

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN I
DIREKTORIN: PROF. DR. MARTINA MÜLLER-SCHILLING

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

AUSWIRKUNG DER CHIRURGISCHEN SYNOVEKTOMIE AM
KNIEGELENK AUF DIE SYMPATHISCHE UND SENSIBLE INNERVATION
DER SYNOVIALMEMBRAN BEI PATIENTEN MIT RHEUMATOIDER
ARTHRITIS IM VERGLEICH ZU EINER KONTROLLGRUPPE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von

Barbara Ossysek

2012

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Rainer H. Straub
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Grifka
Tag der mündlichen Prüfung: 03. April 2012

**Gewidmet
meinen Eltern**

Inhaltsverzeichnis:

1. Einleitung.....	6
1.1. Rheumatoide Arthritis.....	6
1.2. Wechselwirkungen zwischen Immun- und Nervensystem.....	8
1.2.1. Sympathische Nervenfasern und Entzündung.....	9
1.2.2. Sensible Nervenfasern und Entzündung.....	9
1.3. Synovialitis.....	12
1.4. Synovektomie.....	14
1.5. Fragestellung.....	15
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Patienten und Operationspräparate.....	16
2.2. Immunhistochemische Färbung.....	20
2.3. Auswertung.....	23
3. Ergebnisse.....	26
3.1. TH+ Nervenfasern im Synovialgewebe bei erster und zweiter Entnahme.....	26
3.2. SP+ Nervenfasern im Synovialgewebe bei erster und zweiter Entnahme.....	28
3.3. TH+ Zellen im Synovialgewebe bei erster und zweiter Entnahme.....	30
3.4. Gesamtzellzahl und Verhältnis TH+ Zellen / Gesamtzellzahl bei erster und zweiter Entnahme.....	32
4. Diskussion.....	35
5. Zusammenfassung.....	38
6. Literaturverzeichnis.....	40

Inhaltsverzeichnis

7. Originalpublikation	49
8. Lebenslauf	55
9. Danksagung	57

1.Einleitung

1.1. Rheumatoide Arthritis

Weltweit beträgt die Prävalenz der rheumatoiden Arthritis (RA) circa 1,0 %. Diese stellt damit die häufigste entzündlich-rheumatologische Erkrankung dar. Die RA ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung mit bevorzugter Manifestation an den Gelenken, wo es ausgehend von einer Synovialitis zur Entstehung einer Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis, bis hin zur völligen Gelenksdestruktion kommen kann. Im weiteren Verlauf sind fakultativ auch extraartikuläre Organmanifestationen, wie eine Begleitvaskulitis mit kutanem, pulmonalem, renalem und intestinalem Befall, möglich.

Die genaue Ätiologie der RA ist unbekannt. Allerdings kennt man mittlerweile eine Vielzahl von Faktoren, die in der Pathogenese der RA eine Rolle spielen.

Man weiß, dass bei einem Teil der Patienten mit RA eine Autoimmunreaktion mit dem Auftreten autoreaktiver T- und B-Zellen zugrunde liegt. Normalerweise wird Autoimmunität durch Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz verhindert. Bei der T-Zell-Reifung im Thymus wird zentrale Toleranz durch die negative Selektion von T-Lymphozyten mit hoher Affinität zu *Major histocompatibility complex* (MHC) / Peptid-Komplexen erreicht [1]. Auch bei der Entwicklung von B-Lymphozyten im Knochenmark kommt es zur zentralen Toleranz, entweder durch Veränderung der Rezeptoren von B-Zellen mit zu starker Affinität für körpereigene Antigene (Rezeptoredition) oder durch die apoptotische Deletion dieser B-Zellen [2].

Einige autoreaktive T- und B-Zellen entgehen jedoch der Elimination im Rahmen der zentralen Toleranz; Autoimmunreaktionen dieser Zellen werden in der Regel durch verschiedene Mechanismen der peripheren Toleranz, wie Ignoranz von Autoantigenen, Anergie, periphere Deletion oder Suppression durch regulatorische T-Zellen, verhindert [3]. Bei Autoimmunerkrankungen wie der RA kommt es, ausgelöst durch das

Zusammenwirken von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren, zu einem Verlust der zentralen oder peripheren Toleranz.

Außerdem gilt eine genetische Beteiligung bei der RA mittlerweile als gesichert: Insbesondere homozygote Träger des HLA-Antigens DRB1 haben ein erhöhtes Risiko an RA zu erkranken und bei Erkrankung ein erhöhtes Risiko für einen schwereren Krankheitsverlauf. Auch das PTPN22-Gen wird mit der RA assoziiert [4].

Daneben sind Zusammenhänge zwischen äußeren Einflüssen, etwa Stress oder Rauchen, und dem Auftreten und Krankheitsverlauf der RA bekannt [5,6]. Auch Infektionen durch verschiedene bakterielle oder virale Erreger, wie z.B. *Proteus mirabilis* [7] oder das Epstein-Barr-Virus [8,9], scheinen eine Rolle in der Pathogenese der RA zu spielen. Zugrunde liegt der Mechanismus des molekularen Mimikrys, bei dem ein Infektionserreger eine hohe Ähnlichkeit mit der Struktur eines körpereigenen Antigens aufweist und es dann bei einer Infektion mit dem Erreger zu einer Immunreaktion kommt, die sich gegen den Erreger und gleichzeitig aber auch gegen körpereigenes Gewebe richtet [10].

Ferner wird die Pathophysiologie der RA, wie auch die vieler anderer autoimmunologisch bedingter Erkrankungen, durch die Wechselwirkungen zwischen Immunsystem und neuroendokrinem System beeinflusst [11].

1.2. Wechselwirkungen zwischen Immun- und Nervensystem

1.2.1. Sympathische Nervenfasern und Entzündung

Das sympathische Nervensystem mit seinen Neurotransmittern Adrenalin, Noradrenalin, Adenosin, Neuropeptid Y, ATP und Enkephalinen reguliert das Immunsystem auf lokaler und systemischer Ebene. Alle primär und sekundär lymphatischen Organe einschließlich Thymus, Milz und Lymphknoten werden von sympathischen Nervenfasern innerviert, aber auch einzelne, im Organismus verstreute Zellen des Immunsystems werden von der sympathischen Innervation erfasst [12,13]. Zahlreiche pharmakologisch-funktionelle Studien haben gezeigt, dass viele Immunzellen, angefangen bei Stammzellen der lymphatischen Reihe bis hin zu aktivierte, hoch spezialisierten Makrophagen, adrenerge Rezeptoren exprimieren.

Die Wirkungen des sympathischen Nervensystems auf das Immunsystem sind dabei sehr vielschichtig und teilweise sogar antagonistisch und von vielen verschiedenen Faktoren abhängig. So variiert die Wirkung von Katecholaminen in Abhängigkeit vom Adrenorezeptor (AR)-Typ. Adrenerge Rezeptoren stellen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren dar und lassen sich im Wesentlichen in drei Gruppen (α_1 -Rezeptoren, α_2 -Rezeptoren und β -Rezeptoren), einteilen, wobei Noradrenalin, der klassische Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems, eine ca. 100-fach höhere Affinität zu α -AR als zu β -AR hat. In niedrigen Konzentrationen stimuliert Noradrenalin präferenziell α -AR, in hohen Konzentrationen wirkt es vor allem über β -AR. Dabei wirkt die Stimulation von β -AR eher entzündungshemmend, während die Stimulation von α_1 -AR und α_2 -AR proinflammatorische Effekte auslöst [14,15,16].

Die Art des AR und die Anzahl der exprimierten AR hängt stark von Umgebungsfaktoren ab: Eine adrenerge Dauerstimulation führt zu einer Desensibilisierung und zu einer Dichteabnahme der β -AR [17]. Außerdem wurde nachgewiesen, dass in entzündetem Gewebe β -AR vermindert und α -AR hingegen vermehrt exprimiert werden [16], sodass hier die proinflammatorischen Effekte, vermittelt über α_1 -AR und α_2 -AR, überwiegen.

Ferner konnte gezeigt werden, dass es bei einer chronischen Entzündung wie im Synovialgewebe bei der RA [18,19] oder im Ileum bei einer akuten Entzündung bei Morbus Crohn [20] zu einer Abnahme der Dichte sympathischer Nervenfasern kommt, was zu einer verringerten Konzentration von Noradrenalin und somit zu einem Überwiegen der über α -AR vermittelten proinflammatorischen Wirkung führt.

Außerdem hat auch der Zeitpunkt der Ausschüttung von Noradrenalin Auswirkungen darauf, ob es pro- bzw. antiinflammatorisch wirkt. So nahm in einer experimentellen Untersuchung die Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interferon- γ (INF- γ) durch T1-Helfer-Lymphozyten ab, wenn vor deren Aktivierung Noradrenalin zugegeben wurde. Erfolgte die Applikation von Noradrenalin jedoch nach der Aktivierung der T1-Helfer-Lymphozyten, so kam es zu einer Zunahme der INF- γ -Produktion [21].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Einfluss des sympathischen Nervensystems auf das Immunsystem sehr komplex ist, und in Abhängigkeit von Umgebungsfaktoren und dem Aktivierungsgrad der Immunzellen unterschiedliche und sogar völlig gegensätzliche Effekte haben kann.

1.2.2. Sensible Nervenfasern und Entzündung

Afferent-sensible Nervenfasern innervieren, ebenso wie efferent-sympathische Nervenfasern, alle lymphatischen Organe des Körpers. Diese sensiblen nozizeptiven Nervenfasern sind zum Großteil nicht myelinisierte Klasse C- und dünne myelinisierte A δ -Fasern und besitzen neben *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP) Substanz P (SP) als wichtigsten Neurotransmitter. Bei SP handelt es sich um ein aus 11 Aminosäuren bestehendes Neuropeptid, das zur Gruppe der Tachykinine gehört und seine Wirkung über Bindung an die Neurokinin (NK)-Rezeptoren NK-1, NK-2 und NK-3 entfaltet, wobei die Affinität zu NK-1 am größten ist.

In entzündetem Gewebe, z.B. in der Synovialmembran bei RA, ist die Zahl der NK-Rezeptoren erhöht, was vor allem auf das entzündungsbedingte Einsprossen von Blutgefäßen und das Einwandern von Immunzellen, auf denen sich NK-Rezeptoren befinden, zurückzuführen ist [22,23]. Die Angiogenese im Entzündungsgebiet wiederum wird über Substanz P und NK-1 Rezeptoren gefördert [24].

Vermittelt über NK-Rezeptoren spielt SP einerseits eine entscheidende Rolle bei der peripheren [25,26] und zentralen [27,28,29] Schmerzsensibilisierung, stimuliert andererseits viele verschiedene proinflammatorische Mechanismen und trägt so zur chronischen Entzündung bei [30].

Über NK-1-Rezeptoren bewirkt SP an den Blutgefäßen eine Vasodilatation [31], Permeabilitätssteigerung und Plasmaextravasation [32]. Daneben stimuliert SP über NK-1 Rezeptoren auf den verschiedenen Zellen des Immunsystems die Bildung von Superoxid-Anionen [33,34], die Chemotaxis z.B. von neutrophilen Granulozyten [35] und Monozyten [36], sowie die Sekretion von Tumornekrosefaktor (TNF), Interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, Interferon INF- γ [37,38,39,40,41,42,43].

Umgekehrt werden die sensiblen Schmerzfasern durch lokal im Gewebe ausgeschüttete Entzündungsmodulatoren wie TNF, IL-6 und viele weitere [44,45,46,47] stimuliert. Diese lokalen Reize aktivieren die Weiterleitung von Signalen aus dem Entzündungsgebiet zum Gehirn und bewirken eine Sensibilisierung der Schmerzbahnen [48].

So stellt Substanz P einen wichtigen Trigger der neurogenen Entzündung dar, also einer Entzündung, bei der Schmerz nicht nur Folge, sondern auch Ursache der Entzündung ist. Man kennt mittlerweile eine Vielzahl chronischer Erkrankungen, insbesondere auch die RA, bei denen diesem Mechanismus der neurogenen Entzündung eine wesentliche Bedeutung zukommt [49,50,51].

In verschiedenen Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass bei RA-Patienten im Vergleich zu Patienten mit Osteoarthrose (OA) die Dichte der SP positiven (SP+) Nervenfasern im Synovialgewebe erhöht ist [18,19]. Im Gegensatz dazu ist die Dichte CGRP positiven (CGRP+) Nervenfasern bei RA-Patienten niedriger als bei OA-Patienten. Auch das Verhältnis von CGRP+ Nervenfasern zu SP+ Nervenfasern ist bei RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten erniedrigt [52].

Während SP eine proinflammatorische Wirkung hat, löst CGRP hingegen verschiedene antiinflammatorische Effekte aus, wie die Hemmung der TNF-Sekretion [53], der Makrophagenfunktion [54,55] und der Ausschüttung von Zytokinen wie INF- γ , IL-1 β und IL-12 [55,56].

Das Überwiegen der SP+ Nervenfasern gegenüber CGRP+ Nervenfasern kann als proinflammatorisches Signal betrachtet werden, obwohl man die genauen Gründe für das unterschiedliche Verhalten der zwei sensiblen Neuropeptide SP und CGRP gegenwärtig noch nicht kennt.

1.3. Synovialitis

Ursächlich für die Gelenksdestruktion bei der RA ist die Synovialitis, die Entzündung der Synovialmembran. Makroskopisch kommt es bei einer Synovialitis durch Einwanderung und Proliferation der Synoviozyten zur Pannusbildung, zur Verdickung der Synovialis, die mit einer Neovaskularisation im Entzündungsgebiet einhergeht. Daneben findet man eine entzündungsbedingte Vermehrung der Gelenkflüssigkeit, woraus eine Aussackung der Gelenkkapsel resultieren kann. Entsteht eine solche Aussackung dorsal am Kniegelenk, spricht man von einer Bakerzyste.

Bei der Synovialitis spielen neben autoreaktiven T-Zellen, hauptsächlich vom CD4+ Helfer-Typ, vor allem Typ A-Synoviozyten (makrophagenartig) und Typ B-Synoviozyten (fibroblastenartig) eine entscheidende Rolle. Synoviale Makrophagen synthetisieren Chemokine, die die Invasion von Immunzellen fördern, und Zytokine wie z.B. TNF- α und IL-1, die aktivierend auf T-Zellen und synoviale Fibroblasten wirken [57]. Außerdem erfolgt auch eine wechselseitige Aktivierung von T-Zellen und synovialen Fibroblasten. Die Fibroblasten aktivieren z.B. über IL-15, IL-16 und IL-17 T-Zellen [58], und T-Zellen wiederum, speziell CD4+ CD28 negative T-Zellen, fördern die Fibroblastenproliferation [59].

