

UNIVERSITÄT REGENSBURG



Zerebrale Modulation der peripheren Entzündung bei experimenteller Arthritis der Ratte

Rolle von Stress, ZNS-Zytokinen, ZNS-Neurotransmittern

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

am Institut für Pharmazie

der Naturwissenschaftlichen Fakultät IV für Chemie und Pharmazie

der Universität Regensburg

vorgelegt von Christine Wolff

Regensburg, Juli 2009

Promotionsgesuch eingereicht am: 04.08.09

Tag der mündlichen Prüfung am: 23.09.09

Vorsitzender: Prof. Dr. Armin Buschauer

1. Gutachter: Prof. Dr. Achim Göpferich

2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer H. Straub

3. Prüferin: Prof. Dr. Charlotte Förster

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Rheumatoide Arthritis	1
1.1.1	Tiermodell der Kollagen Typ II - induzierten Arthritis.....	4
1.2	Neuroendokrine Veränderungen bei rheumatoider Arthritis	7
1.2.1	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse unter besonderer Berücksichtigung der Nebenniere.....	8
1.2.2	Sympathisches Nervensystem	13
1.3	Psychosozialer Stress und Arthritis	18
1.3.1	Akuter und chronischer Stress	19
1.3.2	Stress und rheumatoide Arthritis	20
1.4	Einfluss von Immunstimuli auf ZNS-Zytokine und monaminerge Neurotransmitter	22
1.5	Fragestellungen.....	26
1.5.1	Psychosozialer Stress.....	26
1.5.2	Zentrale Zytokine und Monamine	26
1.5.3	Nebenniere	27
2	Material.....	29
2.1	Materialien	29
2.1.1	Verbrauchsartikel.....	29
2.1.2	Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel	30
2.1.3	Anästhetika	31
2.1.4	Antikörper.....	32
2.1.5	Lösungen, Medien und Puffer	32
2.1.6	Kits und Assays	35
2.1.7	Geräte.....	35
2.2	Tiere	36
3	Methoden	38
3.1	Kollagen Typ II Arthritis Modell	38
3.1.1	Klinischer Arthritis-Schweregrad.....	39
3.2	Resident-Intruder-Konfrontation	40
3.3	Depletion monoaminerger Neuronen im Gehirn	40
3.4	Blut- und Organentnahmen.....	42
3.4.1	Blut	42
3.4.2	Organe.....	43
3.5	Bestimmung der Zellproliferation	45
3.6	Corticosteron-, Adrenalin- und Noradrenalin-Radioimmunoassays	45
3.7	Zytokinbestimmung in Lymphknoten-Zell-Überständen	45
3.8	Neurochemische Analyse der Neurotransmitter und ihrer Metaboliten in verschiedenen Hirnarealen.....	46
3.9	Bestimmung der Zytokin mRNA Level in verschiedenen Hirnarealen.....	46
3.10	Bestimmung des Differentialblutbildes und der Lymphozyten-Subpopulationen	48
3.11	Histochemische Verfahren.....	49
3.11.1	Histologischer Arthritis-Schweregrad	49
3.11.2	Fluoreszenzfärbung und Quantifizierung von Nervenfasern.....	50
3.11.3	Sudan III Färbung der Nebennieren	51

3.11.4	SR-BI Immunhistochemie	52
3.11.5	Immunzell-Färbung in Schwanzhaut und Lymphknoten	52
3.12	Statistik	53
4	Ergebnisse	54
4.1	Psychosozialer Stress	54
4.1.1	Klinischer Arthritis-Schweregrad und Prävalenz	54
4.1.2	Plasma-Corticosteron	55
4.1.3	Immunzellen in der Zirkulation	56
4.1.4	Immunzellen im Injektionsgebiet der Schwanzhaut	57
4.1.5	Immunzellen in den Lymphknoten	58
4.1.6	Quintessenz	59
4.2	Zentrale Zytokine und Monamine	60
4.2.1	Klinischer und histologischer Arthritis-Schweregrad	60
4.2.2	Zytokine in der Peripherie	62
4.2.3	Plasma-Corticosteron	65
4.2.4	Plasma-Adrenalin und -Noradrenalin	66
4.2.5	Sympathische und sensible Nervenfasern im Synovialgewebe	67
4.2.6	Neurotransmitter und ihre Metaboliten im ZNS	69
4.2.7	Zytokine im ZNS	71
4.2.8	Korrelation von IL-1 β und Noradrenalin im Hypothalamus	73
4.2.9	Zentrale Ausschaltung von Noradrenalin	76
4.2.10	Zentrale Ausschaltung von Serotonin	77
4.2.11	Quintessenz	78
4.3	Nebenniere	79
4.3.1	Cholesterin in der Nebennierenrinde	79
4.3.2	SR-BI in der Nebennierenrinde	80
4.3.3	Quintessenz	81
5	Diskussion	83
5.1	Psychosozialer Stress	83
5.2	Zentrale Zytokine und Monamine	88
5.3	Nebenniere	97
6	Zusammenfassung	100
7	Literatur	103
8	Danksagung	135
9	Lebenslauf	136
10	Publikationen	138
11	Eidesstattliche Erklärung	142
12	Zugrunde liegende Publikation	143

Abkürzungsverzeichnis

AA	Adjuvans Arthritis
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotropin
APC	Antigen-präsentierende Zellen
AVP	Arginin-Vasopressin
BW	Basalwert
bzw.	beziehungsweise
CII	Kollagen Typ II
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CE	Cholesterylester
CFA	komplettes Freund-Adjuvans
CIA	Kollagen Typ II induzierte Arthritis
CRH	corticotropin-releasing hormone
DA Ratte	<i>Dark Agouti</i> Ratte
DCs	dendritische Zellen
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DRN	dorsal raphe nucleus
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GRs	Glucocorticoidrezeptoren
5-HIAA	5-Hydroxyindolessigsäure
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
HANS-Achse	Hypothalamus-autonomes Nervensystem-Achse
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
HLA	human leucocyte antigen

i.c.v.	intracerebroventriculär
IgG	Immunglobulin G
IFA	inkomplettes Freund-Adjuvans
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
i.m.	intramuskulär
INF- γ	Interferon- γ
i.p.	intraperitoneal
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
LC	Locus coeruleus
LPS	Lipopolysaccharide
LTP	long-term potentiation
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MHPG	3-Methoxy-4-Hydroxy-Phenyl Ethylene-Glycol
MRs	Mineralocorticoidrezeptoren
MWU-Test	Mann-Whitney-U-Test
NaCl	Natriumchlorid
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
o.g.	oben genannten
PE	Phycoerythrin
PKA	Proteinkinase vom Typ A
PNS	parasympathisches Nervensystem
PVN	Nucleus paraventricularis
RA	rheumatoide Arthritis
s.c.	subkutan
SEM	Standardfehler (<i>standard error of the mean</i>)
SNS	sympathisches Nervensystem
SP	Substanz P
SR-BI	Scavenger Rezeptor vom Typ BI

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

StAR	<i>steroidogenic acute regulatory protein</i>
TH	Tyrosinhydroxylase
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil

1 Einleitung

1.1 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch verlaufende entzündliche Systemerkrankung, die sich in einer progressiven Gelenkzerstörung, die das Synovialgewebe, den Knorpel und den gelenknahen Knochen betrifft, äußert (100). In der Regel sind mindestens drei Gelenkregionen, vorzugsweise die Hand-, Fingergrund- und Fingermittelgelenke befallen. Es können aber auch andere Gelenke wie Zehen-, Fuß-, Ellenbogen-, Schulter-, Knie- und Hüftgelenke oder sogar die Halswirbelsäule betroffen sein. Typisch ist ein symmetrisches Befallsmuster. Die Inflammationsvorgänge verursachen eine Schwellung und Schmerzhaftigkeit (Synovitis) der betroffenen Gelenke und führen im späteren Stadium zu Gelenkdeformationen und Ankylosierung. Im Langzeitverlauf kommt es neben den durch die Gelenkdestruktion verursachten Funktionseinschränkungen, oftmals zu einer Begleitvaskulitis mit kutanem, kardialem, pulmonalem, renalem und intestinalem Befall (172). Das Hauptmanifestationsalter der RA liegt zwischen 30 und 50 Jahren. Nach ca. 20 Jahren führt die RA zu einer körperlichen Behinderung und zu einer erhöhten Mortalitätsrate (205). Die RA gehört mit einer Prävalenz von 0,5-1% zu den häufigsten Autoimmunkrankheiten, wobei Frauen doppelt so häufig betroffen sind wie Männer (113;128;139;159).

RA ist eine komplexe multifaktorielle Autoimmunkrankheit, deren genaue Ursache unbekannt ist. Verschiedene Gene, deren Proteine eine entscheidende Rolle bei immunologischen und inflammatorischen Prozessen spielen, wurden als Suszeptibilitätsgene für die RA beschrieben. Bereits in den 1970er Jahren wurden HLA Klasse II Alloantigene mit der Suszeptibilität und dem Schweregrad der RA assoziiert (167). In späteren Studien wurde die HLA-Assoziation auf solche Allele eingegrenzt, die das so genannte *shared epitope*, eine bestimmte Aminosäuresequenz auf der DR- β Kette der HLA Klasse II Moleküls enthalten (86;196). Heute kennt man eine ganze Reihe an HLA-DR Allelen, wie DR1 (DRA*0101 und DRB1*0101), DR4 (DRA*0101, DRB1*0401, DRB1*0404, DRB1*0405 und DRB1*0408) und DR10 (DRA*0101 und DRB1*1001), die alle mit einem erhöhten Risiko für RA in Verbindung gebracht werden (2). Weitere kürzlich beschriebene Gene, die mit der RA assoziiert werden, sind z.B. PTPN22 (14;213),

MHC2TA (238), PADI4 (13;235), TRAF1/C5 (136;188), STAT4 (193;213), OLIG3/TNFAIP3 (187;213;242).

Für den Ausbruch der RA werden jedoch nicht nur genetische Faktoren, die ca. 30-50% des Risikos an RA zu erkranken ausmachen (153), sondern auch umweltbedingte Faktoren verantwortlich gemacht. So wurde lange vermutet, dass mikrobielle Stimuli (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* und Mycoplasmen) zur Induktion der RA beitragen können. Diese Vermutungen konnten bisher allerdings nicht verifiziert werden (35). Auch Viren wie das Parvovirus B19, das Zytomegalievirus, und im Besonderen das Epstein-Barr-Virus (243) und Retroviren (121) werden als Trigger der RA in Betracht gezogen (142). Die genauen Mechanismen, durch welche virale Infektionen zur Arthritismanifestation beitragen, sind kaum verstanden. Neben den bereits genannten Umweltfaktoren werden Rauchen (1) und Adipositas (239) ebenfalls als Risikofaktoren für die RA beschrieben und auch der Einfluss von Stress auf die Pathogenese der RA (siehe Kapitel 1.3.2) wurde zahlreich dokumentiert (223).

Eine weitere Hypothese zur Initiierung der pathophysiologischen Vorgänge bei der RA ist die Autoimmunhypothese. Es wurden viele mögliche Autoantigene beschrieben, die als Auslösefaktoren der RA in Frage kommen, darunter Immunglobulin G (IgG), citrullinierte Peptide, Filaggrin, Kollagen Typ II (CII) (25). Aber die Mechanismen, die zur Entwicklung der Autoreaktivität führen, sind bisher unbekannt. Das am besten untersuchte Autoantigen bei der RA ist das IgG. Autoantikörper verschiedener Subklassen, die gegen Epitope des Fc-Fragments verschiedener IgG gerichtet sind, werden häufig im Blutserum von RA-Patienten nachgewiesen. Diese Autoantikörper werden Rheumafaktoren genannt und dienen als diagnostische Parameter bei RA. Der Rheumafaktor ist Bestandteil der revidierten Klassifikationskriterien des *American College of Rheumatology* für die RA (5). Darüber hinaus spielt heute der Nachweis von Antikörpern gegen citrullinierte Antigene in der Diagnostik für die Früherkennung der RA eine wichtige Rolle (79). Autoantikörper können z.T. Jahre vor Beginn der symptomatischen Phase der RA nachgewiesen werden (190).

Bezüglich der auslösenden Faktoren bei der RA gibt es gegenwärtig keine einheitliche Theorie. Es ist aber wahrscheinlich, dass die RA durch ein multifaktoriell auslösendes

Geschehen induziert wird, wobei genetische Faktoren, Umweltfaktoren und Autoreaktivitäten eine Rolle spielen (25).

Der symptomatischen Krankheitsphase geht eine Antigen-abhängige asymptomatische Phase voraus, in der zwar wie bereits erwähnt, Autoantikörper nachgewiesen werden können, es aber nicht zum Ausbruch der RA kommt (Phase der Toleranz). Bei der initialen hochakuten lokalen und systemischen Entzündungsreaktion, die den Beginn der symptomatischen Krankheitsphase kennzeichnet, spielen das angeborene und adaptive Immunsystem eine wichtige Rolle. So beobachtet man eine Aktivierung von Makrophagen und Fibroblasten, eine Komplementaktivierung und die Produktion zahlreicher Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF), Interferon- γ (INF- γ), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6 (IL-6). Zusätzlich sind T-Zellen (115), B-Zellen (249) und Antigen-präsentierende Zellen (APC) (115), die miteinander interagieren, stark in das Entzündungsgeschehen involviert, und es kommt zur Bildung von autoaggressiven Antikörpern. Im chronischen Prozess der Entzündung wird das Synovium in ein gegenüber dem Knorpel und Knochen aggressiv wachsendes Gewebe (Pannusgewebe) umgewandelt. An dieser verstärkten Matrixbildung sind die ortständigen (v.a. Fibroblasten) und eingewanderten Zellen (besonders CD4⁺-T-Helferzellen, B-Zellen, Makrophagen) gleichermaßen beteiligt (172). Die in den Knorpel und Knochen einwachsende Deckzellschicht (*lining layer*) ist nahezu frei von Lymphozyten und besteht im Wesentlichen aus Fibroblasten. Die aggressive Invasion der aktivierten synovialen Fibroblasten in den Knorpel wird auf eine gestörte Balance zwischen Apoptose und Proliferation zurückgeführt (81;172). Aufgrund ihrer Synthese von Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Kathepsinen führen die synovialen Fibroblasten zusammen mit den durch das RANK/RANK-Ligand-System aktivierten knochenabbauenden Osteoklasten zu einer zunehmenden Zerstörung von Knorpel und Knochen und somit zur Gelenkdestruktion (173;254).

Während der ausgeprägten lokalen Entzündungsreaktion gelangen große Mengen immunkompetenter Zellen und proinflammatorischer Immunmediatoren (z.B. Zytokine) in die Peripherie. Dadurch wird eine systemische Reaktion mit der Aktivierung der beiden antinflammatorischen Achsen, der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HHN-Achse) und der Hypothalamus-autonomes Nervensystem-Achse (HANS-Achse), auf die

im Kapitel 1.2 näher eingegangen wird, induziert (100) (Abb. 1.1). Auch diese Veränderungen sind für die Pathogenese der RA von großer Bedeutung, da die Effektoren der endokrinen (u.a. Glucocorticoide) und der neuronalen Systeme (u.a. Noradrenalin, Substanz P) über systemische Rückkopplungskreise zu einer Modulation des lokalen synovialen Entzündungsgeschehens führen (224).

Trotz umfangreicher Forschungsarbeit auf diesem Gebiet ist das Wissen über die Ätiologie und Pathogenese der RA, sicherlich auch aufgrund der Komplexität der Erkrankung, bisher lückenhaft. Um die Pathophysiologie der RA zu verstehen, ist es notwendig alle beteiligten Systeme (Immunsystem, endokrines System, peripheres und zentrales Nervensystem) und deren Interaktionen zu berücksichtigen. Viele Untersuchungen, die die Interaktionen verschiedener Systeme einschließen, sind im menschlichen Modell nicht realisierbar, da sie beispielsweise auf molekulare Faktoren, neuroanatomische Pfade und experimentelle Therapien fokussieren. So wurden Tiermodelle der Arthritis entwickelt, die ein exzellentes Instrument darstellen, um neue Erkenntnisse hinsichtlich der Ätiologie und Pathogenese der Arthritis zu gewinnen und neue Therapieansätze zu finden bzw. neue Therapien zu erproben. Auch dieser Arbeit liegen tierexperimentelle Untersuchungen zugrunde. Das hier verwendete Tiermodell der CII induzierten Arthritis wird im Folgenden beschrieben.

1.1.1 Tiermodell der Kollagen Typ II - induzierten Arthritis

In der Literatur sind zahlreiche Tiermodelle der Arthritis, die Ähnlichkeiten mit der humanen RA aufweisen, beschrieben (16;104). Dazu gehören die Spontanarthritiden in transgenen Tieren (z.B. das K/BxN Mausmodell (133;137), das TNF transgene Mausmodell (126;147) und das HLA-B27 transgene Rattenmodell (240) und die immunologisch induzierten Arthritiden. Zu letzteren zählen die Streptokokkenzellwand induzierte Arthritis (44;54), die Adjuvans Arthritis (82;183), die Antigen induzierte Arthritis (16;28) und die CII induzierte Arthritis (29;110;244;252). Die drei am häufigsten verwendeten Arthritismodelle sind jedoch die Adjuvans Arthritis (AA) bei Ratten und die CII induzierte Arthritis (CIA) bei Ratten und Mäusen (104). Das erste Modell der RA, das beschrieben worden ist, war die AA (183), die klassischerweise durch intradermale Injektion von komplettem Freund-Adjuvans (CFA) in die Schwanzbasis von Lewis Ratten

induziert wird. Nach Immunisierung entwickelt sich schnell eine schwere Polyarthrititis, die durch eine starke Inflammation der betroffenen Gelenke, Knochenabbau und periostale Knochenproliferation gekennzeichnet und T-Zell-abhängig ist, aber selten länger als einen Monat andauert (32). Die AA ist eine aggressive, monophasische und selbst-remittierende Form der Arthritis und hat gegenüber der CIA den Nachteil, dass die Zeitperiode, in der die Arthritis moduliert werden kann bzw. in der Proben genommen werden können, äußerst begrenzt ist. Des Weiteren sind bei der AA auch andere Organsysteme wie z.B. der Gastrointestinaltrakt, der Urogenitaltrakt und die Haut betroffen (118) und Knorpelschäden sind weniger prominent als bei der CIA oder der RA.

Die CIA wurde erstmals 1977 von Trentham beschrieben und ist heute das gebräuchlichste Tiermodell zur Untersuchung der Pathogenese der RA, da sie viele Charakteristika mit der humanen RA teilt. So ist die CIA ähnlich wie die RA durch eine progressive Synovitis mit Infiltration inflammatorischer Zellen, Pannusformation, Knorpeldegradation, Knochenerosion, Fibrose bis hin zur Ankylosierung und durch einen Verlust der Gelenkfunktion charakterisiert (104;175;263). Wie die RA ist die CIA primär eine Autoimmunkrankheit der artikulären Gelenke und die Suszeptibilität wird mit spezifischen MHC (*Major Histocompatibility Complex*) Klasse II Genen assoziiert (86;264). Interessanterweise sind weibliche Ratten analog zum Menschen suszeptibler als männliche Tiere (104). Das Gegenteil ist bei Mäusen der Fall, so dass man davon ausgehen kann, dass hormonelle Faktoren und Umweltfaktoren (u.a. Stress, Verhaltenseffekte), wie bei der RA auch, eine Rolle bei der Pathogenese der CIA spielen (110;261).

Bei Ratten erfolgt die Induktion der Arthritis durch einmalige intradermale Injektion von CII in inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA) in die Schwanzwurzel. Bei Mäusen hingegen wird die Arthritis typischerweise durch eine erste intradermale Injektion von CII in CFA in die Schwanzwurzel und eine zweite Folgeinjektion ca. 3 Wochen später von CII in IFA induziert. Im Gegensatz zur AA, die nahezu ausschließlich durch T-Zellen vermittelt wird, spielen bei der Pathogenese der CIA autoreaktive T- und B-Zellen eine zentrale Rolle (175). So ruft die Immunisierung mit CII sowohl eine humorale als auch eine zelluläre Immunantwort hervor, die gegen den Gelenkknorpel gerichtet ist, auf dem die Antigene hauptsächlich lokalisiert sind.

In der Initialphase werden durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) T-Zellen aktiviert, deren Funktion es ist, B-Zell-Hilfe zu leisten und andere für die Gelenkentzündung wichtige Zellen wie z.B. synoviale Makrophagen zu aktivieren (110). Die Bedeutung der T-Zellen für die Inflammationsvorgänge bei der CIA zeigt sich darin, dass ein T-Zellen-Transfer in Empfängertieren zwar keine klinische Arthritis jedoch eine Synovitis induziert (111). Die Hauptaufgabe der B-Zellen besteht in der Produktion arthritogener Antikörper gegen CII, die an Knorpel binden und eine Arthritis induzieren (241). Die Autoantikörperantwort auf CII wird dominiert durch IgG2a und IgG2b, denen auch die Komplementaktivierung (besonders C5a), die für die Entwicklung der CIA ebenfalls erforderlich ist, zugeschrieben wird (256). Eine Rolle der B-Zellen und des Komplementsystems in die Induktionsvorgänge der CIA konnte dadurch bewiesen werden, dass sowohl B-Zellen-defiziente (236) als auch C5-defiziente Mäuse (256) resistent gegenüber einer CIA sind. Die Aktivierung der Komplementkaskade führt zu einer Zerstörung der Knorpelstrukturen und gleichzeitig zur Anlockung weiterer Immunzellen. Die ersten infiltrierenden Zellen sind neutrophile Granulozyten (202), die im weiteren Verlauf durch Makrophagen und Lymphozyten abgelöst werden.

Im weiteren chronischen Verlauf der CIA kommt es zur Proliferation der Synoviozyten und Fibroblasten und damit zur Ausbildung eines Pannusgewebes. Außerdem werden von Lymphozyten, Makrophagen und synovialen Fibroblasten proinflammatorische Zytokine (TNF, IL-1 β) und proteolytische Enzyme freigesetzt, die zur Chronifizierung der CIA beitragen (88). In der chronischen Phase kommt es zu einer zunehmenden Zerstörung von Knorpel und Knochen und somit zur Gelenkdestruktion. Die Pathogenese der CIA weist viele Gemeinsamkeiten mit der RA auf. Aus diesem Grund ist die CIA ein äußerst geeignetes Tiermodell, um den der RA zugrunde liegenden Krankheitsprozess zu untersuchen. Obwohl ursprünglich bei der Ratte etabliert, ist das Mausmodell der CIA heute das gebräuchlichere Modell (29;110). Jedoch hat der Einsatz von Ratten den Vorteil, dass mehr Gewebe für die zahlreichen Untersuchungen zur Verfügung steht.

1.2 Neuroendokrine Veränderungen bei rheumatoider Arthritis

Wie in Kapitel 1.1 erwähnt, kommt es im Zuge der lokalen Gelenkentzündung bei RA auch zu systemischen Veränderungen. Durch Zytokine und aktivierte Immunzellen, die in großer Zahl in der Peripherie zirkulieren, werden die HHN-Achse und die HANS-Achse aktiviert, deren Effektoren über Rückkopplungskreise zu einer Modulation des synovialen Entzündungsgeschehens führen (100;224), (Abb. 1.1). Normalerweise versucht das zentrale Nervensystem (ZNS) eine periphere Entzündung mittels dieser beiden antiinflammatorischen Achsen zu inhibieren. Bei RA sind diese Achsen jedoch verändert. Man beobachtet einen Funktionsverlust der HHN-Achse (221;228) und einen erhöhten Sympathikotonus (135;185) bei gleichzeitigem Verlust sympathischer Nervenfasern im Synovium (169;257). Das endokrine System und das periphere Nervensystem sind also direkt in die Pathophysiologie der RA involviert (221). Deshalb werden sowohl die Grundlagen als auch die der RA zugrunde liegenden pathologischen Veränderungen dieser Systeme in den folgenden beiden Kapiteln diskutiert.

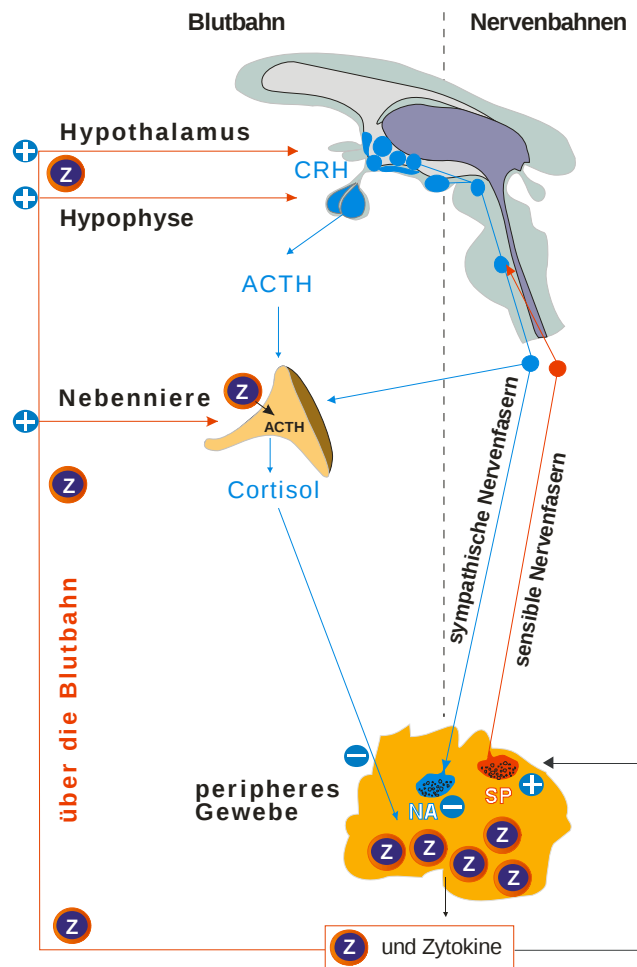


Abb. 1.1: Entzündungshemmende Regelkreise während einer systemischen Entzündung. Peripher freigesetzte Zytokine stimulieren das ZNS über die Blutzirkulation oder über Rezeptoren auf sensiblen Nervenfasern. Das ZNS reagiert mit der Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (links) und der neuronalen Hypothalamus-Automes-Nervensystem-Achse (rechts). Durch die antiinflammatorischen Effektoren beider Systeme (Cortisol, Noradrenalin) wird die periphere Entzündung gehemmt. ACTH, adrenocorticotropes Hormon; CRH, Corticotropin-Releasing-Hormon; NA, Noradrenalin; SP, Substanz P; Z, aktivierte Immunzelle. (modifiziert, aus (220))

1.2.1 Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse unter besonderer Berücksichtigung der Nebenniere

Während einer peripheren Immunreaktion wird dem ZNS über Immunmediatoren, aktivierte Immunzellen und afferente sensible Nervenfasern eine starke proinflammatorische Situation gemeldet, auf die das ZNS u.a. mit der Aktivierung der HHN-Achse reagiert (221) (Abb. 1.1). Welche Effekte periphere Zytokine und immunkompetente Zellen auf das ZNS haben und wie sie zur Aktivierung der HHN-Achse

beitragen, wird im Kapitel 1.4 näher erläutert. Das oberste Steuerungszentrum der HHN-Achse ist der Hypothalamus (Abb. 1.3). Werden die parvozellulären Neuronen des *Nucleus paraventricularis* (PVN) des Hypothalamus beispielsweise durch inflammatorische Stimuli oder Stressexposition aktiviert, führt das zur Freisetzung von *corticotropin-releasing hormone* (CRH), das über PVN-Axone zur *Eminentia mediana* und von dort über das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem in die Adenohypophyse transportiert wird. CRH stimuliert sekretorische Zellen der Adenohypophyse zur Produktion des Adrenocorticotropin (ACTH), das dann in den Blutkreislauf freigesetzt wird und die Nebennierenrinde zur Sekretion von Cortisol (Mensch) bzw. Corticosteron (Maus/Ratte) anregt (204;259).

Die Nebenniere besteht aus dem Nebennierenmark (Medulla), deren chromaffine Zellen Adrenalin und Noradrenalin produzieren und der Nebennierenrinde (Cortex), in der verschiedene Steroidhormone produziert werden. Dazu gehören Mineralocorticoide in der äußeren *Zona glomerulosa*, Glucocorticoide in der mittleren *Zona fasciculata* und Androgene in der inneren an das Mark angrenzenden *Zona reticularis*.

Die nach ACTH-Stimulation von den Zellen der *Zona fasciculata* freigesetzten, zirkulierenden Glucocorticoide beeinflussen die Energiebereitstellung, den Herz- und Gefäßtonus und inhibieren viele Funktionen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems, sind also antiinflammatorisch und immunsuppressiv (92;259). Die entzündungshemmende Wirkung von Glucocorticoiden wird u.a. durch eine Hemmung der Produktion von Zytokinen und anderen Mediatoren, eine Unterdrückung der Aktivierung Antigen-spezifischer T-Lymphozyten, eine Hemmung der Reifung von Makrophagen und dendritischen Zellen (DCs), eine Induktion der Apoptose u.a. bei T-Zellen und Makrophagen, eine verminderte Phagozytose, einen reduzierten oxidativen Burst in Phagozyten, eine Hemmung der Lipoxygenase und Cyclooxygenase 2 vermittelt (92;174;210). Zusätzlich begünstigen Glucocorticoide eine Th2-gewichtete Immunantwort gegenüber einer Th1-Antwort (92).

Um eine adäquate Stress-Antwort zu erzielen, ist eine kontrollierte Gegenregulation durch Rückkopplungsmechanismen auf verschiedenen Ebenen der HHN-Achse notwendig. So wirkt ACTH hemmend auf die Sekretion von CRH (kurze Rückkopplung) und hemmt gleichzeitig die eigene Freisetzung (ultrakurze Rückkopplung) (89). Eine weitere

Rückkopplung erfolgt durch zirkulierende Glucocorticoide, die die Sekretion hypothalamischer und adenohipophysärer Hormone negativ beeinflussen (259). Diese so genannte lange Rückkopplung wird durch zwei verschiedene Steroid-Rezeptortypen, die Glucocorticoidrezeptoren (GRs) und die Mineralocorticoidrezeptoren (MRs) vermittelt (259), die beide hauptsächlich im Hippocampus vorkommen (52). Es konnte gezeigt werden, dass eine Zerstörung des Hippocampus zu einer erhöhten Glucocorticoidsekretion und CRH mRNA Expression im PVN führt (107), während es bei einer Stimulation des Hippocampus zu einer verminderten Aktivität der HHN-Achse kommt (114). Diese Regulierung der HHN-Achse erfolgt indirekt über die Stimulation inhibitorischer GABAerger Neuronen in der *Stria terminalis*, die zu den parvozellulären Neuronen des PVN projizieren (106). Eine weitere negative Rückkopplungs-Regulation der HHN-Achse durch Glucocorticoide wird über GRs, die auch auf neurosekretorischen Zellen im PVN und auf corticotrophen Zellen der Hypophyse exprimiert werden, vermittelt (49;52;259). Ferner sind einige andere weniger gut untersuchte Regulationsmechanismen der HHN-Achse in der Literatur beschrieben (106).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die bidirektionale Interaktion zwischen dem Immunsystem und der HHN-Achse notwendig ist, um eine unangemessen hohe Aktivierung von Immunzellen und eine Überproduktion von proinflammatorischen Zytokinen zu verhindern (20).

Während der akuten Krankheitsphase der RA (in den ersten Wochen) bewirken proinflammatorische Zytokine wie IL-6 (162), IL-1 (20), IL-2 (150) und TNF (168) eine Aktivierung der HHN-Achse, die sich in einer gesteigerten Freisetzung von ACTH und daraus resultierend einer Zunahme der Sekretion von Cortisol, Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion aus den Zellen der Nebennierenrinde äußert (33). In dieser frühen Phase der RA kann die Nebenniere mit einer adäquaten Hormonantwort reagieren.

Im Verlauf des chronischen Krankheitsprozesses bei RA kommt es jedoch zu einem Funktionsverlust der HHN-Achse, der durch eine inadäquate Produktion von ACTH, Glucocorticoiden und Androgenen in Relation zum Entzündungsmaß gekennzeichnet ist (43;161;221;228). Es konnte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Stimulation der HHN-Achse mit IL-6 eine abgeschwächte ACTH-Antwort zur Folge hat, was auf eine Resistenz der HHN-Achsen-Aktivität bei dauerhaft erhöhten Zytokin-Spiegeln hindeutet

(95;162). Des Weiteren wurde beschrieben, dass es bei einer chronischen Aktivierung des Immunsystems und demzufolge dauerhaft erhöhten Zytokin-Spiegeln zu einer Verminderung der CRH-Synthese und einem Anstieg des Arginin-Vasopressin (AVP) kommt (97;237). AVP ist auch ein Bestandteil der HHN-Achse und in der Lage sowohl die hypophysäre Sekretion von ACTH zu stimulieren als auch die Wirkung von CRH zu potenzieren (181). Andere, klinische Studien mit CRH wurden durchgeführt, um die Funktion der Hypophyse hinsichtlich der ACTH-Sekretion bei RA zu überprüfen. Diese führten aber zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen (Übersicht in: (95)), so dass bisher nicht sicher geklärt werden konnte, ob tatsächlich signifikante Veränderungen hinsichtlich der Hormonproduktion auf dem Niveau des Hypothalamus und der Hypophyse bei RA vorliegen und inwieweit diese zum Funktionsverlust der HHN-Achse beitragen (95).

Kein Zweifel besteht jedoch bezüglich der relativen Insuffizienz der Nebenniere in Beziehung zur Entzündung bei RA (47;91;122;232;251). Verschiedene unabhängige Gruppen haben beschrieben, dass es bei RA-Patienten zu einer zunehmenden Verarmung adrenaler Androgene wie DHEA, Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) und Androstendion kommt (46;161;197). Der gemeinsame Vorläufer der Steroidhormone ist Cholesterin, das mittels P450scc zu Pregnenolon und weiter durch die 3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3 β -HSD) zu Progesteron umgewandelt wird (Abb. 1.2). Über einen Doppelenzymschritt der P450c17 werden dann Pregnenolon zu DHEA und Progesteron zu Androstendion konvertiert. Die Synthese dieser Androgene findet in den Zellen der *Zona reticularis* der Nebennierenrinde statt. Aus DHEAS werden in der Peripherie antientzündliche Androgene und Östrogene aber auch proentzündliche Hormone produziert (232).

Durch die Verarmung an Androgenen bei RA kommt es im entzündeten Gewebe insgesamt zu einer Erhöhung der proentzündlichen und Abnahme der antientzündlichen Hormone (36). TNF scheint bei der inadäquaten Androgenproduktion bei RA eine entscheidende Rolle zu spielen, da es die Enzyme P450scc und P450c17 hemmt (112;265) (Abb. 1.2). Außerdem wurde gezeigt, dass eine TNF-Neutralisierung zu einem Anstieg der Androstendion-Spiegel führt (229;230).

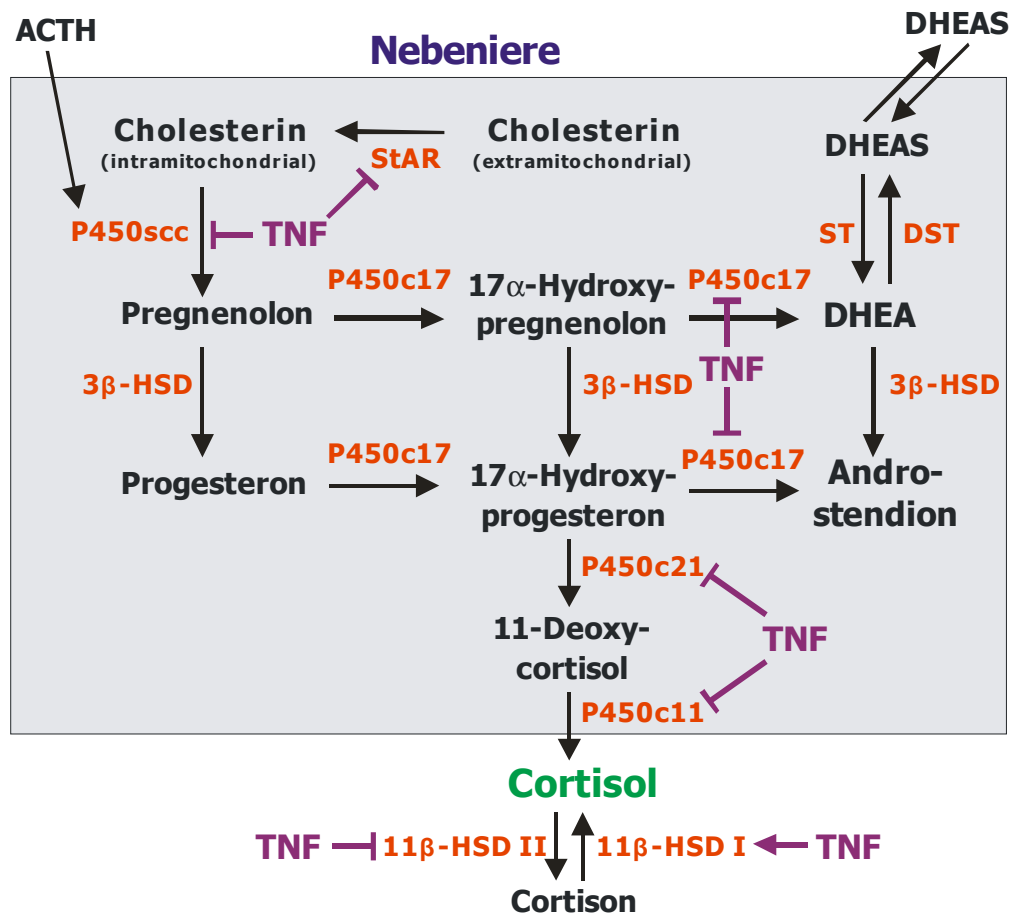


Abb. 1.2: Der Einfluss von Tumornekrosefaktor (TNF) auf verschiedene Enzymschritte der adrenalen Steroidogenese. ACTH, adrenocorticotropes Hormon; StAR, *steroidogenic acute regulatory protein*; 3β-HSD, 3β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase; 11β-HSD I und II, 11β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ I und Typ II; DHEA, Dehydroepiandrosteron; DHEAS, Dehydroepiandrosteronsulfat; DST, DHEA-Sulfotransferase; ST, DHEA-Sulfatase; P450scc, *side chain cleavage enzyme*; P450c17, 17α-Hydroxylase und 17/20-Lyase; P450c21, 21α-Hydroxylase; P450c11, 11β-Hydroxylase. (modifiziert, aus (229))

Neben der absolut erniedrigten adrenalen Androgenproduktion kann man bei RA auch eine unverhältnismäßig niedrige Cortisolproduktion in Relation zum Entzündungsausmaß beobachten (43;47;91;122;228;232;251). Eine Erklärung für die inadäquate Cortisolproduktion könnte auch in diesem Fall der inhibitorische Einfluss von TNF auf diverse Enzyme sein (Abb. 1.2). So ist TNF in der Lage die Expression des *steroidogenic acute regulatory protein* (StAR) und die ACTH-stimulierte Expression der Enzyme P450scc, P450c21 und P450c11 zu hemmen (112). Die Cortisolproduktion findet hauptsächlich in den Zellen der *Zona fasciculata* der Nebennierenrinde statt. Dabei vermittelt StAR den Transport des Cholesterins zur inneren Mitochondrienmembran und

P450scc die Konversion von Cholesterin zu Pregnenolon. P450c21 und P450c11 vermitteln die letzten zwei enzymatischen Schritte der Cortisolsynthese, nämlich die Umwandlung von 17- α -Hydroxy-Progesteron zu 11-Deoxy-Cortisol bzw. die Konversion von 11-Deoxy-Cortisol zu Cortisol. Der negative Einfluss von TNF auf die Cortisolproduktion zeigt sich auch darin, dass eine TNF-Neutralisierung bei RA-Patienten zu einem Anstieg der Cortisol-Spiegel und insgesamt zu einer Verbesserung der HHN-Achse in Relation zur proinflammatorischen Situation führt (229;230).

Des Weiteren gibt es Untersuchungen, die zeigen, dass RA mit einem verstärkten Abbau von Cortisol ins inaktive Cortison, der durch die 11 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ II (11 β -HSD II) vermittelt wird (Abb. 1.2), assoziiert ist, was im peripheren Gewebe ebenfalls zu einer geringeren Konzentration des antiinflammatorischen Cortisol führt (199;258).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Gründe für den Funktionsverlust der HHN-Achse bei RA kaum verstanden sind und es weiterer Untersuchungen bedarf, um die Mechanismen, die für die pathologischen Veränderungen der HHN-Achse verantwortlich sind, aufzuklären.

1.2.2 Sympathisches Nervensystem

Das ZNS reagiert auf inflammatorische Stimuli nicht nur mit der Aktivierung der HHN-Achse, sondern auch mit der Aktivierung der HANS-Achse (Abb. 1.1), deren Effektoren (u.a. Noradrenalin, Adrenalin, Adenosin) ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Immunregulation spielen (41;73). Besonderes Augenmerk soll in dieser Arbeit auf das sympathische Nervensystem (SNS) gelegt werden, das neben dem parasympathischen Nervensystem (PNS) der zweite Bestandteil des autonomen Nervensystems ist. SNS und PNS wirken antagonistisch und innervieren hauptsächlich Drüsen, Blut- und Lymphgefäße, glatte Muskulatur, aber auch andere Strukturen wie Knochenmark, Lymphknoten, Fett und Bindegewebe (178). Das autonome Nervensystem verfügt sowohl über ein System von Neuronen in Gehirn und Rückenmark als auch über ein solches in der Peripherie. Das bedeutet, dass zentrale Impulse nicht direkt ins Erfolgsorgan gelangen,

sondern in peripheren Ganglien eine synaptische Umschaltung erfahren, ehe sie im Zielorgan wirksam werden.

Die präganglionären Fasern des Sympathikus entspringen dem thorakolumbalen Rückenmark, das sie über die Vorderwurzeln verlassen, um zu den Ganglien des *Truncus sympathicus* (Grenzstrang) zu ziehen, wo ein Teil der präganglionären Fasern auf postganglionäre Neurone umgeschaltet wird. Im Gegensatz zum Parasympathikus liegen diese Ganglien organfern. Ein anderer Teil der Fasern zieht weiter zu prävertebralen Ganglien vor der Aorta oder zu Beckenganglien, wo dann die Umschaltung auf postganglionäre Neurone erfolgt. Der Transmitter der präganglionären Neuronen ist Acetylcholin (ACh), während die Übertragung sympathischer Impulse auf das Erfolgsorgan meistens durch Noradrenalin und seltener durch Adrenalin vermittelt wird (178;247). Außerdem besitzt das SNS einen humoralen Anteil, zu dem die Zellen des Nebennierenmarks, die umgebildeten postganglionären Neuronen entsprechen, gehören. Sie produzieren v.a. Adrenalin und seltener Noradrenalin, die ins Blut abgegeben werden und auf den gesamten Körper wirken (247).

