

Aus der Abteilung Immunologie
Leiterin Prof. Dr. med. Barbara Bröker
des Instituts für Immunologie und Transfusionsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**Thema: Effekte einer sympathischen Denervierung bei akutem psychischen
Stress im Mausmodell**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2011

vorgelegt von:
Jakob Olfe
geb. am: 10.05.1983
in: Berlin

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Barbara Bröker

2. Gutachter: Frau Prof. Dr. Daniela Männel

Ort, Raum: Seminarraum der Transfusionsmedizin, Greifswald

Tag der Disputation: 13.9.2011

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Abkürzungsverzeichnis	1
2. Einleitung	3
2.1. Definition von Stress und Stressverarbeitungssystemen	3
2.2. Die Rolle des Neuroendokrins im Stress	5
2.2.1. Autonomes Nervensystem	6
2.2.2. HPA-Achse	12
2.2.3. Interaktionen des Autonomen Nervensystems und der HPA-Achse	14
2.3. Die Rolle des Darmes im Stress	16
3. Zielstellung	23
4. Material und Methoden	24
4.1. Material	
4.1.1. Chemikalien	24
4.1.2. Verbrauchsmaterial	24
4.1.3. Geräte	25
4.1.4. Kits	26
4.1.5. Versuchstiere und deren Behandlung	26
4.1.6. Computerprogramme	26
4.2. Methoden	27
4.2.1. Rahmenbedingungen der Tierversuche	27
4.2.2. Das psychische Stressmodell des akuten, kombinierten akustischen und Immobilisationsstressses	27
4.2.3. Das Transportstressmodell	28
4.2.4. Die Behandlung mit Reserpin	29
4.2.5. Messung der Corticosteronkonzentration im Plasma	29
4.2.6. Messung der Katecholaminkonzentration im Plasma	29
4.2.7. Quantitative Bestimmung der Leuko- und Lymphozytenzahl im peripheren Vollblut	30
4.2.8. Messung der Indolamine im Plasma	30

4.2.9. Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des Ileums	30
4.2.10. Statistik	32
5. Ergebnisse	33
5.1. Etablierung einer Interventionsmethode zur Sympathikolyse	33
5.2. Einfluss von Reserpin auf stressinduzierte Veränderungen in der Maus	36
5.2.1. Einfluss von Reserpin auf Noradrenalinwerte im Plasma gestresster Mäuse	36
5.2.2. Einfluss von Reserpin auf die stressinduzierte HPA- Achsenaktivierung	39
5.2.2.1. Einfluss von Reserpin auf den stressinduzierten Anstieg der Plasmacorticosteronwerte	39
5.2.2.2. Einfluss von Reserpin auf die stressinduzierte Leuko- und Lymphozytopenie	42
5.2.3. Einfluss von Reserpin auf die stressinduzierte Darmbarrierestörung	45
5.2.3.1. Einfluss von Reserpin auf die stressinduzierte Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des Ileums	45
5.2.3.2. Einfluss von Reserpin auf stressinduzierte Veränderungen des Indolaminstoffwechsels	47
5.3. Einfluss von Reserpin auf die durch Transportstress veränderte akute Stressantwort	49
5.3.1. Einfluss von Transportstress auf das Gewicht und die HPA- Achsenaktivität über einen Beobachtungszeitraum von 3 Wochen	49
5.3.2. Einfluss von Transportstress auf die HPA-Achsenaktivierung im akuten Stress	53
5.3.3. Einfluss von Transportstress auf die durch akuten Stress induzierte Darmbarrierestörung	56
5.3.4. Einfluss von Reserpin auf die durch Transportstress verminderte HPA-Achsenaktivität und Darmbarrierestörung	60
6. Diskussion	64
7. Zusammenfassung	83

8. Literaturverzeichnis	85
9. Publikationsverzeichnis	114
10. Eidesstattliche Erklärung	115
11. Tabellarischer Lebenslauf	116
12. Danksagung	117

1. Abkürzungsverzeichnis

1-MT	1-Methyl-Tryptophan
5-HT	5-Hydroxytryptamin
ACTH	<i>Adrenocorticotropic hormone</i>
AK	Antikörper
AR	Adrenozeptor
ATP	Adenosintriphosphat
BNST	Nucleus interstitialis striae terminalis
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
CRF	<i>Corticotropin releasing factor</i>
DBH	Dopamin-beta-Hydroxylase
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNBS	Di-nitrobenzonsulfonsäure
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
GABA	γ -Amino-Buttersäure
GALT	<i>gut associated lymphoreticular tissue</i>
GC	Glukokortikoide
GITR	Glukokortikoid-induzierter Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor
HPA-Achse	<i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> , Hypothalamus-Hypophysen- Nebennieren-Achse
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i. p.	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
Kyn-Trp-Quotient	Kynurenin-Tryptophan-Quotient
LC	Locus coeruleus
LPS	Lipopolysaccharid
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NF- κ B	Nukleärer Faktor-kappaB

NGF	<i>Nerve growth factor</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PVN	Nucleus paraventricularis
s. c.	subkutan
SNS	Sympathisches Nervensystem
TDO	Tryptophan 2,3-Dioxygenase
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TH1-Zelle	Typ1-T-Helferzelle
TH2-Zelle	Typ2-T-Helferzelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TSLP	<i>Thymic stromal lymphopoetin</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i>

2. Einleitung

2.1 Definition von Stress und Stressverarbeitungssystemen

Unter physiologischen Bedingungen ist ein Organismus an die ihn aktuell umgebenden Umweltfaktoren angepasst. Metabolische, neuroendokrine und psychische Regulationskreise sind ausbalanciert und befinden sich in einem Gleichgewicht. Alle Lebewesen haben Mechanismen entwickelt, um auf molekularer, zellulärer, physiologischer und verhaltensbiologischer Ebene die Homöostase engmaschig zu kontrollieren und regulieren ^{(1), (2), (3), (4), (5), (6), (7)}. Als Stress gilt jede Form der Störung dieser Homöostase ⁽⁸⁾ und bereits 1936 definierte Hans Selye ein Konzept der Anpassung eines Organismus an eine veränderte Umwelt als „generelles Adaptationsyndrom“ ⁽⁹⁾. Heute verwendet man als Bezeichnung für diese Adaptation den Begriff der „Allostase“ ^{(2), (3)}.

Die adaptive Antwort auf einen Stressor hängt maßgeblich von dessen Dauer, Stärke und Qualität (physisch/psychisch) als auch von der Konstitution des dem Stressor ausgesetzten Organismus ab ^{(10), (11), (12)}. Hitze, Kälte, Anoxie, Hypoglykämie etc. werden als physische, Angst, Panik, Frustration etc. als psychische Stressoren gewertet ⁽¹¹⁾. Anfang des 19. Jahrhunderts zeigte Cannon erstmals, dass sowohl physikalische als auch emotionale Stressoren dieselben adaptiven Stressmechanismen aktivieren ⁽¹³⁾. Heute wissen wir sogar, dass psychische Stressoren zu den potentesten Aktivatoren der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) gehören ^{(14), (15)}. Grundsätzlich haben alle adaptiven Mechanismen die Aufgabe, den Organismus an die veränderte Umwelt anzupassen, um besser auf einen erneuten Stressor zu reagieren. In diesem Sinne kommt es zu einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems (SNS) und der HPA-Achse. Diese Aktivierung führt zu verhaltensbiologischen Veränderungen, wie z.B. einer erhöhten Aufmerksamkeit und stressinduzierten Analgesie, zur metabolischen Anpassung, die z.B. die Bereitstellung von Energiereserven aus den Speichern in die Blutbahn beinhaltet und zu entsprechenden kardiovaskulären Anpassungen. Das Immunsystem wird aktiviert, um potentiell eindringende Erreger zu eliminieren ^{(16), (17), (18)}.

Die Wahrnehmung der Stressoren findet auf verschiedenen Ebenen statt. Im phylogenetisch ältesten und wissenschaftshistorisch am längsten bekannten System, dem autonomen Nervensystem, findet die unbewusste Aktivierung der sogenannten „fight or flight“ Reaktion statt (s. Abschnitt 2.2.1). Im limbischen System wird dem Reiz, ebenfalls unbewusst, zusätzlich eine emotionale Komponente beigemessen (4), (19), (20), (21). In höheren Organismen findet im Neokortex letztlich eine kognitive Bewertung des Erlebten, in Abhängigkeit zuvor erfahrener Stresssituationen, statt (4), (20), (21). Deshalb ruft nicht jeder Stressor bei jedem Individuum die gleichen adaptiven Mechanismen hervor, obwohl eine gewisse stereotype Konsistenz in der Reaktion, die Organismen auf Stress zeigen, herrscht. Diese Unterschiede scheinen eng mit der genetischen Konstitution und sogenannten „*early-life-experiences*“ zusammenzuhängen (22), (23), (24), (25), (26). Bereits 1967 demonstrierten Levine et al., dass maternale Deprivation bei Ratten langdauernde Effekte auf die Funktion der HPA-Achse hat (14). Vallès et al. zeigten, dass sogar einzelne akute Stressepisoden in der postnatalen Episode bei Ratten wochenlangen Einfluss auf die HPA-Achse haben (27). Das heißt, einmal erlebte Stresserfahrungen beeinflussen die Stressreaktion eines Individuums langfristig.

Eine wichtige Grenze muss zwischen akutem und chronischem Stress gezogen werden. So ist nicht jede Art von Stress *per se* als negativ zu betrachten. Ein akuter Stressor, dem das Individuum für kurze Zeit ausgesetzt ist (Sekunden/Minuten), kann Ausdifferenzierung und Wachstum fördern und steigert die physiologischen und verhaltensbedingten Kompetenzen, die es dem Organismus erlauben, besser auf die nächste Stressexposition zu reagieren (28), (29). Überschreitet der Stress ein kritisches Maß an Qualität oder Quantität oder sind die Stress verarbeitenden Systeme des Organismus nicht voll funktionsfähig oder erschöpft, kommt es zur Dekompensation der „adaptiven Stresssysteme“ (8), (30). Als Folge dessen führt chronischer Stress (Tage bis Wochen) zu schwerwiegenderen funktionellen Veränderungen des Immunsystems, Metabolismus und Verhaltens (3), (31), (32), was im Folgenden detaillierter erklärt wird.

Es wurde mehrfach von unserer Gruppe und von anderen gezeigt, dass es zu einer anhaltenden Erhöhung der Glucocorticoid (GC)-Konzentrationen während chronischem Stress kommt (33), (34), (35), (36), (37), (38). Zusätzlich ist weitläufig bekannt, dass eine lang anhaltende Aktivierung der HPA-Achse immunsuppressiv wirkt (29), (39). Die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF oder IFN γ , wird

gehemmt ^{(20), (40), (41), (42)}, die der antiinflammatorischen wie Interleukin- (IL) 10 bleibt unverändert oder wird sogar gefördert ^{(20), (40), (41), (42)}. Zusätzlich wurde als Konsequenz erhöhter GC beschrieben, dass es zu einem Verlust immunkompetenter Zellen, wie Lymphozyten, Makrophagen und NK-Zellen durch Apoptose kommt und dass Lymphozyten anerg und damit funktionsunfähig werden ^{(40), (41), (42), (43), (44)}.

Das zweite wichtige Stress-Adaptationssystem ist das SNS. Die dauerhafte Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt zu einer Erhöhung der β -Adrenozeptordichte (AR) auf Zellen des Immunsystems ⁽⁴⁵⁾ mit einer daraufhin verstärkten antiinflammatorischen Konditionierung. In der Summe kommt es dadurch zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen ^{(40), (46)}.

Durch Veränderungen im Metabolismus wird die Entstehung von Diabetes mellitus, Dyslipidämie und kardiovaskulären Krankheiten befördert ^{(47), (48)}. Aber auch psychiatrische Krankheiten wie Depression, Angst- und Panikstörungen oder Anorexia nervosa werden mit chronischen Stresszuständen in Verbindung gebracht ^{(21), (49), (50), (51)}, worauf in dieser Arbeit nicht detaillierter eingegangen werden soll.

Die Fülle der aufgelisteten Krankheitszustände macht eindrucksvoll deutlich, warum die Weltgesundheitsorganisation (WHO) Stress als eine der größten Gesundheitsgefahren unserer Zeit einstuft, und die Auseinandersetzung mit diesem Thema umso wichtiger erscheinen lässt ⁽⁵²⁾.

2.2 Die Rolle des Neuroendokrins im Stress

Bestandteil des Neuroendokrins sind alle Zellen und Organe, die an der Produktion und Sekretion von Hormonen und Transmittern beteiligt sind. Die Regulation der Stressantwort beruht auf multidirektionalen immuno-neuro-endokrinen Interaktionen. Das autonome Nervensystem und die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (HPA-Achse) sind dabei die wichtigsten Regulationssysteme, die sowohl untereinander als auch mit dem Immunsystem, dem zentralen Nervensystem, anderen neuroendokrinen Organen und dem kardio-vaskulären System afferent und efferent vernetzt sind ^{(3), (4), (6), (7), (53)}.