Die aktivierte synovialen Fibroblasten weisen ein viel aggressiveres Verhalten als normale Fibroblasten auf, indem sie in Knorpel und Knochen einwachsen und eine verminderte Apoptoserate haben [60]. Vor allem jedoch synthetisieren die Fibroblasten Matrix-abbauende Enzyme, wie die Phospholipase A2, die Matrixmetalloproteininasen MMP-1 und MMP-3 und die Aggrecanasen I und II, die maßgeblich an der Knorpel- und Gelenksdestruktion beteiligt sind [61].

Zusätzlich kommt es zur Destruktion des subchondralen Knochens durch Osteoklasten. Oft beginnt dieser Knochenabbau schon relativ früh im Krankheitsverlauf und schreitet am schnellsten voran im ersten Jahr nach Krankheitsbeginn [62]. Die Differenzierung von Osteoklasten wird durch die Bindung des *Receptor Activator of Nuclear Factor*

kappa B Ligand (RANKL) an den *Receptor Activator of Nuclear Factor kappa B* (RANK), der sich auf den monozytären Osteoklasten-Vorläuferzellen befindet, stimuliert. RANKL wird bei der RA in chronisch entzündeten Synovialgewebe sowohl von T-Lymphozyten als auch von synovialen Fibroblasten exprimiert [63,64,65]. Die Expression von RANKL wird durch proinflammatorische Zytokine einschließlich TNF, IL-1, IL-6 und IL-17 gefördert [66,67].

1.4. Synovektomie

Unter einer Synovektomie versteht man die arthroskopische oder offen chirurgische Entfernung der entzündlich veränderten Synovialmembran. Die Synovektomie ist eine anerkannte therapeutische Maßnahme in der Behandlung der Synovialitis bei Erwachsenen wie auch bei Kindern und Jugendlichen mit RA, die nicht oder nicht mehr auf die Basistherapie mit langwirksamen Antirheumatika (engl.: *disease modifying antirheumatic drugs*, DMARD) ansprechen [68,69,70]. Die Entscheidung zur chirurgischen Synovektomie wird dabei gemeinsam von Chirurgen und Rheumatologen getroffen. Der klinische Erfolg der Synovektomie, in erster Linie eine Verringerung der Schmerzen in dem betroffenen Gelenk und des Entzündungssubstrats, aber auch die Verbesserung der Gelenkbeweglichkeit, ist in einem frühen Stadium der RA in der Regel größer als in einem fortgeschrittenen Zustand [68,71].

Man vermutet, dass der hauptsächliche Nutzen der Synovektomie, die Schmerzreduktion, auf eine sensible Denervierung zurückzuführen ist, die Entfernung der sensiblen, nozizeptiven Nervenfasern im Synovialgewebe [72,73]. Es wurde festgestellt, dass bei RA-Patienten antiinflammatorische sympathische und CGRP-positive Nervenfasern, relativ zu den SP-positiven nozizeptiven Nervenfasern gesehen, verloren gehen [18,52]. Folglich überwiegt im Synovialgewebe der Einfluss der nozizeptiven und proinflammatorischen SP-positiven Nervenfasern und die chirurgische Entfernung des Gewebes müsste demnach günstige Auswirkungen hinsichtlich Schmerzübertragung und Entzündung haben. Allerdings ist diese sensible Denervierung als Folge der chirurgischen Synovektomie bisher noch nie histologisch nachgewiesen worden.

1.5. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Studie war es, zu untersuchen, welche Auswirkungen die Durchführung einer Synovektomie auf die Dichte sympathischer und sensibler Nervenfasern im Synovialgewebe bei Patienten mit RA hat. Hierbei interessierte vor allem auch der Vergleich der RA-Patienten mit einer gleich großen Kontrollgruppe. Die Patienten der Kontrollgruppe hatten keine entzündlichen Veränderungen des Kniegelenks, sondern wiesen einen Knorpeldefekt nach Kniegelenktrauma oder Osteochondrosis dissecans auf. Es sollte analysiert werden, wie sich die beiden Gruppen im Ausgangszustand, d.h. zum Zeitpunkt der ersten Operation, hinsichtlich der Dichte sympathischer und sensibler Nervenfasern unterschieden. Des Weiteren sollte untersucht werden, wie sich diese Parameter nach einer Synovektomie in dem Regeneratgewebe veränderten.

Die sympathischen Nervenfasern wurden durch die immunhistochemische Färbung mit Anti-Tyrosinhydroxylase-Antikörpern (Anti-TH-Aks) dargestellt, die sensiblen Nervenfasern durch Färbung mit Anti-SP-Antikörpern (Anti-SP-Aks).

Tyrosinhydroxylase ist das Schlüsselenzym der Biosynthese der Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin. Sie katalysiert die Umwandlung der Aminosäure L-Tyrosin in die Aminosäure Levodopa. Da in sympathischen Nervenfasern Katecholamine synthetisiert werden, kann somit durch Markierung der Tyrosinhydroxylase dieser Nervenfaser-Typus identifiziert werden. Außerdem werden auch in manchen Synoviozyten Katecholamine produziert [76]. Diese katecholaminsynthetisierenden Zellen können ebenfalls durch Anti-TH-AKs markiert werden.

Zusätzlich zur Dichte der sensiblen und sympathischen Nervenfaseren sollte im Rahmen dieser Studie auch jeweils die Zahl Tyrosinhydroxylase positiver (TH+) Zellen und die Gesamtzellzahl in den Gewebeproben bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Patienten und Operationspräparate

Ursprünglich wurde zwischen den Jahren 2001 und 2004 von 41 Patienten bei Operationen am Kniegelenk in der Klinik und Polyklinik für Orthopädie der Universität Regensburg im Asklepios Klinikum Bad Abbach Probenmaterial gewonnen. Für die vorliegende Studie wurden von diesen 41 Patienten schließlich 8 RA-Patienten und als Kontrollgruppe 8 Patienten ohne RA ausgewählt. Die Patienten der Kontrollgruppe hatten keine entzündlichen Veränderungen des Kniegelenks, sondern wiesen einen Knorpeldefekt nach Kniegelenktrauma ($n=6$) oder Osteochondrosis dissecans ($n=2$) auf, aufgrund dessen eine autologe Chondrozyten-Transplantation durchgeführt wurde [75]. Die RA wurde gemäß den Kriterien des *American College of Rheumatology* (früher: *American Rheumatism Association*) diagnostiziert [74].

Viele Patienten mussten ausgeschlossen werden, da nur Gewebeproben von einer statt von zwei Operationen vorlagen oder anstelle von Synovialmembran nur Synovialflüssigkeit entnommen worden war. Weitere Ausschlusskriterien waren eine unklare Diagnose, d.h. wenn bei Patienten die Diagnose RA nicht gesichert war bzw. diese auch nicht sicher definitiv ausgeschlossen werden konnte. Auch die Diagnose einer Psoriasis-Arthritis führte zum Ausschluss. Im Durchschnitt waren die Patienten der Kontrollgruppe zwar ca. 17 Jahre jünger als die RA-Patienten und der Männeranteil war höher, doch Untersuchungen haben gezeigt, dass weder hinsichtlich Alter noch Geschlecht Auswirkungen auf die synoviale Nervenfaserdichte nachgewiesen werden konnten [18].

Bei allen Patienten der Studie wurde eine zweizeitige Synovektomie durchgeführt und dabei sowohl bei der ersten Operation als auch bei der zweiten Operation nach einem Zeitintervall von ca. 40 bis 50 Tagen ein Stück Synovialgewebe entnommen.

Material und Methoden

Alle RA-Patienten in der Studie wiesen eine Bakerzyste auf, die während der ersten Operation entfernt wurde. Während dieser Operation wurde gleichzeitig eine Synovektomie im vorderen Bereich der entzündeten Synovialmembran durchgeführt und dabei histologisches Material entnommen. Die Entnahmestelle wurde mit einem Faden markiert. Während der zweiten arthroskopisch durchgeführten Synovektomie wurde von dieser Stelle eine weitere Probe zusammen mit dem Faden entnommen.

Bei den Patienten der Kontrollgruppe wurde während einer ersten arthroskopischen Betrachtung des Kniegelenks ein kleines Stück Synovialgewebe entnommen und die Entnahmestelle gekennzeichnet. Nach einigen Wochen wurde bei einer zweiten Operation, während der die autologe Chondrozyten-Transplantation erfolgte, von der markierten Stelle eine zweite Probe und der Markierungsfaden entnommen.

Alle Patienten wurden über den Zweck dieser Studie aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Teilnahme an der Studie gemäß der Deklaration von Helsinki. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität Regensburg zugelassen.

Tab. 1: Daten und Laborwerte der in der Studie untersuchten RA- und Kontroll-Patienten; Variablen wie Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG) und C-reaktives Protein (CRP) wurden durch Standardverfahren bestimmt; die Daten sind als arithmetisches Mittel \pm Standardfehler angegeben; Prozentwerte wurden in runden, Spannweiten in eckigen Klammern angegeben.

	RA-Patienten	Kontroll-Patienten
Patientenanzahl	8	8
Alter (Jahre)	$50,4 \pm 13,4$ [26-64]	$33,1 \pm 15,9$ [19-69]
Frauen / Männer, n(%)	4 / 4 (50 / 50)	2 / 6 (25 / 75)
Zeit zwischen OP1 und OP2 (Tage)	$52,3 \pm 8,7$	$44,1 \pm 23,9$
Diagnosen		
Bakerzyste n(%)	8 (100)	0 (0)
Osteochondrosis dissecans n(%)	0 (0)	6 (75)
Kniegelenkstrauma n(%)	0 (0)	2 (25)
Laborwerte		
Rheuma-Faktor positiv / negativ, n(%)	6 / 2 (75 / 25)	0 / 8 (0 / 100)
CRP (mg/dl)	$3,55 \pm 3,42$	$0,49 \pm 0,36$
BSG (mm/1.Stunde)	$71,2 \pm 41,2$	$17,5 \pm 13,9$
Medikation		
NSARs, n(%)	6 (75)	6 (75)
Prednisolon, n(%)	6 (75)	n. a.
Methotrexat, n(%)	2 (25)	n. a.
Leflunomid, n(%)	2 (25)	n. a.

Material und Methoden

Hydroxychloroquin, n(%)	2 (25)	n. a.
Azathioprin, n(%)	0 (0)	n. a.
Cyclosporin A, n(%)	0 (0)	n. a.

Abkürzungen: RA: Rheumatoide Arthritis; n.a.: nicht anwendbar; NSARs: nichtsteroidale Antirheumatika

2.2. Immunhistochemische Färbung

Unmittelbar nach Eröffnung der Kniegelenkskapsel wurde ein ca. 1cm² großes Stück des Synovialgewebes entnommen. Die Gewebeproben wurden für 12 bis 24 Stunden in Phosphat Buffered Saline (PBS) mit 4% Formaldehyd fixiert und dann für 12 bis 24 Stunden in PBS mit 20% Saccharose inkubiert. Das Gewebe wurde dann in Tissue Tek eingebettet, anschließend tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Die Studie gliederte sich in zwei Teile, wobei im ersten Teil die immunhistochemische Färbung mit Anti-TH-Aks, zur Darstellung sympathischer Nervenfasern und katecholaminproduzierender TH+ Synoviozyten, und im zweiten Teil die Färbung mit Anti-SP-Aks zur Identifizierung sensibler Nervenfasern durchgeführt wurde.

Zuerst wurden von den gefrorenen Gewebeblöckchen mit dem Kryotom 8 µm dicke Schnitte angefertigt, wobei für jeden der beiden Versuchsteile pro Patient und Operation vier Schnitte benötigt wurden. Einer der vier Schnitte diente jeweils als Negativ-Kontrolle. Die drei für die eigentliche Färbung verwendeten Schnitte sollten möglichst von verschiedenen Gewebeblöckchen stammen, was jedoch nicht immer möglich war, da von manchen OPs nur eine oder zwei Gewebeproben tiefgefroren worden waren.

Die Schnitte wurden eine Stunde lang an der Luft getrocknet und anschließend für 10 min in 0,1 M PBS rehydriert. Nach einer Umrandung der Schnitte mit DakoPen erfolgte eine 45-minütige Inkubation in einer feuchten Kammer mit einer Blocklösung zur Absättigung unspezifischer Proteinbindungsstellen. Die Blocklösung bestand aus 10% BSA, 10% Chicken Serum und 10% FCS in PBS. Dann wurden die Objekträger 10 min in PBS gewaschen und für drei Stunden bzw. über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper in einer Verdünnungslösung bei – 4°C inkubiert. Die Kontrollschnitte wurden nur mit der Verdünnungslösung ohne Primärantikörper inkubiert. Alle weiteren Arbeitsschritte hingegen wurden an den Kontrollschnitten in gleicher Weise wie an den mit dem Primärantikörper inkubierten Schnitten vollzogen.

Tab. 2: Verwendete Primärantikörper, Verdünnungslösungen und Verdünnungskonzentrationen:

	Primärantikörper	Verdünnungslösung	Konzentration
Anti-TH-Färbung	anti-TH, Chemicon, rabbit polyclonal, AB 152	PBS mit 0,3% Triton und 10% goat serum	1:1000
Anti-SP-Färbung	anti-SP, Santa Cruz, goat polyclonal, sc-9758	PBS mit 0,3% Triton und 10% rabbit serum	1:200

Nach der Inkubation wurden die Objektträger zweimal in PBS+Triton sowie einmal in PBS für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend erfolgte die 1,5-stündige Inkubation mit einem mit Fluoreszenzfarbstoff konjugierten Sekundärantikörper, der gegen die Spezies des jeweiligen Primärantikörpers gerichtet war. Alle weiteren Arbeitsschritte nach Zugabe des Sekundärantikörpers wurden in einem abgedunkelten Raum durchgeführt, um die Fluoreszeizeigenschaften des Antikörpers nicht zu beeinträchtigen.