Die präganglionären Fasern des Parasympathikus entspringen dem kranialen und sakralen Teil des Rückenmarks und ziehen weiter zu Ganglien in der Nähe der Erfolgsorgane, wo die Umschaltung auf die postsynaptischen Neuronen erfolgt. Der Neurotransmitter des Parasympathikus sowohl an der Umschaltstelle als auch am Erfolgsorgan ist ACh.

ACh und Noradrenalin bzw. Adrenalin binden nach ihrer Freisetzung an cholinerge (ACh) bzw. adrenerge (Noradrenalin, Adrenalin) Rezeptoren in der Membran der nachgeschalteten Effektor- oder Nervenzelle, was in der Zelle molekulare Signalwege auslöst, die Effekte wie z.B. die Kontraktion oder Relaxation glatter Muskelzellen oder die Ausschüttung des Sekretproduktes aus Drüsenzellen zur Folge haben. Da das SNS die primären und sekundären lymphatischen Organe innerviert und viele Immunzellen Adrenozeptoren besitzen, ist das SNS in der Lage das Immunsystem sehr präzise regulierend zu beeinflussen (70;80).

Die adrenergen Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die pharmakologisch in α_1 - , α_2 - und β_1 -, β_2 -, β_3 -adrenerge Rezeptoren unterteilt werden (178). Noradrenalin bindet vorzugsweise α -Adrenozeptoren und in hohen physiologischen Konzentrationen auch β -Adrenozeptoren (Affinität für Rezeptor $\alpha > \beta$, etwa 100:1), während Adrenalin präferenziell

β -Adrenozeptoren aber in hohen physiologischen Konzentrationen auch α -Adrenozeptoren (Affinität für Rezeptor $\beta > \alpha$, etwa 100:1) bindet (99;221). Eine Bindung an β -Adrenozeptoren erhöht intrazellulär die cAMP-Spiegel und eine Bindung an α_2 -Adrenozeptoren reduziert die intrazellulären cAMP-Spiegel. cAMP aktiviert Proteinkinasen vom Typ A (PKA), die u.a. verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und somit die Gentranskription von z.B. Zytokinen oder Matrixmetalloproteinasen beeinflussen (99). Es wurde vielfach gezeigt, dass eine Aktivierung des SNS (hohe Noradrenalin- und Adrenalin-Konzentrationen) induzierter cAMP-Anstieg antiinflammatorische Effekte induziert (158;221).

Die übergeordneten neuronalen Zentren der HANS-Achse sind der Hypothalamus und der *Locus coeruleus* (LC), in dem der größte Teil der noradrenergen Neuronen des ZNS lokalisiert ist (Abb. 1.3). Der LC besteht aus einer Ansammlung noradrenalin-haltiger Zellen, die im Hirnstamm links und rechts des 4. Ventrikels liegen. Das LC-Noradrenalin-System wird auch als zentrales SNS bezeichnet (40;246;247). Von hier aus ziehen die Axone der noradrenergen Neuronen in viele Gehirnregionen wie z.B. Hypothalamus, Hippocampus, Amygdala und Cerebellum (Abb. 1.3). Die CRH-Neuronen des PVN im Hypothalamus und die zentralen katecholaminergen Neuronen des LC-noradrenergen Systems innervieren und aktivieren sich gegenseitig (247). Wie Immunstimuli neuronale und hormonale Komponenten des ZNS beeinflussen und welche Wechselwirkungen zwischen einzelnen Effektoren verschiedener Hirnareale dadurch ausgelöst werden, wird in Kapitel 1.4 erläutert.

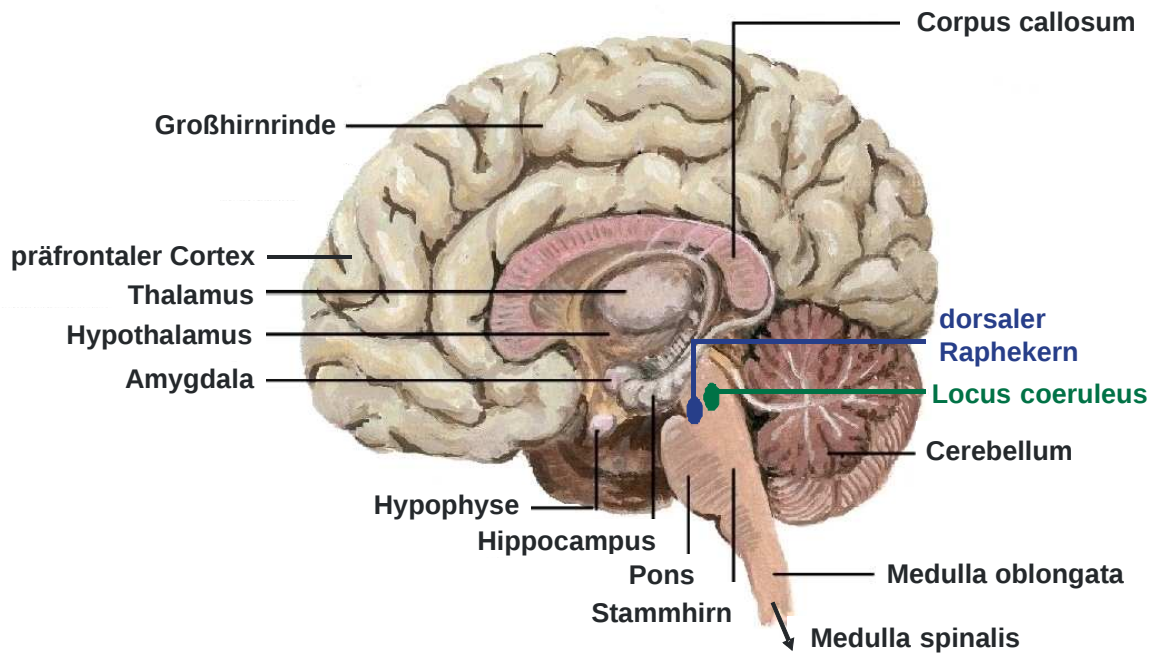


Abb. 1.3: Querschnitt durch das humane Gehirn (<http://www.airflag.com/Hirn/w3/schnitt.jpg>; modifiziert).

Bei Stress oder während einer peripheren Immunreaktion werden das LC-noradrenerge System und parvozelluläre Neuronen des PVN (Hypothalamus) durch Immunstimuli und über humorale und neuronale Signale unverzüglich aktiviert, was wiederum in einer Aktivierung der HHN-Achse und der HANS-Achse resultiert. Die Effektoren des SNS erreichen über postganglionäre sympathische Neuronen und über das adrenomedulläre System alle Orte des peripheren inflammatorischen Geschehens und können so direkt ihre immunregulatorischen Wirkungen entfalten (41;73). Es wurde gezeigt, dass Katecholamine über bestimmte Adrenozeptoren-Subtypen angeborene und erworbene Immunfunktionen beeinflussen (155). So hemmt Noradrenalin in hohen Konzentrationen, das bedeutet über β -Adrenozeptoren die Freisetzung von IL-1 (129), die Sekretion von TNF durch Makrophagen (38;103;194), die Sekretion von IL-12 durch Monozyten und DCs (155;180), die Produktion von IL-2 und INF- γ durch Th1-Zellen (155), die lytische Aktivität von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) (207) und zytotoxischen T-Zellen (72), die Phagozytose (268) und die Proliferation von T-Lymphozyten (72). Außerdem vermittelt Noradrenalin über β -Adrenozeptoren die Migration verschiedener Zelltypen wie NK-Zellen, verschiedener Lymphozyten und Monozyten (125;198;227). In geringen

Konzentrationen, das heißt über α_2 -Rezeptoren bewirkt Noradrenalin jedoch eine erhöhte TNF-Sekretion durch Makrophagen (212). Durch die Veränderungen der regulatorischen Zytokine wie IL-12 und INF- γ bewirken Katecholamine eine Verschiebung in Richtung der humoralen Immunantwort, begünstigen also damit die Differenzierung von Th2-Zellen (72;78;245). Des Weiteren befinden sich in sympathischen Nervenendigungen Vesikel mit endogenen Opioiden, die in der Lage sind die Freisetzung der proinflammatorischen Substanz P aus sensiblen Nervenfasern zu hemmen (131;233).

Wie bisher beschrieben wurde, wirken Steroidhormone wie Cortisol und Neurotransmitter wie Noradrenalin antiinflammatorisch und immunsuppressiv. Wenn beide Stressachsen gleichzeitig aktiviert werden (und das ist in der Regel der Fall), werden die antiinflammatorischen Effekte sogar verstärkt (Synergismus der Stressachsen), da Cortisol und Noradrenalin ihre biologischen Effekte gegenseitig verstärken (221;224). So führen die synergistischen Effekte von Cortisol und Noradrenalin zu einem Anstieg von Glucocorticoidrezeptoren, β -Adrenorezeptoren, intrazellulärem cAMP und Proteinkinase A (65;90;132;176;200). Zudem potenziert Cortisol die Produktion von Noradrenalin und Adrenalin aus sympathischen Nervenendigungen und dem Nebennierenmark (30;203). So sind beide Systeme (HHN-Achse und HANS-Achse) notwendig um eine periphere Inflammation bestmöglich zu hemmen.

Im Verlauf des Krankheitsprozesses bei RA kommt es jedoch nicht nur zum Funktionsverlust der HHN-Achse, sondern auch zu Veränderungen des sympathischen Nervensystems (221). Es kommt zu einem Verlust von β -Adrenorezeptoren (8) und gleichzeitig zu einem Anstieg von α -Adrenorezeptoren auf peripheren Immunzellen von RA-Patienten (105), was eine proinflammatorische Situation erzeugt (224). Zusätzlich beobachtet man einen erhöhten Tonus des Sympathikus (141) bei gleichzeitigem Verlust sympathischer Nervenfasern im entzündeten Synovialgewebe (169;257). Das führt zur Verstärkung der proinflammatorischen Situation im entzündeten Gelenk, da die Innervation mit proinflammatorischen sensiblen Nervenfasern (Substanz P) normal bis erhöht ist (169;257). Des Weiteren konnte experimentell gezeigt werden, dass eine frühe periphere Sympathektomie (in der asymptomatischen Phase) zu einer Verbesserung der Arthritis führt, während eine späte Sympathektomie (in der symptomatischen Phase) eine Verschlechterung des Arthritis-Schweregrades nach sich zieht (101). Diese Ergebnisse

legen nahe, dass das SNS mit seinen Effektoren in der initialen Krankheitsphase die proinflammatorische Situation am Entzündungsort unterstützt, was u.a. auf die potenzierende Wirkung der sympathischen Effektoren auf die Migration und gerichtete Chemotaxis von Leukozyten zurückgeführt werden kann (101). In der späten symptomatischen Krankheitsphase sind jedoch die oben genannten antiinflammatorischen Eigenschaften der Effektoren des SNS unerlässlich, um die periphere Inflammation zu hemmen. Zusammenfassend kann man sagen, dass das Gleichgewicht der synergistisch wirkenden entzündungshemmenden Systeme bei RA gestört ist. Die Ursachen hierfür sind weitestgehend unbekannt.

1.3 Psychosozialer Stress und Arthritis

Wie in Kapitel 1.1 erwähnt, sind verschiedene Risikofaktoren in die Pathogenese der RA involviert. Seit Jahren mehren sich die Befunde, dass soziale Stressoren durch Aktivierung der beiden Hauptachsen der Stressbewältigung (HHN-Achse, SNS, Abb. 1.1) Auswirkungen auf das Immunsystem haben und somit an Ausbruch und Verlauf verschiedener inflammatorischer Erkrankungen beteiligt sein können. So wird psychosozialer Stress heute als möglicher Bedingungsfaktor für RA angesehen (222). Um den Einfluss von psychosozialem Stress auf humane Krankheiten besser zu verstehen, sind Untersuchungen im Tiermodell notwendig (223). Im Vergleich zu den zahlreichen Studien, in denen nicht-soziale Stressoren wie Elektroschock oder Immobilisierungsstress zur Anwendung kommen, sind in der Literatur nur wenige Tiermodelle des psychosozialen Stresses beschrieben (217).

Zwei gegensätzliche Stressmodelle sind *Crowding* (31) und soziale Isolation (93). Während der Stress beim *Crowding* durch eine hohe Individuendichte, die die Ausbildung einer stabilen Rangordnung unmöglich macht und zu ständigen Kämpfen führt, ausgelöst wird, besteht der Stress bei sozialer Isolation im Alleinsein. Ein weiteres etabliertes Modell für psychosozialen Stress sind die *Resident-Intruder*-Konfrontationen, in denen ein Eindringling (*intruder*) in das Gehege eines fremden, ansässigen (*resident*) Männchens gesetzt wird (218). Diese Situation stellt für den *Intruder* eine starke Belastung dar, denn er wird in fast allen Fällen sofort vom ansässigen Rivalen unterworfen. *Resident-Intruder*-

Konfrontationen wurden auch in dieser Arbeit durchgeführt. Welchen Einfluss Stress auf den Ausbruch und den Verlauf verschiedener Krankheiten hat, hängt sowohl von der Art und Intensität des Stresses ab als auch von der Dauer und der Einwirkungszeit des Stresses in Relation zum Ausbruch der Krankheit (117). Grundsätzlich kann man zwischen kurzfristigen akuten Stressbelastungen und lang andauernden chronisch psychosozialen Belastungen unterscheiden (99), die im Folgenden erläutert werden.

1.3.1 Akuter und chronischer Stress

Studien der letzten zwei Jahrzehnte haben gezeigt, dass akuter und chronischer Stress ausgeprägte Veränderungen der angeborenen und adaptiven Immunantworten induzieren können (127). Stress ist die Aufeinanderfolge von Ereignissen, die mit einem Stimulus, dem Stressor, beginnt, der eine Reaktion im Gehirn auslöst, welche unverzüglich zur Aktivierung der physiologischen Systeme (Stressantwort) im Körper führt (63) (Abb. 1.1). Die Stressantwort resultiert in der Freisetzung von Neurotransmittern (Noradrenalin), Hormonen (Cortisol) und Immunzellen, die dazu dienen, die Nachricht des Stresses vom Gehirn in die Peripherie weiter zu leiten (48). Da die wichtigsten Mediatoren der Stressachsen (Noradrenalin und Cortisol) je nach Konzentration, die abhängig ist von der Dauer und Intensität der Stressperiode, unterschiedliche Effekte auf das Immunsystem haben, wird in der Literatur zwischen akutem und chronischem Stress unterschieden (48;61;225).

Akuter Stress wird als Minorstress (Eustress) mit geringer Intensität definiert, der nur Minuten oder wenige Stunden andauert, während chronischer Stress als Majorstress (Distress) mit großer Intensität beschrieben wird, der über mehrere Stunden am Tag für Wochen, Monate oder sogar Jahre anhält (48;225). Dabei ist akuter Stress durch einen gering erhöhten Tonus der Stressachsen gekennzeichnet, was in der Regel zur Aktivierung der Immunfunktion führt. Dieser immunverstärkende Effekt kann u.a. darauf zurückgeführt werden, dass zum einen niedrige Konzentrationen an Cortisol die Sekretion an IL-6 und TNF stimulieren (12). Zum anderen bindet Noradrenalin in niedrigen Konzentrationen bevorzugt α -Adrenozeptoren, was zu einer Stimulierung der TNF- und Komplement-Produktion führt (138;224).

Chronischer Stress hingegen ist durch einen stark erhöhten endogenen Tonus der Stressachsen charakterisiert, was in einer Suppression der Immunantwort resultiert, die auf die bekannten immunsuppressiven Eigenschaften von Cortisol und Noradrenalin zurückgeführt werden kann (siehe Kapitel 1.2). Insgesamt kann man sagen, dass die beiden wichtigsten Mediatoren der Stressantwort in niedrigen Konzentrationen, das entspricht der Situation bei akutem Stress, das Immunsystem aktivieren und in hohen Konzentrationen, das entspricht der Situation bei chronischem Stress, eine immunsuppressive Wirkung entfalten (231).

Auf der Basis dieser unterschiedlichen Stresseffekte haben Dhabhar und McEwen (1997) das Konzept der Stressspektrum-Hypothese aufgestellt, welches besagt, dass bei einem mittleren Niveau des endogenen Tonus an Stressmediatoren die Aktivierbarkeit des Immunsystems am stärksten ist. Dagegen bewirkt ein zu hoher oder zu niedriger Tonus an Stressmediatoren nur eine geringe Aktivierung des Immunsystems (62;231). Eine durch Stress ausgelöste verstärkte Aktivierung des Immunsystems erhöht die Resistenz gegenüber Infektionen (208) und Tumoren (10) und wirkt sich positiv auf die Wundheilung aus (60). Gleichzeitig werden jedoch Autoimmunkrankheiten durch die verstärkte Immunaktivierung negativ beeinflusst (60;61). Bei chronischem Stress (Immunsuppression) hingegen werden Autoimmunkrankheiten unterdrückt (87;145). Dagegen wird die Suszeptibilität gegenüber Infektionen (208) und Tumoren (15) erhöht als auch die Wundheilung negativ beeinflusst (160).

Neben all diesen Befunden muss berücksichtigt werden, dass signifikante Unterschiede zwischen einzelnen Individuen hinsichtlich der Stresswahrnehmung und Verarbeitung bestehen. So wird durch die Art wie ein Individuum auf Stress reagiert u.a. die Reaktivität der HHN-Achse beeinflusst (51).

1.3.2 Stress und rheumatoide Arthritis

Wie bereits erwähnt (1.3), wird psychosozialer Stress heute als möglicher Risikofaktor für RA diskutiert. Ein Zusammenhang zwischen akutem oder chronischem psychischem Stress und dem Beginn der RA konnte bisher allerdings nicht hergestellt werden (223). Jedoch haben Studien an Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis (JIA) gezeigt, dass

stressreiche Lebenssituationen den Ausbruch der JIA begünstigen (108). Warum ein solcher Zusammenhang bei RA-Patienten bisher nicht aufgezeigt werden konnte, könnte damit erklärt werden, dass die Immunantwort bei jungen Menschen intensiver ist als bei Älteren (225). Beispielsweise induziert Stress bei jungen nicht aber bei alten Menschen eine erhöhte Aktivität der NK-Zellen (177).

Wenn auch Stress nicht als auslösender Faktor für RA nachgewiesen werden konnte, gibt es zahlreiche Hinweise in der Literatur, dass Minorstress zu einer gesteigerten Krankheitsaktivität bei RA-Patienten führt (Übersicht in: (108)). Hingegen wurde der Einfluss von starkem lang andauerndem sozialem Stress auf den Verlauf von RA bisher nicht in größeren Patientengruppen untersucht, so dass es keine eindeutigen Beweise gibt, die eine Verbesserung des Arthritis-Schweregrades infolge von Majorstress belegen (48). Auch im Tiermodell wurde bestätigt, dass akuter Stress zu einer verstärkten Arthritis-Symptomatik führt (195). Bei Wistar Ratten, die akutem Stress ausgesetzt wurden, kam es zu einem früheren Ausbruch der AA und zu einer gesteigerten Krankheitsaktivität (39). Chronischer Stress führt auch im Tiermodell zu unterschiedlichen Ergebnissen. So wird in einer Studie gezeigt, dass lang anhaltender chronischer Stress bei Long-Evans Ratten, der auf Nahrungsentzug basiert und mit dauernd erhöhten Corticosteron-Spiegeln einhergeht, eine Verbesserung der AA herbeiführt (206). In derselben Arbeit wird jedoch beschrieben, dass chronischer psychosozialer Stress (z.B. durch soziale Isolation oder *Over-Crowding*) zu einer verstärkten Arthritis-Symptomatik führt. Insgesamt berichten die meisten Studien von einer Verschlechterung der Arthritis-Symptomatik nach Stressexposition, was wahrscheinlich auf die defekten Stressachsen bei Arthritis zurückgeführt werden kann.

Im Allgemeinen sind gesunde Personen in der Lage nach Phasen psychischer Belastung mit einer adäquaten Stressantwort zu reagieren, wobei es allerdings bei chronischer Stressbelastung auch bei diesen Personen zur Abschwächung der Stressantwort in Form einer inadäquaten ACTH und Cortisolproduktion kommt (225). Bei RA-Patienten sind die Stressachsen grundlegend verändert (1.2), was sich u.a. in einer inadäquaten Produktion von ACTH und Cortisol in Relation zum Entzündungsausmaß und in einer Verschiebung des sympathischen Einflusses von β -adrenergen hin zu α -adrenergen Mechanismen äußert. So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit RA im Vergleich zu Kontrollpersonen nach psychischem Stress keine signifikante ACTH und Cortisolantwort aufbauen konnten (55).

Des Weiteren gibt es erste Studien, die den Zusammenhang zwischen akutem Stress und einer verstärkten proinflammatorischen Situation bei RA belegen (225). Nach akutem Stress konnten erhöhte IL-6 Spiegel (109), ein Anstieg zirkulierender CD3⁺ Zellen (267) und erhöhte Serumwerte des löslichen IL-2-Rezeptors (267) nachgewiesen werden. Auch bei RA muss man allerdings berücksichtigen, dass eine Stressexposition in der asymptomatischen Phase vermutlich andere Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf hat als Stress, der in der symptomatischen Phase der Erkrankung erfahren wird. Denn in der asymptomatischen Phase ist beispielsweise nur eine begrenzte Anzahl an Zelltypen in das Krankheitsgeschehen eingeschlossen (225). Tierexperimentell konnte bereits gezeigt werden, dass das SNS zu verschiedenen Zeiten vor und während der Arthritis einen unterschiedlichen Einfluss auf den Krankheitsverlauf hat. So kommt es bei Abschaltung des SNS vor der Arthritisinduktion zu einer Abschwächung der Krankheitsaktivität, während es bei einer Abschaltung des SNS in der chronischen Phase zu einem Anstieg des Arthritis-Schweregrades kommt (siehe 1.2.2) (101).

Zusammengefasst zeigen die bisherigen Befunde, dass akuter psychosozialer Stress einen negativen Einfluss auf den Verlauf der Arthritis hat. Zudem liegt die Vermutung nahe, dass auch chronischer Stress einen eher krankheitsverstärkenden Effekt hat. Weitere Studien am Menschen und im Tiermodell sind zwingend erforderlich, um den Einfluss von geringen oder starken, kurzfristigen oder langwierigen Stressbelastungen in unterschiedlichen Lebensphasen vor und während der symptomatischen Krankheitsphase herauszuarbeiten und gegebenenfalls neue Therapieansätze zur Stressbekämpfung bei RA-Patienten zu finden.

1.4 Einfluss von Immunstimuli auf ZNS-Zytokine und monaminerge Neurotransmitter

Bisher wurde ausführlich dargelegt, dass efferente Signale des Gehirns zum Immunsystem durch Gehirn gesteuerte neuroendokrine Mechanismen und durch das SNS den Verlauf von Krankheiten wie z.B. RA beeinflussen. Aber die Kommunikation zwischen Gehirn und Immunsystem erfolgt bidirektional. So basiert die Gehirn-Immunsystem-Kommunikation auf einem Fluss von afferenten Signalen vom Immunsystem zum Gehirn,

der u.a. durch Zytokine übermittelt wird, die dann efferente immunregulatorische und neuroendokrine Antworten auslösen (21).

Zurzeit werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert, auf welchem Weg die durch Zytokine vermittelten afferenten Signale ins Gehirn gelangen (248). Eine Möglichkeit wie Zytokine eine direkte Wirkung auf neuronale Elemente des Gehirns ausüben könnten, ist im Bereich einer weniger intensiven Blut-Hirn-Schranke zu finden (zirkumventrikuläre Organe einschließlich der *Eminentia mediana*) (163;248). Zytokine können auch über selektive Transportmechanismen die Blut-Hirn-Schranke passieren und so ins Gehirn gelangen (11). Ein weiterer Weg ist die durch Zytokine vermittelte Induktion von Intermediärprodukten (z.B. Prostaglandine durch IL-1) an der Blut-Hirn-Schranke, die dann in der Lage sind die Blut-Hirn-Schranke zu passieren und Effekte am Zielort hervorzurufen (53). Darüber hinaus wird angenommen, dass Zytokine der Peripherie afferente Signale indirekt über neuronale Wege ins Gehirn leiten. Das geschieht über die Stimulation sensibler Anteile des *Nervus vagus* über abdominale Paraganglien oder andere abdominelle Fasern in Nachbarschaft Zytokin-produzierender Zellen (58). Auch wenn es Zytokinen kaum möglich ist aus der Peripherie direkt ins Gehirn zu gelangen, so können sie im Gehirn selbst produziert werden und spielen dort eine wichtige immunregulatorische, physiologische und neuromodulatorische Rolle. Zusammengefasst gibt es eine bidirektionale Kommunikation zwischen dem Gehirn und dem Immunsystem, die initial entweder durch Stimuli des Immunsystems oder durch Stimuli des Gehirns (psychologische) induziert werden kann.

An dieser Stelle stellt sich die Frage, welchen Einfluss Immunstimuli auf ZNS-Zytokine und zentrale monaminerge Neurotransmitter haben und welche Rolle Veränderungen dieser zentralen Moleküle für eine periphere Entzündung spielen. Allerdings gibt es nur sehr wenige Studien, die zentrale Immunmediatoren und Neurotransmitter während chronischer Krankheiten untersucht haben. Es konnte gezeigt werden, dass nach kurzfristiger peripherer Immunstimulation nicht nur zentrale neuronale Strukturen stimuliert, sondern auch Zytokine in verschiedenen Hirnregionen verstärkt exprimiert werden (156). Eine ganze Reihe dieser so genannten „*brain-borne*“ Zytokine, darunter IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF werden in geringen Mengen konstitutiv im Gehirn exprimiert und Nervenzellen exprimieren sowohl unter normalen Bedingungen als auch nach Stimulation

Rezeptoren oder die mRNA für viele dieser Zytokine (22). Dabei sind Astrozyten, Mikrogliazellen und bestimmte Neuronen in der Lage Zytokine zu produzieren (22). Es wurde gezeigt, dass eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) in geringen Dosen, die die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können, zu einem starken Anstieg der Expression von IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF im Gehirn (Abb. 1.3) führt (186). Dabei werden IL-1 β und IL-6 vornehmlich im Hippocampus und Hypothalamus exprimiert, während TNF hauptsächlich im Thalamus und Striatum vermehrt exprimiert wird. Andere Studien beschrieben eine verstärkte Synthese von IL-1 β , IL-6 und TNF nach peripherer LPS-Gabe in der Hypophyse (191;248). Die periphere Gabe von IL-1 β führt ebenfalls zu einer verstärkten IL-1 β Synthese im Gehirn, wohingegen peripher verabreichtes IL-6 zu einem Anstieg der IL-6 Rezeptorexpression im PVN des Hypothalamus führt (23). Des Weiteren kann die Produktion von „brain-borne“ Zytokinen wie IL-1 β durch akuten Stress (157) oder bei chronischem Schmerz (4) induziert werden. In einem Modell der Langzeitpotenzierung (*long-term potentiation*, LTP) konnte gezeigt werden, dass die Produktion von Zytokinen im Gehirn unter monaminergem Kontrolle steht. Die LTP erfolgt durch kurzfristige elektrische Stimulation präsynaptischer Nervenfasern, die in einer anhaltenden Verstärkung der synaptischen Übertragung und der postsynaptischen neuronalen Aktivität resultiert (22). So konnte gezeigt werden, dass die Induktion von LTP im Hippocampus zu einer verstärkten Genexpression von sowohl IL-1 β (201) als auch IL-6 (9) führt.

Die Effekte von Zytokinen im Gehirn sind sehr vielseitig, da sie eine entscheidende Rolle bei der Integration der peripheren und neurosensorischen Signale spielen (22). Es ist bekannt, dass Zytokine verschiedene Gehirnfunktionen wie die Thermoregulation, die Nahrungsaufnahme und die Regulation des Schlafes beeinflussen und zur Gedächtnisbildung beitragen (22;50;266). ZNS-Zytokine können die Aktivität und Funktion vieler Neuronen im Gehirn beeinflussen. So vermitteln „brain-borne“ Zytokine sowohl die Freisetzung von CRH aus dem Hypothalamus (19;248) als auch die Freisetzung von ACTH aus der Hypophyse (20;248). Außerdem wurde der Einfluss von IL-1 β auf noradrenerge Neuronen nachgewiesen. Demnach reduziert IL-1 β den Noradrenalin-Gehalt in den Neuronen, steigert aber den Noradrenalin-Metabolismus im Hypothalamus, Hippocampus, Stammhirn und Rückenmark (120). Die Aktivierung katecholaminerger

Fasern im Rückenmark durch IL-1 β im Gehirn zeigt die Übermittlung zentraler Effekte dieses Zytokins zum peripheren autonomen Nervensystem. Des Weiteren können IL-1 β oder IL-6 auch serotoninerge Neuronen stimulieren und erhöhen die Freisetzung und die Metabolisierung von Serotonin im PVN (71;255). Zudem wurde gezeigt, dass die Modulation zentraler Zytokine periphere Immunreaktionen verändern kann. Beispielsweise führt die Induktion von zentralem IL-1 β zu einer Hemmung der NK-Zellaktivität in der Milz und der Mitogen-induzierten Lymphozytenproliferation und IL-2-Sekretion (234).

Neben der Induktion von ZNS-Zytokinen durch periphere Immunstimuli oder akute Stressexposition werden auch Veränderungen zentraler Neurotransmitter beobachtet. Beispielsweise kommt es nach Stressexposition zu einer Verminderung des Serotonins im präfrontalen Cortex und im Hypothalamus, während die Umsatzrate von Serotonin in diesen Arealen verstärkt ist (182). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass eine intraperitoneale Injektion von LPS bei Mäusen zu einer Aktivierung der dopaminergen, noradrenergen und serotonergen Systeme in verschiedenen Hirnarealen (Hypothalamus, präfrontaler Cortex, Hirnstamm, parietaler Cortex) führt (66). Dieselbe Studie zeigte außerdem eine Aktivierung noradrenerger und serotonerger Neuronen in den oben genannten ZNS-Regionen nach IL-1 β -Gabe. Weiterhin wurde beschrieben, dass eine zentrale Gabe von CRH einen Anstieg von Noradrenalin, Dopamin und 5-Hydroxyindolessigsäure (5-HIAA, Hauptmetabolit des Serotonins) im Hypothalamus hervorruft (211). CRH spielt eine wichtige Rolle bei der Aktivierung zentraler sympathischer und serotonerger Systeme, denn CRH ist in der Lage sowohl den *Locus coeruleus* als auch den dorsalen Raphekern (DRN, *dorsal raphe nucleus*), der Hauptort serotonerger Neuronen im Gehirn (Abb. 1.3), zu aktivieren (85;143). Zwischen den CRH-Neuronen und dem LC-Noradrenalin-System bestehen reziproke Verbindungen in beide Richtungen, wobei sich CRH und Noradrenalin gegenseitig stimulieren (246).

Nicht nur die Modulation zentraler Zytokine sondern auch die Modulation zentraler Neurotransmitter kann die periphere Immunreaktion beeinflussen. So hemmt z.B. die selektive Depletion zentraler noradrenerger Neuronen die spezifische Immunantwort in der Peripherie (45).

Zusammengefasst gibt es eine bidirektionale Kommunikation zwischen dem Gehirn und dem Immunsystem. Viele Studien haben gezeigt, dass eine periphere Immunstimulation zu

Veränderungen zentraler Zytokine und Neurotransmitter führt und diese Veränderungen wiederum die periphere Immunreaktion beeinflussen. Jedoch wurden in fast allen Studien akute immunstimulatorische Bedingungen untersucht, und es liegen bisher keine Berichte vor, die eine Beteiligung des ZNS an den Sollwertverschiebungen bei RA beschreiben.

1.5 Fragestellungen

1.5.1 Psychosozialer Stress

Studien der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass psychosozialer Stress das neuroendokrine System und das Immunsystem beeinflusst und demzufolge auch den Ausbruch und den Verlauf verschiedener inflammatorischer Erkrankungen wie RA modulieren kann. Aus bisherigen Befunden geht hervor, dass akuter psychosozialer Stress einen negativen Einfluss auf den Verlauf der Arthritis hat. Im Gegensatz dazu gibt es nur wenige Studien, die den Einfluss von chronischem sozialem Stress auf den Arthritisverlauf untersucht haben und zudem führten diese Untersuchungen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen. Auch konnte ein Zusammenhang zwischen psychosozialem Stress und dem Beginn der RA bisher nicht hergestellt werden. In diesem ersten Teil der Arbeit wurde daher die Hypothese geprüft, inwiefern psychosozialer Stress (*Resident-Intruder-Konfrontationen*) während der experimentellen Arthritisauslösung mit CII bei männlichen Wistar Ratten die Suszeptibilität und den Krankheitsverlauf beeinflusst. Im Besonderen wurden die stressbedingten endokrinen und immunologischen Veränderungen und deren Bedeutung für den Verlauf der Arthritis untersucht. Die Ergebnisse sollen demonstrieren, inwieweit psychosozialer Stress die Aktivität der HHN-Achse beeinflusst und welche Veränderungen des Immunsystems damit einhergehen.

1.5.2 Zentrale Zytokine und Monamine

Oben wurde bereits erläutert, wie kurzfristige periphere Entzündungsreaktionen Zytokine im ZNS induzieren und wie diese Entzündungsmediatoren Veränderungen der monaminergen Neurotransmittersysteme, der HHN-Achse und des SNS verursachen. Im

Gegensatz dazu gibt es nur sehr wenige Studien, die zentrale Moleküle während chronischer inflammatorischer Krankheiten untersucht haben. Im Verlauf einer Arthritis beobachtet man einen Funktionsverlust der HHN-Achse und des SNS, der wahrscheinlich zur Chronifizierung der Arthritis beiträgt. Jedoch liegen bisher keine Berichte vor, die eine Beteiligung zentraler Zytokine und Monamine an diesen Sollwertverschiebungen bei RA beschreiben. Daher wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Hypothese geprüft, inwieweit ZNS-Zytokine und monaminerge Neurotransmitter für die Suszeptibilität und den chronifizierenden Verlauf einer CII induzierten Arthritis bei weiblichen *Dark Agouti* Ratten (DA Ratten) relevant und demzufolge pathophysiologisch wichtig für die o.g. Sollwertverschiebungen bei Arthritis sind. Dazu wurden die Expression von ZNS-Zytokinen und die Aktivität monaminerger Neurone auf diversen ZNS-Niveaus in der Induktionsphase und im Verlauf einer Modellarthritis charakterisiert. Des Weiteren wurde der Verlauf der Arthritis nach gezielter intracerebroventriculärer (i.c.v.) Modulation von monaminergen Neurotransmitter-Systemen charakterisiert. Die Ergebnisse sollen demonstrieren, ob eine veränderte Expression von ZNS-Zytokinen und –Katecholaminen im Verlauf der Krankheit mit Veränderungen der HHN-Achse und des SNS assoziiert sind, und ob diese zentralen Moleküle zur Chronifizierung der Arthritis beitragen.

1.5.3 Nebenniere

Im Verlauf der RA kommt es zum Funktionsverlust der HHN-Achse, der durch eine inadäquate Produktion von ACTH und Cortisol in Relation zum Schweregrad der Entzündung charakterisiert ist. Die Gründe für die Nebenniereninsuffizienz bei Arthritis sind weitestgehend unbekannt. Deshalb war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Mechanismen, die für die adrenale Insuffizienz verantwortlich sind, zu charakterisieren. Die Vermutung war, dass möglicherweise sowohl eine Störung der Cholesterin-Speicherung in der Nebenniere als auch eine Störung der Cholesterin-Aufnahme in adrenokortikale Zellen dafür verantwortlich sind, dass die Nebenniere keine adäquaten Mengen an Corticosteron produzieren kann. Cholesterin ist der Vorläufer der Steroidhormone und wird als Cholesterylester (CE) an *high density lipoprotein* (HDL) gebunden. Der Scavenger Rezeptor vom Typ BI (SR-BI) ist ein Rezeptor für HDL, der die zelluläre Aufnahme von

CE in adrenokortikale Zellen vermittelt. Diese selektive CE-Aufnahme ist die Hauptquelle für Cholesterin der Steroidogenese in adrenokortikalen Zellen (42). Daher wurde die Hypothese geprüft, inwiefern die inadäquate Produktion von Corticosteron im Verlauf der CII induzierten Arthritis sowohl mit Veränderungen der Cholesterin-Speicherung in der Nebennierenrinde als auch mit Veränderungen der Expression des SR-BI auf adrenokortikalen Zellen assoziiert ist.

2 Material

2.1 Materialien

2.1.1 Verbrauchsartikel

Artikel	Firma
S Monovette (das Original)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Einmal Insulinspritze, 1 ml	Becton Dickinson AG (Basel, Schweiz)
Einmalskalpelle Nr. 20	Feather (Japan)
Einmalspritzen steril, 2/5/10/20 ml	Becton Dickinson S.A. (Fraga, Spanien)
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Eppendorf AG (Hamburg)
Falconröhrchen 15/50 ml	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Fettstift (DakoCytomation Pen)	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
Hamiltonspritze 10 µl, 1 ml	Hamilton (Bonaduz, Schweiz)
Sterican® Kanülen (0.4x19, 0.6x30, 0.9x40)	BD (Heidelberg)
Michelklammern, Nr. BN 507	Aesculap (Tuttlingen)
Ohrmarken und Zange (73855)	Hauptner (Solingen)
Omnifix® Tuberkulinspritzen, 1 ml	Braun (Melsungen)
Petrischalen, 60x15	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Pipetten (Glas) 5/10/25/50 ml	Corning Incorporated (Corning, USA)
Polystyrenröhrchen 5 ml (FACS-Röhrchen)	Sarstedt (Nürnbrecht)
Präparationsbesteck	Aesculap (Tuttlingen)
Sterilfilter, Cell Strainer	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
SuperFrost Plus Objektträger	Menzelgläser (Braunschweig)
96-Well-Platten	Nunc™ (Dänemark)

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien und Lösungsmittel

Artikel	Firma
5,7-DHT (5,7-Dihydroxytryptamin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
6-OHDA (2,4,5-Trihydroxypenethylamin)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
AmpliTaqGold	PE Applied Biosystems (Langen)
<i>Aqueous Mounting Medium</i>	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
BCIP/NBT Substrat System	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
Concanavalin A (Typ IV)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Desipramin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
DnaseI	Epicentre technologies Inc. (Omaha, NE, USA)
Entellan	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA)
EDTA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Erythrozyten-Lysispuffer	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Ethanol 96%	Merk (Darmstadt)
FACS-Puffer	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
FACS-Lysepuffer	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
<i>Fluorescent Mounting Medium</i>	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
inkomplettes Freund-Adjuvans	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Iso-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Kollagen Typ II (bovin, 2 mg/ml in 0,5M Essigsäure)	Chondrex (Seattle, WA, USA)
Levamisole	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
NaCl-Lösung, steril (0,9%)	Braun (Melsungen)
oligop(dT) 12-18 Primer	Amersham Biosciences (Freiburg)
Perchlorsäure	Merck (Darmstadt)
RDO (Dekalzifizier-Lösung)	Medite GmbH (Burgdorf)

Artikel	Firma
reverse Transkriptase	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
ROX (Referenzfarbstoff)	TIB MOLBIOL (Berlin)
TissueTek	Sakura Finetek Europe B.V. Zoeterwoude (Niederlande)
Trasylol	Bayer Corp. AG (Leverkusen)
TRIzol Reagens	Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Uracil-DNA-Glycosylase	New England Biolabs (Frankfurt)
wässrige Hämalaun-Lösung	Sigma-Diagnostics (Baltimore, MD, USA)
wässrige Eosin-Lösung	Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA)
Xylol	Merk (Darmstadt)
10x Y+/Tango Puffer	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

2.1.3 Anästhetika

Artikel	Firma
Anexate (Flumazenil)	Inresa Arzneimittel GmbH (Freiburg)
Antisedan (Atipamezol)	Orion Pharma (Espoo, Finnland)
Domitor (Medetomidin)	Orion Pharma (Espoo, Finnland)
Dormicum (Midazolam)	Ratiopharm GmbH (Ulm)
Fentanyl (Fentanyl25)	Delta Select (Dreieich)
Isofluran	Baxter (Unterschleißheim)
Narcanti (Naloxon)	Inresa Arzneimittel GmbH (Freiburg)

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Firma
Alexa Fluor 546, goat anti-mouse IgG	Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA)
Alexa Fluor 546, goat anti-rabbit IgG	Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA)
Alexa Fluor 546, rabbit anti-goat IgG	Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR, USA)
AP-konjugierte goat ant-rabbit IgG (D0487)	DakoCytomation (Glostrup, Dänemark)
FITC-konjugierter mouse anti-rat CD4 (OX-38)	PharMingen (Hamburg)
FITC-konjugierter mouse anti-rat CD8 (OX-8)	PharMingen (Hamburg)
FITC-konjugierter mouse anti-rat CD45RA (OX-33)	PharMingen (Hamburg)
FITC-konjugierter mouse anti-rat CD161a (10/78)	PharMingen (Hamburg)
FITC-konjugierter mouse anti-rat-CD172a (ED9)	Serotec (Kidlington, England)
goat anti-Substanz P (sc-9758)	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)
mouse anti-rat-Monozyten/Makrophagen (MAB 1435)	Chemicon International, Inc. (Temecula, CA, USA)
PE-konjugierter mouse anti-rat CD3 (G4.18)	PharMingen (Hamburg)
PE-konjugierter mouse anti-rat CD45 (OX-1)	PharMingen (Hamburg)
rabbit anti-SR-BI (NB 400-101)	Novus Biologicals, Inc. (Littleton, CO, USA)
rabbit anti-Tyrosin Hydroxylase (AB152)	Chemicon International, Inc. (Temecula, CA, USA)

2.1.5 Lösungen, Medien und Puffer

DEPC-Wasser

2 ml	DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
2 l	H ₂ O bidest.	
	autoklavieren	

MATERIAL

DEPC-PBS

5	PBS-Tabletten (<i>phosphat buffered saline</i>)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
1 l	DEPC-Wasser	
pH 7,4		

3,7% Formaldehyd

100 ml	37% Formaldehyd	Merck (Darmstadt)
ad 1 l	DEPC-PBS	

20% Saccharose-Lösung

5 g	Saccharose	Merck (Darmstadt)
25 ml	DEPC-PBS	

PBS

5	PBS-Tabletten	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
1 l	H ₂ O bidest.	

PBS und Triton (0,3%)

3 ml	Triton X-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
1 l	PBS	

10x BSA

5 g	bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
ad 50 ml	PBS und Triton (0,3%)	

Blocklösung

1 ml	Ziegenerum	DakoCytomatin GmbH (Hamburg)
1 ml	fötales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
8 ml	10x BSA	

Antikörperpuffer

90%	1x BSA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
10%	Ziegenerum	DakoCytomatin GmbH (Hamburg)

RPMI Medium

500 ml	RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
50 ml	FCS	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
5 ml	Penicilin/Streptavidin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
2 ml	Ciprofloxacin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

MATERIAL

Sudan III Lösung

0,6 g	Sudan III Pulver	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
200 ml	70% Alkohol	
	aufkochen und filtrieren	

TBS

100 ml	H ₂ O bidest.	
12,2 g	Trishydroxymethylaminomethan	Merck (Darmstadt)
17,6 g	NaCl	Merck (Darmstadt)
74 ml	1n HCl	Merck (Darmstadt)
ad 2 l	H ₂ O bidest.	
	auf pH 7,6 einstellen	

Eluent A

Lösung A:		
9,79 g	Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
ad 1100 ml	H ₂ O bidest.	
Lösung B		
10,5 g	Zitronensäure	Merck (Darmstadt)
ad 1000 ml	H ₂ O bidest.	
	Lösung B zu A geben (pH 3,9)	
1800 ml	Lösung AB (pH 3,9)	
0,45 g	Octyl-Sulfat	Merck (Darmstadt)
0,075 g	EDTA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
	filtrieren	
10%	Acetonitril	Merck (Darmstadt)
	10 min entgasen	

2x PCR Puffer

100 mM	KCl	Merck (Darmstadt)
20 mM	Tris HCl pH 8,3	Merck (Darmstadt)
0,02 mM	EDTA	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
0,1%	Gelatine	
0,02%	Tween 20	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)

2.1.6 Kits und Assays

Assay	Firma
CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega (Madison, WI, USA)
Corticosteron ¹²⁵ I RIA Kit	MP Biomedicals (Eschwege)
KatCombi ¹²⁵ I RIA Kit	IBL (Hamburg)
LincoPlex Kit	LINCO Research (St. Charles, MO, USA)
RNeasy Mini Kit	Quiagen GmbH (Hilden)

2.1.7 Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank (T.10A)	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Dekapitationsapparatur	Werkstatt der Universität Regensburg
Homogenisator (Bayreuth: Ultra-Turrax®)	Janke & Kunkel KG (Staufen)
Homogenisator (Regensburg: IKA® Ultra-Turrax)	Medita (Hof)
Fluoreszenzmikroskop (Leitz DMRBE)	Leica Microsystems Nussloch GmbH (Nussloch)
Kryostat (CM 3050 S)	Leica Microsystems Nussloch GmbH (Nussloch)
Luminex 100 IS System	Luminex Corp. (Austin, TX, USA)
MX 3000P Detektionssystem	Stratagene (Heidelberg)
Pipetten, 10/100/200/1000 µl	Eppendorf AG (Hamburg)
Pipetboy, 30-300 µl (Transferpette®-8)	Brand (Wertheim)
Plattenlesegerät (ELISA-Reader, Emax)	Molecular Devices (Ismaning)
Haarschneider (Typ 1556)	Moser Elektrogeräte GmbH (Unterkirnach)
Stereotaxie-Apparatur	Stoelting (Dublin, Irland)
Sterilbank (Lamina Flow Einheit)	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
Feinwaage (Modell CP64, 1 mg genau)	Sartorius AG (Göttingen)

Gerät	Firma
Feinwaage (Analytic AC 210 S)	Waagetchnik Dümberger (Köfering)
Waage (1 g genau)	Sartorius AG (Göttingen)
Wasserbad (JULABO SW-20C)	JULABO Labortechnik GmbH (Sellbach)
Zahnbohrer (Modell 300)	Dremel (Konijnenberg, Mexico)
Tiefkühlzentrifuge (Megafuge 1.0R)	Heraeus Instruments GmbH (Hanau)
<u>HPLC-System:</u>	
Autosampler (AS-2000A)	Merck-Hitachi (Darmstadt)
Fluoreszenz-Detektor (DECADE)	Antec Leyden BV (Zoeterwoude, Niederlande)
Kolbenpumpe (P580)	Gynkotek
“reversed-phase” Säule (supelcosil™ LC-18)	Supelco (Bellefonte, PA, USA)

2.2 Tiere

Teilexperiment Psychosozialer Stress

Für diesen ersten Teil der Arbeit wurden männliche Wistar Ratten aus der Zucht des Lehrstuhles Tierphysiologie der Universität Bayreuth verwendet. Die Gründertiere dieser Zucht wurden 2006 von der Firma Raison sociale: Centre d'Elevage R.JANIVIER, (Le Genest St Isle, Frankreich) erworben. Die Wistar Ratten wurden 21 Tage ($\pm$ 2 Tage) nach der Geburt von der Mutter abgesetzt und paarweise in einer Bruder-Schwester Verpaarung in Standardkäfigen (Makrolon Typ III) unter Standard-Laborbedingungen (Temperatur 22 ± 2 °C; Luftfeuchtigkeit 50-60%; Licht-/Dunkelzyklus 12:12 Stunden) gehalten. Sie hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Die Versuchstiere wurden zur Eingewöhnung mindestens 2 Wochen vor Versuchsbeginn in den Versuchsraum gebracht und waren zu Beginn des Versuches zwischen 129 und 148 Tage alt.

