

# **Charakterisierung des autonomen Nervensystems in Ruhe sowie unter Stresseinwirkung bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med.

an der Medizinischen Fakultät

der Universität Leipzig

eingereicht von:

Anke Esber, geb. Voitzsch, 06.06.1986 in Suhl

angefertigt an der Universität Leipzig, Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Abteilung  
Rheumatologie

Betreuer:

Prof. Dr. med. C. Baerwald, Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Abteilung  
Rheumatologie, Universität Leipzig

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 22.07.2014

# Bibliographische Beschreibung

Anke Esber, geb. Voitzsch

Titel: Charakterisierung des autonomen Nervensystems in Ruhe sowie unter Stresseinwirkung bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis.

Universität Leipzig, Dissertation

Textteil: 77 Seiten, 23 Abbildungen, 17 Tabellen, 201 Literaturstellen

## Referat:

Eine Dysregulation neuro-immunologischer Interaktionen und eine veränderte Stressantwort werden als Teil der Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis (RA) diskutiert. Dabei könnte eine autonome Dysfunktion eine wichtige Rolle spielen. Um dem nachzugehen, wurde an Patienten mit unterschiedlicher Krankheitsaktivität die Aktivität des autonomen Nervensystems in Ruhe und in Reaktion auf minor Stress sowie erstmals deren Assoziation zu Gen-Polymorphismen  $\beta$ 2-adrenerger Rezeptoren ( $\beta$ 2ARs), welche sich u.a. auf Immunzellen befinden, untersucht. Zur Bestimmung autonomer Aktivität wurde an 112 RA- und 48 Osteoarthritis-Patienten die sympathische Hautantwort (SSR) sowie die Herzratenvariabilität (HRV) getestet. Standardisierte Stresstests kamen zur Anwendung. Eine Allel-spezifische Polymerase-Ketten-Reaktion diente zur Ermittlung der Varianten des  $\beta$ 2ARs an Aminosäureposition 16, 27 und 164. Es konnte gezeigt werden, dass die autonome Aktivität bei RA in Ruhe durch eine signifikant erhöhte Herzfrequenz, ein Überwiegen des Sympathikus im Verhältnis zum Parasympathikus sowie eine signifikant erniedrigte Parasympathikusaktivität gekennzeichnet ist. Die Stressantwort bei RA war signifikant häufiger pathologisch als bei der Kontrollgruppe und durch signifikante Hypoaktivität und Hyporeaktivität des Parasympathikus sowie eine signifikant erniedrigte HRV charakterisiert. Das Zusammenspiel beider Schenkel des ANS erschien gestört. Die SSR-Werte befanden sich im Normbereich. Schlechtere Werte waren jedoch signifikant mit hohem CRP assoziiert. Desweiteren war Heterozygotie an allen Gen-Positionen der  $\beta$ 2ARs signifikant mit RA assoziiert. Gln27Gln (signifikant häufiger für Gesunde) ging mit signifikant niedrigerer Krankheitsaktivität einher. Starkes Überwiegen des SNS in Ruhe sowie niedrige parasympathische Aktivität (HRV-Daten) waren signifikant mit hoher Krankheitsaktivität assoziiert. Zusammenfassend weist die vorliegende Arbeit auf eine autonome Dysregulation bei Patienten mit RA hin, was mit klinischen Parametern der RA assoziiert war. Weiterhin unterstreicht die Studie die Assoziation von  $\beta$ 2AR Polymorphismen mit einer RA und liefert einen weiteren Beitrag zum Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fanden Eingang in folgende Abstract-Veröffentlichungen und einem Posterpreis:

Esber A, Malysheva O, Baum P, Baerwald CG (2011): Impact of stress on autonomic modulation in patients with rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation* 18 (6): 373.

→ Posterpräsentation (durch A. Esber) beim 8. Congress of the International Society for NeuroImmunoModulation (ISNIM) together with the German Endocrine-Brain-Immune Network (GEBIN)). Oktober 2011. Dresden

Malysheva O, Esber A, Baum P, Baerwald CG (2011): Influence of Autonomic Nervous Modulation on Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 63 (10) Supplement: 661-662.

Malysheva O, Voitzsch A, Baum P, Baerwald CG (2011): Sympathetic skin response and heart rate variability in patients with rheumatoid arthritis. *Z Rheumatol* 70 (1) Supplement: 88.

→ **Posterpreis** beim 39. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie. September 2011. München (Posterpräsentation durch A. Esber/geb. Voitzsch)

Malysheva O, Baum P, Voitzsch A, Baerwald CG (2010): Differences in the autonomic reactivity pattern upon various stressors in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 62 (10) Supplement: 426-427.

Malysheva O, Baum P, Voitzsch A, Baerwald CG (2010): Autonomic response to mental stress in patients with rheumatoid arthritis with various disease activities. → Posterpräsentation (durch A. Esber) beim 9. Research Festival Leipzig. Dezember 2010. Leipzig

Malysheva O, Baum P, Voitzsch A, Baerwald CG (2009): Autonomic nervous system activity upon mental stress in patients with rheumatoid arthritis with various disease activities. *Z Rheumatol* 68 (1) Supplement: 68.

→ Posterpräsentation (durch A. Esber) beim 37. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie. Oktober 2009. Köln

# Inhaltsverzeichnis

Bibliographische Beschreibung.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einführung.....	1
1.1 Rheumatoide Arthritis.....	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Ätiologie.....	1
1.1.4 Pathogenese.....	2
1.2 Das ANS im Netzwerk mit dem Immunsystem .....	3
1.2.1 Das Parasympathische Nervensystem.....	4
1.2.1.1 Anatomische und physiologische Links zum Immunsystem.....	4
1.2.2 Das sympathische Nervensystem .....	5
1.2.2.1 Anatomische und physiologische Links zum Immunsystem .....	5
1.2.2.2 Die $\beta$ 2-adrenergen Rezeptoren.....	7
1.3 Stress.....	8
1.3.1 Stress und Rheumatoide Arthritis.....	8
1.3.2 Das ANS als Teil der Stressantwort.....	9
1.4 Zielsetzung und Fragestellung.....	12
2. Materialien und Methoden.....	14
2.1 Studiendesign.....	14
2.2 Verzeichnis der verwendeten Materialien und das Untersuchungskollektiv.....	15
2.2.1 Materialien und Geräte im Labor.....	15
2.2.1.1 Laborgeräte.....	15
2.2.1.2 Standardmaterialien.....	15
2.2.1.3 Chemikalien und Lösungen für molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden.....	15
2.2.2 Geräte in der neurologischen Ambulanz.....	17
2.2.3 Software zur Analyse und Auswertung von Daten .....	17
2.2.4 Untersuchungskollektiv.....	18
2.2.4.1 Patientenkollektiv.....	18
2.2.4.2 Kontrollkollektiv.....	19
2.2.4.3 gesunde Kontrollen für die genetischen Untersuchungen.....	20
2.2.4.4 Ethik .....	20

2.3 Datenerhebung.....	21
2.3.1 Ablauf der Untersuchungen.....	21
2.3.2 Ambulanz: Anamnese und klinische Daten .....	21
2.3.2.1 klinische Tests zur Ermittlung der aktuellen Krankheitsaktivität.....	21
2.3.2.2 radiologischer Status.....	23
2.3.2.3 Laborwerte.....	23
2.3.2.4 aktuelle Therapie.....	23
2.3.3 Labor: genetische Daten.....	23
2.3.3.1 DNA-Isolation.....	23
2.3.3.2 PCR .....	25
2.3.3.3 Gelelektrophorese.....	27
2.3.4 Neurologische Daten .....	27
2.3.4.1 Sympathetic skin response (SSR).....	27
2.3.4.2 Herzratenvariabilität (HRV).....	29
2.4 Statistische Auswertung.....	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Klinische Charakterisierung der Patienten .....	37
3.2 Charakterisierung des ANS.....	38
3.2.1 Aktivität des ANS in Ruhe .....	38
3.2.2 Aktivität des ANS unter Stressbelastung.....	40
3.2.2.1 Ruhe versus Stress .....	41
3.2.2.2 quantitativer Vergleich– RA-Patienten zeigen signifikant häufiger pathologische HRV-Test-Ergebnisse.....	42
3.2.2.3 qualitativer Vergleich der absoluten Werte unter Stressbelastung– v.a. die parasympathische Aktivität ist bei RA-Patienten niedriger.....	43
3.2.2.4 Vergleich der Differenzen zwischen Stress und Ruhe– geringere Flexibilität in Reaktion auf Stress bei RA .....	47
3.2.3 HRV und klinische Parameter.....	47
3.2.4 Aktivität des ANS unter Stressbelastung im Test der sympathischen Hautantwort.....	51
3.2.5 Korrelation zwischen SSR und klinischen Parametern.....	52
3.3 Die Rolle der $\beta$ 2-adrenergen-Rezeptoren ( $\beta$ 2ARs).....	52
3.3.1 Charakterisierung der Gen-Polymorphismen der $\beta$ 2ARs.....	52
3.3.1.1 RA versus gesunde Kontrollen.....	53
3.3.1.2 RA versus OA.....	54
3.3.2 Polymorphismen bei RA-Patienten und Klinik.....	56
3.3.3 Korrelation von HRV-Parametern und Gen-Polymorphismen.....	57
4. Diskussion.....	58

---

5. Zusammenfassung.....	75
6. Literaturverzeichnis.....	78
7. Abbildungsverzeichnis.....	98
8. Tabellenverzeichnis.....	99
9. Anlagen.....	VIII
9.1 Die neurologischen Messwerte und ihre Bedeutung.....	VIII
Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit.....	IX
Danksagung.....	X
Lebenslauf.....	XI

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ach	Acetylcholin
ACTH	Adrenocorticotropes- Hormon
$\alpha$ 7-n-Ach-R	Alpha7-nicotinerges Achetylcholin-Rezeptor
Anti-CCP-AK	Antikörper gegen citrullinierte cyclische Peptide
Arg	Arginin
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
$\beta$ 2AR	Beta2-adrenerger Rezeptor
bp	Basenpaare
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
CRP	C-reaktives Protein
DAS	Disease activity score
DBT	Deep breathing test, Atemtest zur Stimulation des Parasympathikus
DMARD	Disease modifying antirheumatic drugs
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
HAQ	Health assessment questionnaire
HF	High frequency (Frequenz des Herzratenvariabilitäts-Spektrums)
HHG-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse
HRV	Herzratenvariabilität
IgG/E	Immunglobulin G/E
IL	Interleukin
Ile	Isoleucin
INF $\gamma$	Interferon gamma
L3	Drittes Segment des Lumbalmarks
LF	Low frequency (Frequenz des Herzratenvariabilitäts-Spektrums)
MCR	Mean Circular Resultant
Min	Minute
MST	Mentaler Stresstest
MW	Mittelwert

---

NA	Noradrenalin
n.s.	nicht signifikant
nu	normalized units
OA	Osteoarthrose
PADI4	Peptidylarginin Deiminase Typ 4
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
PNS	Parasympathisches Nervensystem
PTPN22	Protein Tyrosin Phosphatase Non-Receptor Typ 22
RA	Rheumatoide Arthritis
RR-Intervalle	Abstände zwischen R-Zacken im Elektrokardiogramm
RMSSD	Square root of the mean of the squares of successive RR interval differences (Zeitwert der Herzratenvariabilitätsmessung)
SEM	Standard Error of the Mean
SNS	Sympathisches Nervensystem
SSR	Sympathetic skin response
STAT4	Signal Transducer and Activator of Transcription
Th1	Erstes Segment des Thorakalmarkes
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TP	Total power (Parameter der Herzratenvariabilitätsmessung)
VLF	Very low frequency (Frequenz des Herzratenvariabilitäts-Spektrums)
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1. Einführung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

### 1.1.1 Definition

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung. Hauptmerkmal ist eine Synovialitis, die zu Arthritis, Bursitis und Tendovaginitis führt. Dabei kann es zu extraartikulären Organmanifestationen unter Beteiligung von z.B Herz, Lunge, Leber, Nieren, Augen, Gefäßen, Muskulatur sowie peripherem und zentralen Nervensystem kommen. Des Weiteren zeigen sich unspezifische Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, nächtliches Schwitzen, Myalgien u.a. (Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie 2012). Der schubweise progrediente Verlauf der Krankheit kann in Folge von Schmerz und Gelenkdestruktion zu Mobilitätsverlust und Invalidität führen. Die Patienten haben eine deutlich eingeschränkte Lebensqualität und eine um drei bis zehn Jahre verringerte Lebenserwartung (Mutru et al. 1985), (Aletaha et al. 2010).

### 1.1.2 Epidemiologie

Die Prävalenz der Erkrankung im Erwachsenenalter beträgt 1% und steigt bei über 55 Jährigen auf ca. 2%. In Deutschland sind somit 500 000 bis 800 000 Menschen betroffen. Dabei liegt der Erkrankungsgipfel zwischen dem 55. und 75. Lebensjahr. Frauen sind im Verhältnis w:m=3:1 häufiger betroffen. Es zeigen sich erniedrigte Inzidenzen bei Östrogenanwendung und erhöhte Inzidenzen während der Stillperiode. Desweiteren besteht eine familiäre Häufung (Herold 2012), (Østensen et al. 2012).

### 1.1.3 Ätiologie

Die Ursachen und Verlaufsfaktoren der RA sind heute noch weitgehend ungeklärt. Nach vielen Jahren intensiver Forschung ist klar, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt. Verschiedene Umweltfaktoren sowie ein permissiver genetischer Hintergrund beeinflussen Entstehung und Ausprägung der RA (Review bei Bax et al. 2011), (Perricone et al. 2011). Der wichtigste genetische Risikofaktor ist die HLA-Region, welche 30-50 % der Suszeptibilität für RA bestimmt (Bowes und Barton 2007), (Imboden 2009). Nach der „shared epitope hypothesis“ besitzen eine Vielzahl der Risiko-Allele an Position 70-74 der DRβ1-Kette im HLA-DRB1-Gen die Aminosäuren QKRAA, QRRRAA oder RRRRAA (Gregersen et al. 1987). Seit 2003 wurden weitere pathogenetisch bedeutsame Gene entdeckt, wie z.B. PADI4

(Suzuki et al. 2003), PTPN22 (Carlton et al. 2005) oder STAT 4 (Remmers et al. 2007). Spezielle Single Nukleotid Polymorphismen mit Bezug zu Genen für immunologisch bedeutsame Faktoren, wie TNF (Fonseca et al. 2007), IL-1 (Buchs et al. 2001), IL-6 (Fishman et al. 1998) u.a. scheinen für aggressivere Krankheitsverläufe verantwortlich (Review bei Perricone et al. 2011). Polymorphismen in der CRH-Regulierungs-Region wurden beschrieben (Wagner et al. 2006) Insgesamt waren 2011 rund 30 verschiedene Risiko-Regionen identifiziert (Bax et al. 2011), (Zhernakova et al. 2011), (Stahl et al. 2010). Umweltfaktoren als Triggermechanismen für die RA können in regionale Faktoren betreffend Geografie, Klima, Bakterien und Viren, sowie soziokulturelle Faktoren wie Lebensstil, Rauchen oder Essgewohnheiten unterteilt werden (Youinou et al. 2010), (Perricone et al. 2011). Aktuell rückt hier auch die Rolle von Stress in den Fokus. Darüber, ob Stress tatsächlich ein auslösender Faktor für die Erkrankung sein könnte, bestehen noch widersprüchliche Ergebnisse (Dube et al. 2009), (Li et al. 2005). Mehr Studien konnten daneben einen negativen Einfluss von Stress auf den Verlauf einer bereits bestehenden RA zeigen (Cutolo et al. 2006), (Davis et al. 2008) (Review bei Malysheva et al. 2010).

#### 1.1.4 Pathogenese

Die im Folgenden beschriebenen Mechanismen bilden lediglich einen groben Einblick in das Gebiet der komplexen, weiterhin nicht vollständig geklärten, Pathophysiologie der RA, auf welchem derzeit intensiv geforscht wird (Review bei Cooles und Isaacs 2011): Bei genetisch disponierten Personen wird über die weitgehend unbekanntes Triggermechanismen eine Autoimmunerkrankung induziert, welche durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Entzündungszellen und Entzündungsmediatoren bestimmt wird. Dies führt auf lokaler Ebene zu Gelenkdestruktion, sowie zu verschiedenen systemischen Reaktionen (Panayi 1993).

Lokal kommt es über die postkapillären Venulen zur Infiltration der Synovialis mit autoreaktiven T-Helferzellen (Th-Zellen), B-Lymphozyten, Plasmazellen und dendritischen Zellen. Monozyten und Lymphozyten interagieren über Oberflächenantigene und Zytokine. Dabei kommt den T-Zellen eine besondere Bedeutung in der Pathogenese der RA zu (Weyand et al. 1997), (Ma et al. 2012). Pro-inflammatorischer Th1-Zellen werden induziert und Zytokine, wie IL-1, IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-12 produziert. Der Th2-Weg mit vorrangiger Produktion anti-inflammatorischer Zytokine, wie IL-4 und IL-10, wird durch den sogenannten „Th1-Shift“ unterdrückt (Elenkov et al. 2006), (Wahle et al. 2006). Die pro-inflammatorischen Zytokine induzieren u.a. die Monozyten-Differenzierung zu Osteoklasten sowie deren Proliferation, Aktivierung und Überleben im Synovialgewebe. Diese tragen nun maßgeblich zur Knochendestruktion bei. Außerdem werden Wachstumsfaktoren und Autoantikörpern gegen das Fc-Fragment des IgG, sogenannte Rheumafaktoren (RF), sowie

anti-CCP-Antikörper u.a. gebildet, welche als diagnostische und prognostische Marker von Bedeutung sind (Puszczewicz et al. 2011). Im Rahmen von Immunkomplexablagerungen kommt es zur Komplementaktivierung mit der Freisetzung weiterer Entzündungsmediatoren sowie knorpelagressiver Enzyme (z.B. Kollagenase, Elastase) aus Synovia, Chondrozyten und Pannus. Diese Verdickung der Synovialis (Pannus) wird hervorgerufen durch die Invasion mit makrophagenähnlichen Typ-A-Synoviozyten und die Proliferation fibroblastenähnlicher Typ-B-Synoviozyten. Der Pannus überwuchert den Knorpel (*tumor like proliferation*) und zerstört diesen nach und nach (Herold 2012).

Dieser lokale Prozess im Gelenk wird jedoch nicht getrennt von systemischen Reaktionen betrachtet und das Immunsystem ist nicht der einzige Akteur. Vielmehr wird die RA durch ein komplexes Zusammenspiel endokrinologischer, neurologischer und immunologischer Prozesse bestimmt (Straub und Fassold 2010), (Del Rey et al. 2010). Letztendlich führt eine Vielzahl pathogenetischer Einflussfaktoren dazu, dass das gesunde innere Gleichgewicht zwischen diesen Systemen im Körper gestört wird und eine chronische Krankheit entsteht (Koopman und Stooft 2011). Ein besseres Verständnis pathogenetischer Mechanismen könnte langfristig neue Therapieoptionen eröffnen, die auf die Wiederherstellung von Systemen abzielt, welche für den Erhalt dieser Homöostase (griech: „Gleichstand“) entscheidend sind.

Die vorliegende Arbeit setzt an diesem Punkt an und hat das Ziel, die Funktion des autonomen Nervensystems (ANS) bei der Autoimmunerkrankung RA genauer zu charakterisieren. Warum also das Nervensystem bei einer AutoIMMUNkrankheit untersuchen? Die Forschung der letzten Jahre erbrachte eine Vielzahl von anatomischen und funktionellen Hinweisen zu Interaktionen zwischen ANS und Immunsystem, welche vor dem Hintergrund des derzeit diskutierten negativen Einflusses von Stress auf den Verlauf der RA von besonderem Interesse sind (Vassilopoulos und Mantzoukis 2006), (Cutolo et al. 2006), (Stojanovich 2009) (Del Rey et al. 2010), (McCray und Agarwal 2011). Auf diese beiden Punkte- Wie interagiert das ANS mit dem Immunsystem? Und: Welche Rolle spielt das ANS im Bezug auf Stress?- soll daher etwas näher eingegangen werden.

## 1.2 Das ANS im Netzwerk mit dem Immunsystem

Das Nervensystem wird in das zentrale und das periphere Nervensystem unterteilt. Letzteres besteht aus sensiblen, sensorischen (willkürlichen) und autonomen (unwillkürlichen) Anteilen. Das ANS lässt sich weiter in die beiden Schenkel Sympathikus und Parasympathikus einteilen. Die Signale des Sympathikus werden über prä- und

postganglionäre Fasern vermittelt. Die präganglionären Fasern entstammen Nuclei des Hirnstammes und verlassen das ZNS über Spinalnerven der Rückenmarkssegmente Th1-L3 und ziehen von dort zu ihren Ganglien, die größtenteils direkt paravertebral liegen (sog. sympathischer Grenzstrang), z.T auch weiter peripher, prävertebral. Acetylcholin (Ach) dient hier als Neurotransmitter. Die postganglionären Fasern ziehen schließlich zu den Zielorganen und verwenden hauptsächlich Noradrenalin (auch Adrenalin und Dopamin), welches dann an adrenergen Rezeptoren der Zellen, sog.  $\alpha$  1-3 und  $\beta$  1 und 2 Rezeptoren, seine Botschaft vermitteln kann. Prinzipiell ist der sympathische Schenkel aktiv, wenn der Mensch sich in einer *fight and flight*-Situation befindet. Herzfrequenz und Blutdruck steigen an, die Glukoneogenese der Leber wird aktiviert, die Darmperistaltik verringert uvm. Der Parasympathikus wird im Gegensatz zum thorako-lumbalen sympathischen System als cranio-sakrales System bezeichnet, da seine Fasern dem Hirnstamm sowie den Rückenmarks-Segmenten S2-S4 entstammen. Zu 75% besteht das PNS aus Fasern des Nervus vagus. Seine efferenten Fasern entstammen v.a. dem Nucleus ambiguus und dem Nucleus dorsalis nervi vagi in der Medulla oblongata. Die präganglionären Fasern ziehen zu Ganglien, welche im Gegensatz zum Sympathikus weit peripher in der Nähe der Erfolgsorgane liegen. Sowohl prä- als auch postganglionäre Fasern nutzen Ach als Neurotransmitter. Dieses wirkt über zwei Arten von Rezeptoren: muscarinerge Rezeptoren (mit den Subgruppen M1- M5) und nicotinerge Rezeptoren (mit den Subgruppen  $\alpha$  1-10 und  $\beta$  1-4). Die verschiedenen Rezeptoren führen zu unterschiedlichen physiologischen Reaktionen (Wess et al. 1996), (Kalamida et al. 2007). Prinzipiell wirkt der Parasympathikus als Gegenspieler des Sympathikus in *rest and digest*-Situationen. In einem gesunden Körper wirken beide Schenkel stets in einem fein ausbalancierten Gleichgewicht und im Zusammenhang zu vielen anderen Organsystemen. (Klinke 2005), (Pschyrembel 2002), (Silbernagl 2003). Für die Pathogenese der RA von besonderem Interesse sind die Verbindungen des ANS zum Immunsystem.

## **1.2.1 Das Parasympathische Nervensystem**

### **1.2.1.1 Anatomische und physiologische Links zum Immunsystem**

Einem Review von 2007, das Studien der vergangenen 20 Jahre untersuchte, war zu entnehmen, dass bis dahin keine eindeutigen Beweise für anatomische Links zwischen Nervus vagus und dem Immunsystem im Sinne direkter efferenter vagaler Innervation von Immunorganen bekannt waren (Nance und Sanders 2007)

Neuere Studien vermuten jedoch, dass die Milz parasympathische Signale erhält, welche nicht nur von Ach-produzierenden Immunzellen der Milz stammen. Eine indirekte Verbindung

wird über das Ganglion mesentericum superior beim Plexus coeliacus vermutet. Hierher ziehen sowohl sympathische als auch parasympathische Fasern und die Signale beider Schenkel des ANS werden von hierher weiter in Richtung Milz geleitet (Buijs et al. 2008). Weiter konnte gezeigt werden, dass über von dieser Schnittstelle stammende vagale Reize die TNF- $\alpha$ -Produktion durch Milz-Makrophagen gehemmt wird (Rosas-Ballina et al. 2008). Die Nervenfasern in der Milz können selbst kein Ach produzieren. In Tierexperimenten wurden aber T-Zellen gefunden, die durch vagale Stimulation Ach produzieren und damit die Produktion von Zytokinen wie z.B. TNF- $\alpha$  oder IL-6 durch das angeborene Immunsystem unterdrücken können (Rosas-Ballina et al. 2011). Vermittler für diese Wirkung sind v.a.  $\alpha 7$ -n-Ach-Rezeptoren (Wang et al. 2002). Ein anti-inflammatorischer Einfluss efferenter vagaler Fasern scheint also anatomisch möglich und wurde funktionell schon vielfach gezeigt:

An Tiermodellen mit zervikaler Vagusektomie (wodurch eine Mitstimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHN)-Achse verhindert wurde) z.B. führte die elektrische Stimulation des peripheren Vagus zu signifikant erniedrigter TNF- $\alpha$ -Produktion im Vergleich zu Tieren ohne Stimulation (Tracey et al. 2000). Die Blockierung der Leukozytenmigration durch Vagusstimulation in Mäusen wurde beobachtet (Saeed 2005). Elektrische oder pharmakologische Stimulation des Nervus vagus verbessert in vitro die Überlebenschancen von Tieren mit Entzündung (Bernik 2002). Viele Studien bestätigten die Suppression von Zytokin-Produktion durch vagale Aktivität während Entzündungen (Pavlov et al. 2003), (Bernik 2002), (Wang et al. 2002).

Neben den efferenten wirken außerdem afferente vagale Fasern, die bei einer Entzündung von Endotoxinen und Zytokinen stimuliert werden und dem ZNS Signale senden können, welches dann wieder das SNS sowie die HHN-Achse aktiviert. Glucocorticoide und NA werden freigesetzt. Anti-inflammatorische Signale können gesendet und die Homöostase wieder hergestellt werden. Ach kann zudem prinzipiell nicht nur von Nerven, sondern auch von Immunzellen selbst produziert werden (Wessler et al. 2003/2008). Auch in der Synovia von RA-Patienten konnten Ach-produzierende Zellen nachgewiesen werden (Grimsholm et al. 2008), welche den Anstoß für anti-entzündliche Signale zum ZNS geben könnten. Zusammengefasst wird die Funktion des Parasympathikus als der *cholinerge anti-inflammatorische pathway* beschrieben (Pavlov 2003), (Tracey 2009), (Huston et al.2011).

## 1.2.2 Das sympathische Nervensystem

### 1.2.2.1 Anatomische und physiologische Links zum Immunsystem

Anatomische und physiologische Links zwischen Sympathikus und Immunsystem wurden in den letzten Jahren vielfach beschrieben (Review Kin et al. 2006): Sowohl primäre

(Rückenmark, Thymus), als auch sekundäre (Milz, Lymphknoten, MALT) Lymphorgane sind dicht von sympathischen Nervenfasern innerviert. Die Nervenenden bilden in diesen Geweben Kontakte mit den Lymphozyten, deren Entfernungen kürzer sind, als die in Synapsen (Felten et al. 1987). Auf Lymphozyten, Makrophagen/ Monozyten und Granulozyten in Lymphgeweben sowie auf Zellen im Blut und in Synovialflüssigkeit wurden adrenerge Rezeptoren identifiziert (Williams et al. 1976), (Baerwald et al. 1992). Prinzipiell gibt es zwei Subgruppen von Rezeptoren:  $\alpha$  1-3 auf Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, NK- Zellen usw.) und  $\beta$  1 und 2 auf Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems (auch B- und Th1-Zellen) (Nance und Sanders 2007). Sie besitzen je nach Lokalisation verschieden Affinitäten zu NA. Wird dem ZNS z.B. über Zytokine in der Blutbahn oder afferente Vagusfasern signalisiert, dass im Körper ein Entzündungsherd vorhanden ist, so wird der Sympathikus aktiviert und NA ausgeschüttet. Dieses kann nun immunmodulatorisch wirken, indem es die Zytokinproduktion seiner Effektorzelle beeinflusst (Viswanathan und Dhabhar 2005). Im gesunden Körper unterdrückt NA dabei prinzipiell die pro-inflammatorische Antwort der Th1-Zellen und sorgt für einen Shift hin zu den Th2-Zellen, welche anti-inflammatorische Zytokine produzieren. Dieser Shift ist bei RA gestört (Elenkov et al. 2000), (Bellinger et al. 2008). Die Wirkungen von NA sind allerdings nicht in jeder Situation identisch. Zum einen entscheidet die Dosis über den Effekt: in niedrigen Dosen ( $<10^{-7}$  mol/l im Serum) stimuliert NA über  $\alpha$ 2-Rezeptoren die Produktion des pro-inflammatorischen TNF- $\alpha$  und über  $\alpha$ 1-Rezeptoren Komplementproduktion aus Makrophagen. Erst in hohen Dosen kann NA an  $\alpha$ -und  $\beta$ -Rezeptoren angreifen, wirkt dann anti-inflammatorisch und hemmt v.a. über  $\beta$ 2-Rezeptoren z.B. die TNF- $\alpha$ -Produktion durch Makrophagen (Cutolo et al. 2006), (Bellinger et al. 2008). Neben der Dosis entscheidet auch die aktuelle Aktivität der Effektorzelle, seine spezifische Rezeptorbesetzung, sowie das umgebende aktuelle Mileau aus Zytokinen und Co-Peptiden wie Neuropeotid Y über die endgültige Wirkung der Katecholamine (Koopman und Stoof 2011). Vereinfacht gesagt wirken also erst hohe Dosen von Katecholaminen in einer Umgebung mit ausreichend  $\beta$ -Rezeptoren und den entsprechenden Zytokinen und Co-Peptiden anti-inflammatorisch.

Eine im Vergleich zu Gesunden veränderte Grund-Aktivität des Sympathikus in Ruhe sowie in seiner Reaktion auf Stress könnte eventuell durch entsprechend höhere oder niedrigere Dosen von ausgeschütteten Katecholaminen eine pro-inflammatorische Reaktion des Immunsystems auf Stress bei RA-Patienten mitbedingen. Dabei sind auch die Verbindungsstellen zwischen ANS und Effektororganen von Bedeutung für die letztendlich erzielte Wirkung. Eine dieser Verbindungen stellen die  $\beta$ 2-adrenerge Rezeptoren ( $\beta$ 2ARs) dar. Diese befinden sich u.a. auf glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen, aber auch auf Immunzellen (Xu et al. 2005).

### 1.2.2.2 Die $\beta$ 2-adrenergen Rezeptoren

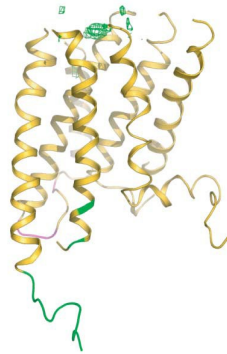


Abb.1: **Schematische Darstellung eines  $\beta$ 2AR**  
(Rasmussen SG 2007)

Seit der Entdeckung  $\beta$ 2ARs auf Immunzellen (Williams et al. 1976) sprechen zunehmende Hinweise für ihre Bedeutung für neuro-immunologische Interaktionen.

Zum einen kommen sie je nach Aktivations- und Entwicklungsstand der Zelle in unterschiedlichen Dichten vor. Dabei konnte eine negative Korrelation der Dichte mit löslichen IL-2-Rezeptoren im Blut von Patienten mit chronisch-entzündlichen Krankheiten gezeigt werden (Krause et al. 1992). Erniedrigte Zahlen von  $\beta$ 2ARs führen zu erhöhter Produktion von pro-inflammatorischem IL-6 sowie INF- $\gamma$  nach Stimulation von Immunzellen durch Katecholamine. Für RA-Patienten konnte eine solche verringerte Dichte der  $\beta$ 2ARs auf Immunzellen und Synovialzellen gezeigt werden, was den Shift zur für die RA primär anti-inflammatorischen Th2-Antwort verhindert (Baerwald et al. 1992), (Baerwald et al. 1997), (Wahle et al. 2005), (Bellinger et al. 2008).

Neben der Dichte könnten auch neuerdings in den Vordergrund getretene Gen-Polymorphismen der  $\beta$ 2ARs eine Rolle spielen. Vier von neun entdeckten Polymorphismen in der codierenden und 5'-regulativen Region des Gens auf Chromosom 5 q 31-32 führen zu veränderter Aminosäure-Sequenz, drei (AS 16, 27 und 164) zu veränderter Funktion des entstehenden Proteins (Green et al. 1995). Mittlerweile kennt man die Assoziation zwischen diesen Gen-Varianten und einer Reihe von Krankheiten, wie z.B. Myasthenia gravis (Xu et al. 2000), Asthma bronchiale (Ramsay et al. 1999), (Fu et al. 2011), Diabetes Mellitus Typ I (de Schouwenberg et al. 2008) oder arterieller Hypertonie (Lou et al. 2011). In Mastzellen der Lunge beeinflussen einzelne Polymorphismen die Desensitivierung der IgE-vermittelten Histaminfreisetzung nach Agonist-Stimulation des Rezeptors (Kay et al. 2003), (Chong et al. 2000). Die RA ist insgesamt eine Krankheit vor permissiven genetischen Hintergrund (Bax et al. 2011). Auch Gen-Polymorphismen der  $\beta$ 2ARs wurden bereits in wenigen Studien mit der RA assoziiert. In bisher zwei Studien wurde Arginin auf Codon 16 gehäuft beobachtet und

ging mit früherem Erkrankungsalter sowie erhöhter Assoziation zu arterieller Hypertonie einher (Malysheva et al. 2008), (Xu et al. 2005). Hier bedarf es noch weiterer Forschung. Die Vermutung liegt nahe, dass Rezeptor-Polymorphismen als Schnittstelle zwischen sympathischen Neurotransmittern und Immunzellen auch einen Zusammenhang zu Effekten des ANS auf Immunzellen haben könnten. Dies scheint auch deshalb wahrscheinlich, da die Forschung der letzten Jahre bereits mehrere für die RA bedeutende Dysregulationen von Schnittstellen zwischen ANS und Immunsystem zeigen konnte (Koopman und Stoof 2011), (Del Rey et al. 2010), (Baerwald et al. 2000). Z.B. kommt es sowohl in der Milz (Straub 2005), als auch im entzündeten Gelenk zum funktionellen Verlust sympathischer Nervenfasern. Dafür sind relativ mehr sensorische pro-inflammatorische Nervenfasern vorhanden (Miller et al. 2000). RA-Patienten haben weiter die erwähnte verringerte Dichte von  $\beta$ 2ARs. Statt der normalerweise überwiegenden  $\beta$ -Rezeptoren finden sich im Verlaufe der Erkrankung hauptsächlich  $\alpha$ -Rezeptoren auf Immunzellen. Es wird von einem *beta-to-alpha-shift* gesprochen (Straub und Härle 2005).

