diese Faktoren einen bedeutsamen und vor allem individuell unterschiedlichen Einfluss auf die untersuchten Parameter ausüben.

Außerdem implizieren die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse, dass selbst unter maximal standardisierten Bedingungen eine breite Streuung von Ergebnissen innerhalb einer scheinbar homogenen Gruppe an Stresstieren nicht für eine mangelnde Qualität der Versuchsdurchführung spricht, sondern lediglich die interindividuell stark unterschiedlichen Adaptationsweisen der einzelnen Tiere widerspiegelt.

6 Literaturverzeichnis

1. Allen R G, Lafuse W P, Galley J D, Ali M M, Ahmer B M, Bailey M T: The intestinal microbiota are necessary for stressor-induced enhancement of splenic macrophage microbicidal activity. *Brain Behav.Immun.*, 26: 371-382 (2012)
2. Allen R G, Lafuse W P, Powell N D, Webster Marketon J I, Stiner-Jones L M, Sheridan J F, Bailey M T: Stressor-induced increase in microbicidal activity of splenic macrophages is dependent upon peroxynitrite production. *Infect.Immun.*, 80: 3429-3437 (2012)
3. Avitsur R, Padgett D A, Dhabhar F S, Stark J L, Kramer K A, Engler H, Sheridan J F: Expression of glucocorticoid resistance following social stress requires a second signal. *J.Leukoc.Biol.*, 74: 507-513 (2003)
4. Avitsur R, Stark J L, Dhabhar F S, Padgett D A, Sheridan J F: Social disruption-induced glucocorticoid resistance: kinetics and site specificity. *J.Neuroimmunol.*, 124: 54-61 (2002)
5. Avitsur R, Stark J L, Dhabhar F S, Sheridan J F: Social stress alters splenocyte phenotype and function. *J.Neuroimmunol.*, 132: 66-71 (2002)
6. Avitsur R, Stark J L, Sheridan J F: Social stress induces glucocorticoid resistance in subordinate animals. *Hormones & Behavior*, 39: 247-257 (2001)
7. Bailey M T, Avitsur R, Engler H, Padgett D A, Sheridan J F: Physical defeat reduces the sensitivity of murine splenocytes to the suppressive effects of corticosterone. *Brain Behav.Immun.*, 18: 416-424 (2004)
8. Bailey M T, Engler H, Powell N D, Padgett D A, Sheridan J F: Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.*, 293: R1180-90 (2007)
9. Bailey M T, Engler H, Sheridan J F: Stress induces the translocation of cutaneous and gastrointestinal microflora to secondary lymphoid organs of C57BL/6 mice. *J.Neuroimmunol.*, 171: 29-37 (2006)
10. Bartolomucci A, Pederzani T, Sacerdote P, Panerai A E, Parmigiani S, Palanza P: Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 29: 899-910 (2004)
11. Bhavsar P, Hew M, Khorasani N, Torrego A, Barnes P J, Adcock I, Chung K F: Relative corticosteroid insensitivity of alveolar macrophages in severe asthma compared with non-severe asthma. *Thorax*, 63: 784-790 (2008)
12. Cabon Q, Deroy C, Ferrand F, Pillard P, Cachon T, Fau D, Goy-Thollot I, Viguier E, Carozzo C: Thoracic bite trauma in dogs and cats: a retrospective study of 65 cases. *Vet.comp.orthop.traumatol.*, 28: 448-454 (2015)

13. Cain D W, Cidlowski J A: Specificity and sensitivity of glucocorticoid signaling in health and disease. *Best Pract.Res.Clin.Endocrinol.Metab.*, 29: 545-556 (2015)
14. Cosio B G, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock I M, Barnes P J: Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J.Exp.Med.*, 200: 689-695 (2004)
15. Crofford L J, Pillemer S R, Kalogeras K T, Cash J M, Michelson D, Kling M A, Sternberg E M, Gold P W, Chrousos G P, Wilder R L: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis perturbations in patients with fibromyalgia. *Arthritis Rheum.*, 37: 1583-1592 (1994)
16. Cuenca A G, Delano M J, Kelly-Scumpia K M, Moreno C, Scumpia P O, Laface D M, Heyworth P G, Efron P A, Moldawer L L: A paradoxical role for myeloid-derived suppressor cells in sepsis and trauma. *Mol.Med.*, 17: 281-292 (2011)
17. Culpitt S V, Rogers D F, Shah P, De Matos C, Russell R E, Donnelly L E, Barnes P J: Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.*, 167: 24-31 (2003)
18. de Kloet E R: From receptor balance to rational glucocorticoid therapy. *Endocrinology*, 155: 2754-2769 (2014)
19. de Kloet E R, Fitzsimons C P, Datson N A, Meijer O C, Vreugdenhil E: Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res.*, 1293: 129-141 (2009)
20. Demitrack M A, Dale J K, Straus S E, Laue L, Listwak S J, Kruesi M J, Chrousos G P, Gold P W: Evidence for impaired activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in patients with chronic fatigue syndrome. *J.Clin.Endocrinol.Metab.*, 73: 1224-1234 (1991)
21. Dettenborn L, Muhtz C, Skoluda N, Stalder T, Steudte S, Hinkelmann K, Kirschbaum C, Otte C: Introducing a novel method to assess cumulative steroid concentrations: increased hair cortisol concentrations over 6 months in medicated patients with depression. *Stress*, 15: 348-353 (2012)
22. Dhabhar F S: Enhancing versus Suppressive Effects of Stress on Immune Function: Implications for Immunoprotection versus Immunopathology. *Allergy Asthma Clin.Immunol.*, 4: 2-11 (2008)
23. Dhabhar F S: Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 917: 876-893 (2000)
24. Dhabhar F S, McEwen B S: Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 96: 1059-1064 (1999)
25. Engler H, Bailey M T, Engler A, Sheridan J F: Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. *J.Neuroimmunol.*, 148: 106-115 (2004)