Tab. 3: Verwendete Sekundärantikörper, Verdünnungslösungen und Verdünnungskonzentrationen:

	Sekundärantikörper	Verdünnungslösung	Konzentration
Anti-TH-Färbung	Alexa Fluor 546 goat anti-rabbit	PBS mit 0,3% Triton und 10% goat serum	1:500
Anti-SP-Färbung	Alexa Fluor 546 rabbit anti-goat	PBS mit 0,3% Triton und 10% rabbit serum	1:500

Die Schnitte wurden nun erneut zweimal in PBS+Triton sowie einmal in PBS für jeweils 5 min gewaschen und danach mit 4-6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) gefärbt. Hierzu wurden die Objektträger 3 min lang in eine 10%ige DAPI Lösung gestellt (DAPI in PBS). Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an Adenin-Thymin-reiche DNS und bildet blau fluoreszierende DNS-DAPI Komplexe, sodass unter dem Fluoreszenzmikroskop die Zellkerne dargestellt werden können.

Nachfolgend wurden die Schnitte mit Fluoreszenz Mounting Medium, das die Fluoreszenz verstärken bzw. ihr Ablassen verlangsamen soll, eingedeckt und mit Deckgläsern versehen. Die Lagerung der fertigen Objektträger bis zur mikroskopischen Betrachtung am nächsten oder übernächsten Tag erfolgte im Dunkeln bei – 4°C.

2.3. Auswertung

Die Betrachtung der Schnitte erfolgte bei 400-facher Vergrößerung und pro Patient und OP wurden jeweils 17 Gesichtsfelder ausgezählt. Unter Verwendung der Anzahl der Nervenfasern bzw. Zellkerne wurde der Mittelwert berechnet und durch Multiplikation mit einem entsprechenden Umrechnungsfaktor die durchschnittliche Zahl von Nervenfasern bzw. Zellkernen pro mm² ermittelt. Sowohl sympathische als auch sensible Nervenfasern erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop als perl schnurartige Aufreihung von kleinen Punkten (Abb. 1 und 2). Definitionsgemäß musste eine mindestens 50 µm lange Kette von mindestens 3 Punkten vorliegen. Die Zellkerne wurden nach DAPI-Färbung in blauer Fluoreszenz dargestellt und ausgezählt (Abb. 3). Außerdem wurde die positive Immunfluoreszenz durch Kontrollschnitte im gleichen Gewebe kontrolliert. Die Kontrollschnitte wiesen außer der normalen Eigenfluoreszenz des Gewebes keine weiteren fluoreszierenden Strukturen auf und waren damit stets negativ.

Die anschließende statistische Auswertung der gesammelten Daten erfolgte mit den Programmen SigmaStat und SigmaPlot. Zum Vergleich der Mediane zweier Gruppen, z.B. RA- und OA-Patienten, wurde der Man-Whitney-Test angewendet. Zur Beurteilung der Veränderung von Datenpaaren, z.B. der Nervenfaserdichte der einzelnen Patienten bei erster und zweiter OP, wurde der Wilcoxon-Test für gepaarte Stichproben bzw., falls eine Normalverteilung der Daten vorlag, der t-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Das Signifikanzniveau betrug dabei p < 0,05.

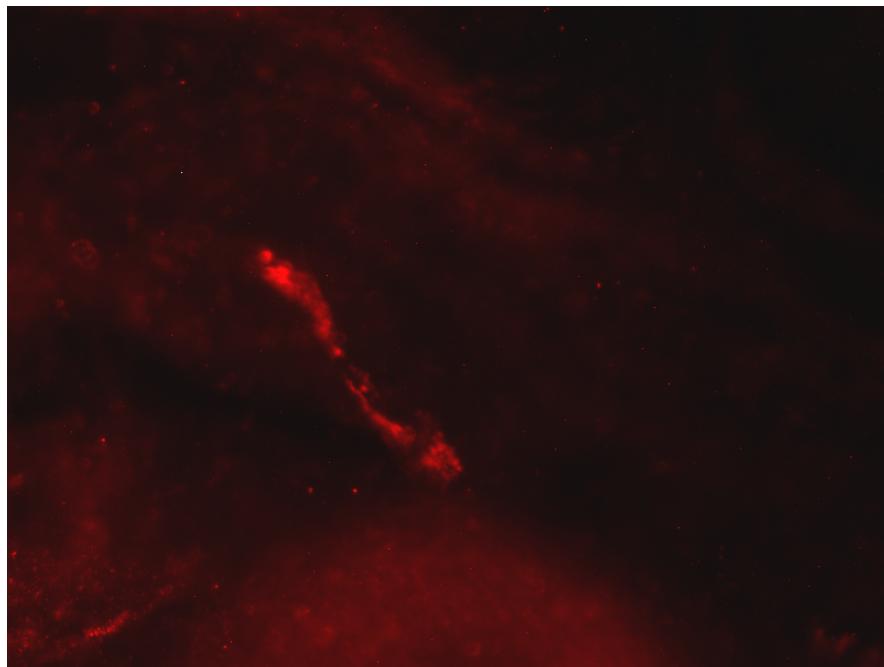


Abb. 1: SP+ Nervenfasern, rote Fluoreszenz, 400-fache Vergrößerung

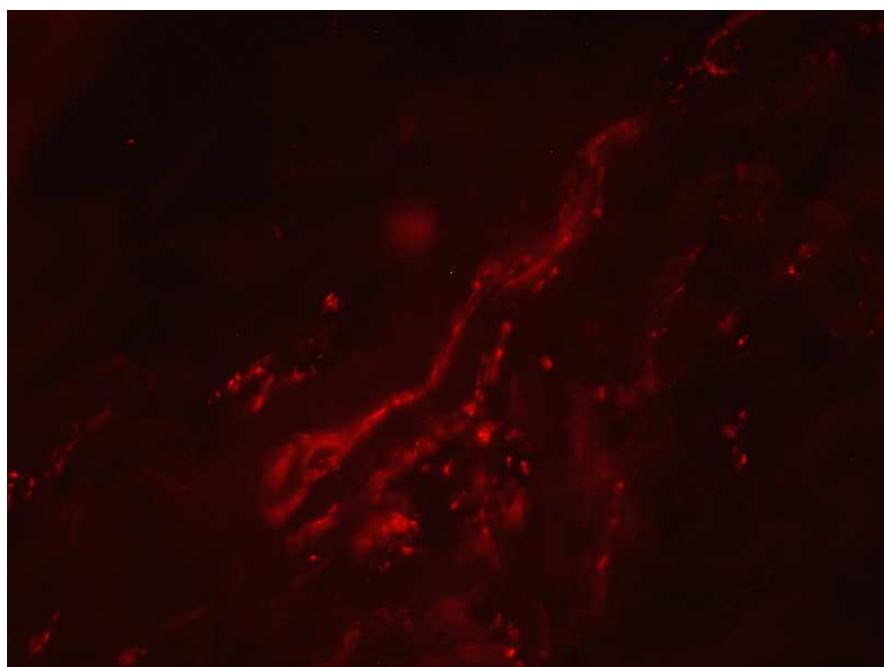


Abb. 2: TH+ Nervenfasern, rote Fluoreszenz, 400-fache Vergrößerung

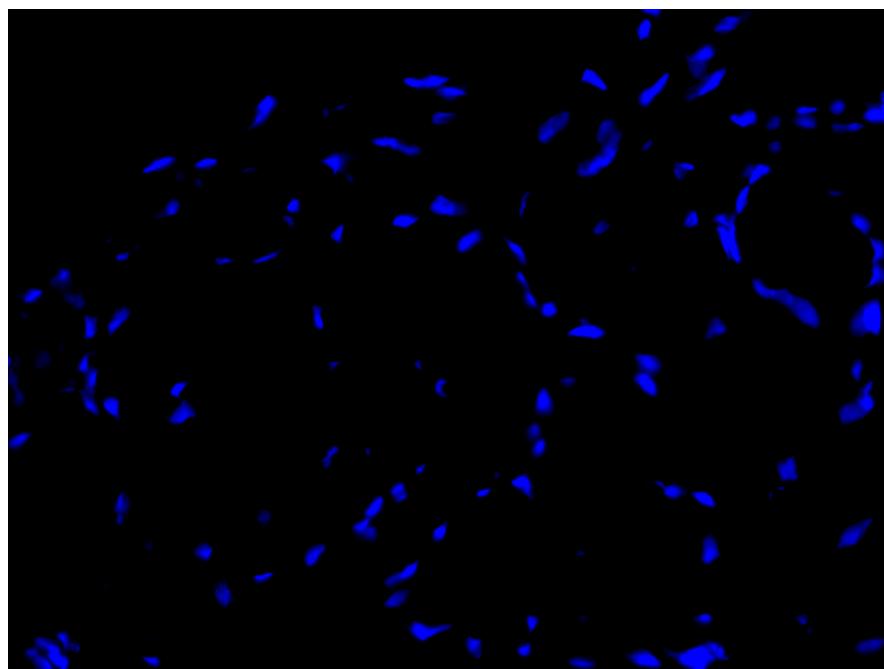


Abb. 3: Zellkerne nach DAPI-Färbung, blaue Fluoreszenz, 400-fache Vergrößerung

3. Ergebnisse

3.1. TH+ Nervenfasern im Synovialgewebe bei erster und zweiter Entnahme

Sowohl in der Gruppe der RA-Patienten als auch der Kontroll-Patienten war die Dichte der TH+ Nervenfasern bei einigen Patienten bei der ersten Operation und bei anderen bei der zweiten Operation höher. Bei 3 Patienten der RA-Gruppe sowie bei 2 Patienten der Kontroll-Gruppe waren weder in der Gewebeprobe der ersten noch in der Probe der zweiten OP TH+ Nervenfasern nachzuweisen. Insgesamt waren somit mit dem Wilcoxon-Test in beiden Patienten-Kollektiven keine signifikanten Veränderungen der Zahl TH+ Nervenfasern feststellbar. Der p-Wert betrug bei der RA-Gruppe 0,813 und in der Kontroll-Gruppe 0,438 (Tab. 4 und Abb. 4 + 5).

Es fiel auf, dass die mittlere Dichte der TH+ Nervenfasern im Synovialgewebe sowohl zum Zeitpunkt der ersten als auch der zweiten Synovektomie bei den RA-Patienten im Durchschnitt kleiner als bei Kontroll-Patienten war (Tab. 4 und Abb. 4 + 5). Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Untersuchungen [18], die zeigten, dass es bei RA-Patienten im Vergleich zu Kontroll-Patienten zu einer Abnahme der Dichte der TH+ Nervenfasern kommt. Allerdings waren in der vorliegenden Studie die Unterschiede der Mediane der beiden Gruppen nicht groß genug, um als signifikant angesehen werden zu können.

Tab. 4: Arithmetisches Mittel der Dichte von TH+ Nervenfasern im Synovialgewebe (Nervenfasern/ mm²) ± Standardabweichung

	1. Operation	2. Operation
RA-Patienten	$0,65 \pm 0,93$	$0,58 \pm 7,73$
Kontroll-Patienten	$4,61 \pm 1,34$	$2,01 \pm 3,57$

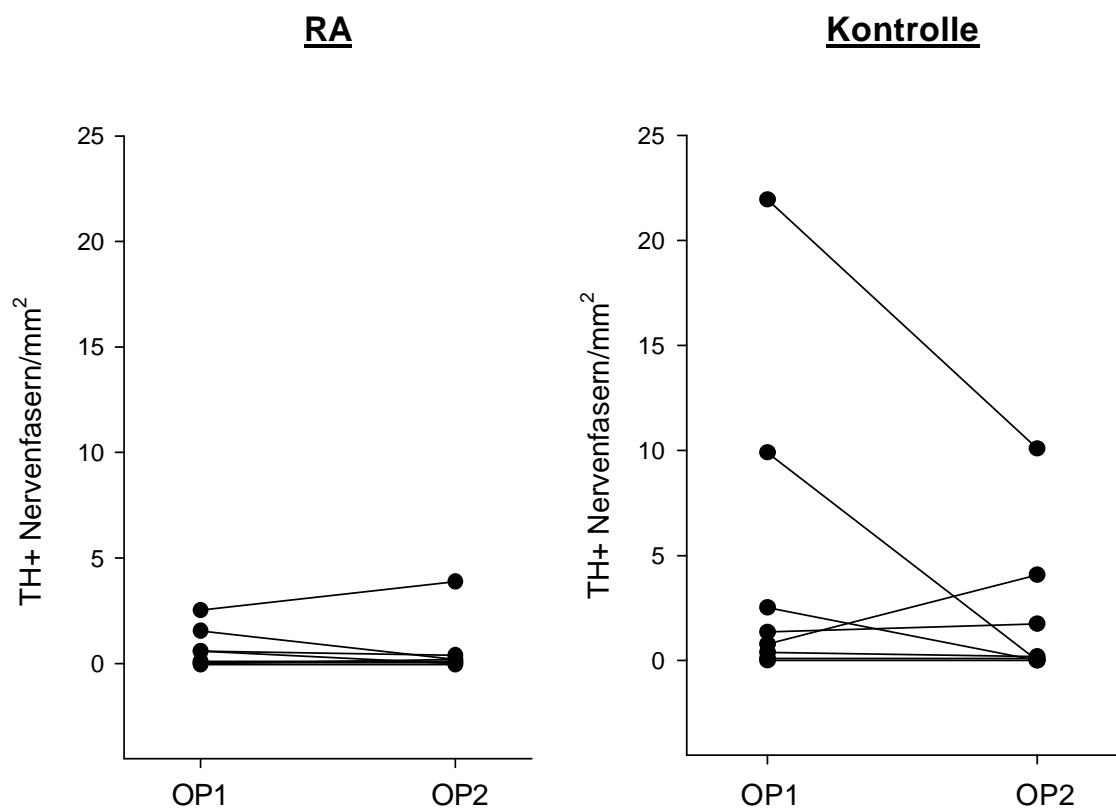


Abb. 4: TH+ Nervenfasern bei RA-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und zweiten Operation; $p=0,813$ (nicht signifikant)

Abb. 5: TH+ Nervenfasern bei Kontroll-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und zweiten Operation; $p=0,438$ (nicht signifikant)

3.2. SP+ Nervenfasern im Synovialgewebe bei erster und zweiter Entnahme

Bei 7 der 8 RA-Patienten kam es nach der ersten Synovektomie zu einer Abnahme der Dichte SP+ Nervenfasern und bei einer Patientin war eine Zunahme feststellbar (Abb. 6+7). Insgesamt ergab die Durchführung eines t-Tests für gepaarte Stichproben trotz dieses einen abweichenden Wertes eine signifikante Abnahme der Dichte der SP+ Nervenfasern (Abb. 6+7). In der Kontroll-Gruppe fand sich bei 5 Patienten eine Abnahme der Anzahl von SP+ Nervenfasern pro mm² und bei 3 Patienten waren sowohl bei der ersten, als auch der zweiten Synovektomie keine SP+ Nervenfasern nachweisbar (Abb 6+7). Bei der Auswertung mit Hilfe t-Tests für gepaarte Stichproben zeigte sich bei den Kontroll-Patienten eine signifikante Abnahme der Dichte der SP+ Nervenfasern.