2.2.1 Autonomes Nervensystem

Das autonome Nervensystem setzt sich aus dem Sympathikus und dem Parasympathikus zusammen. Akuter Stress aktiviert initial den Sympathikus, noch vor der HPA-Achse. Die zentrale Aktivierung des Sympathikus wird über den Locus coeruleus im Hirnstamm vermittelt, der unter Kontrolle des Nucleus tractus solitarius vermehrt Noradrenalin (NA) ausschüttet ⁽⁵⁴⁾. Über die sympathischen Nerven und das Nebennierenmark vermittelt der Sympathikus seine Effekte in der Peripherie. Die sympathischen Fasern ziehen vom Rückenmark in die Paravertebralganglien, in denen sie über den Neurotransmitter Acetylcholin auf das zweite Neuron umgeschaltet werden ⁽⁵⁵⁾. Dieses zweite Neuron innerviert dann über NA, oder seltener über Adrenalin, zusammen mit dem synergistisch wirkenden Neuropeptid Y die entsprechenden Zielorgane. Das Nebennierenmark stellt ein Paraganglion dar, in dem das zweite Neuron durch eine neuroendokrine Zelle repräsentiert wird, die Adrenalin, und in geringeren Mengen auch NA, direkt ins Blut ausschütten kann ⁽⁵⁵⁾. Synthetisiert werden die Katecholamine aus der essentiellen Aminosäure Tyrosin ⁽⁵⁶⁾. Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Synthese ist die Reaktion von Tyrosin zu Dihydroxyphenylalanin (DOPA), die durch die Tyrosinhydroxylase vermittelt wird. DOPA wird zu Dopamin umgewandelt, welches durch aktiven Transport in die Speichervesikel der Synapse geschleust wird ⁽⁵⁶⁾. Dort erst wird Dopamin zu NA umgewandelt und bei Aktivierung in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. In den chromaffinen Zellen des Nebennierenmarkes kann NA zusätzlich noch zu Adrenalin umgewandelt werden ⁽⁵⁶⁾. Die Aktivierung des Sympathikus ist normalerweise nur transient und beginnt sehr schnell. Durch raschen Abbau der Katecholamine im synaptischen Spalt oder Wiederaufnahme in das präsynaptische Neuron wird sie auch schnell wieder beendet ⁽⁵⁵⁾, ⁽⁵⁷⁾. Abgebaut werden die Katecholamine durch die Katechol-O-Methyltransferase und Monoaminoxidasen ⁽⁵⁶⁾. Durch die Aktivierung des Sympathikus soll der Organismus in die Lage versetzt werden, sich an die Stresssituation anzupassen. Es kommt zu einer erhöhten Leistungsbereitschaft und löst im Organismus die sogenannte „fight or flight“-Reaktion aus. In der Folge kommt es zu einer erhöhten kardiovaskulären und respiratorischen Funktion, Steigerung des Muskeltonus der glatten Muskulatur und verminderten Durchblutung des Magen-Darm-Traktes, einer Aktivierung des Stoffwechsels im Sinne einer Bereitstellung von

Glukose und zu einer Beeinflussung peripherer Immunzellen ^{(58), (59), (60)}. Übermittelt werden diese Effekte der Katecholamine über Bindung an α -Adrenozeptoren (AR) (α 1, α 2) und β -AR (β 1 – β 3) ^{(58), (61), (62), (63)}. Auf verschiedenen Geweben kommen hierbei unterschiedliche Expressionsmuster der Rezeptoren vor ⁽⁵⁸⁾. α 1-AR kommen hauptsächlich an Gefäßen vor. α 2-AR befinden sich besonders prä- und post-synaptisch auf Neuronen des zentralen und vegetativen Nervensystems. β 1-AR werden überwiegend am Herzen, aber auch an den Speicheldrüsen, der Niere und dem zerebralen Kortex exprimiert. β 2-AR befinden sich hauptsächlich in der Lunge und auf Immunzellen. Im Fettgewebe schließlich kommen nur β 3-AR vor. Tabelle 2.1 zeigt eine Übersicht der systemischen Wirkungen des Sympathikus in Abhängigkeit der entsprechenden Rezeptor-Subtypen.

Alle primären (Thymus, Knochenmark) und sekundären (Milz, Lymphknoten) lymphatischen Organe werden stark sympathisch innerviert ^{(64), (65)}. Hierdurch ist eine spezifische und lokale Beeinflussung der Aktivität einzelner Immunzellen gewährleistet. Einfluss nehmen Katecholamine dabei unter anderem auf die Lymphozytenzirkulation ^{(16), (66), (67)}, die T_H -Zelldifferenzierung ⁽⁶⁸⁾ und die Ausschüttung von Zytokinen und Hormonen ⁽⁶⁹⁾ aus den verschiedenen Effektorzellen.

Ebenso findet eine direkte Kommunikation vom Immunsystem zum Nervensystem statt. Auf zentralen und peripheren Nerven findet man Rezeptoren für Zytokine, über die die periphere Immunantwort Einfluss auf das zentrale und periphere Nervensystem nimmt. Dieses wiederum reagiert daraufhin mit der Ausschüttung von Neurotransmittern zur Regulation des Immunsystems. So können z.B. IL-1, IL-6 und TNF α das sympathische Nervensystem und die HPA-Achse aktivieren ^{(70), (71)}. Der Einfluss von Katecholaminen auf die T_H -Antwort beschränkt sich auf T_H -1 Zellen, da auf der Oberfläche von T_H -2 Zellen keine AR exprimiert werden ⁽⁷²⁾. Indem Katecholamine die Produktion von IFN γ , und IL-2 in T_H 1-Zellen hemmen, wirken sie immunsuppressiv ^{(73), (74)}. Da die T_H 2-Zellen nicht beeinflusst werden, überwiegt somit die antiinflammatorische Komponente. Über α -AR wirkt der Sympathikus auf die meisten Immunzellen aktivierend ^{(58), (62), (63)}, z.B. indem Monozyten und Makrophagen zur Phagozytose und Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-12 angeregt werden ^{(58), (62), (63)}. Dies spielt besonders in der lokalen Immunantwort eine Rolle. Über β -AR wird eher ein inhibitorischer Effekt auf immunkompetente Zellen vermittelt. So wird z.B. die T-Zellproliferation und

Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine gehemmt. Gleichzeitig wird die Synthese antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10 in T-Zellen gesteigert (58), (59), (61), (62), (63), (75). Da insgesamt vermehrt β -AR auf Immunzellen vorhanden sind, überwiegen die inhibitorischen, Sympathikus vermittelten Effekte die aktivierenden (46), (76), (77), (78).

Organ	Wirkung	AR
Blutgefäße:		
Haut, Schleimhaut	Vasokonstriktion	$\alpha 1$
Koronarien	Vasokonstriktion	$\alpha 1$
	Vasodilatation	$\beta 2$
Skelettmuskeln	Vasokonstriktion	$\alpha 1$
	Vasodilatation	$\beta 2$
Gehirn	Vasokonstriktion	$\alpha 1$
Magen- Darm- Trakt	Vasokonstriktion	$\alpha 1/2$
Niere	Vasokonstriktion	$\alpha 1$
Venen	Vasokonstriktion	$\alpha 1$
Muskulatur:		
Herz:		
Frequenz	steigt	$\beta 1$
Inotropie	steigt	$\beta 1$
Bronchien	Erschlaffung	$\beta 2$
Intestinaltrakt	Erschlaffung	$\alpha 2, \beta 2$
Sphinkteren des Intestinaltraktes	Kontraktion	$\alpha 1$
Detrusor vesicae	Erschlaffung	$\beta 2$
Sphinkter vesicae	Kontraktion	$\alpha 1$
M. dilatator pupillae	Mydriasis	$\alpha 1$
Metabolismus:		
Leber	Glykogenolyse \uparrow	$\beta 2$
	Gluconeogenese \uparrow	$\beta 2$
Fettzellen	Lipolyse \uparrow	$\beta 2$
quergestreifte Muskulatur	Glykogenolyse \uparrow	$\beta 2$
Pankreas	Insulinsekretion \downarrow	$\alpha 2$
	Insulinsekretion \uparrow	$\beta 2$
Immunsystem:		
T_H -1 Zellen	Immunsuppression: IFN γ + IL-2 \downarrow , T-Zellproliferation \downarrow IL-10 \uparrow	$\beta 2$
T_H -2 Zellen	kein Effekt	-
NK-Zellen	Immunsuppression: IFN γ \downarrow	$\beta 2$
Monozyten/Makrophagen	lokale Immunaktivierung: TNF α + IL-12 \uparrow	$\alpha 2$
Neutrophile	Phagozytenaktivität \downarrow	$\beta 2$

Tabelle 2.1

Effekte der Sympathikusaktivierung an verschiedenen Organen und Geweben in Abhängigkeit der verschiedenen Adrenozeptor-Subtypen (modifiziert nach (79), (72), mit (58), (62), (63), (73), (74), (80)); AR=Adrenozeptor, IFN γ =Interferon-gamma, TNF α =Tumor-Nekrose-Faktor alpha, IL=Interleukin, NK-Zelle=Natürliche Killer Zelle, T_H -Zelle=T-Helfer Zelle

Anders als im Metabolismus und bei kardio-pulmonalen Prozessen, bei denen Sympathikus und Parasympathikus antagonistische Wirkung zeigen ⁽⁸¹⁾, wirken sie auf das Immunsystem synergistisch hemmend. Über die Bindung an $\alpha 7$ -Acetylcholin-Rezeptoren hemmt der Parasympathikus die Ausschüttung von TNF in Gewebsmakrophagen ⁽⁷⁸⁾, ⁽⁸²⁾ und verhindert die Leukozytenmigration in Entzündungsgebiete ⁽⁸³⁾. Somit erzeugt er ein lokal antiinflammatorisches Milieu und wirkt immunsuppressiv.

Um die verschiedenen Effekte des Sympathikus genauer zu untersuchen, bedarf es Methoden zur gezielten Aktivierung bzw. Hemmung des sympathischen Nervensystems. Die oben beschriebene Anatomie und Physiologie machen deutlich, dass sich zur Intervention vielfältige Angriffspunkte anbieten. So können selektiv die α -AR oder β -AR, die Nebenniere oder die sympathischen Nervenfasern und zentrale oder periphere Strukturen gehemmt oder aktiviert werden. Grundlegend kann zwischen chirurgischen, chemischen, immunologischen und genetischen Methoden unterschieden werden.

Als erster führte Cannon 1929 eine chirurgische Sympathektomie zur Untersuchung der Rolle des Sympathikus im Stress durch ⁽¹³⁾. Damals dauerte die komplette Ablation 6 Monate. Dies macht deutlich, wie aufwendig diese Methode besonders in kleinen Tieren wie Nagern ist, wenn man eine komplette Sympathektomie herbeiführen will. Ein gutes Anwendungsgebiet dieser Methode ist die selektive Denervierung einzelner Organe oder Gewebe.

Bei den immunologischen Methoden werden zwei unterschiedliche Prinzipien angewendet. Bei der sogenannten Immunosympathektomie wird bei frisch geborenen Tieren durch Applikation von Antikörpern (AK) gegen zentrale Strukturen des Nervenwachstums, wie z.B. nerve-growth-factor (NGF), eine physiologische Entwicklung des sympathischen Nervensystems verhindert ⁽⁸⁴⁾, ⁽⁸⁵⁾, ⁽⁸⁶⁾.

Bei der immunotoxischen Sympathektomie richten sich die AK gegen Strukturen der ausdifferenzierten Nervenfasern z.B. die Dopamin-beta-Hydroxylase und sind zusätzlich an Zellgifte wie Saporin gekoppelt ⁽⁸⁷⁾, ⁽⁸⁸⁾, ⁽⁸⁹⁾, ⁽⁹⁰⁾. Hiermit kann auch bei adulten Tieren eine komplette Zerstörung der sympathischen Fasern erreicht werden ⁽⁹¹⁾. Bei dieser sehr heterogenen Gruppe von Wirkstoffen gibt es abhängig von der gewählten Zielstruktur des AK vielfältige Vor- und Nachteile, die hier nicht näher behandelt werden sollen.

Mit Hilfe von genetischen Methoden können in transgenen Mäusen über die Deletion von neurotrophen Faktoren, ihren Rezeptoren oder Enzymen, die an der Produktion von Neurotransmittern beteiligt sind, besonders deren Rolle in der Entwicklung des Nervensystems untersucht werden ⁽⁹²⁾.

Die chemische Sympathikolyse stellt aufgrund der Vielzahl einsetzbarer Stoffe und der leichten Handhabbarkeit vermutlich die am weitesten verbreitete Methode dar. So können mit Hilfe von selektiven AR-Antagonisten die Funktion einzelner Rezeptorgruppen auf verschiedene Organe oder Gewebe untersucht werden. Ein Vorteil hierbei gegenüber all den zuvor beschriebenen Verfahren ist, dass mit Hilfe von AR-Agonisten auch eine Wiederaktivierung des Sympathikus möglich ist. Andere weit verbreitete Medikamente wie 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) und Guanethidin zerstören post-ganglionäre Strukturen ⁽⁹³⁾, ⁽⁹⁴⁾, ohne dabei andere NA-produzierende Zellen wie z.B. die chromaffinen Zellen im Nebennierenmark ⁽⁹⁵⁾, ⁽⁹⁴⁾ zu beeinflussen.

Das in dieser Arbeit verwendete Reserpin depletiert den NA-Gehalt in allen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen sowohl peripher als auch zentral: d.h. in der Nebenniere ⁽⁹⁶⁾, ⁽⁹⁷⁾, den Paraganglien ⁽⁹⁸⁾, den sympathischen Nervenendigungen ⁽⁹⁹⁾, ⁽¹⁰⁰⁾, in Arterien ⁽¹⁰¹⁾, im Dünndarm ⁽¹⁰²⁾ und in einigen Regionen des Gehirns ⁽¹⁰³⁾, ⁽¹⁰⁴⁾, ⁽¹⁰⁵⁾, ⁽¹⁰⁶⁾. Reserpin ist ein pentazyklisches Indolalkaloid der Schlangenzwurz *Rauwolfia serpentina*, das über die indische Heilkunst Eingang in die westliche Medizin fand. Zunächst als hochpotentes Neuroleptikum in der Therapie der Schizophrenie eingesetzt, erlangte es wenig später besonders als Antihypertonikum große Bedeutung ⁽¹⁰⁷⁾. Nachdem es Ende der 1970er Jahre weitgehend durch neue, bessere Medikamente ersetzt worden war ⁽¹⁰⁸⁾, verlor es seine klinische Bedeutung und wird heute hauptsächlich in der neurochemischen Forschung eingesetzt.