26. Engler H, Engler A, Bailey M T, Sheridan J F: Tissue-specific alterations in the glucocorticoid sensitivity of immune cells following repeated social defeat in mice. *J.Neuroimmunol.*, 163: 110-119 (2005)
27. Foertsch S, Fuchsl A M, Faller S D, Hölzer H, Langgartner D, Messmann J, Strauß G, Reber S O: Splenic glucocorticoid resistance following psychosocial stress requires physical injury. *Nature Sci reports*, 7: 15730 (2017)
28. Fuchsl A M, Langgartner D, Reber S O: Mechanisms underlying the increased plasma ACTH levels in chronic psychosocially stressed male mice. *PLoS One*, 8: e84161 (2013)
29. Fuchsl A M, Neumann I D, Reber S O: Stress resilience: a low-anxiety genotype protects male mice from the consequences of chronic psychosocial stress. *Endocrinology*, 155: 117-126 (2014)
30. Fuchsl A M, Uschold-Schmidt N, Reber S O: Chronic psychosocial stress in male mice causes an up-regulation of scavenger receptor class B type 1 protein in the adrenal glands. *Stress*, 16: 461-468 (2013)
31. Gangl K: https://www.vdma.org/documents/105628/244511/TK_Studie%20Stress.pdf/15ff404a-1799-457f-81cc-1bd640f8f56f (19.05.2017)
32. Glaser R, Kiecolt-Glaser J K: Stress-induced immune dysfunction: implications for health. *Nat.Rev.Immunol.*, 5: 243-251 (2005)
33. Handwerker H O, Kress M: Vegetatives Nervensystem. In: Speckmann E J, Hescheler J, Köhling R (Hrsg) *Physiologie*, 5. Auflage, Elsevier, S. 679-685 (2008)
34. Hapke U, Maske U E, Scheidt-Nave C, Bode L, Schlack R, Busch M A: Chronic stress among adults in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56: 749-754 (2013)
35. Hermann G, Tovar C A, Beck F M, Allen C, Sheridan J F: Restraint stress differentially affects the pathogenesis of an experimental influenza viral infection in three inbred strains of mice. *J.Neuroimmunol.*, 47: 83-94 (1993)
36. Hodges J R: The hypothalamo-pituitary-adrenocortical system. *Br.J.Anaesth.*, 56: 701-710 (1984)
37. Horn J P, Swanson L W: The Autonomic Motor System and the Hypothalamus. In: Kandel E R, Schwartz J H, Jessell T M, Siegelbaum S A, Hudspeth A J (Hrsg) *Principles of Neural Science*, 5. Aufl, McGraw-Hill Companies, S. 1069-1077 (2013)
38. Janicki-Deverts D, Cohen S, Turner R B, Doyle W J: Basal salivary cortisol secretion and susceptibility to upper respiratory infection. *Brain Behav.Immun.*, 53: 255-261 (2016)
39. Juruena M F, Cleare A J, Pariante C M: The hypothalamic pituitary adrenal axis, glucocorticoid receptor function and relevance to depression. *Rev.Bras.Psiquiatr.*, 26: 189-201 (2004)

40. Kaliste-Korhonen E, Eskola S: Fighting in NIH/S male mice: consequences for behaviour in resident-intruder tests and physiological parameters. *Lab.Anim.*, 34: 189-198 (2000)
41. Keeney A J, Hogg S: Behavioural consequences of repeated social defeat in the mouse: preliminary evaluation of a potential animal model of depression. *Behav.Pharmacol.*, 10: 753-764 (1999)
42. Keller J, Flores B, Gomez R G, Solvason H B, Kenna H, Williams G H, Schatzberg A F: Cortisol circadian rhythm alterations in psychotic major depression. *Biol.Psychiatry*, 60: 275-281 (2006)
43. Kendler K S, Hettema J M, Butera F, Gardner C O, Prescott C A: Life event dimensions of loss, humiliation, entrapment, and danger in the prediction of onsets of major depression and generalized anxiety. *Arch.Gen.Psychiatry*, 60: 789-796 (2003)
44. Kiecolt-Glaser J K, Glaser R, Gravenstein S, Malarkey W B, Sheridan J: Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 93: 3043-3047 (1996)
45. Kiecolt-Glaser J K, Marucha P T, Malarkey W B, Mercado A M, Glaser R: Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet*, 346: 1194-1196 (1995)
46. Kim Y K, Na K S, Myint A M, Leonard B E: The role of pro-inflammatory cytokines in neuroinflammation, neurogenesis and the neuroendocrine system in major depression. *Prog.Neuropsychopharmacol.Biol.Psychiatry*, 64: 277-284 (2016)
47. Koolhaas J M, De Boer S F, De Rutter A J, Meerlo P, Sgoifo A: Social stress in rats and mice. *Acta Physiol.Scand.Suppl.*, 640: 69-72 (1997)
48. Krause N: Life stress as a correlate of depression among older adults. *Psychiatry Res.*, 18: 227-237 (1986)
49. Krishnadas R, Cavanagh J: Depression: an inflammatory illness? *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry.*, 83: 495-502 (2012)
50. Kyrou I, Tsigos C: Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Curr.Opin.Pharmacol.*, 9: 787-793 (2009)
51. Langgartner D, Fuchsl A M, Uschold-Schmidt N, Slattery D A, Reber S O: Chronic subordinate colony housing paradigm: a mouse model to characterize the consequences of insufficient glucocorticoid signaling. *Front.Psychiatry.*, 6: 18 (2015)
52. Litvin Y, Blanchard D C, Pentkowski N S, Blanchard R J: A pinch or a lesion: a reconceptualization of biting consequences in mice. *Aggress Behav.*, 33: 545-551 (2007)
53. Maes M, Scharpe S, Meltzer H Y, Bosmans E, Suy E, Calabrese J, Cosyns P: Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. *Psychiatry Res.*, 49: 11-27 (1993)

54. Marucha P T, Kiecolt-Glaser J K, Favagehi M: Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosom.Med.*, 60: 362-365 (1998)
55. McNees P: Skin and wound assessment and care in oncology. *Semin.Oncol.Nurs.*, 22: 130-143 (2006)
56. Meerlo P, Sgoifo A, De Boer S F, Koolhaas J M: Long-lasting consequences of a social conflict in rats: behavior during the interaction predicts subsequent changes in daily rhythms of heart rate, temperature, and activity. *Behav.Neurosci.*, 113: 1283-1290 (1999)
57. Merlot E, Moze E, Dantzer R, Neveu P J: Importance of fighting in the immune effects of social defeat. *Physiol.Behav.*, 80: 351-357 (2003)
58. Nezam F S, Hosseini S M, Kheiri M T, Abdoli A, Memarnejadian A, Shenagari M, Gholami S, Sohani H, Rahmatollahi H, Jamali A: Suppressive Effects of Chronic Stress on Influenza Virus Protection after Vaccination with Plasmid DNA-Encoded Nucleoprotein. *Neuroimmunomodulation*, 22: 322-327 (2015)
59. Nyberg S T, Fransson E I, Heikkila K, Alfredsson L, Casini A, Clays E, De Bacquer D, Dragano N, Erbel R, Ferrie J E, Hamer M, Jockel K H, Kittel F, Knutsson A, Ladwig K H, Lunau T, Marmot M G, Nordin M, Rugulies R, Siegrist J, Steptoe A, Westerholm P J, Westerlund H, Theorell T, Brunner E J, Singh-Manoux A, Batty G D, Kivimaki M, IPD-Work Consortium: Job strain and cardiovascular disease risk factors: meta-analysis of individual-participant data from 47,000 men and women. *PLoS One*, 8: e67323 (2013)
60. Padgett D A, Marucha P T, Sheridan J F: Restraint stress slows cutaneous wound healing in mice. *Brain Behav.Immun.*, 12: 64-73 (1998)
61. Papadimitriou A, Priftis K N: Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation*, 16: 265-271 (2009)
62. Pereg D, Gow R, Mosseri M, Lishner M, Rieder M, Van Uum S, Koren G: Hair cortisol and the risk for acute myocardial infarction in adult men. *Stress*, 14: 73-81 (2011)
63. Peters S, Grunwald N, Rummele P, Endlicher E, Lechner A, Neumann I D, Obermeier F, Reber S O: Chronic psychosocial stress increases the risk for inflammation-related colon carcinogenesis in male mice. *Stress*, 15: 403-415 (2012)
64. Qi X R, Kamphuis W, Wang S, Wang Q, Lucassen P J, Zhou J N, Swaab D F: Aberrant stress hormone receptor balance in the human prefrontal cortex and hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Psychoneuroendocrinology*, 38: 863-870 (2013)
65. Quan N, Avitsur R, Stark J L, He L, Lai W, Dhabhar F, Sheridan J F: Molecular mechanisms of glucocorticoid resistance in splenocytes of socially stressed male mice. *J.Neuroimmunol.*, 137: 51-58 (2003)
66. Quan N, Avitsur R, Stark J L, He L, Shah M, Caligiuri M, Padgett D A, Marucha P T, Sheridan J F: Social stress increases the susceptibility to endotoxic shock. *J.Neuroimmunol.*, 115: 36-45 (2001)