Des Weiteren wurden adulte Long Evans Ratten aus der Zucht des Lehrstuhles Tierphysiologie der Universität Bayreuth verwendet. Die Gründertiere dieser Zucht wurden 1995 von der Firma Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) erworben. Diese Long Evans Ratten wurden aufgrund ihrer Aggressivität gegenüber fremden Artgenossen als *Residents* in den *Resident-Intruder*-Konfrontationen eingesetzt. Sie wurden in

Männchen-Weibchen-Paaren in einem speziell für die Konfrontationsexperimente konzipierten separaten Versuchsraum mit 0,5 m² großen Bodenboxen gehalten. Alle sonstigen Haltungsbedingungen entsprachen denen der o.g. Standardhaltung.

Die Tierversuche mit Wistar Ratten und Long Evans Ratten wurden in Bayreuth durchgeführt und wurden gemäß der Richtlinien für tierexperimentelle Forschung von der Regierung von Mittelfranken genehmigt.

Teilexperiment Zentrale Zytokine und Monamine

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden weibliche DA Ratten im Alter von 8-10 Wochen und einem Gewicht von 150-200 g von Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Diese Ratten wurden zur Eingewöhnung für mindestens 1 Woche vor Versuchsbeginn in Gruppen zu 5 Tieren in Standardkäfigen (Makrolon Typ IV) unter Standard-Laborbedingungen (Temperatur 22 ± 2 °C; Luftfeuchtigkeit 50-60%; Licht-/Dunkelzyklus 12:12 Stunden) gehalten. Sie hatten Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum*. Die Versuche mit DA Ratten wurden in Regensburg durchgeführt und wurden gemäß der Richtlinien für tierexperimentelle Forschung von der Regierung der Oberpfalz genehmigt.

3 Methoden

Der erste Teil dieser Arbeit (Psychosozialer Stress) wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe der Abteilung für Tierphysiologie in Bayreuth (Kerstin Schunke, Doktorandin und Prof. Dr. rer. nat. Volker Stefanski) durchgeführt. Die Arbeiten mit Wistar Ratten (Resident-Intruder-Konfrontationen) und die Bestimmung sowohl des Differentialblutbildes als auch der Lymphozyten-Subpopulationen wurden von Kerstin Schunke in Bayreuth durchgeführt.

Der zweite Teil dieser Arbeit (zentrale Zytokine und Monamine) wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe der Abteilung für Immunophysiologie in Marburg (Dr. rer. nat. Johannes Wildmann, Prof. Dr. phil. Adriana del Rey und Prof. Dr. med. Hugo O. Besedovsky) durchgeführt. Die Bestimmung zentraler Zytokine und Neurotransmitter mittels HPLC bzw. RT-PCR erfolgte durch Johannes Wildmann in Marburg.

3.1 Kollagen Typ II Arthritis Modell

Teilexperiment Psychosozialer Stress

Um eine experimentelle Arthritis auszulösen, wurde männlichen Wistar Ratten eine Suspension aus bovinem CII und IFA ca. 2 cm unterhalb der Schwanzwurzel intradermal in die Schwanzhaut injiziert. Dazu wurden gleiche Volumina von CII und IFA mithilfe eines Homogenisators unter Kühlung mit Eis emulgiert. Um die Denaturierung des Kollagens durch Erwärmung zu vermeiden, wurde die Suspension bis zur Injektion gekühlt aufbewahrt. Die Wistar Ratten wurden vor der Immunisierung nicht narkotisiert, da sie in speziellen Boxen fixiert werden konnten. Am Tag 0 wurde sowohl bei Stresstieren als auch bei nicht gestressten Kontrolltieren eine Arthritis induziert. Kontrolltieren (Stresstiere und nicht gestresste Tiere) wurde anstelle der CII-IFA-Suspension sterile 0,9%ige NaCl-Lösung intradermal unterhalb der Schwanzwurzel injiziert.

Teilexperiment Zentrale Zytokine und Monamine

Die Arthritisauslösung erfolgte bei DA Ratten und bei Wistar Ratten auf die gleiche Weise, mit der Ausnahme, dass die intradermale Immunisierung bei DA Ratten unter Analgosedierung erfolgte. Vor Injektion der Narkotika erfolgte eine Kurzbetäubung mit Isofluran. Anschließend wurden die Ratten unter Verwendung einer gängigen antagonistisierbaren Narkose narkotisiert. Der OP-Cocktail, bestehend aus Domitor (0,15 mg/kg), Dormicum (2 mg/kg) und Fentanyl (5 µg/kg), wurde intramuskulär (i.m.) injiziert. Den narkotisierten Tieren wurden 300 µl der CII-IFA-Suspension ca. 2 cm unterhalb der Schwanzwurzel intradermal in die Schwanzhaut injiziert (Tag 0). Danach wurde der Aufwach-Cocktail bestehend aus Antisedan (0,75 mg/kg), Anexate (0,2 mg/kg) und Narcanti (0,12 mg/kg) subkutan (s.c.) appliziert. Die Aufwachphase der Tiere wurde überwacht. Kontrolltieren wurde entweder eine Suspension aus CII und NaCl-Lösung (0,9%) oder IFA und NaCl-Lösung (0,9%) injiziert. Eine dritte Kontrollgruppe erhielt nur sterile 0,9%ige NaCl-Lösung.

3.1.1 Klinischer Arthritis-Schweregrad

Teilexperiment Psychosozialer Stress

Ab dem Tag 10 nach experimenteller Arthritisauslösung wurden die Wistar Ratten bezüglich ihrer Arthritissymptome beurteilt. Die Pfoten wurden hinsichtlich einer Schwellung, Rötung und Beeinträchtigung der Funktionstüchtigkeit untersucht. Dabei wurde jede Pfote separat beurteilt. 2 Punkte wurden für jede der drei folgenden entzündeten Regionen vergeben: Finger-Zehen-Region, Mittelhand-Mittelfuß-Region und Sprunggelenk-Region. Zwei zusätzliche Punkte wurden vergeben, wenn eine offensichtliche Beeinträchtigung der Funktionsfähigkeit (z.B. Hinken, Nachziehen) einer Extremität vorlag. So wurde insgesamt ein maximaler Arthritis Score von 8 Punkten pro Pfote und 32 Punkten pro Tier vergeben.

Teilexperiment Zentrale Zytokine und Monamine

Die Beurteilung des Arthritis-Schweregrades bei DA Ratten erfolgte auf die gleiche Weise wie bei Wistar Ratten. Jedoch wurden statt zwei Punkten pro Region 1 Punkt vergeben, so dass ein maximaler Arthritis Score von 4 Punkten pro Pfote und 16 Punkten pro Tier vergeben werden konnte.

3.2 Resident-Intruder-Konfrontation

Vor Versuchsbeginn wurden alle residenten Tiere je viermal für 10 min mit unterschiedlichen, fremden Männchen konfrontiert. Dadurch sollte sichergestellt werden, dass sie ein zugesetztes Männchen zuverlässig attackieren. Die *Intruder*-Männchen wurden vor Versuchsbeginn in Stresstiere und Kontrolltiere eingeteilt. Psychosozialer Stress durch kontinuierliche Konfrontation wurde ausgelöst, indem die Stresstiere (männliche Wistar Ratten = *Intruder*) für 7 Tage in die Bodenboxen zu fremden Long Evans Ratten (Männchen und ihren Weibchen, *Residents*) gesetzt wurden. Die nicht gestressten Kontrolltiere verblieben ungestört im Haltungsraum in ihren Heimkäfigen. Während der Konfrontationszeit wurde der Raum nur zur täglichen Kontrolle (Futter, Wasser, Verletzungen) betreten. Um die Unterlegenheit des *Intruders* gegenüber dem *Resident* zu dokumentieren, wurde das Verhalten der Tiere mithilfe von Infrarotkameras (Scan Vision VS 450 mit 1.4/6 mm Objektiv) aufgezeichnet. Am Tag 4 der Konfrontation wurde sowohl bei Stresstieren als auch bei nicht gestressten Kontrolltieren eine Arthritis induziert (Tag 0).

3.3 Depletion monaminерger Neuronen im Gehirn

Depletion noradrenerger Neuronen im Gehirn

In diesen Denervierungsexperimenten wurden alle Tiere (weibliche DA Ratten) am Tag 0 mit CII in IFA immunisiert (3.1). Die Depletion zentraler Katecholamine wurde an drei verschiedenen Zeitpunkten, 14 Tage vor Arthritisinduktion oder am Tag 18 bzw. 25 nach Immunisierung mit CII mittels stereotaktischer Injektion von 100 µg 6-Hydroxydopamin

(6-OHDA) in 10 µl Iso-Ascorbinsäure-Lösung (2 mg/ml Iso-Ascorbinsäure in steriler NaCl-Lösung (0,9%)) in die lateralen Ventrikel (i.c.v.) durchgeführt. Dazu wurden die Ratten nach oben beschriebener Methode narkotisiert und auf dem Kopf zwischen den Ohren rasiert. Auf die Augen wurde als Schutz vor Austrocknung Bepanthen-Salbe (Roche, Grenzach-Wyhlen) aufgetragen. Um nicht auszukühlen lagen die Ratten während des Eingriffes auf einer Wärmematte. Der Schädel der narkotisierten Versuchstiere wurde in einem stereotaktischen Apparat fixiert (Abb. 3.1). Für die Mikroinjektion in die lateralen Ventrikel wurden mithilfe eines stereotaktischen Atlanten (184) die dreidimensionalen Koordinaten des Zielgebietes bestimmt, die sich auf einen Referenzpunkt am Schädel (Bregma) beziehen. Folgende stereotaktische Koordinaten bezogen auf das Bregma wurden für die intrazerebroventrikuläre Mikroinjektion bestimmt: rostral-kaudal 0 mm; medial-lateral + 1,5 mm nach lateral links und dorsal-ventral – 4,0 mm nach ventral. Nun wurde das Bregma freigelegt und mit einem Zahnbohrer ein 1 mm großes Loch über dem Zielgebiet in die Schädelkalotte gebohrt. Anschließend wurde die Kanüle der Spritze, entsprechend den vorher bestimmten Koordinaten, präzise in das Gehirn abgesenkt. Nachdem sich die Kanüle am Zielort befand, wurde die 6-OHDA-Lösung langsam (innerhalb von 5 min) intrazerebroventrikulär injiziert. Nach dem Eingriff wurde die Wunde mit Metallklammern verschlossen und die Tiere wurden mit dem Aufwachcocktail (3.1) aufgeweckt. Kontrolltieren wurden 10 µl Iso-Ascorbinsäure-Lösung i.c.v. appliziert.

Depletion serotoninerger Neuronen im Gehirn

In diesen Denervierungsexperimenten wurden alle Tiere (weibliche DA Ratten) am Tag 0 mit CII in IFA immunisiert (3.1). Die Depletion zentraler serotoninerger Neuronen wurde 14 Tage vor Arthritisinduktion mittels stereotaktischer Injektion von 150 µg 5,7-Dihydroxytryptamin (5,7-DHT) in 10 µl Iso-Ascorbinsäure-Lösung (2 mg/ml Iso-Ascorbinsäure in steriler NaCl-Lösung (0,9%)) in die lateralen Ventrikel (i.c.v.) durchgeführt. Um eine katecholaminerge Neurotoxizität durch 5,7-DHT zu verhindern, wurde den Ratten 30 min vor der 5,7-DHT-Injektion (i.c.v.) Desipramin (25 mg/kg in steriler 0,95iger NaCl-Lösung) intraperitoneal verabreicht. Die Methode der stereotaktischen Operation (Abb. 3.1) wurde oben bereits beschrieben. Kontrolltieren wurden 10 µl Iso-Ascorbinsäure-Lösung i.c.v. appliziert.

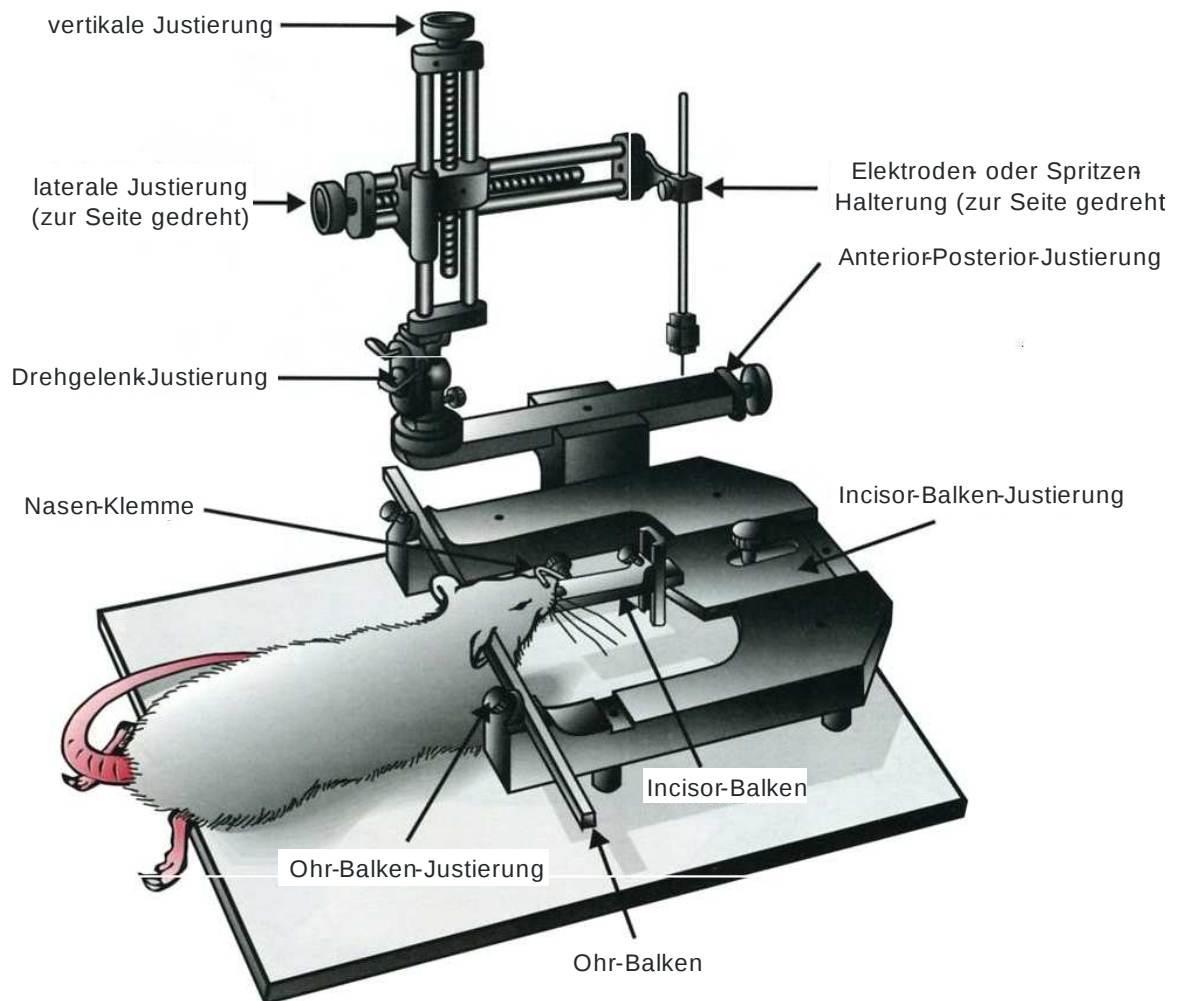


Abb. 3.1: Skizze einer narkotisierten Ratte fixiert in stereotaktischer Apparatur. (modifiziert, aus (134))

3.4 Blut- und Organentnahmen

3.4.1 Blut

Teilexperiment Psychosozialer Stress

Zu verschiedenen Zeitpunkten (basal vor der Stressexposition und an den Tagen 0, 4, 7 und 14 nach Arthritisinduktion) wurde den Wistar Ratten Blut aus der Schwanzvene entnommen. Die Blutabnahmen wurden alle zur gleichen Tageszeit zwischen 8 und 10 Uhr durchgeführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine Dauer von maximal 3 min nicht überschritten wurde, da sonst die Ausschüttung von Stresshormonen die Werte verfälschen würde. Das Blut für die Bestimmung der Glucocorticoide wurde in EDTA-gefüllten

Probenröhrchen gesammelt, zentrifugiert (10 min, 3000 U/min, 4°C) und anschließend bis zur Bestimmung von Corticosteron bei -80°C gelagert. Für die Bestimmung des Blutbildes (Differentialblutbild, Lymphozytensubpopulationen) wurde das Blut in ein Reaktionsgefäß mit einer 7 µl EDTA-Lösung (50mg/ml) aufgenommen.

Teilexperiment Zentrale Zytokine und Monamine

An verschiedenen Tagen (0, 5, 14, 28, 41 und 55) wurden die DA Ratten innerhalb eines Zeitfensters von 3 min (siehe oben) durch Dekapitierung getötet und Rumpfblood entnommen. Dieses wurde in EDTA-benetzten Probenröhrchen, die zur Hemmung der Enzymaktivität zusätzlich 10 µl Trasylol enthielten, gesammelt. Bis zur Zentrifugation (10 min, 3000 U/min, 4°C) wurde das Blut auf Eis aufbewahrt. Nach der Zentrifugation wurde das Plasma abpipettiert und bis zur Bestimmung von Adrenalin, Noradrenalin und Corticosteron bei -80°C gelagert.

3.4.2 Organe

Teilexperiment Psychosozialer Stress

Vor der Stressexposition und an den Tagen 0, 4, 7 und 14 nach Arthritisinduktion bzw. am Tag 4 der symptomatischen Phase wurden sowohl gestresste als auch nicht gestresste Wistar Ratten in einer CO₂-gesättigten Atmosphäre getötet und Nebennieren, Lymphknoten und Schwanzhaut des Immunisierungsgebietes (Kollagen-Injektions-Region) entnommen. Die Nebennieren, Lymphknoten und die Schwanzhaut wurden 3 Tage in 3,7% Formaldehyd fixiert und anschließend in PBS gewaschen und über Nacht in 20% Saccharose-Lösung gegeben. Danach wurden diese Organe in TissueTek eingefroren und bis zur histologischen Untersuchung bei -80°C aufbewahrt.

Teilexperiment Zentrale Zytokine und Monamine

Am jeweiligen Tötungstag (0, 5, 14, 28, 41 oder 55) wurden von jedem Tier Pfoten, Nebennieren, die drainierenden Lymphknoten und das Gehirn entnommen.

Die Pfoten wurden für einige Tage in 3,7% Formaldehyd fixiert und anschließend in PBS gewaschen und für 5 Tage in RDO (Dekalzifizier-Lösung) gegeben. Anschließend wurden

die Pfoten wiederum in PBS gewaschen und über Nacht in 20% Saccharose-Lösung gegeben. Formaldehyd- und Saccharose-Lösung wurden mit DEPC-Wasser hergestellt, um RNAsen zu zerstören. Dann wurden die Pfoten in TissueTek eingefroren und bis zur histologischen Untersuchung bei -80°C aufbewahrt.

Die Nebennieren und die linken drainierenden Lymphknoten wurden 3 Tage in 3,7% Formaldehyd fixiert und anschließend in PBS gewaschen und über Nacht in 20% Saccharose-Lösung gegeben. Danach wurden auch diese Organe in TissueTek eingefroren und bis zur histologischen Untersuchung bei -80°C aufbewahrt.

Die rechten drainierenden Lymphknoten wurden nach der Entfernung in RPMI Medium gegeben. Dann wurden die Lymphknoten unter der Sterilbank mechanisch zerkleinert und durch Sterilfilter in Falconröhrchen gedrückt. Zu der Zellsuspension wurden 10 ml RPMI Medium gegeben und die Zellen resuspendiert. Dann wurde die Zellsuspension zentrifugiert (6 min, 1600 U/min, 4°C), der Überstand verworfen und erneut mit 10 ml RPMI Medium aufgefüllt und die Zellen resuspendiert und anschließend gezählt. Jeweils 100 µl der errechneten Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml) wurden in 96-Well-Platten pipettiert. Dazu wurden überall 100 µl Medium pipettiert. Die 96-Well-Platten wurden 48 h im Brutschrank (37°C) inkubiert. Nach zwei Tagen wurden die Platten zentrifugiert und 100 µl der Überstände in neue 96-Well-Platten pipettiert, die bis zur Zytokinbestimmung bei -20°C aufbewahrt wurden. In den verbliebenen Wells der 96-Well-Platten wurde die Zellproliferation bestimmt.

Nach der Entnahme des Gehirns wurde dieses in eine dafür vorgesehene Gehirnform gelegt und mit Rasierklingen quer in drei Teile durchtrennt. Dann wurden die folgenden Gehirnregionen entnommen: Bulbus olfactori, Cerebellum, Mesencephalon, Pons, Medulla oblongata, Hypothalamus, Thalamus, Hippocampus, präfrontaler Cortex und Lobus temporalis. Die Gehirnregionen wurden in linke und rechte Hälften getrennt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Zytokin- und Monaminbestimmung bei -80°C gelagert.

3.5 Bestimmung der Zellproliferation

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurden kommerziell erhältliche kolorimetrische Zellproliferationsassays verwendet. Bei diesen 1-Schritt-Assays wurden die beiden Reagenzien MTS (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) und PMS (Phenazin Methosulfat) gemischt und die so entstehende stabile wässrige Lösung auf die Zellkultur gegeben und 4 Stunden inkubiert. Durch Dehydrogenasen metabolisch aktiver Zellen wurden die gelben MTS Tetrazoliumsalze zu Formazan (blau bis schwarz) reduziert. PMS fungierte dabei als Elektronen-bindendes Reagenz. Mit dem *ELISA-Reader* wurde die optische Dichte bei 490 nm bestimmt. Die so gemessene Absorption entspricht der Menge des gebildeten löslichen Formazanproduktes und ist dadurch direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur.

3.6 Corticosteron-, Adrenalin- und Noradrenalin-Radioimmunoassays

Die im Blutplasma vorhandenen Konzentrationen an Corticosteron, Adrenalin und Noradrenalin wurden anhand von kommerziell erhältlichen Radioimmunoassays (RIA) bestimmt. Zur Messung der Corticosteron-Konzentrationen im Plasma wurde ein RIA mit einer Detektionsgrenze von 7,7 ng/ml verwendet. Zum Nachweis von Adrenalin und Noradrenalin wurde ein hochsensitiver KatCombi-RIA mit einer Detektionsgrenze von 8 pg/ml für Adrenalin bzw. 24 pg/ml für Noradrenalin verwendet.

3.7 Zytokinbestimmung in Lymphknoten-Zell-Überständen

In den Zellüberständen drainierender Lymphknoten wurden mithilfe des Luminex 100 IS Systems die Konzentrationen der Zytokine IL-6, IL-1 β , IL-10, TNF und IFN- γ bestimmt. Dafür wurden Multiplex Assay Kits (LincoPlex) verwendet.

3.8 Neurochemische Analyse der Neurotransmitter und ihrer Metaboliten in verschiedenen Hirnarealen

Die Konzentrationen von Noradrenalin, Serotonin, Dopamin und ihrer Metaboliten in verschiedenen Hirnarealen (Pons, Medulla oblongata, Hypothalamus) wurden mittels *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) bestimmt. Dazu wurden die in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Gehirnareale gewogen, 1:20 mit Perchlorsäure verdünnt und zentrifugiert. 20 µl der Überstände (= 1 mg Probenmaterial) wurden in das HPLC-System appliziert. Das HPLC-System bestand aus einer dualen Kolbenpumpe (Modell P580), einem Autosampler (Modell AS-2000A) und einer „reversed-phase“ Säule (Modell Supelcosil™ LC-18; Länge und innerer Durchmesser 150 x 4,6 mm; Partikelgröße 5 µm), die als stationäre Phase diente und durch einen Säulenofen konstant bei 32°C gehalten wurde. Außerdem wurde ein hoch sensibler Fluoreszenz-Detektor (Modell DECADE, Exzitation 270 nm, Emission 310 nm) verwendet. Die mobile Phase (Eluent A 2.1.5) bestand aus 0,1 M Na₂HPO₄; 0,08 mM EDTA; 0,015 mM n-Octyl-Sulfat und 7,5% Acetonitril und die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Die folgenden Substanzen wurden quantifiziert: Noradrenalin (Retentionszeit 7,97 min), 3-Methoxy-4-Hydroxy-Phenyl Ethylene-Glycol (MHPG, Retentionszeit 10,05 min), Dopamin (Retentionszeit 9,33 min), Serotonin (Retentionszeit 20,77 min) und 5-HIAA (Retentionszeit 41,61 min). Für die Quantifizierung wurde das Programm Chromeleon (V.6.01, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) verwendet.

3.9 Bestimmung der Zytokin mRNA Level in verschiedenen Hirnarealen

Die RNA-Extraktion, reverse Transkription, RT-PCR und relative Quantifizierung der PCR-Produkte wurden in Marburg durchgeführt. Für die Gewinnung von RNA aus verschiedenen Hirnregionen wurde unter Verwendung des TRIzol Reagens nach dem Standardprotokoll von Chomczynski (37) verfahren. Die RNA wurde mit 2 U DNaseI in 10x Y⁺/Tango Puffer behandelt und anschließend unter Verwendung eines RNeasy Mini Kits nach dem vom Hersteller beigelegten Protokoll aufgereinigt und in 30 µl RNase

freiem Wasser eluiert. Die reverse Transkription wurde mit 1 µg RNA unter Verwendung der 40 U MMLV reversen Transkriptase und 0,5 mg/ml oligop(dT) 12-18 Primern in einem Volumen von 20 µl für 60 min bei 42 °C und für 15 min bei 70°C durchgeführt. Anschließend wurde die Real-time PCR in einem Volumen von 25 µl mithilfe des MX 3000P Detektionssystems durchgeführt. Der Master Mix bestand aus folgenden Reagenzien: 12,5 µl 2x PCR Puffer; die Nukleotide dATP; dCTP; dGTP (200 µM jedes); 400 µM dUTP; 1,0 µl 25 mM MgCl₂; 0,625 U AmpliTaqGold; 0,25 U Uracil- DNA-Glycosylase; 200 nM jedes Primers; 100 nM der zugehörigen Probe und dem Referenzfarbstoff Rox in einer Endkonzentration von 300 nM. 21 µl des Master Mixes und 4 µl cDNA wurden zu jedem Well der 96-Well-Platte hinzugefügt. Alle PCR-Reaktionen wurden 2-4 Mal unter den folgenden Bedingungen durchgeführt: beginnend mit 2 min 50°C und 10 min 95°C, gefolgt von 40 Zyklen 15 sek 95°C und 1 min 60°C. Der Mittelwert der PCR-Reaktion war das Messergebnis für jede Probe. Die Primer und Fluorochrom-markierten Sonden wurden mit dem Programm Primer Express (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) konstruiert oder wurden bereits veröffentlicht. Folgende Primer und Sonden wurden verwendet: für IL-1 (Zugangsnummer E05490): ACCCAAGCACCTTCTTTTCCTT (*forward* Primer), TGCAGCTGTCTAATGGGAACAT (*reverse* Primer) und TCTTTGAAGAAGAGCCCGTCCTCTGTGACT (fluoreszent-markierte Sonde); für IL-6 (Zugangsnummer NM_012589): GACAGTGCATCATCGCTGTTCATA (*forward* Primer), AGTCGGAGGCTTAATTACATATGTTC (*reverse* Primer) und CAGAATTGCCATTGCACAACCTCTTTTCTCATTT (fluoreszent-markierte Sonde); für TNF (Zugangsnummer X66539): GGTGATCGG-TCCCAACAAGGA (*forward* Primer), CACGCTGGCTCAGCCACTC (*reverse* Primer) und TGGCCCAGACCCTCACACTCAGATCA (fluoreszent-markierte Sonde) und für das Referenzgen (*House Keeping Gen*) RPL32 (Zugangsnummer X06483): TGTCTCTAAGAACCGAAAAGCC (*forward* Primer), CGTTGGGATTGGTGACTCTGA (*reverse* Primer) und TCGTAGAAAGAGCAGCACAGCTGGCC (fluoreszent-markierte Sonde). Die Auswertung erfolgte nach der $\Delta\Delta C_T$ -Methode (148), die dazu dient die relative Genexpression zu berechnen. Die Zytokin mRNA Level jeder Probe wurden auf das Referenzgen RPL32 normalisiert. Die bei Kontrolltieren (NaCl-Injektion) erhaltenen

Werte wurden auf 1.0 gesetzt und Werte der immunisierten Tiere sind als Verhältnis der Genexpression in Relation zu den Werten der Kontrolltiere dargestellt.

3.10 Bestimmung des Differentialblutbildes und der Lymphozyten-Subpopulationen

Mittels eines Durchflusszytometers (FACSCalibur) und fluoreszierender Antikörpermarkierung wurde aus dem Vollblut jedes Versuchstieres ein Differentialblutbild erstellt. Zur Bestimmung des Prozentsatzes an Lymphozyten bzw. Granulozyten, Monozyten und eosinophilen Granulozyten wurde sowohl der PE-konjugierte monoklonale mouse anti-rat CD45 Antikörper (OX-1, Lymphozyten) als auch der FITC-konjugierte monoklonale mouse anti-rat CD172a Antikörper (ED9, myeloide Zellen = Monozyten, Granulozyten) verwendet. Dazu wurden zu 20 µl Gesamtblut 50 µl FACS-Puffer, 2 µl OX-1 und 1,5 µl ED9 pipettiert und 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde in jedes Probenröhrchen 0,5 ml frisch angesetzter FACS-Lysepuffer gegeben und die Proben weitere 10 min inkubiert. Danach wurde 1 ml FACS-Puffer hinzugefügt und die Zellen sofort am Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mithilfe des Programms Cell Quest (V.1.2, Becton Dickinson Immunocytometry Systems, USA). Die Zahl der Monozyten und Granulozyten wurde anhand der Größe bzw. Granularität bestimmt.

Auch die Lymphozyten-Subpopulationen wurden mittels der Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür wurden der monoklonale PE-konjugierte mouse anti-rat CD3 Antikörper (G4.18, T-Zellen) und folgende monoklonale FITC-konjugierte Antikörper verwendet: mouse anti-rat CD4 Antikörper (OX-38, CD4⁺ T-Zellen), mouse anti-rat CD8 Antikörper (OX-8, CD8⁺ T-Zellen), mouse anti-rat CD161a Antikörper (10/78, NK-Zellen) und mouse anti-rat CD45RA Antikörper (= B220, OX-33, B-Zellen). Zu jeweils 20 µl Gesamtblut wurden entweder 2µl G4.18 und 2,5 µl OX-38 (zur Th-Zellen-Bestimmung) oder 2µl G4.18 und 1,5 µl OX-8 (zur Bestimmung zytotoxischer T-Zellen) oder 2µl G4.18 und 2,5 µl 10/78 (zur NK-Zell-Bestimmung) oder 2 µl OX-33 (B-Zellen) pipettiert. Dann wurden die Proben in jeweils 50 µl FACS-Puffer 15 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zur Lyse der Erythrozyten 1 ml Lyse-Puffer hinzugegeben und die Proben erneut 10

min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert. Die Proben wurden zentrifugiert, gewaschen und erneut zentrifugiert. Dann wurden die Zellen mit 250 µl Fixativ (500 ml PBS, 5 g Paraformaldehyd) fixiert. Zur Identifizierung der Lymphozyten-Subpopulationen wurde ebenfalls das Programm Cell Quest genutzt. Auf diese Weise konnten folgende Subpopulationen identifiziert werden: Th-Zellen (CD3⁺/CD4⁺), zytotoxische T-Zellen (CD3⁺/CD8⁺), NK-Zellen (CD3⁺/CD161a⁺) und B-Zellen (CD45RA⁺).

3.11 Histochemische Verfahren

3.11.1 Histologischer Arthritis-Schweregrad

Zur histologischen Beurteilung des Arthritis-Schweregrades wurden Hämalaun-Eosin-Färbungen (HE-Färbungen) der in TissueTek eingefrorenen Pfoten der an den Tagen 0, 5, 14, 28, 41 und 55 getöteten DA Ratten angefertigt. Dazu wurden 10 µm dicke Schnitte der Präparate auf Objektträger gebracht und eine halbe Stunde an der Luft getrocknet. Dann wurden die Gefrierschnitte 3 min in Hämalaun inkubiert und anschließend 3 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Der Farbstoff Hämalaun färbt die Zellkerne intensiv blau. Danach wurden die Schnitte 30 sek in wässrige Eosin-Lösung getaucht, die das Zytoplasma rot gegenfärbt, und anschließend wurden die Präparate durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Zum Entfernen des Alkohols wurden die Schnitte nun für 3 min in Xylol gegeben und anschließend mit Entellan eingedeckelt.

Um den histologischen Arthritis-Schweregrad der Pfoten zu bestimmen, wurden pro Tier 2-4 Gelenke hinsichtlich der Immunzell-Infiltration in das Gelenk, der Immunzell-Infiltration in das umgebende Gewebe, der Knorpelerosion und der Knochenerosion beurteilt. Die Immunzell-Infiltration des Gelenkes bzw. des umgebenden Gewebes wurden auf einer Punkteskala von 0-4 bewertet, wobei 0 keine Infiltration und 4 eine maximale Infiltration bedeutet. Auch für die Knorpel- und Knochenerosion wurden jeweils 0-4 Punkte vergeben, wobei 0 keine Erosion und 4 die maximale Zerstörung des Knorpels bzw. des Knochens bedeutete. Insgesamt wurde ein maximaler, histologischer Arthritis Score von 16 Punkten pro Gelenk vergeben.

3.11.2 Fluoreszenzfärbung und Quantifizierung von Nervenfasern

Tyrosinhydroxylase-Fluoreszenzfärbung

Zur Quantifizierung sympathischer Nervenfasern in den Gelenkregionen wurden Tyrosinhydroxylase-Färbungen der Pfoten der an den Tagen 0, 5, 14, 28, 41 und 55 getöteten DA Ratten durchgeführt. Die Tyrosinhydroxylase (TH) katalysiert die Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosin in die Aminosäure L-Dopa, aus der in weiteren enzymatischen Schritten die Katecholamine hervorgehen. Dieser erste TH-vermittelte Schritt ist der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt der Biosynthese der Katecholamine.

Für die TH-Färbung wurden die Pfoten-Präparate der an den Tagen 0, 5, 14, 28, 41 und 55 getöteten Tiere 12 µm dick geschnitten, auf Objektträger gebracht und eine halbe Stunde an der Luft getrocknet. Um später das Verlaufen der aufgetragenen Lösungen zu vermeiden, wurden die Schnitte mit einem Fettstift umkreist und anschließend 10 min in PBS gewaschen. Daraufhin wurde auf jeden Schnitt zur Absättigung unspezifischer Bindungen eine Blocklösung aus BSA, FCS und Ziegenserum aufgetragen und 45 min inkubiert. Nach dem Abschütteln der Blocklösung wurden die Schnitte 10 min in PBS gewaschen, bevor auf jeden Schnitt 150 µl der Primärantikörper-Lösung (rabbit anti-Tyrosine Hydroxylase, polyklonal, Verdünnung 1:100) pipettiert wurde. Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper über Nacht inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle der Primärantikörper-Lösung nur der Antikörperpuffer verwendet. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 10 min in PBS und Triton (0,3%) und 5 min in PBS gewaschen (Negativkontrollen getrennt von den restlichen Schnitten), bevor auf jeden Schnitt 150 µl Sekundärantikörper-Lösung (goat anti-rabbit IgG, 2 mg/ml, Verdünnung 1:500) pipettiert wurde. Die Schnitte mit dem Sekundärantikörper wurden bei Dunkelheit 90 min inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte erneut 10 min in PBS und Triton (0,3%) und 5 min in PBS gewaschen und mit *Fluorescent Mounting Medium* eingedeckt. Bis zur Auswertung innerhalb der darauf folgenden Woche wurden die Objektträger dunkel und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

Am Fluoreszenzmikroskop wurden bei 400-facher Vergrößerung die TH-positiven Nervenfasern mit einer Länge von mindestens 50µm gezählt. Dabei wurden 12

Gesichtsfelder pro Gelenkregion ausgezählt und pro Pfote die folgenden Regionen berücksichtigt: Finger-Zehen-Region, Mittelhand-Mittelfuß-Region und Sprunggelenk-Region. Auf diese Weise wurden die Nervenfasern von mindestens 4 Ratten je Zeitpunkt erfasst. Die Ergebnisse sind in Nervenfasern je mm² angegeben.

Substanz P- Fluoreszenzfärbung

Zur Quantifizierung sensibler Nervenfasern in den Gelenkregionen der Pfoten der an den Tagen 0, 5, 14, 28, 41 und 55 getöteten DA Ratten wurden Substanz P (SP)-Färbungen der Pfoten durchgeführt. Die Färbung erfolgte nach demselben Protokoll wie die TH-Immunhistochemie. Jedoch anstelle des TH-Antikörpers wurde der goat anti-Substanz P-Primärantikörper (polyklonal, Verdünnung 1:50) und anstelle des o.g. Sekundärantikörpers wurde der rabbit anti-goat-Sekundärantikörper (Verdünnung 1:500) verwendet. Auch die Auszählung SP-positiver Nervenfasern erfolgte auf dieselbe Weise wie die Auszählung TH-positiver Nervenfasern. Die Ergebnisse sind in Nervenfasern je mm² angegeben.

3.11.3 Sudan III Färbung der Nebennieren

Zur Färbung des Cholesterins in der Nebennierenrinde wurden Sudan III Färbungen der Nebennieren durchgeführt. Dazu wurden die in TissueTek eingefrorenen Nebennieren 5 µm dick geschnitten und die Schnitte auf Objektträger gebracht und eine halbe Stunde an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte 10 min in TBS rehydriert, kurz abgeklopft und 20 min in der Sudan III Lösung inkubiert. Die Schnitte wurden in Wasser gespült und mit *Aqueous Mounting Medium* eingedeckt.