Berücksichtigt man nur jene Patienten, bei denen es auch tatsächlich zu einer Abnahme kam, reduzierte sich die mittlere Dichte SP+ Nervenfasern in dem RA-Kollektiv um 68%, in dem Kontroll-Kollektiv um 55% (Tab. 5).

Die mittlere Dichte SP+ Nervenfasern war sowohl zum Zeitpunkt der ersten als auch der zweiten Synovektomie bei den RA-Patienten höher als bei den Kontroll-Patienten, allerdings waren auch hier die Unterschiede der Mediane der beiden Kollektive nicht signifikant (Abb. 6 +7).

Tab. 5: Arithmetisches Mittel der Dichte von SP+ Nervenfasern im Synovialgewebe
(Nervenfasern/ mm²) ± Standardabweichung

	1. Operation	2. Operation
RA-Patienten	2,26 ± 1,21	1,21 ± 1,71
Kontroll-Patienten	2,01 ± 2,15	0,80 ± 1,19

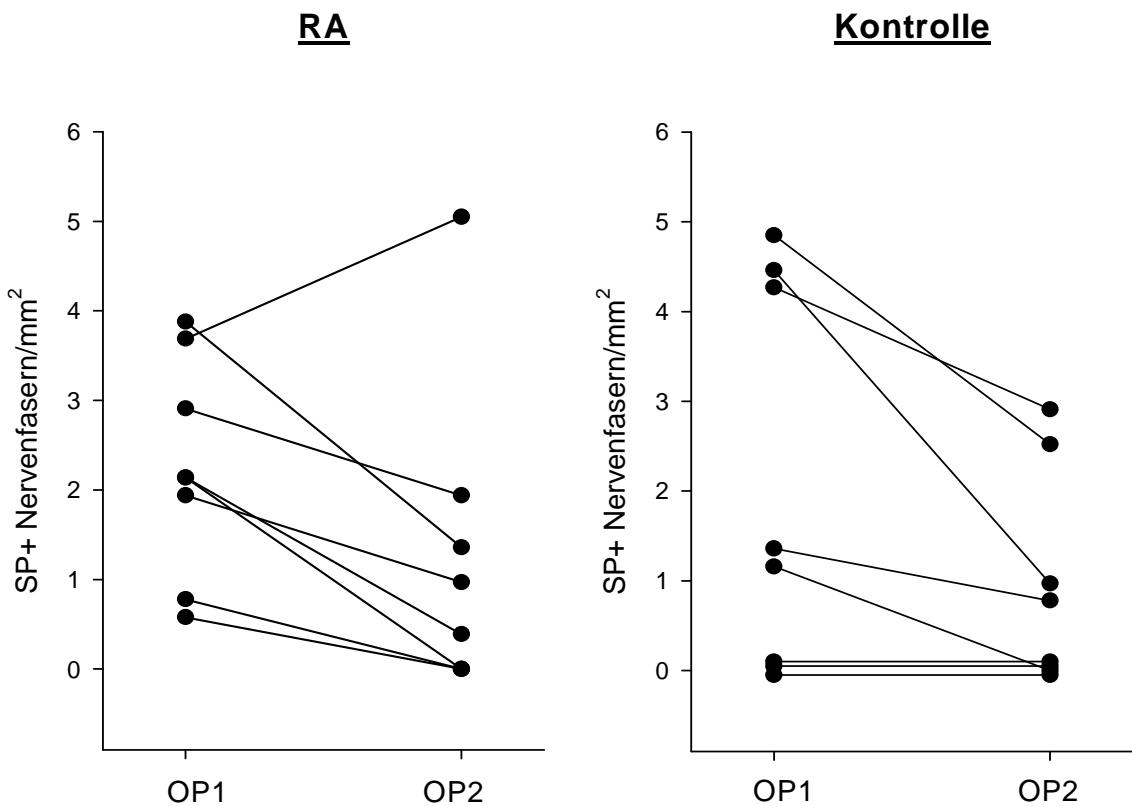


Abb. 6: SP+ Nervenfasern bei RA-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und der zweiten Operation; $p=0,042$ (signifikant)

Abb. 7: SP+ Nervenfasern bei Kontroll-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und der zweiten Operation; $p=0,041$ (signifikant)

3.3. TH+ Zellen im Synovialgewebe bei erster und zweiter Entnahme

Es waren sowohl Zu- als auch Abnahmen der Zahl TH+ Zellen zwischen erster und zweiter Operation zu verzeichnen und die Streuungsbreite der ermittelten Einzelwerte war sehr groß, sodass sich insgesamt weder für die RA- noch für die Kontroll-Patienten eine signifikante Veränderung der TH+ Zellen feststellen ließ.

Allerdings fiel auf, dass die mittlere Dichte TH+ Zellen sowohl zum Zeitpunkt der ersten als auch der zweiten Synovektomie bei RA deutlich größer war als bei der Kontrolle (Tab. 6). Dabei zeigte sich innerhalb der RA-Gruppe zwischen der ersten und zweiten Synovektomie ein Trend zu einer Zunahme der Dichte TH+ Zellen, während diese in der Kontroll-Gruppe praktisch unverändert blieb (Abb. 7+8).

Tab. 6: Arithmetisches Mittel der Dichte von TH+ Zellen im Synovialgewebe (TH+ Zellen/mm²) ± Standardabweichung

	1. Operation	2. Operation
RA-Patienten	51,76 ± 36,62	67,24 ± 66,33
Kontroll-Patienten	30,60 ± 35,13	30,19 ± 40,10

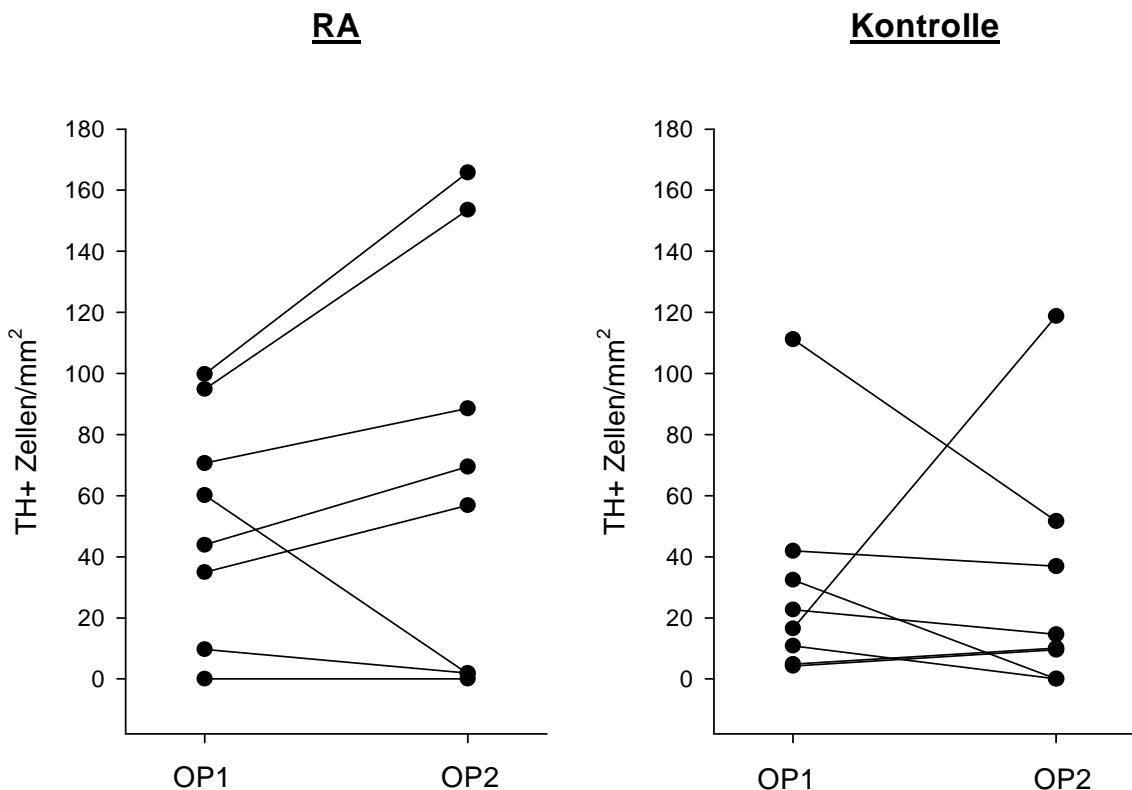


Abb. 8: TH+ Zellen bei RA-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und der zweiten Operation; $p=0,219$ (nicht signifikant)

Abb. 9: TH+ Zellen bei Kontroll-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und der zweiten Operation; $p=0,547$ (nicht signifikant)

3.4. Gesamtzellzahl und Verhältnis TH+ Zellen / Gesamtzellzahl bei erster und zweiter Entnahme

Bei den meisten Patienten (bis auf zwei RA-Patienten) kam es zwischen der ersten und der zweiten Entnahme zu einer deutlichen Zunahme der Gesamtzellzahl, was wahrscheinlich Ausdruck einer Wundheilungsreaktion nach der ersten Synovektomie ist (Tab. 7 und Abb. 10+11). In der Kontroll-Gruppe war diese Zunahme von durchschnittlich 816 auf 1335 Zellen pro mm² bei Durchführung eines Wilcoxon-Tests hochsignifikant ($p=0,008$). Auch in der RA-Gruppe zeigte sich ein Trend zu einer Zunahme der Zellzahl ($p=0,461$). Die eindeutig stärkste Zunahme der Gesamtzellzahl wurde dabei bei genau jener RA-Patientin festgestellt, bei der es zu einer Zu- anstatt einer Abnahme der Dichte der sensiblen Nervenfasern kam.

Hinsichtlich des Verhältnisses von TH+ Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl konnte für keines der beiden Patientenkollektive eine signifikante Veränderung festgestellt werden (Abb. 12+13).

Die mittlere Gesamtzellzahl lag bei den RA-Proben sowohl zum Zeitpunkt der ersten als auch der zweiten Synovektomie höher als bei den Kontroll-Proben (Tab. 7).

Tab. 7: Arithmetisches Mittel der Gesamtzellzahl pro mm² im Synovialgewebe ± Standardabweichung

	1. Operation	2. Operation
RA-Patienten	1335,38 ± 704,45	1563,13 ± 635,23
Kontroll-Patienten	816,00 ± 335,27	1335,38 ± 358,84

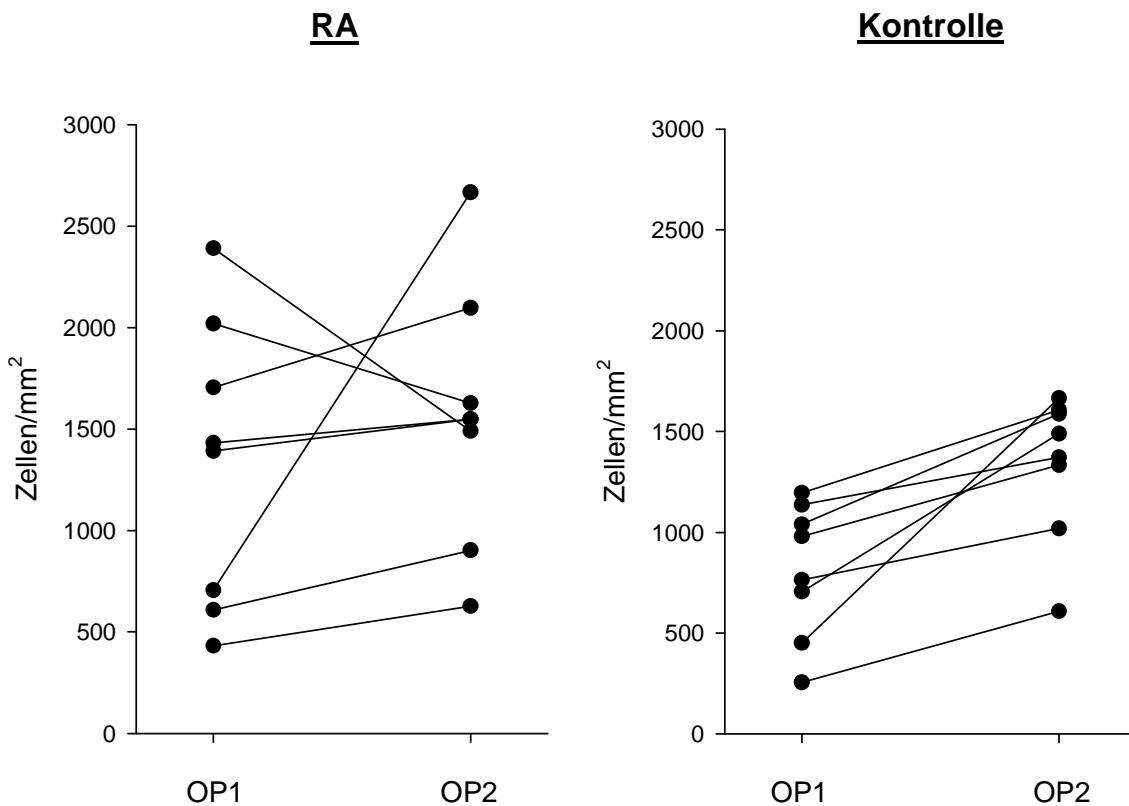


Abb. 10: Gesamzellzahl pro mm² bei RA-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und der zweiten Operation, $p=0,461$ (nicht signifikant)

Abb. 11: Gesamzellzahl pro mm² bei Kontroll-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und der zweiten Operation; $p=0,008$ (signifikant)