67. Raison C L, Miller A H: When not enough is too much: the role of insufficient glucocorticoid signaling in the pathophysiology of stress-related disorders. *Am.J.Psychiatry*, 160: 1554-1565 (2003)
68. Rakhshan K, Imani A, Faghihi M, Nabavizadeh F, Golnazari M, Karimian S: Evaluation of Chronic Physical and Psychological Stress Induction on Cardiac Ischemia / Reperfusion Injuries in Isolated Male Rat Heart: The Role of Sympathetic Nervous System. *Acta Med.Iran.*, 53: 482-490 (2015)
69. Ramsay D S, Woods S C: Clarifying the Roles of Homeostasis and Allostasis in Physiological Regulation. *Psychol.Rev.*, 121: 225-247 (2014)
70. Razzoli M, Carboni L, Andreoli M, Ballottari A, Arban R: Different susceptibility to social defeat stress of BalbC and C57BL6/J mice. *Behav.Brain Res.*, 216: 100-108 (2011)
71. Reber S O, Birkeneder L, Veenema A H, Obermeier F, Falk W, Straub R H, Neumann I D: Adrenal insufficiency and colonic inflammation after a novel chronic psycho-social stress paradigm in mice: Implications and mechanisms. *Endocrinology*, 148: 670-682 (2007)
72. Reber S O, Neumann I D: Defensive behavioral strategies and enhanced state anxiety during chronic subordinate colony housing are accompanied by reduced hypothalamic vasopressin, but not oxytocin, expression. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 1148: 184-195 (2008)
73. Ritter M: Hormone. In: Speckmann E J, Hescheler J, Köhling R (Hrsg) *Physiologie*, 5. Auflage, Elsevier, S. 737-740 (2008)
74. Rodriguez J M, Monsalves-Alvarez M, Henriquez S, Llanos M N, Troncoso R: Glucocorticoid resistance in chronic diseases. *Steroids*, 115: 182-192 (2016)
75. Sapolsky R M, Krey L C, McEwen B S: The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. *Endocr.Rev.*, 7: 284-301 (1986)
76. Saul A N, Oberyshyn T M, Daugherty C, Kusewitt D, Jones S, Jewell S, Malarkey W B, Lehman A, Lemeshow S, Dhabhar F S: Chronic stress and susceptibility to skin cancer. *J.Natl.Cancer Inst.*, 97: 1760-1767 (2005)
77. Savignac H M, Finger B C, Pizzo R C, O'Leary O F, Dinan T G, Cryan J F: Increased sensitivity to the effects of chronic social defeat stress in an innately anxious mouse strain. *Neuroscience*, 192: 524-536 (2011)
78. Savignac H M, Hyland N P, Dinan T G, Cryan J F: The effects of repeated social interaction stress on behavioural and physiological parameters in a stress-sensitive mouse strain. *Behav.Brain Res.*, 216: 576-584 (2011)
79. Schmidt D, Peterlik D, Reber S O, Lechner A, Mannel D N: Induction of Suppressor Cells and Increased Tumor Growth following Chronic Psychosocial Stress in Male Mice. *PLoS One*, 11: e0159059 (2016)

80. Schmidt D, Peterlik D, Reber S O, Lechner A, Mannel D N: Induction of Suppressor Cells and Increased Tumor Growth following Chronic Psychosocial Stress in Male Mice. *PLoS One*, 11: e0159059 (2016)
81. Schmidt D, Reber S O, Botteron C, Barth T, Peterlik D, Uschold N, Mannel D N, Lechner A: Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain Behav.Immun.*, 24: 1097-1104 (2010)
82. Schmidt D, Reber S O, Botteron C, Barth T, Peterlik D, Uschold N, Mannel D N, Lechner A: Chronic psychosocial stress promotes systemic immune activation and the development of inflammatory Th cell responses. *Brain Behav.Immun.*, 24: 1097-1104 (2010)
83. Selye H: Forty years of stress research: principal remaining problems and misconceptions. *Can.Med.Assoc.J.*, 115: 53-56 (1976)
84. Sheridan J F, Stark J L, Avitsur R, Padgett D A: Social disruption, immunity, and susceptibility to viral infection. Role of glucocorticoid insensitivity and NGF. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 917: 894-905 (2000)
85. Singewald G M, Nguyen N K, Neumann I D, Singewald N, Reber S O: Effect of chronic psychosocial stress-induced by subordinate colony (CSC) housing on brain neuronal activity patterns in mice. *Stress*, 12: 58-69 (2009)
86. Slattery D A, Uschold N, Magoni M, Bar J, Popoli M, Neumann I D, Reber S O: Behavioural consequences of two chronic psychosocial stress paradigms: anxiety without depression. *Psychoneuroendocrinology*, 37: 702-714 (2012)
87. Slavich G M, Irwin M R: From Stress to Inflammation and Major Depressive Disorder: A Social Signal Transduction Theory of Depression. *Psychol.Bull.*, 140: 774-815 (2014)
88. Stark J L, Avitsur R, Hunzeker J, Padgett D A, Sheridan J F: Interleukin-6 and the development of social disruption-induced glucocorticoid resistance. *J.Neuroimmunol.*, 124: 9-15 (2002)
89. Stark J L, Avitsur R, Padgett D A, Campbell K A, Beck F M, Sheridan J F: Social stress induces glucocorticoid resistance in macrophages. *Am.J.Physiol.Regul.Integr.Comp.Physiol.*, 280: R1799-805 (2001)
90. Stefanski V: Social stress in loser rats: opposite immunological effects in submissive and subdominant males. *Physiol.Behav.*, 63: 605-613 (1998)
91. Tasker J G, Di S, Malcher-Lopes R: Minireview: Rapid Glucocorticoid Signaling via Membrane-Associated Receptors. *Endocrinology*, 147: 5549-5556 (2006)
92. Tsigos C, Chrousos G P: Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J.Psychosom.Res.*, 53: 865-871 (2002)