Bei 200-facher Vergrößerung wurden am Mikroskop pro Tier 5 Bilder der Nebennierenrinde aufgenommen und mittels der Software MetaView (Version 5.0r1, Universal Imaging Corp., Downingtown, PA, USA) der prozentuale Anteil der positiv gefärbten Fläche an der gesamten Nebennierenrindenfläche, also ein relativer Flächenanteil hinsichtlich des Cholesterins, ermittelt.

3.11.4 SR-BI Immunhistochemie

Zur Färbung der SR-BI positiven Zellen in der Nebennierenrinde wurden AP-Färbungen der Nebennieren durchgeführt (AP = Alkalische Phosphatase). Dazu wurden die in TissueTek eingefrorenen Nebennieren 5 µm dick geschnitten und die Schnitte auf Objektträger gebracht und eine halbe Stunde an der Luft getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte mit einem Fettstift umkreist, 10 min in PBS rehydriert, kurz abgeklopft und mit der Blocklösung 45 min inkubiert. Nach dem Abschütteln der Blocklösung wurden die Schnitte 10 min in PBS gewaschen, bevor auf jeden Schnitt 50 µl der Primärantikörper-Lösung (rabbit anti-SR-BI, polyklonal, Verdünnung 1:1000) pipettiert wurde. Die Schnitte wurden mit dem Primärantikörper 1 h inkubiert. Bei der Negativkontrolle wurde anstelle der Primärantikörper-Lösung nur der Antikörperpuffer verwendet. Dann wurden die Schnitte 3 Mal 5 min in PBS gewaschen, bevor auf jeden Schnitt 50 µl Sekundärantikörper-Lösung (Alkalische Phosphatase-konjugierte goat anti-rabbit IgG, Verdünnung 1:100) pipettiert wurde. Die Schnitte wurden mit dem Sekundärantikörper wiederum 1 h inkubiert und anschließend 3 Mal 5 min in PBS gewaschen. Danach wurde ein Substrat System bestehend aus 4-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) und Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) mit einem Tropfen Levamisol, welches die gewebeeigenen alkalischen Phosphatasen inhibiert, gemischt und je 50 µl des Substrates auf die Schnitte gegeben. Die an den Sekundärantikörper gekoppelte alkalische Phosphatase spaltet Phosphatverbindungen dieses Substrates ab und die so freigesetzten Verbindungen reagieren dann zu einem violett-blauen Endprodukt. Die Farbentwicklung wurde unter dem Mikroskop beobachtet und nach 8 min gestoppt. Dazu wurden die Schnitte abgeklopft und 5 min in PBS gewaschen und anschließend mit *Aqueous Mounting Medium* eingedeckt. Die Auswertung der Färbung am Mikroskop erfolgte auf die gleiche Weise wie für die Sudan III Färbung.

3.11.5 Immunzell-Färbung in Schwanzhaut und Lymphknoten

Die Makrophagen-Fluoreszenzfärbung erfolgte in den Lymphknoten und im Immunisierungsgebiet der Schwanzhaut. Diese Immunzell-Fluoreszenzfärbungen wurden

nach demselben Protokoll wie die Färbung von Nervenfasern durchgeführt. Jedoch wurden die Lymphknoten 5 µm dick und die Schwanzhaut 8 µm dick geschnitten. Als Primärantikörper gegen Makrophagen wurde der mouse anti-rat Monozyten/Makrophagen Antikörper (monoklonal, Verdünnung 1:500) verwendet, während als Sekundärantikörper der goat anti-mouse IgG (Verdünnung 1:500) verwendet wurde.

Bei 400-facher Vergrößerung wurden am Fluoreszenzmikroskop 17 Gesichtsfelder pro Tier und Gewebe nach positiv-gefärbten Zellen ausgezählt. Die Ergebnisse sind in positive Zellen je mm² angegeben.

3.12 Statistik

Für die statistische Analyse wurden die Programme SPSS (V.12.0.1, SPSS Inc., Chicago, USA) und SigmaStat (V.3.5, Systat Software, Inc., Erkrath, Deutschland) verwendet. Für die Erstellung der Graphiken wurde SigmaPlot (V.11.0, Systat Software, Inc., Erkrath, Deutschland) und zur Nachbearbeitung der Graphiken wurde CorelDRAW X3 (V.13.0.0.576, Corel Corp., Unterschleißheim, Deutschland) verwendet. Zum Vergleich von je zwei Gruppen (Gruppen Medianwerte) wurde der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test (MWU-Test) verwendet. Um den Arthritis-Schweregrad zwischen verschiedenen Gruppen während der Beobachtungsperiode zu vergleichen, wurde die statistische Methode des general linear model angewendet (GLM). Korrelationen wurden nach der Spearman Rangkorrelations-Analyse berechnet. Die Erkrankungswahrscheinlichkeit der Wistar Ratten wurde in % angegeben und Unterschiede zwischen Kontroll- und Stresstieren bezüglich der Prävalenz wurden mittels Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz getestet. Die Daten sind entweder als Mittelwerte ± Standardfehler (SEM) oder als Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil dargestellt. Unterschiede ab $p < 0.05$ wurden als signifikant erachtet.

4 Ergebnisse

4.1 Psychosozialer Stress

Dieser Teil der Arbeit wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe der Abteilung für Tierphysiologie in Bayreuth (Kerstin Schunke, Doktorandin und Prof. Dr. rer. nat. Volker Stefanski) durchgeführt.

4.1.1 Klinischer Arthritis-Schweregrad und Prävalenz

Bei Kontrolltieren und Stresstieren, die 7 Tage einer *Resident-Intruder*-Konfrontation ausgesetzt waren, wurde am vierten Tag der Stressexposition eine CII-Arthritis induziert. Beide Gruppen wurden hinsichtlich des Arthritis-Schweregrades und der Prävalenz vergleichend untersucht. Bezüglich der Erkrankungswahrscheinlichkeit ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen nicht gestressten Kontrolltieren und gestressten Tieren, wobei Kontrolltiere (65,6%) häufiger erkrankten als Stresstiere (35,2%) (Abb. 4.1).

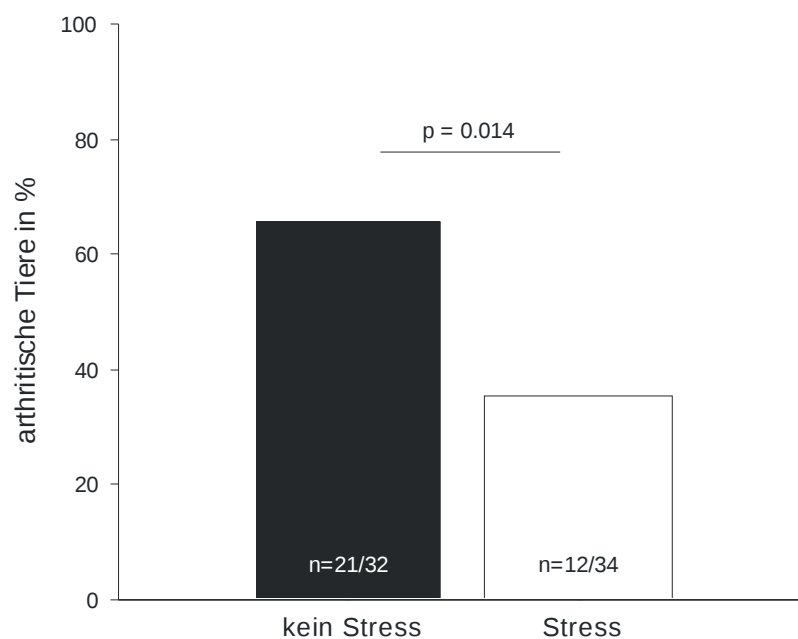


Abb. 4.1: Arthritis-Prävalenz gestresster und nicht gestresster Wistar Ratten. Kontrolltiere entwickelten häufiger eine CIA als gestresste Tiere. (Chi-Quadrat-Test)

Des Weiteren entwickelten Kontrolltiere eine Arthritis mit stärkerer Ausprägung als Stresstiere. Im Arthritisverlauf ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abb. 4.2). Hinsichtlich des Zeitpunktes, an dem die Symptome erstmalig auftraten, konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

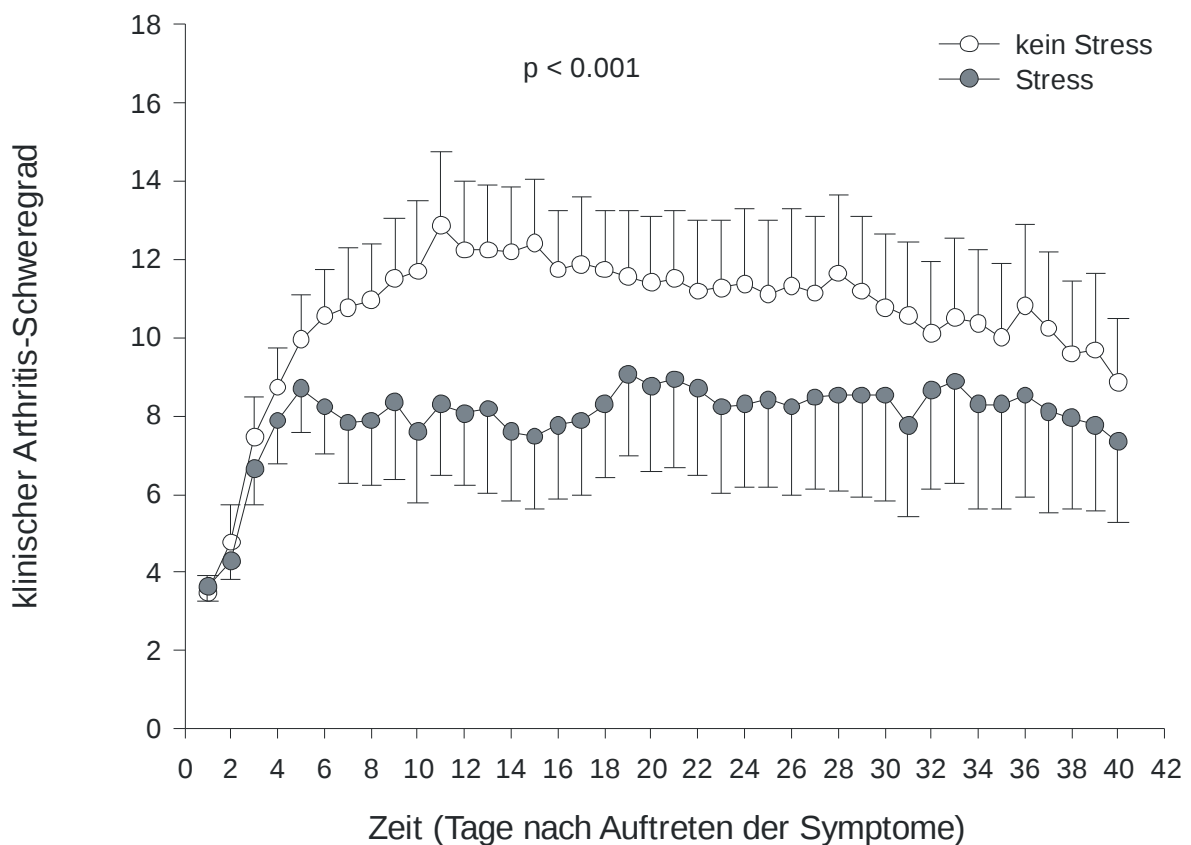


Abb. 4.2: Klinischer Arthritis-Schweregrad der Kontroll- bzw. Stresstiere. Im Arthritisverlauf hatten Kontrolltiere (n = 22) einen signifikant höheren Arthritis-Score als Stresstiere (n = 17). Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM, (GLM).

4.1.2 Plasma-Corticosteron

Zu verschiedenen Zeitpunkten (basal vor der Stressexposition und an den Tagen 0, 4, 7 und 14 nach Arthritisinduktion) wurde den Wistar Ratten Blut aus der Schwanzvene entnommen und Corticosteron im Plasma bestimmt. Alle hierfür untersuchten Tiere wurden mit CII in IFA immunisiert. Einige der Tiere entwickelten im weiteren Verlauf

eine Arthritis, andere Tiere erkrankten nicht. Interessanterweise ergaben sich weder im Vergleich der nicht gestressten und gestressten Tiere noch im Vergleich der im späteren Verlauf (ab Tag 14 erste Symptome) arthritisch werdenden und nicht arthritisch werdenden Tiere signifikante Unterschiede. Lediglich am Tag 7 nach Arthritisinduktion konnte signifikant weniger Plasma-Corticosteron bei den gestressten Tieren im Vergleich zu den nicht gestressten Kontrolltieren nachgewiesen werden (Abb. 4.3).

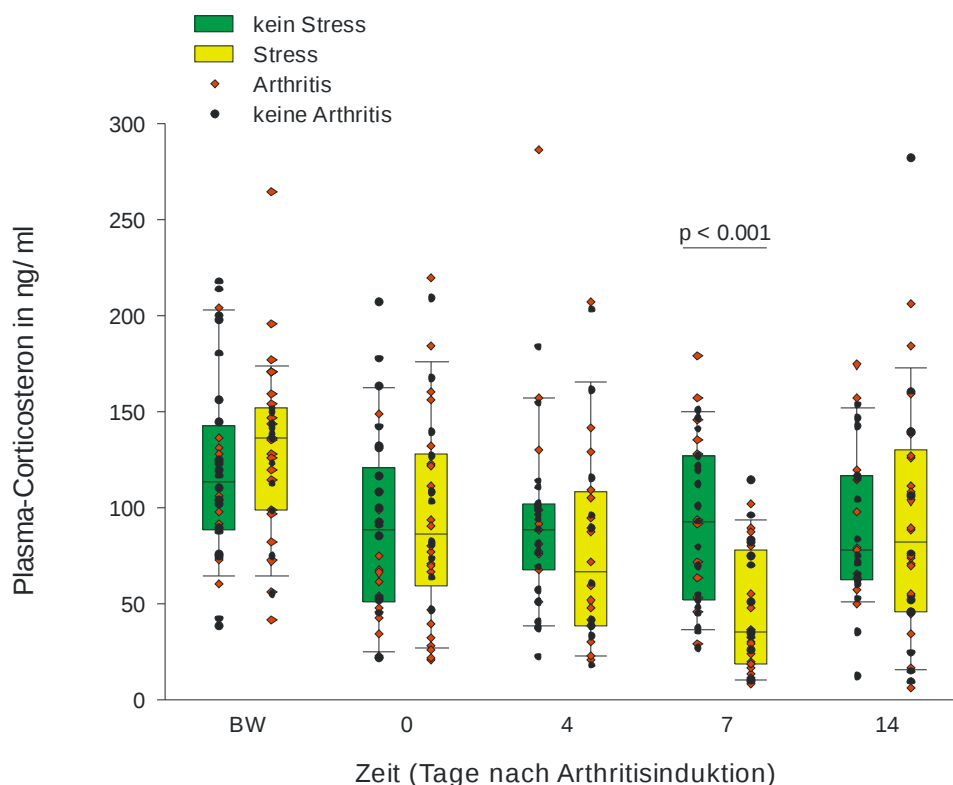


Abb. 4.3: Plasma-Corticosteron-Konzentrationen gestresster (n = 34) und nicht gestresster Wistar Ratten (n = 32). Am Tag 7 war die Plasma-Corticosteron-Konzentration bei Stresstieren signifikant geringer als bei Kontrolltieren. BW = Basalwert, Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

4.1.3 Immunzellen in der Zirkulation

Die Ergebnisse der Untersuchungen verschiedener Immunzellpopulationen im Blut sind Bestandteil der Doktorarbeit von Kerstin Schunke (Bayreuth) und werden hier deshalb nur kurz in Textform beschrieben. Zu verschiedenen Zeitpunkten (basal vor der

Stressexposition und an den Tagen 0, 4, 7 und 14 nach Arthritisinduktion) wurden bei gestressten und nicht gestressten Wistar Ratten die Immunzellen in der Zirkulation bestimmt. Alle hierfür untersuchten Tiere wurden mit CII in IFA immunisiert. Bezüglich der Granulozyten und Monozyten ergaben sich signifikante Unterschiede ($p < 0.001$) zwischen gestressten ($n = 34$) und nicht gestressten Tieren ($n = 32$). Die Zahl sowohl der Granulozyten als auch der Monozyten war bei Stresstieren an den Tagen 0, 4 und 7 nach Arthritisinduktion signifikant höher als bei Kontrolltieren. Im Gegensatz dazu waren hinsichtlich der B-Zell-Subpopulation keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar. Jedoch ergaben sich bezüglich der T-Zell-Subpopulationen wiederum signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) zwischen den Gruppen. Dabei hatten Stresstiere an den Tagen 0, 4 und 14 nach Arthritisinduktion eine signifikant geringere Anzahl zytotoxischer T-Zellen im Blut als nicht gestresste Kontrolltiere. Zudem war die Zahl der Th-Zellen bei Stresstieren an den Tagen 0, 7 und 14 signifikant niedriger als bei Kontrolltieren.

4.1.4 Immunzellen im Injektionsgebiet der Schwanzhaut

Vor der Stressexposition und an den Tagen 4 und 14 nach Arthritisinduktion wurden sowohl gestresste als auch nicht gestresste Wistar Ratten getötet und Schwanzhaut des Immunisierungsgebietes entnommen. Die Schwanzhaut wurde im Kollagen-Injektionsgebiet hinsichtlich eingewanderter Makrophagen untersucht. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den nicht immunisierten Tieren (Basalwerte), den Stresstieren und den nicht gestressten Kontrolltieren (Abb. 4.4). Im Vergleich zu den Basalwerten nicht immunisierter Tiere war die Makrophagenzahl im Immunisierungsgebiet gestresster und nicht gestresster Tiere zu allen Zeitpunkten (Tag 4 und 14) signifikant höher (Abb. 4.4). Außerdem bestanden hinsichtlich der Zahl positiv gefärbter Zellen signifikante Unterschiede zwischen den nicht gestressten Kontrolltieren und den Stresstieren, wobei bei Kontrolltieren am Tag 14 signifikant mehr Makrophagen im Injektionsgebiet der Schwanzhaut nachweisbar waren als bei Stresstieren am Tag 4 und 14 (Abb. 4.4).

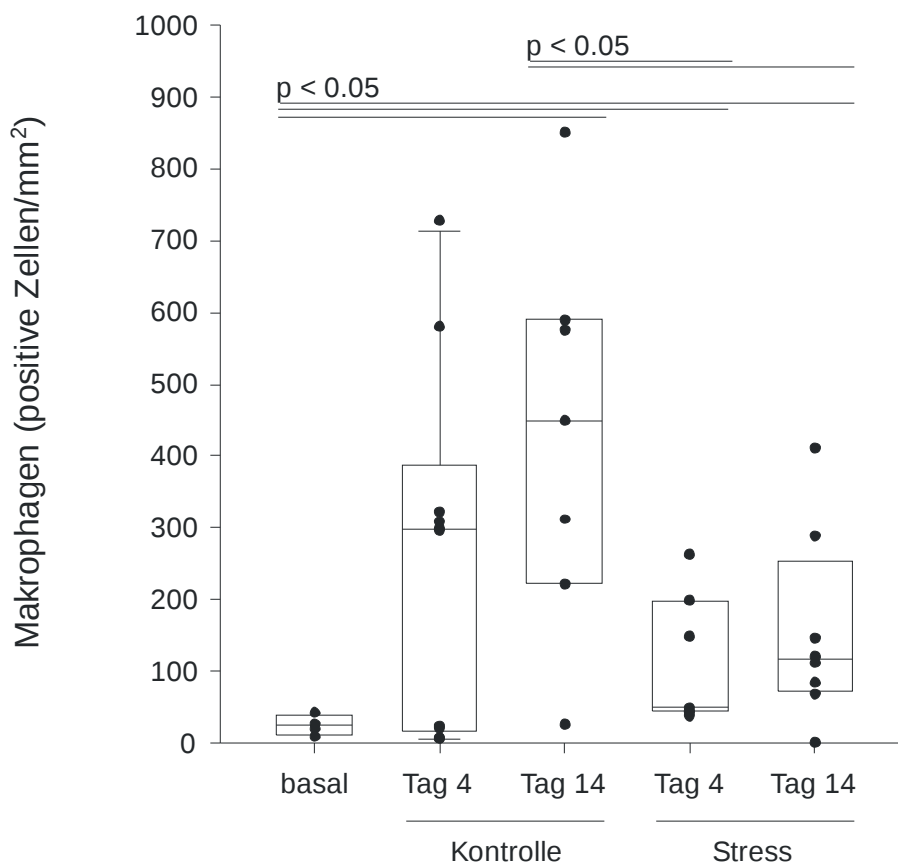


Abb. 4.4: Makrophagen im Kollagen-Injektionsgebiet der Schwanzhaut. Bei Kontrolltieren war die Zahl der Makrophagen am Tag 14 signifikant höher als bei Stresstieren am Tag 4 und 14. basal = nicht immunisierte Tiere (n = 4), Kontrolltiere (Tag 4: n = 10, Tag 14: n = 7), Stresstiere (Tag 4: n = 7, Tag 14: n = 8), Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

4.1.5 Immunzellen in den Lymphknoten

Vor der Stressexposition und an den Tagen 4 und 14 nach Arthritisinduktion wurden sowohl gestresste als auch nicht gestresste Wistar Ratten getötet und die Lymphknoten entnommen. Die Lymphknoten wurden hinsichtlich der Makrophagen untersucht. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den nicht immunisierten Tieren (Basalwerte), den Stresstieren und den nicht gestressten Kontrolltieren (Abb. 4.5).

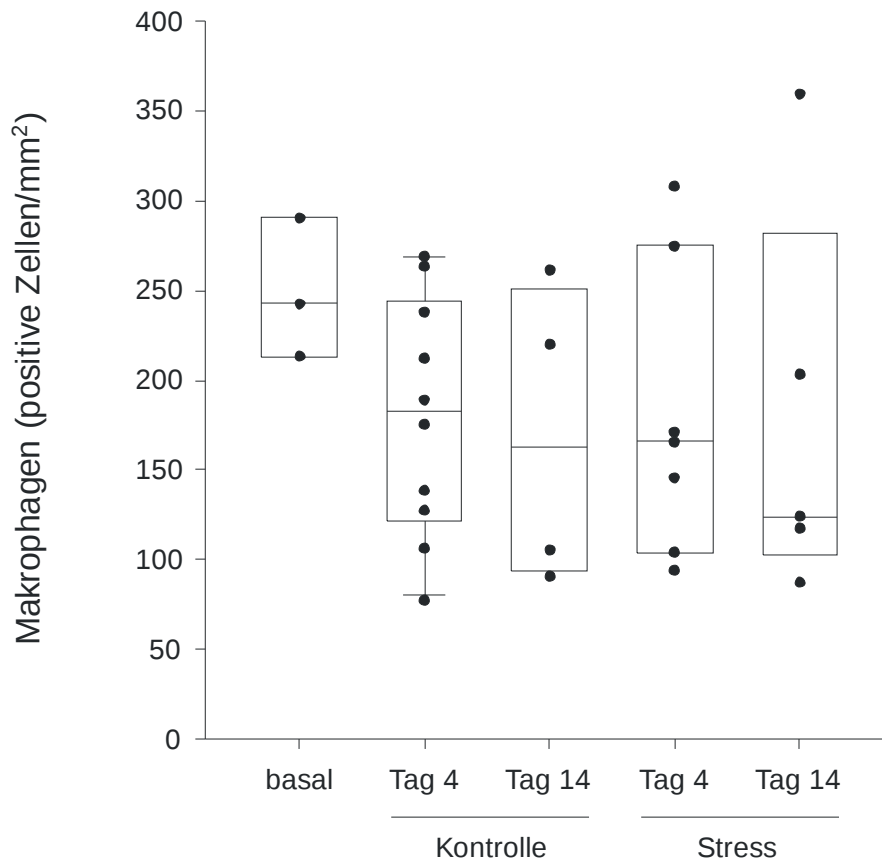


Abb. 4.5: Makrophagen in den Lymphknoten gestresster und nicht gestresster Wistar Ratten. Es waren keine Unterschiede zwischen den Kontroll- und Stresstieren nachweisbar. basal = nicht immunisierte Tiere (n = 3), Kontrolltiere (Tag 4: n = 10, Tag 14: n = 4), Stress = Stresstiere (Tag 4: n = 7, Tag 14: n = 5), Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

4.1.6 Quintessenz

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass psychosozialer Stress durch Dauerkonfrontation bei männlichen Wistar Ratten die Suszeptibilität für eine CIA reduzierte und außerdem zu einer verminderten Arthritisausprägung führte. So entwickelten Kontrolltiere häufiger eine Arthritis als Stresstiere und erkrankte Stresstiere hatten einen geringeren Arthritis-Schweregrad als erkrankte Kontrolltiere. Des Weiteren wurde gezeigt, dass psychosozialer Stress bei immunisierten Wistar Ratten zu einer erhöhten Zahl zirkulierender Granulozyten und Monozyten führte, wohingegen die Level zytotoxischer T-Zellen und Th-Zellen bei gestressten Tieren signifikant geringer waren als bei nicht gestressten Tieren. Im Gegensatz zu den erhöhten Monozyten-Spiegeln im Blut war die Zahl der

Gewebsmakrophagen im Kollagen-Injektionsgebiet der Schwanzhaut bei Stresstieren deutlich geringer als bei Kontrolltieren. Interessanterweise unterschieden sich die Plasma-Corticosteron-Konzentrationen der Stresstiere nicht von denen der Kontrolltiere.

4.2 Zentrale Zytokine und Monamine

Dieser Teil der Arbeit wurde in enger Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe der Abteilung für Immunophysiologie in Marburg (Dr. rer. nat. Johannes Wildmann, Prof. Dr. phil. Adriana del Rey und Prof. Dr. med. Hugo O. Besedovsky) durchgeführt. Die diesem Teil zugrunde liegende Publikation befindet sich im Anhang.

4.2.1 Klinischer und histologischer Arthritis-Schweregrad

Die nächsten Abbildungen zeigen den klinischen (Abb. 4.6) und histologischen (Abb. 4.7) Arthritis-Schweregrad weiblicher DA Ratten, die mit CII in IFA immunisiert wurden. Erste klinische und histologische Symptome entwickelten sich zwischen dem Tag 14 und 20 nach Arthritisinduktion. Stärkste Symptome waren sowohl im klinischen als auch im histologischen Score zwischen dem Tag 25 und 55 zu beobachten. Kontrolltiere, die nur CII, IFA oder NaCl injiziert bekamen, zeigten keinerlei klinische bzw. histologische Arthritis-Symptome (Daten nicht gezeigt). Beispiele für histologische Veränderungen im Verlauf der Arthritis sind in der Abb. 4.8 dargestellt. Diese HE-Färbungen zeigen sowohl die Immunzell-Infiltrationen in den Gelenkspalt und in das umgebende Gewebe am Tag 28 als auch die fortgeschrittene Knorpel- und Knochendestruktion am Tag 55 nach Induktion der Arthritis.

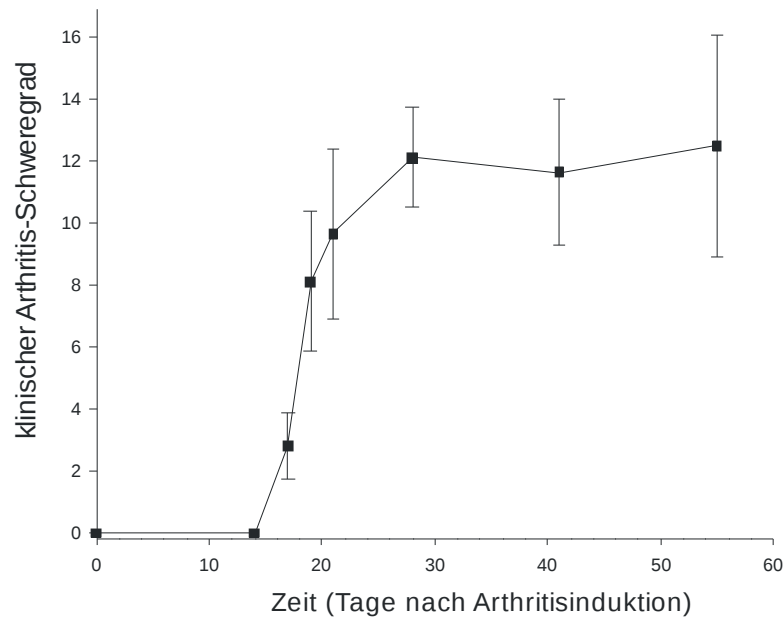


Abb. 4.6: Klinische Beurteilung des Arthritis-Schweregrades bei immunisierten DA Ratten. Erste Symptome zeigten sich zwischen dem Tag 14 und 20 und eine schwere Arthritis-Symptomatik konnte ab Tag 21 beobachtet werden. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 7-9 Tieren je Zeitpunkt bei einem Maximal-Score von 16 Punkten je Tier.

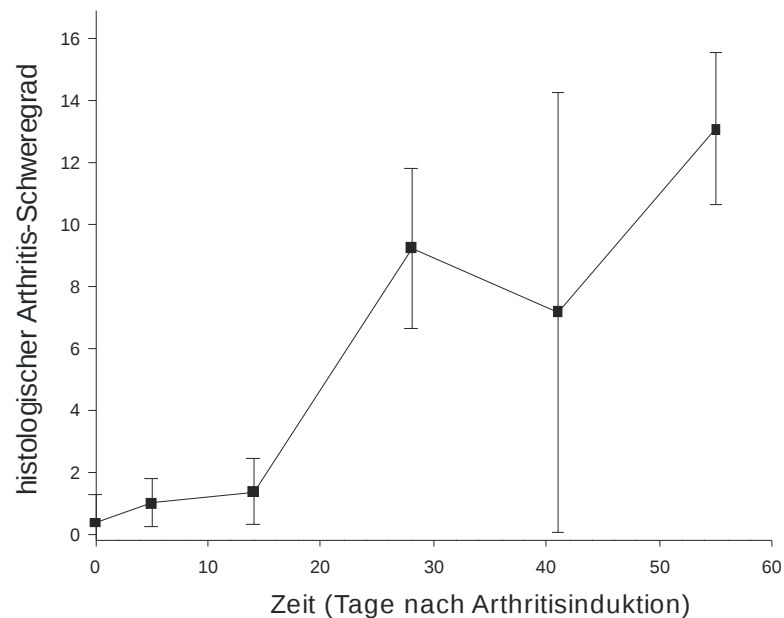


Abb. 4.7: Histologische Beurteilung des Arthritis-Schweregrades bei immunisierten DA Ratten. Erste Symptome zeigten sich zwischen dem Tag 14 und 20 und eine schwere Arthritis-Symptomatik konnte ab Tag 21 beobachtet werden. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 5-6 Tieren je Zeitpunkt bei einem Maximal-Score von 16 Punkten je Tier.

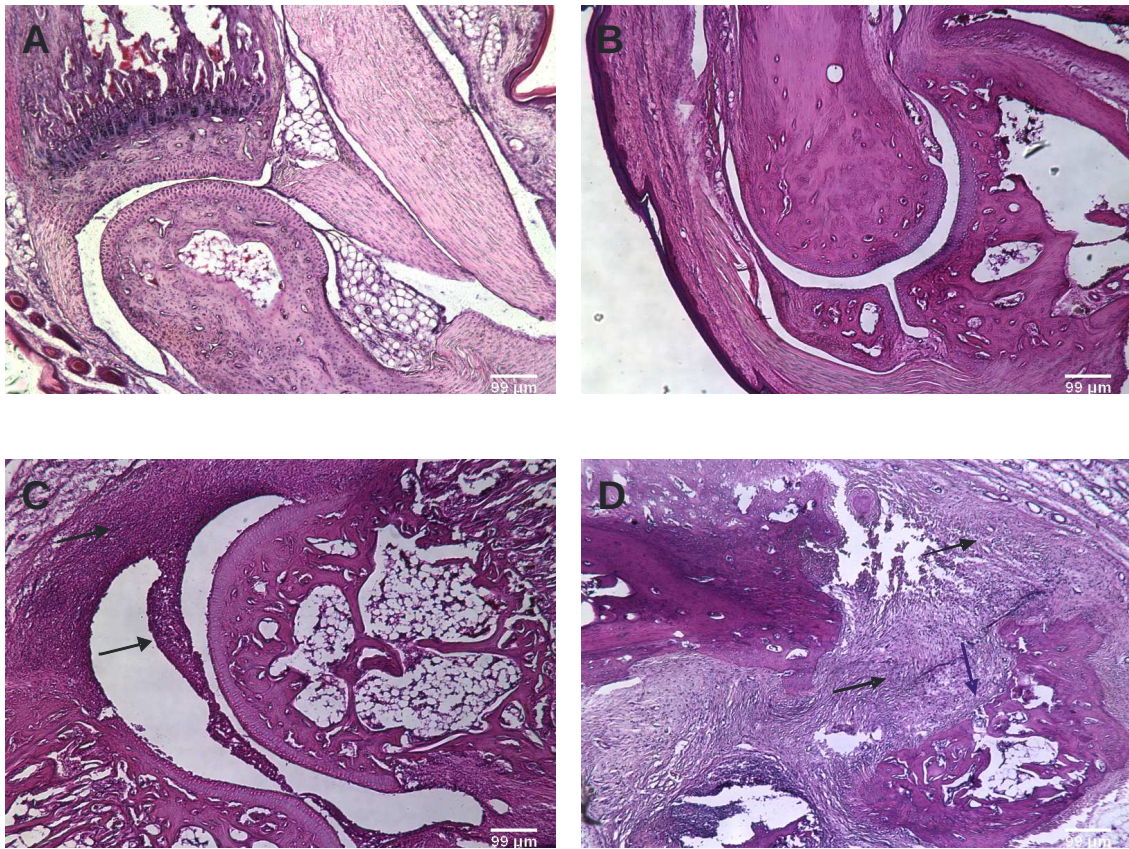


Abb. 4.8: Repräsentative HE-Färbungen der Gelenkregionen immunisierter DA Ratten. **A, B:** Am Tag 0 (**A**) und Tag 5 (**B**) sind keine histologischen Arthritis-Symptome erkennbar. Die Gelenke sind intakt und weisen keine Immunzell-Infiltration oder Knochen-Knorpel-Destruktion auf. **C:** Am Tag 28 ist die Immunzell-Infiltration deutlich sichtbar (Pfeile). **D:** Am Tag 55 ist die Zellinfiltration und Ausbildung des Pannus-Gewebes (schwarze Pfeile) aber auch die Knochen- und Knorpel-Destruktion (blauer Pfeil) deutlich erkennbar, (200-fache Vergrößerung).

4.2.2 Zytokine in der Peripherie

Zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 0, 5, 14, 28, 41, 55) wurden die DA Ratten getötet. In den Überständen der Zellen drainierender Lymphknoten wurden die Konzentrationen verschiedener Zytokine bestimmt. Bei Ratten der CII + IFA Gruppe nahm die *ex vivo* Produktion von TNF (Abb. 4.9) und IFN- γ (Abb. 4.10) im Verlauf der CIA progressiv zu, während die Produktion von IL-1 β (Abb. 4.11) nur in der asymptomatischen Phase maximal erhöht war. Die Produktion von IL-10 *in vitro* war sowohl am Tag 5 als auch an den Tagen 41 und 55 signifikant erhöht (Abb. 4.12). In den Kontrollgruppen (CII, IFA, NaCl) waren keine Veränderungen der *ex vivo* Produktion aller Zytokine nachweisbar.

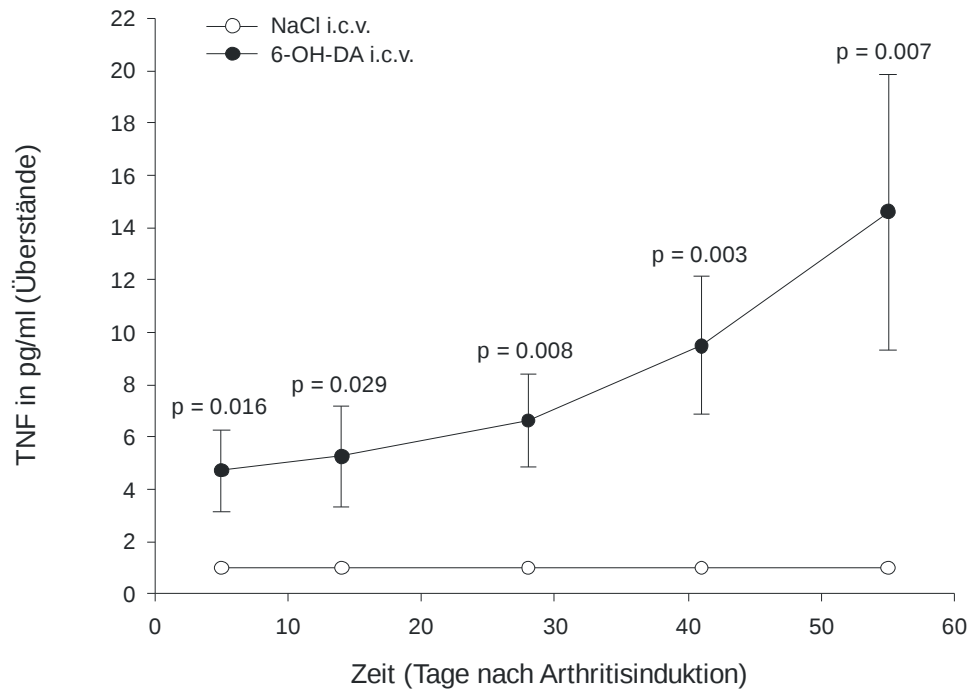


Abb. 4.9: TNF-Konzentration in den Überständen drainierender Lymphknotenzellen. Verglichen mit der Kontrollgruppe war die ex vivo Produktion von TNF bei CIA-Ratten zu allen Zeitpunkten signifikant erhöht. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 7-9 Tiere je Zeitpunkt und Gruppe, (MWU-Test).

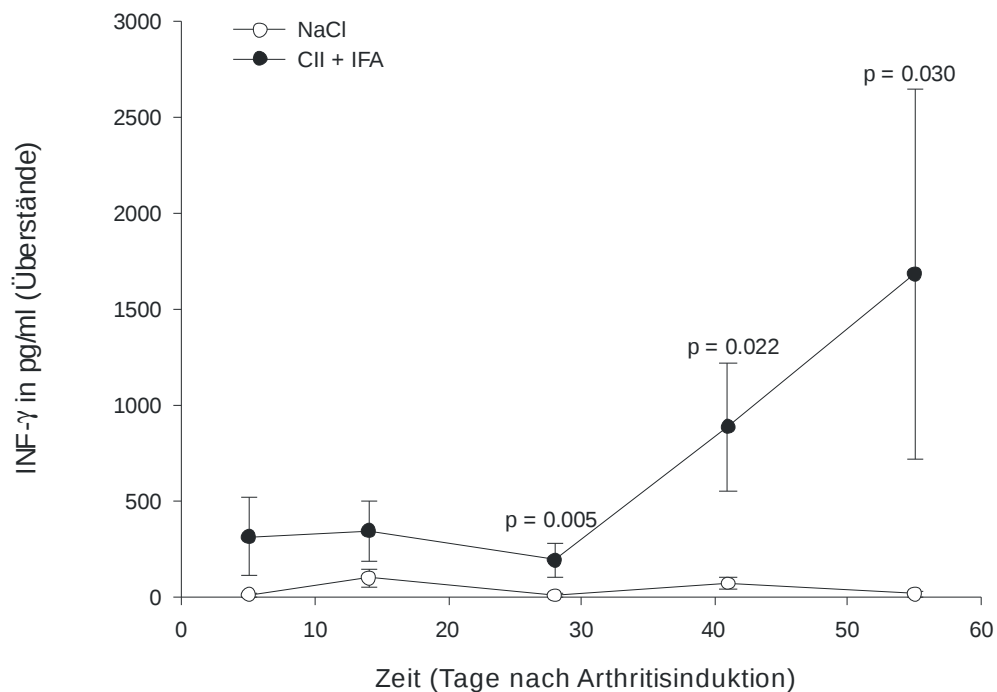


Abb. 4.10: IFN- γ Konzentration in den Überständen drainierender Lymphknotenzellen. Verglichen mit der Kontrollgruppe war die ex vivo Produktion von IFN- γ bei CIA-Ratten vom Tag 28-55 signifikant erhöht. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 7-9 Tieren je Zeitpunkt und Gruppe, (MWU-Test).

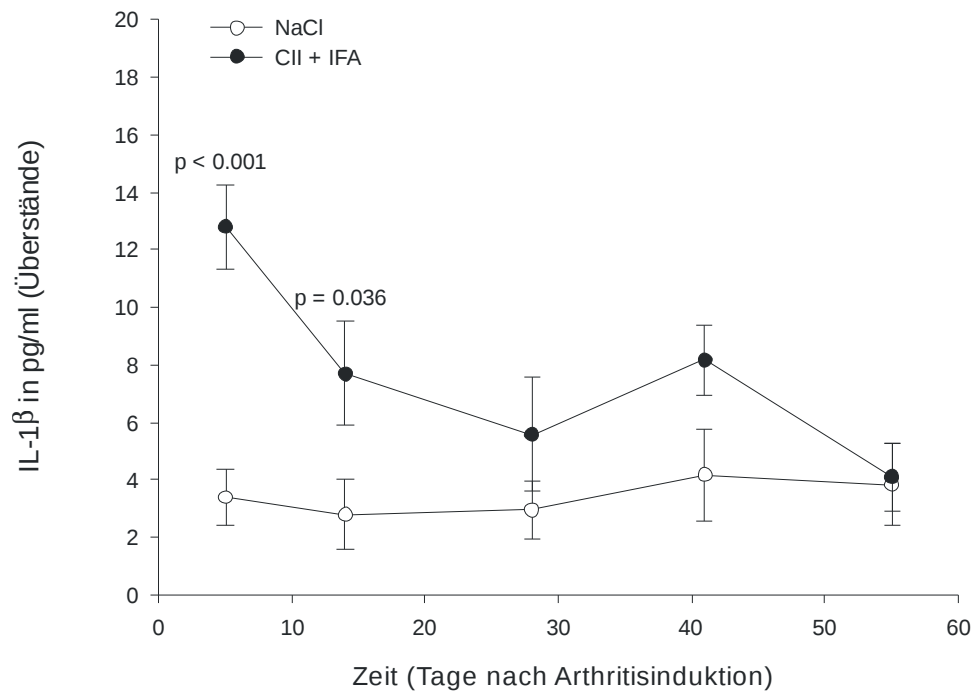


Abb. 4.11: IL-1 β Konzentration in den Überständen drainierender Lymphknotenzellen. Verglichen mit der Kontrollgruppe war die ex vivo Produktion von IL-1 β bei CIA-Ratten nur an den Tagen 5-14 signifikant erhöht. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 7-9 Tieren je Zeitpunkt und Gruppe, (MWU-Test).