Dazu, ob auch  $\beta$ 2AR-Polymorphismen tatsächlich einen funktionellen Beitrag zur autonomen (Dys-) Funktion bei RA leisten, gibt es nach unserem Wissensstand bisher keine Arbeiten. Die vorliegende Arbeit geht daher dieser Frage nach, indem nach Zusammenhängen zwischen Polymorphismen und ANS-Aktivität (mittels Herzratenvariabilität gemessen über die letztendliche Wirkung am Effektororgan Herz) sowie der Krankheitsaktivität (als Effekt pro-inflammatorischer Aktivität des Immunsystems) gesucht wird.

## 1.3 Stress

### 1.3.1 Stress und Rheumatoide Arthritis

Mehrere retrospektive und prospektive Studien konnten klinisch eine Assoziation zwischen *minor stress* und der Krankheitsaktivität der RA zeigen. *Minor stress events* sind von kurzer Dauer (Minuten bis Tage) und umfassen z.B. Ärgernisse des täglichen Lebens, Stressoren von geringerer Intensität. Aus einem Review zu 27 Studien mit insgesamt 3000 Patienten ging hervor, dass *minor stress* die Entzündung negativ beeinflusst (Review bei Herrmann et al. 2000), (Straub et al. 2005). Zwei weitere prospektive Studien bestätigten den Zusammenhang zwischen mildem interpersonellem Stress in den Tagen vor der Studienuntersuchung und aktuell starker Krankheitsaktivität (Zautra et al. 1997). In einer longitudinalen Studie über fünf Jahre zeigten RA-Patienten mit höherem täglichen Stresslevel signifikant mehr Erosionen (Feigenbaum et al. 1979). Fünf Studien mit ca. 150



Patienten konnten diese Assoziation zwischen *minor stress* und Krankheitsschüben nicht nachweisen (Dekkers et al. 2001). Bezüglich *major stress* (von langer Dauer (Wochen bis Jahre) und/oder von starker Intensität, wie z.B. der Tod eines nahen Verwandten, Scheidung) gibt es weitaus weniger publizierte Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen (Cutolo et al. 2006).

Studien, welche den Einfluss von Stress auf das Immunsystem direkt untersuchten, zeigten eine erhöhte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6 durch periphere Blut-Leukozyten von RA-Patienten nach Stress durch Behandlung mit Noradrenalin (van der Rouse Voort et al. 2000). Auch im Blut von Patienten, die kurz vor einer Operation standen, wurden erhöhte IL-6 Spiegel gemessen (Hirano et al. 2001). Vermehrt interpersoneller Stress führte zu höheren Serumspiegeln an CD3 positiven Zellen und löslichen Rezeptoren des pro-inflammatorischen IL-2 bei RA-Patienten (Zautra et al. 1997). Eine andere Studie zeigte, dass Adrenalin-Infusion die Zahl zirkulierender IL-8 produzierender Monozyten erhöht (Kittner et al. 2002).

Zusammengefasst scheint Stress also die RA negativ zu beeinflussen. Die Mehrzahl der Studien spricht von einer pro-inflammatorischen Reaktion des Immunsystems als Reaktion auf *minor stress*. Wie das ANS Einfluss auf das IS ausüben kann, wurde bereits gezeigt. Welche Rolle spielt das ANS also bezüglich Stress? Was ist Stress?

### 1.3.2 Das ANS als Teil der Stressantwort

Der Körper überlebt durch die Fähigkeit zum Erhalt seiner Homöostase. Dieses Prinzip der Selbstregulation des Körpers zur Konstanthaltung seines inneren Mileaus wurde 1860 erstmals von Claude Bernard beschrieben. Walter Cannon prägte 1929 den Begriff. Hans Selye beschrieb dies 1930 bereits als „unspezifische Reaktion des Körpers auf jegliche Anforderung“, entlehnte den Begriff „Stress“ aus der Physik und prägte die Begriffe „stress response“ und „general adaption“ (Selye 1952), (Thomas 1998), (Stojanovich 2010). Neuere Betrachtungen definieren Stress in ähnlicher Weise als „bedrohte Homöostase“, auf die der Körper mit einem komplexen Repertoire verhaltensbezogener und physiologischer bzw. biochemischer Reaktionen des ZNS und peripherer adaptiver Mechanismen antwortet. Sind diese Reaktionen inadäquat, exzessiv und/oder verlängert, können sie persönliches Verhalten und Entwicklung sowie physiologische Funktionen wie Wachstum, Metabolismus, Kreislauf, Reproduktion oder auch die Immunantwort beeinträchtigen (Chrousos 1998), (Straub et al. 2005), (Elenkov et al. 2006). Ein Überschreiten der adaptiven Fähigkeiten birgt das erhöhte Risiko für die Entstehung einer Krankheit. Wann diese Kapazitäten zum Erhalt der Homöostase überschritten werden bzw. welchen Effekt Stress auf den individuellen Menschen hat, hängt von verschiedenen Faktoren, wie Dauer und Intensität (minor versus

major stress), individuellen Verarbeitungsmechanismen, Typ des Stresses (positiv empfundener versus negativ empfundener Stress) und der Intaktheit der somatischen Stressantwort ab (Malysheva et al. 2010), (Cutolo et al. 2006). Wie sieht eine solche intakte Stressantwort aus ?

Information über äußere Stressoren gelangen über Sinnesorgane, Informationen über innere Stressauslöser durch nervale und hämatogene Signale an das ZNS. Diese Signale müssen nun in periphere somatische Signale umgewandelt werden, damit diese wiederum Einfluss auf verschiedene Organe und damit auf für die Homöostase entscheidende Körperfunktionen nehmen können. Dazu gehören z.B. die Anpassung von Herzfrequenz, Blutgefäßtonus, Thermogenese, Energie-Metabolismus und auch der Aktivität des Immunsystems an die aktuelle Situation. Einen entscheidenden Schnittpunkt zwischen zentral und peripher bildet der Hypothalamus. Er liegt nahe beim limbischen System, wo die Bewertung von, über die Cortex aufgenommenen, psychologischen Stress in *Eu-* oder *Distress* stattfindet. Vom Hypothalamus freigesetztes Corticotropin releasing hormone (CRH), als eines der Haupteffektoren der Stressantwort, aktiviert gemeinsam mit Arginin Vasopressin über den sogenannten Locus coeruleus und verschiedene noradrenerge Zellgruppen im Hirnstamm und im Rückenmark den Sympathikus und damit die erste wichtige Achse der peripheren Stressverarbeitung. Die Neurotransmitter Noradrenalin und Adrenalin werden freigesetzt, verstärken und vermitteln die Wirkung des Sympathikus. Dabei wird auch das Nebennierenmark, dessen chromaffine Zellen anatomisch und embryologisch einem sympathischen Ganglion entsprechen, aktiviert und so zusätzlich Adrenalin freigesetzt. Der Parasympathikus steht dem Erhalt der Homöostase v.a. durch rückkoppelnde Signale zur Verfügung. Neben dem ANS gehören die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden(HHG)-Achse und die HHN-Achse zu den Vermittlern der peripheren *stress response*. Erstere führt zur Freisetzung von Östrogenen, die, vereinfacht gesagt, anti-inflammatorisch auf das Immunsystem wirken und damit durch Entzündung entstehendem Stress entgegenwirken können. Die HHN-Achse führt über CRH und ACTH zur Freisetzung von Cortisol und Glukokortikoiden, welche prinzipiell ebenfalls immunsuppressiv und entzündungshemmend wirken, Glykogenolyse der Muskeln sowie Glukoneogenese der Leber fördern und über einen negativen feedback-Mechanismus die Freisetzung weiterer Hormone aus Hypothalamus und Hypophyse hemmen. Die einzelnen Stressachsen sind dabei nicht isoliert voneinander zu betrachten, sondern stehen in enger Verbindung zueinander. So ist die HHN-Achse gemeinsam mit dem SNS in einen positiven feedback-Mechanismus involviert, woraus folgt, dass die Stimulation des einen Systems meist auch zur Stimulation des anderen führt. Dies ist für alle folgenden Kapitel dieser Arbeit zu beachten, in denen nur noch das ANS im Vordergrund stehen wird. Schließlich werden die Effekte auf die für die

Homöostase entscheidenden Körperfunktionen über Mediatoren (v.a Neurotransmitter, Hormone, Zytokine) wieder dem ZNS zurückgemeldet, dort erneut im Zusammenhang zur aktuellen Situation bewertet und angepasst, um überschießende Körperreaktionen zu verhindern. Im gesunden Körper tritt so nach einer akuten Stresssituation eine schnelle Normalisierung der Homöostase ein (Elenkov et al. 2000), Reviews bei: (Charmandari et al. 2005), (Elenkov et al. 2006), (Crousos 2009). Abbildung 2 fasst dies nocheinmal zusammen.

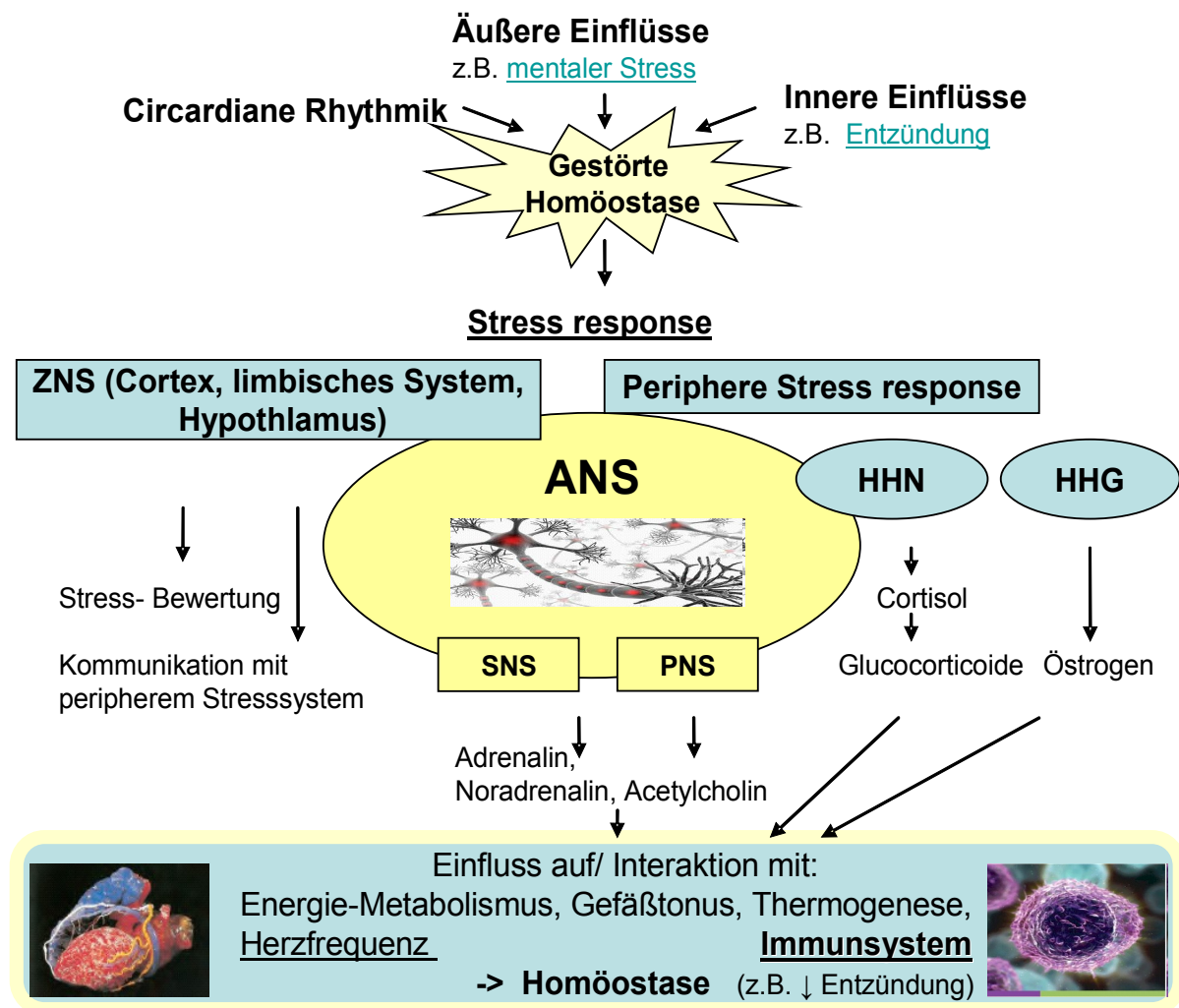


Abb.2: Vereinfachte Darstellung der normalen *stress response*.

Durch innere und äußere Faktoren wird die Homöostase gestört. Der Körper reagiert mit einer komplexen Stressantwort aus zentralen und peripheren Anteilen. Die *störenden Reize* werden im ZNS bewertet und Signale an die peripheren Anteile der *stress response* (autonomes Nervensystem (ANS), Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden(HHN)-Achse und Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden (HHG)-Achse) gesendet. Über Neurotransmitter und Hormone werden schließlich Signale an Effektorsysteme gesendet, die verschiedene Körperfunktionen (u.a. das Immunsystem) der Stresssituation anpassen und letztendlich die Homöostase wieder herstellen. (Charmandari et al. 2005), (Elenkov et al. 2006), (Crousos 2009), (Thieme 1999), (medizin-aspekte), (Gumpert- Anatomie)

Wie bereits in 1.3.1. beschrieben, scheint Stress auf die RA jedoch einen pro-inflammatorischen Effekt zu haben. Rein hypothetisch scheint auf Stress demnach keine adäquate Wiederherstellung der Homöostase in der Weise, wie es bei einer gesunden Stressreaktion zu erwarten wäre, zu erfolgen. Entsprechend der anfänglich genannten Definition scheinen die adaptiven Fähigkeiten dieser Patienten überschritten. Eine denkbare Ursache dafür wäre: die somatische Stressantwort ist nicht intakt bzw. verändert. Das ANS ist hierbei von besonderem Interesse, da es zum einen ein bedeutender Vermittler der somatischen Stressantwort ist und zum anderen, wie in 1.2. gezeigt, die Möglichkeit hat, direkt auf das IS einzuwirken. Bisherige Studien konnten zeigen, dass Störungen im Zusammenspiel von HHN-Achse, ANS und Immunsystem für die Pathogenese der RA von großer Bedeutung sind, wobei v.a. bezüglich der genauen Rolle des ANS noch Vieles genauerer Erforschung bedarf (Wahle et al. 2002) (Cutolo et al. 2006), (Elenkov et al. 2006), (Del Rey et al. 2010), (McCray und Agarwal 2011). Das Ziel dieser Arbeit ist es daher, das ANS bei RA-Patienten in seiner Funktion in Ruhe sowie unter Stresseinwirkung genauer zu verstehen:

## 1.4 Zielsetzung und Fragestellung

Aus den dargestellten Hintergründen ergeben sich zusammenfassend für die vorliegende Arbeit folgende Überlegungen und Fragestellungen:

1. Bei Ätiologie und Pathogenese der RA handelt es sich um ein multifaktorielles Geschehen. Neben dem Immunsystem spielt u.a. auch das ANS eine Rolle. Beide stehen in engem anatomischen und funktionellen Zusammenhang. Das ANS ist weiterhin ein Hauptvermittler der somatischen Stressantwort und Stress hat negativen Einfluss auf die Autoimmunerkrankung RA. Es gibt vermehrt Hinweise für gestörte Kommunikation zwischen ANS und Immunsystem. Die Erkenntnisse darüber sind aber noch lückenhaft. Es besteht daher die These, dass eine autonome Dysregulation in Ruhe sowie als Reaktion auf Stress besteht, welche den Krankheitsverlauf der RA sowie Auswirkungen von Stress auf die Krankheit mitbestimmen könnte. In der vorliegenden Arbeit wird daher der Frage nachgegangen:

**Haben Patienten mit RA autonome Regulationsstörungen? Dabei soll die Aktivität des ANS in Ruhe und unter minor stress untersucht werden.**

2. Einen Teil des ANS, und gleichzeitig Schnittstelle zum Immunsystem, stellen  $\beta$ 2ARs dar. Es gibt Hinweise für deren Bedeutung für die Modulation von Effekten des ANS, bzw. der Katecholamine, auf das Immunsystem im Allgemeinen. Speziell für die RA ist aber diesbezüglich noch sehr wenig bekannt. Es werden daher die Fragen gestellt:

**Gibt es bei Patienten mit RA im Vergleich zu Kontrollen unterschiedliche  $\beta$ 2AR-Gen-Polymorphismen? Und:**

**Gibt es bei der RA einen Zusammenhang zwischen autonomer Regulation bzw. Stressantwort und Rezeptor-Polymorphismen?**

3. Sollten eine veränderte autonome Aktivität sowie mit der RA assoziierte Polymorphismen der  $\beta$ 2AR nachweisbar sein, stellt sich schließlich die Frage nach der klinischen Relevanz dessen. Es wird daher jeweils untersucht:

**Gibt es einen Zusammenhang zwischen klinischen Daten und autonomer Aktivität bzw.  $\beta$ 2AR-Polymorphismen bei RA-Patienten?**

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit ist es, die Aktivität des autonomen Nervensystems in Ruhe und unter Stresseinwirkung sowie die  $\beta$ 2ARs, als Teil des ANS, bei RA-Patienten genauer zu charakterisieren.

## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Studiendesign

Die vorliegende Untersuchung wurde als prospektive, kontrollierte, monozentrische Studie durchgeführt.

Im Längsschnitt sollten Ergebnisse einer Herzratenvariabilitätsmessung (HRV) bei Patienten mit RA in Ruhe mit denen unter definierten Stressbedingungen verglichen werden.

In einer Querschnittuntersuchung sollten die mittels HRV- und sympathetic skin response (SSR)-Test ermittelten Ergebnisse zur Funktionsweise des ANS sowie die mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) und Gelelektrophorese untersuchten Polymorphismen des Gens für  $\beta$ 2ARs mit den Daten von Osteoarthritis (OA)-Patienten verglichen werden.

Um nähere Einblicke in die Funktion des ANS bei Patienten mit RA zu erhalten, sollte des Weiteren untersucht werden, ob eventuelle Dysfunktionen im Zusammenhang mit pro-inflammatorischen Auswirkungen auf die Krankheit stehen könnten. Dazu wurden die RA-Patienten in Untergruppen unterteilt. Es wurde nach Zusammenhängen zwischen den neurologischen und klinischen Daten gesucht, welche die individuelle Krankheitsaktivität charakterisieren (z.B. Entzündungswerte).

Wenn sich zwischen Patienten- und Kontrollgruppe ein vermuteter Unterschied im Genbereich der  $\beta$ 2AR ergeben würde, sollte weiter gezielt nach Zusammenhängen zu den neurologischen Messwerten und der damit verbundenen Verknüpfung von ANS und Immunsystem gesucht werden.

## 2.2 Verzeichnis der verwendeten Materialien und das Untersuchungskollektiv

### 2.2.1 Materialien und Geräte im Labor

#### 2.2.1.1 Laborgeräte

Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Gefrierschränke (-20°C)	Liebherr, Rostock
Gefrierschränke (-80°C)	Jouan, St. Herblain, Frankreich
Geldokumentationsgerät	Biozym Scientific GmbH, Oldenburg
Gel-Dryer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Inkubator	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach
Mikrowelle	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe
PCR-Gerät	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Stromversorgungsgeräte PowerPack300	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Tischwaage	Gottl.Kern und Sohn GmbH, Albstadt
Tischzentrifuge „Biofuge pico“	Kendro Laboratory Products, Osterode
Zentrifuge	Kendro Laboratory Products, Osterode

#### 2.2.1.2 Standardmaterialien

Handschuhe	Paul-Hartmann AG, Heidenheim
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (RNase-, DNase-frei)	Qiagen GmbH, Hilden
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Tubes MicroAmp®	Applied Biosystems, Foster City, USA
96-Well-Platte	Sarstedt Inc., Newton, USA

#### 2.2.1.3 Chemikalien und Lösungen für molekularbiologische und proteinbiochemische Methoden

Agarose (Biozym®LE Agarose)	Biotym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
AmpliTaQ® DNA Polymerase (250 Units, 5U/ µmol)	Applied Biosystems, New Jersey, USA
Aqua bidest für Molekularbiologie	Molekularwasser Eppendorf, Hamburg
Betaine Lösung (5M)	Sigma® Life Science Saint Louis, Missouri, USA

dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP; je 40µmol)	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck KG, Darmstadt
Ethanol	VWR International, Darmstadt
Gel Red Nucleid Acid Gel Stain	Biotium, Hayward
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich, München
Ladepuffer: Blue/ Orange 6x loading dye	Promega, Madison, Wisconsin, USA
Methanol	Merck KG, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Applied Biosystems, New Jersey, USA
Natriumacetat	Merck KG, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
PCR-Längenstandard	Promega, Madison, Wisconsin, USA
PCR-Puffer (10 x ohne MgCl <sub>2</sub> )	Applied Biosystems, New Jersey, USA
PCR-Primer:	Bio Tez, Berlin detailliert in „Durchführung der PCR“
Phenol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Salzsäure	Merck KG, Darmstadt
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Serva, Heidelberg

#### Lösungen:

##### Lysis-Puffer, pH 7,4

0,25 M Saccharose  
10 mM Tris- HCL pH 7,4  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
30 mM NaCl  
0,1 % Triton X-100

##### Proteinase K-Puffer

4mg Proteinase K in 4ml Suspensions-  
puffer

##### Sucrose-Puffer, pH 7,4

0,32 M Saccharose  
10 mM Tris  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 % Triton X-100



Suspensionspuffer, pH 8,0

10 mM Tris

2 mM EDTA

10 mM NaCl

TAE-Puffer 25x

121 g Tris

28,6 ml Eisessig

18,6 g Na<sub>2</sub>EDTA-2H<sub>2</sub>O

Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 8,5 eingestellt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

TE-Puffer

1,21 g Tris

0,37 g EDTA

Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 8,0 eingestellt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

## 2.2.2 Geräte in der neurologischen Ambulanz

Computerprogramm zur Auswertung der Viasys, Health Care, Excellence for Life, USA  
„sympathetic skin response“ (SSR)

Computerprogramm zur Auswertung der Proscicard III/ Version 2.2a, Medi-Systems  
Herzratenvariabilität (HRV): GmbH, Deutschland

## 2.2.3 Software zur Analyse und Auswertung von Daten

Excel®

Microsoft® GmbH, Unterschleißheim

GraphPad Prism

GraphPad Software, Inc, California, USA

OpenOffice.org Writer

Sun Microsystems, Inc., USA

Power Point

Microsoft® GmbH, Unterschleißheim

SigmaStat®

SPSS GmbH München

## 2.2.4 Untersuchungskollektiv

### 2.2.4.1 Patientenkollektiv

Als Patientenkollektiv dienen Patienten mit RA nach den Richtlinien des American College of Rheumatology (ACR) (Arnett et al. 1988), welche regelmäßig zu Kontrolluntersuchungen in der rheumatologischen Ambulanz der Inneren Klinik II/ Rheumatologie des Universitätsklinikums Leipzig erscheinen. Sie wurden ausführlich über Anlass, Inhalt, Umfang und Risiken der Studie informiert. Nach freiwilliger Entscheidung zur Teilnahme und Einverständniserklärung, sowie der Aufklärung darüber, dass die Studie jederzeit abgebrochen werden kann, wurden die Patienten durch den Ambulanzarzt ausführlich körperlich untersucht und auf folgende Ein- und Ausschlusskriterien hin geprüft bzw. über die Verhaltensregelungen für die Untersuchung aufgeklärt:

#### Einschlusskriterien:

1. Weibliche und männliche Patientin mit RA entsprechend der Diagnoserichtlinien des ACR von 1987 (Arnett et al. 1988):

#### **Diagnosekriterien des American College of Rheumatology:**

1. Morgensteifigkeit der Hände von mind. 1 h Dauer
2. Arthritis von 3 oder mehr Gelenkbereichen: Weichteilschwellung oder Erguss gleichzeitig an mindestens 3 Gelenkbereichen
3. Arthritis der Hand- oder Fingergelenke: Schmerzen + Schwellung von Handwurzelgelenken, proximalen Interphalangealgelenken oder Metacarpophalangealgelenken
4. Symmetrische Arthritis: gleichzeitiger Befall desselben Gelenkbereiches beider Körperhälften
5. Rheumaknoten: Subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder Extensorflächen oder im juxtaartikulären Bereich
6. Nachweis von Rheumafaktoren im Serum
7. Typische Röntgenveränderungen der Hände: Gelenknahe Osteoporose und/oder Erosionen

Ein Patient hat eine RA, wenn er 4 von 7 Kriterien erfüllt. Kriterien 1- 4 Müssen für mindestens 6 Wochen vorliegen.

2. Keine Einnahme von trizyklischen Antidepressiva
3. Die Behandlung mit Benzodiazepinen vor den Untersuchungen wurde erlaubt, wenn ein Verzicht innerhalb der letzten 24 Stunden vor Beginn der Ausgangsuntersuchung eingehalten wurde.
4. Rauchverbot für 3 Stunden vor den Untersuchungen
5. Durchführung der Untersuchungen zwischen 13.00 Uhr und 14.00 Uhr

Ausschlusskriterien:

1. Kardiovaskuläre Erkrankung, insbesondere Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen, langjährige Hypertonie, Herzklappenfehler oder kongenitale Herzfehler
2. Pulmonale Erkrankung, einhergehend mit chronisch obstruktiven oder restriktiven Funktionsstörungen
3. Endokrinologische Erkrankung, welche mit neurologischen Symptomen einhergeht
4. Psychiatrische Erkrankung, welche mit autonomen Regulationsstörungen einhergeht
5. Schwere Nieren- und Lebererkrankung, Leberzirrhose, aggressive oder chronisch persistierende Hepatitis, Urämie

Schließlich bildeten 112 Patienten mit RA das Patientenkollektiv. Ihr Alter lag zwischen 32 und 90 Jahren, im Mittel  $62,8 \pm 11,21$  Jahre. Es beteiligten sich 86 Frauen und 26 Männer.

**2.2.4.2 Kontrollkollektiv**

Das Kontrollkollektiv bildeten 48 Patienten mit Osteoarthrose. Die OA stellt ebenfalls eine Gelenkerkrankung mit verschieden ausgeprägter, sekundärer Entzündungskomponente dar. Da dieser Krankheit aber eine eindeutig andere Ätiologie zu Grunde liegt als der RA, erschien sie als Kontrollgruppe geeignet. Per definitionem ist die primäre OA eine *degenerative Erkrankung*, bei der eine ursächliche mechanische Über- oder Fehlbelastung zu Störungen führt, die primär die Chondrozyten betrifft. Pathogenetisch spielt zum einen ein *Chondrozytenschwund*, also eine numerische Atrophie des Gelenkknorpels durch Apoptose als Folge unphysiologischer Belastung eine Rolle. Zum anderen bilden die Chondrozyten im Rahmen einer *chondrozytären Chondrolyse* pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF- $\alpha$ , welche die Abgabe von Matrixmetalloproteinasen und schließlich den Abbau der für die Knorpel-*elastizität* entscheidenden Proteoglykane bewirken. Erst sekundär können Synovialitis oder subchondrale Knochenverdichtungen, als Zeichen der Reparatur kleiner Knochenerosionen, auftreten (Riede 2004). Die RA hingegen ist, wie einleitend erläutert, eine *entzündlich-zelluläre* Erkrankung, der primär eine abnorme humoral-zelluläre Immunantwort, eine *Autoimmun*-Krankheit zu Grunde liegt (Herold 2012).

Es wurden Patienten mit dem klinischen Bild der Fingerbeerarthrose in die Studie aufgenommen. Zugrunde lagen die ACR-Kriterien für Osteoarthrose der Hand (Altman et al. 1990):

**ACR- Kriterien für Osteoarthrose der Hand**

Schmerzen oder Steifigkeit der Hände und 3 oder 4 der folgenden Charakteristika:

1. Harte Verdickung von 2 oder mehr von 10 ausgewählten Gelenken (2 und 3 distales Interphalangealgelenk, 2. und 3. proximales Interphalangealgelenk, 1. Karpometakarpalgelenk von beiden Händen)
2. Harte Verdickung von 2 oder mehr distalen Interphalangealgelenken
3. Weniger als 3 geschwollene MCP-Gelenke
4. Deformierung von mind. einem der 10 ausgewählten Gelenke

Die in 2.3.3.1. genannten Ein- und Ausschlusskriterien sowie Verhaltensregeln für RA-Patienten galten auch für diese Gruppe. Das Kollektiv wurde hinsichtlich Geschlecht und Alter zum Patientenkollektiv gematcht. 40 Frauen und 8 Männer im Alter von 45 bis 86 Jahren, im Mittel  $62,9 \pm 9,2$  Jahre, wurden untersucht. Aufklärung und Einverständnisdokumentation erfolgten analog zum Patientenkollektiv.

**2.2.4.3 gesunde Kontrollen für die genetischen Untersuchungen**

Um eine bessere Aussagekraft durch ein größeres Untersuchungskollektiv zu erreichen, wurde für die genetischen Untersuchungen auf im Labor der Rheumatologischen Abteilung der Universitätsklinik gelagerte DNA-Proben von 305 weiteren, gesunden Kontrollen zurückgegriffen. Deren  $\beta$ -Rezeptor-Gen-Polymorphismen waren für eine frühere Untersuchung bereits bestimmt und in den Datenbanken gespeichert worden. Eine Einverständniserklärung lag auch hier jeweils vor.

**2.2.4.4 Ethik**

Das positive Votum der Ethikkommission (N 042/2005 vom 20.05.2005) lag vor Beginn der Untersuchungen vor.

## 2.3 Datenerhebung

### 2.3.1 Ablauf der Untersuchungen

Im Zeitraum von Oktober 2008 bis Oktober 2011 wurden potentiell für die Studie geeignete Patienten von den internistischen Ärzten der rheumatologischen Ambulanz auf Diagnose, Ein- und Ausschlusskriterien hin untersucht. Für die Studie geeignete und an der Teilnahme interessierte Patienten durchliefen folgende Stationen (Abb. 3):

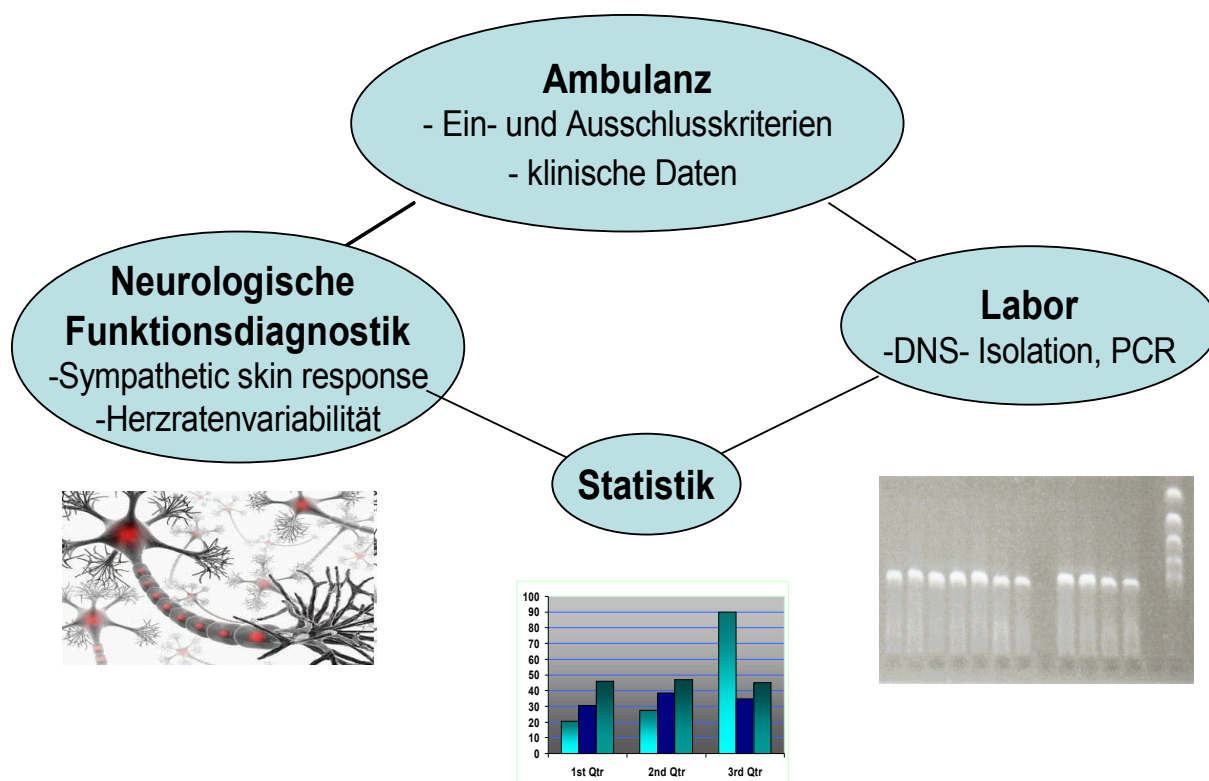


Abb. 3: **Ablauf der Datenerhebung**, Foto: Thiemes Innere Medizin, Thieme Verlag Stuttgart 1999

### 2.3.2 Ambulanz: Anamnese und klinische Daten

Von allen Patienten wurden die im Folgenden aufgeführten Daten ermittelt, um den Status der Krankheit beim einzelnen Patienten einschätzen und später im Zusammenhang zu genetischen und neurologischen Daten untersuchen zu können:

#### 2.3.2.1 klinische Tests zur Ermittlung der aktuellen Krankheitsaktivität

→ *Disease Activity Score (DAS 28)*

Der Disease Activity Score ist ein von der European League against rheumatism (EULAR) entwickeltes und validiertes System zur quantitativen Beurteilung der Krankheitsaktivität bei

RA. Es dient sowohl zur Patientenbetreuung, als auch zur Forschung. 1983 wurde das Verfahren als DAS 44 entwickelt, wobei 44 Gelenke die Grundlage der Beurteilung bildeten. Im weiterentwickelten Modell des auch in dieser Studie genutzten DAS 28 genügen 28 definierte Gelenke (van Prevoo et al. 1995). Folgende Punkte wurden erfasst:

- Anzahl druckschmerzhafter (0-28) sowie Anzahl geschwollener Gelenke (0-28)
- CRP („DAS-CRP“ reagiert schnell auf kurzfristige Veränderungen (Wells et al. 2009))
- Patientenurteil zur Krankheitsaktivität

Das Ergebnis bildete ein Punktwert von 0-10, wobei folgende Beurteilung erfolgte:

Tabelle 1: Bedeutung der Punktwerte des DAS für RA- Patienten

< 2,6	Remission
2,6- 3,2	Niedrige Krankheitsaktivität
> 3,2- 5,1	Mittlere Krankheitsaktivität
> 5,1	Hohe bis sehr hohe Krankheitsaktivität

Dabei erleichterte der standardisierte Erhebungsbogen von Herrn Dr. med. Emmerich/ Rheumaklinik Berlin-Buch die Datenerfassung.

→ *Health Assessment Questionnaire (HAQ)*

Der HAQ ist ein validierter Fragebogen zur Erfassung der Behinderung durch entzündlich-rheumatische Erkrankungen und dient der Messung der Funktionskapazität bei RA. Er wurde 1980 erstmals publiziert und seitdem in verschiedenen regionalen Varianten weiterentwickelt (Fries et al. 1980), (Pincus 1983), (Kirwan 1986).