93. Uchoa E T, Aguilera G, Herman J P, Fiedler J L, Deak T, Cordeiro de Sousa M B: Novel aspects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation and glucocorticoid actions. *J.Neuroendocrinol.*, 26: 557-572 (2014)
94. Valdes M, Garcia L, Treserra J, de Pablo J, de Flores T: Psychogenic pain and depressive disorders: an empirical study. *J.Affect.Disord.*, 16: 21-25 (1989)
95. Veenema A H, Reber S O, Selch S, Obermeier F, Neumann I D: Early life stress enhances the vulnerability to chronic psychosocial stress and experimental colitis in adult mice. *Endocrinology*, 149: 2727-2736 (2008)
96. Vignjevic S, Budec M, Markovic D, Dikic D, Mitrovic O, Diklic M, Suboticki T, Cokic V, Jovicic G: Glucocorticoid receptor mediates the expansion of splenic late erythroid progenitors during chronic psychological stress. *J.Physiol.Pharmacol.*, 66: 91-100 (2015)
97. Voorhees J L, Powell N D, Moldovan L, Mo X, Eubank T D, Marsh C B: Chronic restraint stress upregulates erythropoiesis through glucocorticoid stimulation. *PLoS ONE*, 8: e77935 (2013)
98. Walburn J, Vedhara K, Hankins M, Rixon L, Weinman J: Psychological stress and wound healing in humans: a systematic review and meta-analysis. *J.Psychosom.Res.*, 67: 253-271 (2009)
99. Walker F R, Masters L M, Dielenberg R A, Day T A: Coping with defeat: acute glucocorticoid and forebrain responses to social defeat vary with defeat episode behaviour. *Neuroscience*, 162: 244-253 (2009)
100. Walker P K, Bilkei G: Tail-biting in outdoor pig production. *Vet.J.*, 171: 367-369 (2006)
101. Wendt F: Kleines Vademecum haematologicum Nordmark: Eine Einführung in die Blutzellkunde. Stormarn, S. 35 (1986)
102. Yehuda R, Southwick S M, Nussbaum G, Wahby V, Giller E L, Jr, Mason J W: Low urinary cortisol excretion in patients with posttraumatic stress disorder. *J.Nerv.Ment.Dis.*, 178: 366-369 (1990)
103. Zelena D, Haller J, Halasz J, Makara G B: Social stress of variable intensity: physiological and behavioral consequences. *Brain Res.Bull.*, 48: 297-302 (1999)

Anhang

Abbildungsverzeichnis

1	Schematische Darstellung immunologischer Veränderungen nach akuter Stressexposition.....	5
2	Versuchstiere während der CSC – Exposition	18
3	Schematischer Ablauf des CSC – Paradigmas.....	18
4	Ablauf der Datenerhebung nach Beendigung der CSC - Exposition.....	19
5	Plattenbelegung mit Milzzellsuspensionen nach Inkubation mit MTS	22
6	Unbearbeitete Aufnahme eines präparierten Tierkörpers	23
7	Bearbeitete Fellaufnahme mit Gitterschablone.....	24
8	Etablierung des Bisswundenscores mittels Korrelationsanalyse	30
9	Optische Darstellung von Bissverletzungen unterschiedlicher Intensität	31
10	Etablierung/Experiment 1: A) Absolutes Milzgewicht, B) Gesamtzellzahl und C) Anzahl lebender Zellen pro Milz.....	33
11	Etablierung/Experiment 1: Basale und LPS stimulierte cell viability ohne exogenen Einfluss von CORT	34
12	Etablierung/Experiment 1: Delta cell viability unter dem Einfluss verschiedener CORT – Konzentrationen	36
13	Experiment 2: Entwicklung des Körpergewichts	39
14	Experiment 2: A) Absolutes und B) relatives Milzgewicht	40
15	Experiment 2: A) Gesamtzellzahl und B) Anzahl lebender Zellen pro Milz	41
16	Experiment 2: Basale und LPS stimulierte cell viability ohne exogenen Einfluss von CORT	42
17	Experiment 2: Delta cell viability unter dem Einfluss verschiedener CORT – Konzentrationen	44
18	Zusammenhang zwischen Bissverletzungen und dem absoluten Milzgewicht	46
19	Zusammenhang zwischen Bissverletzungen und basaler cell viability ohne exogenen Einfluss von CORT	47
20	Zusammenhang zwischen Bissverletzungen und GC – Resistenz	48
21	Ergänzung von bisher bekannten Mechanismen zur Ausbildung einer GC – Resistenz durch neue Erkenntnisse	49

Tabellenverzeichnis

1	Material für die Milzzellstimulation	15
2	Hergestellte Medien für die Milzzellstimulation	16
3	Sonstige Geräte und Materialien	16
4	Punkteverteilung für Bissverletzungen im Bereich der Fellunterseite	25
5	Punkteverteilung für Bissverletzungen im Bereich der Dorsalen Körperfaszie	26
6	Etablierung/Experiment 1: Analyse von Bissverletzungen mittels Bisscore	37
7	Experiment 2: Analyse von Bissverletzungen mittels Bisscore.....	38

Anleitung 1: Gittervorlage in GIMP2 erstellen

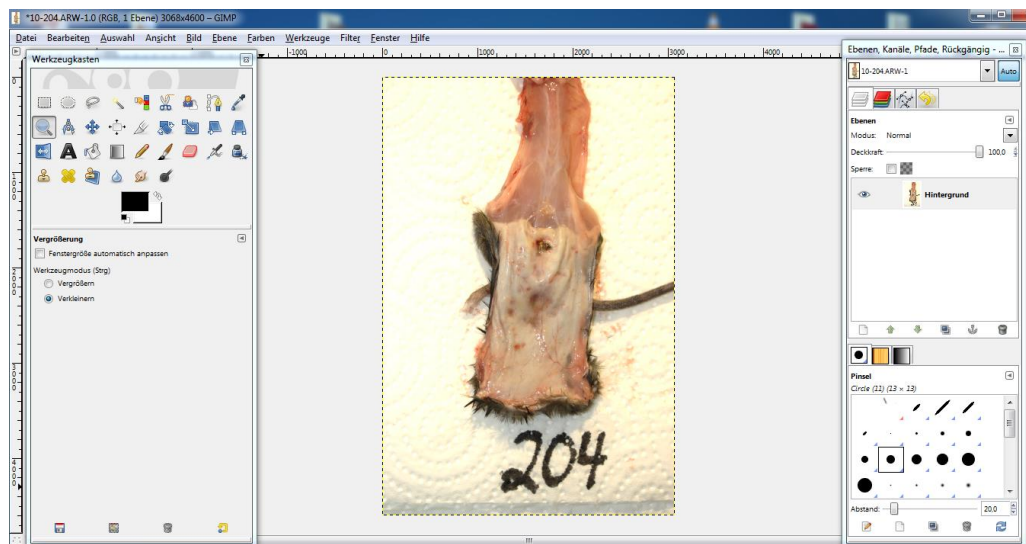
Anhand der Anleitung 1 wird im Bildbearbeitungsprogramm GIMP2 eine Datei mit einer Gittervorlage als Rohmuster erstellt. Diese Datei wird gespeichert und dient für die spätere Auswertung der Fellaufnahmen als Hilfsmittel, um das Ausmaß der durch Bisswunden betroffenen Fläche einfacher abschätzen zu können.