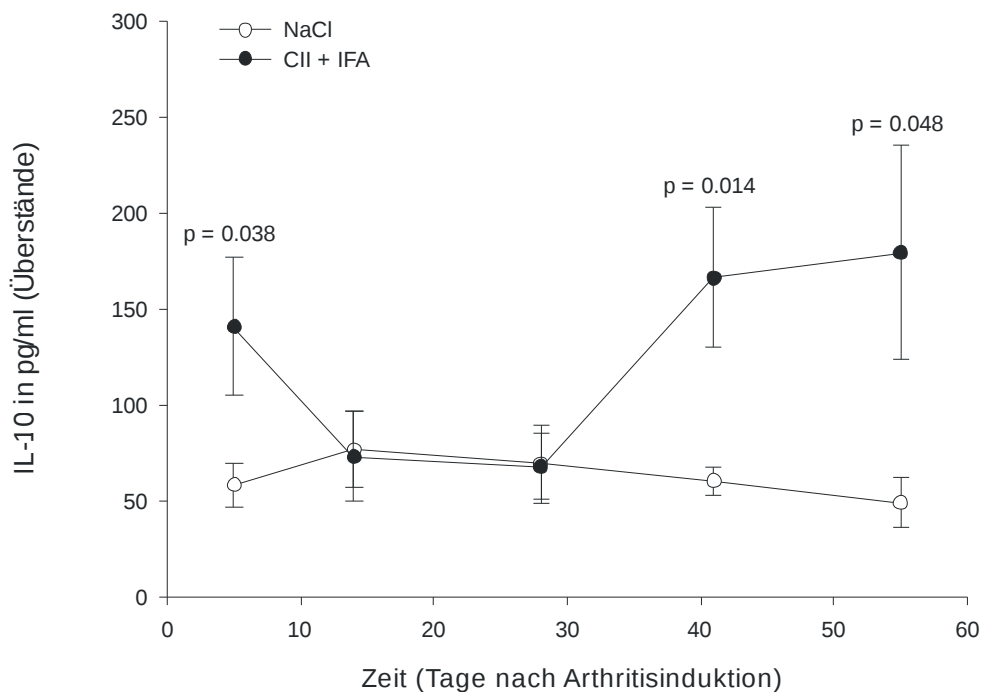


Abb. 4.12: IL-10 Konzentration in den Überständen drainierender Lymphknotenzellen. Verglichen mit der Kontrollgruppe war die ex vivo Produktion von IL-10 bei CIA-Ratten am Tag 5 und an den Tagen 41-55 signifikant erhöht. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 7-9 Tieren je Zeitpunkt und Gruppe, (MWU-Test).

4.2.3 Plasma-Corticosteron

Von den an den Tagen 0, 5, 14, 28, 41 und 55 getöteten Ratten wurden die Plasma-Corticosteron-Konzentrationen bestimmt. Ein signifikanter Unterschied des Plasma-Corticosterons wurde am Tag 5 nach Arthritisinduktion beobachtet, wobei die Corticosteron-Konzentration bei den CIA-Ratten deutlich höher war als bei den Kontrolltieren (Abb. 4.13). Im weiteren Arthritisverlauf sanken die Corticosteron-Spiegel der CIA-Ratten unter die Ausgangswerte (inadäquate Sekretion).

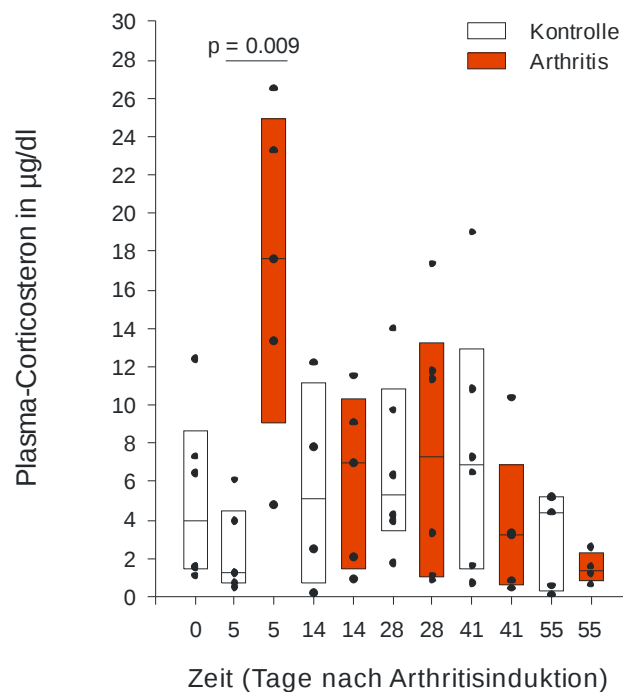


Abb. 4.13: Plasma-Corticosteron-Konzentrationen bei immunisierten Ratten und Kontrollen. Bei immunisierten Tieren war die Corticosteron-Konzentration lediglich am Tag 5 signifikant höher als bei Kontrolltieren. 6 Tiere je Gruppe und Zeitpunkt, Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

4.2.4 Plasma-Adrenalin und -Noradrenalin

Des Weiteren wurden die Plasma-Katecholamin-Konzentrationen bestimmt. Während die Plasma-Adrenalin-Spiegel immunisierter Ratten an den Tagen 14-28 signifikant höher waren als die der Kontrolltiere (Abb. 4.14), konnte nur ein kleiner Anstieg der Plasma-Noradrenalin-Spiegel bei arthritischen Ratten beobachtet werden (Abb. 4.15).

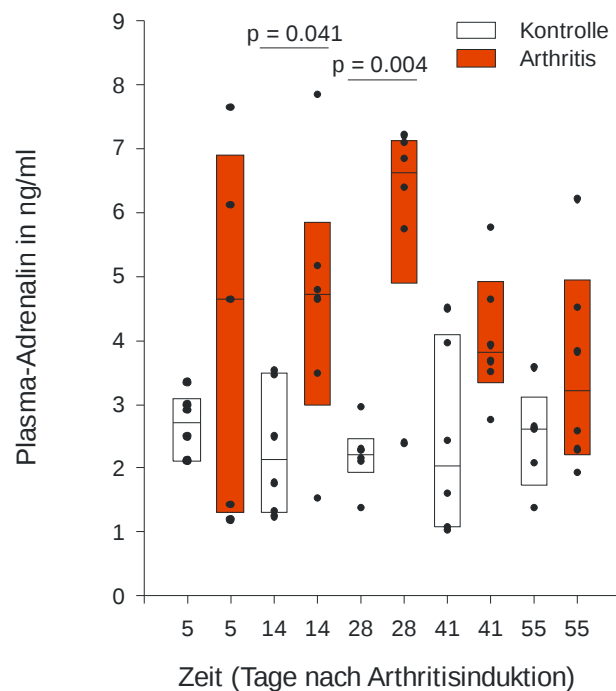


Abb. 4.14: Plasma-Adrenalin-Konzentrationen bei immunisierten Ratten und Kontrollen. Bei immunisierten Tieren war die Adrenalin-Konzentration an den Tagen 14-28 signifikant höher als bei Kontrolltieren. 6 Tiere je Gruppe und Zeitpunkt, Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

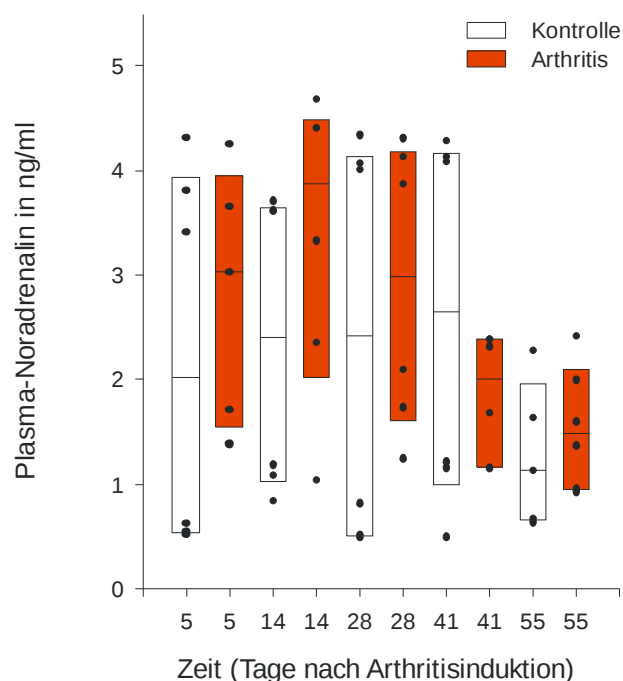


Abb. 4.15: Plasma-Noradrenalin-Konzentrationen bei immunisierten Ratten und Kontrollen. Bei immunisierten Tieren war ein geringer Anstieg der Noradrenalin-Konzentration bis zum Tag 28 zu beobachten. 6 Tiere je Gruppe und Zeitpunkt, Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

4.2.5 Sympathische und sensible Nervenfasern im Synovialgewebe

Die Pfoten von DA-Ratten, die an den Tagen 14, 28, 41 oder 55 nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung bzw. CII in IFA getötet wurden, wurden entnommen und sowohl sympathische Nervenfasern mittels eines Antikörpers gegen Tyrosin Hydroxylase, dem Schlüsselenzym der Katecholamin-Produktion, als auch sensible Nervenfasern mittels eines Antikörpers gegen Substanz P, dem Neurotransmitter sensibler Nervenfasern, quantitativ bestimmt (Abb. 4.16). Ein Rückgang der Dichte sympathischer Nervenfasern in der Gelenkregion war bei immunisierten DA Ratten bereits am Tag 14 nach Arthritisinduktion sichtbar, wenn auch das Signifikanzniveau noch nicht erreicht wurde. Jedoch vom Tag 28 bis zum Ende des Versuches (Tag 55) wurde eine signifikant niedrigere Dichte sympathischer Nervenfasern bei immunisierten Tieren beobachtet (Abb. 4.16). Bezüglich der Dichte sensibler Nervenfasern in der Gelenkregion ergaben sich im Gegensatz dazu keine Unterschiede im Zeitverlauf und zwischen immunisierten und

Kontrolltieren (Abb. 4.16). Die Abb. 4.17 zeigt repräsentative Mikrophotographien Fluoreszenz-gefärbter sympathischer Nervenfasern eines arthritischen Gelenkes und eines normalen Gelenkes bei einer 400-fachen Vergrößerung.

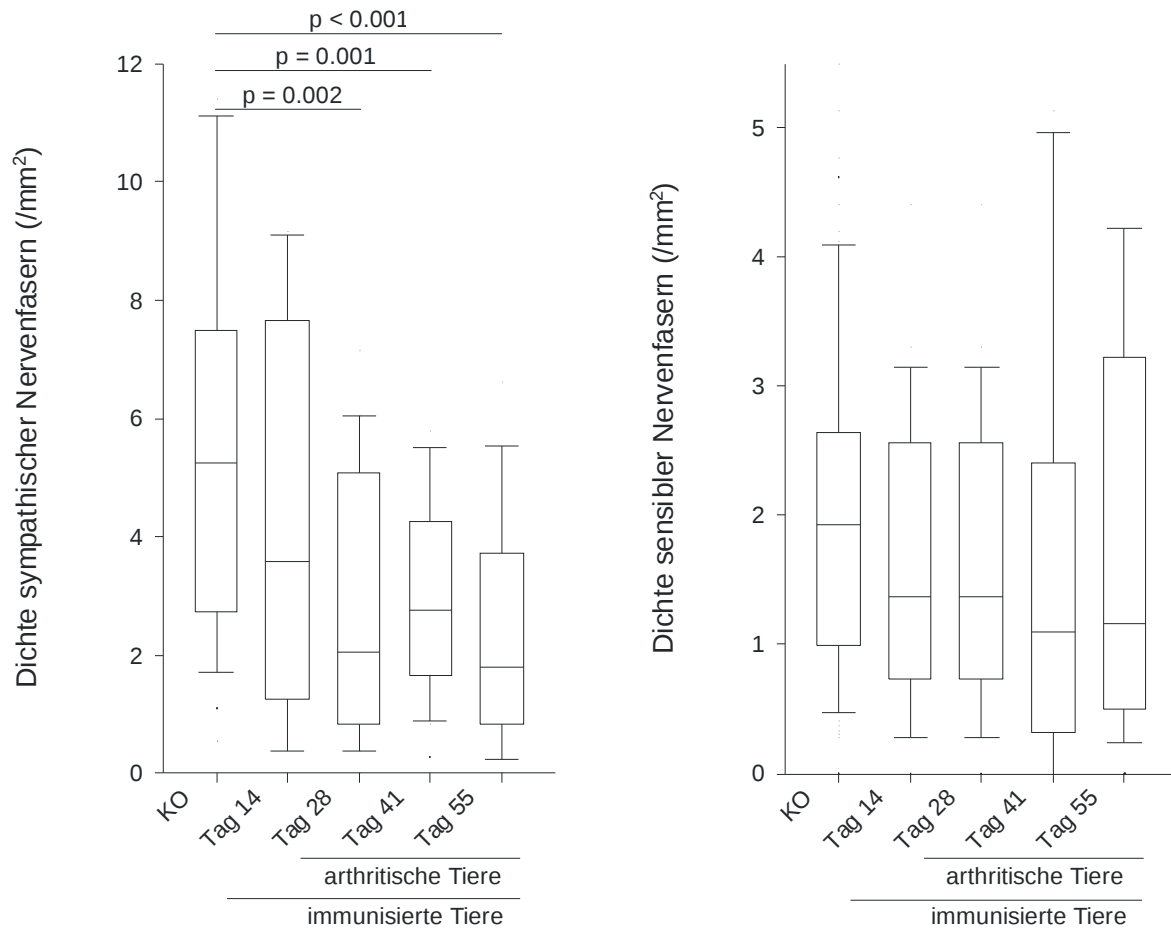


Abb. 4.16: Quantifizierung der Dichte sympathischer (links) und sensibler (rechts) Nervenfasern. Im Verlauf der Arthritis kommt es zu einem signifikanten Rückgang sympathischer Nervenfasern in der Gelenkregion (links), wohingegen die Dichte sensibler Nervenfasern im Krankheitsverlauf unverändert bleibt (rechts). Es wurden 18-23 Gelenkregionen von mindestens 4 arthritischen Ratten je Zeitpunkt untersucht und 46 Gelenkregionen wurden bei 10 Kontrolltieren untersucht. Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

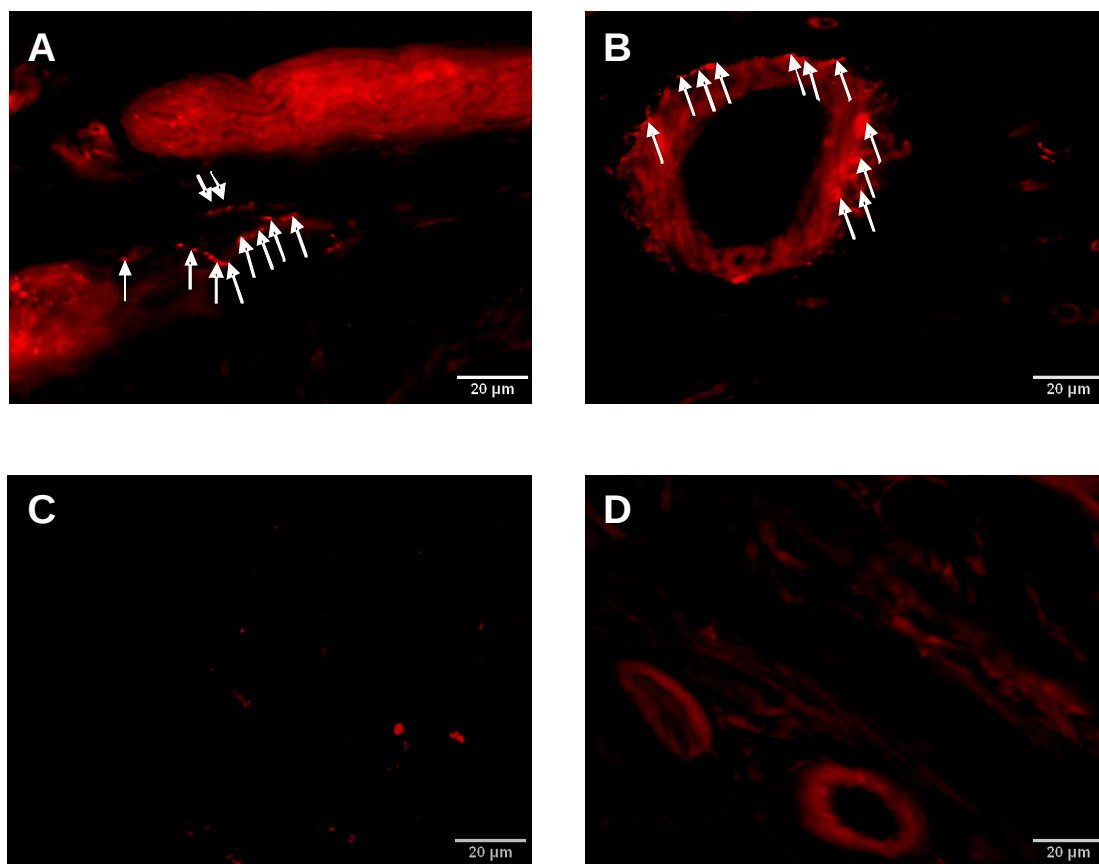


Abb. 4.17: Repräsentative Mikrophotographien Fluoreszent-gefärbter sympathischer Nervenfasern arthritischer **C,D** und gesunder **A, B** Gelenkregionen. **A, B:** Die Pfeile weisen auf die sympathischen Nervenfasern in der Gelenkregion einer gesunden Ratte, wobei **A** eine Region ohne Gefäße und **B** eine Region mit Gefäßen zeigt. **C, D:** Bei der arthritischen Ratte waren weder in der Gelenkregion ohne Gefäße noch in der gefäßreichen Region sympathische Nervenfasern nachweisbar (400-fache Vergrößerung).

4.2.6 Neurotransmitter und ihre Metaboliten im ZNS

Im Hypothalamus der an den Tagen 0, 5, 14, 28 und 55 getöteten DA Ratten wurden die Konzentrationen monoaminerger Neurotransmitter und ihrer Metaboliten bestimmt. Dabei ergaben sich signifikante Unterschiede ($p < 0.05$) in der hypothalamischen Noradrenalin-Konzentration zwischen der Kontrollgruppe und den immunisierten Tieren, wobei bei den immunisierten Tieren in der symptomatischen Phase der Arthritis (Tag 28-55) eine signifikant höhere hypothalamische Noradrenalin-Konzentration nachweisbar war als bei den Kontrollen (Abb. 4.18). Die Abb. 4.19 zeigt, dass auch die hypothalamischen Serotonin-Spiegel bei immunisierten Tieren am Tag 55 signifikant höher waren als bei den

Kontrolltieren. Bezüglich der Konzentrationen von Dopamin, MHPG und 5-HIAA im Hypothalamus ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den immunisierten Tieren und den Kontrolltieren. Auch konnten keine Veränderungen in der Konzentration der Neurotransmitter und ihrer Metaboliten in den anderen untersuchten Hirnarealen nachgewiesen werden (Pons und Medulla oblongata).

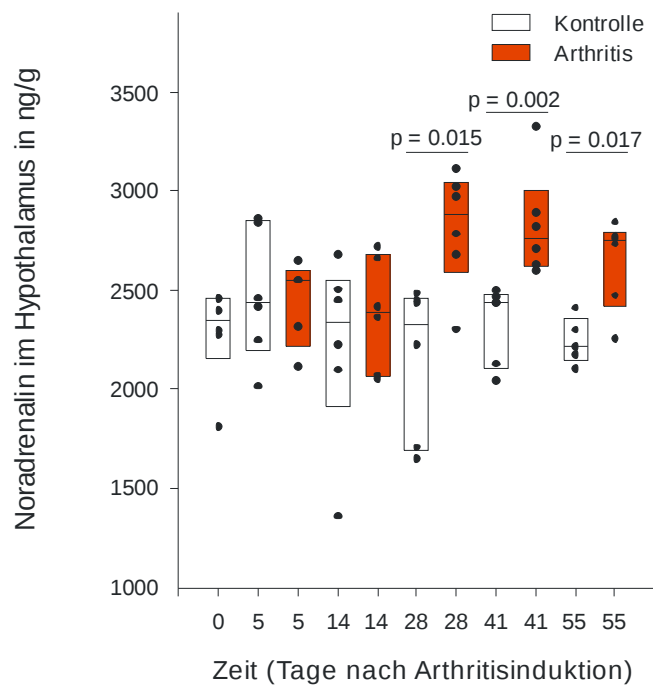


Abb. 4.18: Noradrenalin-Konzentration im Hypothalamus bei immunisierten Ratten und Kontrollen. Bei immunisierten Tieren zeigte sich in der symptomatischen Phase ein signifikanter Anstieg der Noradrenalin-Konzentration. Insgesamt 6 Tiere je Gruppe und Zeitpunkt, Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

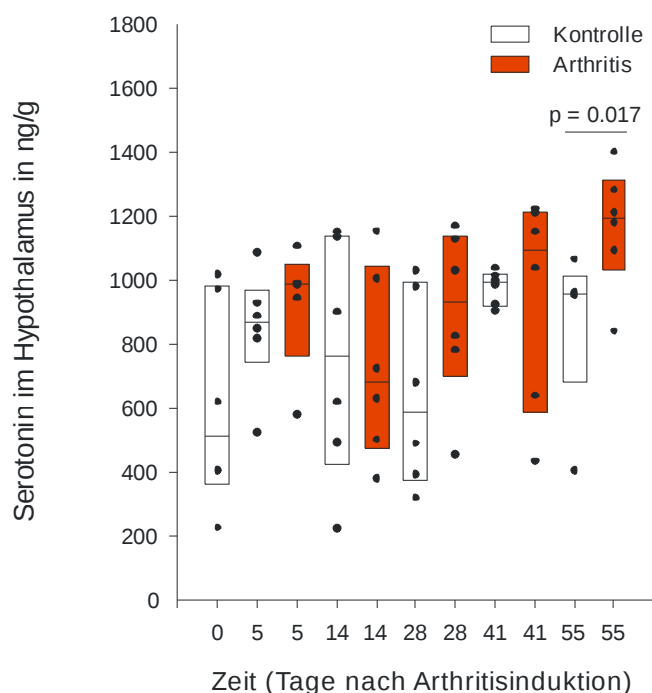


Abb. 4.19: Serotonin-Konzentration im Hypothalamus bei immunisierten Ratten und Kontrollen. Bei immunisierten Tieren zeigte sich am Tag 55 ein signifikanter Anstieg der Serotonin-Konzentration. Insgesamt 6 Tiere je Gruppe und Zeitpunkt, Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

4.2.7 Zytokine im ZNS

Neben den Neurotransmitter-Konzentrationen, die im rechten Teil des Hypothalamus bestimmt wurden, wurde in der linken Hälfte des Hypothalamus der an den Tagen 0, 5, 14, 28 und 55 getöteten DA Ratten die relative Genexpression verschiedener Zytokine bestimmt. Dabei waren zu keiner Zeit signifikante Veränderungen in der TNF Genexpression nachweisbar (Abb. 4.20). Aber bezüglich der IL-1 β Genexpression im Hypothalamus ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den immunisierten Tieren, wobei die IL-1 β Genexpression nur bei den immunisierten Tieren an den Tagen 5 und 14 nach Arthritisinduktion signifikant erhöht war (Abb. 4.21). Zudem wurde bei immunisierten Tieren ein signifikanter Anstieg der hypothalamischen IL-6 Genexpression am Tag 28 beobachtet (Abb. 4.22). Die Werte sind dargestellt als relative Veränderung der Genexpression im Verhältnis zum Grundniveau (Kontrollen).

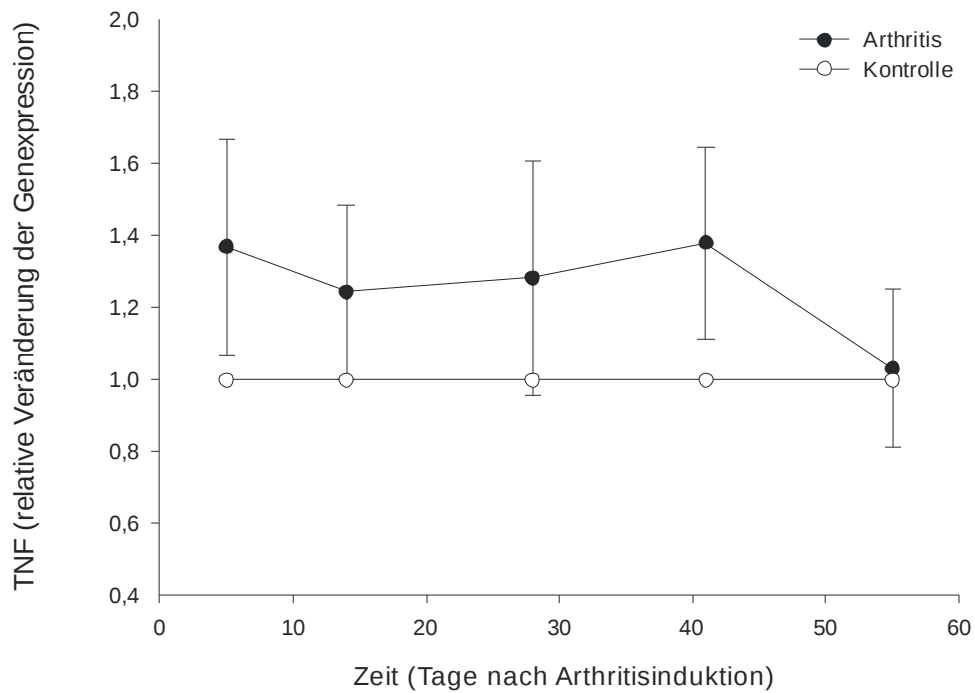


Abb. 4.20: Relative TNF Genexpression im linken Hypothalamus bei arthritischen Tieren und Kontrolltieren. Es waren keine signifikanten Veränderungen nachweisbar. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 7-9 Tieren je Zeitpunkt und Gruppe, (MWU-Test).

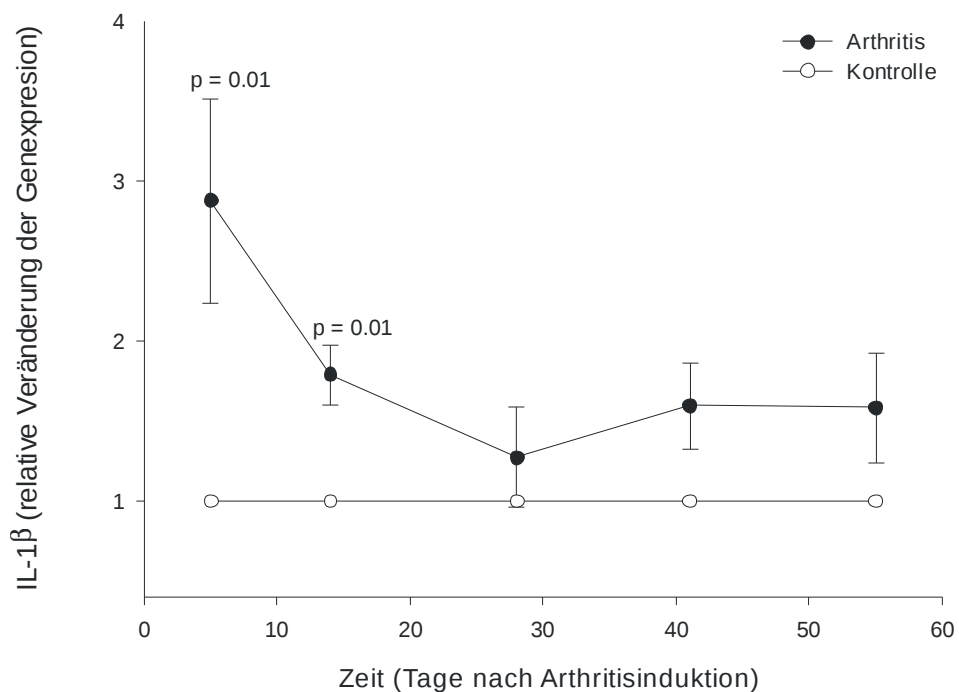


Abb. 4.21: Relative IL-1 β Genexpression im linken Hypothalamus bei arthritischen Tieren und Kontrolltieren. An den Tagen 5 und 14 war die IL-1 β Genexpression bei immunisierten Tieren signifikant erhöht. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 7-9 Tieren je Zeitpunkt und Gruppe, (MWU-Test).

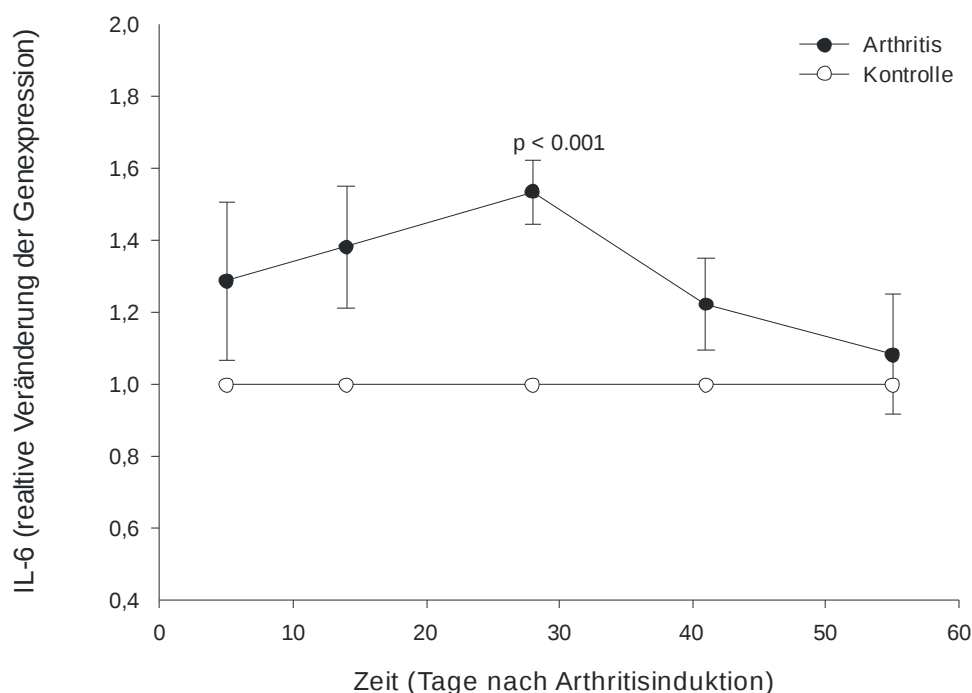


Abb. 4.22: Relative IL-6 Genexpression im linken Hypothalamus bei arthritischen Tieren und Kontrolltieren. Am Tag 28 war die IL-6 Genexpression bei immunisierten Tieren signifikant erhöht. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM von 7-9 Tieren je Zeitpunkt und Gruppe, (MWU-Test).

4.2.8 Korrelation von IL-1 β und Noradrenalin im Hypothalamus

Interessanterweise ergaben sich signifikante Korrelationen zwischen der IL-1 β Genexpression und der Noradrenalin-Konzentration im Hypothalamus bei den drei Kontrollgruppen (NaCl, CII, IFA) (Abb. 4.23 - Abb. 4.25), während bei den arthritischen Tieren (CII + IFA) keine solche Korrelation beobachtet werden konnte (Abb. 4.26). Für die Berechnung der Korrelation wurden zum einen die Werte der Noradrenalin-Konzentrationen und zum anderen die Umkehrfunktion der kleinsten Anzahl der Zyklen, die nötig sind, um die Expression des Gens nachzuweisen (nach Normalisierung auf das Referenzgen, höhere Werte zeigen eine höhere Expression an) verwendet. Dargestellt sind die Noradrenalin-Konzentrationen im rechten Hypothalamus und IL-1 β Genexpression im linken Hypothalamus bei individuellen Ratten der vier Gruppen (NaCl, CII, IFA, CII + IFA) (Abb. 4.23 - Abb. 4.26).

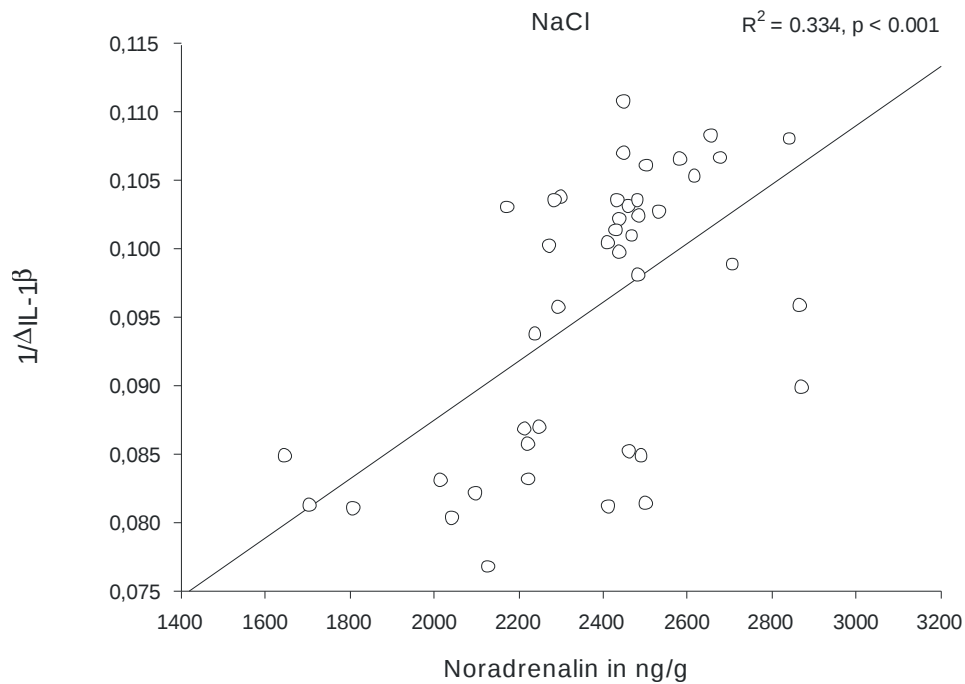


Abb. 4.23: Noradrenalin-Konzentrationen und IL-1 β Genexpression im Hypothalamus bei Ratten der NaCl-Kontrollgruppe (n = 43). Die lineare Regressionslinie und der zugehörige Spearman Korrelationskoeffizient sind dargestellt.

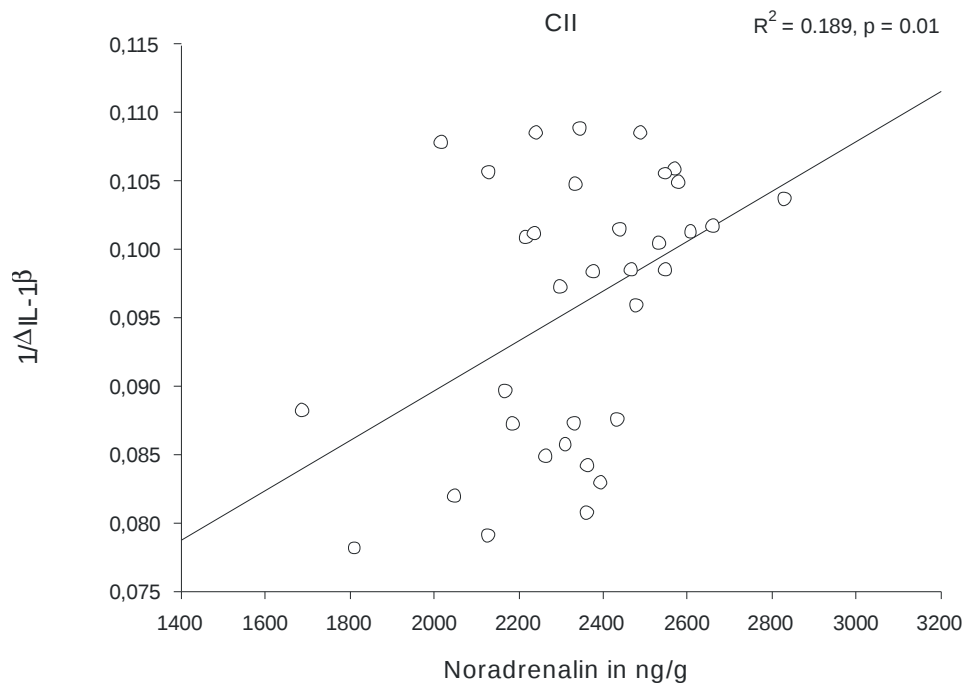


Abb. 4.24: Noradrenalin-Konzentrationen und IL-1 β Genexpression im Hypothalamus bei Ratten der CII-Kontrollgruppe (n = 34). Die lineare Regressionslinie und der zugehörige Spearman Korrelationskoeffizient sind dargestellt.

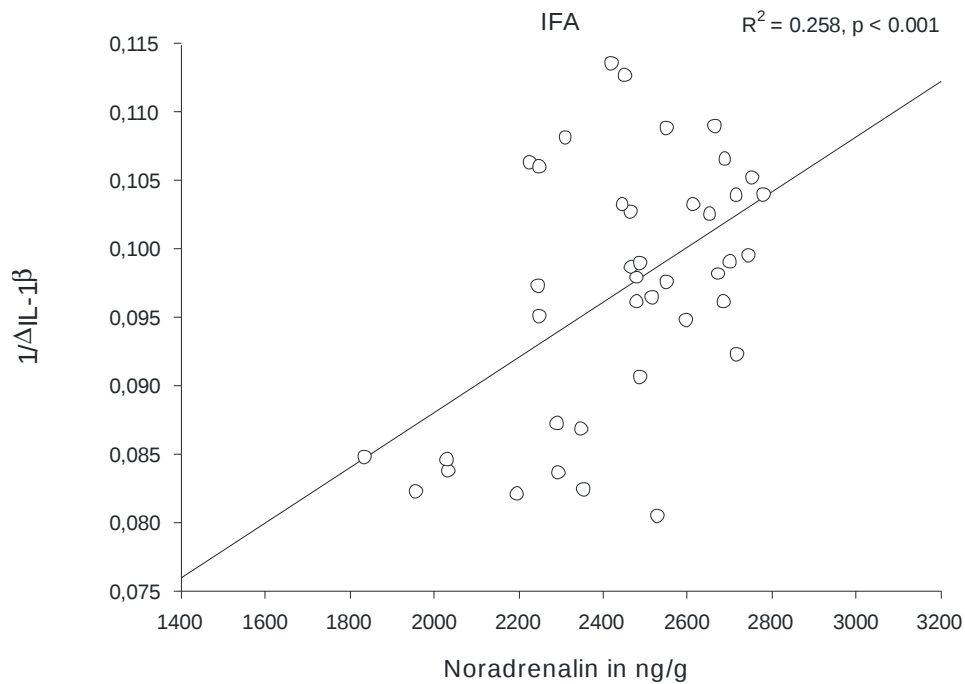


Abb. 4.25: Noradrenalin-Konzentrationen und IL-1 β Genexpression im Hypothalamus bei Ratten der IFA-Kontrollgruppe (n = 40). Die lineare Regressionslinie und der zugehörige Spearman Korrelationskoeffizient sind dargestellt.

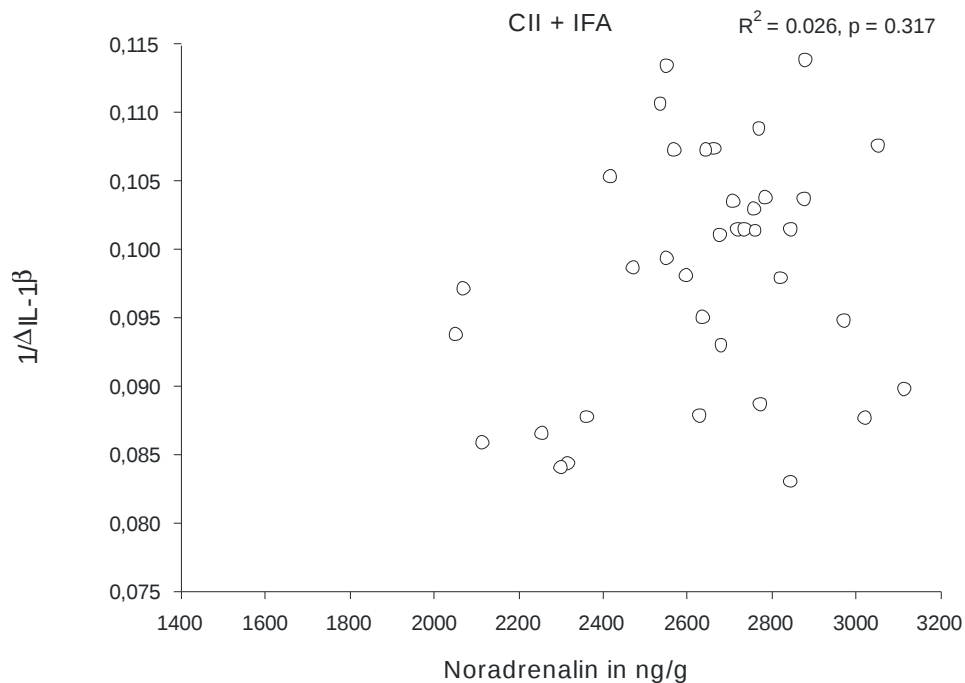


Abb. 4.26: Noradrenalin-Konzentrationen und IL-1 β Genexpression im Hypothalamus bei Ratten der CII + IFA immunisierten Tieren (n = 41). Die lineare Regressionslinie und der zugehörige Spearman Korrelationskoeffizient sind dargestellt.

4.2.9 Zentrale Ausschaltung von Noradrenalin

Aufgrund des beobachteten Anstieges der hypothalamischen Noradrenalin-Konzentration während der symptomatischen Phase der Arthritis wurden Experimente durchgeführt, bei denen die noradrenergen Neuronen zu verschiedenen Zeiten während der Arthritis (Tag 18 bzw. Tag 25 nach Induktion der Arthritis) und 14 Tage vor der Arthritisinduktion zentral mittels Injektion von 6-OHDA (i.c.v.) ausgeschaltet wurden. Diese Experimente sollten zeigen, ob die Depletion zentraler noradrenerger Neuronen einen Effekt auf den Arthritis-Verlauf hat. Bezüglich des Arthritis-Schweregrades waren jedoch im Vergleich zur Kontrolle keine Unterschiede zwischen den Gruppen nachweisbar, bei denen an den Tagen 18 (Daten nicht gezeigt) bzw. 25 (Abb. 4.27) noradrenerge Neuronen ausgeschaltet wurden. Die Gruppe aber, bei der die Noradrenalin-Depletion 14 Tage vor Arthritisauslösung durchgeführt wurde, hatte im Zeitverlauf einen signifikant geringeren Arthritis-Score als die NaCl-Kontrollgruppe (Abb. 4.28).