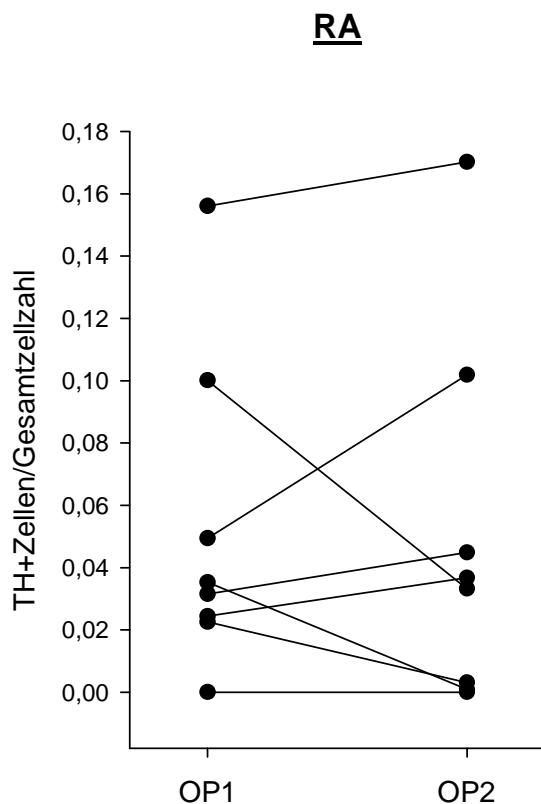


Abb. 12: Zahl TH+ Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl bei RA-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und der zweiten Operation; $p=0,789$ (nicht signifikant)

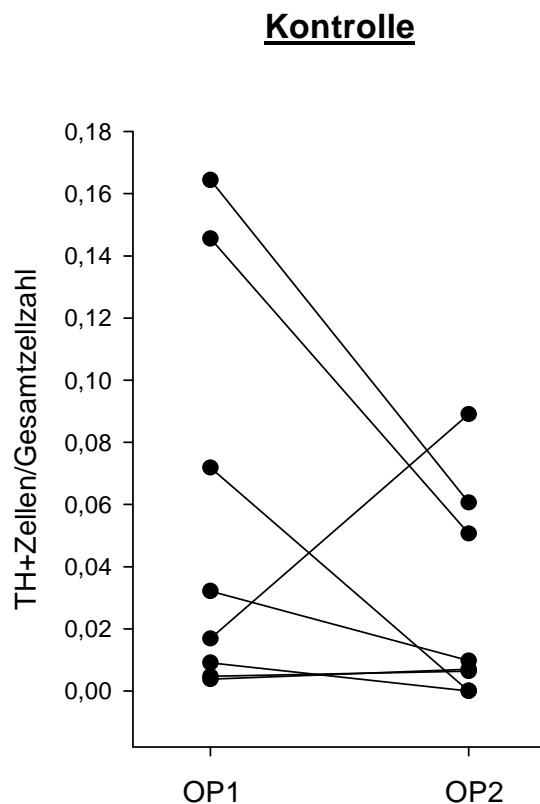


Abb. 13: Zahl TH+ Zellen bezogen auf die Gesamtzellzahl bei Kontroll-Patienten zum Zeitpunkt der ersten und der zweiten Operation; $p=0,220$ (nicht signifikant)

4. Diskussion

Die proinflammatorische Funktion der sensiblen Nervenfasern ist bekannt, wobei SP als hochwirksamer Stimulus des angeborenen als auch des adaptativen Immunsystems wirkt [33,37,38,39,40,41,42,43]. Folglich kann ein Dichteanstieg der sensiblen Nervenfasern und ein entsprechend größerer Vorrat an SP als Stimulus für die Entzündung und den Schmerz gewertet werden [18,77,78,79,80,80,82,83,84]. Bei Patienten mit chronischer RA konnte beobachtet werden, dass nur sensible, nicht jedoch sympathische Nervenfasern von einer Dichtezunahme betroffen sind [18,76]. Vielmehr sind sympathische Nervenfasern in entzündetem Gewebe signifikant verringert. Folglich überwiegt die sensible gegenüber der sympathischen Innervation und führt zu einem proinflammatorischen Effekt und zur Schmerzzunahme. Dies ist insbesondere auch darauf zurückzuführen, dass Noradrenalin in geringen Konzentrationen vor allem an α_2 -Adrenorezeptoren bindet und über diese nozizeptiv und proinflammatorisch wirkt [80, 85]. Das Einsprossen sensibler Nervenfasern ist vermutlich eine direkte Folge der vermehrten Ausschüttung des *Nerve Growth Factor (NGF)* in entzündetem Gewebe.

So gesehen wäre es günstig, wenn die Dichte der sensiblen Nervenfasern verringert und die der sympathischen Fasern dagegen erhöht werden könnte (sodass hohe Konzentrationen von Noradrenalin entstehen können, die über β -Adrenorezeptoren entzündungshemmende Effekte haben). Diese Studie zeigte, dass die chirurgische Synovektomie eine praktikable Methode darstellt, die sensible Innervation in normalem sowie in entzündetem Gewebe zu reduzieren. Man kann dazu die Hypothese zugrunde legen, dass durch eine chirurgische Synovektomie insbesondere die oberflächliche Schicht des entzündeten Gewebes entfernt wird, in der es normalerweise zu einem starken Einsprossen von Nervenfasern kommt. Erfreulicherweise bewirkte die Synovektomie aber keine Veränderung der sympathischen Innervation und führte so zu einem günstigen Gleichgewicht der beiden Nervenfasertypen.

Es ist interessant, dass sich bei einer Patientin ein Anstieg der Dichte der sensiblen Nervenfasern im Synovialgewebe zeigte, der einherging mit einer deutlichen Zunahme der synovialen Zelldichte. Tatsächlich wies diese Patientin die stärkste Zunahme der synovialen Zelldichte aller Patienten auf. Bei den meisten Patienten, besonders deutlich auch bei denen der Kontrollgruppe, kam es zu einem solchen Anstieg der Zelldichte. Man kann diese Zunahme als Reaktion im Rahmen eines Wundheilungsprozesses interpretieren. Im erwähnten Fall der RA-Patientin mit der starken Zunahme sowohl der sensiblen Innervation als auch der synovialen Zelldichte fehlt scheinbar der normalerweise positive Effekt der Synovektomie. Das zeigt, dass nicht alle Patienten von einer Synovektomie profitieren müssen.

Zusätzlich wurde die Zahl der TH+ Zellen, die lokal wirksame Katecholamine produzieren können, ausgewertet [76]. Die Rolle dieser Zellen ist gegenwärtig noch unklar, da ihnen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen zugeschrieben werden [85,87]. Die Dichte dieser Zellen unterschied sich zu den beiden Untersuchungszeitpunkten nicht, was darauf hindeutet, dass die Synovektomie keine signifikanten Auswirkungen auf die TH+ Zellen hat.

Diese Studie zeigt, dass die chirurgische Synovektomie tatsächlich zu einer messbaren Verringerung der sensiblen Innervation des Synovialgewebes um etwa den Faktor zwei führt. Parallel dazu nahm die Zelldichte zu, was als Ausdruck eines Wundheilungsprozesses interpretiert werden kann. Für die Dichte der sympathischen Nervenfasern sowie die Dichte der TH+ Katecholamin-produzierenden Zellen ließ sich hingegen keine signifikante Veränderung feststellen.

Es gab keinerlei Muster, das auf einen Zusammenhang zwischen der Medikation der Patienten und der sensiblen oder sympathischen Innervation oder der Zellinfiltration des Synovialgewebes schließen ließe.

Insgesamt lässt sich sagen, dass durch diese Studie zum ersten Mal bewiesen wurde, dass die chirurgische Synovektomie tatsächlich zu einer Abnahme der sensiblen

Innervation des Synovialgewebes führt. Die in der Regel positiven Effekte der chirurgischen Synovektomie, Schmerzreduktion und Verbesserung der Beweglichkeit [68,69,70,71], können somit durch eine sensible Denervation erklärt werden.

5. Zusammenfassung

Die chirurgische Synovektomie ist eine Technik zur Behandlung der Synovialitis bei Kindern und Erwachsenen mit rheumatoider Arthritis (RA), die nicht oder nicht mehr auf die Basistherapie mit langwirksamen Antirheumatika oder der Therapie mit Biologicals ansprechen. Die Entscheidung zur chirurgischen Synovektomie wird dabei gemeinsam von Chirurgen und Rheumatologen getroffen. Man vermutete, dass die Synovektomie zu einer Verringerung der sensiblen Nervenfasern führt, was man als sensible Denervation bezeichnet. Da die sensible Denervation nach einer Synovektomie bisher nie histologisch nachgewiesen wurde, war es das Ziel, die sensible und sympathische Innervation im Synovialgewebe vor und nach einer Synovektomie zu untersuchen.

Insgesamt 8 Kontroll-Patienten ohne entzündliche Veränderungen des Kniegelenks und 8 Patienten mit RA wurden in diese Studie, bei der eine zweizeitige Synovektomie durchgeführt wurde (Zeitintervall 40-50 Tage), eingeschlossen. Die Nervenfasern und Zellen im Synovialgewebe wurden unter Anwendung der Methode der Immunfluoreszenz nachgewiesen und ausgezählt.

Die Dichte der sympathischen Nervenfasern veränderte sich nicht nach einer Synovektomie nicht, während die Dichte der sensiblen Nervenfasern bei allen Kontroll-Patienten und 7 der 8 RA-Patienten abnahm. Parallel dazu nahm die synoviale Zelldichte nach einer Synovektomie bei allen Kontroll-Patienten und 6 der 8 RA-Patienten zu, was Ausdruck eines Wundheilungsprozesses ist. Bei einer RA-Patientin nahm die Dichte der sensiblen Nervenfasern zu und gleichzeitig konnte eine deutliche Zunahme der synovialen Zelldichte beobachtet werden. Das weist darauf hin, dass nicht alle Patienten von einer chirurgischen Synovektomie profitieren müssen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bei der Mehrheit der Patienten (94%) nach der chirurgischen Synovektomie zu einer sensiblen Denervation begleitet von einer Zellvermehrung im Rahmen der Wundheilung kam. Diese Studie kann dazu beitragen,

Zusammenfassung

die positiven Effekte der chirurgischen Synovektomie, die gewöhnlich zu einer Schmerzreduktion und verbesserten Beweglichkeit führt, zu erklären.

6. Literaturverzeichnis

1. Sprent J, Kishimoto H. The thymus and negative selection. *Immunol Rev* 2002; 185:126-35.
2. Meffre E, Wardemann H. B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2008; 20:632-8.
3. Saouaf SJ, Brennan PJ, Shen Y, Greene MI. Mechanisms of peripheral immune tolerance: conversion of the immune to the unresponsive phenotype. *Immunol Res* 2003; 28:193-9.
4. Pratt AG, Isaacs JD, Matthey DL. Current concepts in the pathogenesis of early rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2009; 23:37–48.
5. Miller AH. Elucidating the consequences of chronic stress on immune regulation and behavior in rheumatoid arthritis. *Brain Behav Immun* 2008; 22:22-3.
6. Baka Z, Buzás E, Nagy G. Rheumatoid arthritis and smoking: putting the pieces together. *Arthritis Res Ther* 2009; 11:238.
7. Rashid T, Timada H, Wilson C, Ebringer A. Rheumatoid arthritis as an autoimmune disease caused by *Proteus* urinary tract infections: a proposal for a therapeutic protocol. *Isr Med Assoc J* 2001; 3: 675-80.
8. Balandraud N, Roudier J, Roudier C. Epstein-Barr virus and rheumatoid arthritis. *Autoimmun Rev* 2004; 3:362–7.
9. Takeda T, Mizugaki Y, Matsubara L, Imai S, Koike T, Takada K. Lytic Epstein-Barr virus infection in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:1218-25.
10. Oldstone MB. Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB J* 1998; 12:1255-65.
11. Jara LJ, Navarro C, Medina G, Vera-Lastra O, Blanco F. Immune-neuroendocrine interactions and autoimmune diseases. *Clin Dev Immunol* 2006; 13:109-23.
12. Madden KS, Sanders VM, Felten DL. Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1995; 35:417-48.

13. Sanders VM, Straub RH. Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun* 2002; 16:290-332.
14. Jänig W, Levine JD, Michaelis M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res* 1996; 113:161-84.
15. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Sarma JV, Day DE, Lentsch AB, Huber-Lang MS, Ward PA. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS One* 2009; 4:4414.
16. Straub RH, Härtle P. Sympathetic neurotransmitters in joint inflammation; *Rheum Dis Clin North Am* 2005; 31:43-59.
17. Kin NW, Sanders VM. It takes nerve to tell T and B cells what to do. *J Leukoc Biol* 2006; 79:1093-104.
18. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, Straub RH. The loss of sympathetic nerve fibres in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. *FASEBJ* 2000; 14:2097-107.
19. Weidler C, Holzer C, Harbuz M, Hofbauer R, Angele P, Schölmerich J, Straub RH. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:13-20.
20. Straub RH, Grum F, Strauch U, Capellino S, Bataille F, Bleich A, Falk, Schölmerich J, Obermeier F. Anti-inflammatory role of sympathetic nerves in chronic intestinal inflammation. *Gut* 2008; 57:911-21.
21. Kudej RK, Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Oka N, Ishikawa Y, Shannon RP, Bishop SP, Vatner SF. Effects of chronic beta-adrenergic receptor stimulation in mice. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29:2735-46.
22. Walsh DA, Mapp PI, Wharton J, Rutherford RA, Kidd BL, Revell PA, Blake DR, Polak JM. Localisation and characterisation of substance P binding to human synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:313-7.
23. Garrett NE, Mapp PI, Cruwys SC, Kidd BL, Blake DR. Role of substance P in inflammatory Arthritis. *Ann Rheum Dis* 1992; 51:1014-18.