Mit einem Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten von 3,3 handelt es sich um eine stark lipophile Substanz ⁽¹⁰⁹⁾, die leicht in Zellen und durch die Bluthirnschranke penetriert. In der Zelle bindet es irreversibel an die ATP/Mg⁺⁺-Pumpe auf den Speichervesikeln der Monoamine und hemmt diese ⁽¹¹⁰⁾, ⁽¹¹¹⁾. Dadurch können keine Protonen mehr in die Vesikel gepumpt werden und basische Substanzen wie Noradrenalin, Adrenalin, Dopamin und Serotonin werden intravesikulär nicht mehr protoniert und können nicht mehr als Salze in den Vesikeln gespeichert werden ⁽¹⁰⁷⁾. Initial kommt es nach der Bindung des Reserpins zu einer Ausschüttung der Monoamine in den Blutkreislauf und erst in der Folge zu einer messbaren Depletion. Die Halbwertszeiten von Reserpin werden im Menschen mit bis zu 270 Stunden

angegeben ⁽¹¹²⁾. Maximale Konzentrationen werden aber schon nach 1 - 2 Stunden erreicht. Da die Bindung des Reserpins an die Mg^{++} -ATPase irreversibel ist, bedarf es nur relativ geringer Mengen des Medikamentes, um die Speicherung von großen Mengen an Monoaminen zu verhindern. Darüber hinaus überdauert die Wirkung von Reserpin durch die irreversible Bindung den im Gewebe messbaren Konzentrationsabfall.

Die Wirkung von Reserpin kann in eine zentrale und eine periphere Komponente unterteilt werden. Die zentrale Komponente beruht auf dem Mangel an Serotonin und Dopamin im zentralen Nervensystem, der die antipsychotische Wirkung erklärt. Aber auch zwei der Hauptnebenwirkungen können auf den Mangel dieser beiden Botenstoffe zurückgeführt werden. So führt gerade die langfristige und hochdosierte Gabe von Reserpin durch den Mangel an Dopamin und Serotonin zu extrapyramidalmotorischen Störungen, Parkinsonismus und Depressionen bis hin zu Suizidalität.

Die periphere Wirkung beruht überwiegend auf der Depletion des sympathischen Neurotransmitters NA, der zu einer Senkung der Herzfrequenz und über Vasodilatation zur Senkung des Blutdrucks führt. Durch diese Beeinflussung der Hämodynamik verändert sich die Verteilung des Blutes auf die verschiedenen Organe. Relativ gesehen verringert sich der Anteil des Herzminutenvolumens im Herz und der Milz, der Magen-Darm-Trakt hingegen wird stärker durchblutet ⁽¹¹³⁾.

Obwohl hinreichend viele Arbeiten den Einfluss des Sympathikus auf das Immunsystem zeigen, sind die direkten Effekte einer Reserpinbehandlung auf das Immunsystem wenig untersucht. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass ein LPS-induzierter $TNF\alpha$ Anstieg im Plasma von Mäusen nach einer Reserpin-vermittelten NA-Depletion signifikant stärker ausfällt ⁽¹¹⁴⁾.

Die cholinerge Signalübertragung wird durch Reserpin nicht beeinflusst, da Acetylcholin einen eigenen Transporter auf Speichervesikeln besitzt. In der Folge überwiegt relativ gesehen die Aktivität des Parasympathikus, die zu weiteren Nebenwirkungen der Reserpinbehandlung führen kann (Pupillenverengung, Libido- und Potenzverlust, Durchfall, Magen- und Duodenalulzera) ⁽⁷⁹⁾.

Anders als mit Medikamenten, die gezielt an einzelnen AR angreifen oder chirurgischen Methoden wie der Adrenektomie, bei der die sympathischen Fasern unbeeinflusst bleiben, kann mittels Reserpin, das eine Depletion von NA und Adrenalin in allen neuronalen Zellen hervorruft, eine globale, sympathische

Denervierung hergestellt werden. Bei den therapeutisch und experimentell verwendeten Dosen ^{(115), (116), (117), (118), (119), (120), (121), (122)} kann allerdings kein kompletter Verlust der Neurotransmitter erreicht werden, sodass nur von einer partiellen Sympathikolyse auszugehen ist. Mittels einer solchen partiellen Sympathikolyse kann die Rolle des Sympathikus im Stress genauer untersucht werden und wurde deshalb als Methode der Wahl in den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten verwendet.

2.2.2 HPA-Achse

Als zweites wichtiges Transmittersystem wird im Stress neben dem sympathischen Nervensystems die HPA-Achse aktiviert. Über die HPA-Achse wird die Ausschüttung von Glucocorticoiden (GC) aus der Zona fasciculata der Nebennierenrinde vermittelt ^{(123), (124), (125)}. Beim Menschen ist das Hauptglucocorticoid Cortisol, bei Nagern ist es Corticosteron ^{(4), (126)}. Reguliert wird dies durch die Sekretion von Corticotropin-Releasing-Factor (CRF) aus dem Nucleus paraventricularis und suprachiasmaticus im Hypothalamus ^{(20), (40), (127), (128)}. Aktivierende Stimuli hierfür sind neben Neurotransmittern aus anderen Gehirnregionen ^{(4), (129)} u.a. proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-6 und IL-1 ^{(20), (127), (128)} Serotonin ⁽¹²⁷⁾, Acetylcholin und Katecholamine ^{(20), (128)}. Als ein Beispiel, wie eine proinflammatorische Immunantwort die HPA-Achse stimulieren kann, wurde gezeigt, dass z.B. die Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) über die Aktivierung von Zytokinen zu einem Anstieg der GC im Plasma führt ^{(70), (130), (131), (132), (133)}.

Über einen Venenplexus erreicht CRF die Adenohypophyse, wo es über CRF1-Rezeptoren die Ausschüttung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) hervorruft. Dieses gelangt über den peripheren Blutkreislauf zur Nebennierenrinde, wo es sowohl die Bildung als auch Ausschüttung von GC bewirkt ^{(127), (129)}. Über einen *Feed-back-loop* hemmen GC die HPA-Achse auf allen Ebenen, d.h. Hypothalamus, Hypophyse und Nebenniere u.a. durch Herunterregulierung der Genexpression von CRF und ACTH die eigene Produktion ^{(124), (125), (134), (135)}. Auf zellulärer Ebene binden GC vor allem an die in allen Zellen des Organismus vorhandenen intrazellulären GC-

Rezeptoren ^{(136), (137), (138), (139)}. Die dabei entstehenden Komplexe nehmen im Zellkern über Promotoren Einfluss auf die Transkription. Somit haben sie Einfluss auf den Wasser- und Elektrolythaushalt, das Herzkreislaufsystem, das Nervensystem und das Immunsystem: Sie wirken antiinflammatorisch, immunsuppressiv und pro-apoptotisch. Bei langfristig erhöhten GC reagieren besonders Lymphozyten und deren Vorläuferzellen im Thymus sehr sensitiv und gehen vermehrt in Apoptose ^{(44), (43), (140), (141)}. So führt chronische Stressexposition, die klassischerweise mit dauerhaft erhöhten GC-Plasmaspiegeln assoziiert ist, zu einer deutlichen Leuko- und Lymphozytopenie ^{(33), (142)}.

Aber auch bei akuter Stressexposition kommt es zu einem Anstieg der GC, der mit einem Abfall der Leuko- und Lymphozyten assoziiert ist ^{(143), (144), (145)}. Allerdings wird hierfür nicht die Apoptose immunkompetenter Zellen, sondern die Umverteilung aktivierter Immunzellen (Lymphozyten, NK-Zellen, Granulozyten) aus dem Blut in die Haut, lokale Lymphknoten und den Darm verantwortlich gemacht ⁽⁶⁶⁾. Somit bereitet sich das Immunsystem darauf vor, potentiell eindringende Erreger schnell und effizient zu eliminieren ^{(3), (16), (20), (66), (146)}. Dies ist vor dem Hintergrund, dass evolutionär betrachtet in Stresssituation, wie Flucht oder Kampf, die Gefahr sich zu verletzen erhöht war, gut nachvollziehbar. Aufgrund dieses schon seit Jahrzehnten bekannten reziproken Zusammenhanges von GC und der Anzahl der zirkulierenden Leuko- und Lymphozyten, wird das Zählen der Leuko- und Lymphozyten im peripheren Blut gerne als kostengünstiger und leicht handhabbarer Parameter zum Nachweis einer stattgehabten Stressexposition z.B. bei Schlachttieren verwandt ⁽¹⁴³⁾. Wie im vorherigen Abschnitt bereits dargestellt, nimmt auch der Sympathikus über direkte Synapsen Einfluss auf die Funktion immunkompetenter Zellen im Stress. Inwiefern eine Reserpin-vermittelte Sympathikolyse Einfluss auf die Leuko- und Lymphozytopenie als klassischen Stressparameter nimmt, ist nicht abschließend geklärt.

Ingesamt betrachtet stellt die Reaktion der HPA-Achse auf Stress kein statisches, sondern vielmehr ein dynamisches und plastisches System dar. So hängt die Stärke der HPA-Achsenantwort von verschiedenen Variablen wie z.B. dem zirkadianen und ultradianen Rhythmus oder einer vorher stattgehabten Stresserfahrung ab ^{(147), (148), (149), (150)}. Diesbezüglich wird zwischen homotypischen und heterotypischen Stressoren unterschieden ⁽¹⁴⁹⁾. Werden Mäuse nach mehreren Wochen erneut demselben (homotypischen) Stressor ausgesetzt, zeigen sie eine verminderte

Stressantwort. Ist der zweite Stressor hingegen ein anderer (heterotypischer), kommt es zur vermehrten Ausschüttung von Stresshormonen ^{(60), (151), (152), (153)}, was sogar auf Ebene der mRNA z.B. von CRF in einzelnen Hirnregionen nachweisbar ist ⁽¹⁵¹⁾. Das heißt, einzelne Stresserfahrungen scheinen einen modulativen Einfluss auf das Gehirn zu haben. In die gleiche Richtung weisen Experimente, die zeigen, dass besonders das limbische System reich an GC-Rezeptoren ist, und Stresserfahrungen darüber langanhaltenden Einfluss auf Verhalten und Psyche haben ^{(154), (155), (156)}. Einige Autoren bringen deshalb Krankheiten wie Panikstörungen oder post-traumatische Belastungsstörungen in Zusammenhang mit einer Dysregulation der HPA-Achsenantwort und ihrer modulativen Potenz ^{(21), (157), (158), (159)}. Im Zusammenhang mit Tierversuchen muss dieser Tatsache eine besondere Bedeutung beigemessen werden, da somit jeder zuvor erlebte Stressor wie Transport, Injektionen oder Raumwechsel Einfluss auf die Ergebnisse von Stressexperimenten nehmen kann.

2.2.3 Interaktionen des Autonomen Nervensystems und der HPA-Achse

In ihrer Reaktion auf Stress interagieren das sympathische Nervensystem und die HPA-Achse eng miteinander. Im Gehirn werden sowohl CRF als auch NA-positive Neurone aktiviert, wenn ein Individuum Stress erfährt. Schon länger ist bekannt, dass NA und Adrenozeptor-Agonisten, die direkt ins Gehirn injiziert werden, die elektrophysiologische Aktivität von CRF-Neuronen verändern ⁽¹⁶⁰⁾ und in der Folge zu einem Anstieg von ACTH führen. Anders herum führt auch die intracerebroventrikuläre Injektion von CRF zu einer erhöhten elektrophysiologischen Aktivität der noradrenergen Neuronen im Locus coeruleus (LC) und vermehrten Ausschüttung von NA ^{(161), (162)}. Der Nucleus paraventricularis (PVN) des Hypothalamus gilt als zentraler Verschaltungsort humoraler und nervaler Signale der beiden Systeme bei der Wahrnehmung von Stress ^{(163), (164)}. Die starke noradrenerge Innervation des PVN zeigt, dass NA ein wichtiger Neurotransmitter für die Modulation dieses Kernes ist. Die Signale der noradrenergen Neuronen stammen zum größeren Teil vom Nucleus tractus solitarius in der Medulla oblongata und zu einem kleineren

Teil aus dem LC. Gerade in ungestressten Tieren scheint der LC eine untergeordnete Rolle zu spielen ^{(165), (166)}. Während Stress hingegen nimmt der Anteil des LC an der Gesamtmenge des ausgeschütteten NA im Gehirn deutlich zu, um maßgeblich an der Aktivierung der HPA-Achse teilzuhaben ⁽¹⁶⁷⁾. Aber auch viele andere Regionen des Gehirns wie der Nucleus paragigantocellularis und Nucleus centralis der Amygdala, der Hippocampus, die Stria terminalis und auch der Kortex scheinen bei der Interaktion von CRF und NA eine Rolle zu spielen ^{(168), (169), (170)}. So kann z.B. durch Mikroinjektionen eines α -Rezeptor-Antagonisten direkt in die Amygdala der durch akuten Immobilisationsstress induzierte Anstieg von ACTH abgeschwächt werden ⁽¹⁷¹⁾. Insgesamt sind die anatomischen Verhältnisse dieser beiden Systeme, trotz vieler neuer Erkenntnisse, nicht vollständig bekannt ⁽¹⁷²⁾.

Auch außerhalb des Gehirns wird zunehmend die dynamische Interaktion und die Plastizität vom sympathischen Nervensystem und der HPA-Achse erkannt. So beeinflussen GC langfristig die Sensitivität von verschiedenen Geweben auf Katecholamine durch Hochregulation von β -AR auf der Zelloberfläche und der intrazellulären cAMP-Aktivität, z.B. in glatten Muskel- und Epithelzellen des Respirationstraktes und Lymphozyten *in vivo* und *in vitro* ^{(45), (173), (174), (175), (176)}. Die Reaktivität einzelner Gewebe kann dadurch über lange Zeiträume verändert werden. Die Beobachtung, dass in Synovialzellkulturen von Patienten mit Rheumatoidarthritis durch simultane Gabe von GC und NA die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen deutlicher gesenkt wird als bei Gabe nur eines der Hormone, deutet ebenfalls den Synergismus der beiden Systeme an ⁽¹⁷⁷⁾.