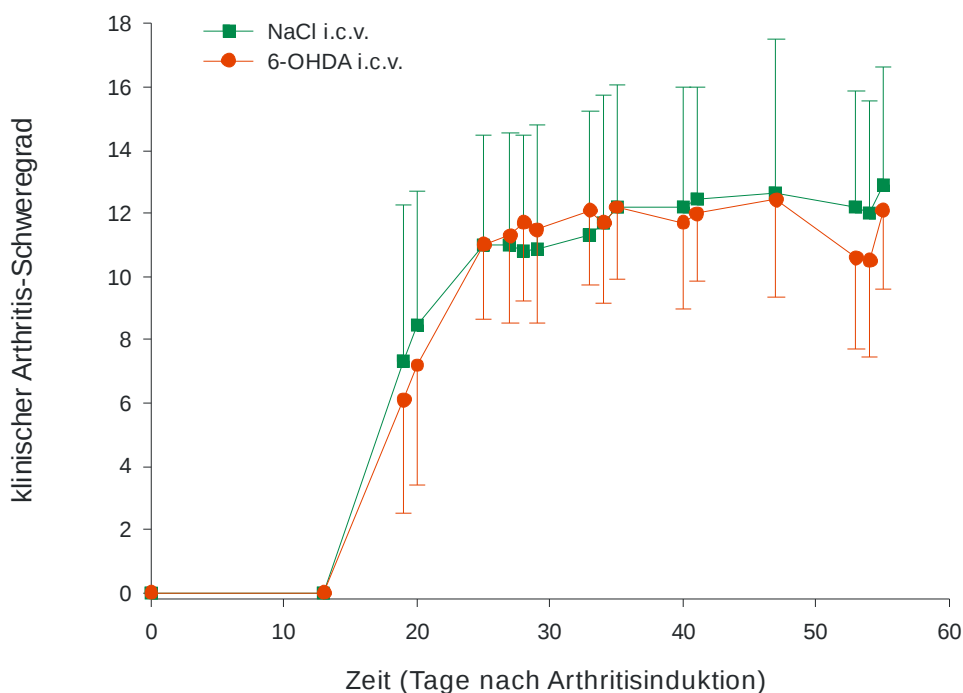


Abb. 4.27: Eine zentrale Noradrenalin-Depletion (6-OHDA i.c.v., n = 10) am Tag 25 ergab keine Veränderung des Arthritis-Schweregrades im Vergleich zu Kontrolltieren (NaCl i.c.v., n = 9). Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

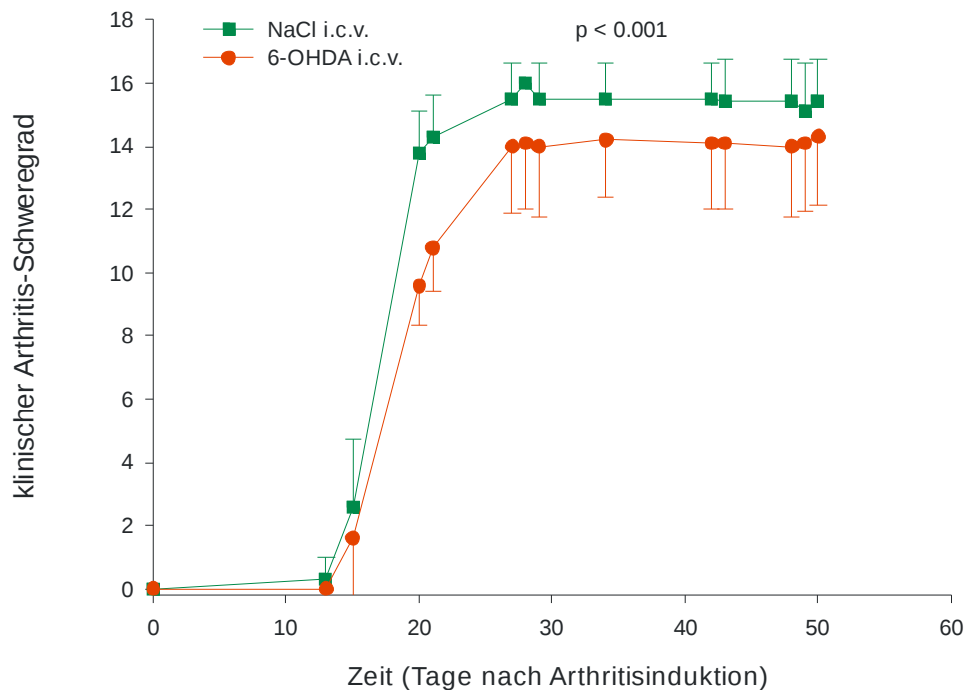


Abb. 4.28: Eine zentrale Noradrenalin-Depletion (6-OHDA i.c.v., $n = 10$) am Tag 14 vor Arthritisinduktion ergab einen signifikant geringeren Arthritis-Score im Vergleich zu Kontrolltieren (NaCl i.c.v., $n = 10$). Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM, (GLM).

4.2.10 Zentrale Ausschaltung von Serotonin

Da ebenfalls ein Anstieg der hypothalamischen Serotonin-Konzentration in der späten symptomatischen Phase der Arthritis beobachtet wurde und ein Effekt (wenn auch nur in einem kleinen Zeitfenster von 2 Tagen) der zentralen Noradrenalin-Ausschaltung 14 Tage vor Arthritisinduktion nachweisbar war, wurde auch ein Experiment durchgeführt, in dem die serotoninergeren Neuronen 14 Tage vor der Arthritisinduktion zentral mittels Injektion von 5,7-DHT (i.c.v.) ausgeschaltet wurden. Interessanterweise ergaben sich hierbei deutliche Unterschiede bezüglich des Arthritis-Schweregrades zwischen den Gruppen, (Abb. 4.29).

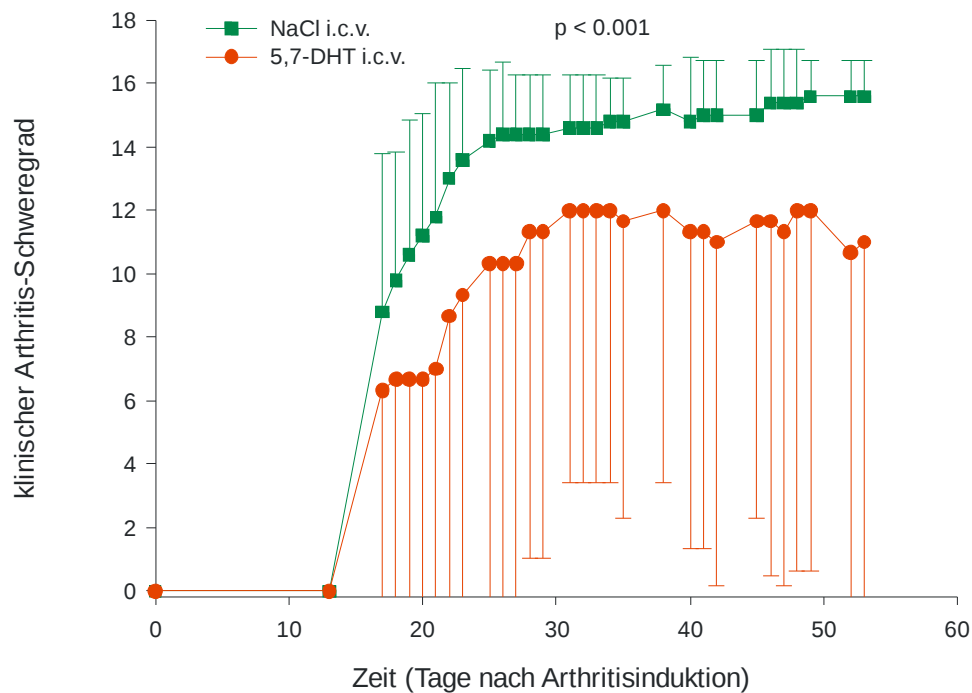


Abb. 4.29: Eine zentrale Serotonin-Depletion (5,7-DHT i.c.v., n = 3) am Tag 14 vor Arthritisinduktion ergab einen signifikant geringeren Arthritis-Score im Vergleich zu Kontrolltieren (NaCl i.c.v., n = 5). Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM, (GLM).

4.2.11 Quintessenz

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass bei immunisierten DA Ratten ab dem Tag 21 nach Arthritisinduktion bis zum Versuchsende am Tag 55 stärkste Arthritis-Symptome auftreten. Ein weiteres Zeichen für das Vorhandensein einer robusten peripheren Inflammation bei immunisierten Tieren war die starke periphere Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF und $\text{IFN-}\gamma$ in Lymphknotenzellen zu allen untersuchten Zeitpunkten während des Krankheitsverlaufes. Aber in Relation zum Schweregrad der Inflammation waren die Corticosteron-Spiegel in der symptomatischen Phase der Arthritis inadäquat niedrig, was den Funktionsverlust der HHN-Achse anzeigt. Außerdem wurde im Verlauf der CIA, ähnlich wie in der chronischen Phase bei RA Patienten, eine Hyperaktivität des SNS (hohe Adrenalin-Spiegel) bei gleichzeitigem Verlust sympathischer Nervenfasern im Synovialgewebe festgestellt. Des Weiteren haben die Ergebnisse gezeigt, dass die Neurotransmitter Noradrenalin und Serotonin in der symptomatischen Krankheitsphase im Hypothalamus signifikant erhöht waren. Jedoch hat

eine zentrale Ausschaltung noradrenerger Neuronen in der symptomatischen Phase der CIA keine Auswirkungen auf den Arthritisverlauf gezeigt. Dagegen führte eine zentrale Sympathektomie 14 Tage vor der Arthritisinduktion zu einer Verbesserung der Arthritis innerhalb des Beobachtungszeitraumes, was auf einen negativen Einfluss des zentralen Noradrenalins in der frühen Phase der CIA schließen lässt. Die Depletion serotoninerger Neuronen 14 Tage vor der Arthritisinduktion führte ebenfalls zu einem niedrigeren Arthritis-Score, was auf einen negativen Einfluss von zentralem Serotonin auf die CIA hinweist. Im Gegensatz zu den erhöhten Neurotransmitter-Konzentrationen im Hypothalamus in der symptomatischen Krankheitsphase waren die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 nur in der asymptomatischen Phase bzw. am Tag 28 im Hypothalamus verstärkt exprimiert, was jedoch nicht zu einer HHN-Achsen-Aktivierung an den Tagen 14 und 28 führte. Schließlich wurde gezeigt, dass bei den Kontrollgruppen eine Korrelation zwischen der hypothalamischen IL-1 β Genexpression und der hypothalamischen Noradrenalin-Konzentration besteht. Interessanterweise war eine solche Korrelation bei immunisierten DA Ratten nicht nachweisbar.

4.3 Nebenniere

4.3.1 Cholesterin in der Nebennierenrinde

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass es im Verlauf der CIA zu einer inadäquaten Sekretion von Corticosteron in Relation zum Schweregrad der Inflammation kommt. Um zu prüfen, ob eine mangelhafte Cholesterin-Speicherung in die Nebenniere zur Insuffizienz der Nebenniere während der CIA beiträgt, wurde der Cholesteringehalt der Nebennieren der an den Tagen 0, 5, 14, 28, 41 und 55 getöteten immunisierten Ratten und der NaCl-Kontrollgruppe untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass bei arthritischen Ratten am Tag 28 signifikant mehr Cholesterin in der Nebennierenrinde nachweisbar war als bei Kontrolltieren (Abb. 4.30). An den anderen Tagen ergaben sich hinsichtlich des Cholesteringehaltes in der Nebennierenrinde keine Unterschiede zwischen immunisierten und Kontrolltieren.

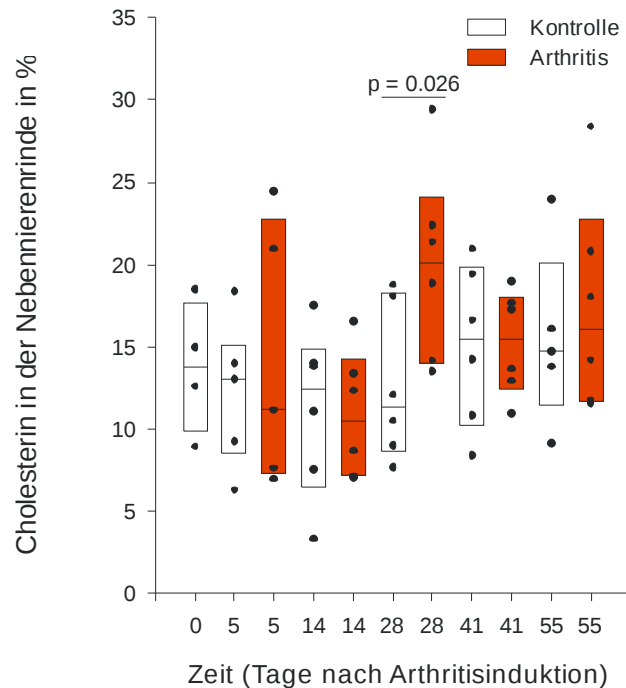


Abb. 4.30: Cholesterin in der Nebennierenrinde. Am Tag 28 war bei immunisierten DA Ratten signifikant mehr Cholesterin in der Nebennierenrinde nachweisbar als bei Kontrolltieren. Dargestellt ist die Prozentzahl positiver Pixel in Relation zur Gesamtzahl der Pixel. Insgesamt 6 Tiere je Gruppe und Zeitpunkt, Tag 0: n=4, Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

4.3.2 SR-BI in der Nebennierenrinde

Des Weiteren sollte geprüft werden, ob ein Problem in der Cholesterylester-Aufnahme in adrenokortikale Zellen zur Nebenniereninsuffizienz während der CIA beiträgt. Da der SR-BI die zelluläre Aufnahme von Cholesterylester in adrenokortikale Zellen vermittelt, wurde die SR-BI Expression in der Nebennierenrinde von Nebennieren der an den Tagen 0, 5, 14, 28, 41 und 55 getöteten immunisierten und Kontrolltiere untersucht. Dabei zeigte sich, dass die SR-BI Expression in der Nebennierenrinde immunisierter DA Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren nur am Tag 5 erhöht war (Abb. 4.31). Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden.

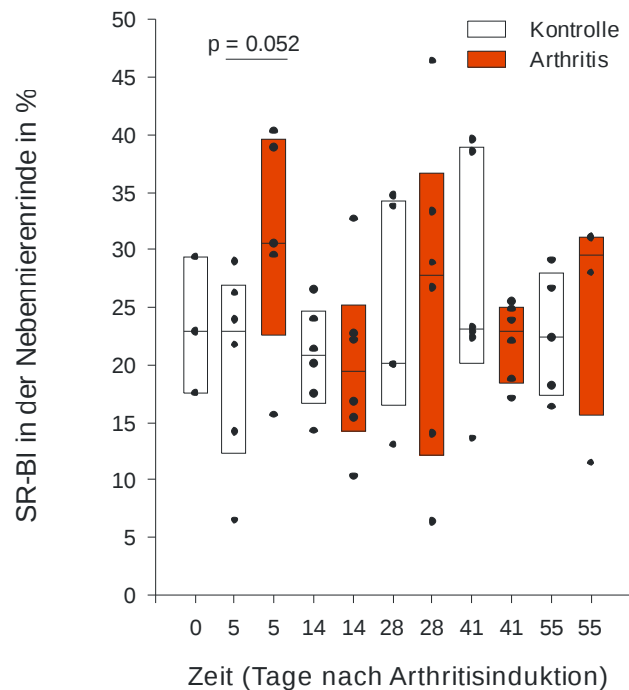


Abb. 4.31: SR-BI Expression in der Nebennierenrinde. Am Tag 5 war die SR-BI Expression in der Nebennierenrinde immunisierter DA Ratten im Vergleich zu Kontrolltieren erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten jedoch zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Dargestellt ist die Prozentzahl positiver Pixel in Relation zur Gesamtzahl der Pixel. Insgesamt 6 Tiere je Gruppe und Zeitpunkt, Tag 0: n=4, Box-Plots mit 10., 25., 50. (Medianwert), 75. und 90. Perzentil, (MWU-Test).

4.3.3 Quintessenz

Die Abb. 4.32 stellt die Ergebnisse des letzten Teiles dieser Arbeit zusammenfassend dar. In der Immunisierungsphase (Tag 5) konnte die Nebenniere mit einer adäquaten Corticosteron-Produktion reagieren. Jedoch, während der chronischen Phase der Arthritis waren die Corticosteron-Level in Relation zur robusten peripheren Inflammation, die sich u.a. in der starken Arthritis-Symptomatik zeigt, inadäquat niedrig. Zu keinem Zeitpunkt während der CIA konnten allerdings inadäquat niedrige Cholesterin-Konzentrationen oder aber eine inadäquat niedrige Expression des SR-BI in der Nebennierenrinde nachgewiesen werden, so dass kein Defekt in der Cholesterin-Speicherung bzw. der Cholesterin-Aufnahme für die Nebenniereninsuffizienz verantwortlich zu sein scheint.

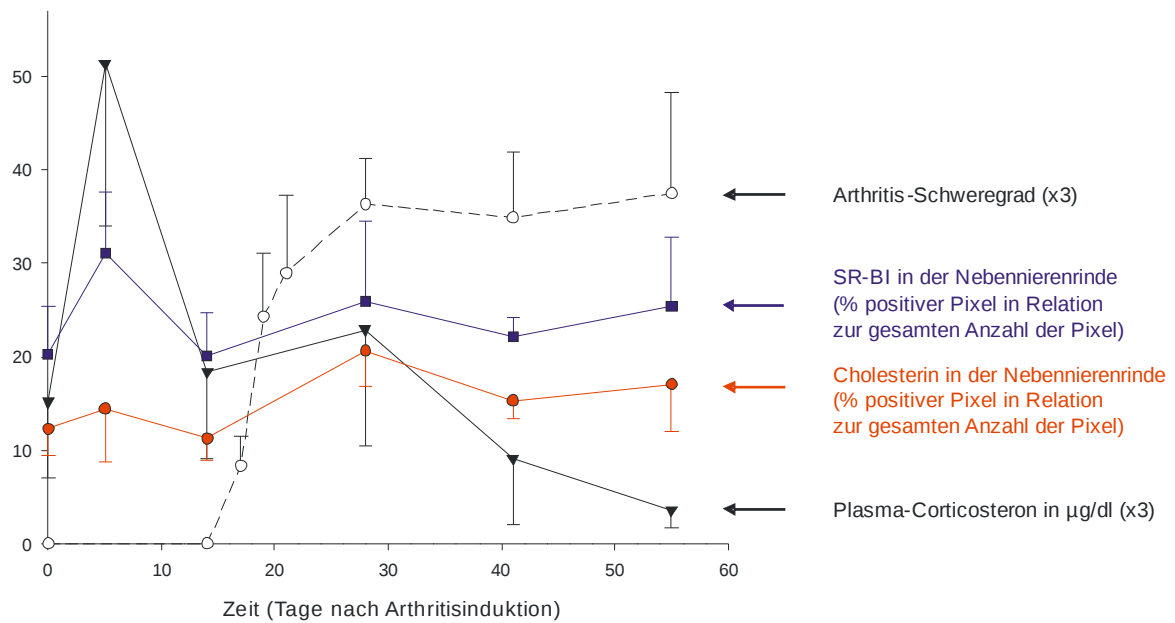


Abb. 4.32: Zusammenfassend dargestellt sind der klinische Arthritis-Schweregrad (Werte multipliziert mit 3), die Plasma-Corticosteron-Konzentration (Werte multipliziert mit 3), der Cholesterin-Gehalt der Nebennierenrinde und die SR-BI Expression in der Nebennierenrinde. Erklärung im Text. Werte sind Mittelwerte $\pm$ SEM.

5 Diskussion

5.1 Psychosozialer Stress

Es wurde vielfach gezeigt, dass psychosozialer Stress durch Beeinflussung des neuroendokrinen Systems und des Immunsystems den Ausbruch und Verlauf verschiedener inflammatorischer Erkrankungen wie RA modulieren kann. Allerdings gibt es nur wenige Studien, die den Einfluss von chronischem psychosozialem Stress auf den Arthritisverlauf untersucht haben. Deshalb wurde in dieser Arbeit die Hypothese geprüft, inwiefern psychosozialer Stress während der experimentellen Arthritisauslösung die Suszeptibilität und den Krankheitsverlauf beeinflusst.

Bezüglich des Zeitpunktes des Krankheitsausbruches konnten keine Unterschiede zwischen gestressten und Kontrolltieren festgestellt werden. Auch beim Menschen konnte bisher kein Zusammenhang zwischen Stress (akut oder chronisch) und dem Beginn der Arthritis hergestellt werden (223). Dagegen wurde in Experimenten am Tiermodell gezeigt, dass Wistar Ratten nach Stressexposition früher eine Arthritis entwickelten (39). Allerdings waren die Ratten in diesen Experimenten akuten Stressbedingungen ausgesetzt, die zudem zu einer gesteigerten Krankheitsaktivität führten. Das Gegenteil war in dieser Arbeit der Fall. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass psychosozialer Stress durch Dauerkonfrontation bei männlichen Wistar Ratten die Suszeptibilität für eine CIA reduziert und außerdem zu einer verminderten Arthritisausprägung führt, was die o.g. Hypothese bestätigt. Zu einem ähnlichen Ergebnis kam auch eine Studie an Long-Evans Ratten, in der lang anhaltender chronischer Stress, der allerdings auf Nahrungsentzug basierte, den Arthritis-Schweregrad verminderte (119). Andere Experimente kamen jedoch zu gegenteiligen Ergebnissen und haben gezeigt, dass chronischer psychosozialer Stress durch Over-Crowding zu einer verstärkten Arthritis-Symptomatik führte (206).

Für die Diskrepanzen der Ergebnisse in der Literatur, die Ergebnisse der vorliegenden Studie eingeschlossen, sind verschiedene Erklärungen vorstellbar. Zum einen wurden jeweils andere Tierstämme, unterschiedliche Stressmodelle und auch verschiedene Tiermodelle der Arthritis (AA, CIA) verwendet, die möglicherweise nicht direkt miteinander vergleichbar sind. Zum anderen unterschieden sich die Dauer und vermutlich auch die Intensität des Stresses in den genannten Studien voneinander, auch wenn alle untersuchten Stress-Bedingungen dem chronischen Stress zuzuordnen sind. So begann die

Stressexposition durch Nahrungsentzug und Over-Crowding 14 Tage vor der Arthritisinduktion und dauerte 14 weitere Tage an (119;206), während der Konfrontationsstress in dieser Arbeit 7 Tage im Immunisierungszeitraum stattfand und aufgrund der starken Intensität auch nicht länger durchführbar war.

Insgesamt wurde durch die vorliegenden Ergebnisse die Stressspektrum-Hypothese (1.3.1) (62), die besagt, dass bei chronischem und schwerem Stress Autoimmunkrankheiten unterdrückt werden, bestätigt. Diese Hypothese basiert allerdings darauf, dass chronischer Stress in einem stark erhöhten endogenen Tonus der Stressachsen resultiert, der u.a. durch hohe Konzentrationen an Cortisol bzw. Corticosteron und Noradrenalin gekennzeichnet ist, deren immunsuppressive Eigenschaften zur Unterdrückung von Autoimmunkrankheiten wie RA führen. Die peripheren Katecholamine wurden in dieser Studie jedoch nicht untersucht, so dass die Frage, ob und in welchem Umfang Katecholamine bei der hier beobachteten Stress-induzierten Verminderung des Arthritis-Schweregrades und der geringeren Suszeptibilität für die CIA eine Rolle spielen, an dieser Stelle nicht geklärt werden kann.

Als Parameter der HHN-Achse wurde in dieser Arbeit die Plasma-Corticosteron-Konzentration bestimmt. Jedoch waren bei gestressten Tieren keine erhöhten Corticosteron-Spiegel nachweisbar. Selbst am Tag der Immunisierung (Tag 0) also am 4. Tag der Stressexposition konnten keine erhöhten Corticosteron-Level bei gestressten Tieren festgestellt werden. In der Literatur gibt es diesbezüglich kontroverse Ergebnisse. Einerseits wurde ein Anstieg des Plasma-Corticosterons nach 10-tägigem Konfrontationsstress beschrieben (189). Andererseits wurde, wie in dieser Arbeit, gezeigt, dass psychosozial gestresste Tiere bezüglich des Corticosterons keine Unterschiede zu Kontrolltieren aufwiesen (7;214;215) oder aber sogar niedrigere Corticosteron-Spiegel als nicht gestresste Tiere hatten (192), so wie es in der vorliegenden Studie am Tag 7 der Fall war. Wieder eine andere Untersuchung ergab, dass die Corticosteron-Konzentrationen bei Stresstieren lediglich am ersten Tag der Stressexposition signifikant erhöht waren und die Werte im weiteren Stressverlauf wieder auf die Basalwerte zurückgingen (83). Es wäre also durchaus denkbar, dass die Corticosteron-Konzentrationen auch bei den hier untersuchten Stresstieren zu Beginn des Stresses anstiegen, die Werte jedoch am 4. Tag der Stressexposition bereits wieder auf die Basalwerte abgefallen waren.

Insgesamt ist die Corticosteron-Antwort bei den in dieser Arbeit untersuchten gestressten Ratten in Relation zur Intensität des Stressors niedrig. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass bei lang anhaltender Stressdauer eine Adaptation erfolgt, um den Körper vor chronisch erhöhten Corticosteron-Konzentrationen und somit einer dauerhaft immunsuppressiven Situation zu schützen (62;63) und zu ermöglichen, dass auch bei neu auftretenden Stimuli noch eine Reaktion ausgelöst werden kann. Allerdings wurde gezeigt, dass adrenokortikale Zellen nach längerer Stressexposition auch nicht in der Lage waren, auf neue Stimuli mit einer adäquaten Corticosteron-Produktion zu reagieren (192), was wiederum durch eine Stress-induzierte Insuffizienz der Nebenniere erklärt werden könnte. Die vergleichbaren Corticosteron-Konzentrationen bei Stress- und Kontrolltieren legen die Vermutung nahe, dass andere Faktoren als Corticosteron bei der Stress-induzierten Verminderung des Arthritis-Schweregrades und der geringeren Suszeptibilität eine Rolle spielen. So unterstützen diese Daten die Hypothese von Chover-Gonzales et al., dass die Schwere der Inflammation nicht nur eine Konsequenz der Corticosteron-Aktivierung ist (39).

Interessanterweise waren keine Veränderungen der Corticosteron-Konzentrationen im Zeitverlauf bei Kontrolltieren nachweisbar. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde hingegen beobachtet, dass die Immunisierung mit CII und IFA bei DA Ratten am Tag 5 in einer signifikant erhöhten Produktion von Corticosteron resultierte. Ein Grund für diese Diskrepanzen könnte sein, dass hier ein anderer Rattenstamm untersucht wurde. Am Tag 7 waren bei den nicht gestressten Ratten allerdings signifikant höhere Corticosteron-Konzentrationen nachweisbar als bei den Stresstieren. Wenn man nur diesen einen Tag betrachtet und den Vergleich mit den Ausgangswerten außer Acht ließe, könnten diese höheren Corticosteron-Konzentrationen bei Kontrolltieren als Antwort auf die Immunisierung gedeutet werden, während Stesstiere nicht in der Lage waren auf diesen neuen Stimulus mit einer Corticosteron-Antwort zu reagieren (Adaptation, Nebenniereninsuffizienz).

Neben dem Arthritis-Schweregrad und der Corticosteron-Konzentration wurden in dieser Arbeit auch die Immunzell-Populationen bestimmt. So war die Zahl der Granulozyten und Monozyten bei Stresstieren signifikant höher als bei Kontrolltieren, während gleichzeitig die Zahl der zytotoxischen T-Zellen und Th-Zellen bei Stresstieren signifikant niedriger

war als bei Kontrollen. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse früherer Studien, die gezeigt haben, dass chronischer Stress zu einer Hemmung der spezifischen Abwehr (Lymphozyten) und zu einer Aktivierung unspezifischer Immunfunktionen (Granulozyten, Phagozytose) führte (75;214-217). Die Reduktion der zirkulierenden T-Zell-Subpopulationen wird in der Literatur oftmals auf die Wirkung der Glucocorticoide zurückgeführt, die sowohl die Migration der T-Zellen beeinflussen als auch die Apoptose von Thymozyten induzieren können (76). In dieser Arbeit konnten jedoch keine erhöhten Corticosteron-Spiegel bei Stresstieren nachgewiesen werden. Andererseits wird die Apoptose der Thymozyten auf erhöhte Konzentrationen an freiem Corticosteron, der aktiven Form dieses Glucocorticoids, zurückgeführt (166). Da in der vorliegenden Studie nur die Konzentration des gesamten Corticosterons gemessen wurde, könnte der beobachtete Effekt auf unterschiedliche Konzentrationen des freien Corticosterons zurückgeführt werden. Tatsächlich wurde von Stefanski et al. gezeigt, dass bei gestressten Tieren der Gesamt-Corticosteron-Gehalt unverändert war, jedoch die *Corticosterone binding globulin*-Bindungskapazität sank, was bedeutet, dass mehr freies Corticosteron zur Verfügung stand (214;215). Diese Hypothese gilt es allerdings zu bestätigen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass eine Adrenalectomie die Stress-induzierte Suppression der T-Lymphozyten verhinderte (75). Jedoch wurde bei der Entfernung der Nebennieren nicht nur die Quelle für Corticosteron, sondern auch die Quelle für Adrenalin entfernt, so dass prinzipiell beide Hormone für die Erniedrigung der T-Lymphozyten verantwortlich sein könnten.

Für die erhöhten Granulozyten- und Monozyten-Spiegel scheinen α - und β -adrenerge Mechanismen verantwortlich zu sein. So wurde die Stress-induzierte Granulozytose durch Applikation von α -adrenergen Antagonisten höchst effektiv verhindert (75). Zusätzlich verhinderte die Behandlung mit β -adrenergen Antagonisten den Stress-induzierten Anstieg der Monozyten und Granulozyten (75). Zusammengenommen scheint die Mobilisierung der Zellen der angeborenen Immun-Antwort durch Katecholamine reguliert zu werden, wobei die genauen Mechanismen der adrenergen Leukozyten-Mobilisierung allerdings noch unklar sind. Da die Katecholamine in dieser Arbeit aber nicht untersucht wurden, ist es ein weiteres Ziel, auch diese Hypothese zu bestätigen.

Betrachtet man die Veränderungen der Zellen des Immunsystems nach Stressexposition im Zusammenhang mit den Veränderungen hinsichtlich der Suszeptibilität und des Krankheitsverlaufes, kommt man zu dem Schluss, dass die Stress-induzierte Hemmung der spezifischen Immunabwehr und die Aktivierung der angeborenen Immunfunktion einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung einer CIA hat. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass T-Zellen eine bedeutende Rolle in der Immunisierungsphase der CIA spielen. Th-Zellen sind die prinzipiellen Regulatoren der Immunantwort, da sie für die Aktivierung der Effektorzellen (zytotoxische T-Zellen und Antikörper-produzierende B-Zellen) essentiell sind und zudem stark am Entzündungsgeschehen bei der CIA beteiligt sind. Ohne die Subpopulationen der T-Lymphozyten sind die Tiere geschützt oder entwickeln eine mildere Form der CIA. Obwohl die B-Zell-Populationen sich bei gestressten Tieren nicht von denen der Kontrolltiere unterscheiden, ist es wahrscheinlich, dass die Suppression der T-Zellen bei Stresstieren zu einer verminderten Antikörper-Produktion durch B-Zellen führt, was die Tiere wiederum vor der CIA schützt oder zu einer verminderten Arthritis-Ausprägung führt.

In der Literatur wurde gezeigt, dass die Veränderungen der Immunzellen nach Stressexposition nicht auf das Blut beschränkt sind, sondern auch die lymphatischen Organe wie Milz und Lymphknoten betreffen (189). Zudem könnte es auch zu einem veränderten Migrationsmuster der Immunzellen aus dem Blut in die lymphatischen Organe oder peripheren Gewebe und zurück ins Blut kommen (215). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit Makrophagen in den Lymphknoten und im Immunisierungsgebiet der Schwanzhaut untersucht. Diese ersten Daten bieten allerdings lediglich einen Ausblick auf weitere Untersuchungen, da ein größerer Zusammenhang erst hergestellt werden kann, wenn weitere Immunzellen in diesen Organen untersucht und verglichen worden sind. Bisher konnte gezeigt werden, dass bei nicht gestressten Kontrolltieren am Tag 4 und 14 signifikant mehr Makrophagen im Injektionsgebiet der Schwanzhaut nachweisbar waren als bei gestressten Tieren.

Diese Befunde sind möglicherweise auf Stress-induzierte Effekte der Katecholamine zurückzuführen. So wurde gezeigt, dass Adrenalin eine Verschiebung der Granulozytenzahl vom marginalen Speicher in die Zirkulation verursacht (6) und, dass eine adrenerge Stimulation zu einer verminderten Adhärenz von Granulozyten an die

Gefäßwände führt (27). Auch andere Studien beschrieben, dass Katecholamine die Zelladhäsion von Immunzellen an die Gefäßwand modulieren können (17;18). So sind die erhöhte Monozytenzahl im Blut und die verminderte Makrophagenzahl im Injektionsgebiet der Schwanzhaut vermutlich mit einer durch Katecholamine verursachten, verminderten Adhäsionsfähigkeit der Immunzellen an die Gefäßwände zu erklären. Die Folge ist eine verminderte Migration ins periphere Gewebe und ein vermehrter Übertritt vom marginalen Speicher in die Zirkulation.

Des Weiteren konnten keine Unterschiede der Makrophagenzahl in den Lymphknoten gestresster und nicht gestresster immunisierter oder nicht immunisierter Tiere festgestellt werden. Diese Ergebnisse könnten so interpretiert werden, dass die Makrophagen der Schwanzhaut nicht in die Lymphknoten einwandern und somit möglicherweise nur lokal eine Rolle für die Entzündung spielen. Möglicherweise migrieren die Makrophagen aber auch zu anderen Zeitpunkten als am Tag 4 oder 14 nach Immunisierung in die Lymphknoten. Eine andere Erklärung könnte sein, dass die Makrophagen zu DCs werden und als solche auch nach der Immunisierung in die Lymphknoten migrieren. So ist es ein weiteres Ziel die DCs in den Lymphknoten und der Schwanzhaut vergleichend zu untersuchen. Auch sollen weitere Immunzellen wie Granulozyten, B-Zellen und T-Zellen in die Untersuchungen eingeschlossen werden.

Diese Daten haben eindrucksvoll gezeigt, dass psychosozialer Stress gravierende Auswirkungen auf das Immunsystem hat und so zu einem verminderten Arthritis-Schweregrad und ferner zu einer geringeren Suszeptibilität für die CIA führte, was bisher noch in keiner Studie gezeigt wurde.

5.2 Zentrale Zytokine und Monamine

Aus der Literatur ist bekannt, dass kurzfristige periphere Entzündungsreaktionen Zytokine im ZNS induzieren, die wiederum Veränderungen zentraler Neurotransmitter, der HHN-Achse und des SNS verursachen. Wenig ist jedoch bekannt über die Veränderungen zentraler Moleküle während chronisch inflammatorischer Krankheiten wie RA. Bei der RA kommt es zu einem Funktionsverlust der beiden antiinflammatorischen Achsen, der HHN-Achse und des SNS. Inwieweit zentrale Zytokine und monaminerge

Neurotransmittersysteme an dieser pathophysiologischen Situation beteiligt sind, ist nicht bekannt. Daher war es das Ziel dieser Arbeit herauszufinden, ob es im Verlauf einer experimentellen Arthritis zu Veränderungen dieser zentralen Moleküle kommt und ob diese Veränderungen möglicherweise mit den o.g. Sollwertveränderungen assoziiert sind und somit zur Chronifizierung der CIA beitragen.

Wie aus dem klinischen und histologischen Arthritis-Score hervorgeht, zeigten die Ratten ab dem Tag 14 nach Arthritisinduktion erste Symptome der CIA. Ab dem Tag 21 entwickelten sich stärkste Symptome, die bis zum Ende der Studie am Tag 55 zu beobachten waren.

Da die T-Zell-Aktivität in den drainierenden Lymphknoten wichtige Hinweise über das Ausmaß und den Charakter der Immunantwort liefert, wurden als Maß für die Stärke der peripheren Inflammation verschiedene Zytokine in den Überständen dieser Lymphknoten bestimmt. Dabei zeigte sich im Verlauf der CIA eine progressive Zunahme der ex vivo Produktion von TNF und IFN- γ bei immunisierten Tieren, wobei die Produktion von TNF ab dem Tag 5 und die Produktion von IFN- γ ab dem Tag 28 nach Arthritisinduktion signifikant höher waren als bei Kontrolltieren. Hingegen war die Produktion von IL-1 β nur in der asymptomatischen Phase maximal erhöht. Es ist allgemein bekannt, dass die Zytokine IFN- γ , IL-1 β und TNF eine proinflammatorische Rolle bei der Pathogenese der Arthritis spielen. Dies wurde sowohl in verschiedenen Tiermodellen der Arthritis als auch beim Menschen oftmals gezeigt (69;101;104;152;250;263). So verschlimmerte sich die Arthritis, wenn IFN- γ , IL-1 β oder TNF peripher oder intraartikulär appliziert wurden, während nach der Gabe von Antikörpern gegen diese Zytokine eine Verbesserung des Arthritis-Schweregrades beobachtet wurde (Übersicht in (175)). Ferner führten die Erkenntnisse über die pathogenetische Rolle von TNF zur Entwicklung TNF-neutralisierender Therapien, die maßgeblich zur Verbesserung des Arthritis-Schweregrades bei Patienten mit RA beitrugen (74). So kann die stark erhöhte Produktion dieser proinflammatorischen Zytokine als Marker für eine robuste periphere Inflammation, wie sie auch bei der menschlichen RA auftritt, gedeutet werden.

Neben dem Anstieg in der Produktion der proinflammatorischen Zytokine TNF und IFN- γ wurde auch eine erhöhte Produktion von IL-10 in der späten symptomatischen Phase der CIA (Tag 41 und 55) beobachtet. Zur gleichen Zeit war die Produktion von IL-1 β , dem

Zytokin mit der größten Fähigkeit die HHN-Achse zu stimulieren, jedoch nicht erhöht. Da aber gezeigt werden konnte, dass IL-1 β in entzündeten Gelenken durch IL-10 inhibiert wird, ist es vorstellbar, dass die geringe Produktion von IL-1 β in der symptomatischen Phase auf die inhibitorischen Eigenschaften von IL-10 zurückzuführen ist (151).

Die o.g. inflammatorischen Prozesse der experimentell induzierten Arthritis wurden von neuroendokrinen Veränderungen, wie sie auch bei der RA beobachtet werden (24), begleitet. So wurde ein signifikanter Anstieg des Plasma-Corticosterons am Tag 5 nach der Arthritisinduktion beobachtet, was als endokrine Reaktion infolge einer Immunantwort auf Kollagen gedeutet wird, da solche endokrinen Veränderungen auch nach Immunisierungen mit anderen Antigenen auftreten (21;248). Nach diesem Anstieg am Tag 5 sanken die Corticosteron-Level im weiteren Arthritisverlauf jedoch unter die Ausgangswerte, obwohl zu dieser Zeit hohe Konzentrationen an TNF und IFN- γ , die bekanntlich in der Lage sind die HHN-Achse zu stimulieren, nachweisbar waren. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die Kommunikation zwischen dem Immunsystem und der HHN-Achse gestört war. Zu gegensätzlichen Ergebnissen kamen andere Studien, die eine starke Aktivierung der HHN-Achse im Verlauf der AA beobachteten (94;98;206). Eine Erklärung für die Diskrepanzen könnte sein, dass sowohl andere Rattenstämme als auch ein anderes Modell der Arthritis (AA) verwendet wurden. So wurde die AA mit CFA induziert, während die CIA mit CII in IFA induziert wurde, und es wurde bereits gezeigt, dass diese Adjuvantien unterschiedliche Corticosteron-Antworten auslösen (56). Insgesamt haben die vorliegenden Ergebnisse gezeigt, dass die Corticosteron-Produktion in Relation zur robusten peripheren Inflammation (Arthritis-Schweregrad, periphere proinflammatorische Zytokine) während der chronischen Phase der CIA inadäquat niedrig war. Auch bei Patienten mit RA wurde eine verminderte HHN-Achsen-Aktivität festgestellt (123;228).

Aufgrund dieser Gemeinsamkeiten mit der menschlichen RA, scheint die CIA ein äußerst geeignetes Arthritis-Modell zu sein, um die Mechanismen zu untersuchen, die zum Funktionsverlust der HHN-Achse bei Arthritis beitragen. Ein solcher Defekt wurde bei anderen experimentell induzierten inflammatorischen Krankheiten wie beispielsweise der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis nicht beobachtet (56;146;154). Die genauen Gründe für den Funktionsverlust der HHN-Achse konnten bisher nicht geklärt werden. Verantwortliche Mechanismen könnten sowohl auf zentralem Niveau

(Hypothalamus/Hypophyse) als auch auf dem Niveau der Nebenniere zu finden sein. So wurde gezeigt, dass eine kontinuierliche Stimulation der HHN-Achse mit IL-6 eine abgeschwächte ACTH-Antwort zur Folge hat, was auf eine Resistenz der HHN-Achsen-Aktivität bei dauerhaft erhöhten Zytokin-Spiegeln hindeutet (Adaptation) (95;162). Eine weitere Erklärung für die inadäquate Corticosteronproduktion könnte der inhibitorische Einfluss von TNF auf diverse Enzyme der adrenokortikalen Corticosteronsynthese sein (1.2.1) (112).

Da die Produktion von IL-1 β , dem Zytokin mit der besten Fähigkeit die HHN-Achse zu stimulieren, in der chronischen Phase der CIA nicht erhöht war, wohingegen IL-10 in dieser Phase vermehrt produziert wurde, liegt die Vermutung nahe, dass der Verlust der HHN-Achsen-Aktivität zumindest teilweise auf die Fähigkeit von IL-10, IL-1 β zu inhibieren (151), zurückzuführen sein könnte.

Neben den Veränderungen des Plasma-Corticosterons wurde bei der CIA eine Hyperaktivität des SNS, wie sie auch bei der RA beobachtet wird (24), festgestellt. So waren die Plasma-Adrenalin-Spiegel bei immunisierten Tieren deutlich höher als bei Kontrolltieren. Demzufolge waren also die HHN-Achse und das SNS zumindest zu Beginn parallel aktiviert, die Konzentrationen von Corticosteron und Adrenalin waren „normal“ erhöht. Allerdings waren die Plasma-Adrenalin-Spiegel im Verlauf der CIA weit länger erhöht als die HHN-Achse aktiviert war. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Stressachsen während der CIA entkoppelt sind. Eine solche Entkopplung findet man auch bei Patienten mit RA (102). Normalerweise sind die beiden Stressachsen jedoch aneinander gekoppelt, d.h. parallel aktiviert, was zu einer Verstärkung der antiinflammatorischen immunsuppressiven Effekte führt, da die Effektoren beider Stressachsen ihre biologischen Effekte gegenseitig verstärken (221;224). In mehreren Studien wurde die Kooperation beider Systeme auf molekularer Ebene beschrieben (65;90;132;176;200). So führten die synergistischen Effekte zu einem Anstieg von Glucocorticoidrezeptoren, β -Adrenorezeptoren, intrazellulärem cAMP und Proteinkinase A. Zudem potenzierte Cortisol die Produktion von Noradrenalin und Adrenalin aus sympathischen Nervenendigungen und dem Nebennierenmark (30;203). Die Kopplung beider Systeme wäre also notwendig, um die periphere Inflammation bestmöglich zu hemmen. Sowohl bei der CIA als auch bei der

RA kommt es jedoch zu einer Entkopplung beider Stressachsen, die demnach zu einer verstärkten proinflammatorischen Situation beiträgt.