24. Seegers HC, Hood VC, Kidd BL, Cruwys SC, Walsh DA. Enhancement of angiogenesis by endogenous substance P release and neurokinin-1 receptor during neurogenic inflammation. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306:8-12.
25. Rittner HL, Brack A, Stein C. Pain and the immune system. *Br J Anaesth* 2008; 101:40-4.
26. Pasternak GW. The central questions in pain perception may be peripheral. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:10354-5.
27. Khasabov SG, Rogers SD, Ghilardi JR, Peters CM, Mantyh PW, Simone DA. Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization. *J Neurosci* 2002; 22:9086-98.
28. Mazaró J, Basbaum AI. Contribution of substance P and neurokinin A to the differential injury-induced thermal and mechanical responsiveness of lamina I and V neurons. *J Neurosci* 2007; 27:762-70.
29. Zubrzycka M, Janecka A. Substance P: transmitter of nociception (Minireview). *Endocr Regul* 2000; 34:195-201.
30. Levine JD, Clark R, Devor M, Helms C, Moskowitz MA, Basbaum AI. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 1984; 226:547-9.
31. Wong BJ, Minson CT. Neurokinin-1 receptor desensitization attenuates cutaneous active vasodilatation in humans. *J Physiol* 2006; 577:1043-51.
32. Maa J, Grady EF, Kim EH, Yoshimi SK, Hutter MM, Bennett NW, Kirkwood KS. NK-1 receptor desensitization and neutral endopeptidase terminate SP-induced pancreatic plasma extravasation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279:726-32.
33. Tanabe T, Otani H, Mishima K, Ogawa R, Inagaki C. Mechanisms of oxyradical production in substance P stimulated rheumatoid synovial cells. *Rheumatol Int* 1996; 16:159-67.
34. Bardelli C, Gunella G, Varsaldi F, Balbo P, Del Boca E, Bernardone IS, Amoruso A, Brunelleschi S. Expression of functional NK1 receptors in human alveolar macrophages: superoxide anion production, cytokine release and involvement of NF-kappaB pathway. *Br J Pharmacol* 2005; 145:385-96.

35. Helme RD, Eglezos A, Hosking CS. Substance P induces chemotaxis of neutrophils in normal and capsaicin-treated rats. *Immunol Cell Biol* 1987; 65:267-9.
36. Chernova I, Lai JP, Li H, Schwartz L, Tuluc F, Korchak HM, Douglas SD, Kilpatrick LE. Substance P (SP) enhances CCL5-induced chemotaxis and intracellular signaling in human monocytes, which express the truncated neurokinin-1 receptor (NK1R). *J Leukoc Biol* 2009; 85:154-64.
37. Wagner F, Fink R, Hart R, Dancygier H. Substance P enhances interferon-gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul Pept* 1987; 19:355-64.
38. Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 1988; 241:1218-21.
39. 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; 340:185-90.
40. Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993; 150:4478-85.
41. Kavelaars A, Broeke D, Jeurissen F, Kardux J, Meijer A, Franklin R, Gelfand EW, Heijnen CJ. 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; 153:3691-9.
42. Serra MC, Calzetti F, Ceska M, Cassatella MA. Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology* 1994; 82:63-9.
43. Kincy-Cain T, Bost KL. Substance P-induced IL-12 production by murine macrophages. *J Immunol* 1997; 158:2334-9.
44. Brenn D, Richter F, Schaible HG. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: an inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum* 2007; 56:351-9.

45. Boettger MK, Hensellek S, Richter F, Gajda M, Stöckigt R, von Banchet GS, Bräuer R, Schaible HG. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum* 2008; 58:2368-78.
46. Schäfers M, Sorkin L. Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neurosci Lett* 2008; 437:188-93.
47. Hucho T, Levine JD. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron* 2007; 55:365-76.
48. Schaible HG, Del Rosso A, Matucci-Cerinic M. Neurogenic aspects of inflammation. *Rheum Dis Clin North Am* 2005; 31:77-101.
49. Herbert MK, Holzer P. Neurogenic inflammation. I. Basic mechanisms, physiology and pharmacology. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2002; 37:314-25.
50. Herbert MK, Holzer P. Neurogenic inflammation. II. Pathophysiology and clinical implications. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2002; 37:386-94.
51. Levine JD, Goetzl EJ, Basbaum AI. Contribution of the nervous system to the pathophysiology of rheumatoid arthritis and other polyarthritides. *Rheum Dis Clin North Am* 1987; 13:369-83.
52. Dirmeyer 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; 47:36-40.
53. Feng Y, Tang Y, Guo J, Wang X. Inhibition of LPS-induced TNF-alpha production by calcitonin gene-related peptide (CGRP) in cultured mouse peritoneal macrophages. *Life Sci* 1997; 61:L7.
54. Nong YH, Titus RG, Ribeiro JM, Remold HG. Peptides encoded by the calcitonin gene inhibit macrophage function. *J Immunol* 1989; 143:45-9.

55. Torii H, Hosoi J, Beissert S, Xu S, Fox FE, Asahina A, Takashima A, Rook AH, Granstein RD. Regulation of cytokine expression in macrophages and the Langerhans cell-like line XS52 by calcitonin gene-related peptide. *J Leukoc Biol.* 1997; 61:216-23.
56. Fox FE, Kubin M, Cassin M, Niu ZT, Hosoi J, Torii H, Granstein RD, Trinchiere G, Rook AH. Calcitonin gene-related peptide inhibits proliferation and antigen presentation by human peripheral blood mononuclear cells: effects on B7, interleukin 10, and interleukin 12. *J Invest Dermatol* 1997; 108:43.8.
57. Athanasou NA. Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 1995; 54:392-4.
58. Karouzakis E, Neidhart M, Gay RE, Gay S. Molecular and cellular basis of rheumatoid joint destruction. *Immunol Lett* 2006; 106:8-13.
59. Sywai H, Park YW, He X, Goronzy JJ, Weyand CM. Fractalkine mediates T cell-dependent proliferation of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007; 56:3215-25.
60. Huber LC, Distler O, Tarner I, Gay RE, Gay S, Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2006; 45:669-75.
61. Pap T, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S. Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2000; 2:361-7.
62. van der Heijde DM. Joint erosions and patients with early rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 1995; 34:74-8.
63. Shigeyama Y, Pap T, Kunzler P, Simmen BR, Gay RE, Gay S. Expression of osteoclast differentiation factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000; 43:2523-30.
64. Miranda-Carús ME, Benito-Miguel M, Balsa A, Cobo-Ibáñez T, Pérez de Ayala C, Pascual-Salcedo D, Martin-Mola E. Peripheral blood T lymphocytes from patients with early rheumatoid arthritis express RANKL and interleukin-15 on the cell surface and promote osteoclastogenesis in autologous monocytes. *Arthritis Rheum* 2006; 54:1151-64.
65. Schett G. Erosive arthritis. *Arthritis Res Ther* 2007; 9:S2.

66. Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortum Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:49-60.
67. Hashizume M, Hayakawa N, Mihara M. IL-6 trans-signalling directly induces RANKL on fibroblast-like synovial cells and is involved in RANKL induction by TNF-alpha and IL-17. *Rheumatology (Oxford)* 2008; 47:1635-40.
68. Carl HD., Swoboda B. Effectiveness of arthroscopic synovectomy in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 2008; 67:485-90.
69. Iesaka K, Kubiak EN, Bong MR, Su ET, Di Cesare PE. Orthopedic surgical management of hip and knee involvement in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Orthop* 2006; 35:67-73.
70. Simmen BR, Bogoch ER, Goldhahn J. Surgery Insight: orthopedic treatment options in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008; 4:266-73.
71. Klug S, Wittmann G, Weseloh G. Arthroscopic synovectomy of the knee joint in early cases of rheumatoid arthritis: follow-up results of a multicenter study. *Arthroscopy* 2000; 16:262-7.
72. Saxler G, Löer F, Skumavc M, Pförtner J, Hanesch U. Localization of SP- and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties. *Eur J Pain* 2007; 11:67-74.
73. Gschwend N, Raemy H, Nittner H, Ivosevic-Radovanovic D. Long-term results of endoprosthetic joint replacement and synovectomy. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 1986; 18:135-49.
74. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988; 31:315-24.
75. Lüring C, Anders S, Bäthis H, Perlick L, Tingart M, Grifka J. Current treatment modalities for cartilage defects at the knee - results of a nation-wide survey of surgical trauma and orthopaedic clinics in Germany. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 2004; 142:546-52.

76. Miller LE, Jüsten 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; 14:2097-107.
77. Jancsó G., Király E. Cutaneous nerve regeneration in the rat: reinnervation of the denervated skin by regenerative but not by collateral sprouting. *Neurosci Lett* 1983; 36:133-7.
78. Weihe E, Nohr D, Millan MJ, Stein C, Müller S, Gramsch C, Herz A. Peptide neuroanatomy of adjuvant-induced arthritic inflammation in rat. *Agents Actions* 1988; 25:255-9.
79. Hong D, Byers MR, Oswald RJ. Dexamethasone treatment reduces sensory neuropeptides and nerve sprouting reactions in injured teeth. *Pain* 1993; 55:171-81.
80. Jänig W, Levine JD, Michaelis M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res* 1996; 113:161-84.
81. Reinert A, Kaske A, Mense S. Inflammation-induced increase in the density of neuropeptide-immunoreactive nerve endings in rat skeletal muscle. *Exp Brain Res* 1998; 121:174-80.
82. Schubert TE, Weidler C, Lerch K, Hofstadter F, Straub RH. Achilles tendinosis is associated with sprouting of substance P positive nerve fibres. *Ann Rheum Dis* 2005; 64:1083-6.
83. Dickson A, Avelino A, Cruz F, Ribeiro-da-Silva A. Peptidergic sensory and parasympathetic fiber sprouting in the mucosa of the rat urinary bladder in a chronic model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuroscience* 2006; 141:1633-47.
84. Tuisku IS, Konttinen YT, Konttinen YT, Konttinen LM, Tervo TM. Alterations in corneal sensitivity and nerve morphology in patients with primary Sjögren's syndrome. *Exp Eye Res* 2008; 86:879-85.

85. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, Salma JV, Day DE, Lentsch AB, Huber-Lang MS, Ward PA. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. PLoS One 2009; 4:4414.
86. Taniguchi M, Matsuzaki S, Tohyama M. P75 plays a key role in the induction of the sprouting of sensory nerve fibers in inflamed skin. J Invest Dermatol 2007; 127:2062-5.
87. Cosentino M, Fietta AM, Ferrari M, Rasini E, Bombelli R, Carcano E, Saporiti F, Meloni F, Marino F, Lecchini S. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. Blood 2007; 109:632-42.

Surgical Synovectomy Decreases Density of Sensory Nerve Fibers in Synovial Tissue of Non-Inflamed Controls and Rheumatoid Arthritis Patients

B. Ossysek,¹ S. Anders,² J. Grifka,² R.H. Straub¹

¹Laboratory of Experimental Rheumatology and Neuroendocrino-Immunology, Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine I, University Hospital Regensburg, Regensburg, Germany, ²Department of Orthopedic Surgery, University Hospital Regensburg, in the Asklepios Clinic Bad Abbach, Regensburg, Germany

Received 17 December 2009; accepted 1 July 2010

Published online 31 August 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/jor.21233

ABSTRACT: Surgical synovectomy is a technique to treat synovitis and pain in patients with rheumatoid arthritis (RA) resistant to DMARDs or therapy with biologics. Indication to synovectomy is subject to tight cooperation of orthopaedic surgeons and rheumatologists. It was thought that synovectomy leads to a reduction of sensory nerve fibers, called sensory denervation. Since sensory denervation after synovectomy has never been histologically tested, we aimed to investigate sensory and sympathetic innervation in synovial tissue before and after synovectomy. Eight non-inflamed control subjects and eight patients with RA were included in this study with a two-stage synovectomy approach (interval 40–50 days). Nerve fibers and cells in synovial tissue were detected and counted using immunofluorescence. Density of sympathetic nerve fibers did not change after synovectomy, whereas density of sensory nerve fibers decreased in all control subjects and seven of eight patients with RA. In parallel, the density of synovial cells increased after synovectomy in all control subjects and six of eight RA patients, which is indicative of a wound healing response. In one female RA patient, density of sensory nerve fibers increased and a very marked rise of cellular density was observed, too. This indicates that probably not all patients profit from surgical synovectomy. The majority of patients (94%) demonstrated sensory denervation after surgical synovectomy accompanied by a wound healing cell response. This study can help to explain the positive effects of surgical synovectomy which usually leads to pain reduction and improved mobility.

© 2010 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc. *J Orthop Res* 29:297–302, 2011

Keywords: rheumatoid arthritis; osteoarthritis; synovectomy; sensory nerve fibres; sympathetic nerve fibres; denervation

Surgical synovectomy is a well-known therapeutical tool for the treatment of synovitis in adults and children with rheumatoid arthritis (RA) who are resistant to disease-modifying anti-rheumatic drug (DMARD) therapy.^{1–3} Today, decision for surgical synovectomy is made by cooperation of surgeons and rheumatologists. Clinical success of surgical synovectomy is higher in early arthritic disease leading to pain reduction and improved joint mobility.¹⁴ Pain reduction after synovectomy is the major benefit, and it is thought that this is due to sensory denervation by removal of nociceptive nerve fibers in the tissue.^{5,6} However, sensory denervation as a consequence of surgical synovectomy has never been demonstrated histologically.

Nociceptive nerve fibres in the synovial tissue are stimulated by local inflammatory factors such as tumour necrosis factor (TNF), interleukin (IL)-6, and many others.^{7–10} The local stimuli activate inflammation-to-brain signalling leading to sensitisation of pain pathways.¹¹ Nociceptive nerve fibres of the synovial tissue are equipped with substance P (SP) and calcitonin gene-related peptide (CGRP). In parallel to pain sensitisation, release of SP into the synovial microenvironment is a proinflammatory stimulus that contributes to chronic inflammation.¹² SP stimulates many proinflammatory aspects such as secretion of TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, interferon (IFN)- γ , superoxide anion production, and chemotaxis of different cell types.^{13–20} In addition,

in RA patients, SP-positive nerve fibers outweigh CGRP-positive nerve fibers, which probably has anti-inflammatory effects.²¹ Thus, surgical removal of tissue with nociceptive SP-positive nerve fibers should lead to favourable effects on pain transmission and inflammation. This is particularly relevant in RA patients because anti-inflammatory sympathetic nerve fibers and CGRP fibers are lost relative to proinflammatory SP-positive nociceptive nerve fibers.²²

This study aimed to investigate nerve fiber density of sympathetic and SP-positive nociceptive nerve fibers in identical synovial areas at two separate time points. Material was obtained using two-stage arthroscopy or open surgery of the knee in non-inflamed control subjects and patients with RA. Parallel to nerve fibers, the density of synovial cells was investigated.

PATIENTS AND METHODS

Patients

Eight patients with chronic RA and 8 non-inflamed control subjects were included without specific selection. Clinical and laboratory data for the two groups are presented in Table 1. Variables such as erythrocyte sedimentation rate, and C-reactive protein were measured by standard techniques (Table 1).