Die Patienten bewerteten hierbei selbst, ob sie alltägliche Tätigkeiten ohne Schwierigkeiten, mit leichten Schwierigkeiten, mit großen Schwierigkeiten oder gar nicht ausführen können. Dabei wurden die Tätigkeitsbereiche Anziehen und Körperpflege, Aufstehen, Essen, Gehen, Hygiene, nach etwas greifen, Greifen und Öffnen, sowie andere Tätigkeiten (z.B. aus dem Auto aussteigen) erfragt. Den vier Schwierigkeitsgraden wurden Zahlenwerte zugeordnet. Aus den Mittelwerten des je Tätigkeit höchsten angegebenen Zahlenwertes errechnete sich der sogenannte HAQ-Behinderungsindex, welcher zwischen den Patienten, in Relation zum Median, verglichen wurde.

### 2.3.2.2 radiologischer Status

Das Röntgenstadium wurde nach dem 1974 von Larsen entwickelten, 1995 durch ihn und Scott modifizierten und von EULAR empfohlenen Larsen-Score ermittelt (Larsen 1975), (Larsen 1995), (Scott et al. 1995), (Tuulikki 2008). Es werden folgende Stadien unterschieden (um dem genauen radiologischen Wortlaut zu entsprechen, wurde auf eine deutsche Übersetzung verzichtet):

Tabelle 2: D.L. Scott's Modifikationen zu Larsens Scoring System (Scott et al. 1995)

Grade I	a- Only score 1 for periarticular osteoporosis/ joint swelling if these are major features b- if suggested erosions/ cysts at two sites in joint are less than 1 mm, score 1
Grade II	Score 2 if one ore more erosions greater than 1 mm are present with a break in the cortical margin
Grade III	Score 3 if erosions at both sides of joint are of significant size with preservation of some joint surface
Grade IV	Score 4 if subluxation is present

### 2.3.2.3 Laborwerte

Es wurden von allen Patienten Anti-CCP-AK, RF sowie CRP erfasst.

### 2.3.2.4 aktuelle Therapie

Außerdem wurde dokumentiert, ob die Patienten aktuell mit low dose Prednisolon, mit disease modifying anti rheumatic drugs (DMARDs) und/ oder Anti-TNF-Therapie behandelt wurden.

## 2.3.3 Labor: genetische Daten

Von allen Patienten wurden die Gen-Polymorphismen der  $\beta$ 2ARs ermittelt.

### 2.3.3.1 DNA-Isolation

Mittels eines standardisierten Vitamin-K-Verdau, sowie der etablierten Phenol-Chloroform-Methode wurde genomische DNA aus EDTA-Blut-Leukozyten extrahiert. Die gewählte Methode ist über lange Jahre im rheumatologischen Labor der Universität als zuverlässig

erprobt.

Aus Monovetten mit 10 ml EDTA-Blut wurden in einem ersten Schritt die Leukozyten isoliert, um die Zellkern- und damit DNA-losen Erythrozyten und andere störende Elemente, wie z.B. Häm, was die PCR-Reaktion hemmen kann, zu entfernen.

Dazu wurde das Blut in der Monovette mit Sucrose-Puffer (0,32 M Saccharose, 10 mM Tris-HCL pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 % Triton X-100, Aqua dest.) vermischt, bei 2100 Umdrehungen/Min für 10 Min bei 4 °C zentrifugiert, anschließend der Überstand verworfen, das verbleibende Sediment erneut mit Sucrose-Puffer resuspendiert und vermischt und wieder bei gleichen Einstellungen zentrifugiert. Gleiches (Überstand, Puffer, Zentrifuge) anschließend noch einmal. Nach der dritten Zentrifugation wurde das überbleibende Sediment nun in Lysis-Puffer (0,25 M Saccharose, 10mM Tris-HCL pH 7,4, 2mM CaCl<sub>2</sub>, 30 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, Aqua dest.) resuspendiert, die Monovette damit aufgefüllt und so für 10 Min im Kühlschrank inkubiert.

Danach wurde erneut bei 2100 Umdrehungen/Min und 4°C für 10 Min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment nun in 800 µl Suspensionspuffer (10 mM Tris-HCL pH 8,0, 2 mM EDTA pH 8,0, 10 mM NaCl, Aqua dest.) resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Proteinase-K-Lysispuffer (4mg Proteinase K plus 4 ml Suspensionspuffer) hinzugegeben und alles über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Schließlich wurde die DNA mit klassischer Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt. Dafür wurden 0,5 ml 5 M NaCl- Lösung zur DNA-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurde 2-3 Mal folgender Ablauf wiederholt: 1 ml Phenol wurde hinzugegeben, bis eine weiße milchige Flüssigkeit entstand, unter Schütteln 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend bei 4000-4800 Umdrehungen/Min für 10 Min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde, unter Vermeidung der weißen Interphase, in ein neues Gefäß übernommen.

Zur Konzentration der DNA, sowie um noch störende Salze und Reste von Phenol und anderen organischen Lösungsmitteln zu entfernen, wurde die Alkoholfällung durchgeführt.

Zur Nukleinsäurelösung wurden 0,1 ml 3M Natriumacetat-Lösung, pH 5,2, (Endkonzentration in der DNA-Lösung 0,3 M) hinzugegeben und anschließend mit 2 ml absolutem Äthanol übergossen. Um die Ausbeute an DNA zu erhöhen, wurde Äthanol mit einer Temperatur von ca -30°C verwendet. Nach mehrmaligem vorsichtigen Kippen des Gefäßes bildete sich der DNA-Faden, ein *medusenartiges*, wolkiges Gebilde, das beim Kippen langsam kompakter wird. Der DNA-Faden wurde in ein steriles, mit 1 ml 80 % igem Äthanol gefülltes Eppendorfgefäß überführt, bei 7000 Umdrehungen/Min für 3 Min zentrifugiert, der Überstand verworfen und noch einmal zentrifugiert. Nachdem so auch letzte



Reste von Salz oder Phenol entfernt waren und der DNA-Faden weiß und deutlich kleiner zu sehen war, wurde die gesamte Flüssigkeit entfernt, das Sediment an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und abschließend in 200 µl TE-Puffer zur Lösung gebracht. Letzteres benötigt ca. 1-2 Tage Zeit. (Mühlhardt 2009).

### 2.3.3.2 PCR

→ *Das Prinzip*

PCR steht für *Polymerase Chain Reaction* und wurde 1987 vom späteren Nobel-Preisträger Kary B. Mullis entwickelt (Mullis 1987). Es ist ein Verfahren zur Amplifikation einer spezifischen Sequenz eines DNA-Doppelstranges.

Durch Erhitzen des Stranges auf 94°C wird dieser im ersten Schritt denaturiert. Schnelles Abkühlen auf z.B. 55°C verhindert im zweiten Schritt, dass sich die komplementären Stränge wieder aneinanderlagern können. Sie stehen nun als Matrize zur Verfügung. An die 3'-Enden der zu ihnen komplementären Sequenzen der Einzelstränge lagern sich bereits hinzugegebene, aus 15-25 Basen bestehende Oligonukleotide, sog. Primer, an. Die für diese Anlagerung, auch *annealing*, nötige Temperatur ist Primer-spezifisch. In einem dritten Schritt wird die Temperatur wieder auf 72 °C erhöht, um unspezifische Anlagerungen zu vermeiden. Diese Temperatur entspricht gleichzeitig dem Temperaturoptimum der sich ebenfalls in der Lösung befindlichen thermostabilen DNA-Polymerase-I (Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus*). Des Weiteren befinden sich Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) in der Lösung. Die Polymerase kann nun an den Primern ansetzen, von hier aus den Einzelstrang in 3'-5' Richtung ablesen und gleichzeitig aus den dNTPs einen komplementären Strang in 5'-3' Richtung synthetisieren. Durch Wiederholung der beschriebenen Zyklusschritte wird eine logarithmische Zunahme der DNA-Abschnitte erreicht: nach 25 Zyklen ist die Zielsequenz auf das etwa 10<sup>7</sup>-fache amplifiziert.

→ *Die Durchführung*

Die PCR und anschließende Gelelektrophorese dienten der Prüfung der drei Gen-Polymorphismen der β2ARs, welche zu einer Veränderung der daraus folgenden Aminosäure-Sequenz führen (auf Position bzw. Codon 16 → Nukleotid 46 → führt zu Arg oder Gly; Codon 27 → Nukleotid 79 → führt zu Gln oder Glu; Codon 164 → Nukleotid 491 → führt zu Thr oder Ileu). Dabei ging es ausschließlich darum, zu erkennen, ob diese Polymorphismen beim jeweiligen Patienten vorhanden sind oder nicht. Es wurden für jeden Polymorphismus eine Allel-spezifische PCR verwendet (Xu et al 2000), (Malysheva et al. 2008). Die jeweiligen Primer-Stammlösungen wurden 1:5 zu Gebrauchslösungen verdünnt und dann die folgende Mixtur angesetzt:

10 x PCR-Puffer →	2,5 µl
MgCl →	5 µl (mit Primer für Arg, Glu); 12 µl (Primer für Gly); 10 µl (Primer für Gln, Thr, Ileu)
dNTP →	4 µl
Aqua destillata →	27,7 µl (Primer für Arg, Glu); 20,7 µl (Primer für Gly); 22,7 µl (Primer für Gln, Thr, Ileu)
Betaine →	5 µl
sense-Primer →	1 µl
anti-sense-Primer →	1 µl
Taq-Polymerase →	0,1 µl

Die Taq-Polymerase wurde erst unmittelbar vor Verwendung der Mixtur hinzugegeben und dann alles gevortext. 1 µl der DNA wurde pro Well der PCR-Platte vorgelegt, 49 µl der Mixtur hinzu gegeben und der Ansatz gut gemischt. Die Module der PCR-Platte wurden mit ihren Deckeln verschlossen und in den Thermocycler gesetzt, wo sie unten beschriebene Schemata durchliefen. Bei allen Varianten startete die PCR-Reaktion mit 5 Min 94°C Denaturierung und endete mit 5 Min. 72°C Verlängerung. Die dazwischen geschalteten Zyklen wurden den Primern für die einzelnen Polymorphismen angepasst. Bis zur Entnahme waren 4°C eingestellt. Folgende Primerpaare und Temperaturzyklen fanden Anwendung:

#### a) Arg auf Codon 16

Das Primerpaar 5' – CTTCTTGCTGGCACCCAATA – 3' (sense) und 5'-CCAATTTAGGAGGATGTAACTTC – 3' (anti-sense) wurde verwendet. Es liefen 35 Temperaturzyklen mit je 45 Sek. 94°C, 45 Sek. 59°C und 1 Min. 72°C. Für Codon 16 war das generierte PCR-Produkt unter diesen Bedingungen 913 bp groß.

#### b) Gly auf Codon 16

Das Primerpaar aus 5' – CTTCTTGCTGGCACCCAATG – 3' (sense) und anti-sense wie bei Arg fand Anwendung. Es liefen 34 Zyklen mit je 45 Sek. 94°C, 45 Sek. 60°C und 1 Min. 72°C. Das PCR-Produkt war 913 bp groß.

#### c) Gln oder Glu auf Codon 27

Die Primerpaare waren 5' – GGACCACGACGTCACGCAGC – 3' (sense für Gln), bzw. 5' – GCACCACGACGTCACGCAGG – 3' (sense für Glu) und 5' – ACAATCCACACCATCAGAAT – 3' (anti-sense). Der initialen Denaturierung folgten 35 Zyklen mit je 30 Sek. 94°C, 45 Sek 62°C, 45 Sek. 72°C. Das generierte PCR-Produkt hatte eine molekulare Größe von 442 bp.

#### d) Thr oder Ileu auf Codon 164

Die Primerpaare 5' – TGGATTGTGTCAGGCCTTAC – 3' (sense für Thr), bzw.

5' – TGGATTGTGTCAGGCCTTAT – 3' ( sense für Ileu) und 5' – CACAGCAGTTTTCTTT – 3' (anti-sense) wurden verwendet. Die spezifische Temperaturlaufzeit beinhaltete 29 Zyklen mit je 30 Sek. 94°C, 45 Sek. 59°C, 45 Sek. 72°C. Das PCR-Produkt war 662 bp groß.

### 2.3.3.3 Gelelektrophorese

→ *Das Prinzip*

Die Gelelektrophorese ist eine Methode DNA-Fragmente zwischen 0,1 und 30 kb Länge voneinander zu trennen bzw. zu identifizieren. Das Prinzip beruht auf der Auftrennung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Das elektro-neutrale Agarosegel stellt das Trägermaterial dar. Aufgrund der negativen Ladung wandert die DNA in Richtung Kathode, wobei der Trennbereich der einzelnen DNA-Fragmente von der Porengröße und damit von der Konzentration des Agarosegels abhängig ist. Der Auftrennbereich linearer dsDNA liegt in einem 2%igen Gel zwischen 0,1 und 2 kb (Mühlhardt 2009).

→ *Die Durchführung*

Zur Herstellung des 2%igen Träger-Gels wurden zu 230 ml 1x TAE-Puffer, der mit Aqua dest. aus seiner 25-fachen Stammlösung hergestellt worden war, 4,6 g Agarose-Gel-Pulver hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 3 Min in der Mikrowelle gekocht, auf 60°C abgekühlt und unter Schwenken mit 5 µl GelRed versetzt. Dieser unter UV-Licht fluoreszierende Farbstoff diente der späteren Visualisierung der DNA-Moleküle. Das Gel wurde dann in eine Elektrophoresekammer gefüllt und abgekühlt. Durch vorheriges Einsetzen eines Taschen-Kammes und Entfernen störender Luftbläschen mit einer Pipettenspitze bildete sich ein glattes Gel mit Taschen für das PCR-Produkt. Nach dem Entfernen des Taschenkammes wurde die Elektrophoresekammer mit TAE-Puffer aufgefüllt bis das Gel bedeckt war. 15 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl Ladepuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Die erste Tasche wurde mit einem Marker plus Ladepuffer befüllt, um die Größe der später sichtbaren DNA-Fragmente zuordnen zu können. Bei 200 V und 400 mA wurde die Elektrophorese für 25 Min durchgeführt. Abschließend wurde die DNA auf dem Transilluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht und das Bild zur Dokumentation gespeichert und ausgedruckt.

## 2.3.4 Neurologische Daten

### 2.3.4.1 Sympathetic skin response (SSR)

→ *Das Prinzip*

Das Testen der sympathischen Hautantwort (SSR) stellt eine einfache, nicht-invasive, schnell

und mit gewöhnlichem neurologischen Equipment zu verwirklichende Methode dar, um die Funktion des ANS zu quantifizieren. Erstmals beschrieben wurde die SSR 1980 durch Tarchanoff (Tarchanoff 1980). Shahani et al. beschrieben 1984 die Anwendung in der klinischen Neurophysiologie (Shahani et al. 1984). Seither fand der Test u.a. Anwendung bei Patienten mit Hyperhidrose (Manca et al. 2000), peripheren Neuropathien (Shahani et al. 1984), Depression (Boettger et al.) und in bisher sehr wenigen Studien für die RA (Gozke et al. 2003). Verschiedene emotionale und sensorische Reize können beim gesunden Menschen das sympathisch-sudomotorische System aktivieren. Das Erfolgsorgan der sympathischen Fasern bilden die Schweißdrüsen, deren Stimulation zu einer vorübergehenden Potentialveränderung der Hautoberfläche und einer Verminderung des Hautwiderstandes führen. Die Latenzzeit dieser Hautantwort setzt sich dabei aus der reizabhängigen afferenten Leitungszeit, der zentralen Verarbeitungszeit und der efferenten Leitungszeit zusammen (Vetrugno et al. 2003).

→ *Die Durchführung*

Die Untersuchung erfolgte durch geschulte medizintechnische AssistentInnen der neurologischen Abteilung des Universitätsklinikums beim wachen, ruhig atmenden, liegenden Patienten. Da die SSR-Messung durch Störfaktoren beeinträchtigt werden kann (Vetrugno et al. 2003), wurden folgende Punkte beachtet: Die Raumtemperatur wurde konstant bei 21°C gehalten (Vetrugno et al. 2003). Um die Hauttemperatur der Hände über 29°C und die der Füße über 28°C zu sichern, wurden Hände und Füße durch Reiben mit Sandpapier aufgewärmt, was gleichzeitig der Absenkung des Hautwiderstandes diente (Fujimori et al. 1956). Um einer Beeinflussung durch circardiane Rhythmik (Brasil-Neto et al. 1998) entgegen zu wirken, fanden sich die Patienten ausschließlich zwischen 13 und 14 Uhr in der Funktionsabteilung ein. Nachdem der Patient 10 Min liegend zur Ruhe gekommen war, wurde er darüber aufgeklärt, bei den folgenden Reizen möglichst entspannt zu bleiben. Dann wurden die Patienten mehrmals unerwartet (um dem Störfaktor Habituation entgegen zu wirken) mit einem Stromimpuls von 15-30 mA über 0,2 ms an der Stirn gereizt und die Hautpotentiale der Hand- bzw. Fußinnenflächen, sowie den jeweiligen Außenseiten gemessen ( Abb. 4).

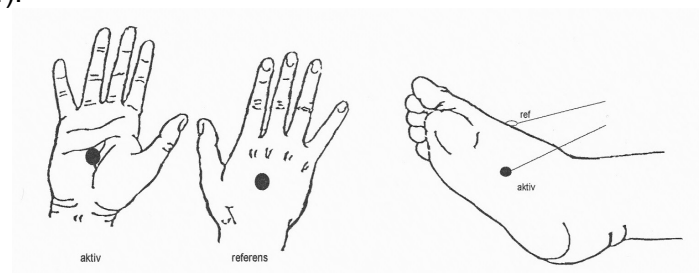


Abb. 4: **Ableitung der sympathischen Hautantwort (SSR) von Hand und Fuß**

Die Ergebnisse wurden dabei vom Computer-Programm *Synergy* von *Viasys, Health Care, Excellence for Life* aufgezeichnet, Potentiale mit der kürzesten Latenz und der höchsten Amplitude durch das Programm zur Beurteilung ausgewählt, zur Dokumentation gespeichert und ausgedruckt. Die Daten wurden später in eine Exceltabelle übertragen und bezüglich Vorhandensein der sympathischen Hautantwort, Latenzzeiten und Median der Amplitudenhöhen ausgewertet (Abb. 5).

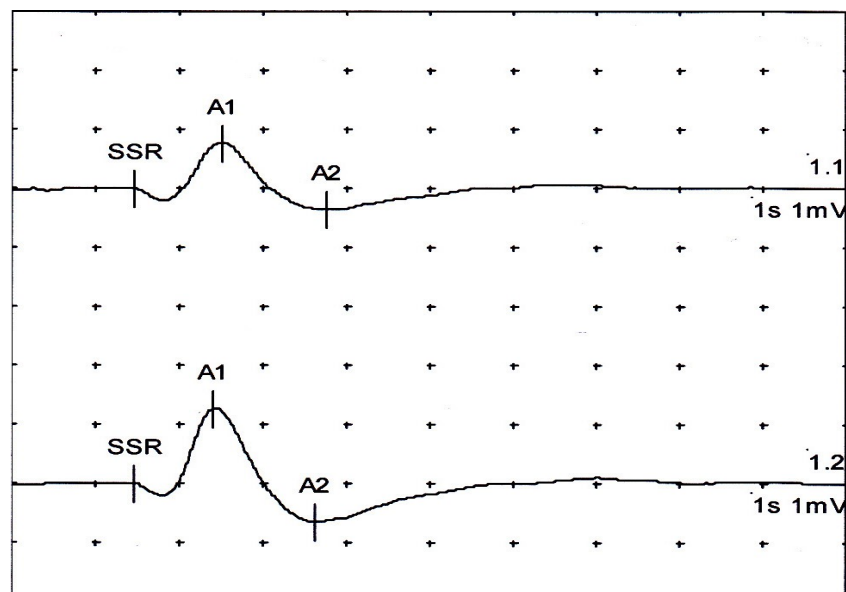


Abb. 5: **Sympathische Hautantwort der Hände**; oben: rechte Hand; unten: linke Hand. Der parallele Verlauf beider Potentiale spricht für normale Ergebnisse mit geringer Seitendifferenz; SSR= Latenzzeit; A1/A2= Max/ Min in den Amplituden; Länge der Latenzen, Median der Amplitudenhöhen und Seitendifferenzen wurden ausgewertet und mit Normwerten verglichen. Ausschlaggebendes Kriterium war die absolute Anwesenheit der Antwort. Fehlende Antworten sind pathologisch.

### 2.3.4.2 Herzratenvariabilität (HRV)

→ *Messmethoden und -werte*

Die Herzfrequenz unterliegt physiologischer Weise ständiger Variation durch verschiedene oszillierende Rhythmen. Mit Hilfe des ANS wird sie z.B. mit der Atemfrequenz synchronisiert (Zunahme der Herzfrequenz bei Inspiration, Abnahme bei Expiration= *respiratorische Sinusarrhythmie*) oder rhythmischen Fluktuationen der Blutdruckregulation angeglichen. Eine große Rolle spielt die Tag-Nacht-Rhythmik. Auch Sport und Emotionen können Einfluss haben. So entsteht ein von Schlag zu Schlag verändertes Zeitintervall, welches stets den zentralen und peripheren Anforderungen angepasst ist (Abb. 6).

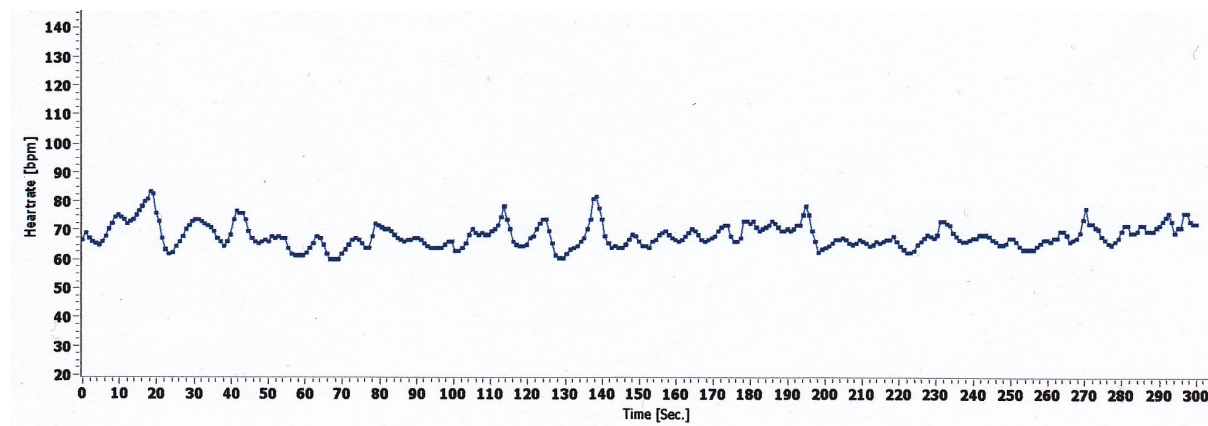


Abb.6: Dargestellt ist die **Variabilität der Herzfrequenz** [bpm= Schläge/ Minute] über die Zeit.

Seit der ersten groß angelegten Studie von Kleiger 1978 fand die Herzratenvariabilitäts-Analyse Eingang in die klinische Forschung (Kleiger et al. 1978). Heute gehört die moderne EKG- und Computer-gestützte HRV-Messung zur Routinediagnostik, wenn die Annahme einer autonomen Funktionsstörung besteht. Die HRV-Messung gilt als ein non-invasives, durch Festlegungen einer *Task Force* 1996 standardisiertes, validiertes und reproduzierbares Verfahren zur Messung autonomer Funktionsparameter mit hoher Sensitivität und Spezifität (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996). Studien an RA-Patienten sind allerdings noch selten.

Durch reine Frequenzmessung kann nicht zwischen sympathischen und parasympathischen Einflüssen auf das Herz unterschieden werden. Die Herzfrequenz könnte sowohl durch gesteigerte Sympathikus-, als auch durch erniedrigte Parasympathikus-Aktivität zunehmen (Akselrod et al. 1981), (Bigger et al. 1988). Die Besonderheit der modernen computergestützten Spektralanalyse der HRV-Messung ist daher, dass sie es über komplexe Rechnungen zur RR-Variabilität ermöglicht, sympathische und parasympathische Einflüsse auf das Herz getrennt voneinander darzustellen. Damit erlaubt sie differenzierte Einblicke in die Funktionsweise des ANS.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Herzaktivität entsprechend den Empfehlungen der *Task Force* (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996) über eine standardisierte Aufzeichnungslänge von fünf Minuten mittels 12-Kanal-EKG mit den Ableitungen nach Eindhoven und Goldberger aufgezeichnet. Zur Anwendung kam nach industriellen Standards kontrolliertes EKG-Equipment. Das Computerprogramm *Proscicard III/ Version 2.2a der Medi-Syst. GmbH, Germany* digitalisierte kontinuierlich das EKG, identifizierte die QRS-Komplexe nach den

Kriterien Steilheit, Anstiegszeit und Amplitudenhöhe und analysierte nach einer kurzen Lernphase die um Extrasystolen und andere Fehler bereinigte Variabilität der RR-Intervalle. Diese technisch automatisierte Kontrolle der RR-Intervalle gilt heutzutage als zuverlässig genug, um auf die in den Richtlinien der Task Force empfohlene manuell/ visuelle Kontrolle verzichten zu können (Nunan et al. 2010). Zur Analyse der Herzfrequenz, bzw. der aufgezeichneten RR-Intervalle und ihrer Variationen standen dem Programm folgende Messmethoden zur Verfügung, welche wiederum zur Berechnung verschiedener statistischer Größen genutzt wurden:

a) zeitbezogene Messungen, sog. *time domain*: Herzfrequenz und Intervalle zwischen benachbarten normalen R-Zacken werden über die Aufzeichnungszeit gemessen und als Funktion der Zeit ausgewertet. So konnten für die Studie verschiedene Variablen erfasst werden:

→ einfache, direkt aus den Zeitintervallen berechnete Werte, wie *mean RR-Intervall*, die mittlere Länge des Abstands von einer zur nächsten R-Zacke, also letztendlich die *mittlere Herzfrequenz*

→ statistisch berechnete Werte, wie

*RMSSD (square root of the mean of the squares of successive RR interval differences)*: Dieser Wert charakterisiert durchschnittliche Intervallveränderungen zwischen den einzelnen Schlägen und damit Kurzzeitkomponenten der HRV (Kleiger et al. 2005), (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996). Da die parasymphatische Nervenaktion schneller ist (<1 Sek.) als die sympathische (> 5 Sek.), repräsentieren diese von-Schlag-zu-Schlag-Veränderungen den parasymphatischen Schenkel. (Nunan et al. 2010). Die Berechnung erfolgt nach der Formel (Gundersen 1977):

$$RMSSD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^k [(R-R_{i+1}) - (R-R_i)]^2}{n}}$$

b) frequenzbezogene Messungen, sog. *spectral analysis*/ *frequency domain*: Sie wurden seit den 1960ern entwickelt und sind besonders für die Analyse von Kurzzeitmessungen mittels 5-Min-EKG geeignet (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996). Sie dienen der Quantifizierung zyklischer Fluktuationen der RR-Intervalle. In sog. *Power-Spectral-Density-Analysen* wird gemessen, wie sich die Power (Varianz) als Funktion der Frequenz verteilt. Zur Berechnung wurde in der vorliegenden Arbeit eine non-parametrische Methode verwendet. Mit Hilfe

dieser einfachen und schnellen *Fast Fourier Transformation* wurde das frequenzbezogene Gesamt-Powerspektrum erstellt, die Spektraldichte abgeleitet und die Integrale der folgenden drei Frequenzbänder berechnet.

→ *HF (high frequency)*: 0,15- 0,5 Hz.

Dieser Frequenzbereich spiegelt die respiratorische Sinusarrhythmie wieder, welche durch die efferenten Impulse auf den kardialen Vagus zustande kommen. Es konnte gezeigt werden, dass experimentelle Vagusstimulation HF-Power steigert (Malliani et al. 1991) Muscarinrezeptorblockade und Atropin löscht sie fast vollständig aus (Akselrod 1981), (Pomeranz et al. 1985). Somit lassen sich über die HF-Messung Aussagen zum parasympathischen Schenkel des ANS treffen.

→ *LF (low frequency)*: 0,04- 0,15 Hz

Zur Bedeutung der LF werden der überwiegende Einfluss des Sympathikus (Malliani et al. 1991),(Montano et al. 1994) sowie ein gemeinsamer Einfluss von Sympathikus und Parasympathikus diskutiert. Stehen senkt die HF, während es die LF erhöht. Beta-Blockade verhindert diesen Anstieg. Atropin aber beseitigt die LF-Spitzen. Es wird angenommen, dass die LF Power durch den Baroreflex aus einer Kombination von sympathischen und parasympathischen Efferenzen zum Sinusknoten beeinflusst wird (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996). In der klinischen Forschung gilt der Wert dennoch allgemein hin als Vertreter des Sympathikus (Kleiger et al. 2005).

→ *LF/HF-Ratio*

Dieser Quotient spiegelt die sympathisch-parasympathische Balance wieder (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996).

→ *VLF (very low frequency)*: 0,003- 0,04 Hz

Die Bedeutung dieser Frequenzen ist bisher nicht genügend geklärt. Es werden thermoregulatorische Steuerungsprozesse oder Einflüsse des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf den Sinusknoten in Betracht gezogen. Klinische Schlussfolgerungen sollten aber nicht aus diesen Werten gezogen werden (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology 1996).

Entsprechend den Empfehlungen der *Task Force* wurden alle Werte der Frequenz-Domäne in absoluten Werten und zusätzlich in *normalized units* (nu) nach der Beispielformel:

$LF\ nu = LF\ in\ Absolutwerten / (total\ power\ TP - VLF) * 100$  angegeben und ausgewertet.



Dadurch wurden störende VLF-Werte ausgeklammert und die Balance von SNS und PNS stärker betont (Task Force 1996), (Montano et al. 2009).

c) Geometrische Methoden: RR-Intervall-Serien werden geometrisch dargestellt, z.B. als mathematisch definierte Form des Dreiecks. Die Darstellungen werden zur Berechnung daraus hervorgehender Parameter und so zur Einschätzung der Variabilität mittels mathematischer Formeln genutzt. In dieser Studie kam folgender Wert zur Anwendung:

→ *HRV-triangular-Index*

Er bildet das Integral der Dichte-Verteilung aller RR-Intervalle geteilt durch das Maximum der Dichteverteilung. Damit wird die Gesamt-Herzratenvariabilität geschätzt und gleichzeitig der Einfluss abweichender RR-Intervalle minimiert. Ein erniedrigter HRV-Index gilt auch als starker Risikofaktor nach Herzinfarkt (Kleiger et al. 2005), (Farrell et al. 1991).

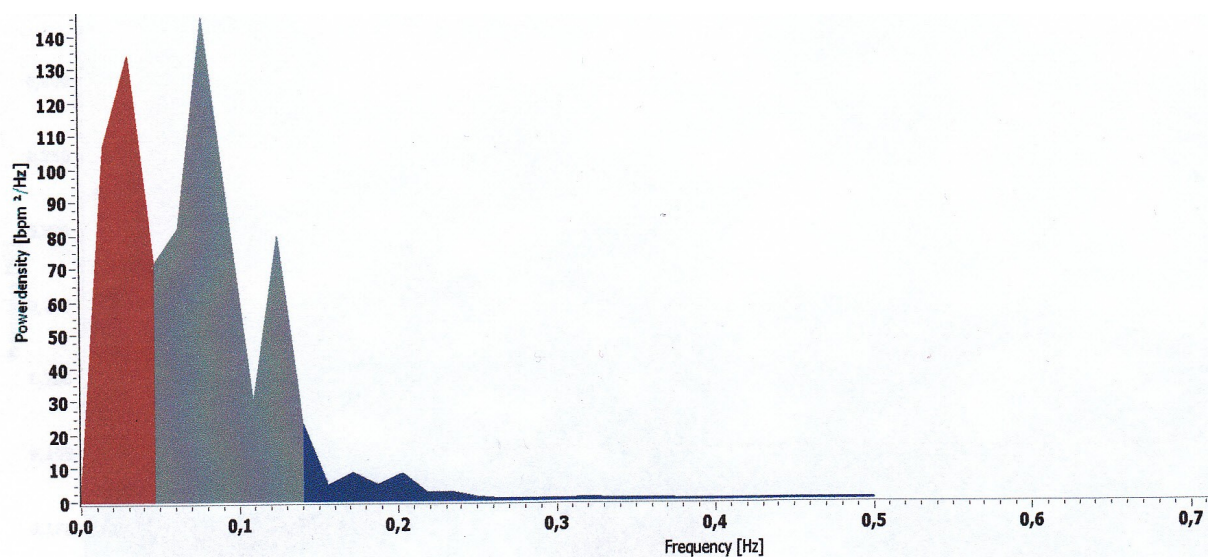


Abb. 7: **Exemplarische Darstellung eines HRV-Spektrums.** Very low frequency (rot), low frequency (grau) und high frequency (blau) können getrennt voneinander beurteilt werden.

→ *Die Durchführung*

Die HRV-Messungen wurden von geschulten medizintechnischen AssistentInnen der Neurologischen Funktionsabteilung des Universitätsklinikums Leipzig durchgeführt. Um die Messung beeinflussende Störfaktoren weitgehend auszuschließen, fand die Untersuchung unter standardisierten Bedingungen in einem klimatisierten und schallgeschützten Raum, sowie zwischen 13 und 14 Uhr, um Einflüssen durch die circadiane Rhythmik vorzubeugen, statt. Die Patienten durften vor der Untersuchung noch kein Mittagessen zu sich nehmen und

nicht rauchen. Zu Beginn der Untersuchung erhielten die Patienten eine Einführung und sollten nach Anlegen des EKGs in einer 10-minütigen Ruhephase liegend entspannen. Anschließend wurden sie aufgefordert weiter entspannt zu liegen, normal zu atmen, sich möglichst wenig zu bewegen, nicht zu sprechen und nicht einzuschlafen. Dann erfolgten in festgelegter Reihenfolge die Messungen: zunächst in Ruhe und anschließend während verschiedener Manöver zur Stimulation des ANS. Bereits durch die grundlegende HRV-Messung und die Unterscheidung einzelner Frequenzbereiche (siehe oben) ist es möglich, den Einfluss des Parasympathikus bzw des Sympathikus auf die gemessene Herzreaktion zu differenzieren. Durch die einzelnen Manöver sollte dann gezielt Stress auf einen der beiden Schenkel oder auf beide gemeinsam ausgeübt werden, um die Reaktion des ANS auf Stress für die beiden Anteile differenziert beurteilen zu können. Mentaler Stress diente dazu, den einleitend beschriebenen Einfluss von psychologischem Stress auf die RA zu untersuchen. Physische Tests, modifiziert nach der Testbatterie von Ewing und Clarke (Ewing et al. 1986), dienten zur zusätzlichen Charakterisierung des ANS.