Hinzu kommt, dass die Dichte noradrenerger Nervenfasern in entzündeten Gelenken sowohl bei Patienten mit RA (219) als auch bei Mäusen mit CIA (101) reduziert ist. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit auch im Rattenmodell der CIA bestätigt werden. So war ein Rückgang der Dichte sympathischer Nervenfasern in der Gelenkregion bei immunisierten Ratten bereits am Tag 14 nach Arthritisinduktion sichtbar und eine signifikant niedrigere Dichte sympathischer Nervenfasern war ab dem Tag 28 bis zum Versuchsende zu beobachten. Der Rückzug sympathischer Nervenfasern begann also bereits in der asymptomatischen Phase der Arthritis. Dieser Verlust sympathischer Nervenfasern führt zusätzlich zu einer Verstärkung der proinflammatorischen Situation im entzündeten Gelenk, da die Innervation mit proinflammatorischen sensiblen Nervenfasern (Substanz P) im Verlauf der CIA bei DA Ratten normal war.

Auch dieser Befund bestätigt die Ergebnisse früherer Studien, die gezeigt haben, dass die Dichte sensibler Nervenfasern bei Patienten mit RA normal oder sogar erhöht war (64;169;257). Aufgrund des Rückzugs sympathischer Nervenfasern aus den entzündeten Gelenkregionen ist die lokale Konzentration sympathischer Neurotransmitter niedrig, wohingegen die Konzentration von Substanz P verhältnismäßig hoch ist. In einer solchen Situation wird der proinflammatorische Prozess durch Substanz P und via α -Adrenozeptoren unterstützt (223). Denn zum einen wird durch die Bindung an α -Adrenozeptoren u.a. die Sekretion von TNF durch Makrophagen induziert (212) und zum anderen stimuliert Substanz P die Sekretion verschiedener Zytokine (TNF, IL-1 β , IL-6, IFN- γ) und die Chemotaxis verschiedener Zelltypen (3;124;149;253;260). Warum es bei RA und CIA zu einem derartigen Nervenfaserrückzug kommt, konnte bisher nicht geklärt werden. Es ist aber denkbar, dass der Verlust sympathischer Nervenfasern mit der Aktivierung von Immunzellen in Zusammenhang stehen könnte, da eine ähnliche Reduktion in der Dichte noradrenerger Nervenfasern in lymphatischen Organen von Mäusen, die spontan eine autoimmune lymphoproliferative Erkrankung entwickeln, beobachtet wurde (57). Des Weiteren könnte der Nervenfaserrückzug eine Konsequenz der erhöhten lokalen Produktion des Nervenrepulsionsfaktors Semaphorin 3C sein, der im synovialen Gewebe von Patienten mit RA verstärkt exprimiert wird (170).

Insgesamt kommt es im Verlauf der CIA zu einer Entkopplung des Immunsystems und den beiden Stressachsen, die sich in einer inadäquat niedrigen Corticosteron-Produktion und einer Hyperaktivität des SNS bei gleichzeitigem Nervenfaserverlust im Synovialgewebe äußert.

Um herauszufinden, ob diese Entkopplung mit diversen zentralen Molekülen assoziiert werden kann, wurden in dieser Arbeit verschiedene zentrale Zytokine und monaminerge Neurotransmitter untersucht. Die Ergebnisse haben gezeigt, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 in der Induktionsphase der CIA im Hypothalamus verstärkt exprimiert waren. Eine verstärkte Expression dieser Zytokine in der späteren Phase der Arthritis konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dennoch sind diese Daten der erste Beweis dafür, dass infolge einer peripheren Immunstimulation proinflammatorische Zytokine im Gehirn nicht nur während der Aktivierung der angeborenen Immunantwort sondern auch einige Tage nach Applikation des Antigens, also während der adaptiven spezifischen Immunantwort, induziert wurden. So wurde bisher zwar gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6, TNF oder IFN- γ nach peripherer Applikation von LPS in verschiedenen Hirnarealen (z.B. im Hypothalamus) induziert wurden (1.4) (140;186), aber die Expression dieser Zytokine wurde lediglich einige Stunden nach LPS-Gabe untersucht. Auch wurde gezeigt, dass Zytokine wie IL-1 β durch akuten Stress (157) oder bei chronischem Schmerz (4) in verschiedenen Hirnarealen exprimiert wurden. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt, dass proinflammatorische Zytokine im Verlauf einer peripheren chronischen Erkrankung im Gehirn induziert wurden.

Allerdings stellt sich an dieser Stelle die Frage, warum die erhöhten IL-1 β - und IL-6-Spiegel im Hypothalamus nicht zur Aktivierung der HHN-Achse in der asymptomatischen Phase der CIA führten. Denn bekanntermaßen ist die Produktion dieser Zytokine im Hypothalamus relevant für die Stimulation der HHN-Achse (68;171). Außerdem ist es verwunderlich, dass die Expression von IL-1 β und IL-6 im Hypothalamus nur auf die frühe Phase der CIA bis zum Tag 28 beschränkt war. Denn zum einen wurde gezeigt, dass die Produktion von Zytokinen im Gehirn unter monaminerner Kontrolle steht (9;59;201) und in dieser Arbeit wurde beobachtet, dass die Noradrenalin-Spiegel im Hypothalamus in der symptomatischen Phase der CIA erhöht waren. Zum anderen war die Produktion

proinflammatorischer Zytokine aus drainierenden Lymphknoten in der späten Phase der CIA, als auch stärkste Arthritis-Symptome nachweisbar waren, deutlich erhöht und normalerweise sollte eine maximale Produktion dieser Immunprodukte in der Peripherie die Expression von proinflammatorischen Zytokinen im Gehirn induzieren (84). Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass die Expression der Zytokine im Gehirn und die Produktion der Zytokine in der Peripherie während der experimentellen Arthritis entkoppelt sind.

Auch die Veränderungen monoaminerger Neurotransmitter im Gehirn während der CIA wurden in der vorliegenden Arbeit untersucht. Dabei ergab sich ein Anstieg der Serotonin-Spiegel in der späten symptomatischen Phase (Tag 55) der experimentellen Arthritis. Zusätzlich wurde ein anhaltender Anstieg der Noradrenalin-Konzentration in der symptomatischen Phase der CIA vom Tag 28 bis zum Tag 55 beobachtet.

Bisher war es völlig unbekannt, welchen Einfluss die Ausbildung einer chronischen Arthritis auf die zentralen monoaminergen Neuronen hat. Aber in den letzten Jahren konnte bereits gezeigt werden, dass eine intraperitoneale Injektion von LPS bei Mäusen zu einer Aktivierung der dopaminergen, noradrenergen und serotonergen Neuronen in verschiedenen Hirnarealen (u.a. im Hypothalamus und Hirnstamm) führte (66). Des Weiteren wurde gezeigt, dass es auch nach Stressexposition zu einer verstärkten Umsatzrate von Serotonin im präfrontalen Cortex und im Hypothalamus kam (182). Allerdings wurden auch die Veränderungen monoaminerger Neurotransmitter nur einige Stunden nach der Immunstimulation bzw. der Stressexposition beobachtet, so dass diese Arbeit die erste ist, die einen Anstieg monoaminerger Neurotransmitter in der symptomatischen Phase der CIA zeigt. Verwunderlich ist jedoch, dass der Anstieg von Noradrenalin und Serotonin im Hypothalamus nicht in einer Stimulation der HHN-Achse in der chronischen Phase der CIA resultierte. Denn es wurde gezeigt, dass erhöhte Level dieser hypothalmischen Neurotransmitter zur Aktivierung der HHN-Achse führen (67;171). Aber die Plasma-Corticosteron-Spiegel waren zu der Zeit, als ein Anstieg der Noradrenalin-Konzentration im Hypothalamus nachweisbar war, inadäquat niedrig. Deshalb besteht Grund zu der Annahme, dass auch die Interaktion zwischen den zentralen noradrenergen Neuronen und der HHN-Achse gestört ist. Des Weiteren stellt sich die Frage, warum die Noradrenalin- und Serotonin-Level in der frühen Phase der CIA nicht

erhöht waren. So ist doch bekannt, dass IL-1 β und IL-6 in der Lage sind, sowohl noradrenerge als auch serotoninerge Neuronen zu stimulieren (21;71;120;255) und diese Zytokine waren in dieser frühen Phase der CIA im Hypothalamus verstärkt exprimiert.

Insgesamt wird aus diesen Ergebnissen ersichtlich, dass es im Verlauf der CIA auch im Gehirn zu einer Entkopplung kommt, nämlich zu einer Entkopplung zwischen der Zytokin-Genexpression und der Neurotransmitter-Aktivität. Dies wird noch deutlicher, wenn man die folgenden Ergebnisse betrachtet. Diese haben gezeigt, dass bei gesunden Ratten eine positive Korrelation zwischen der IL-1 β Genexpression und der Noradrenalin-Konzentration im Hypothalamus existiert. Interessanterweise war eine solche Korrelation bei arthritischen Ratten nicht nachweisbar. Diese positive Korrelation bei gesunden Tieren zeigt, dass IL-1 β und Noradrenalin normalerweise in gleichem Maße induziert werden, während das bei kranken Tieren nicht mehr der Fall ist. So liegt der Schluss nahe, dass Interaktionen auf zentralem Niveau, namentlich die zwischen neuroendokrinen Mechanismen und Zytokinen, während einer Arthritis entkoppelt sind.

Aufgrund des beobachteten Anstieges des hypothalamischen Noradrenalins in der symptomatischen Phase der Arthritis, wurden auch Experimente durchgeführt, in denen noradrenerge Neuronen zentral ausgeschaltet wurden. Diese Versuche sollten zeigen, ob eine zentrale Noradrenalin-Depletion Veränderungen im Arthritisverlauf nach sich zieht, was, wenn dem so wäre, bedeuten würde, dass dieser Neurotransmitter in der Pathogenese der CIA eine Rolle spielt. Bei einer zentralen Depletion noradrenerger Neuronen am Tag 18 oder 25, also zu Beginn der symptomatischen Phase bzw. als die CIA bereits manifestiert war, zeigten sich keine Veränderungen im Arthritis-Schweregrad im Vergleich zu Kontrolltieren. Wurde Noradrenalin jedoch 14 Tage vor der Induktion der Arthritis ausgeschaltet war die Arthritisausprägung signifikant vermindert. Zu einem anderen Ergebnis kam eine Studie, die den Einfluss einer Noradrenalin-Depletion im Hypothalamus auf den Verlauf einer AA bei PVG Ratten untersucht hat. In dieser Studie wurde gezeigt, dass die zentrale Applikation von 6-OHDA 2 Tage bevor die AA induziert wurde, zu einer verschlimmerten AA führte (94). Die Autoren schlossen daraus, dass die erhöhten Noradrenalin-Spiegel im Hypothalamus im Verlauf der AA eine protektive Rolle spielen. Eine Erklärung für diese Diskrepanzen könnte sein, dass zum einen die Arthritisinduktion unterschiedlich war (siehe oben) und zum anderen PVG Ratten

verwendet wurden. Diese Ratten sind resistent gegenüber verschiedenen Autoimmunkrankheiten u.a. auch CIA, da die HHN-Achse verändert ist (262). Im Tiermodell der Experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis führte die zentrale Depletion von Noradrenalin zu einer verminderten Schwere der Erkrankung (144).

Schließlich konnte gezeigt werden, dass eine periphere Depletion noradrenerger Neuronen 7 Tage vor Induktion der CIA bei Mäusen zu einer Verbesserung des Arthritis-Schweregrades führte, während eine späte periphere Sympathektomie am Tag 56 nach Arthritisinduktion zu einer Verschlechterung des Arthritis-Schweregrades führte (101). Die Autoren kamen zu dem Schluss, dass das periphere SNS die Inflammation während der asymptomatischen Phase unterstützt, während es die Inflammation während der chronischen Phase der CIA unterdrückt. Wie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gezeigt haben, scheint das zentrale SNS in der chronischen Phase der CIA keinen Einfluss auf die periphere Entzündung zu nehmen, da nach Ausschalten zentraler noradrenerger Neuronen keine Veränderungen des Arthritis-Scores nachweisbar waren. Das ist insofern verwunderlich, als dass gezeigt wurde, dass die zentrale Depletion monoaminerger Neuronen u.a. zu einer Erniedrigung der Lymphozytenproliferation und der zirkulierenden CD8⁺-Zellen und darüber hinaus zu einer reduzierten Genexpression des splenischen IL-2 und IFN- γ führte (179), was bedeuten würde, dass dem zentralen SNS eine immunverstärkende Rolle zukäme.

Die Beobachtung, dass eine zentrale noradrenerge Depletion keinen Einfluss auf die periphere Entzündung hatte, könnte zum einen damit erklärt werden, dass die sympathische Innervation in den Gelenkregionen im Verlauf der CIA verloren gegangen ist. Denn kürzlich wurde demonstriert, dass die Entfernung des peripheren Nervensystems den inhibitorischen Effekt, den die zentrale Depletion noradrenerger Neuronen auf das Immunsystem hat, aufhebt (179). Zum anderen könnten die Ergebnisse damit erklärt werden, dass es im Verlauf der CIA zu einer gestörten Gehirn-Immunsystem-Gelenk-Kommunikation kommt. Die Verminderung des Arthritis-Schweregrades, die beobachtet wurde, wenn die zentrale noradrenerge Depletion vor der Arthritisinduktion erfolgte, entspricht der Beobachtung, die bei peripherer Sympathektomie gemacht wurde (101). Zu dieser Zeit waren Gehirn und Peripherie noch nicht entkoppelt und auch das zentrale SNS scheint eine immunverstärkende Rolle zu haben. Zur Zeit ist wenig darüber bekannt,

welchen Einfluss zentrale Katecholamine auf periphere Krankheitsprozesse haben, so dass weitere Untersuchungen auf diesem Gebiet erforderlich sind, um die Mechanismen, die der Kommunikation zwischen Gehirn und Peripherie unterliegen, vollends zu verstehen.

Da ebenfalls ein Anstieg der hypothalamischen Serotonin-Konzentration in der späten Phase der CIA beobachtet wurde, wurde ein Versuch durchgeführt, in dem die serotoninerger Neuronen 14 Tage vor Arthritisinduktion ausgeschaltet wurden. Die Depletion serotoninerger Neuronen führte dabei zu einer Verminderung des Arthritis-Schweregrades. Diese Daten bestätigen die Ergebnisse einer anderen Studie, in der ebenfalls eine Verminderung des Arthritis-Schweregrades nach zentraler Serotonin-Depletion festgestellt werden konnte (96). Diese Ergebnisse sprechen für eine proinflammatorische Rolle des zentralen Serotonins in der Pathogenese der CIA. Allerdings sind die Mechanismen, wie Serotonin zur proinflammatorischen Situation beiträgt, bisher nicht verstanden. Zudem ist bekannt, dass Serotonin die Freisetzung von CRH aus dem Hypothalamus stimuliert (116), was nicht für eine proinflammatorische Rolle von Serotonin spricht.

Zusammengenommen haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, dass es im Verlauf der CIA zu einer Entkopplung zwischen dem Immunsystem, dem Gehirn und den beiden efferenten neuroendokrinen Achsen kommt.

5.3 Nebenniere

Sowohl im Verlauf der CIA als auch im Verlauf der RA (228) kommt es zu einer inadäquat niedrigen Produktion von Corticosteron bzw. Cortisol in Relation zum Schweregrad der Inflammation. Die Gründe für die Nebenniereninsuffizienz bei Arthritis sind allerdings unbekannt. In der Literatur gibt es einige Hinweise, die auf ACTH-unabhängige Mechanismen der Glucocorticoid-Regulation hindeuten. So wurde gezeigt, dass hypophysektomierte Ratten (165) oder CRH-*Knockout* Mäuse (209) dennoch in der Lage waren, Corticosteron zu produzieren. Zudem wurde die robuste Corticosteron-Antwort bei CRH-*Knockout* Mäusen mit erhöhten IL-6 Spiegeln assoziiert, so dass die Autoren annahmen, dass IL-6 einen direkten stimulatorischen Einfluss auf adrenokortikale Zellen haben könnte (209). Des Weiteren wurde gezeigt, dass CRH die Glucocorticoid-Sekretion

aus bovinen adrenokortikalen Zellen stimulierte (34) und auch Katecholamine, die von adrenomedullären Zellen produziert wurden, die Steroidogenese in adrenokortikalen Zellen stimulierten (26). Diese Studien legen nahe, dass es alternative Wege für die Glucocorticoid-Regulation geben muss.

So war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Mechanismen, die für die adrenale Insuffizienz verantwortlich sind, zu charakterisieren. Dazu wurde der Cholesteringehalt in der Nebennierenrinde untersucht, da die Vermutung war, dass möglicherweise ein Problem der Cholesterin-Speicherung in der Nebenniere zur Nebenniereninsuffizienz beitragen könnte und Cholesterin bekanntlich der Vorläufer der adrenalen Steroidhormone ist. Lediglich am Tag 28 nach Arthritisinduktion war bei immunisierten Tieren signifikant mehr Cholesterin in der Nebennierenrinde nachweisbar. Das könnte darauf zurückzuführen sein, dass vorher zumindest am Tag 5 mehr Cholesterin zu Corticosteron umgesetzt wurde und dementsprechend auch mehr Cholesterin in die Nebenniere geliefert wurde, was bis zum Tag 28 anhielt. Ansonsten bestanden zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen Kontrollen und arthritischen Tieren hinsichtlich des Cholesteringehaltes. Da am Tag 5 genug Cholesterin vorhanden war, um eine adäquate Corticosteron-Antwort zu ermöglichen und dieser Cholesteringehalt an keinem anderen Tag im Verlauf der CIA unterschritten wurde, liegt die Vermutung nahe, dass während der CIA kein Problem in der Lieferung von Cholesterin in die Nebennieren besteht. Ob das bei der RA auch so ist, gilt es zu bestätigen.

Um zu prüfen, ob die niedrigen Corticosteron-Spiegel mit Veränderungen in der Expression des SR-BI assoziiert waren, wurde außerdem die Expression des SR-BI in der Nebennierenrinde untersucht. Der SR-BI vermittelt die zelluläre Aufnahme von CE in adrenokortikale Zellen und diese selektive CE-Aufnahme ist die Hauptroute der Cholesterinaufnahme in adrenokortikale Zellen bei Nagern (42). Das Homolog beim Menschen ist CTL-1. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob ein Problem in der Cholesterin-Aufnahme in adrenokortikale Zellen der Nebenniere besteht und dieses Problem möglicherweise zur Nebenniereninsuffizienz bei der CIA beiträgt. Dabei ergaben sich am Tag 5 Unterschiede in der Expression des SR-BI, wobei bei arthritischen Tieren eine etwas stärkere SR-BI Expression nachweisbar war als bei Kontrolltieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass der SR-BI an dem Tag stärker exprimiert war, an dem eine

adäquate Corticosteron-Produktion vorhanden war. Da aber zu keiner Zeit signifikante Unterschiede sowohl zwischen arthritischen und Kontrolltieren als auch im Arthritisverlauf nachweisbar waren, liegt auch hier die Vermutung nahe, dass kein Defekt in der CE-Aufnahme in adrenokortikale Zellen während der CIA existiert. Das Problem der Nebenniereninsuffizienz scheint innerhalb der adrenokortikalen Steroidogenese selbst zu liegen.

So könnte ein Grund für die inadequate Corticosteron-Produktion während der chronischen Phase der CIA der hemmende Einfluss von TNF auf die Steroidogenese sein. Denn TNF ist in der Lage, eine ganze Reihe der Enzyme zu hemmen, die unerlässlich für die Synthese des Corticosterons sind (1.2.1) (112;164). Außerdem wurde gezeigt, dass eine TNF-Neutralisierung zu einer Verbesserung der HHN-Achsen-Aktivität in Relation zur proinflammatorischen Situation bei RA führte (226).

In einer weiteren Studie wurde der Effekt von IL-10 auf die Steroidogenese untersucht (130). Interessanterweise hatten IL-10-Knockout Mäuse sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Immunstimulation erhöhte Corticosteron-Level im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Außerdem war IL-10 in der Lage einige für die Steroidogenese bedeutende Enzyme zu inhibieren, so dass auch IL-10 zur Nebenniereninsuffizienz bei Arthritis beitragen könnte.

Zusammengenommen scheint es, dass hauptsächlich Zytokine die verantwortlichen Faktoren für die Nebenniereninsuffizienz sind. Aber auch die Immunzellinfiltration in die Nebenniere könnte ein wichtiger zusätzlicher proinflammatorischer Stimulus sein, da gezeigt wurde, dass es nach einer Immunstimulation zu starken Veränderungen der Immunzellen in der Nebenniere hinsichtlich ihrer Morphologie, Häufigkeit und Verteilung kommt (77).

6 Zusammenfassung

Studien der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass psychosozialer Stress den Ausbruch und Verlauf verschiedener inflammatorischer Erkrankungen wie RA modulieren kann. Es gibt aber nur sehr wenige Studien, die den Einfluss von chronischem sozialem Stress auf den Arthritisverlauf untersucht haben. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde daher untersucht, welchen Einfluss chronischer psychosozialer Stress während der Arthritisauslösung auf die Suszeptibilität und den Arthritisverlauf hat, und welche endokrinen und immunologischen Veränderungen damit einhergehen. Es wurde gezeigt, dass psychosozialer Stress durch Dauerkonfrontation bei Wistar Ratten die Suszeptibilität für eine CIA reduzierte und außerdem zu einer verminderten Arthritisausprägung führte. Da die Corticosteron-Konzentrationen im Verlauf der CIA nicht verändert waren, kann man davon ausgehen, dass andere Faktoren als Corticosteron bei der Stress-induzierten Verminderung des Arthritis-Schweregrades eine Rolle gespielt haben. Des Weiteren wurde gezeigt, dass chronischer psychosozialer Stress bei immunisierten Tieren zu einer erhöhten Zahl zirkulierender Granulozyten und Monozyten führte, wohingegen die Spiegel zytotoxischer T-Zellen und Th-Zellen bei gestressten Tieren geringer waren als bei nicht gestressten Tieren. So scheint es, dass die Stress-induzierte Hemmung der spezifischen Immunabwehr und Aktivierung der angeborenen Immunfunktion einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung der CIA hat. Um die genauen Mechanismen der Auswirkungen von Stress auf die Arthritis besser zu verstehen, sind weitere Untersuchungen, die andere endokrine Parameter (SNS) oder auch das Verhalten mit einbeziehen, notwendig.

Im zweiten Teil dieser Arbeit war es das Ziel herauszufinden, ob es im Verlauf einer experimentellen Arthritis zu Veränderungen zentraler Zytokine und Monamine kommt, und ob diese Veränderungen zur Chronifizierung der Arthritis beitragen. Denn aus der Literatur ist zwar bekannt, dass kurzfristige periphere Entzündungsreaktionen Zytokine und Neurotransmitter im ZNS induzieren, jedoch wenig ist bekannt über die Veränderungen zentraler Moleküle während chronisch inflammatorischer Krankheiten. Bei der RA kommt es zu Funktionseinschränkungen der HHN-Achse und des SNS, aber inwieweit zentrale Zytokine und monaminerge Neurotransmittersysteme an dieser pathologischen Situation beteiligt sind, ist nicht bekannt und sollte daher in dieser Arbeit untersucht werden.

So wurde gezeigt, dass die Corticosteron-Produktion im Verlauf der CIA trotz erhöhter Konzentrationen der Zytokine TNF und IFN- γ in der Peripherie inadäquat niedrig war. Zudem war eine Hyperaktivität des SNS, bei gleichzeitigem Nervenfaserverlust im Synovialgewebe zu beobachten. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass es ähnlich wie in der chronischen Phase der Arthritis bei RA Patienten auch im Verlauf der CIA zu einer Entkopplung des Immunsystems und der beiden Stressachsen kommt. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit erstmals gezeigt, dass die Zytokine IL-1 β und IL-6 im Verlauf einer peripheren chronischen Erkrankung im Gehirn induziert wurden. So wurde in der asymptomatischen Phase der CIA eine verstärkte Expression von IL-1 β und IL-6 im Hypothalamus festgestellt, was jedoch nicht in einer HHN-Achsen-Aktivierung resultierte. Außerdem war in der symptomatischen Phase der CIA eine erhöhte Produktion von Noradrenalin und Serotonin im Hypothalamus nachweisbar. Jedoch hat eine zentrale Ausschaltung noradrenerger Neuronen in der symptomatischen Phase der CIA keine Auswirkungen auf den Arthritisverlauf gezeigt. Aber eine zentrale Sympatektomie 14 Tage vor der Arthritisinduktion führte zu einer Verbesserung der Arthritis innerhalb eines kleinen Zeitfensters, was auf einen proinflammatorischen Einfluss des zentralen Noradrenalins in der frühen Phase der CIA schließen lässt. Die Depletion serotoninerger Neuronen 14 Tage vor Arthritisinduktion führte ebenfalls zu einem niedrigeren Arthritis-Score, was auf einen negativen Einfluss von zentralem Serotonin auf die CIA hinweist. Schließlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die positive Korrelation zwischen IL-1 β und Noradrenalin im Hypothalamus, die bei gesunden Tieren beobachtet wurde, im Verlauf der CIA verloren ging.

Diese Ergebnisse zeigen, dass es im Verlauf der CIA zu einer Entkopplung zwischen dem Immunsystem, dem Gehirn und den beiden efferenten neuroendokrinen Achsen kommt.

Im dritten und letzten Teil dieser Arbeit war es das Ziel, Mechanismen der Nebenniereninsuffizienz zu charakterisieren. Die Vermutung war, dass möglicherweise eine Störung der Cholesterin-Speicherung in die Nebenniere oder eine Störung der Cholesterinaufnahme in adrenokortikale Zellen zur Nebenniereninsuffizienz beitragen könnte. Allerdings konnten zu keinem Zeitpunkt während der CIA inadäquat niedrige Cholesterin-Mengen oder eine inadäquat niedrige Expression des SR-BI in der

Nebennierenrinde nachgewiesen werden, so dass kein Defekt in der Cholesterin-Speicherung bzw. der Cholesterin-Aufnahme vorzuliegen scheint. Das Problem der Nebenniereninsuffizienz bei RA bzw. CIA scheint vielmehr innerhalb der adrenokortikalen Steroidogenese selbst zu liegen.

7 Literatur

- (1) Albano SA, Santana-Sahagun E, Weisman MH. Cigarette smoking and rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2001; 31(3):146-59.
- (2) Alvarez I, Collado J, Daura X, Colome N, Rodriguez-Garcia M, Gallart T et al. The rheumatoid arthritis-associated allele HLA-DR10 (DRB1*1001) shares part of its repertoire with HLA-DR1 (DRB1*0101) and HLA-DR4 (DRB*0401). *Arthritis Rheum* 2008; 58(6):1630-9.
- (3) Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993; 150(10):4478-85.
- (4) Apkarian AV, Lavarello S, Randolph A, Berra HH, Chialvo DR, Besedovsky HO et al. Expression of IL-1beta in supraspinal brain regions in rats with neuropathic pain. *Neurosci Lett* 2006; 407(2):176-81.
- (5) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31(3):315-24.
- (6) Athens JW, Haab OP, Raab SO, Mauer AM, Ashenbrucker H, Cartwright GE et al. Leukokinetic studies. IV. The total blood, circulating and marginal granulocyte pools and the granulocyte turnover rate in normal subjects. *J Clin Invest* 1961; 40:989-95.
- (7) Azpiroz A, Fano E, Garmendia L, Arregi A, Cacho R, Beitia G et al. Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice. *Psychoneuroendocrinology* 1999; 24(3):345-61.
- (8) Baerwald C, Graefe C, von Wichert P, Krause A. Decreased density of beta-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1992; 19(2):204-10.

- (9) Balschun D, Wetzel W, del Rey A, Pitossi F, Schneider H, Zuschratter W et al. Interleukin-6: a cytokine to forget. *FASEB J* 2004; 18(14):1788-90.
- (10) Baltrusch HJ, Stangel W, Titze I. Stress, cancer and immunity. New developments in biopsychosocial and psychoneuroimmunologic research. *Acta Neurol (Napoli)* 1991; 13(4):315-27.
- (11) Banks WA, Kastin AJ, Broadwell RD. Passage of cytokines across the blood-brain barrier. *Neuroimmunomodulation* 1995; 2(4):241-8.
- (12) Barber AE, Coyle SM, Marano MA, Fischer E, Calvano SE, Fong Y et al. Glucocorticoid therapy alters hormonal and cytokine responses to endotoxin in man. *J Immunol* 1993; 150(5):1999-2006.
- (13) Barton A, Bowes J, Eyre S, Symmons D, Worthington J, Silman A. Investigation of polymorphisms in the PADI4 gene in determining severity of inflammatory polyarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(9):1311-5.
- (14) Begovich AB, Carlton VE, Honigberg LA, Schrodi SJ, Chokkalingam AP, Alexander HC et al. A missense single-nucleotide polymorphism in a gene encoding a protein tyrosine phosphatase (PTPN22) is associated with rheumatoid arthritis. *Am J Hum Genet* 2004; 75(2):330-7.
- (15) Ben Eliyahu S, Yirmiya R, Liebeskind JC, Taylor AN, Gale RP. Stress increases metastatic spread of a mammary tumor in rats: evidence for mediation by the immune system. *Brain Behav Immun* 1991; 5(2):193-205.
- (16) Bendele A. Animal models of rheumatoid arthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2001; 1(4):377-85.
- (17) Benschop RJ, Oostveen FG, Heijnen CJ, Ballieux RE. Beta 2-adrenergic stimulation causes detachment of natural killer cells from cultured endothelium. *Eur J Immunol* 1993; 23(12):3242-7.

- (18) Benschop RJ, Rodriguez-Feuerhahn M, Schedlowski M. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav Immun* 1996; 10(2):77-91.
- (19) Berkenbosch F, van Oers J, del Rey A, Tilders F, Besedovsky H. Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 1987; 238(4826):524-6.
- (20) Besedovsky H, del Rey A, Sorkin E, Dinarello CA. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 1986; 233(4764):652-4.
- (21) Besedovsky HO, del Rey A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. *Endocr Rev* 1996; 17(1):64-102.
- (22) Besedovsky HO, del Rey A. Zytokine des Gehirns sind Integrationsfaktoren des neuroendokrin-immunen Netzwerks. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007. 171-82.
- (23) Besedovsky HO, del Rey A. Processing of Cytokine Signals at CNS Levels: Relevance for Immune–HPA Axis Interactions. In: del Rey A, Chrousos GP, Besedovsky H, editors. *NeuroImmune Biology, Vol. 7: The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*. Elsevier B.V.; 2008. 227-40.
- (24) Bijlsma JW, Cutolo M, Straub RH, Masi AT. Clinical aspects of immune neuroendocrine mechanisms in rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2005; 31(1):xiii-xxvi.
- (25) Blass S, Engel JM, Burmester GR. The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1999; 42(12):2499-506.

- (26) Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Pfeiffer EF, Holst JJ. Effects of splanchnic nerve stimulation on the adrenal cortex may be mediated by chromaffin cells in a paracrine manner. *Endocrinology* 1990; 127(2):900-6.
- (27) Boxer LA, Allen JM, Baehner RL. Diminished polymorphonuclear leukocyte adherence. Function dependent on release of cyclic AMP by endothelial cells after stimulation of beta-receptors by epinephrine. *J Clin Invest* 1980; 66(2):268-74.
- (28) Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum* 1977; 20(3):841-50.
- (29) Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25(1):3-18.
- (30) Brion F, Parvez H, Parvez S, Marnay-Gulat C, Raoul Y. Effects of glucocorticoids upon adrenal and urinary epinephrine and norepinephrine and the activity of enzyme phenylethanolamine-N-methyltransferase in rats made partially deficient in vitamin D: role of vitamin D supplementation. *Horm Metab Res* 1978; 10(6):556-60.
- (31) Brown KJ, Grunberg NE. Effects of housing on male and female rats: crowding stresses male but calm females. *Physiol Behav* 1995; 58(6):1085-9.
- (32) Bush KA, Farmer KM, Walker JS, Kirkham BW. Reduction of joint inflammation and bone erosion in rat adjuvant arthritis by treatment with interleukin-17 receptor IgG1 Fc fusion protein. *Arthritis Rheum* 2002; 46(3):802-5.
- (33) Capellino S, Straub RH. Neuroendocrine immune pathways in chronic arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2008; 22(2):285-97.

- (34) Carroll JA, Willard ST, Bruner BL, McArthur NH, Welsh TH, Jr. Mifepristone modulation of ACTH and CRH regulation of bovine adrenocorticosteroidogenesis in vitro. *Domest Anim Endocrinol* 1996; 13(4):339-49.
- (35) Carty SM, Snowden N, Silman AJ. Should infection still be considered as the most likely triggering factor for rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis* 2004; 63 Suppl 2:ii46-ii49.
- (36) Castagnetta LA, Carruba G, Granata OM, Stefano R, Miele M, Schmidt M et al. Increased estrogen formation and estrogen to androgen ratio in the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003; 30(12):2597-605.
- (37) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1):156-9.
- (38) Chou RC, Stinson MW, Noble BK, Spengler RN. Beta-adrenergic receptor regulation of macrophage-derived tumor necrosis factor-alpha production from rats with experimental arthritis. *J Neuroimmunol* 1996; 67(1):7-16.
- (39) Chover-Gonzalez AJ, Jessop DS, Tejedor-Real P, Gibert-Rahola J, Harbuz MS. Onset and severity of inflammation in rats exposed to the learned helplessness paradigm. *Rheumatology (Oxford)* 2000; 39(7):764-71.
- (40) Chrousos GP. Regulation and dysregulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The corticotropin-releasing hormone perspective. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1992; 21(4):833-58.
- (41) Chrousos GP. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N Engl J Med* 1995; 332(20):1351-62.
- (42) Connelly MA, Williams DL. SR-BI and cholesterol uptake into steroidogenic cells. *Trends Endocrinol Metab* 2003; 14(10):467-72.

- (43) Crofford LJ, Kalogeras KT, Mastorakos G, Magiakou MA, Wells J, Kanik KS et al. Circadian relationships between interleukin (IL)-6 and hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones: failure of IL-6 to cause sustained hypercortisolism in patients with early untreated rheumatoid arthritis. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(4):1279-83.
- (44) Cromartie WJ, Craddock JG, Schwab JH, Anderle SK, Yang CH. Arthritis in rats after systemic injection of streptococcal cells or cell walls. *J Exp Med* 1977; 146(6):1585-602.
- (45) Cross RJ, Jackson JC, Brooks WH, Sparks DL, Markesbery WR, Roszman TL. Neuroimmunomodulation: impairment of humoral immune responsiveness by 6-hydroxydopamine treatment. *Immunology* 1986; 57(1):145-52.
- (46) Cutolo M, Balleari E, Giusti M, Monachesi M, Accardo S. Sex hormone status of male patients with rheumatoid arthritis: evidence of low serum concentrations of testosterone at baseline and after human chorionic gonadotropin stimulation. *Arthritis Rheum* 1988; 31(10):1314-7.
- (47) Cutolo M, Foppiani L, Prete C, Ballarino P, Sulli A, Villaggio B et al. Hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis function in premenopausal women with rheumatoid arthritis not treated with glucocorticoids. *J Rheumatol* 1999; 26(2):282-8.
- (48) Cutolo M, Straub RH. Stress as a risk factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation* 2006; 13(5-6):277-82.
- (49) Dallman MF, Akana SF, Levin N, Walker CD, Bradbury MJ, Suemaru S et al. Corticosteroids and the control of function in the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Ann N Y Acad Sci* 1994; 746:22-31.
- (50) Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: where do we stand? *Brain Behav Immun* 2001; 15(1):7-24.

- (51) De Boer SF, Slangen JL, Van der GJ. Plasma catecholamine and corticosterone levels during active and passive shock-prod avoidance behavior in rats: effects of chlordiazepoxide. *Physiol Behav* 1990; 47(6):1089-98.
- (52) de Kloet ER. Steroids, stability and stress. *Front Neuroendocrinol* 1995; 16(4):416-25.
- (53) de Vries HE, Hoogendoorn KH, van Dijk J, Zijlstra FJ, van Dam AM, Breimer DD et al. Eicosanoid production by rat cerebral endothelial cells: stimulation by lipopolysaccharide, interleukin-1 and interleukin-6. *J Neuroimmunol* 1995; 59(1-2):1-8.
- (54) DeJoy SQ, Ferguson KM, Sapp TM, Zabriskie JB, Oronsky AL, Kerwar SS. Streptococcal cell wall arthritis. Passive transfer of disease with a T cell line and crossreactivity of streptococcal cell wall antigens with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1989; 170(2):369-82.
- (55) Dekkers JC, Geenen R, Godaert GL, Glaudemans KA, Lafeber FP, van Doornen LJ et al. Experimentally challenged reactivity of the hypothalamic pituitary adrenal axis in patients with recently diagnosed rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28(7):1496-504.
- (56) del Rey A, Klusman I, Besedovsky HO. Cytokines mediate protective stimulation of glucocorticoid output during autoimmunity: involvement of IL-1. *Am J Physiol* 1998; 275(4 Pt 2):R1146-R1151.
- (57) del Rey A, Roggero E, Kabiersch A, Schafer M, Besedovsky HO. The role of noradrenergic nerves in the development of the lymphoproliferative disease in Fas-deficient, *lpr/lpr* mice. *J Immunol* 2006; 176(11):7079-86.
- (58) del Rey A, Voigt K, Besedovsky HO. Bidirektionale Kommunikation zwischen den Hormonachsen und dem Immunsystem. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007.

- (59) Depino AM, Earl C, Kaczmarczyk E, Ferrari C, Besedovsky H, del Rey A et al. Microglial activation with atypical proinflammatory cytokine expression in a rat model of Parkinson's disease. *Eur J Neurosci* 2003; 18(10):2731-42.
- (60) Dhabhar FS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:876-93.
- (61) Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for Immunoprotection and Immunopathology. In: del Rey A, Chrousos GP, Besedovsky H, editors. *NeuroImmune Biology, Vol. 7: The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*. Elsevier B.V.; 2008. 207-24.
- (62) Dhabhar FS, McEwen BS. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 1997; 11(4):286-306.
- (63) Dhabhar FS, McEwen BS. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96(3):1059-64.
- (64) Dirmeier M, Capellino S, Schubert T, Angele P, Anders S, Straub RH. Lower density of synovial nerve fibres positive for calcitonin gene-related peptide relative to substance P in rheumatoid arthritis but not in osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47(1):36-40.
- (65) Dong Y, Aronsson M, Gustafsson JA, Okret S. The mechanism of cAMP-induced glucocorticoid receptor expression. Correlation to cellular glucocorticoid response. *J Biol Chem* 1989; 264(23):13679-83.
- (66) Dunn AJ. Endotoxin-induced activation of cerebral catecholamine and serotonin metabolism: comparison with interleukin-1. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 261(3):964-9.

- (67) Dunn AJ. Cytokine activation of the HPA axis. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:608-17.
- (68) Dunn AJ. Effects of the IL-1 receptor antagonist on the IL-1- and endotoxin-induced activation of the HPA axis and cerebral biogenic amines in mice. *Neuroimmunomodulation* 2000; 7(1):36-45.
- (69) Durie FH, Fava RA, Noelle RJ. Collagen-induced arthritis as a model of rheumatoid arthritis. *Clin Immunol Immunopathol* 1994; 73(1):11-8.
- (70) Elenkov IJ. Effects of Catecholamines on the Immune Response. In: del Rey A, Chrousos GP, Besedovsky H, editors. *NeuroImmune Biology, Vol. 7: The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*. Elsevier B.V.; 2008. 189-206.
- (71) Elenkov IJ, Kovacs K, Duda E, Stark E, Vizi ES. Presynaptic inhibitory effect of TNF-alpha on the release of noradrenaline in isolated median eminence. *J Neuroimmunol* 1992; 41(1):117-20.
- (72) Elenkov IJ, Webster EL, Torpy DJ, Chrousos GP. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 876:1-11.
- (73) Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4):595-638.
- (74) Elliott MJ, Maini RN, Feldmann M, Long-Fox A, Charles P, Katsikis P et al. Treatment of rheumatoid arthritis with chimeric monoclonal antibodies to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum* 1993; 36(12):1681-90.
- (75) Engler H, Dawils L, Hoves S, Kurth S, Stevenson JR, Schauenstein K et al. Effects of social stress on blood leukocyte distribution: the role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. *J Neuroimmunol* 2004; 156(1-2):153-62.

- (76) Engler H, Stefanski V. Social stress and T cell maturation in male rats: transient and persistent alterations in thymic function. *Psychoneuroendocrinology* 2003; 28(8):951-69.
- (77) Engstrom L, Rosen K, Angel A, Fyrberg A, Mackerlova L, Konsman JP et al. Systemic immune challenge activates an intrinsically regulated local inflammatory circuit in the adrenal gland. *Endocrinology* 2008; 149(4):1436-50.
- (78) Fearon DT, Locksley RM. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 1996; 272(5258):50-3.
- (79) Feist E, Egerer K, Burmester GR. [Autoantibody profile in rheumatoid arthritis]. *Z Rheumatol* 2007; 66(3):212-8.
- (80) Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Carlson SL, Ackerman KD, Madden KS et al. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol Rev* 1987; 100:225-60.
- (81) Firestein GS, Nguyen K, Aupperle KR, Yeo M, Boyle DL, Zvaifler NJ. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am J Pathol* 1996; 149(6):2143-51.
- (82) Glenn EM, Gray J. Adjuvant-induced polyarthritis in rats: biologic and histologic background. *Am J Vet Res* 1965; 26(114):1180-94.
- (83) Gotz AA, Wittlinger S, Stefanski V. Maternal social stress during pregnancy alters immune function and immune cell numbers in adult male Long-Evans rat offspring during stressful life-events. *J Neuroimmunol* 2007; 185(1-2):95-102.
- (84) Goujon E, Parnet P, Laye S, Combe C, Kelley KW, Dantzer R. Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice. *Brain Behav Immun* 1995; 9(4):292-303.