RA was diagnosed according to the American College of Rheumatology (formerly, the American Rheumatism Association) criteria.²³ All RA patients were diagnosed with a symptomatic Baker's cyst and underwent a first operation to remove the Baker's cyst. During this operation, focal synovectomy of the inflamed synovium very close was performed in the supra-patellar pouch of the knee and material was taken for histology. A small area next to the patella was tagged with a suture marker. During the second arthroscopic total

The authors declare that there are no conflicts of interest.

B. Ossysek and S Anders contributed equally to this work.

Correspondence to: R. H. Straub (T: +49-941-944-7120; F: +49-941-944-7121; E-mail: rainer.straub@klinik.uni-regensburg.de)

© 2010 Orthopaedic Research Society. Published by Wiley Periodicals, Inc.

Table 1. Characteristics of Controls and Patients with Rheumatoid Arthritis

	Control Group	Rheumatoid Arthritis
Number	8	8
Age, years	39.4 ± 5.7 [25–76]	57.5 ± 4.6 [35–71]*
Women/men, n (%)	2/6 (25/75)	5/3 (62/38)
Time between operation 1 and 2, days	43.4 ± 8.2	$51.4 \pm 3.0^*$
Erythrocyte sedimentation rate, mm 1st hour	17.6 ± 4.9	$62.6 \pm 12.5^{**}$
C-Reactive protein, mg/L	4.9 ± 1.3	$26.9 \pm 7.1^{\#}$
Medication		
NSAIDs, n (%)	6 (75)	6 (75)
Prednisolone, n (%)	n.a.	6 (75)
Methotrexate, n (%)	n.a.	2 (25)
Leflunomide, n (%)	n.a.	2 (25)
Hydroxychloroquine, n (%)	n.a.	2 (25)
Sulfasalazine, n (%)	n.a.	0 (0)
Azathioprine, n (%)	n.a.	0 (0)

Data are given as means \pm SEM, percentages in parentheses, and ranges in brackets.

* $p < 0.05$, ** $p \leq 0.01$, and $^{\#}p < 0.005$ for the difference between the two groups. n.a., not applicable; NSAIDs, non-steroidal anti-inflammatory drugs.

synovectomy, a piece of the same synovial area was removed (including the suture). Where the first operation was mainly dedicated to Baker's cyst removal, the second arthroscopy was performed in order to remove synovial tissue completely using a ventral approach.

Non-inflamed controls demonstrated a cartilage defect in the knee joint after trauma ($n = 6$) or osteochondritis dissecans ($n = 2$), which were subjected to autologous chondrocyte transplantation.²⁴ During the index arthroscopy of the joint, a small piece of synovial tissue was removed in the supra-patellar pouch next to the patella and the donor site was tagged with a suture marker as described above. After a time interval for autologous chondrocyte expansion ex vivo, during the second open operation for autologous chondrocyte transplantation, a second piece of synovial tissue was removed from the tagged area (including the suture).

We used the synovial suture as a marker in order to find the same synovial area during the second operation. This allows a direct comparison between operation 1 and 2 of tissue from the same area.

All patients were informed about the purpose of the study and gave written consent according to the declaration of Helsinki. The study was approved by the Ethics Committee of the University of Regensburg.

Synovial Tissue Preparation and Immunofluorescence

Synovial tissue samples were obtained immediately after opening the knee joint capsule. The preparation of the tissue for histology was previously described.^{22,25} A piece of about 1 cm² of synovial tissue was obtained. The tissue samples were fixed for 12–24 h in phosphate buffered saline (PBS) containing 4% formaldehyde and then incubated in PBS with 20% sucrose for 12–24 h. The tissue was then bedded in Tissue-Tek and quick-frozen. Each patient's samples of synovial tissue were stored at -80°C.

Using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Vectashield mounting medium, catalogue No. H-1200; Vector Laboratories, Burlingame, CA), nuclei were stained in order to detect tissue cell density. The numbers of cells per square millimetre were determined by averaging the number of DAPI-

stained nuclei in 17 randomly selected high power fields of view (400 \times).

Determination of synovial innervation has been extensively described in earlier studies.^{22,25} In our studies of nerve fibers, we always investigated sympathetic and sensory nerve fibers in parallel because the balance of the two nerve fiber types is important for synovial tissue homeostasis.^{21,22,25} Briefly, six to eight 7–9 μ m thick cryosections were used for immunofluorescence staining with primary antibodies against tyrosine hydroxylase (TH, the key enzyme for noradrenaline production in sympathetic nerve endings, polyclonal, rabbit, #AB152, 1:1,000, incubation time: 3 h; Chemicon, Temecula, CA) and SP (polyclonal, goat, #sc-9758, 1:200, incubation time: 12 h; Santa Cruz, Heidelberg, Germany). An Alexa Fluor 546 conjugated secondary antibody (for TH: goat anti-rabbit and, for SP: rabbit anti-goat, Molecular Probes, Invitrogen, Leiden, The Netherlands) was used to achieve immunofluorescent staining of these nerve fibers. The numbers of positive nerve fibers per square millimetre were determined by averaging the number of stained nerve fibers (minimum length 50 μ m, determined through a micrometer eyepiece) in 17 randomly selected high power fields of view (400 \times). Due to the low tissue density of nerve fibers it can be ruled out that a nerve fiber was counted twice. In a very similar way, tyrosine hydroxylase-positive cells were detected and counted using the same antibodies and the same tissue. Tyrosine hydroxylase-positive cells were found in earlier studies to be mainly fibroblasts or macrophages with an anti-inflammatory phenotype.²⁶

We controlled positive staining by incubating the tissue with respective control antibodies (Sigma, Deisenhofen, Germany) which always yielded a negative result.

Presentation of Data and Statistical Analysis

Mean values are given \pm SEM (table). Groups were compared by the Mann–Whitney U test (table). Differences between the two time points were tested using the Wilcoxon signed rank test for paired data, and correlations were calculated by Spearman rank correlation analysis (SPSS, V.17.0, SPSS, Inc., Chicago, IL). $p < 0.05$ was the level of significance.

RESULTS

Density of Sympathetic and Sensory Nerve Fibers before and after Synovectomy

In this cohort of control subjects and patients with RA, density of sympathetic nerve fibers did not change from operation 1 to the operation 2 as demonstrated in Figure 1. Figure 1C demonstrates an example of a sympathetic nerve fiber. As reported earlier,^{22,25} density of sympathetic nerve fibers is lower in RA as compared to control patients (compare Fig. 1A,B).

In contrast, in control subjects and in patients with RA, density of sensory nerve fibers was higher in the operation 1 compared to operation 2 (Fig. 2A,B). Figure 2C demonstrates an example of a sensory nerve fiber. In five of eight controls density decreased whereas in three of eight density remained at the same level (Fig. 2A). In seven of eight RA patients density decreased, and in only one patient density increased (Fig. 2B). The latter RA patient also demonstrated a strong increase of cellular density from $706/\text{mm}^2$ (operation 1) to $2,666/\text{mm}^2$ (operation 2), which indicates a marked wound response. This prompted us to study density of synovial cells in all patients (see below).

When control subjects and patients with RA were studied together (because behaviour of density of sensory nerve fibers was similar in the two groups), the difference between operation 1 ($2.1 \pm 0.4 \text{ fibers/mm}^2$) and operation

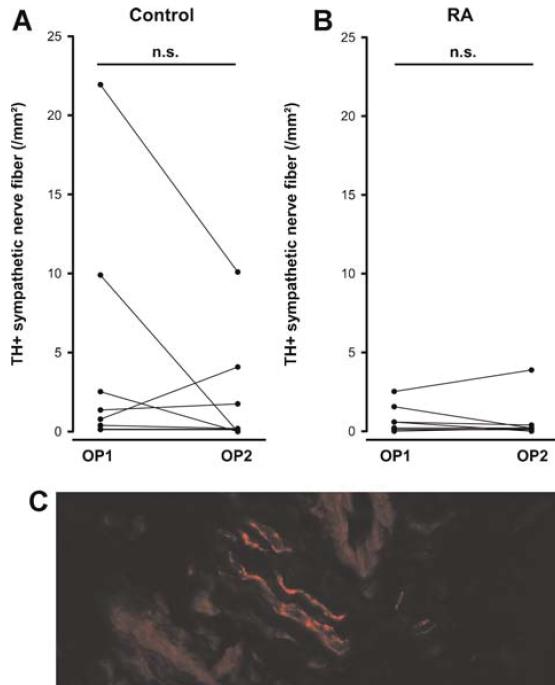


Figure 1. Density of sympathetic nerve fibres in synovial tissue before and after synovectomy in control subjects (A) and patients with rheumatoid arthritis (B). Every line represents one patient. (C) Example of a tyrosine hydroxylase-positive sympathetic nerve fibre; magnification $400\times$. n.s., not significant; OP1, operation 1; OP2, operation 2; RA, rheumatoid arthritis.

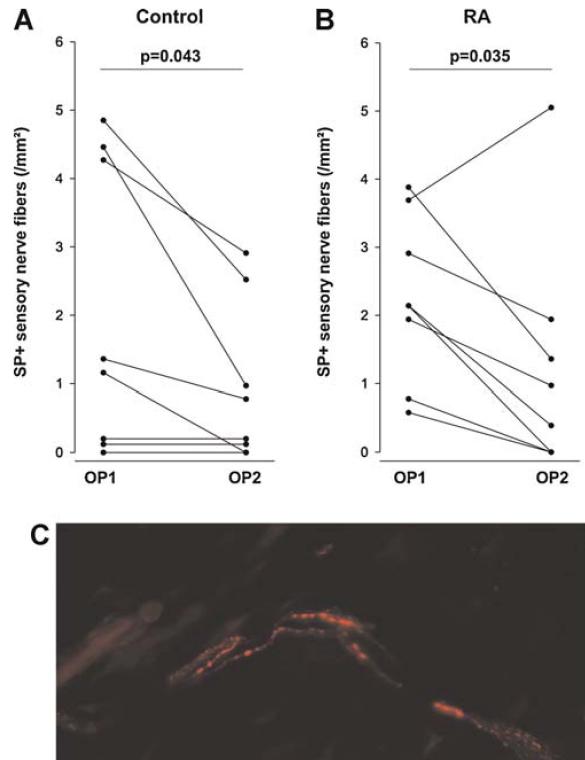


Figure 2. Density of sensory nerve fibres in synovial tissue before and after synovectomy in control subjects (A) and patients with rheumatoid arthritis (B). Every line represents one patient. (C) Example of a substance P—positive sensory nerve fibre; magnification $400\times$. Abbreviations see legends to Figure 1.

$2 (1.1 \pm 0.3 \text{ fibers/mm}^2)$ was highly significant ($p = 0.004$). A correlation analysis with density of sensory nerve fibers of operation 1 and operation 2 demonstrated a highly significant interrelation (Fig. 3). Most of the symbols were below the bisectrix which indicates that density of sensory nerve fibers at operation 1 were higher as compared to the time point at operation 2 (Fig. 3).

There was no pattern that linked medication of our patients with the behaviour of sympathetic and sensory innervation. In RA patients, there was no relationship between density of these nerve fibers and disease activity (data not shown).

Density of Synovial Cells before and after Synovectomy

Cell density can markedly change as a consequence of synovectomy (see RA patient above). The detailed analysis of cellular density at operation 1 and operation 2 demonstrated that most patients (except 2 RA patients) reacted with a wound healing response and increased cellular density after synovectomy (Fig. 4). Obviously, all control subjects demonstrated an increase of cellular density at operation 2 compared to operation 1 (Fig. 4A) (from $810 \pm 119 \text{ cells/mm}^2$ to $1,335 \pm 127 \text{ cells/mm}^2$). Similarly, in RA patients, mean cellular density tended to increase from $1,335 \pm$

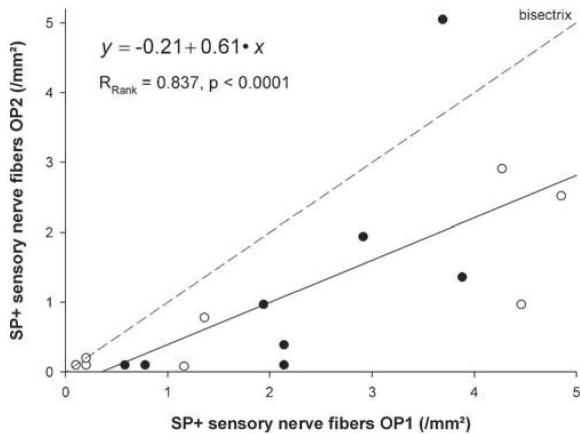


Figure 3. Correlation of density of sensory nerve fibres at operation 1 and 2. Open symbols represent control subjects whereas closed symbols stand for rheumatoid arthritis (RA) patients. The solid regression line, its equation, the rank correlation coefficient, and its *p*-value are given for all subjects (controls plus RA). The dashed line represents the bisectrix. Every symbol represents one patient.

249 cells/mm² to $1,563 \pm 225$ cells/mm² (Fig. 4B). The increase was most pronounced in one patient with RA, who demonstrated an enhanced density of sensory nerve fibers as already mentioned above (Figs. 2B and 4B).

The number of tyrosine hydroxylase-positive cells increased in three of eight controls and in four of eight RA patients (Fig. 5). The density of these cells remained constant or decreased in five of eight controls and in four of eight RA patients (Fig. 5). Overall, these changes were not statistically significant.

There was no pattern that linked medication of our patients with the behaviour of cell infiltration.

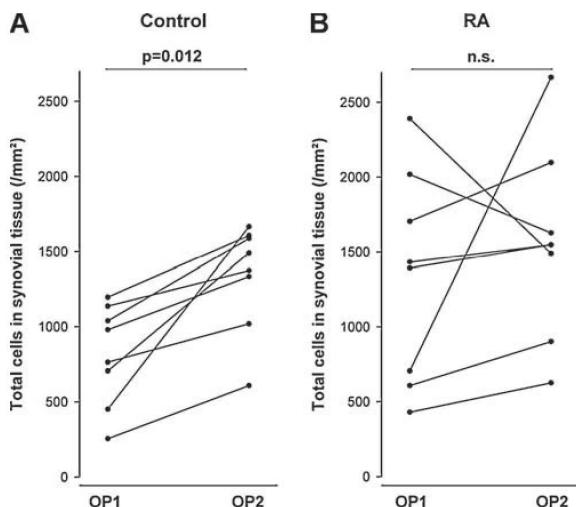


Figure 4. Density of synovial cells before and after synovectomy in control subjects (A) and patients with rheumatoid arthritis (B). Every line represents one patient. Abbreviations see legends to Figure 1.