- 1) Ruhemessungen: Unter völligen Ruhebedingungen wurde, wie auch während der folgenden Manöver, über fünf Minuten das EKG aufgezeichnet und oben genannte Werte erfasst.
- 2) Belastung durch mentalen Stress (MST: mentaler Stresstest): Die Patienten wurden in gleicher Position wie zuvor dazu aufgefordert, in Gedanken von 700 an in 5er-Schritten rückwärts zu zählen. Zur Kontrolle wurden Zwischenergebnisse erfragt. Damit wurde die komplexe Situation von psychischen Stress nachgeahmt. Eine Vielzahl von Studien haben gezeigt, dass der Test bei Gesunden zu einem Anstieg von Adrenalin und Noradrenalin (Rostrup et al. 1993), (Schöder 2000) sowie erhöhter Herzfrequenz führt, was für die vorrangige Aktivierung des Sympathikus spricht (Al'Absi et al. 1997),(Kelsey et al. 2000), (Kelsey et al. 1999).
- 3) Belastung durch Orthostase-Test (Ewing-Test): Die Patienten wurden aufgefordert, so schnell wie möglich aufzustehen. Anschließend wurden vom Computer 50 Herzschläge aufgezeichnet und ausgewertet. Die physiologische Reaktion bei Gesunden würde zu einem Anstieg der Herzfrequenz. mit Maximum um den 15. Schlag nach dem Aufstehen und anschließender *overshoot-Bradykardie* mit Tiefstwert um den 30. Schlag führen. Zur Auswertung des Testes wurde daher der Quotient aus maximalen RR-Intervall zwischen 21. und 45. Schlag (Bradykardie) und minimalem RR-Intervall zwischen 5. und 25. Schlag (Tachykardie), die sog. 30:15 Ratio, gebildet. ( $30:15 \text{ Ratio} = R - R_{\max} 21 \text{ bis } 45 / R - R_{\min} 5 \text{ bis } 25$ ). Eine Ratio < 1,5 gilt als pathologisch. Hauptmodulator hierbei ist der Nervus vagus (Ewing et al. 1982).

- 4) Belastung durch forcierte Respiration (DBT: deep breathing test): Mit Hilfe eines sich bewegenden Balkens auf dem Computer wurde den Patienten ein Rhythmus von 6 Atemzyklen pro Minute vorgegeben, der Frequenz, die zur höchsten Steigerung der parasympathischen Kontrolle und HRV führt (Mackay et al. 1983). Da die HRV während des DBT durch Atropin ausgelöscht, durch Propranolol aber nicht beeinflusst wird, sind die physiologischen Regulationsmechanismen durch den Parasympathikus gesteuert. Reduktion oder Verlust der HRV sprechen für eine vagale Fehlfunktion (Ewing et al. 1982). Es wurden zusätzlich zur Auswertung der *Herzfrequenz* und der *E:I-Ratio* (E:I-Ratio = maximales RR-Intervall während Expiration/minimales RR-Intervall während Inspiration), wie in der klassischen Ewing-Testbatterie, die *RMSSD* und der *HRV-Index* analog zu den Ruhemessungen sowie der *Variationskoeffizient* (VK= Standardabweichung von 150 artefaktfreien RR-Intervallen/durchschnittliche Länge der RR-Intervalle) (Morguet et al. 1981) und die *Mean Circular Resultant (MCR)* berechnet. Die Ermittlung Letzterer erfolgt mittels Vektoranalyse, wobei die Verteilung der RR-Intervalle jedes Atemzyklus auf einer kreisförmigen Zeitachse aufgetragen und ausgewertet wird (Weinberg und Pfeifer 1984).
- 5) Belastung durch Valsalva-Manöver: Der Patient wurde aufgefordert, so stark wie möglich gegen geschlossene Nase und Mund zu pressen und dies über eine vom Computer vorgegebene Zeit durchzuhalten. In der ersten Phase des Pressens steigt durch intrathorakalen und intraabdominalen Druck der Blutdruck, reflektorisch sinkt über parasympathische Aktivität die Herzfrequenz. In der zweiten Phase während des Pressens sinkt der Blutdruck bis zum Normwert, dann wird der Vagus gehemmt, der Sympathikus steigert langsam die Herzfrequenz. Direkt nach dem Pressen kommt es durch den mechanisch bedingten, plötzlichen Abfall des Blutdruckes zu reflektorischen, Barorezeptor-vermittelten starken Anstieg der Herzfrequenz. Schließlich steigt der Blutdruck über den ursprünglichen Ruhewert hinaus (*overshoot*). Der Parasympathikus reguliert dagegen, die Herzfrequenz sinkt wieder. Durch dieses Manöver lässt sich das feine Zusammenspiel zwischen beiden Schenkeln des ANS beobachten. Eine Fehlfunktion liegt vor, wenn der Blutdruck nach dem Pressen nicht sinkt und dann ohne „overshoot“ steigt oder sich die Herzfrequenz nicht verändert und damit die HRV sinkt (Ewing et al. 1982). Nach Levin wird zur Beurteilung der Valsalva-Quotient aus längstem RR-Intervall während der Bradykardie nach Entspannung vom Pressen und kürzestem RR-Intervall der Tachykardie beim Pressen berechnet:  $Valsava-Quotient = R-R_{max}/R-R_{min}$  (Levin AB. 1966).

Zur leichteren Nachvollziehbarkeit der Ergebnisse dieser Arbeit befindet sich im Anhang eine vereinfachte Auflistung der einzelnen neurologischen Werte und ihrer Bedeutungen.

## 2.4 Statistische Auswertung

Die Daten wurden mit Hilfe von *SPSS 15.0 für Windows* (SPSS Inc, Chicago, Illinois, USA) sowie *GraphPad Prism Version 5.02 für Windows* (GraphPad Software, San Diego, California, USA) analysiert.

Alle Variablen wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung geprüft. Nicht normalverteilte Werte der Frequenzdomäne der HRV-Messungen wurden für einige Untersuchungen logarithmisch transformiert.

Für die Untersuchung der HRV-Werte bei Patienten mit RA im Längsschnitt (Stress versus Ruhe) wurde der t-Tests für abhängige Variablen verwendet. Sobald mindestens ein Datenset nicht normalverteilt war, fand der Wilcoxon-Test Anwendung.

Um im Querschnitt SSR- und HRV-Werte zwischen Gruppen (RA versus OA) zu vergleichen, wurde der t-Test für ungepaarte Stichproben verwendet. Für nicht normalverteilte Daten wurde der Man-Whitney-U-Test genutzt. Zum Vergleich von HRV-Werten in Stresstests wurde zusätzlich eine logistische Regression mit der Diagnose als abhängiger Variable, dem HRV-Wert des Stresstests als unabhängige Variable, sowie dem Wert in Ruhe als Kovariate durchgeführt, um den Einfluss des Ausgangswert zu berücksichtigen. Außerdem wurden zur Veranschaulichung der Aktivierung des ANS im Verlauf von Ruhe zu Stress Differenzen zwischen Stress- und Ausgangswerten der HRV-Messungen zwischen RA und OA verglichen.

Für den Vergleich der Prävalenz von Polymorphismen der  $\beta$ 2-Rezeptoren oder quantitativer HRV-Daten zwischen Gruppen, wurden Chi-Quadrat bzw. Fisher's Exakter-Test für kategoriale Daten verwendet sowie Odds-Ratio und 95% Konfidenzintervalle für relatives Risiko berechnet.

Stärke und Richtung der Korrelation zwischen neurologischen und genetischen bzw. klinischen Daten wurden beim Untersuchen des Zusammenhangs zweier metrischer Daten mittels Spearman-Korrelation für nicht normalverteilte Daten sowie linearer Regressionsanalyse berechnet. Für die Beschreibung eines Zusammenhangs zwischen metrischen und binären Variablen (Risiko für Gruppenzugehörigkeit) wurde die logistische Regressionsanalyse durchgeführt. Zusätzlich fand eine multivariate logistische Regressionsanalyse für die Untersuchung des Zusammenhang neurologischer und klinischer Daten Anwendung. Mittelwertvergleiche zwischen mehreren Gruppen (Gruppen mit verschiedener Krankheitsaktivität oder verschiedenen Genpolymorphismen) wurden mittels ANOVA, bzw. Kruskal-Wallis-Test für nicht normalverteilte Werte durchgeführt.

Alle statistischen Tests galten auf einem Niveau von  $p = 0,05$  als signifikant.

## 3. Ergebnisse

### 3.1 Klinische Charakterisierung der Patienten

In Tabelle 3 sind die klinischen Daten der Patientengruppe zusammengefasst.

Tabelle 3: Klinische Charakterisierung der Patienten mit RA

	Patienten mit RA	
	n/ M $\pm$ SD	%
Weiblich	86	76,8
Männlich	26	23,2
Alter bei Untersuchung	62,8 $\pm$ 11,2	
Alter bei Beginn der Erkrankung	52,9 $\pm$ 11,5	
<b>Krankheitsaktivität/ Labor:</b>		
Röntgenstadium:		
0-II (ohne Erosionen)	36	35,3
II-IV (mit Erosionen)	76	64,7
Rheumafaktor positiv	78	75,7
Anti-CCP positiv	77	74,8
Seropositiv	90	84,9
CRP > 5	39	36,4
DAS < 2,6	24	27,3
DAS 2,6- 3,2	13	14,8
DAS 3,2- 5,1	41	46,6
DAS > 5,1	10	11,4
HAQ	1,47 $\pm$ 0,86	
<b>Medikation:</b>		
DMARD-Therapie	88	83
Methotrexat (MTX)	74	69,8
Leflunomid (Arava)/ + MTX	4/ 3	3,8/ 2,8
Sulfasalazin/ + MTX	2/ 2	1,9/ 1,9
Hydrochloroquin (Quensyl) + MTX	1	0,9
Azathioprin	2	1,9
Anti-TNF-Therapie	14	13,2
Adalimumab (Humira)	8	7,5
Etanercept (Enbrel)	5	4,7
Certolizumab Pegol (Cimzia)	1	0,9
Abatacept (Orencia)	1	0,9
MTX + Anti-TNF	11	10,4
Low dose Prednisolon (< 5 mg)	75	70,8

Die Gruppe setzte sich aus 76,8 % Frauen und 23,2 % Männern zusammen, was der für Frauen allgemein höheren Prävalenz der RA entspricht. 112 Patienten nahmen teil. Von einer Untergruppe mit 106 Patienten konnten Tests zur autonomen Funktion erfasst werden. Genetische Daten gab es von 101 Patienten. Die statistische Auswertung zum Zusammenhang aller Parameter erfolgte daher nur an der Gruppe mit beiden Daten. Das Alter der Gruppe war mit  $62,8 \pm 11,2$  Jahren verhältnismäßig hoch, was bei der Interpretation der neurologischen Messdaten beachtet werden musste. Das Alter bei Erstdiagnose lag bei  $52,9 \pm 11,5$  Jahren. Bei 12 Patienten befand sich die Krankheit im Anfangsstadium (Erstdiagnose innerhalb des letzten Jahres). 27,3% der Patienten befanden sich in Remission, alle anderen zeigten leichte bis schwere Krankheitsaktivität. Bis auf fünf Patienten nahmen alle ihre Basistherapie für RA weiterhin ein. Die klinischen Daten der Kontrollgruppe aus 48 Patienten mit Osteoarthrose sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Klinische Charakterisierung der Patienten mit OA

	Patienten mit OA	
	n/ M $\pm$ SD	%
Weiblich	40	83,3
Männlich	8	16,7
Alter bei Untersuchung	$62,9 \pm 9,2$	
Erosionen	7	14,6
CRP > 5	8	16,7

Von 43 Patienten konnten neurologische Daten, von 40 Patienten genetischen Daten erfasst werden. Die Patienten unterschieden sich weder im Alter, noch in der Verteilung des Geschlechts signifikant von der Gruppe mit RA. 16,7% der Patienten zeigen Hinweise auf einen aktuellen entzündlichen Prozess (CRP > 5). 14,5 % hatten Erosionen.

## 3.2 Charakterisierung des ANS

### 3.2.1 Aktivität des ANS in Ruhe

Zur Beurteilung der Grundaktivität des ANS wurden HRV-Messungen unter Ruhebedingungen im Liegen durchgeführt und zwischen RA und OA verglichen. Es zeigten sich folgende Befunde:

### Gesamtaktivität und Verhältnis SNS-PNS zueinander– bei RA überwiegt der Sympathikus im Verhältnis zum Parasympathikus

Die Gesamtaktivität des ANS (total power= TP) ist bei RA-Patienten niedriger. Die Herzratenvariabilität ist im Vergleich zu OA signifikant verringert, was ein Überwiegen der sympathischen bei im Verhältnis dazu niedriger parasympathischer Aktivität bedeutet. In der LF/HF-Ratio zeigt sich kein signifikanter Unterschied. Allerdings haben Patienten mit RA eine signifikant höhere Herzfrequenz unter Ruhebedingungen als OA-Patienten (Abb. 8).

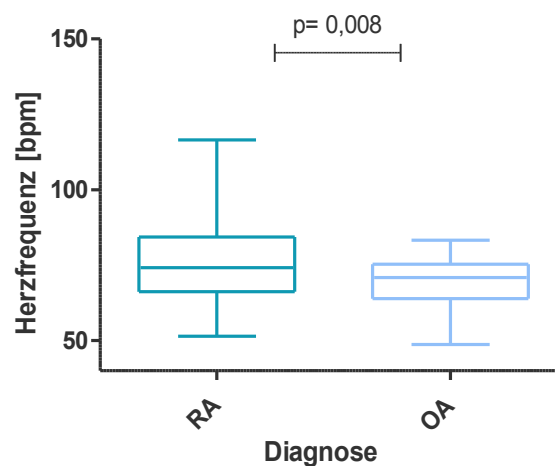


Abb. 8: Herzfrequenz unter Ruhebedingungen im Vergleich zwischen RA und OA

### Sympathikus– keine signifikant erhöhte absolute Aktivität

Die absolute Aktivität des SNS (LF) ist für RA nicht signifikant verschieden zu OA, die Aktivität des Sympathikus allein nicht signifikant höher.

### Parasympathikus– RA-Patienten haben eine niedrigere parasympathische Aktivität

Sowohl der Frequenzbereich der HF ist bei RA-Patienten niedriger, als auch die RMSSD signifikant kürzer. Der parasympathische Schenkel zeigt für RA eine signifikant erniedrigte Aktivität in Ruhe im Vergleich zu OA. (Abb. 9).

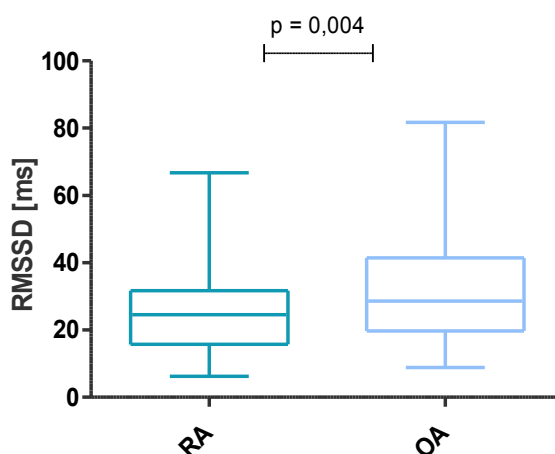


Abb.9: Mittelwerte der RMSSD (parasymphatische Aktivität in der HRV) im Vergleich zwischen RA und OA in Ruhe (logRMSSD = Logarithmus der RMSSD, ms = Millisekunden)

Im Folgenden sind die Ergebnisse zur Ruheuntersuchung nocheinmal zusammengefasst:

Tabelle 5: MW und SEM der HRV (qualitativ) RA versus OA in Ruhe

Parameter	RA (n = 106)	OA (n = 43)	p-Wert
<b><u>Gesamtaktivität,</u></b>			
<b><u>Verhältnis SNS/ PNS</u></b>			
Herzfrequenz	75,16 ± 1,34	69,07 ± 1,31	0,008
Total Power [bpm <sup>2</sup> ]	4,62 ± 0,54	7,80 ± 1,89	0,260
Log LF/HF	-0,14 ± 0,04	-0,13 ± 0,06	0,910
LF/HF nu	87,35 ± 11,54	72,89 ± 13,82	0,569
HRV- index	7,8 ± 0,32	9,05 ± 0,56	0,058
<b><u>Sympathikus</u></b>			
LogLF	-0,19 ± 0,05	-0,06 ± 0,09	0,207
LF nu	46,27 ± 3,82	43,70 ± 2,91	0,805
<b><u>Parasympathikus</u></b>			
Log HF	-0,05 ± 0,04	0,09 ± 0,08	0,096
HF nu	60,24 ± 3,70	57,99 ± 3,22	0,930
RMSSD [ms]	25,43 ± 1,21	33,13 ± 2,92	0,004

### 3.2.2 Aktivität des ANS unter Stressbelastung

Zur Beurteilung der Aktivität des ANS unter Stressbelastung wurden Stresstests durchgeführt, die entweder den Sympathikus (mental stress test = MST, Valsalva -> Balance



beider Schenkel) oder den Parasympathikus (tiefe Atmung = DBT; Orthostase = Ewing-Test) stimulieren sollten. Dabei reagiert keiner der beiden Schenkel ohne gleichzeitige Veränderung des Gegenspielers. Zunächst wurde im Längsschnitt beurteilt, wie sich die einzelnen Messwerte während der jeweiligen Stresssituationen im Vergleich zur Ruhe verändern (3.2.2.1). Anschließend wurde der Frage nachgegangen, ob die vorhandenen Reaktionen normal oder pathologisch sind (3.2.2.2). Schließlich wurden die Absolutwerte der Messergebnisse unter Stress zwischen RA und OA verglichen (3.2.2.3) und abschließend durch den Vergleich von Differenzen zwischen Ruhe- und Stresswerten gefragt: Wie unterscheiden sich die Reaktionen auf Stress ausgehend von der Ruhesituation zwischen beiden Gruppen genau (3.2.2.4)?

### **3.2.2.1 Ruhe versus Stress**

#### **mentale Stressbelastung im MST**

##### Gesamtaktivität und Verhältnis SNS zu PNS– Die Herzfrequenz steigt unter mentalem Stress

Die Gesamtaktivität (TP) steigt bei Patienten mit RA unter mentaler Stressbelastung im Vergleich zur Ruhe nicht signifikant. Die Herzfrequenz nimmt jedoch signifikant zu, was für ein Überwiegen des Sympathikus im Verhältnis zum Parasympathikus in der Situation von mentalem Stress spricht.

##### Sympathikus– keine signifikante Veränderung der LF unter mentalem Stress

Der LF-Aktivität allein verändert sich nicht signifikant.

##### Parasympathikus– die Aktivität sinkt unter mentalem Stress nur für OA signifikant

Die parasympathische Aktivität (RMSSD) sinkt in der Gruppe der RA-Patienten nicht signifikant im Vergleich zur Ruhe. Bei OA-Patienten hingegen sinkt die Aktivität interessanterweise signifikant ( $33,13 \pm 2,92$  vs.  $26,66 \pm 2,13$ ;  $p= 0,001$ ; Ergebnis nicht gesondert dargestellt).

#### **Sympathische und parasympathische Stimulation im Valsalva-Test**

Die HRV nimmt im Valsalva-Test signifikant zu.

#### **Parasympathikus-Stimulation im DBT sowie bei Orthostase im Ewing-Test**

##### Gesamtaktivität und Verhältnis zwischen SNS und PNS- die HRV steigt

Die Gesamt-Herzratenvariabilität steigt unter tiefer Atmung im Vergleich zur Ruhe signifikant,

was für eine überwiegende Parasympthikusaktivität nach Stimulation dieses Schenkels spricht. Im Ewing-Test zeigt sich eine entgegengesetzte Reaktion. Die Herzfrequenz ist im Vergleich zur Ruhe für RA signifikant erhöht, allerdings im DBT im Vergleich zum kurz davor durchgeführten MST deutlich gesunken.

#### Parasympthikus- die Aktivität steigt als Reaktion auf den DBT

Die Parasympthikus-Aktivität steigt unter Stimulation durch tiefe Atmung signifikant an (RMSSD).

Die Werte aller Stresstests sind In Tabelle 6 zusammengefasst.

Tabelle 6: Aktivität von SNS und PNS unter Stress im Vergleich zur Ruhe für RA (MW  $\pm$  SEM)

HRV- Parameter	<b>RA n = 106</b>		
	Ruhe	Stresstest	p-Wert
	<b><u>MST</u></b>		
Herzfrequenz	75,16 $\pm$ 1,34	79,84 $\pm$ 1,39	< 0,0001
TP [bpm <sup>2</sup> ]	4,66 $\pm$ 0,54	5,65 $\pm$ 0,62	0,152
LF [bpm <sup>2</sup> ]	1,40 $\pm$ 0,24	1,60 $\pm$ 0,19	0,199
RMSSD[ms]	25,43 $\pm$ 1,21	24,31 $\pm$ 1,38	0,352
	<b><u>Valsalva</u></b>		
HRV- Index	7,80 $\pm$ 0,32	8,95 $\pm$ 0,34	0,002
	<b><u>DBT</u></b>		
Herzfrequenz	75,16 $\pm$ 1,34	78,08 $\pm$ 1,35	< 0,0001
VK [%]	3,70 $\pm$ 0,15	6,95 $\pm$ 0,44	< 0,0001
RMSSD ms]	25,43 $\pm$ 1,21	34,91 $\pm$ 1,95	< 0,0001
HRV- Index	7,80 $\pm$ 0,32	10,43 $\pm$ 0,46	< 0,0001
	<b><u>Ewing-Test</u></b>		
HRV- Index	7,80 $\pm$ 0,32	6,08 $\pm$ 0,26	< 0,0001

### **3.2.2.2 quantitativer Vergleich– RA-Patienten zeigen signifikant häufiger pathologische HRV-Test-Ergebnisse**

Die Absolutwerte der HRV-Messungen wurden mit vom Proscicard-System vorgegebenen und mit den Werten von Ewing et al. übereinstimmenden Normwerten (Ewing DJ 1982) verglichen. So konnte eine Aussage getroffen werden, ob eine pathologische Reaktion des ANS unter der jeweiligen Bedingung vorliegt, oder nicht. Es wurde untersucht, ob sich ein Zusammenhang zwischen pathologischen Werten und der jeweiligen Diagnose (RA oder OA) finden lässt:

Signifikant mehr RA-Patienten zeigen pathologische HRV-Gesamt-Tests. Als pathologisch galt dabei, wenn mindestens zwei Untertests nicht der Norm entsprachen (Abb. 10).

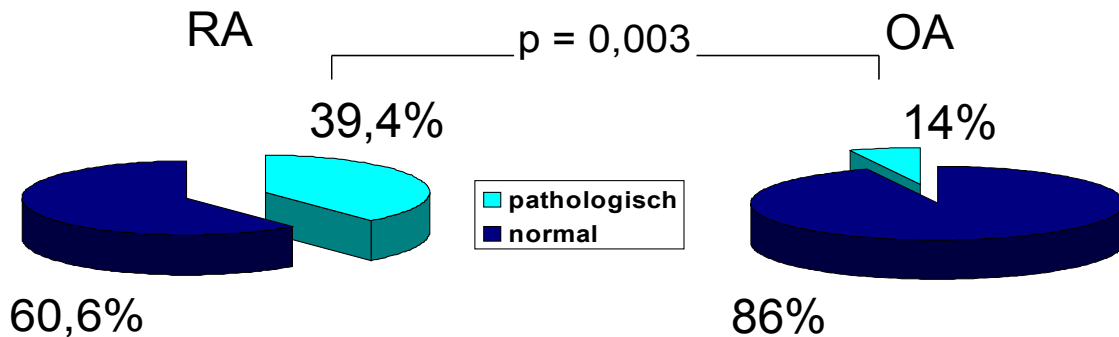


Abb. 10: Vergleich der Gesamt-HRV-Test-Ergebnisse zwischen RA- und OA-Patienten

Betrachtet man die Einzeltests, so sind bei RA der DBT sowie der Valsalva-Test signifikant häufiger pathologisch (Tabelle 7).

Tabelle 7: quantitative Daten der HRV-Messungen (Einzeltests Ruhe und Stress, sowie alle Tests in Zusammenschau = „HRV“); RA versus OA

Tests	pathologische Tests				OR	p-Wert
	RA		OA			
	n	%	n	%		
„HRV“	39	39,4	6	14	0,25 (0,1- 0,65)	0,003
Ruhe	4	4,1	1	2,3	0,57 (0,06- 5,22)	1,0
<b><u>Tests für Sympathikus</u></b>						
MST	6	6,1	2	4,7	0,76 (0,15- 3,91)	1,0
Valsalva-Test (PNS+SNS)	33	33,3	6	14	0,32 (0,12- 0,85)	0,024
<b><u>Tests für Parasympathikus</u></b>						
Ewing-Tests	26	26,3	6	14	0,46 (0,17- 1,2)	0,129
DBT	51	51,5	14	32,6	0,45 (0,21- 0,96)	0,045

### 3.2.2.3 qualitativer Vergleich der absoluten Werte unter Stressbelastung– v.a. die parasympathische Aktivität ist bei RA-Patienten niedriger

Die absoluten Werte der HRV-Messungen unter definierter Stressbelastung ergaben für RA-

Patienten folgende Aussagen (Tabelle 8):

Tabelle 8: MW und SEM der HRV-Werte (qualitativ) RA versus OA bei diversen Stresstests

Parameter	RA (n = 106)	OA (n = 43)	p-Wert
<b><u>Tests für Sympathikus</u></b>			
<b><u>MST</u></b>			
Herzfrequenz	79,84 ± 1,39	75,03 ± 1,47	0,044
Total Power [bpm <sup>2</sup> ]	5,65 ± 0,62	7,06 ± 1,58	0,902
LF	1,60 ± 0,19	2,28 ± 0,62	0,726
LF nu	45,55 ± 1,72	44,85 ± 2,96	0,657
HF	1,65 ± 0,21	2,41 ± 0,69	0,734
HF nu	54,31 ± 1,72	55,13 ± 2,96	0,626
LF/HF	1,10 ± 0,09	1,30 ± 0,30	0,648
LF/HF nu	85,88 ± 11,63	80,93 ± 20,01	0,570
RMSSD [ms]	24,32 ± 1,38	26,66 ± 2,12	0,361
HRV-Index	7,8 ± 0,33	8,83 ± 0,59	0,107
<b><u>Valsalva-Test (PNS+ANS)</u></b>			
Valsalva-Quotient	1,45 ± 0,04	1,48 ± 0,07	0,320
HRV-Index	8,95 ± 0,34	9,95 ± 0,48	0,060
<b><u>Test für Parasympathikus</u></b>			
<b><u>Ewing- Test</u></b>			
30.15-Ratio	1,18 ± 0,01	1,18 ± 0,02	0,578
HRV-Index	6,08 ± 0,26	6,69 ± 0,35	0,100
<b><u>DBT</u></b>			
Herzfrequenz	77,93 ± 1,35	72,92 ± 1,43	0,027
RMSSD [ms]	34,92 ± 1,95	42,99 ± 2,79	0,024
VK [%]	6,95 ± 0,44	8,68 ± 0,77	0,043
HRV-Index	10,43 ± 0,46	11,55 ± 0,7	0,194
E:I-Ratio	1,57 ± 0,05	2,25 ± 0,59	0,124
MCR	0,03 ± 0,002	0,04 ± 0,004	0,050

#### Gesamtaktivität und Herzratenvariabilität:

Die Gesamtaktivität (TP) des ANS ist für RA-Patienten während mentaler Stressbelastung tendenziell niedriger, aber nicht signifikant verschieden zu OA. Sowohl bei einem Test, welcher den Sympathikus stimuliert (MST), als auch bei einem Test zur Stimulation des Parasympathikus (DBT) ist die Herzfrequenz für RA signifikant höher als für OA (Abb.11). Im

Vergleich zu OA überwiegt der Sympathikus den Parasympathikus bei RA-Patienten also in beiden Situationen stärker, was sich auch in einer für RA verminderten HRV beim Valsalva-Test (Zusammenspiel PNS + SNS) zeigt.

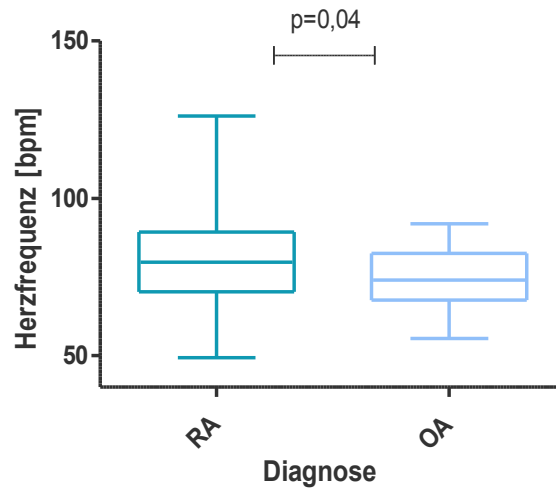


Abb.11: Herzfrequenz im MST, RA versus OA

#### Sympathikus (MST):

Trotz des stärkeren Überwiegens im Verhältnis zum Parasympathikus (siehe oben) ist die absolute sympathische Antwort auf mentale Stressbelastung (LF im MST) für RA-Patienten nicht signifikant verschieden zu OA (Abb. 12).

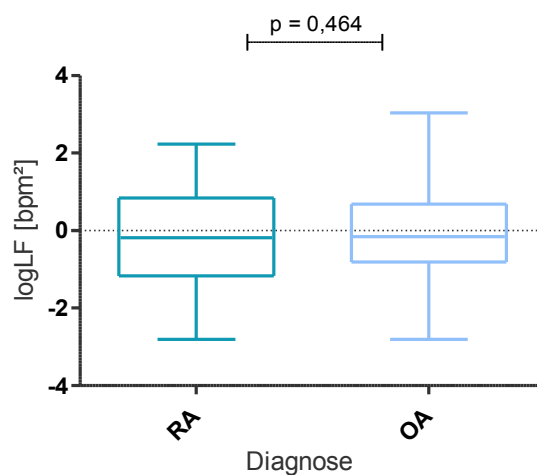


Abb.12: SNS- Aktivität (LF) unter Sympathikus-Stimulation im mentalen Stresstest (MST)

#### Parasympathikus (Ewing= Orthostasetest, Valsalva, DBT):

Unter Stressbelastung durch Stimulation des Parasympathikus bei tiefer Atmung (DBT) zeigt

sich eine signifikant kürzere RMSSD (Abb.13) sowie niedrigere MCR (Abb.14) für RA-Patienten im Vergleich zu OA. Der Parasympathikus der RA-Patienten reagiert auf Stimulation schwächer. Die Parasympathikus-Antwort auf Stress ist bei RA signifikant geringer. Ewing-Test und Valsalva-Quotient sind nicht unterschiedlich in den Gruppen.

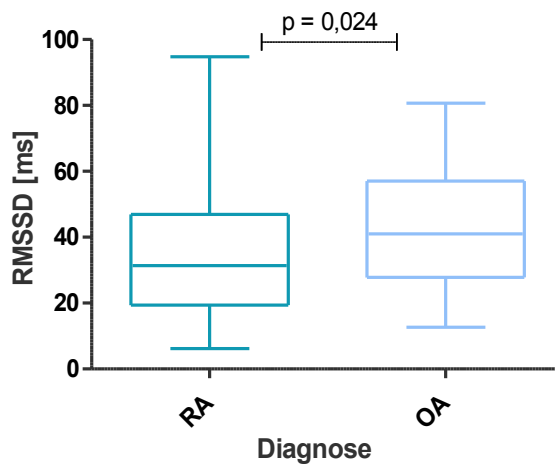


Abb. 13: **parasympathische Aktivität (RMSSD) unter Parasympathikus-Stimulation im DBT**

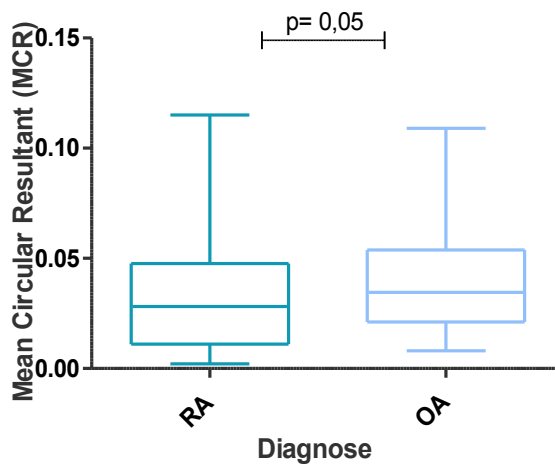


Abb.14: **Reaktion des Parasympathikus auf tiefe Atmung im DBT (MCR)**

Zusammenfassend ist die Aktivität des ANS von RA-Patienten im Vergleich zu OA demnach im Moment einer Stresseinwirkung häufiger pathologisch. Dabei ist v.a. die Parasympathikusaktivität in den jeweiligen Stresstests niedriger als bei OA.

Es stellte sich nun weiter die Frage: Wie unterscheidet sich die tatsächliche *Reaktion* des ANS auf Stress ausgehend von der Ruhesituation im Vergleich zwischen RA und OA?

Deshalb wurden im Folgenden Differenzen einzelner Parameter von Ruhe zu Stress [Differenz = Wert unter Stress – Wert in Ruhe] zwischen RA- und OA-Patienten verglichen, um Aussagen über die tatsächliche „Reaktion auf Stress“ treffen zu können.

### 3.2.2.4 Vergleich der Differenzen zwischen Stress und Ruhe– geringere Flexibilität in Reaktion auf Stress bei RA

Besonders die Aktivität des parasympathischen Gegenspielers (RMSSD) sinkt unter mentaler Stressbelastung in der Bewegung von Ruhe zu Stress bei RA-Patienten signifikant weniger als bei OA. Die Reaktivität des Parasympathikus ist geringer (Differenzen MST – Ruhe; RA vs OA:  $-1,12 \pm 1,19$  vs.  $-5,92 \pm 1,66$ ;  $p = 0,03$ ) (Abb. 15).

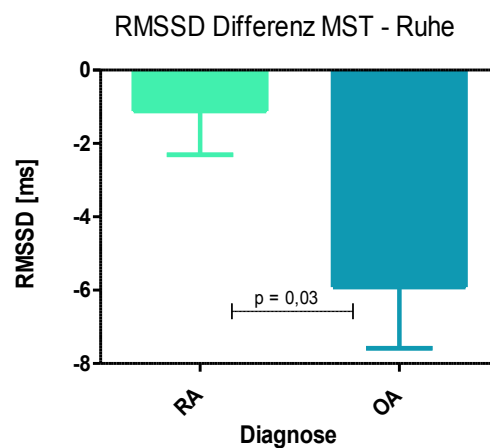


Abb. 15: Differenzen der parasympathischen Aktivität (RMSSD) zwischen Werten unter mentalem Stress und Ruhewerten.

Auch im DBT, unter Stimulation des Parasympathikus, verlängert sich die RMSSD bei RA-Patienten im Vergleich zur Ruhe etwas, jedoch nicht signifikant, weniger, als bei OA-Patienten (Differenzen DBT – Ruhe: RA vs OA  $9,52 \pm 1,68$  vs.  $10,42 \pm 2,68$ ;  $p = 0,24$ ).