1 Programm GIMP2 installieren und öffnen

2 Beispielbild importieren

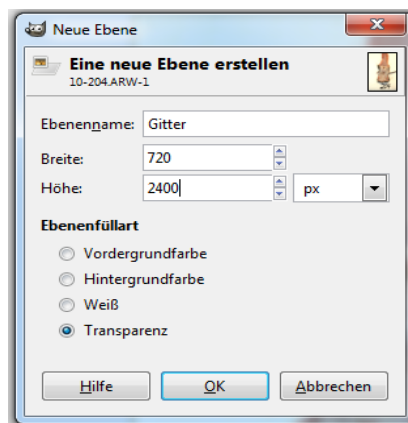
- Strg+O drücken
- Beispielbild wählen (z.B. Bild 10-204)
- Rechts unten „OK“ klicken

Es erscheint folgendes Layout:



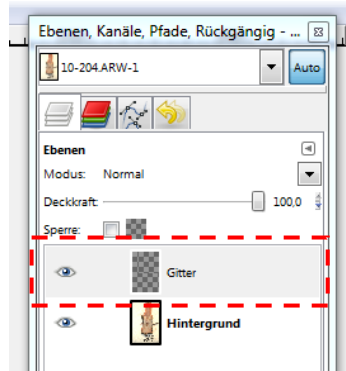
3 Neue Ebene erstellen

- Umschalt+Strg+N drücken
- Folgende Einstellungen übernehmen und „OK“ klicken:

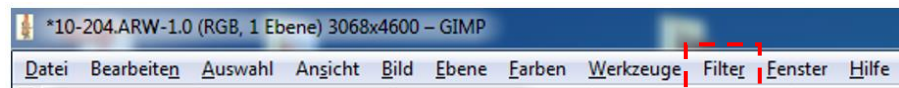


4 Gittervorlage einfügen

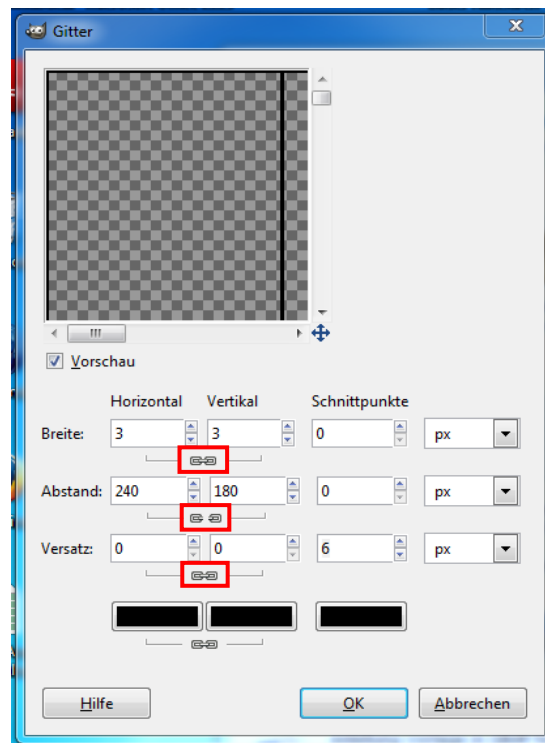
- Im rechten Fenster Ebene „Gitter“ auswählen



- In oberen Menüleiste „Filter“ auswählen



- „Render“ auswählen
- „Muster“ auswählen
- „Gitter“ auswählen
- Folgende Einstellungen übernehmen und „OK“ klicken:



5 Gitterebene verschieben

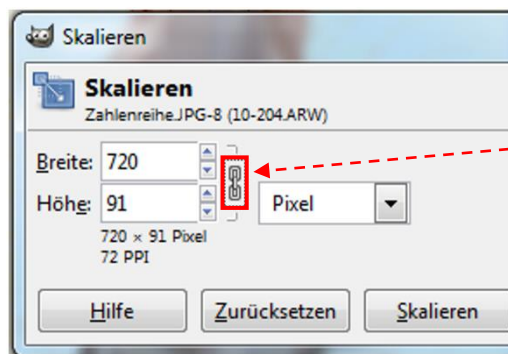
- <m> drücken
- Im linken Fenster „Aktive Ebene verschieben“ anklicken
- Gitter kann nun mit Maus verschoben werden

6 Zahlenreihe importieren

- Strg+Alt+O drücken
- Bilddokument „Zahlenreihe“ auswählen
(wurde als Bilddatei mit dem Protokoll gespeichert)
- Im rechten Fenster Ebene „Zahlenreihe“ auswählen



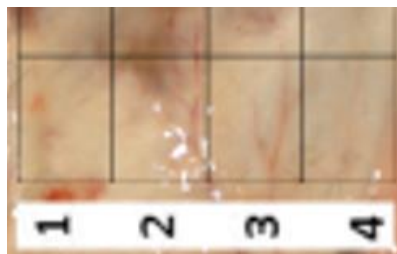
- Umschalt+T drücken
- Folgende Einstellungen übernehmen und „Skalieren“ klicken:



Schloss verbinden!!!

7 Ebene Zahlenreihe verschieben

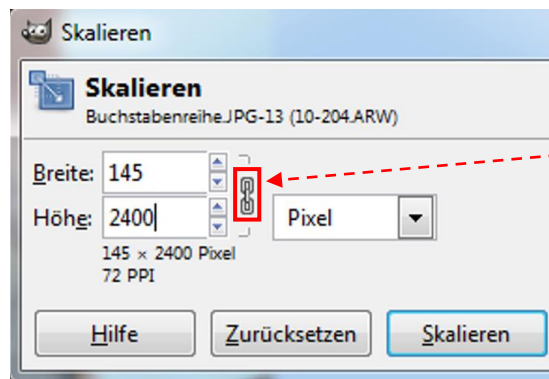
- <m> drücken
- Buchstabenreihe nun im Hauptbild passend zum Gitter verschieben