Auch bei der Reaktion des Darmes auf Stress spielen die beiden Systeme eine zentrale Rolle. So beschreiben z.B. Jarillo-Luna und ihre Mitarbeiter den Einfluss der HPA-Achse und des SNS auf den stressinduzierten Abfall des intestinalen IgA-Spiegels ⁽¹⁷⁸⁾ und der intestinalen intraepithelialen Lymphozyten ⁽⁶⁷⁾. Im Allgemeinen kann davon ausgegangen werden, dass viele der durch psychischen Stress verursachten entzündlichen und immunologischen Veränderungen des Darmes durch die HPA-Achse und das autonome Nervensystem vermittelt werden ^{(179), (180), (181), (182), (183), (184)}. Dies spielt besonders in der Pathophysiologie von entzündlichen Darmerkrankungen und im Verlauf septischer Geschehen eine zentrale Rolle.

2.3 Die Rolle des Darmes im Stress

In allen mukosalen Geweben trennt eine komplexe Zell- und Schleimschicht die äußere Umwelt vom Organismus. Aufgrund der Anwesenheit von Speisebrei und symbiontischen bzw. pathogenen Keimen sind die physikalischen, chemischen und mikrobiellen Anforderungen an diese Barriere im Darm besonders intensiv. Um diesen Anforderungen gerecht zu werden, hat der Körper ein spezialisiertes lymphatisches Gewebe entwickelt (GALT – gut associated lymphoreticular tissue) ^{(185), (186)}. Es umfasst den Waldeyer'schen Rachenring (Tonsillae palatinae und pharyngealis, Zungenmandel), die Peyer'schen Plaques im Dünndarm und die Appendix vermiformis.

Aufgebaut ist die Darmbarriere aus einer dicken mukösen Schleimschicht, einer epithelialen Zellschicht und einer darunter liegenden nichtepithelialen mukosalen Zellschicht (*L. propria*), in der sich der Großteil der Immunzellen, hauptsächlich Leukozyten, befindet. Die hauptsächlich von der Epithelzellschicht sezernierte Schleimschicht ist reich an antimikrobiellen Molekülen (IgA, Defensine, Lysozym, etc.) und stellt somit eine wichtige immunologische aber auch physikalische Komponente der intestinalen Barriere dar ⁽¹⁸⁷⁾. Neben der Produktion der Hauptbestandteile der Schleimschicht stellt das Epithel die eigentliche Barriere für Keime und Toxine dar. Es handelt sich um eine polarisierte Zellschicht. Eng miteinander über *tight junctions* verbunden ist sie in der Lage, die trans- und parazelluläre Permeabilität einzuschränken. Innerhalb dieses Epithels befinden sich Enterozyten, die zur Resorption von Nährstoffen befähigt sind, neuroendokrine Zellen für die Bereitstellung von Verdauungsenzymen, Gobletzellen, die für die Produktion und Sezernierung des Schleims zuständig sind und schließlich Paneth-Zellen, die antimikrobielle Substanzen in die Schleimschicht ausschütten. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu einem ständigen Verlust apikaler Zellen, der die Homöostase der Mukosa jedoch nicht beeinträchtigt ⁽¹⁸⁸⁾. Ersetzt werden die verloren gegangenen Zellen durch ständige Nachproduktion aus Stammzellen in den Krypten der Darmzotten. Innerviert wird der Darm über die Plexus submukosus und myentericus, die durch das autonome Nervensystem reguliert werden ⁽¹⁸⁹⁾. Einen weiteren wichtigen Faktor für die adäquate Funktionsweise des Darmes stellt die reichhaltige Blutversorgung dar. Sie

gewährleistet den Abtransport der Nährstoffe und passt sich sympathikusvermittelt den verschiedenen Anforderungen an.

Schon unter physiologischen Bedingungen ist das Darmepithel durch die Darmflora und die aufgenommenen Nährstoffe einer großen Menge von Antigenen ausgesetzt. Das Epithel und das intestinale Immunsystem müssen in der Lage sein, einerseits Nahrungsbestandteile zu resorbieren und andererseits pathologische Keime an der Passage zu hindern und zu eliminieren ohne dabei die physiologische Darmflora zu zerstören. Um diesen Zustand zu gewährleisten, wird im gesunden Darm durch das intestinale Immunsystem eine lokale Immunsuppression herbeigeführt, die als orale Toleranz bezeichnet wird. So werden von Mukosa-assoziierten B-Zellen fast ausschließlich IgA-AK produziert ^{(190), (191), (192)}. Diese induzieren nicht wie IgG-AK eine entzündliche Reaktion, sondern neutralisieren die Bakterien, ohne inflammatorische Prozesse zu bedingen. Sogenannte $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten im Darm weisen eine veränderte Rezeptorausstattung auf, die zu einer verminderten Aktivierbarkeit und Proliferationsfähigkeit führt, und eine IgA-vermittelte Immunität stimuliert. Darmepithelzellen wiederum können über das konstitutiv exprimierte Zytokin TSLP (Thymic Stromal Lymphopoetin) mukosale, dendritische Zellen konditionieren. Danach reagieren Epithelzell-konditionierte mukosale dendritische Zellen selbst nach Kontakt mit einem T_H1 -induzierenden Antigen mit einer „klassischen“ T_H2 -Antwort und der Ausschüttung der antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und IL-6 ⁽¹⁹³⁾. Über hohe Sekretionsraten von IL-10 und TGF β aus regulatorischen T-Zellen wird im Magen-Darm-Trakt eine dominante Antiinflammation hergestellt ^{(191), (188), (194), (193)}. TGF β ist in der Lage in AK-produzierenden Zellen einen IgA-Klassenswitch zu induzieren und hemmt die lymphozytäre Zellproliferation. IL-10 hemmt die Proliferation von T_H1 - und T_H2 -Zellen und supprimiert die angeborene Immunantwort. Insgesamt wird so durch den ständigen immunsuppressiven Zustand eine destruktive Immunantwort im Darm verhindert. Die genauen Mechanismen dieser Toleranzinduktion und wie es dem Immunsystem gelingt, zwischen Kommensalen und pathogenen Keimen zu unterscheiden, sind in ihrer Komplexität noch nicht vollständig geklärt. Normalerweise werden pathogene Keime, die die Darmbarriere überwinden, durch eine proinflammatorische Entzündungsreaktion eliminiert und danach das antiinflammatorische Milieu wieder hergestellt. Es können sich aber auch chronisch entzündliche Zustände einstellen, deren Ursache in einer gestörten T_H1 - T_H2 Polarisierung gesehen wird ⁽¹⁹⁵⁾. Dabei kommt es zu einer unkontrollierten,

überschießenden Immunreaktion mit Aktivierung von T_H-Zellen und Produktion von IgG-AK, die sich gegen körpereigene Strukturen richten. Durch Induktion einer Entzündungsreaktion kommt es so bei Autoimmunerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa (196), (197), (198) und Nahrungsmittelallergien (199), (200) zur Zerstörung des Darmepithels. Dies führt zu einer erhöhten Permeabilität für antigene Makromoleküle aus dem Darmlumen in die Blutbahn. Auch bei Multi-Organ-Versagen in Folge einer Sepsis oder schwerem Trauma (201), (202), (203) wird der erhöhten intestinalen Permeabilität sowohl in der Pathogenese als auch der Entwicklung von Komplikationen eine zentrale Rolle beigemessen. In diesem Zusammenhang wird oft vom „leaky-gut-syndrome“ gesprochen. Ob dabei die Dysfunktion der Darmbarriere als primäre Ursache oder als Folge der systemischen Entzündung aufgrund der translozierten Bakterien zu sehen ist, ist nicht abschließend geklärt. Dessen ungeachtet erscheint die Wiederherstellung der Barrierefunktion eine erstrebenswerte therapeutische Option zu sein.

Zunehmend wird deutlich, dass Stress über neurohumorale Mechanismen die verschiedenen Komponenten der Darmbarrierefunktion beeinflusst, und in der Pathogenese von entzündlichen Darmerkrankungen und septischen Geschehen eine Rolle spielt. So sind die Auswirkungen von Stress bei der intestinalen Dysfunktion sowohl im Menschen (204) als auch im Nager bekannt (198), (205), (206), (207).

Qiu et al. zeigen, dass eine Dinitrobenzensäure-induzierte (DNBS) Colitis in BALB/c Mäusen 6 Wochen später durch akuten Stress und geringe Mengen an DNBS, nicht jedoch mit DNBS alleine, reaktiviert werden kann. Dies zeigte sich an einer erhöhten Permeabilität für ³H-Mannitol und einer verminderten Schleimproduktion (198). Andere Autoren zeigen, dass bereits akuter und chronischer Stress alleine zu einer erhöhten Permeabilität für Ionen und Makromoleküle führt (207), (208), (209), (210). Durch einmalige bzw. wiederholte Gabe von CRF können die gleichen Effekte erzeugt werden (210), (211).

In unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es durch psychischen Stress (kombinierter Immobilisations- und akustischer Stress) zu einer Permeabilitätsstörung des Darmes und einer damit zusammenhängenden, verstärkten bakteriellen Translokation in weiblichen BALB/c Mäusen im Vergleich mit ungestressten Kontrollen kommt. Direkt nach einer akuten Stresssitzung (2 Stunden) kam es zu einer Lymphozytopenie und einem apoptotischen Verlust von Epithelzellen im terminalen Ileum. 6 Stunden nach Beendigung des Stresses konnten sowohl in der Leber als

auch in mesenterialen Lymphknoten eine erhöhte bakterielle Last von Darmkommensalen nachgewiesen werden. Wurde der Stress für weitere 5 Tage fortgeführt, entwickelten die Mäuse eine Immunsuppression, die charakterisiert ist durch eine verminderte *ex vivo* Induzierbarkeit proinflammatorischer Zytokine, aber erhöhten Produktion von IL-10 in Milzzellen gestresster Tiere, durch eine Thymuskortexinvolution und die verminderte Fähigkeit, eine experimentelle Infektion mit *E.coli* ⁽³³⁾ und *S. typhimurium* (unveröffentlichte Daten) adäquat zu bekämpfen. Ausserdem zeigten die Tiere einen deutlichen Gewichtsverlust ⁽²¹²⁾ und depressives Verhalten.

Als ein bedeutender stressinduzierter, immunsuppressiver Mechanismus konnte die Aktivierung der Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO) identifiziert werden. Durch proinflammatorische Zytokine oder bakterielle Produkte wie LPS oder CpG-Motive ist dieses geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Tryptophanabbaus induzierbar ⁽²¹³⁾, ⁽²¹⁴⁾. Das heißt die durch im Stress translozierten Bakterien hervorgerufene Induktion einer proinflammatorischen Antwort führt zu einer gesteigerten Aktivität von IDO. Tryptophan wird, wenn IDO aktiv ist, zunächst zu Kynurenin abgebaut, welches durch verschiedene Enzyme zu Kynureninsäure, Anthranilsäure oder 3-Hydroxy-Kynurenin und Quinolinsäure verstoffwechselt wird (Abb. 2.1). Eines der Endprodukte des Tryptophanmetabolismus ist Nikotinamidadenindinukleotid (NAD⁺) ⁽²¹³⁾, ⁽²¹⁵⁾, ⁽²¹⁶⁾, welches für die Energiegewinnung durch Adenosintriphosphat (ATP) gebraucht wird. In der Folge der Aktivierung von IDO kommt es zu einem Verbrauch von Tryptophan, der im Plasma gemessen werden kann. Durch den Mangel dieser essentiellen Aminosäure kommt es zu einem Arrest der T-Zellproliferation, da eine Zellteilung nicht mehr möglich ist ⁽²¹⁷⁾, ⁽²¹⁸⁾. Desweiteren ist Tryptophan der Ausgangsstoff für die Serotoninsynthese. Ein Mangel an Serotonin wiederum ist mit depressiven Zuständen assoziiert ⁽²¹⁹⁾, ⁽²²⁰⁾. Einige der Abbauprodukte von Tryptophan, die bei Aktivierung des IDO-Abbauweges entstehen, sind neuro- und immunotoxisch ⁽²²¹⁾, ⁽²²²⁾, ⁽²²³⁾, ⁽²²⁴⁾, ⁽²²⁵⁾. So wird dem Tryptophanmetaboliten Kynurenin eine neurodegenerative Eigenschaft zugesprochen, die ebenfalls an der Entstehung von Depression beteiligt sein soll ⁽²²⁶⁾, ⁽²²⁷⁾. Bezüglich der Immunotoxizität zeigt sich *in vitro*, dass Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilinsäure die Apoptose von T-, B- und NK-Zellen fördern. Quinolinsäure und 3-Hydroxy-Anthranilinsäure vermitteln *in vitro* über Caspase-8 die Apoptose von Thymozyten und T_H1-Zellen ⁽²²²⁾. T_H2-Zellen hingegen sind von den zytotoxischen Effekten nicht betroffen ⁽²²²⁾. Durch diese Verminderung

der T_H1-Zellantwort induziertIDO ein antiinflammatorisches Milieu und schwächt die Immunabwehr ^{(217), (218)}. Verschiedene Autoren gehen davon aus, dass diese proapoptotischen Effekte auch *in vivo* stattfinden ^{(222), (224), (225)}. So bringen verschiedene *in vivo* Studien ein verlängertes Transplantatüberleben und vermindertes Tumorwachstum in Zusammenhang mit der IDO-abhängigen Tryptophandepletion und Produktion zytotoxischer Metabolite ^{(228), (229), (230), (231)}. In der Schwangerschaft wird durch die Aktivierung von IDO in der Plazenta ein lokal immunsuppressiver Zustand hergestellt, der die Abstoßung des Fötus verhindert ^{(214), (215)}. Weiterhin ist beschrieben, dass Tryptophanmangel, bei der Bekämpfung von pathogenen Keimen einen protektiven Mechanismus darstellt, indem die Zellteilung der Bakterien verhindert wird ^{(213), (215), (214)}. In der akuten Infektion kann somit die Funktion von IDO darin gesehen werden, einerseits das bakterielle Wachstum zu hemmen und andererseits durch seine antiinflammatorischen Eigenschaften eine übermäßige Inflammation zu verhindern. Kommt es hingegen zu einer pathologisch verstärkten Aktivierung (z.B. im chronischen Stress), kann dies zur Entstehung von Depression und Immunsuppression führen.