Die Herzfrequenz, deren Ansteigen ein Überwiegen des Sympathikus anzeigt, ist unter mentaler Stressbelastung in ihren absoluten Werten zwar höher für RA-Patienten, steigt aber im Vergleich zur Ruhe tendenziell schwächer (n.s.) an, als bei der Gruppe der OA-Patienten (Differenzen MST – Ruhe; RA vs. OA:  $6,0 \pm 0,92$  vs.  $4,68 \pm 0,56$ ;  $p = 0,23$ ).

### 3.2.3 HRV und klinische Parameter

Um zu untersuchen, ob sich autonome Dysfunktionen in klinischen Symptomen widerspiegeln, wurde nach Zusammenhängen zwischen den ermittelten HRV-Daten und einzelnen klinischen Parametern, welche die Krankheitsaktivität der RA zum Untersuchungszeitpunkt charakterisieren, gesucht.

Der Vergleich der RA-Gruppen bezüglich des *disease activity scores (DAS)* ergibt signifikant unterschiedliche Werte für den LF/HF–Quotienten [nu] in Ruhe, wobei der Quotient mit steigenden DAS-Werten zunimmt, was einen Zusammenhang zwischen stärkerem Überwiegen des SNS in Ruhe mit hoher Krankheitsaktivität zeigt (Kruskal-Wallis-Test zwischen allen 4 DAS-Gruppen:  $p=0,023$ ; Man Whithney DAS 2,6 - 3,2 vs DAS > 5,1:  $66,33 \pm 13,03$  vs.  $102,80 \pm 27,76$ ;  $p=0,05$ ). Dieser Unterschied bleibt unter mentaler Stressbelastung im MST bestehen. (Kruskal-Wallis:  $p=0,007$ ; Man Whithney DAS 2,6 - 3,2 vs. DAS > 5,1:  $64,31 \pm 11,94$  vs.  $124,00 \pm 43,41$ ;  $p= 0,03$ ) (Abb. 16).

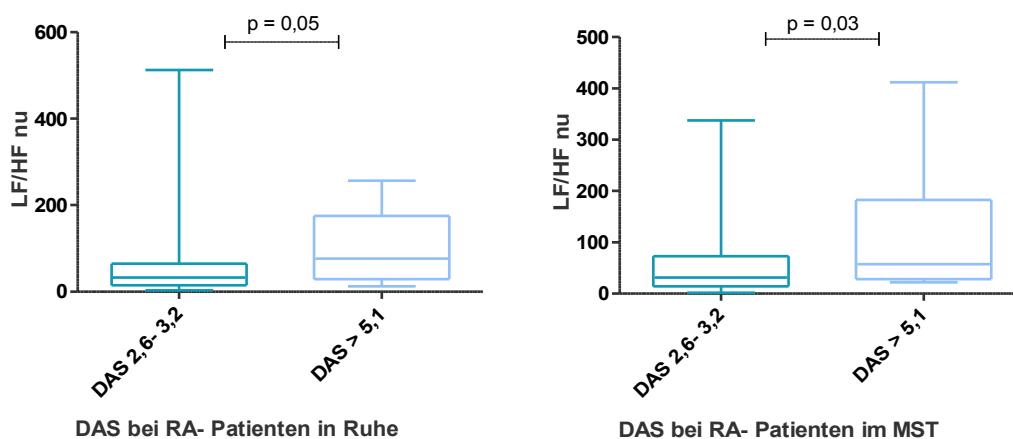


Abb.16: LF/HF unter Ruhebedingungen und im mental stress test (MST) bei RA-Patienten mit verschiedener Krankheitsaktivität (DAS= disease activity score; nu= normalized units)

Die HF ist bei Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität signifikant höher, als bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität. Eine niedrige parasympathische Aktivität ist assoziiert mit hoher Krankheitsaktivität (Man Whithney für HF DAS 2,6- 3,2 vs. HF DAS > 5,1:  $1,38 \pm 0,22$  vs.  $0,78 \pm 0,21$ ;  $p=0,04$ ) (Abb. 17).



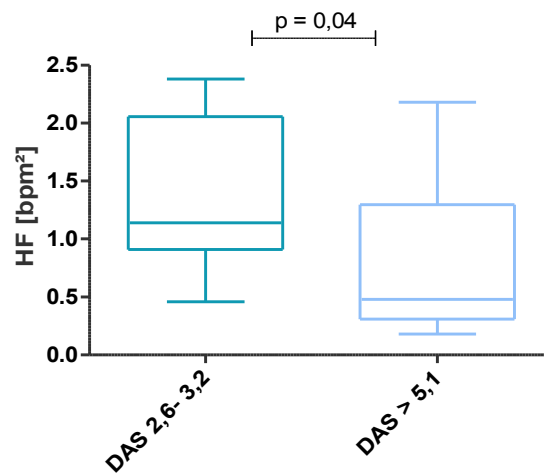


Abb.17: **HF unter Ruhebedingungen bei RA-Patienten mit verschiedener Krankheitsaktivität** (DAS= disease activity score)

In der Spearman-Korrelationsanalyse ist einen Trend (n.s.) zu niedrigeren Valsalva-Quotienten mit steigenden DAS-Werten zu erkennen (DAS < 2,6 vs DAS > 5,1 im Mann-Whitney-Test:  $1,53 \pm 0,12$  vs.  $1,27 \pm 0,10$ ;  $p=0,096$ ). Abb.18 veranschaulicht dies.

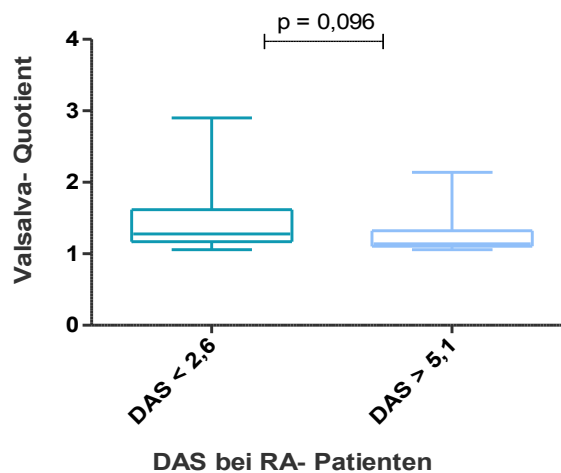


Abb.18: **Valsalva-Quotient als Parameter sympathischer und parasympathischer Balance bei Patienten in Remission (DAS < 2,6) und mit hoher Krankheitsaktivität (DAS > 5,1)**

Desweiteren finden sich signifikante Zusammenhänge zum Ergebnis des *HAQ* und zum *Alter*. Höheres Alter geht mit niedrigeren LF-Werten (Sympathikus) im MST, sowie zu niedrigerer Gesamtherzratenvariabilität, VK und MCR im DBT einher (Tab.9).

Tabelle 9: Spearman Korrelation zwischen HRV (qualitativ) und klinischen Parametern bei Patienten mit RA

Parameter	Alter	HAQ
<b><i>MST</i></b>		
LF [bpm <sup>2</sup> ]	-0,26*	0,18
RMSSD [ms]	-0,00	0,23**
HRV- index	-0,16	0,27**
<b><i>DBT</i></b>		
VK [%]	-0,26*	0,12
RMSSD [ms]	-0,17	0,08
HRV-Index	-0,25*	0,04
E:I-Ratio	-0,13	-0,10
MCR	-0,26*	0,08
*p < 0,01	**p < 0,05	

Weitere Zusammenhänge zwischen *qualitativen* neurologischen Werten und Geschlecht, RF, Erosionen, anti-CCP-AK und CRP ergaben sich nicht.

Die Untersuchung von Zusammenhängen zwischen *quantitativen HRV-Daten* (pathologisch ja oder nein?) und klinischen Parametern zeigt, dass 66,7% der Patienten in Remission (DAS < 2,6) normale, und nur 33,3% pathologische HRV-Tests haben, während bei Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (DAS > 5,1) 54,5% pathologische Ergebnisse haben (Abb. 19). Untersuchungen mit anderen klinischen Parametern ergaben keine signifikanten Ergebnisse, weder bei der Betrachtung aller Tests in Zusammenschau (Gesamt-„HRV“), noch bei der Korrelation mit den jeweiligen Einzeltests.

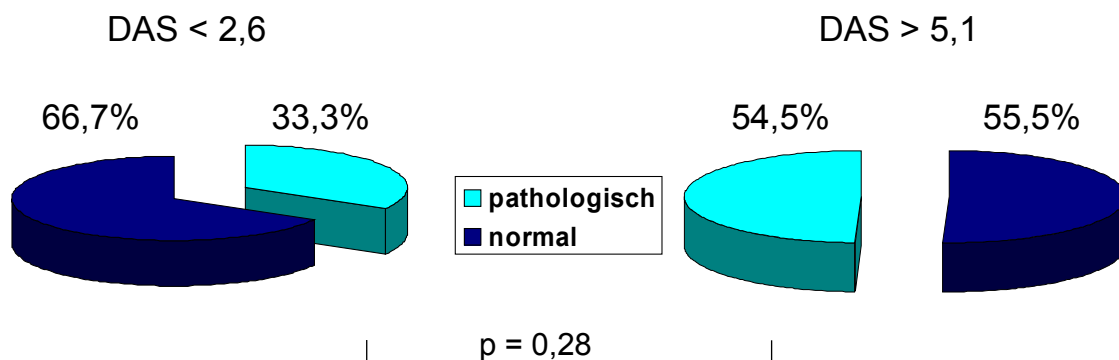


Abb. 19: Vergleich der HRV-Test-Ergebnisse zwischen Patienten in Remission (DAS < 2,6) und Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (DAS > 5,1)

### 3.2.4 Aktivität des ANS unter Stressbelastung im Test der sympathischen Hautantwort

Durch Messungen der sympathischen Hautantwort wurde der sympathische Schenkel des ANS untersucht. Dazu wurden Latenzzeiten bis zur messbaren Antwort nach Reizung des Nervensystems durch einen kurzen Stromimpuls, sowie die Amplituden der Antwort zwischen RA- und OA-Patienten verglichen.

15% der RA-Patienten und 7% der OA-Patienten haben pathologische Antworten des sympathischen Sudomotoriums (Tabelle 10).

Tabelle 10: SSR- Befunde bei RA- und OA-Patienten

SSR	RA (n = 106)		OA (n = 43)		p-Wert
	n	%	n	%	
normal	90	85	40	93	0,278
pathologisch	16	15	3	7	

OA-Patienten haben im Median signifikant höhere Amplituden der Handpotentiale sowie signifikant kürzere Latenzzeiten der Füße, also stärkere Antworten des sudomotorischen Systems, als RA-Patienten. Beide Gruppen sind aber innerhalb der Normgrenzen (Tab. 11).

Tabelle 11: Latenzen und Amplituden der SSR nach Reiz (MW  $\pm$  SD) im Vergleich zwischen RA, OA und Normwerten.

	RA		OA		Normwert	
	Hand	Fuß	Hand	Fuß	Hand	Fuß
P0 [s]	1,36 $\pm$ 0,37	1,96 $\pm$ 0,35*	1,35 $\pm$ 0,29	1,79 $\pm$ 0,32*	1,45 $\pm$ 0,18	2,13 $\pm$ 0,31
Seitendifferenz Po [s]	0,04 $\pm$ 0,04	0,06 $\pm$ 0,06	0,05 $\pm$ 0,04	0,07 $\pm$ 0,07	0,08 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,12
Seitendifferenz Ampl. [%]	95,94	89,75	91,35	90,83	82 $\pm$ 22	74 $\pm$ 22
Median Ampl. [ $\mu$ V]	2218*	1647	4309*	2067	1960	1000
<u>Normgrenze</u>						
Ampl. [ $\mu$ V]					> 260	> 240

\* RA vs. OA:  $p < 0,01$ ; P0= Potentialabgang= Latenz; Ampl.= Amplitude (A1- A2);; relative Seitendifferenzen geben die Prozentzahl bezogen auf den größeren der beiden Werte an

### 3.2.5 Korrelation zwischen SSR und klinischen Parametern

Eine Korrelationsanalyse mit den qualitativen SSR-Daten für RA-Patienten ergibt einen signifikant negativen Zusammenhang zwischen Amplitudenhöhe der sympathischen Hautantwort der Hände und CRP-Werten ( $r = -0,242$ ;  $p = 0,005$ ).

Mit zunehmenden Latenzzeiten der sympathischen Hautantwort an den Händen steigt außerdem signifikant das Risiko für das Auftreten von Erosionen bei RA-Patienten (log. Regression: OR (95% CI): 1,003 (1,001- 1,005);  $p = 0,01$ ).

Es besteht kein Zusammenhang zwischen quantitativen Daten (SSR pathologisch ja/ nein?) und klinischen Parametern wie Alter, Alter bei Erstdiagnose, CRP, Seropositivität (anti-CCP-AK, RF), Erosionen, Röntgen-Stadium oder DAS.

## 3.3 Die Rolle der $\beta$ 2-adrenergen-Rezeptoren ( $\beta$ 2ARs)

### 3.3.1 Charakterisierung der Gen-Polymorphismen der $\beta$ 2ARs

Als einen Berührungspunkt zwischen ANS und Effektorsystemen wie Herz und Immunsystem sollten in der vorliegenden Arbeit die Gene  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren bei allen Studienpatienten auf Polymorphismen hin untersucht und verglichen werden. Um durch eine größere Fallzahl noch aussagekräftigere Ergebnisse zu erhalten, wurden die Gen-Polymorphismen der RA-Patienten mit denen zusätzlicher gesunder Kontrollen verglichen (Abb. 20).

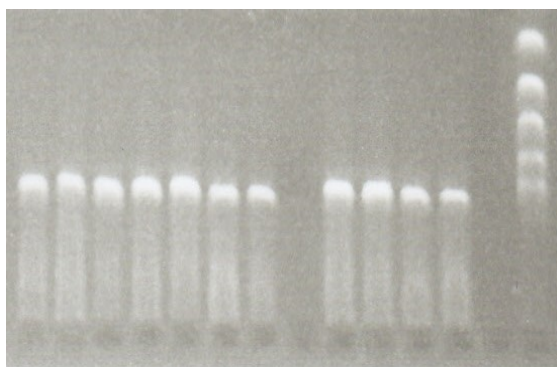


Abb.20: **Produkt der PCR nach Gelelektrophorese.** Es sind optisch Unterschiede der Lumineszenz zu erkennen, was auf unterschiedlichen DNA-Gehalt zurückzuführen ist. Dennoch sind vorhandene von nicht vorhandenen Banden eindeutig zu unterscheiden. (Quelle: eigene Messung)

### 3.3.1.1 RA versus gesunde Kontrollen

Der Vergleich der Genotypen, Allelfrequenzen und des Carrierstatus an den Positionen 16, 27 und 164 ergab für RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden folgende Aussagen:

#### Position 16 (Tabelle 12):

RA-Patienten sind in ihren Genotypen signifikant häufiger heterozygot für Arg16Gly an Position 16 als Gesunde ( $p < 0,0001$ ), wohingegen signifikant mehr Gesunde homozygot für Glycin sind ( $p < 0,0001$ ).

Bezüglich der Allelfrequenzen finden sich signifikant mehr Arg-Allele und weniger Gly-Allele an Position 16 bei Patienten mit RA als bei Gesunden ( $p$  jeweils  $< 0,001$ ).

Auch der Carrier-Status zeigt signifikant mehr Arg-Träger für RA im Vergleich zu Gesunden ( $p < 0,0001$ ).

Tabelle 12: Verteilung von Genotypen, Allelfrequenzen und Carrier-Status an Aminosäure Position 16 bei Patienten mit RA und gesunden Kontrollen

Rezeptor-Genotyp	RA n=101 n (%)	Gesunde n= 305 n (%)	Odds ratio (95%CI)	p-Wert
Arg16Arg	6 (5,9)	14 (4,6)	1,31 (0,49- 3,51)	0,59
Arg16Gly	87 (86,2)	188 (61,6)	3,86(2,1- 7,1)	< 0,0001
Gly16Gly	8 (7,9)	103 (33,8)	0,17 (0,08- 1,36)	< 0,0001
<b>Allelfrequenz</b>				
Arg16	99 (49)	216 (35,4)	1,75 (1,27- 2,42)	< 0,001
Gly	103 (51)	394 (64,6)	0,57 (0,41- 0,78)	< 0,001
<b>Carrier</b>				
Arg	93 (92,1)	202 (66,2)	5,93 (2,77- 12,68)	< 0,0001
Non- Arg	8 (7,9)	103 (33,8)	0,17 (0,08- 0,36)	< 0,0001

#### Position 27 (Tabelle 13):

Gesunde sind signifikant häufiger homozygot für Gln an Position 27 (22%), ( $p = 0,01$ ), RA-Patienten signifikant häufiger heterozygot (68,3%), ( $p = 0,04$ ).

Tabelle 13: Genotypen und Allelfrequenz für Polymorphismen an Aminosäure-Position 27 bei Patienten mit RA und gesunden Kontrollen

Rezeptor-Genotyp	RA n=101 n Allele (%)	Gesunde n= 305 n Allele (%)	Odds ratio (95%CI)	p-Wert
Gln27Gln	11 (10,9)	67 (22)	0,43 (0,22- 0,86)	0,01
Gln27Glu	69 (68,3)	171 (56)	0,69 (1,05- 2,72)	0,04
Glu27Glu	21 (20,8)	67 (22)	0,93 (0,53- 1,62)	0,89
<b>Allelfrequenz</b>				
Gln27	91 (45)	305 (50)	0,82 (0,6- 1,1)	0,23
Glu	111 (55)	305 (50)	1,22 (0,89- 1,67)	0,23

#### Position 164 (Tabelle 14):

93,1% der gesunden Kontrollen sind homozygot für Thr an Position 164. Nur 9,9% der RA-Patienten zeigen dieses Merkmal ( $p < 0,0001$ ). Dagegen zeigen signifikant mehr Patienten mit RA (66,3%) Heterozygotie für Thr164Ile, als Gesunde (6,9%), ( $p < 0,0001$ ). Homozygote für Ile164 an Position 164 kommen bei Gesunden in unserer Arbeit nicht vor. RA-Patienten sind signifikant häufiger homozygot für Ile an Position 164 ( $p < 0,0001$ ).

Auch beim Vergleich der Allelfrequenzen wird deutlich, dass RA-Patienten signifikant mehr Ile-Allele und signifikant weniger Thr-Allele aufweisen ( $p < 0,0001$ ).

Tabelle 14: Genotypen und Allelfrequenz für Polymorphismen an Aminosäure-Position 164 bei Patienten mit RA und gesunden Kontrollen

Rezeptor-Genotyp	RA n=101 n (%)	Gesunde n=305 n (%)	Odds rati (95% CI)	p-Wert
Thr164Thr	10 (9,9)	284 (93,1)	0,01 (0- 0,02)	< 0,0001
Thr164Ile	67 (66,3)	21 (6,9)	26,65 (14,5- 48,8)	< 0,0001
Ile164Ile	24 (23,8)	0 (0)	193,2 (11,6-3214)	< 0,0001
<b>Allelfrequenz</b>				
Thr164	87 (43,1)	589 (96,6)	0,03 (0,02- 0,05)	< 0,0001
Ile	115 (56,9)	21 (3,4)	37,1 (22,1- 62,2)	< 0,0001

### 3.3.1.2 RA versus OA

Beim Vergleich der Gen-Polymorphismen dieser beiden Gruppen gab es v.a. bezüglich Position 16 Auffälligkeiten:

Position 16:

Beim Vergleich der Genotypen (Tabelle 15) fällt auf, dass 5,9% der RA-Patienten homozygot für Arginin an Position 16 sind, aber kein einziger Patient mit OA. Dagegen sind 12,5% der OA-Patienten homozygot für Glycin an Position 16. Bei RA-Patienten findet sich dieser Polymorphismus nur in 7,9% der Fälle.

Tabelle 15: Verteilung von Genotypen, Allelfrequenz und Carrier-Status an Aminosäure-Position 16 bei Patienten mit RA und OA

Rezeptor-Genotyp	RA n=101 n (%)	OA n= 40 n (%)	Odds ratio (95%CI)	p-Wert
Arg16Arg	6 (5,9)	0 (0)	1,42 (1,27- 1,59)	0,18
Arg16Gly	87 (86,2)	35 (87,5)	0,89 (0,29- 2,65)	1
Gly16Gly	8 (7,9)	5 (12,5)	0,6 (0,18- 2)	0,52
<b>Allelfrequenz</b>				
Arg16	99 (49)	35 (43,8)	1,24 (0,73- 2,08)	0,43
Gly	103 (51)	45 (56,2)	0,81 (0,48- 1,36)	0,43
<b>Carrier</b>				
Arg	93 (92,1)	35 (87,5)	1,66 (0,51- 5,42)	0,52
Non- Arg	8 (7,9)	5 (12,5)	0,61 (0,18- 1,97)	0,52

Tabellen 16 und 17 stellen die Ergebnisse für Genotypen, Allelfrequenzen und Carrier-Status an Position 27 und 164 dar. Es ergaben sich keine Signifikanzen. Der weiterhin durchgeführte Vergleich der Verteilung verschiedener Allelkombinationen an Position 16, 27 und 164, wie z.B. Arg16Arg + Gln27Gln + Thr164Thr, oder Arg16Gly + Gln27Glu + Ile164Ile zwischen RA und OA erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 16: Genotypen und Allelfrequenzen für Polymorphismen an Aminosäure-Position 27 bei Patienten mit RA und OA

Rezeptor-Genotyp	RA n=101 n Allele (%)	OA n= 40 n Allele (%)	Odds ratio (95%CI)	p-Wert
Gln27Gln	11 (10,9)	5 (12,5)	0,86(0,26- 2,64)	0,77
Gln27Glu	69 (68,3)	28 (70)	0,92 (0,42- 2,05)	1
Glu27Glu	21 (20,8)	7 (17,5)	1,24 (0,48- 3,19)	0,82
<b>Allelfrequenz</b>				
Gln27	91 (45)	38 (47,5)	0,9 (0,54- 1,52)	0,79
Glu	111 (55)	42 (52,5)	1,1 (0,66- 1,86)	0,79

Tabelle 17: Genotypen und Allelfrequenz für Polymorphismen an Aminosäure-Position 164 bei Patienten mit RA und OA

Rezeptor-Genotyp	RA n=101 n (%)	OA n= 40 n (%)	Odds ratio (95%CI)	p-Wert
Thr164Thr	10 (9,9)	3 (7,5)	1,36 (0,35- 5,21)	0,76
Thr164Ile	67 (66,3)	32 (80)	0,49 (0,21- 1,19)	0,1
Ile164Ile	24 (23,8)	5 (12,5)	2,18 (0,77- 6,19)	0,1
Allelfrequenz				
Thr164	87 (43,1)	38 (47,5)	0,84 (0,5- 1,41)	0,51
Ile	115 (56,9)	42 (52,5)	1,2 (0,71- 2,01)	0,51

### 3.3.2 Polymorphismen bei RA-Patienten und Klinik

Träger von Arg16Gly haben im Vergleich zu Patienten ohne diesen Genotyp tendenziell ein früheres Alter bei Erstdiagnose (MW  $\pm$  SEM: 51,88  $\pm$  1,44 vs. 57,45  $\pm$  2,53 Jahre;  $p = 0,088$ ).

Arg-Carrier zeigen im Vergleich zu Non-Carriern einen Trend (n.s.) zu höheren CRP-Werten (OR und 95% CI: 4 (0,46 – 34.64);  $p = 0,25$ ).

Der Vergleich der Krankheitsaktivität (DAS) zwischen RA-Gruppen unterschiedlicher Gen-Polymorphismen zeigt signifikante Unterschiede bezüglich Codon 27 (ANOVA:  $p = 0,05$ ):

Patienten mit dem Genotyp Gln27Gln (signifikant häufiger für Gesunde) haben signifikant niedrigere DAS-Werte, als die Gruppe mit dem Genotyp Glu27Glu ( $p = 0,01$ ) (Abb. 21).

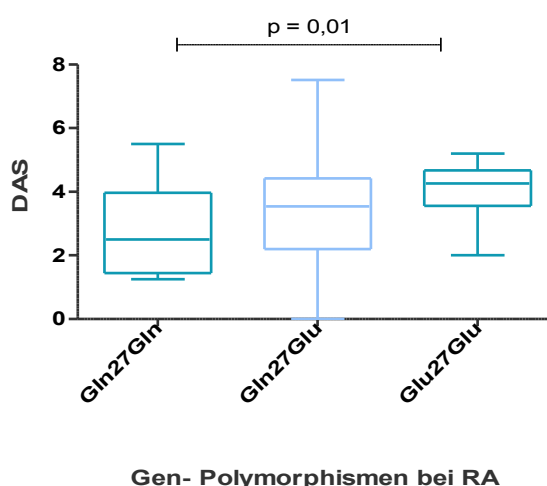


Abb.21: **Krankheitsaktivität bei RA-Patienten mit verschiedenen  $\beta$ 2ARs-Gen-Polymorphismen** (DAS = disease activity score)

Signifikante Zusammenhänge zu weiteren klinischen Parametern wie Geschlecht, Anti-CCP-Ak, RF, Erosionen bzw. verschiedenen Röntgenstadien ergaben sich nicht.



### 3.3.3 Korrelation von HRV-Parametern und Gen-Polymorphismen

Abschließend wurde der Frage nachgegangen: Besteht ein Zusammenhang zwischen der gezeigten veränderten ANS-Aktivität bei RA-Patienten und den verschiedenen Genotypen der jeweiligen Patienten? Dazu wurden innerhalb der RA-Gruppe Untergruppen nach Genotypen/ Allelfrequenzen/ Carrierstatus gebildet und zwischen diesen die neurologischen Messwerte verglichen.

Zum Vergleich der HRV-Daten zwischen den verschiedenen Genotyp-Polymorphismen wurde zum Mittelwertvergleich für nicht-normalverteilte Werte zwischen Gruppen der Kruskal-Wallis-Test oder der Man-Whitney-U-Test durchgeführt. Sowohl in *Ruhe* als auch in *Stressituationen* zeigen sich keine signifikanten Unterschiede.

Betrachtet man die Differenzen der HRV- Messwerte zwischen Stress und Ruhe, um die Reaktivität des ANS zu beurteilen, so ergeben sich unter mentalem Stress im *MST* für Gly16Gly-Träger größere LF (Sympathikus)-Differenzen, als für Arg16Gly. Die Unterschiede sind nicht signifikant. Interessanterweise bewegt sich die sympathische Aktivität aber für Arg16Arg-Träger entgegengesetzt zu den anderen Genotypen sowie der RA-Gesamtgruppe und nimmt unter mentaler Stressbelastung ab, statt zu steigen (Abb.22). Ähnliches gilt für Position 164. Die Differenz der sympathischen Aktivität zwischen MST und Ruhe (LF) ist für Thr164Thr-Homozygote größer, als bei allen Vergleichsgruppen (nicht signifikant).

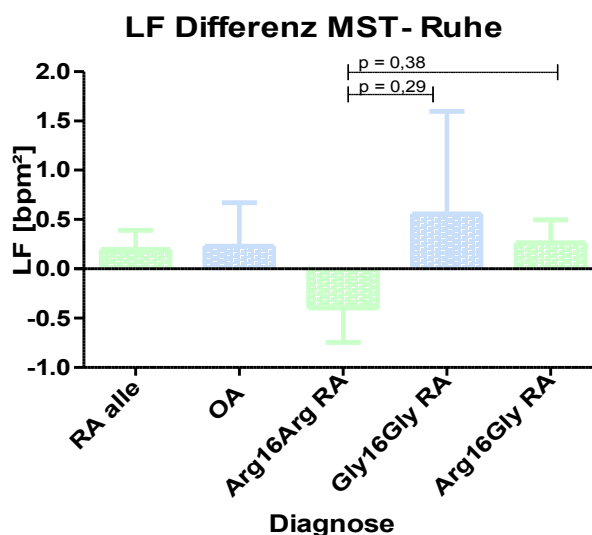


Abb.22: Differenzen der sympathischen (LF) Aktivität zwischen mentaler Stressbelastung und Ruhe als Marker der autonomen Reaktionsfähigkeit im Vergleich zwischen RA-Gesamtgruppe, OA und RA-Untergruppen nach Genotyp

Bezüglich Genetik und SSR ergaben sich keine signifikanten Zusammenhänge.

## 4. Diskussion

Die Rheumatoide Arthritis ist eine multifaktorielle Autoimmunerkrankung mit gestörter Homöostase, deren genaue Pathomechanismen noch weitgehend ungeklärt sind. Vor einem permissiven genetischen Hintergrund könnten verschiedene Umweltfaktoren Beginn und Verlauf der Krankheit mitbestimmen (Bax et al. 2011). Psychologischer Stress verschlechtert die Krankheitsaktivität (Malysheva et al. 2010). Aktuelle Studien weisen auf eine auf verschiedenen Ebenen gestörte Stressantwort mit Dysregulationen der immuno-neuro-endokrinen Interaktionen hin (Del Rey et al. 2010), (Straub und Fassold 2010).

Auf der Ebene des Immunsystems ist eine gestörte Balance zwischen überwiegenden Th1-Zellen mit der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und Th2-Zellen mit anti-inflammatorischen Zytokinen von zentraler Bedeutung. Die Rolle des ANS bei RA ist bisher nicht ausreichend verstanden. Durch anatomische und funktionelle Links zum Immunsystem könnte es den Krankheitsverlauf mitbestimmen. Als Teil der *stress response* könnte eine vermutete Dysregulation des ANS zur gestörten Homöostase beitragen. Um dieser Vermutung nachzugehen wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen untersucht:

**1. Haben Patienten mit RA autonome Regulationsstörungen? Dabei sollte die Aktivität des ANS in Ruhe und unter minor stress untersucht werden.**

### ***Aktivität des ANS in Ruhe***

#### *Zusammenspiel von Sympathikus und Parasympathikus*

Unsere Untersuchungen ergaben eine für RA im Vergleich zu OA *signifikant erhöhte Herzfrequenz* unter Basis-Bedingungen. Da die Herzfrequenz über sympathische Einflüsse am Sinusknoten erhöht und über parasympathische Einflüsse vermindert wird, spricht dies für ein Überwiegen des sympathischen Tonus im Verhältnis zum Parasympathikus.

Diese Ergebnisse entsprechen denen früherer Studien (Leden et al. 1983), (Perry et al. 1989), (Kuis et al. 1996). Kuis et al. schlossen auf eine erhöhte zentrale Sympathikusaktivität als Ursache für die erhöhte Herzfrequenz, da bei ihrer Untersuchung an 32 Kindern mit juveniler RA zentrale NA-Metabolite im Urin im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht waren. Prinzipiell könnten bei juveniler Arthritis andere Mechanismen zu Grunde liegen, als bei der adulten Form. Perry et al. hingegen gingen von einer erniedrigten Grundaktivität des PNS aus. Auch bei unseren Patientengruppen schien ein verringerter Parasympathotonus eine wesentliche Rolle zu spielen, worauf noch eingegangen wird. Schließlich spiegelt auch die laut unseren Ergebnissen *erniedrigte HRV* bei RA-Patienten eine Dysbalance zwischen beiden Schenkeln des ANS mit Dominanz des Sympathikus gegenüber dem Parasympathikus in Ruhe wider. Welche Rolle könnte dies für die Patienten spielen?

Eine dauerhaft erhöhte Herzfrequenz bei Imbalance zwischen PNS und SNS sowie damit einhergehender erniedrigter HRV stellt einen starken und unabhängigen Risikofaktor für die Mortalität nach einem Herzinfarkt dar und hat prognostischen Wert für Patienten mit Herzinsuffizienz und diabetischer Neuropathie (Farrell et al. 1991), (Kao et al. 2000), (Nolan et al. 1998), (O'Brien et al. 1991). Mehrere epidemiologische Studien zeigten eine erhöhte Prävalenz kardiovaskulärer Mortalität auch bei RA-Patienten im Vergleich zu Kontrollgruppen (Prior et al. 1984), (Kvalvik et al. 2000), (Schwemmer et al. 2006). Eine Langzeitstudie an 187 RA-Patienten über 17 Jahre ergab für den plötzlichen Herztod einen Anteil von 11,3% an der Gesamtmortalität von RA-Patienten. Das ist insgesamt doppelt so hoch, wie die der Kontrollgruppe (Riise et al. 2001). Evrengül et al. schlossen durch ihre Ergebnisse von 42 RA-Patienten (relativ erhöhter Sympathotonus, erniedrigte HRV) auf einen Zusammenhang zwischen vorwiegend sympathischer Kontrolle des Herzens und gehäufterem Auftreten von Arrhythmien und plötzlichem Herztod für RA-Patienten (Evrengül et al. 2003). Unsere Studie an deutlich mehr Patienten bestärkt diese Vermutung.

Neben diesen Auswirkungen auf das Herz könnte eine Imbalance zwischen SNS und PNS auch für das neuro-immunologische Zusammenspiel eine pathophysiologische Bedeutung haben. Dazu wurden im Folgenden die einzelnen Schenkel des ANS weiter beleuchtet.

### *Sympathikus*

Den sympathischen Anteil betreffend bestätigte sich in der vorliegenden Arbeit der Trend zu einem *im Verhältnis zum erniedrigten Parasympathotonus (HF) hohem Sympathikotonus (LF)*. Die *absoluten LF-Werte unterschieden sich jedoch nicht signifikant* zur OA-Kontrolle.

Bisherige Studien waren widersprüchlich. Aydemir et al. fanden an 36 RA-Patienten unter Ruhebedingungen im Liegen signifikant *niedrigere* SNS (LF)-Werte im Vergleich zu gesunden Kontrollen (Aydemir et al. 2010). Evrengül et al. hingegen fanden signifikant *erhöhte* LF-Werte bei 42 RA-Patienten im Vergleich zu Gesunden (Evrengül et al. 2003). Allerdings waren diese Patienten mit durchschnittlich 47 Jahren deutlich jünger als unser Patientenkollektiv mit  $52,9 \pm 11,5$  Jahren. Da die HRV-Werte, wie auch in unserer Studie gezeigt, negativ mit zunehmendem Alter korrelieren, könnte dies unterschiedliche Ergebnisse mitbedingen. Dekkers et al. deuteten über eine verkürzte Pre-Ejektions-Phase bei Patienten mit aktiver RA ebenfalls auf einen bereits in Ruhe *erhöhten* Sympathotonus (Dekkers et al. 2004). Interessanterweise wurden in dieser Studie ausschließlich Patienten mit gerade neu diagnostizierter RA untersucht, wohingegen die Patienten der vorliegenden Studie schon seit durchschnittlich 10 Jahren an RA leiden (Alter bei Krankheitsbeginn  $52,9 \pm 11,5$  Jahre). Tierexperimente konnten zeigen, dass das SNS zu verschiedenen Zeitpunkten der Krankheit gegenteilige Reaktionen des Immunsystems bewirkt. Infusion von  $\beta$ 2AR-Agonisten wie

Salbutamol zwei Tage vor bis 28 Tage nach Beginn Adjuvant-induzierter Arthritis (AA) verschlechterte die Krankheitsaktivität der entstehenden Arthritis (Bellinger et al. 2008). Gabe der Agonisten ab Beginn der Erkrankung bis 10 Tage danach hingegen besserte die Symptome bei Kollagen- oder Adjuvant-induzierter Arthritis (Malfait et al. 1999), (Lubahn et al. 2004). Ein höheres Level an NA bei gerade aufgetretener RA könnte also genauso negativ wirken, wie ein im Verhältnis zur Entzündungssituation niedriges NA-Level in späteren Krankheitsstadien. Prinzipiell zu beachten ist zudem, dass in unserer Studie OA-Patienten als Kontrollgruppe zur Verfügung standen, bei nahezu allen anderen Studien Gesunde. Das erschwert den Vergleich unserer Studie mit anderen in diesem Punkt. Es wäre theoretisch denkbar, dass auch OA-Patienten auf Grund sekundärer Synovialitis oder durch Produktion pro-inflammatorischer Zytokine durch Chondrozyten, ebenfalls erhöhte Aktivierung des Sympathikus bereits in Ruhe zeigen. Das könnte den Unterschied zu RA verringern. Besonders Patienten der Untergruppe mit erosiver OA, welche eine im Vergleich zu anderen OA-Subgruppen stärkere Entzündung, stärkere klinische Belastung und schlechteres Outcome zeigen (Bijsterbosch et al. 2010), (Kwok et al. 2011), könnte dies betreffen. Ein für RA im Vergleich zu Gesunden erhöhter Sympathotonus wäre demnach nicht auszuschließen. Da die Sympathikustests aber im zusätzlich durchgeführten Vergleich zwischen RA, OA ohne Erosionen und erosiver OA (im Ergebnisteil nicht gesondert dargestellt) nicht signifikant häufiger pathologisch waren, ist eine allgemeine Verschleierung unserer Ergebnisse durch die wenigen Studienpatienten mit erosiver OA nicht anzunehmen. Für den von uns erstmals mittels HRV-Messungen durchgeführten Vergleich zwischen RA und OA-Patienten bleibt für die RA in Ruhe eine absolut nicht erhöhte, jedoch im Verhältnis zum Parasympathikus dominierende Sympathikusaktivität festzuhalten.