Zahlenreihe sollte folgendermaßen angeordnet werden

8 Buchstabenreihe importieren

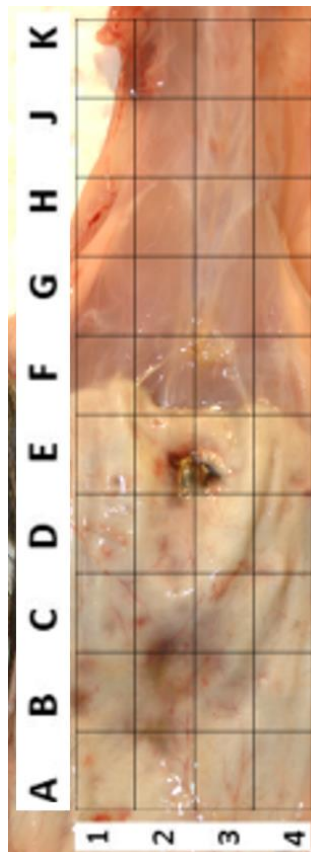
- Strg+Alt+O drücken
- Bilddokument „Buchstabenreihe“ auswählen
(wurde als Bilddatei mit dem Protokoll gespeichert)
- Im rechten Fenster Ebene „Buchstabenreihe“ auswählen
(wie vorher bei Zahlenreihe)
- Umschalt+T drücken
- Folgende Einstellungen übernehmen und „Skalieren“ klicken:



Schloss verbinden!!!

9 Ebene Buchstabenreihe verschieben

- <m> drücken
- Buchstabenreihe nun im Hauptbild passend zum Gitter verschieben



Gesamtbild sollte folgendermaßen aussehen

10 Ebenen „Gitter“, „Zahlenreihe“ und „Buchstabenreihe“ verbinden

- Im rechten Fenster **Rechtsklick** auf Ebene „Buchstabenreihe“
- „Ebene nach unten vereinen“ anklicken
- Im rechten Fenster **Rechtsklick** auf Ebene „Zahlenreihe“
- „Ebene nach unten vereinen“ anklicken

Im rechten Fenster sind nun nur noch die Ebenen mit den Titeln „Gitter“ und „Hintergrund“ zu sehen

11 Ebene „Gitter“ umbenennen

- Im rechten Fenster **Doppelklick** auf Ebene „Gitter“
- Umbenennen in „Auswertrahmen“

12 Ebene Hintergrund löschen

- Im rechten Fenster **Rechtsklick** auf Ebene „Hintergrund“
- „Ebene löschen“ anklicken

13 Format speichern

- In oberen Leiste „Datei“ anklicken
- aktuelles Format als „Vorlage.xcf“ speichern

Anleitung 2: Fellbilder in GIMP2 importieren und zuschneiden

Anhand der Anleitung 2 werden die auszuwertenden Fellbilder in GIMP2 an die vorher angefertigte Gittervorlage angepasst, zugeschnitten und für die spätere Auswertung gespeichert.

1 Programm UFraw installieren

2 Zu importierende Bilder vorbereiten

- Neuen Ordner „Auswertbilder_ExpXY“ erstellen
- Aus den erstellten Bildern (RAW-Format) für jedes Tier das Bild mit der besten Qualität auswählen und in den Ordner „Auswertbilder_ExpXY“ einfügen
- Im Ordner die ausgewählten Bilder nach dem Experiment und den Tiernummern umbenennen



16-327



16-328

Dateiname gemäß Experiment und Tiernummer, z.B.: 16-328

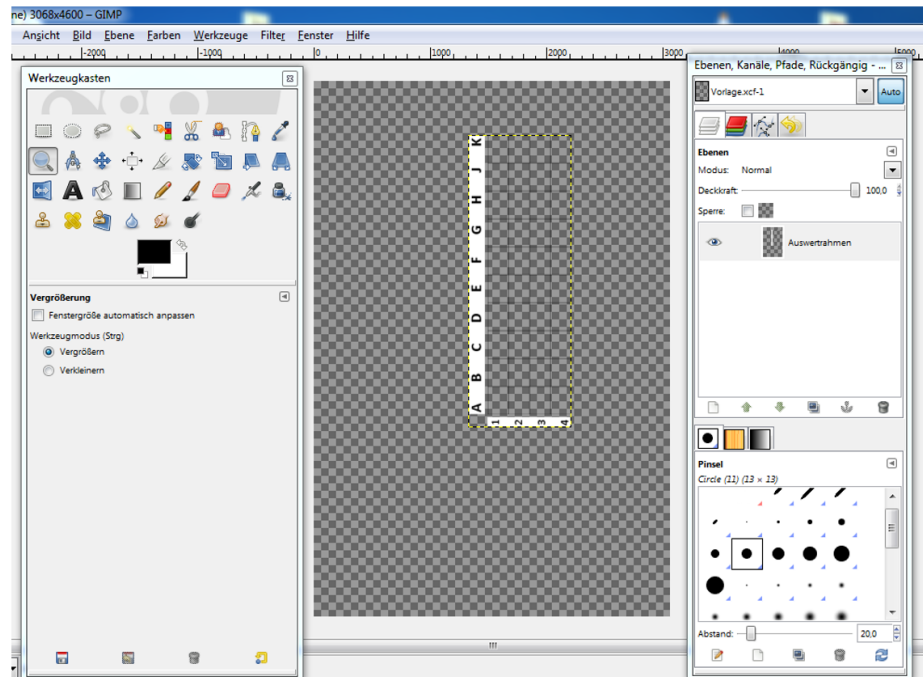
3 Ordner für bearbeiteten Bilder vorbereiten

- Neuen Ordner „Auswertbilder_ExpXY_zugeschnitten“ erstellen

Am besten erstellt man diesen zunächst auf dem eigenen PC und speichert erst am Ende den fertigen Ordner auf dem NAS, da sonst die Bilder einzeln hochgeladen werden, was länger dauert.

4 GIMP – Vorlage öffnen

- Angefertigte Datei „Vorlage.xcf“ öffnen (siehe Anleitung 1)
- Folgendes Layout erscheint:



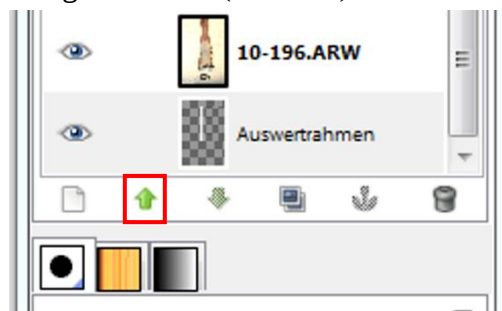
- Falls rechtes Ebenenfenster nicht automatisch geöffnet wird, dann:
 - Strg+L drücken, oder
 - In oberen Leiste „Fenster“ anklicken
 => „Andockbare Dialoge“ => „Ebenen“ wählen

5 Bilder in GIMP – Vorlage importieren

- Strg+Alt+O drücken
- Ordner „Auswertbilder_ExpXY“ öffnen
- Alle Bilder markieren (Strg+A)
- Unten „öffnen“ wählen
- Jedes Bild im UFraw-Programm unten rechts mit <OK> bestätigen