Insgesamt unterliegt die intestinale Barriere einer vielfältigen neuro-immuno-endokrinen Regulation, die aufgrund der Mannigfaltigkeit in dieser Arbeit nicht genau beschrieben werden kann. Zusammenfassend ist dazu nur anzumerken, dass sich die Barriere im Magen-Darm-Trakt damit dynamisch an viele physiologische Bedingungen anzupassen vermag. So kann z.B. die Produktion und Sekretion von Bestandteilen der Schleimschicht von PAMPs ^{(232), (233)}, proinflammatorischen Zytokinen (TNF α , IL-9, IL-4, IL-1 β , IL-13) ^{(234), (235), (236)}, Hormonen wie Leptin ⁽²³⁷⁾ und *Vasoactive intestinal peptide* ⁽²³⁸⁾ und nervalen Stimuli ^{(235), (239), (240)} gefördert werden.

Über CRF ist bekannt, dass es maßgeblich an der lokalen Regulation der Darmbarrierefunktion beteiligt ist. Durch die Gabe von CRF können z.B. wesentliche Merkmale einer stressinduzierten Permeabilitätserhöhung imitiert werden ^{(181), (211), (204)}. Andererseits führt die Blockade von CRF-Rezeptoren zur Verhinderung der Darmbarrierestörung. Allerdings scheinen diese CRF-Effekte unabhängig von der HPA-Achse zu funktionieren ^{(181), (241)}. So ist bekannt, dass CRF nicht nur im Rahmen einer HPA-Achsenantwort ausgeschüttet wird, sondern auch in Leukozyten und Nervenendigungen produziert werden kann und über auto- und parakrine Mechanismen lokal Einfluss auf seine Umgebung nimmt ⁽²⁴²⁾.

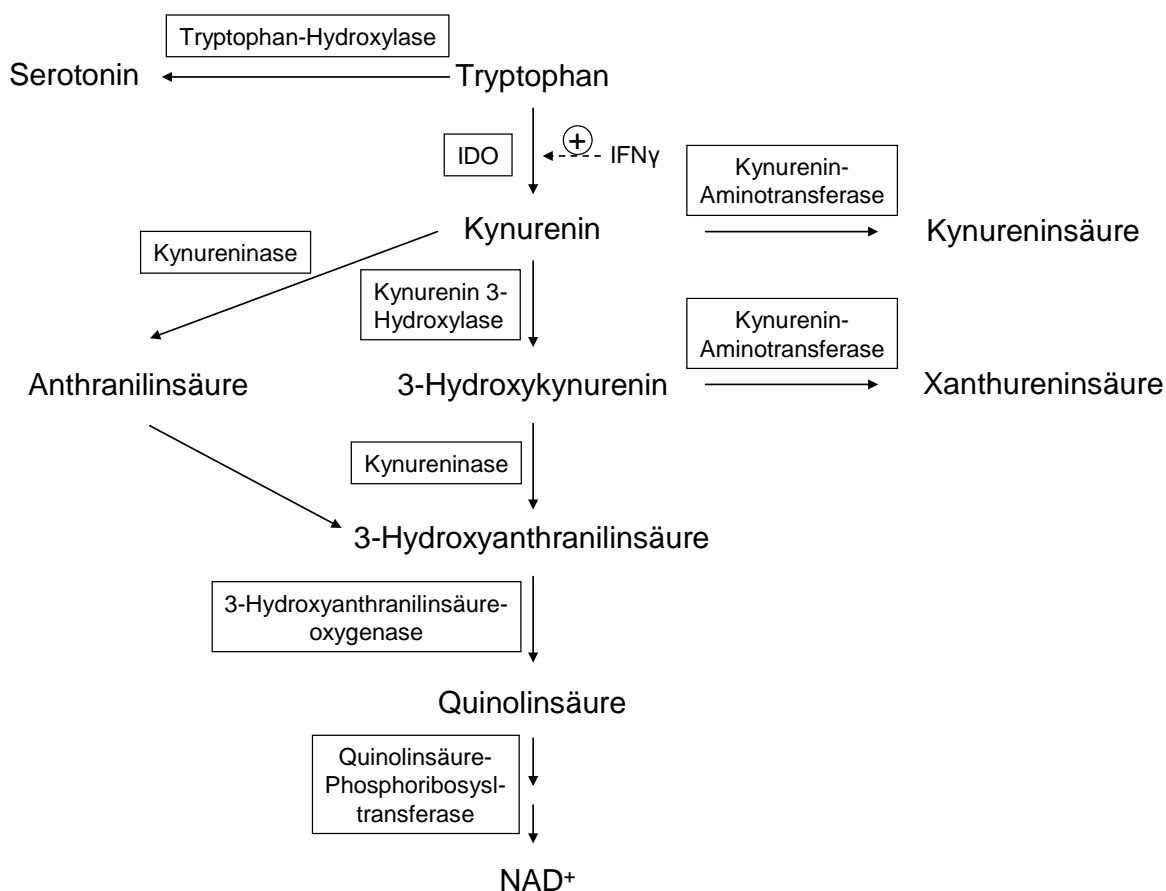


Abb. 2.1 Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan (vereinfachte Darstellung).

Die Tryptophan-Hydroxylase baut Tryptophan zu Serotonin um. Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Kynurenin-Abbauweges und kann durch Interferon- γ (IFN γ) aktiviert werden. Aus Kynurenin entstehen einerseits Kynureninsäure und andererseits 3-Hydroxyanthranilinsäure und Quinolinsäure. NAD⁺ wird bei verschiedenen Prozessen zur Bereitstellung von Energie benötigt.

Wichtig anzumerken ist zusätzlich, dass die Integrität der Epithelzellschicht durch Zytokine beeinflusst werden kann. Ergebnisse unserer Arbeitsgruppen zeigen, dass durch die Therapie mit Endotoxin-freiem Anti-TNF α -AK die Darmbarrierestörung und Translokation von Bakterien verhindert werden kann. Dies geht mit einer Verminderung von stressinduzierten Apoptosen intestinaler Epithelzellen einher (unveröffentlichte Ergebnisse). In die gleiche Richtung weisen Ergebnisse, die zeigen, dass *in vitro* Darmepithelzellen in Apoptose gehen, wenn sie mit TNF inkubiert werden

(243), (244). Darüber hinaus scheint der interzelluläre Zusammenhalt durch *tight junctions* durch TNF und IFN γ beeinträchtigt zu werden (245), (246), so dass die Darmpermeabilität ansteigt. Die Quellen der Zytokine im Gastro-Intestinal-Trakt gestresster Tiere sind bislang wenig untersucht. Mastzellen werden als eine der Hauptquellen intestinalen TNFs vermutet (247), (248). Wie bereits im Abschnitt „Autonomes Nervensystem“ erwähnt, nimmt der Sympathikus direkt Einfluss auf Immunzellen. So haben Katecholamine über β -AR einen stabilisierenden Effekt auf Mastzellen und erschweren dadurch die TNF-Ausschüttung (249), (250). Peritoneale Makrophagen hingegen reagieren auf Stimulation mit Katecholaminen mit einer gesteigerten Produktion von TNF α und IL-1 (251). Und im Plasma von Mäusen konnte gezeigt werden, dass der LPS-induzierte Anstieg von TNF α durch Depletion von NA mittels Reserpin verhindert wird (114).

Auch über die Regulation der hämodynamischen Versorgung des Darmes nimmt der Sympathikus Einfluss auf die Darmbarriere. Durch Erhöhung der Katecholamine wird im Splanchnikusgebiet eine α -adrenerge Vasokonstriktion vermittelt, die potentiell zu einer Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen führt. Mukosale Hypoxie ist eine der zentralen Ursachen für die Entwicklung von Apoptosen intestinaler Epithelzellen und Lymphozyten, die in der Folge zu epithelialer Dysfunktion mit erhöhter Permeabilität führen (252), (253), (254), (255). Wie bereits erwähnt, kam es in Experimenten aus unserer Arbeitsgruppe nach 2 Stunden akutem psychischen Stress zum apoptotischen Zellverlust intestinaler Epithelzellen mit nachfolgender Translokation von Bakterien in die Leber und mesenteriale Lymphknoten. Inwiefern diese Apoptosen durch eine verminderte Perfusion des Darmes aufgrund erhöhter Katecholamine bedingt sind, ist nicht geklärt. Demnach stellt sich die Frage, ob mit einer die α -AR einschließenden Sympathikolyse durch Verbesserung der Sauerstoffversorgung ein protektiver Effekt auf die Darmbarriere herbeizuführen ist.

3. Zielstellung

Um die Rolle des Sympathikus bei akutem, psychischen Stress in der Maus zu untersuchen, wurde mit Hilfe von Reserpin eine chemische Sympathikolyse herbeigeführt.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

- Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
- ACTH ₁₋₂₄	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- d ₄ -Kynureninsäure	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
- d ₅ -Phenylalanin	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
- d ₆ -Kynurenin	Cambridge Isotope Laboratories, Andover, USA
- Ethanol, 99,8%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- PBS-DULBECCO	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
- Physiologische Kochsalzlösung (NaCl)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
- Salzsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
- TissueTek [®] Einbettungsmedium	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland
- Trichloressigsäure	Fluka BioChemika, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterial

- Cryomold [®] -Einbettungschalen	Sakura Finetek, Heppenheim, Deutschland
- Deckgläschen	Superior Marienfeld, Marienfeld, Deutschland
- EDTA-Vacutainer K2E	BD [™] -Vacutainer, Plymoth, UK

- Einmalspitzen (10µl, 200µl, 100µl, 2,5ml)	Greiner Bio-one, Deutschland oder Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Einmalspritzen 0,5 ml	BD™, Franklin Lakes, USA
- Einmalspritzen 2 ml	BD™-Discardit, Plymoth, UK
- Mikro-Hämatokritröhrchen	Brand, Wertheim, Deutschland
- Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Spritzenvorsatzfilter, 0,45 µm	MILLEX®, MILLIPORE, Irland
- SuperFrost Objektträger	R. Langenbrinck, Deutschland
- Tierfutter, ssniff R-Z ssniff	Spezialitäten GmbH, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen (15 ml)	SARSTEDT, Deutschland
- Zentrifugenröhrchen (50 ml)	Falcon®, Becton Dickinson Labware, Meylan Cedex, France

4.1.3 Geräte

- ELISA-Reader (Tecan)	SLT- Labinstruments, Crailsheim, Deutschland
- Hämocounter Sysmex K-4500	SYSMEX GmbH, Deutschland
- Kamera, SPOT RT Power Supply	Visitron Systems GmbH, Hamburg, Deutschland
- Kryotom MICROM HM 560	MICROM Int. GmbH, Deutschland
- Mikroskop: Olympus BX60	Olympus, Hamburg, Deutschland
- Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
- Orbitalschüttler, Shaker: S-3.08M Skyline	Bartels Instruments, Heidelberg, Deutschland
- Tandem Massenspektrometer Refurb Wallac MS2	Perkin Elmer, Rodgau, Deutschland

- | | |
|------------------------------|---|
| - Ultraschallsender | SiXiS, Pat.No.109977, Taiwan |
| - Vortex | IKA-Labortechnik, Staufen,
Deutschland |
| - Zentrifuge: EBA 12 R | Hettich, Tuttlingen, Deutschland |
| - Zentrifuge: Megafuge 1.0 R | Heraeus, Hanau, Deutschland |

4.1.4 Kits

- | | |
|-----------------------|---------------------------|
| - Corticosteron-ELISA | IDS, Boldon, UK |
| - Noradrenalin-ELISA | IBL, Hamburg, Deutschland |
| - Adrenalin-ELISA | IBL, Hamburg, Deutschland |

4.1.5 Versuchstiere und deren Behandlung

- | | |
|---|--|
| - BALB/c-Mäuse, weiblich u. männlich | eigene Zucht, Universität
Greifswald oder Charles River
Laboratories, Sulzfeld,
Deutschland |
| - Reserpin | Sigma, Steinheim, Deutschland |
| - Narkose: | |
| Ketamin 500mg | DeltaSelect, Dreieich,
Deutschland |
| Rompun [®] , Xylazinhydrochlorid | Bayer Vital GmbH, Leverkusen,
Deutschland |
| Physiologische Kochsalzlösung | Braun Melsungen AG,
Melsungen, Deutschland |

4.1.6 Computerprogramme

- | | |
|-----------------------------|---|
| - Excel 2000 | Microsoft Co.,
Unterschleißheim, Deutschland |
| - GraphPad Prism 3.02 und 5 | GraphPad Software Inc., San
Diego, USA |

- easyWin basic V 6.0a	Tecan GmbH, Crailsheim, Deutschland
- SPOT Advanced	Visitron Systems GmbH, Hamburg, Deutschland

4.2 Methoden

4.2.1 Rahmenbedingungen der Tierversuche

Die 8-12 Wochen alten Mäuse wurden 4 Wochen vor Beginn des Experimentes entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit auf Käfige aufgeteilt (5-6 Mäuse/Käfig). Bis zum Beginn des Experimentes verblieben die Tiere unter konstant stressminimierten Bedingungen in einem ventilierten Isolator bei einem Tag-Nacht-Rhythmus von 12 Stunden (6.00–18.00 Uhr), konstanter Raumtemperatur (21-23°C) und Luftfeuchtigkeit und Futter und Wasser *ad libitum*. 2x pro Woche wurden die Käfige von der betreuenden Person gereinigt.

Im Labor war ein konstanter Schallpegel von 50-52dB mehrfach gemessen worden (Prof. rer. nat. Ch. Wilke, Institut für Physik, Ernst Moritz Arndt Universität Greifswald). Zusätzliche Schallquellen wurden vermieden.

Zu keinem Zeitpunkt befanden sich zuvor gestresste Tiere innerhalb des Isolators.

Zur Vermeidung der Übertragung potenzieller Infektionen auf die Tiere wurde stets mit Kittel, Mundschutz, Haarschutz, Plastikschuhüberziehern und Latex-Handschuhen gearbeitet.