Wie ist dies pathophysiologisch einzuordnen? Hier gibt es zwei Diskussionsansätze zu unseren Ergebnissen. Entweder man stellt das Überwiegen der SNS-Aktivität über die PNS-Aktivität in den Vordergrund. Oder man bezieht sich v.A. auf die im Vergleich zur OA-Kontrolle gleich hohen SNS-Werte.

Dem ersten Ansatz folgend lässt sich für die im Verhältnis hohe SNS-Aktivität ähnlich argumentieren, wie bei anderen Autoren, welche in Ruhe hohe SNS-Aktivitäten für RA im Vergleich zu Gesunden gezeigt haben: Die RA ist eine Th1-gewichtete Erkrankung. Der Sympathikus kann die Aktivität von Th1-Zellen über  $\beta$ 2ARs beeinflussen (Straub und Härle 2005). Hohe Dosen an NA können, wie in 1.3.2.1 beschrieben, über  $\beta$ ARs die cAMP-Konzentration in den Th1-Zellen erhöhen und so die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  hemmen (Spengler et al. 1994),(Cutolo et al. 2006). Ein *hoher Sympathotonus* würde sich dementsprechend eigentlich *positiv* auf die Krankheitsaktivität auswirken. Dafür spricht z.B. die Beobachtung, dass RA-Patientinnen im dritten Trimester

der Schwangerschaft, welches mit erhöhten Konzentrationen an Katecholaminen und Glukokortikoiden einhergeht, einen Rückgang der Krankheitsaktivität erleben (Østensen et al. 2012). Auch im experimentellen Modell der Multiplen Sklerose, einer Th1 gewichteten Erkrankung wie der RA, verschlechterte eine chemische Sympathektomie die Krankheit (Chelmicka et al. 1988). Für die RA gibt es allerdings Beobachtungen, die vermuten lassen, dass eine im Verhältnis oder sogar absolut erhöhte Sympathikusaktivität nicht entsprechend anti-inflammatorisch wirken kann: Zum einen gibt es anatomisch-funktionelle Veränderungen an Schnittstellen zwischen ANS und IS. Wie bereits in 1.3.2.2 erwähnt, sorgt eine erniedrigte Dichte von  $\beta$ ARs auf peripheren Blutmonozyten und im Synovialgewebe von RA-Patienten unabhängig vom NA-Level für erniedrigte anti-inflammatorische Effekte (Baerwald et al. 1992), (Baerwald et al. 1997), (Wahle et al. 2005). Auch der Rückzug sympathischer Nervenfasern z.B. aus der Milz und aus dem Gelenk heraus (Koopman und Stoof 2011), lässt auch hohe Dosen von NA nicht adäquat im Entzündungsgebiet agieren. In niedrigen Konzentrationen stimuliert NA v.a.  $\alpha$ -Rezeptoren zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Cutolo et al. 2006). Diese überwiegen im Verlauf der Erkrankung durch den sogenannten *beta-to-alpha-adrenergic shift* (Straub und Härle 2005) den  $\beta$ -Rezeptoren. So könnten die nur noch niedrigen Dosen von NA, die im Entzündungsgebiet agieren, an  $\alpha$ -Rezeptoren und so letztendlich pro-inflammatorisch wirken. Tatsächlich konnten experimentelle (Levine et al. 1986), (Bellinger et al. 2008) und klinische (Levine et al. 1986) Studien zeigen, dass Symptome von RA-Patienten nach systemischer und regionaler Blockade des SNS z.B. mit Gunethidine abnehmen. Zum anderen gibt es weitere Faktoren, die die Rolle des ANS bei der RA komplexer machen. Wie bereits erwähnt, ist die Wirkung von NA vom Stadium der Krankheit abhängig, was bisher in vielen Studien nicht explizit beachtet wurde. Außerdem wirkt das ANS systemisch und lokal und nicht an jedem Effektororgan gleich. Sympathische Denervation mittels  $\beta$ -Blockern bei Ratten mit Adjuvant-induzierter Arthritis z.B. verbessert die Gelenkentzündung. Denervation von die inguinale und popliteale Region drainierenden Lymphknoten hingegen verschlechtert die Arthritis (Bellinger et al. 2008). Auch Milz und Thymus spielen neben dem Gelenk wichtige und unterschiedliche Rollen bei der Pathogenese, worauf weiter einzugehen den Rahmen dieser Arbeit sprengen würde (Review bei Koopman und Stoof 2011). Es bleibt festzuhalten, dass auch hohe Sympathikusaktivität bei der RA nicht automatisch anti-inflammatorisch wirken kann.

Schließlich, dem zweiten Diskussionsansatz folgend, zeigen unsere Ergebnisse, dass die Aktivität des Sympathikus zwar im Verhältnis zum Parasympathikus hoch ist, absolut aber nicht. Dies könnte anti-inflammatorische Wirkung von vornherein erschweren. In diesem Zusammenhang ist eine kürzlich erschienene Publikation interessant. An 10 RA-Patienten

wurde im Vergleich zu 10 OA-Patienten eine erhöhte Dichte von sympathischen Nervenfasern in dem das entzündete Gelenk umgebenden Fettgewebe sowie den Lymphknoten, welche dieses Gewebe drainieren, entdeckt. Demnach wäre ein hoher basaler SNS-Tonus schon allein nötig, um durch Lipolyse energiereiche Substrate bereitzustellen, die ein Körper mit chronischer Entzündung benötigt (Straub et al. 2011). Alle Energie des SNS würde also genutzt, um die Entzündung zu unterhalten. Für *anti*-inflammatorische Effekte würde selbst eine absolut hohe Aktivität nicht ausreichen. Eine nur im Verhältnis hohe Aktivität, wie in unseren Ergebnissen, wäre für die Situation schließlich sogar als zu niedrig zu charakterisieren. Letztendlich ist die Dosis an NA, welche auf Effektororgane wirkt, nicht optimal, um die Homöostase, das innere Gleichgewicht im Körper, zu erhalten. Es ist also eine inadäquate SNS-Aktivität bereits unter Basisbedingungen zu postulieren.

### *Parasympathikus*

Die differenzierte Betrachtung der einzelnen Schenkel des ANS in der vorliegenden Arbeit ergab *signifikant verkürzte RMSSD* ( $p= 0,004$ ), was eindeutig eine für RA verminderte Aktivität des Parasympathikus bedeutet. Bisherige Studien hierzu, mit gesunden Probanden als Kontrollgruppe, waren widersprüchlich. Dekkers et al. untersuchten 25 RA-Patienten, deren parasympathische Aktivität sich nicht von der Kontrollgruppe unterschied (Dekkers et al. 2004). Goldstein et al. hingegen zeigten, unseren Daten entsprechend, eine *signifikant verkürzte RMSSD* sowie *signifikant erniedrigte HF-Werte* (Goldstein und Bruchfeld 2007).

Dies könnte im Rahmen des unter 1.3.3.1 beschriebenen *anti-inflammatorischen-cholinerger pathways* von pathophysiologischer Bedeutung sein (Pavlov et al. 2003), (Mravec 2007). Demnach könnte schon unter Basisbedingungen die *anti-inflammatorische* Wirkung des Parasympathikus so vermindert sein, dass eine bestehende Entzündung nicht bekämpft und so dauerhaft unterhalten wird. Vorangegangene Studien unterstützen die Möglichkeit dieser These. In Blutproben von RA-Patienten konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation der  $\alpha 7n$ -Ach-Rezeptoren zu signifikanter Senkung der pro-inflammatorischen TNF- $\alpha$ -Level führte (Bruchfeld et al. 2010). Am lokalen Ort des Entzündungsgeschehens im Gelenk ist keine direkte vagale Innervation nachgewiesen. Allerdings wurden auch auf Zellen aus Synovial-Biopsien  $\alpha 7$ -nicotinerge Rezeptoren nachgewiesen, deren *in vitro* Stimulation mit Ach oder Agonisten ebenfalls zur Senkung der Produktion pro-inflammatorischer Cytokine führte (Waldburger et al. 2008). Es konnte weiter gezeigt werden, dass Manipulationen am *anti-inflammatorischen cholinerger pathway* die Aktivität der Arthritis bei *in vitro* Experimenten an Mäusen beeinflussen kann: So führte systemische Behandlung mit  $\alpha$ -Rezeptor-Agonisten zu einer Besserung, wohingegen unilaterale cervicale Vagusektomie die Aktivität der Arthritis verschlechterte (Koopman und Stoof 2011).

Schließlich ist zu bedenken, was nach unserem Wissen bisher in Untersuchungen der ANS-Stressachse kaum explizit beachtet wurde, aber für die Schlussfolgerungen bedeutend ist: RA-Patienten sind stets der chronischen Entzündung als Dauerstressor ausgesetzt. Eine wirkliche Ruhe-Situation existiert also eigentlich nicht. Im Verhältnis zur Kontrollgruppe, welche sich tatsächlich in Ruhe befindet, gleiche (wie in der vorliegenden Arbeit), oder auch leicht erhöhte absolute Werte der sympathischen Aktivität, müssen dann im Verhältnis zur Entzündungssituation bei RA-Patienten bereits als für die Immunreaktion inadäquat niedrige Aktivität gedeutet werden. Eine erniedrigte parasympathische Aktivität könnte ebenfalls von noch gravierender Bedeutung sein. Von diesem Standpunkt ausgehend ist die Reaktion auf Stress umso interessanter.

### ***Aktivität des ANS unter Stressbelastung***

Um Aussagen über die tatsächliche Reaktionsfähigkeit des ANS auf die Homöostase störende Stressoren zu beurteilen und der These zu einem defektem Stresssystem weiter nachzugehen, wurden Tests zur gezielten Stimulation des ANS durchgeführt. Dazu wurde die seit Jahren etablierte und in vielen Studien verwendete Ewing-Testbatterie (Ewing et al. 1986) mit den drei Untertests zu tiefer Atmung, Valsalva- und Orthostase-Manöver durchgeführt und durch einen vierten Test zur Beurteilung der Reaktion auf milden psychischen Stress ergänzt (van Geenen et al. 2006).

#### *Quantitativer Vergleich*

In Auswertung der kardialen Testbatterie als Ganzes zeigten RA-Patienten *signifikant häufiger* (39,4%) *pathologische Ergebnisse*, als OA-Patienten (14%). Dies unterstützt die Vermutung, dass eine autonome Dysfunktion in Reaktion auf Stress zur Pathogenese der RA mit negativen Auswirkungen von Stress auf die Krankheitsaktivität beitragen könnte. Genauere Einblicke ermöglichten die Einzeltests.

#### *Qualitativer Vergleich der Absolutwerte und der Differenzen zwischen Ruhe und Stress*

##### *Mentaler Stresstest (MST)*

Unter mentaler Stressbelastung zeigten die RA-Patienten dieser Studie einen *Anstieg der Herzfrequenz im Vergleich zur Ruhe*. Das entspricht dem, was Al'Ábsi et al. bei Gesunden als Reaktion auf dem MST beobachten konnten (Al'Ábsi et al. 1997). Die Herzfrequenz war dabei für RA signifikant höher als bei OA-Patienten, was ein stärkeres Überwiegen des SNS gegenüber dem PNS in dieser Situation bedeutet.

Die Werte der low-frequency-domain (LF), *als Maß des Sympathikus, veränderten sich jedoch nicht signifikant unter mentaler Stressbelastung und waren nicht signifikant verschieden zwischen beiden Gruppen*. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu einer

Beobachtung von Rostrup et al. an 19 gesunden Männern, welche erhöhte NA- und A-Konzentrationen als Zeichen einer Aktivierung des SNS in Reaktion auf den MST fanden (Rostrup et al. 1993). Dieser Unterschied könnte durch die unterschiedlichen Untersuchungsgruppen oder durch die verschiedenen Methoden zur Beurteilung der sympathischen Aktivität bedingt sein. Dabei ist der MST ein valider und im Rahmen der Mini-Mental-State-Untersuchungen langjährig im klinischen Alltag erprobter Test (Folstein et al. 1975). Auch in unserer Studie wurde der Test unter standardisierten Bedingungen unter Abschirmung jeglicher anderer Reize (Licht, Kälte, Geräusche, physische Belastung durch Stehen) an einer im Vergleich zu bisherigen Studien für neurologische Untersuchungen vergleichsweise hohen Patientenzahl durchgeführt. Einschränkend ist zu erwähnen, dass leises Rechnen mit unregelmäßiger Kontrolle für manchen Patienten einen zu leichten Stressor darstellen könnte. Auch Unterschiede in den Rechen- Fähigkeiten der einzelnen Studienteilnehmer könnten das Ergebnis beeinflusst haben, wobei kein signifikanter Unterschied zwischen beiden, hinsichtlich dieses Kriteriums zufällig ausgewählten, Gruppen anzunehmen ist. Schließlich erscheint ein für RA im Vergleich zu OA nicht signifikant verschiedener Sympathotonus auch hier verhältnismäßig niedrig, wenn man bedenkt, dass der mentale Stress für RA im Gegensatz zur OA *zusätzlich* zum Entzündungsstress bestand.

*Die RMSSD als Maß des Parasympathikus sank unter mentalem Stress für OA signifikant. Für RA hingegen sank sie nicht* signifikant im Vergleich zur Ruhe. Die *Differenz* zwischen Stress und Ruhe war für RA im Vergleich zu OA ebenfalls signifikant *geringer*. Der Parasympathikus erscheint damit unflexibel in der Reaktion auf mentalen Stress. Das wiederum könnte indirekt auch ein für die Stresssituation inadäquat schwächeres Ansteigen des Sympathikus zur Folge gehabt haben.

In Zusammenschau zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit also eine für RA verminderte Flexibilität des ANS bei Hyporeaktivität v.a. des Parasympathikus in Reaktion auf mentalen Stress und einer Tendenz zu Hypoaktivität des SNS. In einem Review von van Geenen et al. über alle in den letzten 15 Jahren durchgeführten Studien zu minor stress fanden sich lediglich zwei Studien, die die Reaktion auf mentalen Stress für RA-Patienten untersucht hatten (van Geenen et al. 2006). Geenen beobachtete die Reaktionen von Herzfrequenz, Blutdruck und skin conductance und fand, unseren Ergebnissen entsprechend, erniedrigte autonome Reaktion auf Tests zur kognitiven Diskrimination (Geenen 1996). Perry et al. führten mit 19 RA-Patienten ebenfalls mental arithmetic tasks durch, untersuchten ausschließlich die Reaktion der Herzfrequenz und fanden keine Unterschiede zwischen RA und Gesunden (Perry et al. 1989). Allerdings untersuchten sie nicht gezielt den Parasympathikus, welcher in unseren Ergebnissen im Vordergrund steht. Weitere Studien an mehr Patienten mit stärkeren Stressoren und der parallelen Kontrolle von RA, OA und



Gesunden wären wünschenswert, um die Situation noch besser zu verstehen.

#### *Ewing/ Orthostase-Test*

Im Vergleich von Ruhewerten mit Stresswerten war die *HRV in beiden Gruppen durch das Orthostase-Manöver signifikant gesunken*, was am ehesten durch die zunächst erhöhte Herzfrequenz bedingt ist und zeigt, dass der Test in beiden Gruppen unter standardisierten Bedingungen eine Reaktion des Körpers hervorgerufen hat. *26,3% der RA-Patienten hatten pathologische Testergebnisse*. Dagegen zeigten nur 14% der OA-Patienten eine pathologische 30:15-Ratio. *Die absoluten Werte dieser Ratio und des HRV-Index als Reaktion auf den Orthostase-Stress unterschieden sich jedoch im Mittel nicht signifikant zwischen den beiden Gruppen*. Dies bestätigt Studien anderer Autoren, die ebenfalls physiologische Reaktion für RA-Patienten im Orthostase-Test fanden (Toussiro et al. 1993), (Louthrenoo et al. 1999), (Piha und Voipio-Pulkki 1993), (Vlcek et al. 2008). Lediglich Kuis et al. schlussfolgerten aus einer schwächeren Erhöhung des systemischen Gefäßwiderstandes sowie einem kleineren Anstieg der NA-Konzentrationen im Blut auf pathologische ANS-Reaktionen bei RA in dieser Situation. Hohe Baseline-NA-Spiegel wurden von diesen Autoren als Ursache für die Unflexibilität der Gefäße und des ANS betrachtet (Kuis et al. 1996). Jedoch galten ihre Beobachtungen bezüglich der SNS-Funktion für Patienten mit juveniler Arthritis und nur für eine Untergruppe mit hoher Krankheitsaktivität. Die Arbeit von Leden et al. bestätigt inadäquate Reaktionen der Herzfrequenz auf Orthostase nur für Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (Leden et al. 1983).

#### *tiefe Atmung/ DBT*

*Signifikant mehr RA- als OA-Patienten unserer Studie zeigten pathologische Ergebnisse im DBT (51,1% versus 31,6%) und damit pathologisch niedrige Aktivität des Parasympathikus unter Stress*. In beiden Gruppen *stieg die RMSSD im Vergleich zur Ruhe* signifikant, was das Ansprechen der Probanden auf den Test belegt. Sowohl die *absoluten Werte der RMSSD waren aber für RA signifikant niedriger* als auch die Differenz zwischen Stressbelastung und Ruhe tendenziell kleiner (n.s.). Auch die bei RA-Patienten *signifikant niedrigere MCR* bestätigte die Hypoaktivität des Parasympathikus. Die wenigen bisherigen Studien zur Belastung von RA-Patienten im DBT sprachen entweder ebenfalls für (Louthrenoo et al. 1999) oder gegen (Piha und Voipio-Pulkki 1993) eine pathologische Reaktion. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie stehen eindeutig im Einklang mit Ergebnissen anderer Teile der noch erweiterten Testbatterie innerhalb unserer Untersuchungen und wurden zudem mittels gut evaluierter moderner Werte wie RMSSD und MCR beurteilt. Eine schwächere Atemleistung der RA-Patienten ist nicht anzunehmen, da pulmonale Erkrankungen zu den Ausschlusskriterien der Studie zählten. Lediglich die nötige Mitarbeit

der Patienten könnte die Ergebnisse beeinflusst haben.

#### *Valsalva-Test*

Auch im Valsalva-Test zeigte sich für RA-Patienten in der vorliegenden Arbeit *signifikant häufiger ein pathologisches Zusammenspiel von SNS und PNS* im Vergleich zu OA-Patienten (autonome Dysfunktion im Valsalva bei 33.3% der RA-Patienten versus 14% der OA-Patienten). Dieses Ergebnis entspricht dem anderer Autoren, die mittels klassischer Ewing-Testsbatterie den Valsalva-Quotienten untersucht hatten (Perry et al. 1989; Toussirost et al. 1993). Es betont, dass beide Schenkel des ANS im Zusammenspiel unter Stress inadäquat reagieren.

#### *Messung der sympathischen Sudomotoraktivität mittels SSR*

Zur Vervollständigung der Untersuchung des ANS bei RA kam neben kardialen Tests die Messung der autonomen Funktion über elektrodermale Reize zur Anwendung. Interessanterweise zeigte sich auch hier eine für RA-Patienten *signifikant niedrigere Aktivität des sympathisch modulierten Sudomotorsystems* (z.T. niedrigere Amplituden, kürzere Latenzen). Dies steht im Einklang mit einer von anderen Autoren gezeigten verminderten Schweißproduktion als Reaktion auf intradermale Injektion von Nikotin (Kalliomäki 1963) oder Ach (Bennet et al. 1965) bei RA-Patienten. Die SSR-Messwerte der vorliegenden Studie *unterschieden sich allerdings nur innerhalb der Normgrenzen zwischen beiden Gruppen und waren insgesamt für RA nicht häufiger pathologisch* als für OA. Dies war in einer Studie an einer kleinen Zahl von RA-Patienten (n = 40) ebenfalls gezeigt worden (Gozke et al. 2003). Dabei ist die SSR ein verlässlicher Marker für Störungen kleiner nicht-myelinierter sympathischer C-Fasern innerhalb der oberflächlichen Haut und nicht sympathischer Fasern entlang intramuskulärer Gefäße. Letztere sind eher für systemische autonome Dysfunktionen, wie Störungen der Orthostase, verantwortlich (Shahani et al. 1984). Pathologische SSR-Befunde haben also eher eine Bedeutung für periphere Prozesse. Auch ist die Aussage darüber, an welcher Stelle des Reflexbogens (sensible afferente, zentrale, sympathische efferente Anteile) genau die Störung liegt, nicht sicher zu treffen, da bis heute die Physiologie hierzu nicht vollständig verstanden ist (Vetrugno et al. 2003) und pathologische Befunde bei systemischen autonomen Dysfunktionen, peripherer Neuropathie, aber auch zentralen Degenerationen, wie bei Morbus Alzheimer auftreten (Caccia et al. 1991), (Linden et al. 1995), (Illigens et al. 2009). Hierzu könnte die invasive Mikroneurographie genauer Auskunft geben. Degeneration von sympathischen Nervenfasern oder Mitbeteiligung sensibler Nerven im Rahmen einer peripheren Neuropathie bei RA könnten die Ergebnisse auch in unserer Arbeit mitbestimmen. Bennet et al. zeigten, dass durch autonome Störung bedingter Schweißverlust bei RA-Patienten meist gemeinsam mit

sensiblen Ausfällen auftritt. Allerdings hatten auch 2 von 8 Patienten Schweißausfälle ohne jegliche Zeichen von sensorischer Neuropathie, was als eigenständige klinische Bedeutung der autonomen Neuropathie gedeutet wurde (Bennet et al. 1965). Diese Punkte schränken die Interpretationsmöglichkeiten der SSR bezüglich allgemeiner ANS-Funktion bei RA-Patienten ein. Bezüglich der Durchführung wurden in der vorliegenden Arbeit sämtliche Einflussfaktoren wie Umgebungs- und Hauttemperatur, Habituation, Stärke des Stimulus, circardiane Rhythmik und Alter optimiert bzw. kontrolliert (siehe 2.3.4.1). Nicht zu beeinflussen war allerdings die Abhängigkeit von mentalem und emotionalem Zustand. Hohe Aufregung könnte zu falsch hohen Werten geführt haben (Vetrugno et al. 2003). Die vorliegende Arbeit zeigte jedoch interessanterweise einen signifikanten Zusammenhang zwischen klinischen Zeichen der Krankheitsaktivität (mehr Erosionen, höhere CRP-Werte) und längeren Latenzen, bzw. niedrigeren Amplituden der sympathischen Hautantwort bei RA-Patienten. Die Messung der Sudomotoraktivität könnte daher als klinischer Marker für Krankheitsprogression genutzt werden. Auf Grund dessen und wegen der im klinischen Setting einfach durchzuführenden und nicht-invasiven Technik, erscheint die SSR-Messung als gute Ergänzung zur Beurteilung der ANS-Funktion bei RA.

#### *Zusammenschau der Tests*

Zusammenfassend lässt sich für die Aktivität des ANS unter Stressbelastung Folgendes festhalten: Die Aktivität des PNS ist unter Stress signifikant verringert. Zusätzlich konnte eindeutig eine signifikante Hyporeaktivität gezeigt werden. Das SNS zeigt bei alleiniger Betrachtung keine signifikanten Unterschiede zu OA in Reaktion auf Stress. Jedoch erscheint sie wegen des bereits dauerhaft vorhandenen Entzündungsstressses für RA im Verhältnis zur Situation als tendenziell hypoaktiv. Zudem ist das Zusammenspiel beider Schenkel des ANS gestört (Herzfrequenz im MST, Valsalva). Prinzipiell reagieren die beiden Schenkel nicht unabhängig voneinander, sodass bei verminderter PNS-Reaktivität auch eine im Verhältnis inadäquate Aktivität des SNS unter Stress anzunehmen ist.

Entsprechend der Ausführungen zu den Ruheuntersuchungen könnte ein solches hypoaktives Stresssystem große pathophysiologische Bedeutung haben. Experimentelle Beobachtungen zeigen, dass F344 Ratten mit hyperaktivem Stresssystem resistent gegen experimentelle Induktion von Th1-Erkrankungen einschließlich Arthritis sind (Wilder 1995); (Bellinger et al. 2008). Bellinger et al. postulierten, dass ein hypoaktives SNS unter Stress zu erniedrigter Hemmung der TH1-Zellen beiträgt und damit den Shift zur anti-inflammatorischen TH2-Strecke verhindert (Bellinger et al. 2008). Unsere Untersuchungen betonen die Rolle des PNS, welches bisher in den meisten Studien zu neuro-immunmodulatorischen Zusammenhängen wenig und nur unabhängig vom SNS betrachtet wurde. Das System der RA-Patienten scheint nicht fähig, auf Stress hin seine PNS-Aktivität adäquat

anzupassen. Zum einen könnte dadurch die Aktivität des SNS negativ beeinflusst werden. Zum anderen könnte nicht nur eine erniedrigte Aktivität des PNS unter Basisbedingungen, sondern auch eine Hyporeaktivität auf zusätzlichen Stress eine Schwäche des anti-inflammatorischen cholinergen pathways bedingen und so die Krankheitssituation verschlechtern. Tatsächlich konnten unsere Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der ANS-Dysfunktion und der Krankheitsaktivität zeigen. Dazu mehr bei der Beantwortung der letzten Frage der vorliegenden Arbeit. Zunächst die Frage nach den  $\beta$ 2ARs als Schnittstelle zwischen ANS und Immunsystem:

## **2. Gibt es bei Patienten mit RA im Vergleich zu Kontrollen unterschiedliche $\beta$ 2AR-Gen-Polymorphismen? Und:**

**Gibt es bei der RA einen Zusammenhang zwischen autonomer Regulation bzw. Stressantwort und Rezeptor-Polymorphismen?**

### ***Charakterisierung der Gen-Polymorphismen der $\beta$ 2ARs als Teil des SNS***

Die RA war in der vorliegenden Studie signifikant mit gehäuftem Auftreten von Arg-Allelen sowie Arg16Gly assoziiert. Dies unterstützt Ergebnisse von Malysheva et al. (Malysheva et al. 2008). Bezüglich des Codon 27 waren RA-Patienten signifikant häufiger heterozygot für Glu27Gln im Vergleich zu Gesunden, was im Einklang mit der zweiten hierzu bereits existierenden Studie von Xu et al. steht (Xu et al. 2005). Des weiteren zeigten sich erstmals für RA-Patienten signifikant häufiger Heterozygotie für Thr164Ile und signifikant mehr Ile-Allele als für die gesunde Kontrollgruppe. Xu et al. hatten diese Position nicht untersucht (Xu et al. 2005). Der in unserer Studie erstmals durchgeführte Vergleich der Gen-Polymorphismen zwischen RA und OA ergab interessanterweise, dass kein einziger Patient mit OA Arg16Arg-homozygot war. Ansonsten gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen RA und OA. Da die Probandenzahl der Kontrollgruppe aus OA-Patienten für allgemeine Aussagen zur Genetik jedoch sehr klein war, ist ein unseren Untersuchungen zu Grunde liegender Zufall nicht auszuschließen. Hier bedarf es noch weiterer Forschung. Insgesamt zeigten sich v.a. im Vergleich zu Gesunden mit der RA assoziierte Polymorphismen, welche einen weiteren Beitrag zum genetischen Hintergrund der Erkrankung leisten könnten.

Daraus ergab sich die Frage, ob  $\beta$ 2AR-Polymorphismen als ein Teil des ANS, welcher sich direkt an der Schnittstelle zwischen autonomen Transmittern und u.a. Herz- aber auch Immunzellen befindet, einen funktionellen Beitrag zum Zusammenhang zwischen autonomer Dysregulation und letztendlich pro-inflammatorischer Reaktion leisten könnten. Dazu wurden innerhalb der RA-Gruppe Untergruppen mit den verschiedenen Polymorphismen bezüglich ihrer neurologischen Daten verglichen.

### ***Korrelation von HRV-Parametern und Gen-Polymorphismen***

Prinzipiell ist ein Einfluss der  $\beta$ 2AR-Polymorphismen auf immunmodulatorische Effekte der Katecholamine nach der bisherigen Forschung an verschiedenen anderen Krankheiten aus zwei Gründen denkbar: Zum einen sind funktionelle Unterschiede einiger Polymorphismen bezüglich ihrer Sensitivität für Katecholamine anzunehmen (Green et al. 1993). Zum anderen können sie die Rezeptor-Expression auf Immunzellen beeinflussen (McGraw et al. 1998). Die Gly16-Variante führt in vitro in glatten Muskelzellen menschlicher Atemwege und Fibroblasten von Hamstern zu stärkerer Down-Regulation des Rezeptors nach Agonist-Stimulation, als die Arg16-Variante (Brodde et al. 2005). Dies spricht für eine verminderte Down-Regulation der Rezeptoren bei laut unseren Ergebnissen für RA typischen Polymorphismen. Das steht zunächst im Widerspruch zu bei RA insgesamt verminderter Dichte von  $\beta$ 2ARs im Verlauf der Erkrankung, welche auch zu erhöhter Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt (Wahle et al. 2005). Allerdings tritt bei RA besonders die heterozygote Variante des Gens auf, weshalb zu spekulieren wäre, dass nur der für die Down-Regulation resistente Teil der Rezeptoren „übrig bleibt“ und dann in so geringer Zahl letztendlich durch niedrige Dosen von wirkendem NA für pro-inflammatorische Effekte sorgt. Daneben könnte die unterschiedliche Sensitivität der Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen. Da Gly16 Rezeptoren verstärkt down-reguliert werden (Brodde et al. 2005), ist auch eine erhöhte Sensitivität für NA denkbar. Dann könnte NA stärker auf die mit diesen Rezeptoren besetzten Th1-Zellen wirken und so die Produktion inflammatorischer Zytokine durch diese hemmen. Diese Annahme wird durch die Beobachtung neuerer Studien unterstützt, die zeigten dass Homozygotie für Gly16 mit schweren Asthmaverläufen (im Sinne der Notwendigkeit von Kortikoid- oder Immuntherapie) und erhöhtem Risiko für nächtliche Asthmasymptome einhergeht (Ramsay et al. 1999), (Turki et al. 1995). Asthma ist eine Th2-gewichtete Krankheit. Hingegen könnten die weniger down-regulierten Arg16-Rezeptor-Varianten weniger sensitiv auf Katecholamine sein, somit eine Hemmung der pro-inflammatorischen Th1-Antwort durch NA verhindern und zu einer TH1-gewichteten Erkrankung wie der RA führen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Arg16 gehäuft zu Th1-vermittelter Tachyphylaxie führt (Liggett et al. 2000), (Malysheva et al. 2008). Die Ergebnisse passen auch zu den neuerdings verstärkt in den Fokus gerückten Betrachtungen zu den gegensätzlichen Wirkungen von NA in verschiedenen Krankheitsstadien (Bellinger et al. 2008). Am Anfang der Erkrankung wenig down-regulierte Arg16-Rezeptor-Varianten könnten durch zu diesem Zeitpunkt pro-inflammatorische Wirkungen von NA einen permissiven Effekt für die Entstehung der Krankheit haben. Dies passt auch zur beobachteten Tendenz zu früherem Alter bei Erstdiagnose für Arg16Gly-Träger im Vergleich zu Gly16Gly-Trägern. Später könnten die dann in etwas kleinerer Zahl vorhandenen und

gleichzeitig eventuell weniger sensitiven Rezeptoren anti-inflammatorische Effekte von NA verhindern. Rezeptoren mit Glu27 erscheinen ebenfalls resistent gegen Down-Regulation in vitro an Hamster-Fibroblasten (Green et al. 1994). Ähnliche Mechanismen wie für Codon 16 könnten eine Rolle spielen. Schließlich könnte auch die in unserer Arbeit gezeigte Assoziation zwischen RA und Thr164Ile-Rezeptor-Polymorphismen für die Pathogenese der RA von Bedeutung sein. In vitro wurde für Thr164Ile eine erniedrigte Affinität für Katecholamine gefunden (Green et al. 1993). Auch in vivo zeigen sich verringerte Antworten des Herzens auf Agonist-Stimulation bei Menschen mit Heterozygotie für Thr164Ile (Bruck et al. 2003). Es besteht eine Assoziation zwischen Thr164Ile und erhöhtem systolischen und diastolischen Blutdruck (Thomsen et al. 2011). Es kann also spekuliert werden, dass eine verminderte Sensitivität der mit Rezeptoren dieses Polymorphismus besetzten Th1-Zellen die Wirkung von NA abschwächt und so zum Th1-Shift bei RA beiträgt. Letztendlich basieren viele dieser Überlegungen auf Modellen aus anderen Krankheiten, bleiben für die RA spekulativ und bedürfen weitere gezielter Forschung an RA-Modellen in vitro oder in klinischen Studien. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals für die RA nach einem Zusammenhang zwischen den mit der Krankheit assoziierten Polymorphismen und den über die HRV gemessenen Daten zur autonomen Aktivität gesucht:

Für die Ruheuntersuchungen ließen sich keine signifikanten Zusammenhänge zeigen. Bei den Untersuchungen unter Stress ergaben sich interessante Tendenzen. Der LF/HF-Quotient (Marker für das Überwiegen des SNS gegenüber dem PNS bei zu niedriger PNS-Aktivität) war unter mentaler Stressbelastung für Arg16-Homozygote höher als für andere Gen-Varianten. Dieser Polymorphismus ist gehäuft mit RA assoziiert. Das ist besonders interessant, da ein solch erhöhter Quotient auch signifikant mit höherer Krankheitsaktivität assoziiert war. Die SNS-Aktivität (LF) dieser Patienten nahm außerdem unter mentaler Stressbelastung ab, statt zu steigen, wie in den anderen Gruppen mit für RA selteneren Polymorphismen. Die Arg16Arg-Variante des Gens könnte also tendenziell mit der Hypoaktivität des SNS-Stresssystems assoziiert sein. Eine niedrigere Sensitivität dieses Rezeptors für NA (Brodde et al. 2005) könnte dies bedingen. Auch die mit RA-assoziierten Polymorphismen Thr164Ile (vergleichsweise niedrige LF-Werte im MST) und Ile164Ile (niedrigere HRV in MST und Valsalva) zeigten Tendenzen zu einer Assoziation mit einem hypoaktivem SNS. Ein Einfluss der Polymorphismen auf Effekte des ANS auf Herz und Immunsystem lässt sich aber bestenfalls vermuten. Die Tendenzen waren nicht signifikant. Das könnte zum einen daran liegen, dass die Schlussfolgerungen in unserer Arbeit über Effekte an den Rezeptoren des Herzens getroffen wurden und in anderem Mileau aus umgebenden Transmittern und Zytokinen auf Immunzellen doch über andere Mechanismen wirken könnte. Ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen und über Immunzellen

vermittelte Entzündungsaktivität würde sich dann eventuell nicht in einem Zusammenhang zwischen HRV-Werten und Polymorphismen widerspiegeln. Es könnte sich auch um einen Fehler zweiter Art handeln, der v.a. durch für die Genetik niedrige Fallzahlen für den Vergleich zu Stande gekommen sein könnte.