Alle Bilder erscheinen nun als eigene Ebenen im rechten Fenster

- Ebene „Auswertrahmen“ anklicken (steht ganz unten)
- **Umschalt** + grüner Pfeil (nach oben) drücken

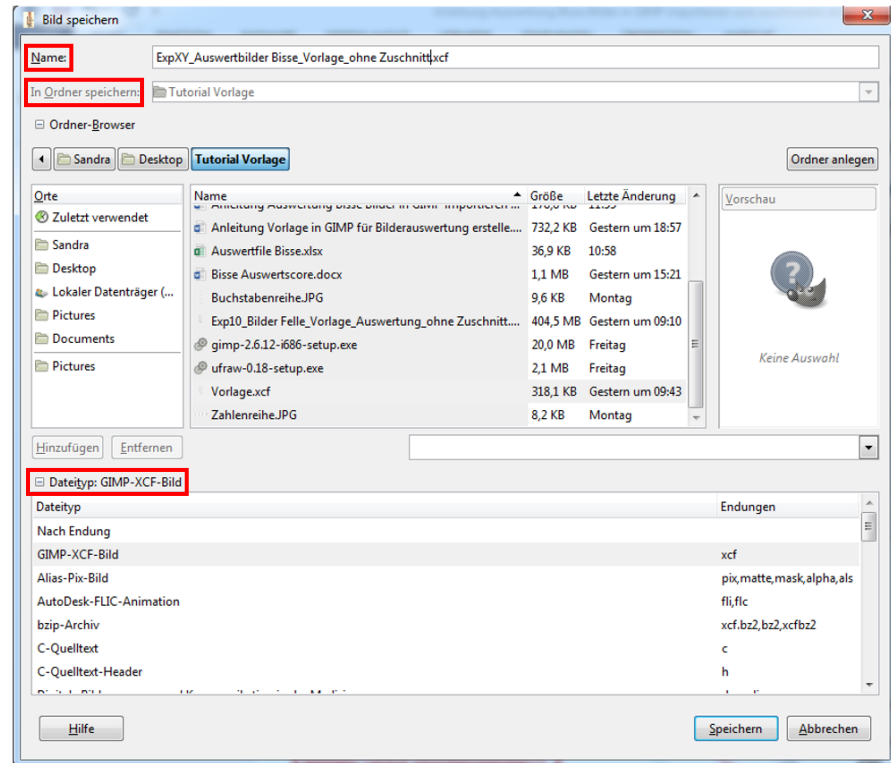


Ebene „Auswertrahmen“ steht anschließend ganz oben

6 Jetziges Layout zwischenspeichern!!!

- Umschalt+Strg+S

Folgendes Layout erscheint:



- Name: „ExpXY_Auswertbilder_Vorlage_ohne Zuschnitt“
- Zielordner: Ordner „Auswertbilder_ExpXY_zugeschnitten“ auswählen
- Dateityp: „GIMP-XCF-Bild“ auswählen
- Unten rechts „Speichern“ auswählen

Auf die nun gespeicherte Datei kann auch im späteren Verlauf immer wieder zurückgegriffen werden.

7 Gitter für einzelnes Fellbild anpassen: Verschieben

- Im rechten Fenster Ebene „Auswertrahmen“ anklicken
- <m> drücken
- Gitter im Hauptbild durch verschieben an das jeweilige Fellbild anpassen

Gitter so verschieben, dass die Linie zwischen den Buchstaben „E“ und „F“ am Übergang zwischen Fell und Körper liegt.

Es muss im linken Fenster der Punkt bei „Aktive Ebenen verschieben“ stehen, sonst verschiebt sich das Hintergrundbild.

Ebene verschieben ist auch über das Pfeilsymbol im linken Fenster möglich.



8 Gitter für einzelnes Fellbild anpassen: Größe verändern

- Im rechten Fenster Ebene „Auswertrahmen“ anklicken
- Im linken Fenster Größensymbol anklicken
- Im neu geöffnete Fenster mit den Skalierungen das Schlüsselsymbol schließen, damit das Seitenverhältnis beim Ändern der Größe erhalten bleibt
- Gittergröße an Tierkörper anpassen



Gittergröße so verändern, dass möglichst viel Fell abgedeckt wird. Der Körper ist automatisch immer etwas kleiner als der Fellbereich.

9 Einzelnes Fellbild mit Gitter zuschneiden

- Umschalt+C drücken
- Mit Maus entsprechenden Bildteil zuschneiden



Ausschnitt sollte etwa so aussehen

- Mit Entertaste bestätigen

10 Zugeschnittenes Fellbild mit Gitter speichern

- Oben in Menüleiste „Datei“ anklicken
- „Kopie speichern“ auswählen
- Name: Experimentnummer-Tiernummer.jpg (z.B. 16-328.jpg)
- Ordner: Ordner „Auswertbilder_ExpXY_zugeschnitten“ auswählen
- „Speichern“ wählen
- „Exportieren“ wählen
- Qualität auf 100% setzen
- Beim ersten Bild „Standardwerte speichern“ anklicken, dann werden die Einstellungen für die weiteren Bilder übernommen
- „Speichern“ wählen

Das bearbeitete Bild ist jetzt mit Gitternetz im vorher angelegten Ordner als JPEG-Datei gespeichert und kann jederzeit zur Beurteilung mittels Score genutzt werden.

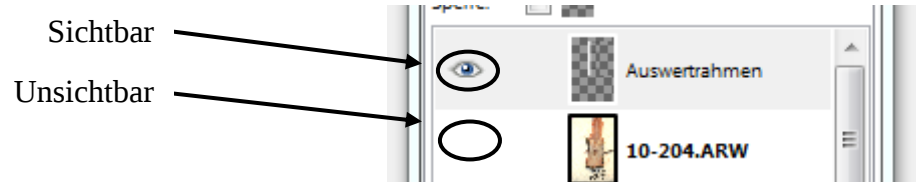
11 Nächstes Fellbild auswählen

Wieder im GIMP-Programm:

- Einmal (!) Strg+Z drücken

Ausschneiden des letzten Bildes wird rückgängig gemacht.