4.2.2 Das psychische Stressmodell des akuten, kombinierten akustischen und Immobilisationsstresses

Als Modell des akuten Stresses wurde ein kombinierter Immobilisations- und Akustikstress angewendet ⁽³³⁾. Akuter Stress wurde durch eine zweistündige Stresssitzung von 8:00 bis 10:00 Uhr morgens erzeugt. Akustischer Stress wurde durch Ultraschall erzeugt. Der Sender emittierte zufällig verteilte, irreguläre Schwingungen mit einer Amplitudenmodulation zwischen 15 und 25 kHz und einem randomisierten Schalldruckpegel zwischen 50 und 85 dB, d.h. 0 bis 35 dB über dem Hintergrundschalldruckpegel von 50 dB im Raum.

Als Immobilisationsstress wurden die Tiere, ohne Anwendung von Gewalt, in gut belüftete (mehrere Löcher im Konus) 50ml Zentrifugenröhrchen platziert und der Schwanz zur Vermeidung von Verletzungen durch ein Loch im Schraubschlussdeckel gesteckt. Die Zentrifugenröhrchen, mit den darin immobilisierten Tieren, wurden in einer Styropor[®] Halterung im Abstand von 30 cm vor der Ultraschallquelle horizontal platziert.

Nach Beendigung der Stressexposition wurden die gestressten Tiere, ihren Gruppen entsprechend, zurück in ihre Käfige gesetzt.

Zur Vermeidung einer olfaktorischen und akustischen Beeinflussung der Kontrolltiere wurden diese streng getrennt im Isolator gehalten.

4.2.3 Das Transportstressmodell

Sechs Wochen alte weibliche BALB/c Mäuse wurden von Charles River[®] gekauft und über Nacht für 18 Stunden transportiert. Während des Transportes wurden die Tiere routinemäßig in belüfteten Tiertransportkartons mit freiem Zugang zu Nahrung und Flüssigkeit gehalten. Nach Ankunft wurden sie in Gruppen von 6 Tieren pro Käfig eingeteilt, die sie bis zum Ende der Experimente beibehielten. Als Vergleichsgruppen wurden gleichaltrige weibliche BALB/c Mäuse aus der institutseigenen Zucht verwendet, die nur einmal den Raum wechselten. Diese Tiere wurden bereits im Alter von 4 Wochen geschlechtlich getrennt und in Gruppen eingeteilt (6 Tiere/Käfig). Danach wurden alle Tiere unter konstant minimierten Stressbedingungen in einem Isolator gehalten. Zwei Stunden nach Ankunft der transportierten Tiere, am Folgetag sowie an den Tagen 8, 15 und 22 wurden die Tiere jeweils um 10 Uhr gewogen und bekamen Blut entnommen. Im Alter von 10 Wochen, also nach 4 Wochen Adaptationszeit, wurde eine akute Stresssitzung nach oben beschriebener Methode durchgeführt.

4.2.4 Die Behandlung mit Reserpin

Das Reserpin wurde in einer Lösung mit einer Konzentration von 200µg/ml appliziert. Pro Maus wurde jeweils 100µl der Reserpinlösung bzw. NaCl als Kontrolle subkutan in die Nackenfalte injiziert, sodass pro Maus von einer Endkonzentration von 20µg/g Körpergewicht ausgegangen werden kann. Am Vortag der Applikation wurde das lyophilisierte Reserpin mit Essigsäure angesäuert, mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und mit NaOH auf einen pH von ca. 7,2 titriert. Über Nacht wurde die Lösung bei 4-8°C gelagert.

24 Stunden vor Stressexposition bekamen die Mäuse die Reserpin-Lösung bzw. NaCl gespritzt und verblieben bis zur Stressexposition ohne weitere Manipulation in ihren ursprünglichen Käfigen.

4.2.5 Messung der Corticosteronkonzentration im Plasma

Die Mäuse wurden mittels Ketamin/Xylazin (Ketamin: 150 µg/g Körpergewicht, Xylazin: 20 µg/g Körpergewicht, intraperitoneal) narkotisiert und durch retroorbitale Punktion geblutet. Das Blut wurde in EDTA-beschichteten Vacutainern aufgefangen, durch Zentrifugation (3345g, 10min, 4°C) von zellulären Bestandteilen getrennt, aliquotiert und bei -20°C gelagert. Mehrmaliges Auftauen der Proben wurde vermieden.

Die enthaltene Corticosteron-Konzentration wurde mittels ELISA bestimmt, wobei die im Kit enthaltenen Herstellerangaben befolgt wurden.

4.2.6 Messung der Katecholaminkonzentration im Plasma

Nach der wie unter Punkt 4.2.5 beschriebenen Plasma-Gewinnung wurde die enthaltene Noradrenalin- und Adrenalin-Konzentration mit Hilfe eines ELISA bestimmt, wobei die im Kit enthaltenen Herstellerangaben befolgt wurden.

4.2.7 Quantitative Bestimmung der Leuko- und Lymphozytenzahl im peripheren Vollblut

Die Anzahl der Leuko- und Lymphozyten in dem unter Narkose durch retroorbitale Punktion gewonnenen EDTA-Blut der Mäuse wurde mit Hilfe eines für Humanblut geeichten Hämocounters bestimmt.

Das zur Bestimmung der Hormone benötigte Blutplasma wurde zuvor abpipetiert und aliquotiert. Die entnommene Menge Plasma wurde mit PBS wieder aufgefüllt und die zellulären Bestandteile resuspendiert.

4.2.8 Messung der Indolamine im Plasma

Die Konzentrationen von Tryptophan und seinen Kataboliten Serotonin, Kynurenin, Kynureninsäure und Quinolinsäure wurden im Plasma der Mäuse bestimmt, welches nach Zentrifugation des EDTA-Vollblutes aus dem retroorbitalen Venenplexus gewonnen worden war. Zu 100µl Plasmaprobe wurden 10µl 50%ige Trichloressigsäure (gelöst in Aqua dest.), 10µl d₅-Phenylalanin, 10µl d₄-Kynureninsäure, 10µl d₆-Kynurenin, 100µl Methanol und 60µl Aqua dest. gegeben. Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (20.000 g, 15 min). Anschließend wurde die obere Phase abgenommen und für die Messungen der Kataboliten-Konzentrationen im Tandem-Massenspektrometer verwendet. Der Quotient von Kynurenin und Tryptophan diente, mit 100 multipliziert, als Parameter für die IDO-Aktivität.

Die Präparation der Proben wurde von Grazyna Domanska, Abteilung für Immunologie, die Messungen im Tandem-Massenspektrometer durch Dr. G. Fusch, Institut für Pädiatrie und pädiatrische Intensivmedizin, Universitätsklinikum Greifswald, durchgeführt.

4.2.9 Fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des Ileums

Unmittelbar vor Stressbeginn wurden die Mäuse mittels einer Pipette mit 20µl Evans Blue 1mg/ml geschlündelt. Durch leichtes Berühren der Rachenhinterwand mit der Pipettenspitze wurde der Schluckreflex ausgelöst. Nach der Stresssitzung und Tötung

der Tiere durch zervikale Dislokation wurde das terminale Ileum vorsichtig freipräpariert, in Tissue Tec[®] eingebettet, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

An einem Kryotom wurden, unter Vermeidung von übermäßiger Lichtexposition, Schnitte von 6µm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden über Nacht in Dunkelheit getrocknet, am nächsten Morgen für 10 min. in Aceton (-20°C) fixiert, für 1 Stunde getrocknet und dann entweder, in Alufolie eingewickelt, bei -20°C eingefroren oder sofort verwendet.

Zur Kernfärbung wurde Hoechst Farbstoff in PBS 1:2000 angewendet. Vor der Färbung wurden die Schnitte für 10 Minuten in PBS gewässert, dann für 5 Minuten gefärbt und danach für 2 Minuten in PBS gespült. Zur Vorbereitung der Schnitte für die mikroskopische Betrachtung wurden sie in Fluoprep[®] unter Deckgläschen eingebettet. Die mikroskopische Beurteilung der Bilder erfolgte am Fluoreszenzmikroskop.

Um eine subjektive Bewertung der Evans Blue Färbung auszuschließen, wurde zunächst ein Bildausschnitt unter Anregung der blauen Fluoreszenz eingestellt, d.h. nur unter Betrachtung der „Hoechst“ gefärbten Kerne. Danach wurde der Fluoreszenzkanal, ohne weitere Veränderungen am Bildausschnitt, auf den grünen Fluoreszenzkanal zur Betrachtung der Evans Blue gefärbten Abschnitte umgestellt und ein weiteres Foto desselben Bildausschnittes geschossen. Die beiden entstandenen Bilder wurden digital übereinander gelegt. Pro Schnitt wurden je 5 Bilder aus verschiedenen Bereichen des Präparates angefertigt.

Zur relativen Quantifizierung der Evans Blue Translokation wurde der Quotient der Anzahl der gemessenen Pixel (Evans Blue/gefärbte Kerne) pro Bildausschnitt errechnet und der Mittelwert pro Maus ermittelt, der in die statistische Analyse einging. Die Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des Darmes wurde als Surrogat für eine stattgehabte Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen in die Blutbahn verwendet.

4.2.10 Statistik

Alle Daten dieser Arbeit wurden anhand von GraphPad Prism 3.02 und 5 analysiert. Unterschiede zwischen zwei unabhängigen Gruppen wurden mittels Mann-Whitney-Test analysiert. Unterschiede zwischen mehr als 2 Gruppen wurden mittels Bonferroni-Test nach one-way ANOVA bzw. bei einer weiteren zeitabhängigen Komponente nach two-way ANOVA bestimmt. Alle Daten sind als Boxplots dargestellt. Ein p-Wert unter 0,05 wurde als signifikanter Unterschied angesehen.

5. Ergebnisse

5.1 Etablierung einer Interventionsmethode zur Sympathikolyse

Zur Untersuchung der Effekte des Sympathikus im akuten psychischen Stress sollte mit Hilfe des Ergotaminderivates Reserpin bei BALB/c Mäusen eine partielle Sympathikolyse hervorgerufen werden.

Als *Readout*-System zum Nachweis der Wirkung von Reserpin werden im Allgemeinen die Quantifizierung der Dyskinesie, der Hypothermie und die Messung des Abfalls der Katecholamine im Blut oder in Organen verwendet.

Reserpin führt zu einer Depletion aller Monoamine (NA, Adrenalin, Serotonin, Dopamin). Durch die Depletion des Dopamins kommt es zur Dyskinesie bzw. dem sogenannten „Parkinsonoid Syndrom“^{(256), (257), (258), (259)}. Dieses ist bei den Mäusen gut sichtbar, aber nur schwer zu quantifizieren und mit den uns zur Verfügung stehenden Methoden nicht auswertbar. Desweiteren kommt es durch Reserpingabe zu einer deutlichen Hypothermie^{(260), (115), (261)}. Bei Ratten oder noch größeren Tieren ist diese gut durch eine rektale Temperaturmessung quantifizierbar. Bei Mäusen ist zum einen die Durchführbarkeit einer rektalen Temperaturmessung aufgrund ihrer Körpergröße eingeschränkt. Darüber hinaus hätte diese Prozedur einen zusätzlichen Stresseffekt bedeutet, der eventuelle Ergebnisse unserer Experimente verfälschen hätte können⁽²⁶²⁾.

Recherchen vor Beginn der Experimente zeigten, dass das Reserpin in den meisten Fällen intraperitoneal appliziert wird. Da in unseren Experimenten u.a. die Auswirkungen von Stress auf den Darm untersucht werden würde, sollte jegliche Manipulation am Darm und der Bauchhöhle vermieden werden. Deshalb musste initial die gleichwertige Wirksamkeit einer subkutanen Applikation des Reserpins bewiesen werden.

Bei einem ersten Experiment erhielten je drei männliche BALB/c Mäuse pro Gruppe 1mg/kg Körpergewicht (KG) Reserpin entweder intraperitoneal oder subkutan injiziert. Dabei lagen die NA-Werte im Plasma von subkutan gespritzten Tieren 48 Stunden nach Injektion sogar noch niedriger als die der intraperitoneal behandelten Tiere (Daten nicht gezeigt). Da sich auch in den folgenden Experimenten eine signifikante Depletion von NA im Plasma von subkutan gespritzten Mäusen zeigte (Abb. 5.1)

bewerteten wir die subkutane Applikation von Reserpin als mindestens gleichwertig zur intraperitonealen.

Ein zweites Problem stellte die zeitliche Komponente dar. Aufgrund der initialen Ausschüttung aller Monoamine aus ihren Speichervesikeln durch Reserpin, kommt es kurz nach Applikation zu einem initialen Anstieg des Sympathikotonus und erst im Verlauf zum Abfall der Katecholamine. Deshalb musste zwischen der Injektion des Reserpins und der Stressexposition ein genügend langer Zeitraum liegen, um einen Einfluss dieser initialen Antwort zu minimieren. Auf der anderen Seite sollte die sympathikolytische Wirkung des Reserpins noch anhalten. Wie in Abbildung 5.1 zu sehen ist, war bereits 24 Stunden nach subkutaner Injektion von Reserpin das NA im Plasma von männlichen BALB/c Mäusen signifikant abgesunken und blieb auf einem vergleichbar niedrigen Level bis zu 48 Stunden nach Injektion. Somit war gewährleistet, dass in den folgenden Experimenten zu jedem Entnahmezeitpunkt eine signifikante Depletion von NA, als Zeichen der partiellen Sympathikolyse, gegeben war.

Zusätzlich zur Messung der NA-Werte wurde aus denselben Proben die Konzentration von Adrenalin im Plasma bestimmt. Auch hier zeigten sich 48 Stunden nach subkutaner Injektion von Reserpin im Plasma von männlichen BALB/c Mäusen signifikant niedrigere Werte als in unbehandelten Kontrollen (Daten nicht gezeigt). In den folgenden Experimenten wurde als Nachweis der Wirksamkeit von Reserpin nur das NA gemessen.