Wenige andere Arbeiten hatten für RA einen Zusammenhang zwischen  $\beta$ 2AR-Polymorphismen und der Wirkung auf Herz, Gefäße und Krankheitsbeginn gezeigt: Arg16-Träger zeigen häufiger arterielle Hypertonie. Das Alter bei Erstdiagnose scheint früher (Malysheva et al. 2008). Unsere Arbeit hat erstmalig ANS-Funktion und Verteilung von  $\beta$ 2ARs sowie deren Zusammenhang zu Klinik und ANS an ein und den selben Patienten umfassend untersucht. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen mittels HRV gemessener ANS-Funktion und Polymorphismen konnte jedoch nicht gezeigt werden. Weitere Forschung an mehr Patienten, im Vergleich zwischen RA und Gesunden, aber auch mehr OA-Patienten sowie an experimentellen Modellen, bei denen ANS-Effekte direkt an Entzündungszellen (nicht indirekt über das Herz) gemessen und in Zusammenhang mit Polymorphismen untersucht werden, könnten Aufschluss bringen. Solch weitere Forschung könnte lohnenswert sein, denn interessanterweise konnten unsere Ergebnisse eine direkte klinische Bedeutung sowohl der bereits diskutierten Dysfunktion des ANS in Ruhe und in Reaktion auf Stress, als auch der Rezeptor-Polymorphismen zeigen:

### **3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen klinischen Daten und autonomer Aktivität bzw. $\beta$ 2AR-Polymorphismen bei RA-Patienten?**

#### ***HRV und klinische Parameter***

Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (DAS > 5,1) zeigten in 54,5% pathologische Gesamtest-Ergebnisse, wohingegen nur 33,3% der Patienten in Remission (DAS < 2,6) pathologische Werte hatten. Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Anichkov et al., welche einen signifikanten Zusammenhang zwischen niedrigen HRV-Parametern und hoher Krankheitsaktivität gezeigt hatten (Anichkov et al. 2007). In unserer Arbeit zeigten Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (DAS > 5,1) signifikant niedrigere parasympathische Aktivität (HF) in Ruhe, als Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS 2,6- 3,2). Auch Goldstein et al. untersuchten die parasympathische Aktivität bei RA-Patienten in Ruhe mit Werten aus frequency (HF)-und time(RMSSD)-domain und fanden ebenfalls einen Zusammenhang zwischen DAS und niedriger PNS-Aktivität, allerdings nur, wenn sie die gesunde Kontrollgruppe in den Vergleich mit einbezogen (Goldstein und Bruchfeld 2007). Außerdem fanden sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen erniedrigter PNS-Aktivität und erhöhter Produktion des für die RA bedeutenden Zytokins High Mobility Group Box-1 (Goldstein und Bruchfeld 2007). Holman et al. untersuchten in Ihrer Studie den

Zusammenhang zwischen HRV-Parametern und dem Ansprechen auf eine anti-TNF-Therapie (beurteilt anhand das DAS28) und konnten zeigen, dass ein schlechtes Therapie-Ansprechen mit niedriger PNS-Aktivität einhergeht (Holman und Edmund 2008). Unsere Daten unterstützen die Vermutung, dass eine erniedrigte PNS-Aktivität einen wichtigen Beitrag zur Pathogenese der RA beim Menschen leisten könnte. Weiter zeigten Patienten mit hoher Krankheitsaktivität (DAS > 5,1) signifikant höhere LF/HF-Quotienten, als Patienten mit niedriger Krankheitsaktivität (DAS 2,6- 3,2). Der Sympathikus überwog bei höherer Krankheitsaktivität stärker dem Parasympathikus. Das Zusammenspiel beider Schenkel war inadäquat. Dass dieser Unterschied auch unter mentaler Stressbelastung bestehen blieb, lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass die Aktivität des ANS insgesamt in Reaktion auf Stress unflexibel war und sich daher im Vergleich zur Ruhe in allen Gruppen nur wenig änderte. Auch Kuis et al. hatten nur für Patienten mit aktiver Krankheit (definiert durch Gelenkschwellungen, Bewegungseinschränkung, erhöhte Temperatur oder Schmerz) autonome Dysfunktionen im Vergleich zu Gesunden festgestellt (Kuis et al. 1996). Andere Studien sprechen gegen einen Zusammenhang zur Klinik und schließen daher auf eine nur subklinische Bedeutung der autonomen Dysfunktionen. Diese Studien hatten allerdings nur Patienten mit gerade diagnostizierter RA untersucht (Dekkers et al. 2004) oder ausschließlich die Ewing-Testbatterie ohne moderne HRV-Messungen genutzt (Louthrenoo et al. 1999), (Toussirot et al. 1993). Auch wurden zur Beurteilung der Krankheitsaktivität verschiedene Kriterien herangezogen. In unsere Studie wurde mit Hilfe des DAS-Scores ein breites Band aus subjektiven und objektiven Maßen verwendet. Eine klinische Bedeutung der autonomen Dysfunktion konnte damit gezeigt werden.

### ***β2AR-Gen-Polymorphismen bei RA und Klinik***

Sollten die mit RA assoziierten β2AR-Gen-Polymorphismen als Teil des ANS ebenfalls einen Beitrag zur Pathogenese der Krankheit leisten, so müssten sich auch die verschiedenen Gen-Varianten im Krankheitsverlauf der jeweiligen Patienten widerspiegeln. Daher wurde innerhalb der RA-Gruppe untersucht, ob Zusammenhänge zwischen jeweiligem Polymorphismus und klinischen Parametern bestehen. Tatsächlich zeigten die bei RA signifikant häufiger vorkommenden Arg-Carrier einen Trend zu höheren CRP-Werten und in Heterozygotie mit Arg16Gly ein tendenziell früheres Alter bei Erstdiagnose (n.s.). Dies war nicht signifikant, entspricht aber Daten von Malysheva et al., die eine positive Assoziation zwischen Arg-Carriern und frühem Alter bei Erstdiagnose sowie signifikant höheren anti-CCP-AK zeigen konnten (Malysheva et al. 2008). Die vorliegende Arbeit erbrachte v.A. einen signifikanten Zusammenhang zwischen Polymorphismen des Codons 27 und der Krankheitsaktivität. Die bei Gesunden signifikant häufiger auftretenden Gln27Gln-Homozygoten gingen auch bei RA-Patienten mit signifikant niedrigeren DAS-Werten einher

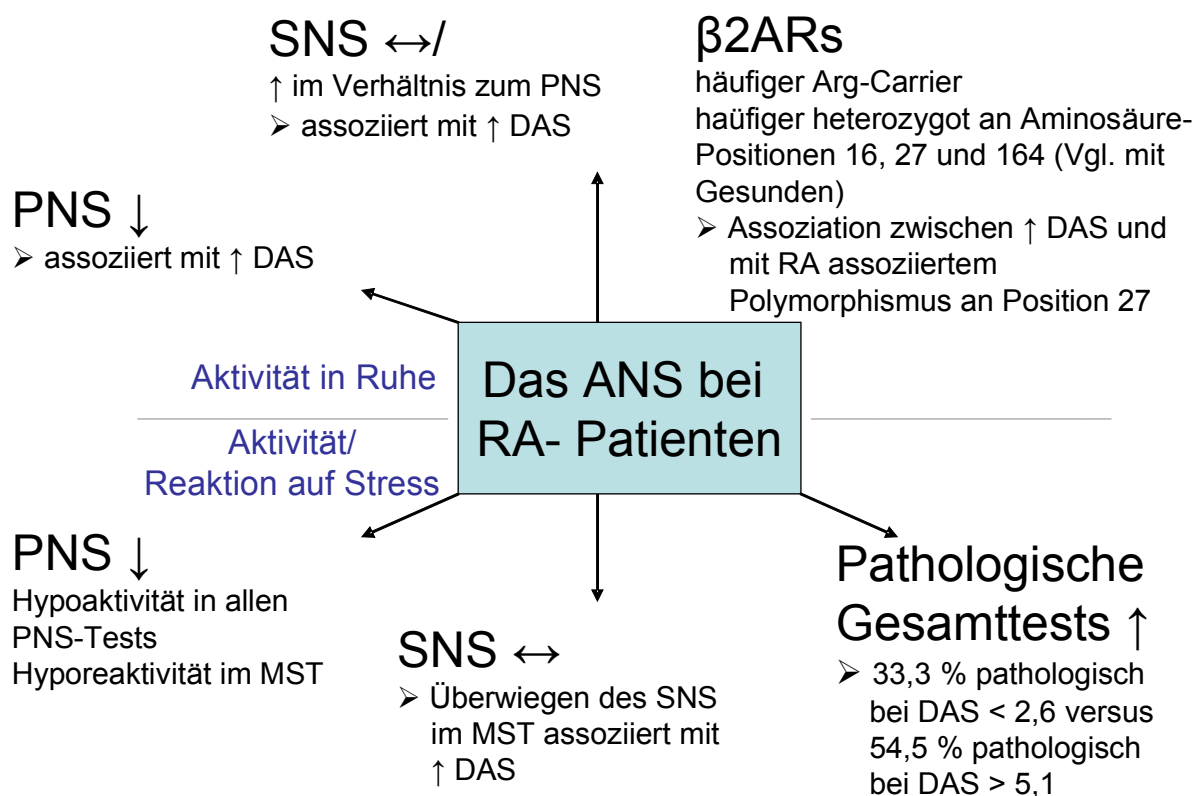


als Glu17Glu-Träger. Auch die häufiger mit RA assoziierten Heterozygoten mit Gln27Glu zeigten höhere DAS-Werte als Gln-Homozygote.

### Allgemeine und klinische Bedeutung der Ergebnisse

Die Bedeutung der vorliegenden Ergebnisse lässt sich schließlich in folgenden Punkten zusammenfassen:

1. Die gezeigten Erkenntnisse ermöglichen tiefere Einblicke in die noch weitgehend ungeklärte Pathogenese und Ätiologie der RA. Das übergeordnete Ziel der Arbeit war die genauere Charakterisierung des ANS von RA-Patienten in Ruhe sowie unter Stresseinwirkung. Abbildung 23 fasst die signifikanten Ergebnisse hierzu nocheinmal zusammen.



**Abb. 23: Signifikante Veränderungen der Aktivität des autonomen Nervensystems (ANS) bei RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten und die Zusammenhänge zur Krankheitsaktivität (DAS = disease activity score; MST = mental stress test; ↑/↓/↔= Aktivität erhöht/erniedrigt/gleich)**

Insgesamt ist die *Aktivität des ANS* bei RA im Vergleich zu OA als inadäquat in Ruhe und in Reaktion auf Stress zu charakterisieren. Dies könnte durch inadäquate Dosen von Katecholaminen sowie im Rahmen eines hypoaktiven anti-inflammatorischen cholinergen pathways von pathophysiologischer Bedeutung sein. Als Teil einer defekten stress response

könnte die Dysfunktion des ANS zur gestörten Homöostase bei RA beitragen.

2. Die Messung der autonomen Aktivität mit Hilfe der Herzratenvariabilität erbrachte interessante Zusammenhänge zur Krankheitsaktivität der RA-Patienten. Da es sich um eine im klinischen Setting unkompliziert anzuwendende Methode handelt, könnten einige Werte für die direkte Patientenversorgung als Marker für die Krankheitsaktivität (hoher DAS bei hohen LF/HF-Quotienten oder niedrigen HF-Werten) Verwendung finden.

3. Schließlich könnten sich langfristig neue Therapieoptionen ergeben. Ein Therapieziel hierbei wäre die Wiederherstellung der Balance des ANS, z.B. über eine gezielte Beeinflussung der  $\beta$ 2ARs als Schnittstelle zwischen ANS und IS. Die vorliegende Arbeit bekräftigt die Annahme eines Beitrags von Gen-Polymorphismen der  $\beta$ 2ARs zur Pathogenese dieser Autoimmunerkrankung. Experimentelle Studien mit Agonisten und Antagonisten an  $\beta$ 2ARs erbrachten bisher widersprüchliche Ergebnisse (Koopman und Stoof 2011), (Bellinger et al. 2008). Neue experimentelle Studien zur Auswirkung von Agonist- oder Antagonist-Stimulation, welche nicht nur verschiedene Wirkungen zu verschiedenen Krankheitsstadien, sondern auch die verschiedenen genetischen Rezeptor-Varianten für RA beachten, könnten wertvolle neue Erkenntnisse bringen. Außerdem betonten die Ergebnisse unserer Studie die Bedeutung einer Dysfunktion des Parasympathikus und stehen damit im Einklang mit bereits veröffentlichten Experimenten: Agonisten für  $\alpha$ 7n-Ach-Rezeptoren mildern z.B. signifikant Kollagen-induzierte Arthritis im Tierexperiment mit Mäusen (van Maanen et al. 2010). Auch an Blutproben von 13 RA-Patienten konnten Ach-Agonisten die Produktion von anti-TNF signifikant senken (Bruchfeld et al. 2010). Unsere Arbeit bestärkt den Nutzen weiterer Forschung an diesem Punkt, um derartige Ergebnisse zu erhärten.

Schließlich bleibt die Erkenntnis zum Stress. Wie einleitend dargestellt, ist das ANS ein zentraler Vermittler einer adäquaten Stressantwort und somit zu einem bedeutenden Anteil an der Wiederherstellung der Homöostase des Körpers beteiligt. Das ANS der RA-Patienten kann im Zusammenspiel mit den anderen Organsystemen des Körpers, wie dem Immunsystem, nicht adäquat auf Stress reagieren. Ergänzend zu allen Therapieoptionen der heutigen Zeit erscheint Stressprävention damit für RA-Patienten als eine sinnvolle Möglichkeit. Meditation (Pradhan et al. 2007), Tai Chi (Wang 2011), Yoga (Bosch et al. 2009), gesunde Ernährung und Sport (Review bei Malysheva et al. 2010) könnten die ohnehin durch die Krankheit gestressten Patienten (Bugajska et al. 2010) von zusätzlichem Alltagsstress befreien und ihre Lebensqualität verbessern.

## 5. Zusammenfassung

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

Charakterisierung des autonomen Nervensystems in Ruhe sowie unter Stresseinwirkung bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis

eingereicht von:

Anke Esber

angefertigt an der Universität Leipzig, Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Abteilung Rheumatologie

betreut von:

Prof. Dr. med. Ch. Baerwald, Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Abteilung Rheumatologie, Universität Leipzig

Dr. med. O. Malysheva, Klinik für Gastroenterologie und Rheumatologie, Abteilung Rheumatologie, Universität Leipzig

Juli 2013

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronisch-entzündliche Systemerkrankung, deren multifaktorielle Ätiologie und Pathogenese noch weitgehend unbekannt sind. Neben dem Immunsystem spielt u.a. das autonome Nervensystem (ANS) eine Rolle. Zwischen beiden Systemen bestehen enge anatomische und funktionelle Verbindungen. Vor einem permissivem genetischen Hintergrund werden zudem verschiedene Umweltfaktoren diskutiert, die Beginn und Verlauf der Autoimmunkrankheit mitbestimmen könnten. Mehrere Studien der letzten Jahre konnten einen negativen Einfluss von mildem Stress auf die Krankheitsaktivität belegen. Stress stört das innere Gleichgewicht, die Homöostase. In einem gesunden Körper kann diese durch eine intakte Stressantwort, welche durch zentrales Nervensystem, Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden/-Gonaden-Achse und ANS vermittelt wird, schnell wieder hergestellt werden. Aktuelle Studien weisen für die RA jedoch auf Dysregulationen neuro-endokriner-immunologischer Interaktionen hin, wobei besonders bezüglich der Rolle des ANS noch Vieles unbekannt oder widersprüchlich ist.

Die vorliegende Arbeit hatte daher zum Ziel das ANS sowie Gen-Polymorphismen  $\beta$ 2-adrenerger Rezeptoren ( $\beta$ 2ARs) bei Patienten mit RA genauer zu charakterisieren. Sie ging der These nach, dass autonome Dysregulationen in Ruhe und in Reaktion auf Stress bestehen, welche den Krankheitsverlauf sowie Auswirkungen von Stress auf die Krankheit

mitbestimmen.

Dazu wurden in einer prospektiven Querschnittsstudie von allen Patienten aktuelle klinische Parameter zur Krankheitsaktivität (z.B. disease activity score= DAS), mittels PCR Gen-Polymorphismen sowie neurologische Funktionsparameter erhoben und schließlich alle Daten auf mögliche Zusammenhänge hin untersucht. Der neurologischen Funktionsdiagnostik lag das Prinzip zu Grunde indirekt, über die Messung von Effekten des ANS auf Effektororgane wie Herz (Herzratenvariabilitätsmessung= HRV) und Haut (Messung sympathischer Hautantwort auf Stromreiz= SSR), auf die autonome Aktivität zu schlussfolgern. Die Messungen erfolgte in Ruhe und unter Stressbelastung durch mentalen Stress beim Rechnen oder physischen Stress durch Orthostase-Test, Valsalva-Test und tiefe Atmung, was die einzelnen Schenkel des ANS gezielt stimulieren sollte. Folgenden Fragen wurde nachgegangen:

#### 1. Haben Patienten mit RA autonome Regulationsstörungen?

RA-Patienten zeigten bereits unter Basisbedingungen eine signifikant erhöhte Herzfrequenz ( $p = 0,008$ ), was für eine im Verhältnis zum Parasympathikus überwiegende Sympathikus-Aktivität spricht, sowie eine signifikant erniedrigte Parasympathikus-Aktivität ( $p = 0,038$ ). Weiterhin hatten RA-Patienten signifikant häufiger pathologische Reaktionen auf Stresstests ( $p = 0,003$ ). Dabei war im Einzelnen sowohl der Valsalva-Test, welcher beide Schenkel des ANS stimuliert, als auch der Atemtest zur Stimulation des Parasympathikus signifikant häufiger pathologisch ( $p=0,024/ 0,045$ ). Qualitativ betrachtet war die Reaktion des ANS der RA-Patienten v.a. durch signifikante Hypoaktivität des Parasympathikus (RMSSD:  $p= 0,011$ ) gekennzeichnet. Zur Beurteilung der Reaktivität des ANS wurden Differenzen aus Stress- und Ruhe-Parametern zwischen RA und OA verglichen. Hier zeigte sich eine signifikante Hyporeaktivität des Parasympathikus (Differenz RMSSD mentaler Stress- Ruhe;  $p= 0,03$ ).

Die Latenzen und Amplituden der sympathischen Hautantwort (SSR) befanden sich innerhalb der Normgrenzen.

Zusammenfassend ist die Aktivität des ANS bei RA-Patienten als inadäquat in Ruhe und in seiner Reaktion auf Stress zu charakterisieren.

#### 2. Gibt es bei Patienten mit RA im Vergleich zu Kontrollen eine unterschiedliche Verteilung von Gen-Polymorphismen im $\beta 2AR$ ? Diese Rezeptoren befinden sich u.a. auf den in der Immunpathogenese der Krankheit zentralen Th1-Zellen und bilden somit eine direkte Schnittstelle zwischen ANS und Immunsystem. Daher weiter die Frage: Gibt es einen Zusammenhang zwischen autonomer Regulation und Rezeptor-Polymorphismen?

Die Verteilung der Gen-Polymorphismen der  $\beta 2ARs$  auf Chromosom 5 q 31-32 ergab an

allen relevanten Aminosäurepositionen (16, 27, 164) signifikante Unterschiede zwischen RA und Gesunden und könnte damit einen zusätzlichen Beitrag zum genetischen Hintergrund der Krankheit leisten. RA-Patienten sind signifikant häufiger heterozygot für Arg16Gly ( $p < 0,0001$ ) und signifikant häufiger Arg-Carrier ( $p < 0,0001$ ). Desweiteren zeigen sie sich signifikant häufiger heterozygot für Gln27Glu ( $p = 0,04$ ) und Thr164Ile ( $p < 0,001$ ) als Gesunde. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen Polymorphismen und HRV-Messdaten ergab sich nicht.

3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen klinischen Daten und autonomer Aktivität bzw.  $\beta$ 2AR-Polymorphismen bei RA-Patienten, welche eine klinische Relevanz einer autonomen Dysfunktion vermuten lassen?

Sowohl autonome Funktionsparameter aus HRV-Tests (HF; LF/HF-Quotient) als auch mit RA assoziierte Polymorphismen korrelierten signifikant mit der Krankheitsaktivität der RA-Patienten. Gln27Gln (signifikant häufiger bei Gesunden) war signifikant mit niedrigerem DAS assoziiert. Ein starkes Überwiegen des SNS in Ruhe sowie eine niedrige parasympathische Aktivität gingen mit hoher Krankheitsaktivität einher. Auch waren hohe Latenzen und niedrige Amplituden im SSR-Test signifikant mit höheren Entzündungsmarkern (Erosionen, CRP) assoziiert. Damit wurde die klinische Relevanz der beobachteten autonomen Dysfunktion gezeigt.

Die vorliegenden Daten ermöglichen einen weiteren Einblick in die ungeklärte Pathogenese der RA. Sie erhärten die These, dass autonome Dysregulationen im Sinne von Hypoaktivität in Ruhe und Hyporeaktivität der autonomen Stressantwort zum Krankheitsverlauf bei RA beitragen könnten. Der Sympathikus könnte sich über im Verhältnis zur Entzündungssituation inadäquate NA-Dosen oder veränderte Interaktion mit polymorphen  $\beta$ 2AR negativ auf die Krankheitsaktivität auswirken. Der Parasympathikus könnte im Rahmen eines hypoaktivem anti-inflammatorischen cholinergen pathways von pathophysiologischer Bedeutung sein. Die Bedeutung der autonomen Dysregulation sowie der mit RA assoziierten Rezeptor-Polymorphismen wurde zudem durch die gezeigte klinische Relevanz unterstrichen. Schon jetzt könnten HRV-Parameter im klinischen Setting als Marker für Krankheitsaktivität getestet werden und es lässt sich die therapeutische Konsequenz ziehen, dass gezielte Stressbewältigungsprogramme die Lebensqualität von Patienten verbessern könnten. Weitere Zellversuche und in-vivo-Studien an mehr Patienten könnten tiefere Einblicke in die Rolle des ANS bei der Pathogenese der RA ermöglichen und neue Optionen zur Diagnostik und Therapie der Krankheit eröffnen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Akselrod S (1981): Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat- to- beat cardiovascular control. *Science* 213 (4504): 220–222.
2. Al'Absi M, Bongard S, Buchanan T et al. (1997): Cardiovascular and neuroendocrine adjustment to public speaking and mental arithmetic stressors. *Psychophysiology* 34 (3): 266–275.
3. Aletaha D, Neogi T, Silman AJ et al. (2010): 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/ European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis & Rheumatism* 62 (9): 2569–2581.
4. Altman R, Alarcón G, Appelrouth D et al. (1990): The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hand. *Arthritis & Rheumatism* 33 (11):1601–1610.
5. Andrew J Holman, Edmund Ng (2008): Heart rate variability predicts anti-tumor necrosis factor therapy response for inflammatory arthritis. *Autonomic Neuroscience* 143 (1-2): 58–67.
6. Anichkov DA, Shostak NA, Ivanov DS (2007): Heart rate variability is related to disease activity and smoking in rheumatoid arthritis patients. *International Journal of clinical practice* 61 (5): 777–783.
7. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch et al. (1988): The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 31 (3): 315–324.
8. Aydemir M, Yazisiz V.; Basarici I et al. (2010): Cardiac autonomic profile in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Lupus* 19 (3): 255–261.
9. Baerwald C, Graefe C, Muhl C et al. (1992): Beta 2-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatic diseases. *European Journal of clinical investigation* 22 (1): 42.46.
10. Baerwald CG, Burmester GR, Krause A (2000): Interactions of autonomic nervous, neuroendocrine and immune systems in rheumatoid arthritis. *Rheumatic diseases clinics of North America* 26 (4): 841–857.
11. Baerwald CG, Laufenberg M, Specht T et al. (1997): Impaired sympathetic influence on the immune response in patients with rheumatoid arthritis due to lymphocyte subset-specific modulation of beta 2-adrenergic receptors. *British journal of*

- rheumatology* 36 (12): 1262–1269.
12. Bax M, van Heemst J, Huizinga TWJ et al. (2011): Genetics of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Immunogenetics* 63 (8): 459–466.
  13. Bellinger DL, Millar BA, Perez S et al. (2008): Sympathetic modulation of immunity: relevance to disease. *Cell Immunology* 252 (1-2): 27–56.
  14. Bennett PH, Scott JT (1965): Autonomic neuropathy in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 24 (24): 161–168.
  15. Bernik TR (2002): Pharmacological Stimulation of the Cholinergic Antiinflammatory Pathway. *Journal of Experimental Medicine* 195 (6): 781–788.
  16. Bigger JT Jr, Kleiger RE, Fleiss JL et al. (1988): Components of heart rate variability measured during healing of acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* 61 (4): 208–215.
  17. Bijsterbosch J, Watt I, Meulenbelt I et al. (2010): Clinical burden of erosive hand osteoarthritis and its relationship to nodes. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (10): 1784–1788.
  18. Boettger MK, Greiner W, Rachow T et al. (2010): Sympathetic skin response following painful electrical stimulation is increased in major depression. *Pain* 149 (1): 130–134.
  19. Bosch PR, Traustadóttir T, Howard P et al. (2009): Functional and physiological effects of yoga in women with rheumatoid arthritis: a pilot study. *Alternative Therapies in health and medicine* 15 (4): 24–31.
  20. Bowes J, Barton A (2007) Recent advances in the genetics of RA susceptibility. *Rheumatology* 47 (4): 399-402
  21. Brasil-Neto JP, Gonçalves CA, Araújo CD et al. (1998): Circadian latency variability of sympathetic skin responses. *Clinical Autonomic Research* 8 (4): 237–239.
  22. Brodde OE, Leineweber K (2005): Beta2-adrenoceptor gene polymorphisms. *Pharmacogenetics and Genomics* 15 (5): 267–275.
  23. Bruchfeld A., Goldstein RS, Chavan S et al. (2010): Whole blood cytokine attenuation by cholinergic agonists ex vivo and relationship to vagus nerve activity in rheumatoid arthritis. *Journal of Internal Medicine* 268 (1): 94-101
  24. Bruck H, Leineweber K, Ulrich A et al. (2003): Thr164Ile polymorphism of the human beta2-adrenoceptor exhibits blunted desensitization of cardiac functional responses in vivo. *American Journal of Physiology. Heart Circulation Physiology.* 285 (5): 2034–2038.

25. Buchs N, di Giovine FS, Silvestri T et al. (2001): IL-1B and IL-1Ra gene polymorphisms and disease severity in rheumatoid arthritis: interaction with their plasma levels. *Genes and Immunity* 2(4):222–228.
26. Bugajska J, Brzosko M, Jędryka-Góral A et al. (2010): Psychological stress in rheumatoid arthritis patients: a comparative Polish–German study. *Autoimmunity Reviews* 9 (4): 211–215.
27. Buijs RM, van der Vliet J, Garidou ML et al. (2008): Spleen Vagal Denervation Inhibits the Production of Antibodies to Circulating Antigens. *PLoS ONE* 3 (9): e3152.
28. Caccia MR, Dezuanni E, Salvaggio A et al. (1991): Sympathetic skin response versus maximum motor and sensory conduction velocity to detect subclinical neuropathy in non-insulin-dependent diabetics. *Acta Neurologica Belgica* 91 (4): 213–222.
29. Carlton VE, Hu X, Chokkalingam AP et al. (2005): PTPN22 genetic variation: evidence for multiple variants associated with rheumatoid arthritis. *Annual Journal of Human Genetics* 77(4):567–581
30. Charmandari E, Tsigos C, Chrousos G (2005) Endocrinology of the stress response. *Annual Reviews in Physiology* 67(1):259–284.
31. Chelmicka-Schorr E, Checinski M, Arnason BG (1988): Chemical sympathectomy augments the severity of experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* 17 (4): 347–350.
32. Chong LK, Chowdry J, Ghahramani P et al. (2000): Influence of genetic polymorphisms in the beta2-adrenoceptor on desensitization in human lung mast cells. *Pharmacogenetics and Genomics* 10 (2): 153–162.
33. Cooles FAH, IsaacsJD (2011): Pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Current Opinion in Rheumatology* 23(3):233–240.
34. Crousos GP (1998): Stressors, Stress, and Neuroendocrine Integration of the Adaptive Response: The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Annals of the New York Academy of Sciences* 851 (1): 311-335.
35. Crousos GP (2009): Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* 5(7):374–381.
36. Cutolo M, Straub RH (2006): Stress as a risk factor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Neuroimmunomodulation* 13 (5-6): 277–282.
37. Davis MC, Zautra AJ, Younger J et al. (2008) Chronic stress and regulation of cellular markers of inflammation in rheumatoid arthritis: Implications for fatigue. *Brain*,



- Behavior, and Immunity* 22(1):24–32.
38. Dekkers JC, Geenen R, Evers AW et al. (2001): Biopsychosocial mediators and moderators of stress-health relationships in patients with recently diagnosed rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 45 (4): 307–316.
  39. Dekkers JC, Geenen R, Godaert GL et al. (2004): Elevated sympathetic nervous system activity in patients with recently diagnosed rheumatoid arthritis with active disease. *Clinical and Experimental Rheumatology* 22 (1): 63–70.
  40. Del Rey A, Wolff C, Wildmann J et al. (2010): When immune-neuro-endocrine interactions are disrupted: experimentally induced arthritis as an example. *Neuroimmunomodulation* 17 (3): 165–168.
  41. Deutsche Gesellschaft für Rheumatologie (2012): Rheumatoide Arthritis. [http://dgrh.de/qualitaetsmanual3\\_2.html](http://dgrh.de/qualitaetsmanual3_2.html). 14 May 2012
  42. Dube SR, Fairweather D, Pearson WS et al. (2009): Cumulative Childhood Stress and Autoimmune Diseases in Adults. *Psychosomatic Medicine* 71 (2): 243–250.
  43. Elenkov IJ, Chrousos GP (2006): Stress system- organization, physiology and immunoregulation. *Neuroimmunomodulation* 13 (5-6): 257–267.
  44. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP et al. (2000): The sympathetic nerve- an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacological Reviews* 52: (595-638).
  45. Evrengül H, Dursunoglu D, Cobankara V et al. (2003): Heart rate variability in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology International* 24 (4): 198–202.
  46. Ewing DJ, Clarke BF(1982): Diagnosis and management of diabetic autonomic neuropathy. *British Medical Journal* 285 (6346): 916-918.
  47. Ewing DJ, Clarke BF (1986): Autonomic neuropathy: its diagnosis and prognosis. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 15 (4): 855–888.
  48. Farrell TG, Bashir Y, Cripps T et al. (1991): Risk stratification for arrhythmic events in postinfarction patients based on heart rate variability, ambulatory electrocardiographic variables and the signal-averaged electrocardiogram. *Journal of the American College of Cardiology* 18 (3): 687–697.
  49. Feigenbaum SL, Masi AT, Kaplan SB (1979): Prognosis in rheumatoid arthritis. A longitudinal study of newly diagnosed younger adult patients. *The American journal of medicine* 66 (3): 377–384.
  50. Felten DL, Felten SY, Bellinger DL et al. (1987): Noradrenergic sympathetic neural

- interactions with the immune system: structure and function. *Immunological reviews* (100): 225–260.
51. Fishman D, Faulds G, Jeffery R et al (1998) The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. *Journal of Clinical Investigation* 102 (7):1369–1376.
  52. Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975): "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *Journal of Psychiatric research* 12 (3): 189–198.
  53. Fonseca J, Cavaleiro J, Teles J et al. (2007) Contribution for new genetic markers of rheumatoid arthritis activity and severity: sequencing of the tumor necrosis factor-alpha gene promoter. *Arthritis Research and Therapy* 9 (2):R37.
  54. Fries JF, Spitz P, Kraines R et al. (1980): Measurement of patient outcome in arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 23 (2): 137–145.
  55. Fu WP, Zhao ZH, Zhong L et al. (2011): Relationship between polymorphisms in the 5' leader cistron, positions 16 and 27 of the adrenergic beta-2 receptor gene and asthma in a Han population from southwest China. *Respirology* 16 (8) 1221- 1227
  56. Fujimori B (1956): Studies on the galvanic skin response using the current-and potential method. *The Japanese Journal of Physiology* 15 (5): 294–405.
  57. Geenen R, Godaert GL, Jacobs JW et al. (1996): Diminished autonomic nervous system responsiveness in rheumatoid arthritis of recent onset. *The Journal of rheumatology*, 23 (2): 258–264.
  58. Goldstein R, Bruchfeld A (2007): Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway Activity and High Mobility Group Box-1 (HMGB1) Serum Levels in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Molecular Medicine* 13 (3-4): 210-215.
  59. Gozke E, Erdogan N, Akyuz G et al. (2003): Sympathetic skin response and R-R interval variation in cases with rheumatoid arthritis. *Electromyography and clinical Neurophysiology* 43 (2): 81–84.
  60. Green SA, Cole G, Jacinto M et al. (1993): A polymorphism of the human beta 2-adrenergic receptor within the fourth transmembrane domain alters ligand binding and functional properties of the receptor. *Journal of Biological Chemistry* 268 (31): 23116–23121.
  61. Green SA, Turki J, Innis M et al. (1994): Amino-terminal polymorphisms of the human

- beta 2-adrenergic receptor impart distinct agonist-promoted regulatory properties. *Biochemistry* 33 (32): 9414–9419.
62. Green SA, Turki J, Hall IP et al. (1995): Implications of genetic variability of human beta 2-adrenergic receptor structure. *Pulmonary Pharmacology* 8 (1): 1–10.
63. Gregersen PK, Silver J, Winchester RJ (1987): The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 30 (11):1205–1213.
64. Grimsholm O, Rantapää-Dahlqvist S, Dalén T et al. (2008): Unexpected finding of a marked non-neuronal cholinergic system in human knee joint synovial tissue. *Neuroscience letters* 442 (2): 128–133.
65. Gundersen HJ, Neubauer B (1977): A long-term diabetic autonomic nervous abnormality. Reduced variations in resting heart rate measured by a simple and sensitive method. *Diabetologia* 13 (2): 137–140.
66. Gumpert- Anatomie (2012): <http://www.dr-gumpert.de/html/parasymphikus.html>
67. Hermann M, Schölmerich J, Straub RH (2000): Stress and rheumatic diseases. *Rheumatic diseases clinics of North America* 26 (4):737–763.
68. Herold G (2012) Innere Medizin 2012: Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Herold, Köln
69. Hirano D, Nagashima M, Ogawa R et al. (2001): Serum levels of interleukin 6 and stress related substances indicate mental stress condition in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology* 28 (3): 490–495.
70. Huston JM, Tracey KJ (2011): The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. *Journal of Internal Medicine* 269 (1): 45–53.
71. Illigens BM, Gibbons CH (2009): Sweat testing to evaluate autonomic function. *Clinical Autonomic Research* 19 (2): 79–87.
72. Imboden JB (2009) The Immunopathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *Annual Reviews of Pathology: Mechanisms of Disease* 4 (1):417–434.
73. Kalamida D, Poulas K, Avramopoulou V et al. (2007): Muscle and neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *FEBS Journal* 274 (15): 3799–3845.
74. Kalliomäki JL, Saarimaa HA, Toivanen P (1963): Axon Reflex Sweating in Rheumatoid Arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 22 (1): 46–49.