- Ebene des gerade gespeicherten Bildes unsichtbar machen



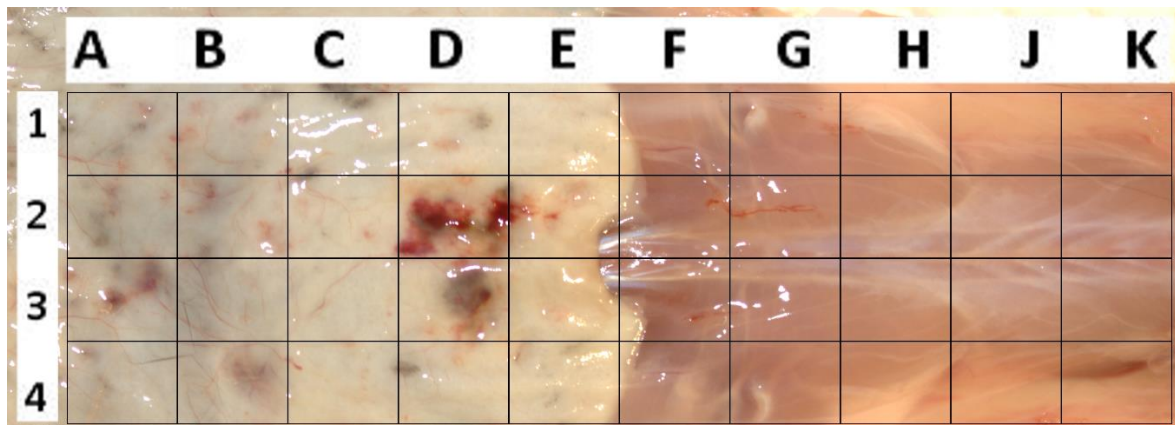
Nun erscheint das nächste Fellbild mit dem Gitter im Hauptfenster

12 Weiteres Bild bearbeiten

- Schritte 7 – 11 für alle Bilder wiederholen
- Nach dem letzten gespeicherten Bild GIMP2 schließen
- Ordner „Auswertbilder_ExpXY_zugeschnitten“ auf NAS speichern (Dieser enthält alle zugeschnittenen Fellbilder mit Gitter sowie die zwischengespeicherte GIMP – Datei von Schritt 6)

Anleitung 3: Fellbilder mittels Bisscore auswerten

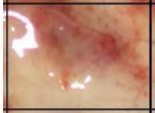
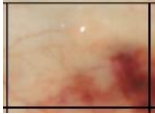
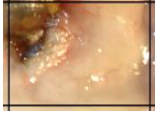
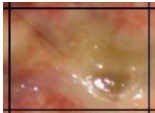
Alle CSC - Tiere werden bei der Tötung nach dem stumpfen Ablösen des Fells von der Körperfaszie unter standardisierten Bedingungen fotografiert. Diese Aufnahmen werden anschließend im Bildbearbeitungsprogramm GIMP2 vorbereitet (Anleitung 2), sodass für jedes Tier ein dem nachfolgenden Beispiel ähnliches Bild zur Beurteilung der Bissverletzungen mittels Bisscore vorliegt.



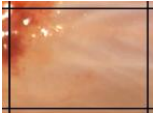
Die Felder A – E dienen der Fellauswertung, die Felder F – K der Auswertung der dorsalen Körperfaszie. Somit ergeben sich pro Tier insgesamt 80 Felder. Die minimale Punktzahl beträgt null, die maximale Punktzahl ist 300.

Die Kriterien zur Vergabe der Punkte finden sich in nachfolgendem Schema, wobei jedes Kästchen für sich genommen betrachtet wird. Die vergebenen Punkte werden direkt im vorbereiteten Excel – Auswertfile eingetragen und zusammengerechnet (wurde als Datei mit dem Protokoll gespeichert).

Auswertung Fellunterseite

	Beispiel	Punktzahl	Beschreibung
Betroffene Fläche		0	Keine Bissverletzung
		1	Einzelner Biss
		2	Einzelne Bisse oder schlierenartiger Befall
		3	Flächiger Befall
		4	Kompletter Befall
Intensität		0	Keine Bissverletzung
		1	Leicht (Rosa)
		2	Mittelstark (Rot)
		3	Stark (Dunkelrot)
		4	Nekrotisch (Schwarz)
Eiterbildung		0	Keine Eiterbildung
		1	Leichte Eiterbildung
		2	Starke Eiterbildung

Auswertung Dorsale Körperfaszie

	Beispiel	Punktzahl	Beschreibung
Betroffene Fläche		0	Fläche nicht betroffen
		1	$< \frac{1}{3}$ der Fläche betroffen
	Bisher kein repräsentatives Bild vorhanden	2	$\frac{1}{3}$ bis $\frac{2}{3}$ der Fläche betroffen
	Bisher kein repräsentatives Bild vorhanden	3	$> \frac{2}{3}$ der Fläche betroffen
Intensität		0	Nicht betroffen
		1	Leicht betroffen (Hellrot/Rosa, wenig Eiter)
		2	Stark betroffen (Dunkelrot, viel Eiter)

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei allen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. med. Harald Gündel danke ich für die Möglichkeit, die Promotion in der Klinik für Psychosomatische Medizin und Psychotherapie durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Stefan Reber für die Überlassung des Themas und das mir damit entgegengebrachte Vertrauen. Ich bedanke mich ganz herzlich für die intensive und unermüdliche Betreuung, die interessanten und inspirierenden Diskussionen sowie die vielen motivierenden und aufmunternden Gespräche. Es war toll, dass ich mich bei Problemen oder Rückfragen immer an ihn wenden konnte und er sich stets geduldig Zeit genommen hat.

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Holger Barth für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein großes Dankeschön möchte ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Reber für die freundliche Aufnahme ins Team und die große Unterstützung während der Arbeit im Labor aussprechen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Dominik Langgartner für die fachkundige Einarbeitung im Labor und im Tierstall sowie seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei verschiedensten Problemen oder Fragestellungen. Danke für die Bereitstellung der Kamera zur Aufnahme der Fellbilder.

Ebenso möchte ich mich herzlichst bei Petra Hornischer bedanken, die mir mit großem Engagement bei labortechnischen Schwierigkeiten zur Seite stand und als geduldige Ansprechpartnerin immer ein offenes Ohr hatte. Das gemeinsame Arbeiten hat sehr viel Spaß gemacht.

Zudem bedanke ich mich bei Dr. Andrea Fuchsl für die interessante und lehrreiche Zusammenarbeit und die Betreuung bei der schriftlichen Ausarbeitung.

Bei Frau Mihr vom Promotionssekretariat bedanke ich mich für ihre Beratung bei formalen Rückfragen sowie die Durchsicht des Manuskripts.

Allen meinen Freunden, die mich während der Zeit mit aufmunternden Worten und Gesprächen, vielen Tassen Kaffee und kleinen Leckereien unterstützt und diverse Stimmungsschwankungen ertragen haben, sage ich herzlich Danke. Eure Hilfe war super.

Meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, möchte ich von ganzem Herzen danken. Auf Euren bedingungslosen Rückhalt sowie Euer Vertrauen und Eure Liebe konnte mich auf meinem bisherigen Lebensweg zu jeder Zeit und in jeder Situation verlassen. Danke, dass Ihr mich immer unterstützt.

Zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund Julian Klima bedanken. Ohne Deine kompetente Hilfe bei verschiedenen technischen Schwierigkeiten hätte ich die Arbeit nicht in dieser Weise schreiben können. Für Deine grenzenlose Geduld, Deine aufmunternden Worte und Gesten sowie Deine liebevolle Unterstützung in allen Situationen bin ich Dir unendlich dankbar.

Lebenslauf

Lebenslauf aus Gründen des Datenschutzes entfernt.