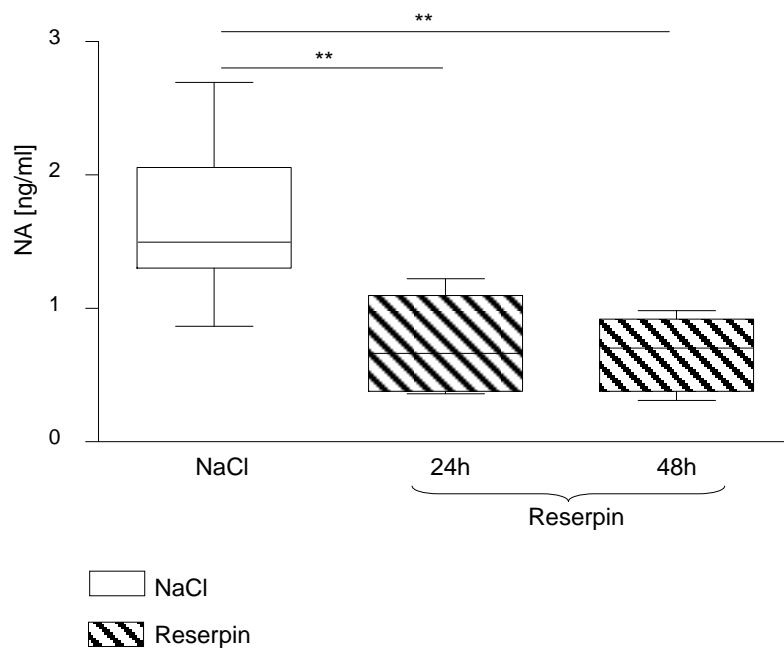


Abb. 5.1

Noradrenalinwerte im Plasma von Reserpin- bzw. Kochsalz-behandelten, männlichen BALB/c Mäusen. Die Tiere erhielten subkutan $1\mu\text{g/g}$ Körpergewicht Reserpin bzw. Kochsalz (NaCl) injiziert. 24h oder 48h später wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und die Noradrenalinwerte (NA) im Plasma mittels ELISA gemessen. jeweils $n=7$ Tiere/ Gruppe in den reserpinbehandelten Gruppen und $n=13$ Tiere/Gruppe in der Kontrollgruppe, Summe aus 2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen; $**p<0,01$

5.2 Einfluss von Reserpin auf stressinduzierte Veränderungen in der Maus

5.2.1 Einfluss von Reserpin auf Noradrenalinwerte im Plasma gestresster Mäuse

Vorherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass direkt nach 2 Stunden kombiniertem akustischen und Immobilisationsstress die Konzentration von NA im Plasma von weiblichen BALB/c Mäusen signifikant abgefallen war. Die meisten Veröffentlichungen zeigen hingegen, dass es nach akuter Stressexposition zu einem Anstieg von NA kommt ^{(172), (263)}. Deshalb vermuteten wir, dass es bereits während der Stressexposition als Zeichen der Sympathikusaktivierung zum Anstieg der Katecholamine kommt, d.h. die Speichervesikel bereits entleert werden, die Transmitter enzymatisch abgebaut werden und sich somit am Ende der Stressexposition ein Abfall des NA zeigt. Um dieses Phänomen genauer beurteilen zu können und später die eventuell durch das Reserpin hervorgerufenen Veränderungen richtig zu interpretieren wurde die Kinetik der NA-Werte im Plasma von weiblichen BALB/c Mäusen beginnend 15 Minuten nach Stressbeginn bis 2 Stunden nach Beendigung einer 2-stündigen Stressexposition untersucht. Anders als erwartet, konnte allerdings in diesen Untersuchungen über den gesamten Beobachtungszeitraum kein signifikanter Anstieg oder Abfall der NA-Werte gezeigt werden (Abb. 5.2). Auch nach erneutem Messen der Proben mit einem ELISA-Kit eines anderen Herstellers, zeigten sich die gleichen Ergebnisse.

Auch die Messung des Adrenalins im Plasma aus denselben Proben zeigte keine signifikanten Veränderungen (Daten nicht gezeigt).

Sowohl ungestresste Reserpin-behandelten Kontrolltiere, als auch Reserpin-behandelte, gestresste Tiere zeigten einen deutlichen Abfall des NA im Plasma (Abb. 5.3), der auch noch 12 Stunden später nachweisbar war (Daten nicht gezeigt).

Demnach kann davon ausgegangen werden, dass die Gabe von Reserpin auch zu einer verlässlichen Hemmung des Sympathikus führt, wenn die Tiere der Stressexposition ausgesetzt waren.

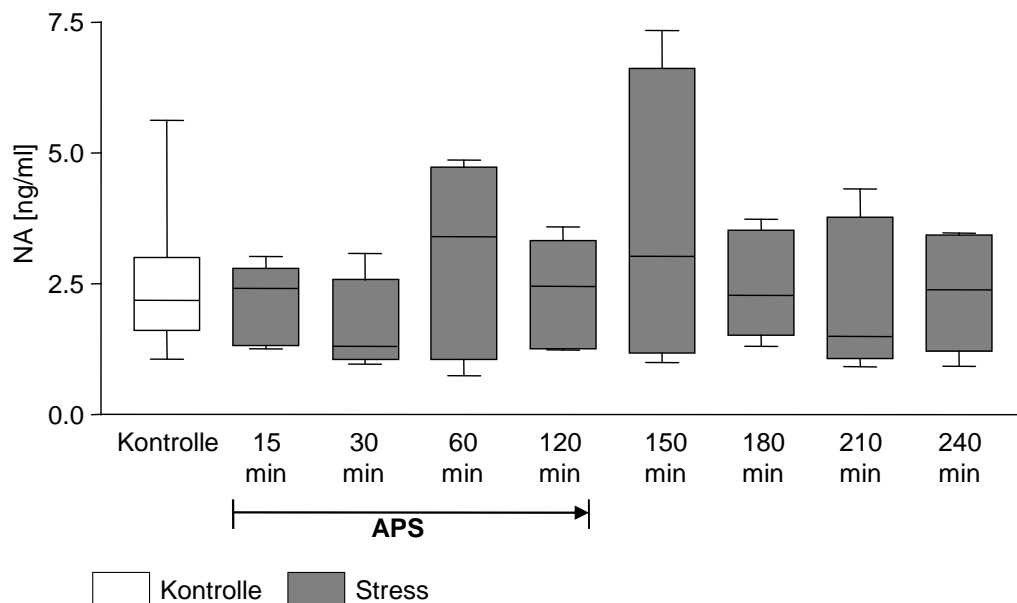


Abb. 5.2

NoradrenalinKonzentrationen im Plasma von akut gestressten und ungestressten weiblichen BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden entweder akut gestresst (graue Boxplots) oder blieben ungestresst (weißer Boxplot). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und der Noradrenalinegehalt (NA) im Plasma mittels ELISA bestimmt. Die dargestellten Abnahmezeitpunkte zeigen die Minuten nach Stressbeginn. Die Dauer der Blutentnahmen betrug pro Maus ca. 2 Minuten. APS= akuter psychischer Stress; jeweils n= 6/ Gruppe, Summe aus 2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen, Bonferroni's multiple comparison test nach one-way ANOVA

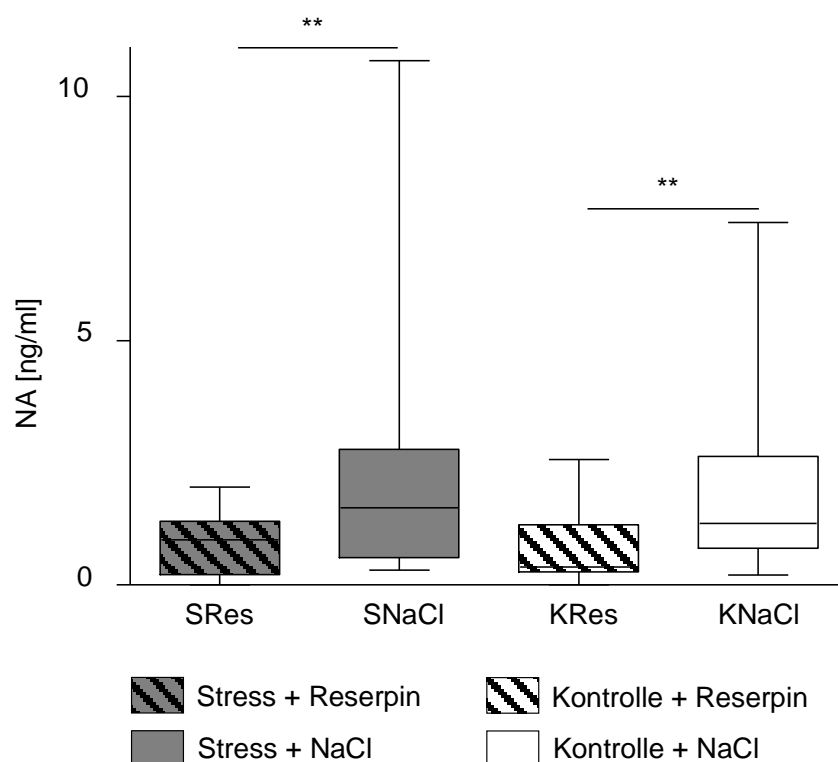


Abb. 5.3

Noradrenalindepletion im Plasma akut gestresster und nicht gestresster, Reserpin-behandelter weiblicher BALB/c Mäuse im Vergleich zu Kochsalz behandelten Kontrollen. 24 Stunden vor dem Experiment erhielten 2 Stunden lang gestresste (S) und ungestresste (K) Mäuse eine subkutane Injektion mit Reserpin $1\mu\text{g/g}$ Körpergewicht (Res) bzw. Kochsalz (NaCl). Direkt nach Stressende wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und der Noradrenalinegehalt (NA) im Plasma mittels ELISA bestimmt. jeweils $n= 24/$ Gruppe, Summe aus 4 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen; $**p<0,01$, Bonferroni' s multiple comparison test nach one-way ANOVA

5.2.2 Einfluss von Reserpin auf die stressinduzierte HPA-Achsenaktivierung

Neben dem sympathischen Nervensystem stellt die HPA-Achse das zweite grundlegende System dar, das es dem Organismus erlaubt, eine adäquate Stressreaktion zu generieren. Zunehmend zeigt sich, dass diese beiden Systeme eng miteinander verwoben sind und sich gegenseitig stark beeinflussen. Um die Wirkung der Sympathikolyse auf die HPA-Achse zu überprüfen, wurde zum einen die Konzentration von Corticosteron im Plasma und zum anderen die eng damit zusammenhängende Anzahl der Leuko- und Lymphozyten im peripheren Blut untersucht.

5.2.2.1 Einfluss von Reserpin auf den stressinduzierten Anstieg der Plasmacorticosteronwerte

Die Aktivierung der HPA-Achse ist eine physiologische Reaktion auf akuten psychischen Stress und durch einen Anstieg der Glucocorticoide (GC) im Plasma gekennzeichnet.

Während der im vorherigen Abschnitt beschriebenen Erstellung der Kinetik der NA-Werte im Plasma von gestressten Mäusen wurde auch die Konzentration des Corticosterons im Plasma gemessen. Da wir für die Veränderungen des Corticosterons im Plasma längere Zeiträume vermuteten, wurde der Beobachtungszeitraum auf 26 Stunden nach Stressbeginn erweitert.

Wie erwartet, zeigten akut gestresste Tiere einen Anstieg der Plasma-GC-Konzentration, der bereits 15 min nach Stressbeginn nachweisbar war und in diesem Modell ein Maximum nach 2 Stunden, am Ende der Stressexposition, erreichte (Abb 5.4). Bereits eine halbe Stunde danach nahm die Corticosteronkonzentration ab, lag allerdings immer noch signifikant über der der Kontrolltiere. Auf diesem Niveau blieben die Werte bis 2 Stunden nach Stressende.

8 Stunden nach Beginn der Stressexposition stiegen die GC-Werte erneut an (Abb. 5.4), ohne dass die Tiere einem erneuten Stressor ausgesetzt waren. Dieser, als solcher zuvor nicht bekannte, zweite Peak hielt bis 14 Stunden nach Stressbeginn an. 24 Stunden nach Beendigung der 2-stündigen Stressexposition waren die GC-Plasmakonzentrationen wieder abgesunken, aber noch nicht auf einem

physiologischen Level angelangt. Ab wann die GC-Werte wieder auf einen Level der Kontrolltiere abgefallen waren, konnte in diesem Experiment nicht geklärt werden.

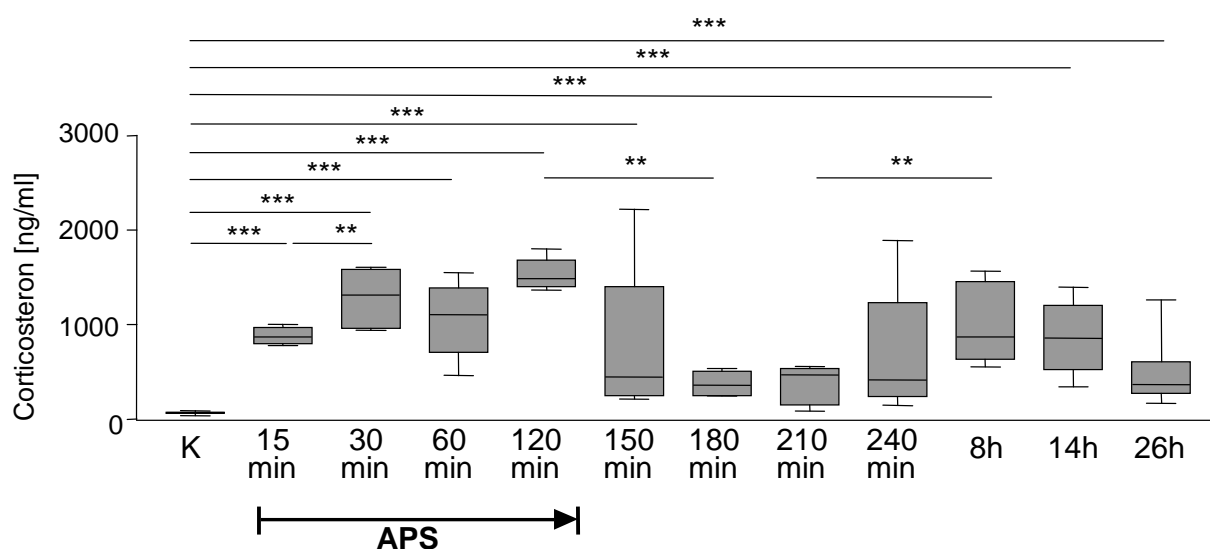


Abb. 5.4

Corticosteronwerte im Plasma von gestressten und ungestressten weiblichen BALB/c Mäusen.