75. Kao T, Hsiao HC, Chiu HW et al. (2000): The relationship of late potentials to assessment of heart rate variability in post-infarction patients. *International Journal of cardiology* 74 (2-3): 207–214.
76. Kay LJ, Chong LK, Rostami-Hodjegan A et al. (2003): Influence of the Thr164Ile polymorphism in the beta2-adrenoceptor on the effects of beta-adrenoceptor agonists on human lung mast cells. *Internal Immunopharmacology* 3 (1): 91–95.
77. Kelsey RM, Blascovich J, Leitten C et al. (2000): Cardiovascular reactivity and adaptation to recurrent psychological stress: The moderating effects of evaluative observation. *Psychophysiology* 37 (6): 748–756.
78. Kelsey RM, Blascovich J, Tomaka J et al. (1999): Cardiovascular reactivity and adaptation to recurrent psychological stress: effects of prior task exposure. *Pathophysiology* 36 (818-831).
79. Kin NW, Sanders VM (2006): It takes nerve to tell T and B cells what to do. *Journal of Leukocyte Biology* 79 (6): 1093–1104.
80. Kirwan JR (1986): Stanford Health Assessment Questionnaire modified to assess disability in British patients with rheumatoid arthritis. *British journal of rheumatology* 25 (2): 206–209.
81. Kittner JM, Jacobs RPCR, Heijnen CJ et al. (2002): Adrenaline-induced immunological changes are altered in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 41 (9): 1031–1039.
82. Kleiger RE, Stein PK, Bigger JT JR (2005): Heart rate variability: measurement and clinical utility. *Annals of noninvasive Electrocardiology* 10 (1): 88–101.
83. Klinke R, Silbernagl HCP (2005) Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
84. Kloppenburg, Margreet; Kwok et al. (2011): Hand osteoarthritis—a heterogeneous disorder. *Nature Reviews Rheumatology* 8 (1) 22-31
85. Koopman, Frieda; Stoof, Susanne (2011): Restoring the balance of the autonomic nervous system as an innovative approach to the treatment of rheumatoid arthritis. *Mol. Med* 17 (9-10): 937–948.
86. Krause A, Henrich A, Beckh KH et al. (1992): Correlation between density of beta 2-adrenergic receptors on peripheral blood mononuclear cells and serum levels of soluble interleukin-2 receptors in patients with chronic inflammatory diseases. *European Journal of clinical investigation* 22 (1): 47–51.
87. Kuis W; van Jong-de Vos Steenwijk CCE, Sinnema G et al. (1996): The Autonomic

- Nervous System and the Immune System in Juvenile Rheumatoid Arthritis. *Brain, Behavior, and Immunity* 10 (4): 387-398.
88. Kvalvik AG, Jones MA, Symmons DP (2000): Mortality in a cohort of Norwegian patients with rheumatoid arthritis followed from 1977 to 1992. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 29 (1): 29–37.
89. Kwok WY, Kloppenburg M, Rosendaal FR et al. (2011): Erosive hand osteoarthritis: its prevalence and clinical impact in the general population and symptomatic hand osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 70 (7):1238–1242.
90. Larsen A (1995): How to apply Larsen score in evaluating radiographs of rheumatoid arthritis in long-term studies. *The Journal of rheumatology*, 22 (10): 1974–1975.
91. Larsen A (1975): A radiological method for grading the severity of rheumatoid arthritis. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 4 (4): 225–233.
92. Leden I, Eriksson A, Lilja B et al. (1983): Autonomic nerve function in rheumatoid arthritis of varying severity. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 12 (2): 166–170.
93. Levin AB (1966): A simple test of cardiac function based upon the heart rate changes induced by the Valsalva maneuver. *The American journal of cardiology* 18 (1): 90–99.
94. Levine JD, Dardick SJ, Roizen MF et al. (1986): Contribution of sensory afferents and sympathetic efferents to joint injury in experimental arthritis. *The Journal of Neuroscience* 6 (12): 3423–3429.
95. Levine JD, Fye K, Heller P et al. (1986): Clinical response to regional intravenous guanethidine in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 13 (6): 1040–1043.
96. Li J, Schiøttz-Christensen B, Olsen J (2005): Psychological stress and rheumatoid arthritis in parents after death of a child: a national follow-up study. *Scandinavian Journal of Rheumatology* 34 (6): 448–450.
97. Liggett SB (2000): beta(2)-adrenergic receptor pharmacogenetics. *American Journal of respiratory and critical care medicine* 161 (3Pt2), 197–201.
98. Linden D, Berlit P (1995): Sympathetic skin responses (SSRs) in monofocal brain lesions: topographical aspects of central sympathetic pathways. *Acta Neurologica Scandinavica* 91 (5): 372–376.
99. Lou Y, Liu J, Li Y et al. (2011): Association study of the  $\beta$ 2-adrenergic receptor gene polymorphisms and hypertension in the Northern Han Chinese. *PLoSOne* 6 (4): e18590.

100. Louthrenoo W, Ruttanaumpawan P, Aramrattana A et al. (1999): Cardiovascular autonomic nervous system dysfunction in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Q J Med* 92 (2): 97–102.
101. Lubahn CL, Schaller JA, Bellinger DL, Sweeney S et al. (2004): The importance of timing of adrenergic drug delivery in relation to the induction and onset of adjuvant-induced arthritis. *Brain, Behavior, and Immunity* 18 (6): 563–571.
102. MA J, Zhu C, Ma B, Tian J et al. (2012): Increased frequency of circulating follicular helper T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Clinical and developmental Immunology*. Epub May 2012
103. Mackay JD (1983): Respiratory sinus arrhythmia in diabetic neuropathy. *Diabetologia* 24 (4): 253–256.
104. Malfait AM, Malik AS, Marinova-Mutafchieva L et al. (1999): The beta2-adrenergic agonist salbutamol is a potent suppressor of established collagen-induced arthritis: mechanisms of action. *The Journal of Immunology* 162 (10): 6278–6283.
105. Malliani A, Pagani M, Lombardi F et al. (1991): Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation* 84 (2): 482–492.
106. Malysheva O, Pierer M, Wagner U et al. (2010): Stress und Rheuma. *Zeitschrift für Rheumatologie* 69 (6): 539–543.
107. Malysheva O, Pierer M, Wagner U et al. (2008): Association between 2 adrenergic receptor polymorphisms and rheumatoid arthritis in conjunction with human leukocyte antigen (HLA)-DRB1 shared epitope. *Annals of the Rheumatic Diseases* 67 (12): 1759–1764.
108. Manca D, Valls-Solé J, Callejas MA (2000): Excitability recovery curve of the sympathetic skin response in healthy volunteers and patients with palmar hyperhidrosis. *Clinical Neurophysiology* 111 (10): 1767–1770.
109. McCray, Courtney J, Agarwal SK (2011): Stress and Autoimmunity. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 31 (1): 1–18.
110. McGraw DW, Forbes SL, Kramer LA et al. (1998): Polymorphisms of the 5' leader cistron of the human beta2-adrenergic receptor regulate receptor expression. *Journal of Clinical Investigation* 102 (11): 1927–1932.
111. medizinaspekte:[http://www.medizinaspekte.de/2009/02rheumatoidearthritiss\\_rheuma\\_ursachen\\_5370.html](http://www.medizinaspekte.de/2009/02rheumatoidearthritiss_rheuma_ursachen_5370.html)
112. 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 (13): 2097–2107.
113. Montano N, Ruscone TG, Porta A et al. (1994): Power spectrum analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. *Circulation* 90 (4): 1826–1831.
114. Montano N, Porta A, Cogliati C, Costantino G (2009): Heart rate variability explored in the frequency domain: A tool to investigate the link between heart and behavior. *Neuroscience and biobehavioral reviews* 33 (2): 71–80.
115. Morguet A, Springer HJ (1981): Microcomputer-based measurement of beat-to-beat intervals and analysis of heart rate variability. *Medical progress through technology* 8 (2): 77–82.
116. Mravec B (2007): Autonomic dysfunction in autoimmune diseases: consequence or cause? *Lupus* 16 (9): 767–768.
117. Mullis K., Faloona F (1987): Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335–350.
118. Mutru O, Laakso M, Isomäki H et al. (1985): Ten year mortality and causes of death in patients with rheumatoid arthritis. *British Medical Journal* 290 (6484): 1797–1799.
119. Mühlhardt C (2009): Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics, 6. Ausgabe, Spektrum Akad.-Verlag, Heidelberg
120. Nance DM, Sanders VM (2007): Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987–2007). *Brain, Behavior, and Immunity* 21 (6): 736–745.
121. Nolan J, Batin PD, Andrews R et al. (1998): Prospective study of heart rate variability and mortality in chronic heart failure: results of the United Kingdom heart failure evaluation and assessment of risk trial (UK-heart). *Circulation* 98 (15): 1510–1516.
122. Nunan D, Sandercock GRH, Brodie DA (2010): A Quantitative Systematic Review of Normal Values for Short-Term Heart Rate Variability in Healthy Adults. *Pacing and Clinical Electrophysiology* 33 (11): 1407–1417.
123. O'Brien IA, McFadden JP, Corral RJ (1991): The influence of autonomic neuropathy on mortality in insulin-dependent diabetes. *The Quarterly Journal of medicine* 79 (290): 495–502.
124. Østensen M, Villiger PM, Förger F (2012): Interaction of pregnancy and autoimmune rheumatic disease. *Autoimmunity Reviews* 11 (6-7): A437-446.

125. Panayi GS (1993): The pathogenesis of Rheumatoid Arthritis: from the molecules to the whole patient. *Rheumatology* 32 (7): 533–536.
126. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ et al. (2003): The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Molecular Medicine* 9 (5-8): 125–134.
127. Perricone C, Ceccarelli F, Valesini G (2011) An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: A never-ending story. *Autoimmunity Reviews* 10 (10): 599–608.
128. Perry F, Heller PH, Kamiya J et al. (1989): Altered autonomic function in patients with arthritis or with chronic myofascial pain. *Pain* 39: 77-84.
129. Piha SJ, Voipio-Pullki LM (1993): elevated resting heart rate in rheumatoid arthritis: possible role of physical deconditioning. *Rheumatology* 32 (3): 212–215.
130. Pincus T (1983): Assessment of patient satisfaction in activities of daily living using a modified Stanford Health Assessment Questionnaire. *Arthritis & Rheumatism*, 26 (11): 1346–1353.
131. Pomeranz B, Macaulay RJ, Caudill MA et al. (1985): Assessment of autonomic function in humans by heart rate spectral analysis. *American Journal of Physiology* 248 (1Pt2): 151–153.
132. Pradhan EK, Baumgarten M, Langenberg P et al. (2007): Effect of Mindfulness-Based stress reduction in rheumatoid arthritis patients. *Arthritis & Rheumatism* 57 (7): 1134–1142.
133. Prior P, Symmons DPM, Scott DL et al. (1984): cause of death in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 23 (2): 92–99.
134. Pschyrembel (2002): Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin
135. Puszczewicz M, Iwaszkiewicz C (2011) Role of anti-citrullinated protein antibodies in diagnosis and prognosis of rheumatoid arthritis. *Archives of Medical Science* 2:189–194.
136. Ramsay H, Tiller B, Goldblatt L (1999): Polymorphisms in the beta2-adrenoreceptor gene are associated with decreased airway responsiveness. *Clinical and Experimental Allergy* 29 (9): 1195–1203.
137. Rasmussen SGF, Choi HJ, Rosenbaum DM et al. (2007): Crystal structure of the human  $\beta$ 2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature* 450 (7168): 383–387.
138. Remmers EF, Plenge RM, Lee AT et al. (2007): STAT4 and the Risk of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *New English Journal of Medicine* 357



- (10): 977–986.
139. Riede U (2004) Allgemeine und spezielle Pathologie, 5. Ausgabe. G. Thieme, Stuttgart
  140. Riise T, Jacobsen BK, Gran JT et al. (2001): Total mortality is increased in rheumatoid arthritis. A 17-year prospective study. *Clinical Rheumatology* 20 (2), 123–127.
  141. Rosas-Ballina M, Ochani M, Parrish WR et al. (2008): Splenic nerve is required for cholinergic antiinflammatory pathway control of TNF in endotoxemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (31): 11008–11013.
  142. Rosas-Ballina M, Olofsson PS, Ochani M et al. (2011): Acetylcholine-Synthesizing T Cells Relay Neural Signals in a Vagus Nerve Circuit. *Science* 334 (6052): 98–101.
  143. Rostrup M, Westheim A, Kjeldsen SE et al. (1993): Cardiovascular reactivity, coronary risk factors and sympathetic activity in young men. *Hypertension* 22 (6): 891–899.
  144. Saeed RW (2005): Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 201 (7): 1113–1123.
  145. Schöder H, Silverman DH, Campisi R et al. (2000): Regulation of myocardial blood flow response to mental stress in healthy individuals. *Annual Journal of Physiology. Heart and circulatory physiology.* 278 (2): 360–366.
  146. Schouwenberg BJ, Veldman BA, Spiering W et al. (2008): The Arg16Gly variant of the beta2-adrenergic receptor predisposes to hypoglycemia unawareness in type 1 diabetes mellitus. *Pharmacogenetics and Genomics* 18 (4): 369–372.
  147. Schwemmer S, Beer P, Schölmerich J et al. (2006): Cardiovascular and pupillary autonomic nervous dysfunction in patients with rheumatoid arthritis - a cross-sectional and longitudinal study. *Clinical and Experimental Rheumatology* 24 (6): 683–689.
  148. Scott DL, Houssien D, Laasonen L (1995) Proposed modification to Larsen's scoring methods for hand and wrist radiographs. *Rheumatology* 34 (1): 56.
  149. Selye H. (1952) The story of the adaptation syndrome. Acta Inc, Montreal
  150. Shahani BT, Halperin JJ, Boulu P et al. (1984): Sympathetic skin response-a method of assessing unmyelinated axon dysfunction in peripheral neuropathies. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry* 47: 536–542.
  151. Silbernagl/ Despopoulos (2003): Taschenatlas der Physiologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart

152. Spengler RN, Chensue SW, Giacherio DA et al. (1994): Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor- $\alpha$  production from macrophages in vitro. *Journal of Immunology* 152 (6): 3024–3031.
153. Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF et al. (2010): Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature Genetics* 42 (6): 508–514.
154. Stojanovich L (2009): Autonomic dysfunction in autoimmune rheumatic disease. *Autoimmunity Reviews* 8 (7): 569–572.
155. Stojanovich L (2010): Stress and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* 9 (5): A271.
156. Straub RH, Fassold A (2010): Neuroendokrin-immune Interaktionen bei rheumatischen Krankheiten. *Zeitschrift für Rheumatologie* 69 (4): 340–348.
157. Straub R, H.; Baerwald CG, Wahle M et al. (2005): Autonomic Dysfunction in Rheumatic Diseases. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 31 (1): 61–75.
158. Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JWJ et al. (2005): How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 52 (1): 16–26.
159. Straub RH, Härle P (2005): Sympathetic Neurotransmitters in Joint Inflammation. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 31 (1): 43–59.
160. Straub RH, Lowin T, Klatt S et al. (2011): Increased density of sympathetic nerve fibers in metabolically activated fat tissue surrounding human synovium and mouse lymph nodes in arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 63 (11): 3234–3242.
161. Straub RH, Dhabhar FS, Bijlsma JW et al. (2005): How psychological stress via hormones and nerve fibers may exacerbate rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism* 52 (1): 16–26.
162. Suzuki A, Yamada R, Chang X et al. (2003): Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nature Genetics* 34 (4): 395–402.
163. Tarchanoff J (1980): Über die galvanischen Erscheinungen an der Haut des Menschen bei Reizung der Sinnesorgane und bei verschiedenen Formen der psychischen Tätigkeit. *Pflugers Arch Ges Physiol* 46: 46–55.
164. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology (1996): Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 93 (5): 1043–

- 1065.
165. Thiemes Innere Medizin-TIM (1999) Georg Thieme Verlag, Stuttgart
166. Thomas C. Neylan MSE (1998) Hans Selye and the Field of Stress Research. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 10 (2): 230-230.
167. Thomsen M, Dahl M, Tybjaerg-Hansen A et al. (2011):  $\beta$ 2-Adrenergic Receptor Thr164Ile Polymorphism, Blood Pressure and Ischaemic Heart Disease in 66750 Individuals. *Journal of Internal Medicine* 271 (3): 305-314.
168. Toussirot E, Serratrice G, Valentin P (1993): Autonomic nervous system involvement in rheumatoid arthritis. 50 cases. *Journal of Rheumatology* 20 (9): 1508–1514.
169. Tracey KJ, Borovikova LV., Ivanova S et al. (2000): Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405 (6785): 458–462.
170. Tracey KJ (2009): Reflex control of immunity. *Nature Reviews. Immunology*. 9 (6): 418–428.
171. Turki J, Pak J, Green SA et al. (1995): Genetic polymorphisms of the beta 2-adrenergic receptor in nocturnal and nonnocturnal asthma. Evidence that Gly16 correlates with the nocturnal phenotype. *Journal of Clinical Investigation* 95 (4): 1635–1641.
172. Tuulikki S (2008): Radiographic Scoring in Rheumatoid Arthritis A Short Introduction to the Methods. *Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases* 66 (2): 166–168.
173. van der Roupe Voort C, Heijnen CJ, Wulffraat N et al. (2000): Stress induces increases in IL-6 production by leucocytes of patients with the chronic inflammatory disease juvenile rheumatoid arthritis: a putative role for alpha(1)-adrenergic receptors. *Journal of Neuroimmunology* 110 (1-2): 223–229.
174. van Geenen R, Middendorp H, Bijlsma JW (2006): The Impact of Stressors on Health Status and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis and Autonomic Nervous System Responsiveness in Rheumatoid Arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1069 (1): 77–97.
175. van Prevoe MLL, Hof MAT, Kuper HH et al. (1995): Modified disease activity scores that include twenty- eight- joint counts. *American College of Rheumatology* 38 (1): 44–48.
176. van Maanen MA, Stoof SP, LaRosa GJ et al. (2010): Role of the cholinergic nervous system in rheumatoid arthritis: aggravation of arthritis in nicotinic acetylcholine

- receptor 7 subunit gene knockout mice. *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (9): 1717–1723.
177. Vassilopoulos D, Mantzoukis D (2006): Dialogue between the Brain and the Immune System in Inflammatory Arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1088 (1): 132–138.
178. Vetrugno R, Liguori R, Cortelli P et al. (2003): Sympathetic skin response. *Clinical Autonomic Research* 13 (4): 256–270.
179. Viswanathan K, Dhabhar FS (2005): Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (16): 5808–5813.
180. Vlcek M, Rovensky J, Blazicek P et al. (2008): Sympathetic Nervous System Response to Orthostatic Stress in Female Patients with Rheumatoid Arthritis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1148 (1): 556–561.
181. Vlcek M, Radikova Z, Penesova A et al. (2008): Heart rate variability and catecholamines during hypoglycemia and orthostasis. *Autonomic Neuroscience* 143 (1-2): 53–57.
182. Wagner U, Wahle M, Moritz F et al. (2006): Promoter Polymorphisms Regulating Corticotrophin-releasing Hormone Transcription In Vitro. *Hormone and Metabolic Research* 38 (2): 69–75.
183. Wahle M, Krause A, Pierer M et al. (2002): Immunopathogenesis of Rheumatic Diseases in the Context of Neuroendocrine Interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 966 (1): 355–364.
184. Wahle M, Neumann RP, Moritz F et al. (2005): Beta 2 -Adrenergic Receptors Mediate the Differential Effects of Catecholamines on Cytokine Production of PBMC. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 25 (7): 384–394.
185. Wahle M, Hanefeld G, Brunn S et al. (2006): Failure of catecholamines to shift T-cell cytokine responses toward a Th2 profile in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Research & Therapy* 8 (5): R138.
186. Waldburger JM, Boyle DL, Pavlov VA et al. (2008): Acetylcholine regulation of synoviocyte cytokine expression by the  $\alpha 7$  nicotinic receptor. *Arthritis & Rheumatism* 58 (11): 3439–3449.
187. Wang C (2011): Tai Chi and Rheumatic Diseases. *Rheumatic Disease Clinics of North America* 37 (1): 19–32.

188. Wang H, Yu M, Ochani M et al. (2002): Nicotinic acetylcholine receptor  $\alpha 7$  subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 421 (6921): 384–388.
189. Weinberg CR, Pfeifer MA (1984): An improved method for measuring heart-rate variability: assessment of cardiac autonomic function. *Biometrics*. 40 (3): 855–861.
190. Wells G, Becker JC, Teng J et al. (2009): Validation of the 28-joint Disease Activity Score (DAS28) and European League Against Rheumatism response criteria based on C-reactive protein against disease progression in patients with rheumatoid arthritis, and comparison with the DAS28 based on erythrocyte sedimentation rate. *Annals of the Rheumatic Diseases* 68 (6): 954–960.
191. Wess J (1996): Molecular biology of muscarinic acetylcholine receptors. *Critical reviews in Neurobiology* 10 (1): 69–99.
192. Wessler I, Kirkpatrick CJ (2008): Acetylcholine beyond neurons: the non-neuronal cholinergic system in humans. *British Journal of Pharmacology* 154 (8): 1558–1571.
193. Wessler I, Kilbinger H, Bittinger F et al. (2003): The non-neuronal cholinergic system in humans: expression, function and pathophysiology. *Life Science* 72 (18-19):2055–2061.
194. Weyand CM, Goronzy JJ (1997): Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *The medical clinics of North America* 81 (1): 29–55.
195. Wilder RL (1995): Neuroendocrine-immune system interactions and autoimmunity. *Annual review of Immunology* 13: 307–338.
196. Williams LT, Snyderman R, Lefkowitz RJ (1976): Identification of beta-adrenergic receptors in human lymphocytes by (-) (3H) alprenolol binding. *Journal of Clinical Investigation* 57 (1): 149–155.
197. Xu BY, Ärleth L; Rantapää-Dahlquist SB et al. (2005): 2 Adrenoceptor gene single nucleotide polymorphisms are associated with rheumatoid arthritis in northern Sweden. *Annals of the Rheumatic Diseases* 64 (5): 773–776.
198. Xu BY, Huang D, Pirskanen R et al. (2000): beta2-adrenergic receptor gene polymorphisms in myasthenia gravis (MG). *Clinical and Experimental Immunology* 119 (1): 156–160.
199. Youinou P, Pers J, Gershwin ME et al. (2010): Geo-epidemiology and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 34 (3): J163.
200. Zautra AJ, Hoffman J, Potter P et al. (1997): Examination of changes in interpersonal stress as a factor in disease exacerbations among women with rheumatoid arthritis.

*Annals of behavioral medicine* 19 (3): 279–286.

201. Zernakova A, Stahl EA, Trynka G et al. (2011): Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies in Celiac Disease and Rheumatoid Arthritis Identifies Fourteen Non-HLA Shared Loci. *PLoS Genetics* 7 (2): e1002004.

## 7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines $\beta$ 2AR	7
Abbildung 2: Vereinfachte Darstellung der normalen stress response	11
Abbildung 3: Ablauf der Datenerhebung	21
Abbildung 4: Ableitung der sympathischen Hautantwort (SSR) von Hand und Fuß	28
Abbildung 5: Sympathische Hautantwort der Hände	29
Abbildung 6: Variabilität der Herzfrequenz	30
Abbildung 7: Exemplarische Darstellung eines HRV-Spektrums	33
Abbildung 8: Herzfrequenz unter Ruhebedingungen im Vergleich zwischen RA und OA	39
Abbildung 9: Mittelwerte der RMSSD im Vergleich zwischen RA und OA in Ruhe	40
Abbildung 10: Vergleich der Gesamt-HRV-Test-Ergebnisse zwischen RA und OA-Patienten	43
Abbildung 11: Herzfrequenz im MST, RA versus OA	45
Abbildung 12: sympathische Aktivität unter Sympathikus-Stimulation im mentalen Stresstest	45
Abbildung 13: parasympathische Aktivität unter Parasympathikus-Stimulation im DBT	46
Abbildung 14: Reaktion der Parasympathikus auf tiefe Atmung im DBT	46
Abbildung 15: Differenzen der parasympathischen und sympathischen Aktivität zwischen Stress- und Ruhewerten	47
Abbildung 16: LF/ HF unter Ruhebedingungen und im mental stress test (MST) bei RA-Patienten mit verschiedenen Krankheitsaktivitäten	48
Abbildung 17: HF unter Ruhebedingungen bei RA-Patienten mit verschiedenen Krankheitsaktivitäten	49
Abbildung 18: Valsava-Quotient als Parameter sympathischer und parasympathischer Balance bei Patienten in Remission und mit hoher Krankheitsaktivität	49
Abbildung 19: Vergleich der HRV-Testergebnisse zwischen Patienten in Remission und Patienten mit hoher Krankheitsaktivität	50
Abbildung 20: Produkt der PCR nach Gelelektrophorese	52
Abbildung 21: Krankheitsaktivität bei RA-Patienten mit verschiedenen $\beta$ 2AR-Gen-Polymorphismen	56
Abbildung 22 Differenzen der sympathischen Aktivität zwischen mentaler Stressbelastung und Ruhe als Marker der autonomen Reaktionsfähigkeit im Vergleich zw. RA-Gesamtgruppe, OA und RA-Untergruppen nach Genotyp	57
Abbildung 23 Signifikante Veränderungen der Aktivität des autonomen Nervensystems (ANS) bei RA-Patienten im Vergleich zu OA-Patienten	73

## 8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Bedeutung der Punktwerte des DAS für RA-Patienten	22
Tabelle 2:	D.L.Scott's Modifikation zu Larsens Scoring System	23
Tabelle 3:	Klinische Charakterisierung der Patienten mit RA	37
Tabelle 4:	Klinische Charakterisierung der Patienten mit OA	38
Tabelle 5:	MW und SEM der HRV (qualitativ) RA versus OA in Ruhe	40
Tabelle 6:	Aktivität von Sympathikus und Parasympathikus unter Stress im Vergleich zur Ruhe für RA und OA	42
Tabelle 7:	Quantitative Daten der HRV- Messungen	43
Tabelle 8:	MW und SEM der HRV (qualitativ) RA versus OA bei diversen Stresstests	44
Tabelle 9:	Spearman-Korrelation zwischen HRV (qualitativ) und klinischen Parametern bei Patienten mit RA	50
Tabelle 10:	SSR-Befunde bei RA- und OA-Patienten	51
Tabelle 11:	Latenzen und Amplituden der SRR nach Stromreiz im Vergleich zwischen RA, OA und Normwerten	51
Tabelle 12:	Verteilung von Genotypen, Allelfrequenz und Carrier-Status an Aminosäure Position 16 bei Patienten mit RA und gesunden Kontrollen	53
Tabelle 13:	Genotypen und Allelfrequenz für Polymorphismen an Aminosäure Position 27 bei Patienten mit RA und gesunden Kontrollen	54
Tabelle 14:	Genotypen und Allelfrequenz für Polymorphismen an Aminosäure Position 164 bei Patienten mit RA und gesunden Kontrollen	54
Tabelle 15:	Verteilung von Genotypen, Allelfrequenz und Carrier-Status an Aminosäure Position 16 bei Patienten mit RA und OA	55
Tabelle 16:	Genotypen und Allelfrequenz für Polymorphismen an Aminosäure Position 27 bei Patienten mit RA und OA	55
Tabelle 17:	Genotypen und Allelfrequenz für Polymorphismen an Aminosäure Position 164 bei Patienten mit RA und OA	56



## 9. Anlagen

### 9.1 Die neurologischen Messwerte und ihre Bedeutung

Parameter	Bedeutung
<b>Herzratenvariabilitätsmessungen (HRV):</b>	
<u>für Ruhe und mental stress test (MST)</u>	= <i>Ruhe und Test unter SNS-Stimulation</i>
<u>frequency domain:</u>	
<b>HF</b> = high frequency	<i>Parasympathikus</i>
<b>LF</b> = low frequency	<i>Sympathikus</i>
<b>LF/HF</b>	<i>Balance</i> zwischen Parasympathikus und Sympathikus
<b>TP</b> = total power	<i>Gesamt-Power</i> des ANS
<u>time domain:</u>	
<b>RMSSD</b>	<i>Parasympathikus</i>
<u>geometric measure:</u>	
<b>HRV- Index</b>	<i>Herzratenvariabilität</i>
<u>für den Orthostase-Test (Ewing)</u>	= <i>Test unter Parasympathikus-Stimulation</i>
<b>30:15 Ratio</b>	max. RR-Intervall während der Bradykardie/ max. RR-Intervall während der Tachykardie
<u>für den deep breathing test (DBT)</u>	= <i>Test unter Parasympathikus-Stimulation</i>
<b>E:I-Ratio</b>	max. RR-Intervall während Expiration/ max. RR-Intervall während Inspiration
<b>VK</b> = Variationskoeffizient	Standardabweichung von 150 artefaktfreien RR-Intervallen/ durchschnittliche Länge der RR-Intervalle
<b>MCR</b> = Mean Circular Resultant	Auswertung der Verteilung der RR-Intervalle eines Atemzyklus auf einer kreisförmigen Zeitachse
<u>für den Valsalva- Test</u>	= <i>Test für Beurteilung des Zusammenspiels von Sympathikus und Parasympathikus</i>
<b>Valsalva-Quotient</b>	max.RR-Intervall während der Bradykardie/max. RR-Intervall während der Tachykardie
<b>Sympathische Hautantwort (SSR):</b>	= <i>Test für sympathisches System</i>
<b>P0</b> = Potentialabgang = Latenz	Zeit vom Stromreiz bis zum messbaren Hautpotential
<b>Amplitude</b>	max./min. Stärke der Hautantwort in mV

## **Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

---

Datum

---

Unterschrift

# Danksagung

Für die Möglichkeit in der Abteilung Innere Medizin/ Rheumatologie der Universität Leipzig zu promovieren möchte ich mich bei dem Direktor der Klinik, Prof. Dr. med. J. Mössner, herzlichst bedanken.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. med. C. Baerwald für die Bereitstellung der Thematik sowie die Betreuung meiner Arbeit.

Mein besonderer großer Dank gebührt meiner Betreuerin Frau Dr. med. O. Malysheva für die wertvolle Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit sowie für alle kritischen Anregungen und Anstöße zur Weiterentwicklung der Thematik, die besondere Möglichkeit sie bei Kongressen begleiten und dort selbst mehrfach Poster präsentieren zu können sowie ihren uneingeschränkten persönlichen Einsatz und guten Zuspruch.

Weiterhin gilt mein Dank der Medizintechnischen Assistentin Cornelia Arnold. Frau Arnold stand mir stets helfend zur Seite und hat mich bei den experimentellen Arbeiten im Labor sehr unterstützt. Für die anfängliche Hilfe bei der DNA-Isolation danke ich Frau Manuela Ehbrecht. Dem gesamten Team des rheumatologischen Labors danke ich für das nette Klima und die ständige Hilfsbereitschaft.

Frau Dr. med. S. Arnold möchte ich für Ihre Unterstützung in der rheumatologischen Ambulanz danken.

Ein großer Dank gilt Frau Dr. P. Baum für inhaltliche Bereicherungen im Bereich der Neurologie sowie allen Mitarbeitern der Neurologischen Funktionsabteilung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Bei meinen Eltern Dr. Birgit und Dr. Jörg Voitzsch möchte ich mich ganz besonders bedanken, da sie mir nicht nur das Medizinstudium und damit meine Promotion ermöglichten, sondern auch durch Ihre allgegenwärtige Hilfe in jeglicher Beziehung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben. Nicht zuletzt gilt ein herzlicher Dank meinen Freunden Emanuela Klein und Ole Vollstädt sowie meinem Mann Ahmad Esber für die uneingeschränkte persönliche Unterstützung.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 06.06.1986  
Geburtsort: Suhl  
Familienstand: verheiratet  
Nationalität: Deutsch

## Schulische Ausbildung:

1993- 1995 Grundschole (Suhl)  
1996- 1999 Gymnasium (Johann- Gottfried- Herder- Gymnasium Suhl)  
1999- 2005 Musikgymnasium (Schloss Belvedere, Weimar)  
2005 Abitur

## Universitäre Ausbildung:

seit 2005 Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig  
seit 2006 Stipendiatin der "Studienstiftung des deutschen Volkes"  
2007 Erster Abschnitt Ärztliche Prüfung  
2012 Zweiter Abschnitt Ärztliche Prüfung  
2012 Approbation

## Klinische Tätigkeit:

2005 Pflegepraktikum: Police Hospital, Accra/Ghana  
2007 Pflegepraktikum: "St.-Elisabeth"-Krankenhaus, Leipzig  
2008 Famulatur: Innere Medizin, "Zentralklinikum", Suhl  
2008 Famulatur: Allgemeinmedizin, Praxis Dr. D. Schöne, Leipzig  
2009 Tropenmedizinkurs (6 Wochen), Universität Leipzig  
2009 Famulatur: Gynäkologie, University Hospital, Gondar/Äthiopien  
2010 Famulatur: Gynäkologie, "St.-Elisabeth"- Krankenhaus, Leipzig  
2010 1. Tertial Praktisches Jahr: Onkologie, Infektiologie, „St. Georg“, Leipzig  
2010 2. Tertial Praktisches Jahr: Allgemeinchirurgie, „St. Georg“; Leipzig  
Pathologie, Universitätsklinikum Leipzig  
2010 3. Tertial Praktisches Jahr: Gynäkologie; Klinikum Altenburger Land  
2008-2010 Klinik für kosmetisch plastische Chirurgie Leipzig, Nachtdienste  
ab Sept. 2012 Assistenzärztin für Frauenheilkunde und Geburtshilfe; „St. Georg“-  
Klinikum Eisenach