- (85) Gray TS. Amygdaloid CRF pathways. Role in autonomic, neuroendocrine, and behavioral responses to stress. *Ann N Y Acad Sci* 1993; 697:53-60.
- (86) Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ. The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1987; 30(11):1205-13.
- (87) Griffin AC, Lo WD, Wolny AC, Whitacre CC. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by restraint stress: sex differences. *J Neuroimmunol* 1993; 44(1):103-16.
- (88) Griffiths MM, Remmers EF. Genetic analysis of collagen-induced arthritis in rats: a polygenic model for rheumatoid arthritis predicts a common framework of cross-species inflammatory/autoimmune disease loci. *Immunol Rev* 2001; 184:172-83.
- (89) Groscurth P. Endokrines System: Hypophyse. In: Benninghoff A, Drenckhahn D, (Hrsg.). *Anatomie, Band 2*. München: Elsevier GmbH; 2004. 188-97.
- (90) Gruol DJ, Campbell NF, Bourgeois S. Cyclic AMP-dependent protein kinase promotes glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem* 1986; 261(11):4909-14.
- (91) Gudbjornsson B, Skogseid B, Oberg K, Wide L, Hallgren R. Intact adrenocorticotrophic hormone secretion but impaired cortisol response in patients with active rheumatoid arthritis. Effect of glucocorticoids. *J Rheumatol* 1996; 23(4):596-602.
- (92) Guyre PM, Yeager MP, Munck A. Glucocorticoid effects on immune responses. In: del Rey A, Chrousos GP, Besedovsky H, editors. *NeuroImmune Biology, Vol. 7: The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*. Elsevier B.V.; 2008. 147-67.
- (93) Haller J, Halasz J. Mild social stress abolishes the effects of isolation on anxiety and chlordiazepoxide reactivity. *Psychopharmacology (Berl)* 1999; 144(4):311-5.

- (94) Harbuz MS, Chover-Gonzalez AJ, Biswas S, Lightman SL, Chowdrey HS. Role of central catecholamines in the modulation of corticotrophin-releasing factor mRNA during adjuvant-induced arthritis in the rat. *Br J Rheumatol* 1994; 33(3):205-9.
- (95) Harbuz MS, Jessop DS. Is there a defect in cortisol production in rheumatoid arthritis? *Rheumatology (Oxford)* 1999; 38(4):298-302.
- (96) Harbuz MS, Marti O, Lightman SL, Jessop DS. Alteration of central serotonin modifies onset and severity of adjuvant-induced arthritis in the rat. *Br J Rheumatol* 1998; 37(10):1077-83.
- (97) Harbuz MS, Rees RG, Eckland D, Jessop DS, Brewerton D, Lightman SL. Paradoxical responses of hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) messenger ribonucleic acid (mRNA) and CRF-41 peptide and adenohipophysial proopiomelanocortin mRNA during chronic inflammatory stress. *Endocrinology* 1992; 130(3):1394-400.
- (98) Harbuz MS, Richards LJ, Chover-Gonzalez AJ, Marti-Sistac O, Jessop DS. Stress in autoimmune disease models. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1069:51-61.
- (99) Härle P. Signaltransduktion der Noradrenalin-vermittelten Geninduktion. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007. 60-4.
- (100) Härle P, Cutolo M, Schölmerich J, Straub RH. [Rheumatoid arthritis - pathogenetic role of neuroendocrine axes and the peripheral nervous system]. *Med Klin (Munich)* 2002; 97(12):720-9.

- (101) Härle P, Mobius D, Carr DJ, Schölmerich J, Straub RH. An opposing time-dependent immune-modulating effect of the sympathetic nervous system conferred by altering the cytokine profile in the local lymph nodes and spleen of mice with type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2005; 52(4):1305-13.
- (102) Härle P, Straub RH, Wiest R, Mayer A, Schölmerich J, Atzeni F et al. Increase of sympathetic outflow measured by neuropeptide Y and decrease of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis tone in patients with systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: another example of uncoupling of response systems. *Ann Rheum Dis* 2006; 65(1):51-6.
- (103) Hasko G. Receptor-mediated interaction between the sympathetic nervous system and immune system in inflammation. *Neurochem Res* 2001; 26(8-9):1039-44.
- (104) Hegen M, Keith JC, Jr., Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; 67(11):1505-15.
- (105) Heijnen CJ, Rouppe vd, V, Wulffraat N, van der NJ, Kuis W, Kavelaars A. Functional alpha 1-adrenergic receptors on leukocytes of patients with polyarticular juvenile rheumatoid arthritis. *J Neuroimmunol* 1996; 71(1-2):223-6.
- (106) Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 1997; 20(2):78-84.
- (107) Herman JP, Schafer MK, Young EA, Thompson R, Douglass J, Akil H et al. Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *J Neurosci* 1989; 9(9):3072-82.
- (108) Herrmann M, Schölmerich J, Straub RH. Stress and rheumatic diseases. *Rheum Dis Clin North Am* 2000; 26(4):737-63, viii.

- (109) Hirano D, Nagashima M, Ogawa R, Yoshino S. Serum levels of interleukin 6 and stress related substances indicate mental stress condition in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2001; 28(3):490-5.
- (110) Holmdahl R, Bockermann R, Backlund J, Yamada H. The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice--a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res Rev* 2002; 1(1):135-47.
- (111) Holmdahl R, Klareskog L, Rubin K, Larsson E, Wigzell H. T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. *Scand J Immunol* 1985; 22(3):295-306.
- (112) Jaattela M, Ilvesmaki V, Voutilainen R, Stenman UH, Saksela E. Tumor necrosis factor as a potent inhibitor of adrenocorticotropin-induced cortisol production and steroidogenic P450 enzyme gene expression in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 1991; 128(1):623-9.
- (113) Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* 1997; 84(3):223-43.
- (114) Jacobson L, Sapolsky R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr Rev* 1991; 12(2):118-34.
- (115) Janossy G, Panayi G, Duke O, Bofill M, Poulter LW, Goldstein G. Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation. *Lancet* 1981; 2(8251):839-42.
- (116) Jessop DS. Brain-immune interactions in arthritis: an integrated systems approach. *Arthritis Rheum* 2008; 58(10):2928-30.
- (117) Jessop DS, Richards LJ, Harbuz MS. Effects of stress on inflammatory autoimmune disease: destructive or protective? *Stress* 2004; 7(4):261-6.

- (118) Joe B, Wilder RL. Animal models of rheumatoid arthritis. *Mol Med Today* 1999; 5(8):367-9.
- (119) Jurcovicova J, Stancikova M, Svik K, Ondrejickova, Krsova D, Seres J et al. Stress of chronic food restriction attenuates the development of adjuvant arthritis in male Long Evans rats. *Clin Exp Rheumatol* 2001; 19(4):371-6.
- (120) Kabiersch A, del Rey A, Honegger CG, Besedovsky HO. Interleukin-1 induces changes in norepinephrine metabolism in the rat brain. *Brain Behav Immun* 1988; 2(3):267-74.
- (121) Kalden JR, Gay S. Retroviruses and autoimmune rheumatic diseases. *Clin Exp Immunol* 1994; 98(1):1-5.
- (122) Kanik KS, Chrousos GP, Schumacher HR, Crane ML, Yarboro CH, Wilder RL. Adrenocorticotropin, glucocorticoid, and androgen secretion in patients with new onset synovitis/rheumatoid arthritis: relations with indices of inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(4):1461-6.
- (123) Kanik KS, Wilder RL. Hormonal alterations in rheumatoid arthritis, including the effects of pregnancy. *Rheum Dis Clin North Am* 2000; 26(4):805-23.
- (124) Kavelaars A, Broeke D, Jeurissen F, Kardux J, Meijer A, Franklin R et al. Activation of human monocytes via a non-neurokinin substance P receptor that is coupled to Gi protein, calcium, phospholipase D, MAP kinase, and IL-6 production. *J Immunol* 1994; 153(8):3691-9.
- (125) Kavelaars A, van de PM, Zijlstra J, Heijnen CJ. Beta 2-adrenergic activation enhances interleukin-8 production by human monocytes. *J Neuroimmunol* 1997; 77(2):211-6.
- (126) Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991; 10(13):4025-31.

- (127) Kemeny ME, Schedlowski M. Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: a stepwise progression. *Brain Behav Immun* 2007; 21(8):1009-18.
- (128) Kobayashi S, Momohara S, Kamatani N, Okamoto H. Molecular aspects of rheumatoid arthritis: role of environmental factors. *FEBS J* 2008; 275(18):4456-62.
- (129) Koff WC, Fann AV, Dunegan MA, Lachman LB. Catecholamine-induced suppression of interleukin-1 production. *Lymphokine Res* 1986; 5(4):239-47.
- (130) Koldzic-Zivanovic N, Tu H, Juelich TL, Rady PL, Tying SK, Hudnall SD et al. Regulation of adrenal glucocorticoid synthesis by interleukin-10: a preponderance of IL-10 receptor in the adrenal zona fasciculata. *Brain Behav Immun* 2006; 20(5):460-8.
- (131) Kontinen YT, Kemppinen P, Segerberg M, Hukkanen M, Rees R, Santavirta S et al. Peripheral and spinal neural mechanisms in arthritis, with particular reference to treatment of inflammation and pain. *Arthritis Rheum* 1994; 37(7):965-82.
- (132) Korn SH, Wouters EF, Wesseling G, Arends JW, Thunnissen FB. Interaction between glucocorticoids and beta2-agonists: alpha and beta glucocorticoid-receptor mRNA expression in human bronchial epithelial cells. *Biochem Pharmacol* 1998; 56(12):1561-9.
- (133) Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996; 87(5):811-22.
- (134) Krinke GJ. Intracranial Surgery. In: Krinke GL, editor. *The laboratory rat - Handbook of experimental animals*. London: Academic Press; 2000. 551-60.

- (135) Kuis W, de Jong-de Vos van Steenwijk, Sinnema G, Kavelaars A, Prakken B, Helders PJ et al. The autonomic nervous system and the immune system in juvenile rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 1996; 10(4):387-98.
- (136) Kurreeman FA, Padyukov L, Marques RB, Schrodi SJ, Seddighzadeh M, Stoeken-Rijsbergen G et al. A candidate gene approach identifies the TRAF1/C5 region as a risk factor for rheumatoid arthritis. *PLoS Med* 2007; 4(9):e278.
- (137) Kyburz D, Corr M. The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25(1):79-90.
- (138) Lappin D, Whaley K. Adrenergic receptors on monocytes modulate complement component synthesis. *Clin Exp Immunol* 1982; 47(3):606-12.
- (139) Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH et al. Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998; 41(5):778-99.
- (140) Laye S, Parnet P, Goujon E, Dantzer R. Peripheral administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Brain Res Mol Brain Res* 1994; 27(1):157-62.
- (141) Leden I, Eriksson A, Lilja B, Sturfelt G, Sundkvist G. Autonomic nerve function in rheumatoid arthritis of varying severity. *Scand J Rheumatol* 1983; 12(2):166-70.
- (142) Leirisalo-Repo M. Early arthritis and infection. *Curr Opin Rheumatol* 2005; 17(4):433-9.
- (143) Leonard BE. The HPA and immune axes in stress: the involvement of the serotonergic system. *Eur Psychiatry* 2005; 20 Suppl 3:S302-S306.
- (144) Leonard JP, MacKenzie FJ, Patel HA, Cuzner ML. Hypothalamic noradrenergic pathways exert an influence on neuroendocrine and clinical status in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 1991; 5(4):328-38.

- (145) Levine S, Saltzman A. Nonspecific stress prevents relapses of experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Brain Behav Immun* 1987; 1(4):336-41.
- (146) Levine S, Sowinski R, Steinetz B. Effects of experimental allergic encephalomyelitis on thymus and adrenal: relation to remission and relapse. *Proc Soc Exp Biol Med* 1980; 165(2):218-24.
- (147) Li P, Schwarz EM. The TNF-alpha transgenic mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003; 25(1):19-33.
- (148) Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 1995; 4(6):357-62.
- (149) Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988; 241(4870):1218-21.
- (150) Lotze MT, Frana LW, Sharrow SO, Robb RJ, Rosenberg SA. In vivo administration of purified human interleukin 2. I. Half-life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived interleukin 2. *J Immunol* 1985; 134(1):157-66.
- (151) Lubberts E, Joosten LA, Helsen MM, van den Berg WB. Regulatory role of interleukin 10 in joint inflammation and cartilage destruction in murine streptococcal cell wall (SCW) arthritis. More therapeutic benefit with IL-4/IL-10 combination therapy than with IL-10 treatment alone. *Cytokine* 1998; 10(5):361-9.
- (152) Luross JA, Williams NA. The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology* 2001; 103(4):407-16.

- (153) MacGregor AJ, Snieder H, Rigby AS, Koskenvuo M, Kaprio J, Aho K et al. Characterizing the quantitative genetic contribution to rheumatoid arthritis using data from twins. *Arthritis Rheum* 2000; 43(1):30-7.
- (154) MacPhee IA, Antoni FA, Mason DW. Spontaneous recovery of rats from experimental allergic encephalomyelitis is dependent on regulation of the immune system by endogenous adrenal corticosteroids. *J Exp Med* 1989; 169(2):431-45.
- (155) Madden KS, Sanders VM, Felten DL. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:417-48.
- (156) Maier SF. Bi-directional immune-brain communication: Implications for understanding stress, pain, and cognition. *Brain Behav Immun* 2003; 17(2):69-85.
- (157) Maier SF, Nguyen KT, Deak T, Milligan ED, Watkins LR. Stress, learned helplessness, and brain interleukin-1 beta. *Adv Exp Med Biol* 1999; 461:235-49.
- (158) Malfait AM, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L, Butler DM, Maini RN, Feldmann M. The beta2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *J Immunol* 1999; 162(10):6278-83.
- (159) Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 2001; 7(8):899-905.
- (160) Marucha PT, Kiecolt-Glaser JK, Favagehi M. Mucosal wound healing is impaired by examination stress. *Psychosom Med* 1998; 60(3):362-5.
- (161) Masi AT, Josipovic DB, Jefferson WE. Low adrenal androgenic-anabolic steroids in women with rheumatoid arthritis (RA): gas-liquid chromatographic studies of RA patients and matched normal control women indicating decreased 11-deoxy-17-ketosteroid excretion. *Semin Arthritis Rheum* 1984; 14(1):1-23.

- (162) Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS. Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(6):1690-4.
- (163) Matta S, Singh J, Newton R, Sharp BM. The adrenocorticotropin response to interleukin-1 beta instilled into the rat median eminence depends on the local release of catecholamines. *Endocrinology* 1990; 127(5):2175-82.
- (164) Mauduit C, Gasnier F, Rey C, Chauvin MA, Stocco DM, Louisot P et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression. *Endocrinology* 1998; 139(6):2863-8.
- (165) Mazzocchi G, Rocco S, Malendowicz LK, Rebuffat P, Nussdorfer GG. Bacterial lipopolysaccharide stimulates glucocorticoid secretion in hypophysectomized rats. *Endocr Res* 1995; 21(3):525-36.
- (166) McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bulloch K, Chambers WH, Dhabhar FS et al. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Brain Res Rev* 1997; 23(1-2):79-133.
- (167) McMichael AJ, Sasazuki T, McDevitt HO, Payne RO. Increased frequency of HLA-Cw3 and HLA-Dw4 in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1977; 20(5):1037-42.
- (168) Michie HR, Spriggs DR, Manogue KR, Sherman ML, Revhaug A, O'Dwyer ST et al. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. *Surgery* 1988; 104(2):280-6.
- (169) Miller LE, Justen HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEB J* 2000; 14(13):2097-107.

- (170) Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Schölmerich J et al. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004; 50(4):1156-63.
- (171) Mulla A, Buckingham JC. Regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis by cytokines. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999; 13(4):503-21.
- (172) Müller-Ladner U, Gay S. Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 2: Spezielle Pathophysiologie*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007. 70-9.
- (173) Muller-Ladner U, Kriegsmann J, Franklin BN, Matsumoto S, Geiler T, Gay RE et al. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am J Pathol* 1996; 149(5):1607-15.
- (174) Munck A, Guyre PM. Glucocorticoid physiology, pharmacology and stress. *Adv Exp Med Biol* 1986; 196:81-96.
- (175) Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci* 1997; 61(19):1861-78.
- (176) Nakada MT, Stadel JM, Poksay KS, Crooke ST. Glucocorticoid regulation of beta-adrenergic receptors in 3T3-L1 preadipocytes. *Mol Pharmacol* 1987; 31(4):377-84.
- (177) Naliboff BD, Benton D, Solomon GF, Morley JE, Fahey JL, Bloom ET et al. Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. *Psychosom Med* 1991; 53(2):121-32.

- (178) Neuhuber W. Autonomes Nervensystem. In: Benninghoff A, Drenckhahn D, (Hrsg.). Anatomie, Band 2. München: Elsevier GmbH; 2004. 595-614.
- (179) Pacheco-Lopez G, Niemi MB, Kou W, Bildhauser A, Gross CM, Goebel MU et al. Central catecholamine depletion inhibits peripheral lymphocyte responsiveness in spleen and blood. *J Neurochem* 2003; 86(4):1024-31.
- (180) Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L et al. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest* 1997; 100(6):1513-9.
- (181) Patchev VK. Einfluss von Zytokinen auf neuroendokrine Regulationsmechanismen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse. In: Allolio B, Benker G, Schulte HM, (Hrsg.). Nebenniere und Stress - Von den Grundlagen zur Klinik. Stuttgart, New York: Schattauer; 1994. 27-39.
- (182) Pawlak D, Takada Y, Urano T, Takada A. Serotonergic and kynurenic pathways in rats exposed to foot shock. *Brain Res Bull* 2000; 52(3):197-205.
- (183) Pearson CM. Development of arthritis, periarthritis and periostitis in rats given adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 1956; 91(1):95-101.
- (184) Pellegrino LJ, Pellegrino AS, Cushman AJ. A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain. New York: Plenum Press; 1979.
- (185) Perry F, Heller PH, Kamiya J, Levine JD. Altered autonomic function in patients with arthritis or with chronic myofascial pain. *Pain* 1989; 39(1):77-84.
- (186) Pitossi F, del Rey A, Kabiersch A, Besedovsky H. Induction of cytokine transcripts in the central nervous system and pituitary following peripheral administration of endotoxin to mice. *J Neurosci Res* 1997; 48(4):287-98.
- (187) Plenge RM, Cotsapas C, Davies L, Price AL, de Bakker PI, Maller J et al. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2007; 39(12):1477-82.

- (188) Plenge RM, Seielstad M, Padyukov L, Lee AT, Remmers EF, Ding B et al. TRAF1-C5 as a risk locus for rheumatoid arthritis--a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; 357(12):1199-209.
- (189) Raab A, Dantzer R, Michaud B, Mormede P, Taghzouti K, Simon H et al. Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiol Behav* 1986; 36(2):223-8.
- (190) Rantapaa-Dahlqvist S, de Jong BA, Berglin E, Hallmans G, Wadell G, Stenlund H et al. Antibodies against cyclic citrullinated peptide and IgA rheumatoid factor predict the development of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003; 48(10):2741-9.
- (191) Ray D, Melmed S. Pituitary cytokine and growth factor expression and action. *Endocr Rev* 1997; 18(2):206-28.
- (192) Reber SO, Obermeier F, Straub RH, Falk W, Neumann ID. Chronic intermittent psychosocial stress (social defeat/overcrowding) in mice increases the severity of an acute DSS-induced colitis and impairs regeneration. *Endocrinology* 2006; 147(10):4968-76.
- (193) Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW et al. STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 2007; 357(10):977-86.
- (194) Renz H, Gong JH, Schmidt A, Nain M, Gerns D. Release of tumor necrosis factor-alpha from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependently regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. *J Immunol* 1988; 141(7):2388-93.
- (195) Rogers MP, Trentham DE, Dynesius-Trentham R, Daffner K, Reich P. Exacerbation of collagen arthritis by noise stress. *J Rheumatol* 1983; 10(4):651-4.

- (196) Roudier J, Petersen J, Rhodes GH, Luka J, Carson DA. Susceptibility to rheumatoid arthritis maps to a T-cell epitope shared by the HLA-Dw4 DR beta-1 chain and the Epstein-Barr virus glycoprotein gp110. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(13):5104-8.
- (197) Sambrook PN, Eisman JA, Champion GD, Pocock NA. Sex hormone status and osteoporosis in postmenopausal women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31(8):973-8.
- (198) Schedlowski M, Hosch W, Oberbeck R, Benschop RJ, Jacobs R, Raab HR et al. Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta 2-adrenergic mechanisms. *J Immunol* 1996; 156(1):93-9.
- (199) Schmidt M, Weidler C, Naumann H, Anders S, Schölmerich J, Straub RH. Reduced capacity for the reactivation of glucocorticoids in rheumatoid arthritis synovial cells: possible role of the sympathetic nervous system? *Arthritis Rheum* 2005; 52(6):1711-20.
- (200) Schmidt P, Holsboer F, Spengler D. Beta(2)-adrenergic receptors potentiate glucocorticoid receptor transactivation via G protein beta gamma-subunits and the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Mol Endocrinol* 2001; 15(4):553-64.
- (201) Schneider H, Pitossi F, Balschun D, Wagner A, del Rey A, Besedovsky HO. A neuromodulatory role of interleukin-1beta in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(13):7778-83.
- (202) Schrier D, Gilbertsen RB, Lesch M, Fantone J. The role of neutrophils in type II collagen-induced arthritis in rats. *Am J Pathol* 1984; 117(1):26-9.
- (203) Schubert D, LaCorbiere M, Klier FG, Steinbach JH. The modulation of neurotransmitter synthesis by steroid hormones and insulin. *Brain Res* 1980; 190(1):67-79.

- (204) Schütt C, Bröker B. Neuroimmunoendokrine Regelkreise. In: Schütt C, Bröker B, (Hrsg.). Grundwissen Immunologie. München: Elsevier GmbH; 2006. 80-2.
- (205) Scott DL, Symmons DP, Coulton BL, Popert AJ. Long-term outcome of treating rheumatoid arthritis: results after 20 years. *Lancet* 1987; 1(8542):1108-11.
- (206) Seres J, Stancikova M, Svik K, Krsova D, Jurcovicova J. Effects of chronic food restriction stress and chronic psychological stress on the development of adjuvant arthritis in male long evans rats. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966:315-9.
- (207) Shakhar G, Ben Eliyahu S. In vivo beta-adrenergic stimulation suppresses natural killer activity and compromises resistance to tumor metastasis in rats. *J Immunol* 1998; 160(7):3251-8.
- (208) Sheridan JF. Norman Cousins Memorial Lecture 1997. Stress-induced modulation of anti-viral immunity. *Brain Behav Immun* 1998; 12(1):1-6.
- (209) Silverman MN, Miller AH, Biron CA, Pearce BD. Characterization of an interleukin-6- and adrenocorticotropin-dependent, immune-to-adrenal pathway during viral infection. *Endocrinology* 2004; 145(8):3580-9.
- (210) Smoak KA, Cidlowski JA. Glucocorticoid signaling in health and disease. In: del Rey A, Chrousos GP, Besedovsky H, editors. *NeuroImmune Biology, Vol. 7: The Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis*. Elsevier B.V.; 2008. 33-53.
- (211) Song C, Earley B, Leonard BE. Behavioral, neurochemical, and immunological responses to CRF administration. Is CRF a mediator of stress? *Ann N Y Acad Sci* 1995; 771:55-72.
- (212) Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. *J Immunol* 1990; 145(5):1430-4.

- (213) Stark K, Rovensky J, Blazickova S, Grosse-Wilde H, Ferencik S, Hengstenberg C et al. Association of common polymorphisms in known susceptibility genes with rheumatoid arthritis in a Slovak population using osteoarthritis patients as controls. *Arthritis Res Ther* 2009; 11(3):R70.
- (214) Stefanski V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. *Psychoneuroendocrinology* 2000; 25(4):389-406.
- (215) Stefanski V. Social stress in laboratory rats: behavior, immune function, and tumor metastasis. *Physiol Behav* 2001; 73(3):385-91.
- (216) Stefanski V, Engler H. Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. *Physiol Behav* 1998; 64(5):733-41.
- (217) Stefanski V, Engler H. Social stress, dominance and blood cellular immunity. *J Neuroimmunol* 1999; 94(1-2):144-52.
- (218) Stefanski V, Sachser N, von Holst D. Sozialer Stress, Verhalten, Immunsystem und Krankheit. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007. 221-33.
- (219) Straub RH. Autoimmune disease and innervation. *Brain Behav Immun* 2007; 21(5):528-34.
- (220) Straub RH, Besedovsky HO, del Rey A. Allgemeine Konzepte der Psychoneuroendokrino-Immunologie. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 1: Physiologische Grundlagen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007. 11-34.
- (221) Straub RH, Cutolo M. Involvement of the hypothalamic--pituitary--adrenal/gonadal axis and the peripheral nervous system in rheumatoid arthritis: viewpoint based on a systemic pathogenetic role. *Arthritis Rheum* 2001; 44(3):493-507.

- (222) Straub RH, Cutolo M. Does stress influence the course of rheumatic diseases? Clin Exp Rheumatol 2006; 24(3):225-8.
- (223) Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JW, Cutolo M. How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 2005; 52(1):16-26.
- (224) Straub RH, Gunzler C, Miller LE, Cutolo M, Schölmerich J, Schill S. Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. FASEB J 2002; 16(9):993-1000.
- (225) Straub RH, Härle P. [Stress, hormones, and neuronal signals in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. The negative impact on chronic inflammation]. Med Klin (Munich) 2005; 100(12):794-803.
- (226) Straub RH, Härle P, Sarzi-Puttini P, Cutolo M. Tumor necrosis factor-neutralizing therapies improve altered hormone axes: an alternative mode of antiinflammatory action. Arthritis Rheum 2006; 54(7):2039-46.
- (227) Straub RH, Mayer M, Kreutz M, Leeb S, Schölmerich J, Falk W. Neurotransmitters of the sympathetic nerve terminal are powerful chemoattractants for monocytes. J Leukoc Biol 2000; 67(4):553-8.
- (228) Straub RH, Paimela L, Peltomaa R, Schölmerich J, Leirisalo-Repo M. Inadequately low serum levels of steroid hormones in relation to interleukin-6 and tumor necrosis factor in untreated patients with early rheumatoid arthritis and reactive arthritis. Arthritis Rheum 2002; 46(3):654-62.
- (229) Straub RH, Pongratz G, Schölmerich J, Kees F, Schaible TF, Antoni C et al. Long-term anti-tumor necrosis factor antibody therapy in rheumatoid arthritis patients sensitizes the pituitary gland and favors adrenal androgen secretion. Arthritis Rheum 2003; 48(6):1504-12.

- (230) Straub RH, Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Buttgereit F, Carrabba M, Cutolo M. Anti-tumour necrosis factor antibody treatment does not change serum levels of cortisol binding globulin in patients with rheumatoid arthritis but it increases androstenedione relative to cortisol. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(9):1353-6.
- (231) Straub RH, Schedlowski M, Kavelaars A, Heijnen CJ. Einfluss von Stress auf die rheumatoide und die juvenile idiopathische Arthritis. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 2: Spezielle Pathophysiologie*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007. 89-98.
- (232) Straub RH, Wahle M, Baerwald CG. Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis unter Betrachtung von neuroendokrino-immunen Interaktionen. In: Straub RH, (Hrsg.). *Lehrbuch der klinischen Pathophysiologie komplexer chronischer Erkrankungen, Band 2: Spezielle Pathophysiologie*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; 2007. 80-8.
- (233) Straub RH, Wolff C, Fassold A, Hofbauer R, Chover-Gonzalez A, Richards LJ et al. Antiinflammatory role of endomorphins in osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and adjuvant-induced polyarthritis. *Arthritis Rheum* 2008; 58(2):456-66.
- (234) Sundar SK, Cierpial MA, Kilts C, Ritchie JC, Weiss JM. Brain IL-1-induced immunosuppression occurs through activation of both pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system by corticotropin-releasing factor. *J Neurosci* 1990; 10(11):3701-6.
- (235) Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhiro S, Sawada T, Suzuki M et al. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* 2003; 34(4):395-402.
- (236) Svensson L, Jirholt J, Holmdahl R, Jansson L. B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin Exp Immunol* 1998; 111(3):521-6.

- (237) Swain MG, Patchev V, Vergalla J, Chrousos G, Jones EA. Suppression of hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to stress in a rat model of acute cholestasis. *J Clin Invest* 1993; 91(5):1903-8.
- (238) Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M et al. MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet* 2005; 37(5):486-94.
- (239) Symmons DP, Bankhead CR, Harrison BJ, Brennan P, Barrett EM, Scott DG et al. Blood transfusion, smoking, and obesity as risk factors for the development of rheumatoid arthritis: results from a primary care-based incident case-control study in Norfolk, England. *Arthritis Rheum* 1997; 40(11):1955-61.
- (240) Taurog JD. Arthritis in HLA-B27 transgenic animals. *Am J Med Sci* 1998; 316(4):250-6.
- (241) Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH, Stuart JM. Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol* 1992; 148(7):2103-8.
- (242) Thomson W, Barton A, Ke X, Eyre S, Hinks A, Bowes J et al. Rheumatoid arthritis association at 6q23. *Nat Genet* 2007; 39(12):1431-3.
- (243) Toussiot E, Roudier J. Pathophysiological links between rheumatoid arthritis and the Epstein-Barr virus: an update. *Joint Bone Spine* 2007; 74(5):418-26.
- (244) Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977; 146(3):857-68.
- (245) Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 1995; 13:251-76.

- (246) Tsigos C, Chrousos GP. Physiology of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in health and dysregulation in psychiatric and autoimmune disorders. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994; 23(3):451-66.
- (247) Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res* 2002; 53(4):865-71.
- (248) Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999; 79(1):1-71.
- (249) van de Putte LB, Meijer CJ, Lafeber GJ, Kleinjan R, Cats A. Lymphocytes in rheumatoid and nonrheumatoid synovial fluids. Nonspecificity of high T-cell and low B-cell percentages. *Ann Rheum Dis* 1975; 35(5):451-5.
- (250) van den Berg WB, Joosten LA, Kollias G, van de Loo FA. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. *Ann Rheum Dis* 1999; 58 Suppl 1:I40-I48.
- (251) van den Brink HR, Blankenstein MA, Koppeschaar HP, Bijlsma JW. Influence of disease activity on steroid hormone levels in peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1993; 11(6):649-52.
- (252) Vierboom MP, Jonker M, Bontrop RE, 't HB. Modeling human arthritic diseases in nonhuman primates. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(4):145-54.
- (253) Wagner F, Fink R, Hart R, Dancygier H. Substance P enhances interferon-gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul Pept* 1987; 19(5-6):355-64.
- (254) Walsh NC, Gravallese EM. Bone loss in inflammatory arthritis: mechanisms and treatment strategies. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16(4):419-27.
- (255) Wang J, Dunn AJ. Mouse interleukin-6 stimulates the HPA axis and increases brain tryptophan and serotonin metabolism. *Neurochem Int* 1998; 33(2):143-54.

- (256) Watson WC, Townes AS. Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC loci. *J Exp Med* 1985; 162(6):1878-91.
- (257) Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Schölmerich J et al. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(1):13-20.
- (258) West HF. Corticosteroid metabolism and rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1957; 16(2):173-82.
- (259) Whitnall MH. Regulation of the hypothalamic corticotropin-releasing hormone neurosecretory system. *Prog Neurobiol* 1993; 40(5):573-629.
- (260) Wiedermann CJ, Wiedermann FJ, Apperl A, Kieselbach G, Konwalinka G, Braunsteiner H. In vitro human polymorphonuclear leukocyte chemokinesis and human monocyte chemotaxis are different activities of aminoterminal and carboxyterminal substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1989; 340(2):185-90.
- (261) Wilder RL. Hormones and autoimmunity: animal models of arthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 1996; 10(2):259-71.
- (262) Wilder RL, Griffiths MM, Cannon GW, Caspi R, Gulko PS, Remmers EF. Genetic factors involved in central nervous system/immune interactions. *Adv Exp Med Biol* 2001; 493:59-67.
- (263) Williams RO, Inglis JJ, Simelyte E, Criado G, Sumariwalla PF. Analysing the effect of novel therapies on cytokine expression in experimental arthritis. *Int J Exp Pathol* 2005; 86(5):267-78.

- (264) Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med* 1981; 154(3):688-700.
- (265) Xiong Y, Hales DB. The role of tumor necrosis factor-alpha in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* 1993; 132(6):2438-44.
- (266) Yirmiya R, Winocur G, Goshen I. Brain interleukin-1 is involved in spatial memory and passive avoidance conditioning. *Neurobiol Learn Mem* 2002; 78(2):379-89.
- (267) Zautra AJ, Hoffman JM, Matt KS, Yocum D, Potter PT, Castro WL et al. An examination of individual differences in the relationship between interpersonal stress and disease activity among women with rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 1998; 11(4):271-9.
- (268) Zurier RB, Weissmann G, Hoffstein S, Kammerman S, Tai HH. Mechanisms of lysosomal enzyme release from human leukocytes. II. Effects of cAMP and cGMP, autonomic agonists, and agents which affect microtubule function. *J Clin Invest* 1974; 53(1):297-309.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mir während der gesamten Zeit der Arbeit hilfreich zur Seite standen.

Im Besonderen möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Straub für die Überlassung des spannenden Themas und die ausgezeichnete Betreuung während der gesamten Arbeit bedanken.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Göpferich für die Bereitschaft zur Betreuung und Begutachtung dieser Arbeit.

Für die großartige Zusammenarbeit möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefanski und Frau Dipl. biol. Kerstin Schunke der Abteilung für Tierphysiologie der Universität in Bayreuth bedanken. Kerstin Schunke danke ich für die Arbeit mit den Wistar Ratten und die Durchführung der FACS-Analysen.

Ebenso danke ich Frau Prof. Dr. del Rey, Herrn Prof. Dr. Besedovsky und Herrn Dr. Wildmann der Abteilung für Immunophysiologie der Universität in Marburg für die großartige Zusammenarbeit. Bei Herrn Dr. Wildmann bedanke ich mich für die Durchführung der HPLC bzw. RT-PCR.

Bei Angelika Gräber und Luise Rauch möchte ich mich herzlichst für die großartige Unterstützung bei den Tierversuchen bedanken.

Auch möchte ich Peter Härle für die anfängliche Betreuung und Unterstützung bei den ersten Rattenversuchen danken.

Danke auch an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Straub für die Anregungen und Hilfestellungen während meiner Arbeit.

Schließlich möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir schon so lange zur Seite stehen und bei Christoph, Diane und Silvia für die unermüdliche Unterstützung.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Christine Wolff
Geburtsdatum	03.10.1978
Geburtsort	Eberswalde
Nationalität	Deutsch

Schulbildung

09/1985 - 08/1990	Rosa-Luxemburg-Oberschule in Eberswalde-Finow
09/1990 - 06/1998	Alexander von Humboldt Gymnasium in Eberswalde
	Allgemeine Hochschulreife

Studium und praktische Erfahrungen

10/1998 – 10/2000	Grundstudium im Studiengang Diplom Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald
11/2000 – 02/2001	Praktikum im Kasanka Nationalpark in Sambia zum Thema „Distribution and habit of the African elephant (<i>Loxodonta africana</i>)“
03/2001 – 09/2001	Praktikum im Queen Elisabeth Nationalpark in Uganda zum Thema „Soziale Organisation, Verhalten und Ökologie des Afrikanischen Riesenwaldschweins (<i>Hylochoerus meinertzhageni</i>)“
10/2001 – 01/2005	Hauptstudium im Studiengang Diplom Biologie an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald Diplom
11/2001-02/2003	Tätigkeit als studentische Hilfskraft an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald in der Arbeitsgruppe mit dem Schwerpunkt „Ökologie und Verhalten von Bodenarthropoden“

03/2004-11/2004	Diplomarbeit, durchgeführt an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald, mit dem Thema „Untersuchung der Microwear an den Zähnen ausgewählter Primaten“
02/2005-05/2005	Tätigkeit als Wissenschaftliche Hilfskraft an der Ernst-Moritz-Arndt Universität in Greifswald
09/2005-02/2006	Tätigkeit als Wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe Muskuloskelettales System am Anatomischen Institut der Ludwig-Maximilian-Universität in München
Seit März 2006	Tätigkeit in der Lehre (Präparationskurs für Mediziner) Doktorarbeit, durchgeführt am Universitätsklinikum in Regensburg in der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I bei Prof. Dr. R.H. Straub zum Thema: „Zerebrale Modulation der peripheren Entzündung bei experimenteller Arthritis – Rolle von Stress, ZNS-Zytokinen, ZNS-Neurotransmittern“

10 Publikationen

Originalarbeiten

del Rey A.*, Wolff C.*, Wildmann J., Randolph A., Hahnel A., Besedovsky H., Straub R.H. Disrupted Brain-Immune System-Joint Communication During Experimental Arthritis. Arthritis Rheum. 2008; 58(10): 3090-9.

* trugen zu gleichen Teilen bei

Straub R.H., Wolff C., Fassold A., Hofbauer R., Chover-Gonzalez A., Richards L.J., Jessop D.S. Antiinflammatory Role of Endomorphins in Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, and Adjuvant-Induced Polyarthritis. Arthritis Rheum. 2008; 58(2): 456-66.

Vorträge

Wolff C. Adrenal Reasons for Inadequately Low Secretion of Glucocorticoids During the Course of Arthritis. 4th International Conference on NeuroEndocrine Immunology in Rheumatic diseases (NEIRD). Santa Magherita Ligure, Genua, Italien, 8.-10. Mai 2009

Wolff C. Dental Microwear Analysis in Primates Using ESTA (Enamel Surface Texture Analysis), A New Method in Microwear Evaluation. 13th International Symposium on Dental Morphology, Lodz, Polen, 24.-27. August 2005

Posterpräsentationen

Wolff C., Schunke K., Stefanski V., Straub R.H. Psychosocial Confrontation Stress Reduces the Susceptibility to Experimental Arthritis in Male Wistar Rats. 36. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Berlin, 24. - 27. September 2008

Wolff C., Wildmann J., Hahnel A., Besedovsky H.O, del Rey A., Straub R.H. Early Disruption of the Brain-Immune System-Joint Communication and Adrenal Insufficiency during Experimental Arthritis in Rats. 36. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Berlin, 24. - 27. September 2008

Wolff C., Wildmann J., Hahnel A., Besedovsky H.O, del Rey A., Straub R.H. Early Disruption of the Brain-Immune System-Joint Communication and Adrenal Insufficiency during Experimental Arthritis in Rats. 38. Kongress der Europäischen Gesellschaft für Immunologie, Wien, Österreich, 3.-6. September 2008

Wolff C., Wildmann J., Hahnel A., Besedovsky H.O, del Rey A., Straub R.H. Disruption of the Joint-Immune-Brain Communication during Experimental Arthritis in the Rat. 15th Annual Meeting of The Psychoneuroimmunology Research Society (PNIRS), Madison, Wisconsin, USA, 28.-31. Mai 2008

del Rey A., Wolff C., Randolph A., Wildmann J., Hahnel A., Straub R.H., Besedovsky H. Joint-Immune-Brain Communication is Disrupted during Experimental Arthritis. 7th International Society for NeuroImmunoModulation (ISNIM), Rio de Janeiro, Brazil, 24.-27. April 2008

Schunke K., Wolff C., Straub R.H., Stefanski V. Social Stress and Collagen-Induced Arthritis (CIA) in Laboratory Rats: Agonistic Behavior and Susceptibility. Tagung der Deutschen Ethologischen Gesellschaft, Regensburg, 20.-22. Februar 2008

Wolff C., Härle P., Wildmann J., Besedovsky H.O., Straub R.H., del Rey A. Uncoupling of the HPA Axis and the Sympathetic Nervous System in Rheumatoid Arthritis is Linked to Marked Changes of Norepinephrine Content in the Hypothalamus. Annual Meeting of the American College of Rheumatology (ACR), Boston, USA, 7.-11- November 2007

Straub R.H., Wolff C., Fassold A., Hofbauer R., Chover-Gonzalez A., Richards L.J., Jessop D.S. Anti-Inflammatory Role of Endomorphins in Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, and Adjuvant Arthritis. Annual Meeting of the American College of Rheumatology (ACR), Boston, USA, 7.-11- November 2007

Wolff C., Härle P., Wildmann J., Besedovsky H.O., Straub R.H., del Rey A. Uncoupling of the HPA Axis and the Sympathetic Nervous System in Rheumatoid Arthritis is Linked to Marked Changes of Norepinephrine Levels in the Hypothalamus. 35. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Hamburg, 19.-22. September 2007

Straub R.H., Wolff C., Fassold A., Hofbauer R., Chover-Gonzalez A., Richards L.J., Jessop D.S. Anti-Inflammatory Role of Endomorphins in Osteoarthritis, Rheumatoid Arthritis, and Adjuvant Arthritis. 35. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (DGRh), Hamburg, 19.-22. September 2007

Wolff C., Härle P., Wildmann J., Besedovsky H.O., Straub R.H., del Rey A. Uncoupling of the HPA Axis and the Sympathetic Nervous System in Rheumatoid Arthritis is Linked to Marked Changes of Norepinephrine Levels in the Hypothalamus. 37. Kongress der Gesellschaft fuer Immunologie, Heidelberg, 5.-8. September 2007

Wolff C., Härle P., Wildmann J., Besedovsky H.O., Straub R.H., del Rey A. Uncoupling of the HPA Axis and the Sympathetic Nervous System in Arthritis is Linked to Marked Changes of Norepinephrine Content in the Hypothalamus. 14th Annual Meeting of The Psychoneuroimmunology Research Society (PNIRS), Arcachon, Frankreich, 30. Mai – 2. Juni 2007

Schunke K., Wolff C., Straub R.H., Stefanski V. The Influence of Social Stress on Collagen-Induced Arthritis in Laboratory Rats: Study Outline and First Results. 6th Meeting of the German-Endocrine-Brain-Immune Network (GEBIN), Freiburg, 5.-7. Mai 2007

Kaiser T.M., Wolff C. & Brinkmann G. Surface Roughness Parameters - A New Approach to Dental Microwear in Primates. 97. Jahresversammlung der Deutschen Zoologischen Gesellschaft (DZG), Rostock, 31. Mai – 4. Juni 2004

Kaiser T M, Wolff C, Brinkmann G. Applying dental micro roughness analysis to primates. 1st International Workshop: Evolutionary Changes in the Craniofacial Morphology of Primates, Greifswald, 18.-20. September 2003

11 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Form bei keiner anderen Hochschule eingereicht worden.

Regensburg, Juli 2009

Christine Wolff

12 Zugrunde liegende Publikation

del Rey A.*, Wolff C.*, Wildmann J., Randolph A., Hahnel A., Besedovsky H., Straub R.H.
Disrupted Brain-Immune System-Joint Communication During Experimental Arthritis.
Arthritis Rheum. 2008; 58(10): 3090-9.

* trugen zu gleichen Teilen bei

(<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/121425882/PDFSTART>)