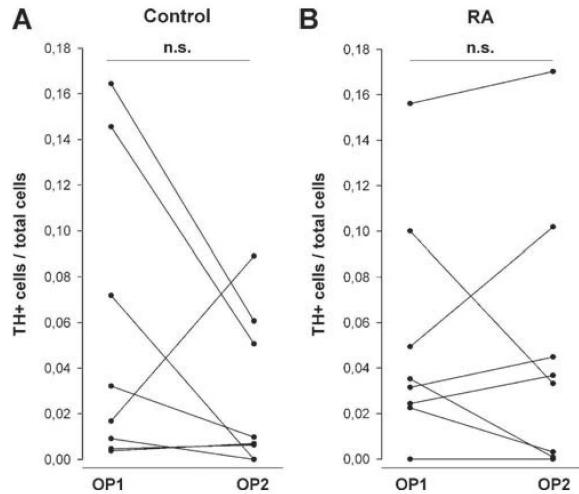


Figure 5. Density of synovial tyrosine hydroxylase-positive (TH+) cells before and after synovectomy in control subjects (A) and patients with rheumatoid arthritis (B). Every line represents one patient. Data are given in relation to the number of all synovial cells. Abbreviations see legends to Figure 1.

DISCUSSION

This study demonstrates that surgical synovectomy really leads to a measurable reduction of sensory innervation of synovial tissue by a factor of two. In parallel, cellular density increased as an indication of a wound healing response. Density of sympathetic nerve fibres and density of tyrosine hydroxylase-positive, catecholamine-producing cells did not change.

The proinflammatory role of sensory nerve fibres is well-known in that SP is a potent stimulus of innate and adaptive immunity.^{13–20} Thus, a sprouting response of sensory nerve fibres with an increased reservoir of SP, observed during an inflammatory process,^{22,27–34} is perceived as a stimulus for inflammation and pain. In patients with chronic RA, we observed that sprouting is specific for sensory nerve fibres but not for sympathetic nerve fibres.^{22,25} In contrast, sympathetic nerve fibres are markedly decreased in inflamed tissue.^{22,25} Thus, there is a preponderance of sensory over sympathetic nerve fibres leading to proinflammatory effects and pain because the remaining low concentrations of norepinephrine play a nociceptive and proinflammatory role (via α_2 -adrenoceptors).^{30,35} The sprouting response seems to be a direct consequence of up-regulation of nerve growth factor (NGF) in inflamed tissue, where the p75 NGF receptor seems to play a decisive role.³⁶

From this point of view, it would be beneficial if sensory nerve fibers can be reduced whereas sympathetic nerve fibers can be increased (so that high concentrations of norepinephrine would elicit anti-inflammatory effects via β -adrenoceptors). This study demonstrates that surgical synovectomy is a feasible technique to reduce sensory innervation in normal and inflamed tissue. We hypothesise that surgical synovectomy particularly removes the sprouting area of inflamed tissue (Fig. 6). Fortunately, surgical synovectomy did

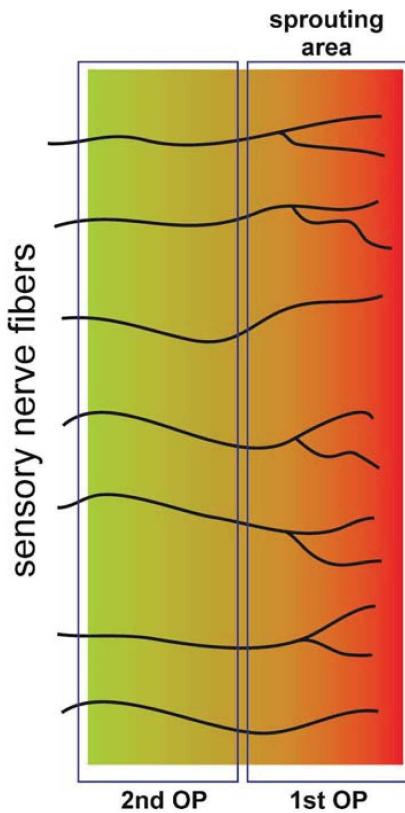


Figure 6. Schematic drawing of sensory nerve fibres in the two synovial tissue layers at operation 1 and 2. Tissue from the same area was removed during the operation 1 and a second time after approximately 45 days during operation 2. The density of sensory nerve fibres is nearly twice as high at operation time point 1 compared to operation time point 2. Since sensory nerve fibres can sprout into inflamed tissue, it is hypothesised that during the first operation the inflamed sprouting area is removed.

not change sympathetic innervation leading to a beneficial balance of the two nerve fiber types.

It is interesting that one woman demonstrated an increase of synovial density of sensory nerve fibres, which was accompanied by a marked increase of synovial cellular density. Indeed, this patient demonstrated the most pronounced increase of density of synovial cells. Most patients demonstrated such an increase in cellular density that was particularly visible in control subjects. We interpret this increase as a wound healing response. In the mentioned case of an RA woman with a strong increase of sensory innervation and synovial cells, the usually positive effect of synovectomy is probably missing (due to anonymisation this can not be checked). We conclude that these patients may not profit from synovectomy.

In an additional analysis, we tested for tyrosine hydroxylase-positive cells, which can produce local catecholamines.²⁵ The role of these cells is presently unclear since proinflammatory and anti-inflammatory effects have been described.^{35,37} The density of these cells was not different at the two time points investigated,

which indicates that synovectomy does not markedly influence tyrosine hydroxylase-positive cells.

In conclusion, for the first time, this study demonstrates that surgical synovectomy indeed decreases sensory innervation of synovial tissue. The usually positive effects attributed to surgical synovectomy, reduction of pain and improvement of mobility,^{1–4} can be explained by sensory denervation.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Silvia Capellino for technical help concerning tyrosine hydroxylase staining. We thank Angelika Gräber and Luise Rauch for technical assistance. This study was supported by a grant of the Deutsche Forschungsgemeinschaft (FOR696).

REFERENCES

- Carl HD, Swoboda B. 2008. Effectiveness of arthroscopic synovectomy in rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 67:485–490.
- Iessaka K, Kubiak EN, Bong MR, et al. 2006. Orthopedic surgical management of hip and knee involvement in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Orthop* 35:67–73.
- Simmen BR, Bogoch ER, Goldhahn J. 2008. Surgery insight: Orthopedic treatment options in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 4:266–273.
- Klug S, Wittmann G, Weseloh G. 2000. Arthroscopic synovectomy of the knee joint in early cases of rheumatoid arthritis: Follow-up results of a multicenter study. *Arthroscopy* 16:262–267.
- Saxler G, Loer F, Skumavc M, et al. 2007. Localization of SP- and CGRP-immunopositive nerve fibers in the hip joint of patients with painful osteoarthritis and of patients with painless failed total hip arthroplasties. *Eur J Pain* 11:67–74.
- Gschwend N, Raemy H, Nittner H, et al. 1986. Long-term results of endoprosthetic joint replacement and synovectomy. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 18:135–149.
- Brenn D, Richter F, Schaible HG. 2006. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: An inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum* 56:351–359.
- Boettger MK, Hensellek S, Richter F, et al. 2008. Antinociceptive effects of tumor necrosis factor alpha neutralization in a rat model of antigen-induced arthritis: Evidence of a neuronal target. *Arthritis Rheum* 58:2368–2378.
- Schafers M, Sorkin L. 2008. Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neurosci Lett* 437:188–193.
- Hucho T, Levine JD. 2007. Signaling pathways in sensitization: Toward a nociceptor cell biology. *Neuron* 55:365–376.
- Schaible HG, Del Rosso A, Matucci-Cerinic M. 2005. Neurogenic aspects of inflammation. *Rheum Dis Clin North Am* 31:77–101, ix.
- Levine JD, Clark R, Devor M, et al. 1984. Intraneuronal substance P contributes to the severity of experimental arthritis. *Science* 226:547–549.
- Wagner F, Fink R, Hart R, et al. 1987. Substance P enhances interferon-gamma production by human peripheral blood mononuclear cells. *Regul Pept* 19:355–364.
- Lotz M, Vaughan JH, Carson DA. 1988. Effect of neuropeptides on production of inflammatory cytokines by human monocytes. *Science* 241:1218–1221.
- Wiedermann CJ, Wiedermann FJ, Apperl A, et al. 1989. In vitro human polymorphonuclear leukocyte chemokinesis and human monocyte chemotaxis are different activities of

- aminoterminal and carboxyterminal substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 340:185–190.
16. Ansel JC, Brown JR, Payan DG, et al. 1993. Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 150:4478–4485.
 17. Kavelaars A, Broeke D, Jeurissen F, et al. 1994. 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* 153:3691–3699.
 18. Serra MC, Calzetti F, Ceska M, et al. 1994. Effect of substance P on superoxide anion and IL-8 production by human PMNL. *Immunology* 82:63–69.
 19. Kincy-Cain T, Bost KL. 1997. Substance P-induced IL-12 production by murine macrophages. *J Immunol* 158:2334–2339.
 20. Tanabe T, Otani H, Mishima K, et al. 1996. Mechanisms of oxyradical production in substance P stimulated rheumatoid synovial cells. *Rheumatol Int* 16:159–167.
 21. Dirmeier M, Capellino S, Schubert T, et al. 2008. 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)* 47:36–40.
 22. Weidler C, Holzer C, Harbuz M, et al. 2005. Low density of sympathetic nerve fibres and increased density of brain derived neurotrophic factor positive cells in RA synovium. *Ann Rheum Dis* 64:13–20.
 23. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, et al. 1988. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31:315–324.
 24. Luring C, Anders S, Bathis H, et al. 2004. Current treatment modalities for cartilage defects at the knee—Results of a nation-wide survey of surgical trauma and orthopaedic clinics in Germany. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 142:546–552.
 25. Miller LE, Jüsten HP, Schölmerich J, et al. 2000. 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* 14:2097–2107.
 26. Capellino S, Falk W, Straub RH. 2009. Reserpine as a new therapeutic agent in arthritis. *Arthritis Rheum* 58:S730.
 27. Jancso G, Kiraly E. 1983. Cutaneous nerve regeneration in the rat: Reinnervation of the denervated skin by regenerative but not by collateral sprouting. *Neurosci Lett* 36:133–137.
 28. Weihe E, Nohr D, Millan MJ, et al. 1988. Peptide neuro-anatomy of adjuvant-induced arthritic inflammation in rat. *Agents Actions* 25:255–259.
 29. Hong D, Byers MR, Oswald RJ. 1993. Dexamethasone treatment reduces sensory neuropeptides and nerve sprouting reactions in injured teeth. *Pain* 55:171–181.
 30. Janig W, Levine JD, Michaelis M. 1996. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res* 113:161–184.
 31. Reinert A, Kaske A, Mense S. 1998. Inflammation-induced increase in the density of neuropeptide-immunoreactive nerve endings in rat skeletal muscle. *Exp Brain Res* 121:174–180.
 32. Schubert TE, Weidler C, Lerch K, et al. 2005. Achilles tendinitis is associated with sprouting of substance P positive nerve fibres. *Ann Rheum Dis* 64:1083–1086.
 33. Dickson A, Avelino A, Cruz F, et al. 2006. Peptidergic sensory and parasympathetic fiber sprouting in the mucosa of the rat urinary bladder in a chronic model of cyclophosphamide-induced cystitis. *Neuroscience* 141:1633–1647.
 34. Tuisku IS, Konttinen YT, Konttinen LM, et al. 2008. Alterations in corneal sensitivity and nerve morphology in patients with primary Sjogren's syndrome. *Exp Eye Res* 86:879–885.
 35. Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, et al. 2009. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response. *PLoS One* 4:e4414.
 36. Taniguchi M, Matsuzaki S, Tohyama M. 2007. P75 plays a key role in the induction of the sprouting of sensory nerve fibers in inflamed skin. *J Invest Dermatol* 127:2062–2065.
 37. Cosentino M, Fietta AM, Ferrari M, et al. 2007. Human CD4+CD25+ regulatory T cells selectively express tyrosine hydroxylase and contain endogenous catecholamines subserving an autocrine/paracrine inhibitory functional loop. *Blood* 109:632–642.

8. Lebenslauf

Name:	Barbara Ossysek	
Geburtsdatum:	23.06.1986	
Geburtsort:	Passau	
Konfession:	römisch-katholisch	
Familienstand:	ledig	
Eltern:	Joachim Ossysek Lieselotte Ossysek	Sozialversich.fachangestellter Angestellte
Geschwister:	Stefan Ossysek	Student (Umwelt- und Ressourcenmanagement)
Schulbildung:	1992-1996 1996-2005	Grundschule Aicha v. Wald Gymnasium Vilshofen
Studium:	2005-2011	Humanmedizin an der Universität Regensburg
1. Abschnitt der Ärztl. Prüfung:	9/2007	
Praktisches Jahr:	1. Tertiair Chirurgie 2. Tertiair Innere Medizin 3. Tertiair Neurologie	KH St. Josef Regensburg KH Barmherzige Brüder Regensburg BKH Regensburg

2. Abschnitt der Ärztl. Prüfung: 11/2011

Approbation: 11/2011

Ärztliche Tätigkeit seit 01/2012 Assistenzärztin in der Abteilung Innere Medizin der Asklepios Klinik Burglengenfeld

9. Danksagung

Besonders möchte ich mich bei meinen Doktorvater Prof. Dr. Rainer Straub bedanken, zunächst einmal für das interessante Thema, das er mir für meine Doktorarbeit zur Verfügung stellte, und vor allem für die sehr gute und kompetente Betreuung. Mit seinem enormen Fachwissen und seiner Begeisterung für die Innere Medizin, speziell die Rheumatologie und Immunologie, entfachte und verstärkte er auch mein eigenes Interesse und die Freude an diesem Fachgebiet.

Daneben gilt mein großer Dank Frau Dr. Silvia Capellino und Frau Luise Rauch, die mich zu Beginn meiner experimentellen Arbeit in die Methoden der Immunhistochemie einführten, und mir auch später bei technischen Problemen immer mit Rat und Tat zur Seite standen.

Und schließlich möchte ich meinen Eltern ganz herzlich „Danke“ sagen, dass sie immer für mich da waren und sind, mir mein Studium in finanzieller Hinsicht ermöglichten und mich auch stets in meinem Tun bestärkten und motivierten.