Die Tiere wurden entweder akut gestresst (graue Boxplots) oder blieben ungestresst im Inkubator (K, weißer Boxplot). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und der Corticosterongehalt im Plasma mittels ELISA bestimmt. Die dargestellten Abnahmezeitpunkte zeigen die Minuten bzw. Stunden nach Stressbeginn. APS= akuter psychischer Stress; jeweils n= 6/ gestresste Gruppe, Kontrolle n=12, Summe aus 3x2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen; **p<0,01, ***p<0,001

Da vielfach gezeigt wurde, dass sich SNS and HPA-Achse gegenseitig beeinflussen, wurden GC-Plasmalevel in Reserpin-behandelten und unbehandelten Mäusen bestimmt.

Wie im vorherigen Experiment zeigten nicht gestresste Tiere keinen GC-Anstieg im Plasma und auch in ungestressten Tieren, die zusätzlich mit Reserpin behandelt wurden, blieben die GC-Level sowohl direkt nach Stress als auch 8 Stunden nach Stressbeginn auf einem niedrigen Level (Abb. 5.5). Demgegenüber stand erneut ein

signifikanter Anstieg der Plasma-GC-Werte in gestressten Tieren 2 und 8 Stunden nach Stressbeginn. Die zusätzliche Sympathikolyse mittels Reserpin in gestressten Tieren hatte auf diesen Anstieg keinen Einfluss (Abb. 5.5).

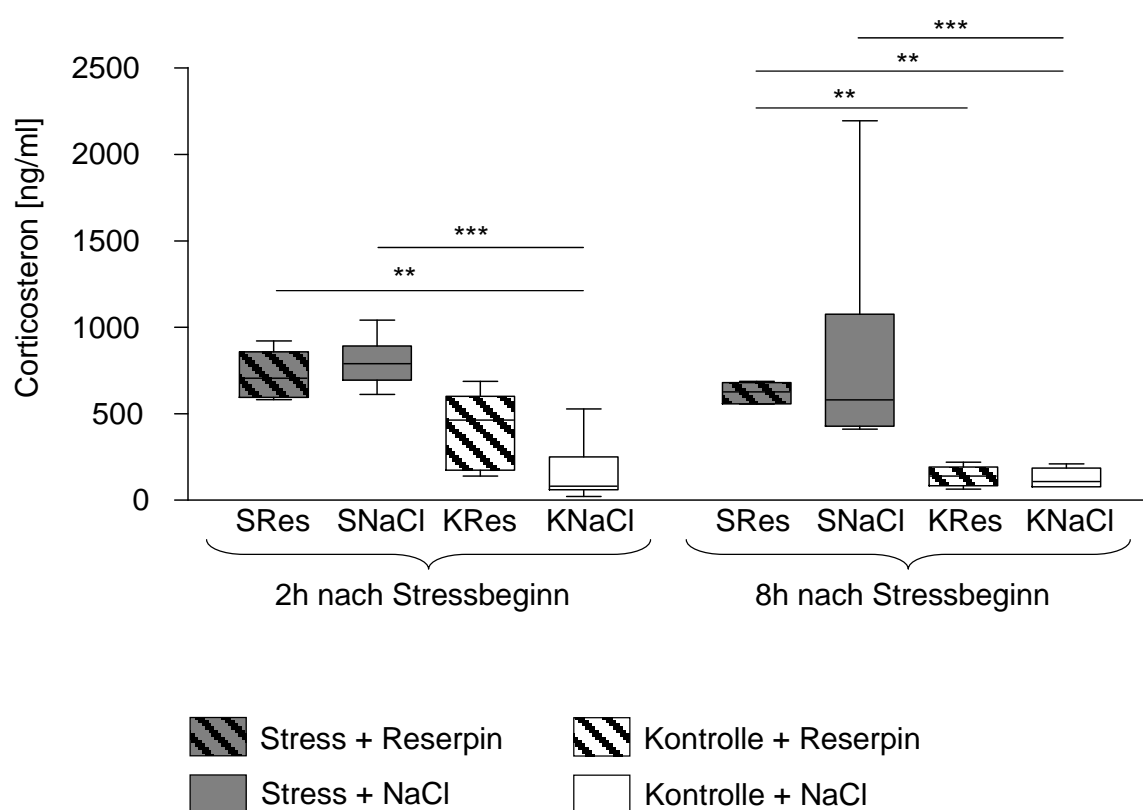


Abb. 5.5

Corticosteronwerte im Plasma akut gestresster und nicht gestresster, Reserpin- bzw. Kochsalz-behandelter weiblicher BALB/c Mäuse 2 oder 8 Stunden nach Stressbeginn. 24 Stunden vor dem Experiment erhielten 2 Stunden lang gestresste (S) und ungestresste (K) Mäuse eine subkutane Injektion mit Reserpin 1µg/g Körpergewicht (Res) bzw. Kochsalz (NaCl). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und der Corticosterongehalt im Plasma mittels ELISA bestimmt. jeweils n= 6/ Gruppe, Summe aus 2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen; **p<0,01;***p<0,001 Bonferroni's multiple comparison test nach two-way ANOVA

5.2.2.2 Einfluss von Reserpin auf die stressinduzierte Leuko- und Lymphozytopenie

Als zweiter Parameter zur Untersuchung der HPA-Achse wurde die Anzahl der Leuko- und Lymphozyten im Blut untersucht, da bekannt ist, dass es mit einer gewissen Latenz nach Anstieg der GC zum Abfall der Leuko- und Lymphozyten kommt ⁽¹⁴³⁾.

Auch in unserem Stressmodell kam es während der Stressexposition, eine Stunde nach Anstieg der GC (Abb. 5.6b), zu einem signifikantem Abfall der Lymphozyten (Abb. 5.6a) und Leukozyten (Daten nicht gezeigt), der bis zu 2 Stunden nach Beendigung des Stresses anhielt und sich danach erholte (Abb. 5.6a).

Nach dem zweiten Anstieg der GC 8 Stunden nach Stressbeginn, kam es zu einer Stagnation der Erholung der Lymphozyten 14 Stunden nach Stressbeginn, um danach höhere Werte als in der Kontrollgruppe zu erreichen.

Da der GC-Spiegel und die Lymphozytopenie in unserem Modell direkt nach Stressende korrelierten, verwendeten wir in den folgenden Experimenten die Lympho- und Leukopenie als Nachweis der wirkungsvollen Stressexposition.

Im akuten Stress scheint an der Umverteilung immunkompetenter Zellen neben den GC auch maßgeblich das SNS beteiligt zu sein. Deshalb wurde der Einfluss von Reserpin auf die stressinduzierte Leuko- und Lymphopenie untersucht.

In den ungestressten Gruppen fiel auf, dass in Tieren nach Reserpinbehandlung signifikant mehr Lymphozyten gemessen wurden als in NaCl-behandelten Kontrollen (Abb. 5.7). Der stressbedingte Abfall der Lymphozyten (Abb. 5.7) und Leukozyten (Daten nicht gezeigt) konnte durch Reserpingabe nicht verhindert werden. Dies zeigt, dass die stressinduzierte Lympho- und Leukopenie in unserem verwendeten Modell durch Sympathikolyse nicht beeinflusst werden konnte und somit auch andere Faktoren als die Katecholamine ursächlich daran beteiligt zu sein scheinen.

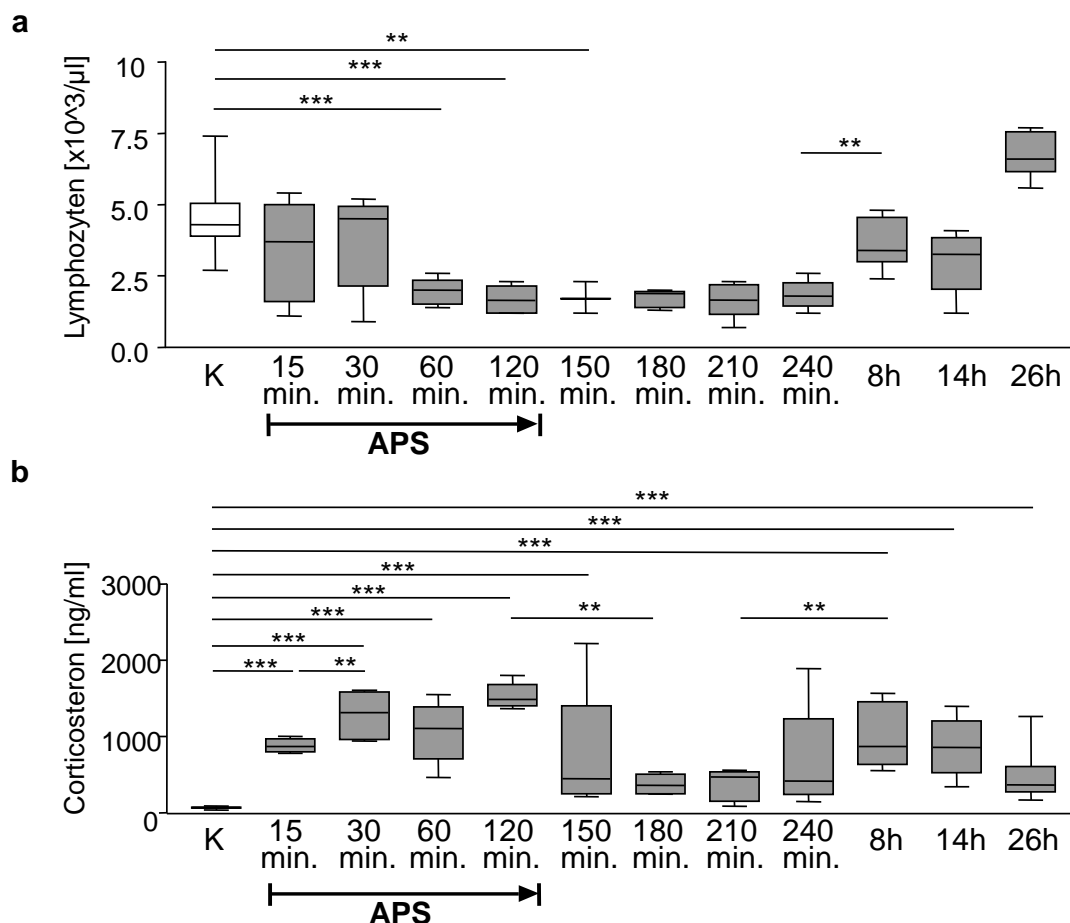


Abb. 5.6

(a) Anzahl der Lymphozyten im Blut von gestressten und ungestressten weiblichen BALB/c Mäusen. Die Tiere wurden entweder akut gestresst (graue Boxplots) oder blieben ungestresst im Inkubator (K, weißer Boxplot). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und die Anzahl der Lymphozyten im Blut mittels Hämocounter bestimmt. Zum besseren Vergleich ist hier in **(b)** die Kinetik der Corticosteronwerte wie bereits in Abb. 5.4 erneut dargestellt. Die dargestellten Abnahmezeitpunkte zeigen die Minuten bzw. Stunden nach Stressbeginn. APS= akuter psychischer Stress; jeweils $n=6$ / gestresste Gruppe, Kontrolle $n=12$, Summe aus 3×2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen; $**p < 0,01$, $***p < 0,001$

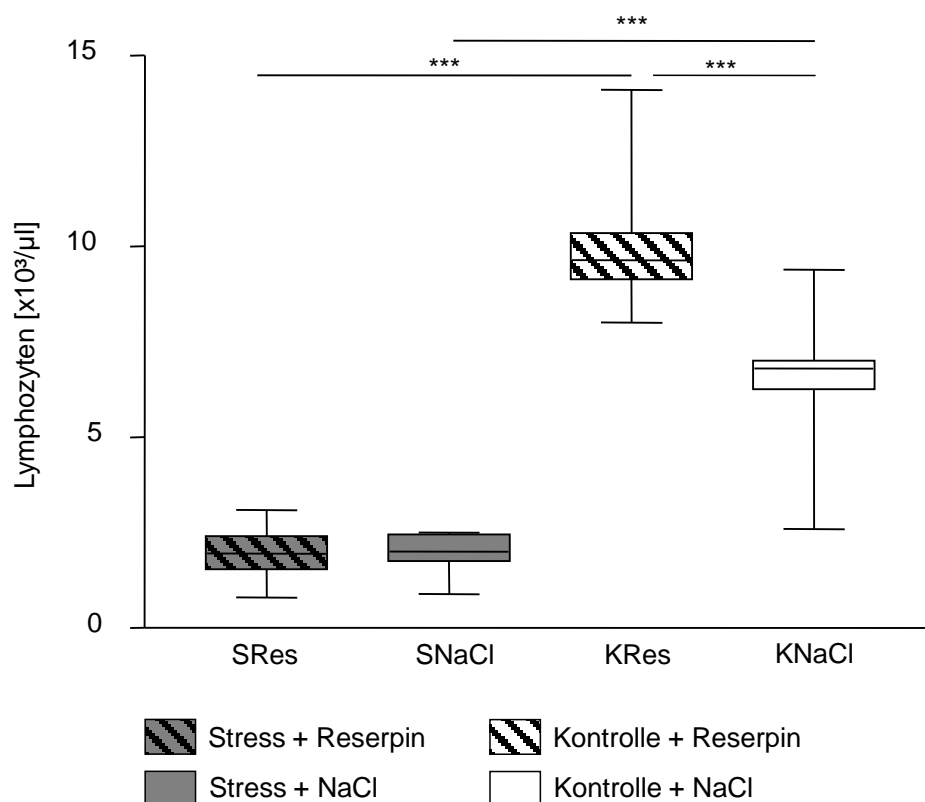


Abb. 5.7

Anzahl der Lymphozyten im Blut akut gestresster und nicht gestresster, Reserpin- bzw. Kochsalz-behandelter weiblicher BALB/c Mäuse. 24 Stunden vor dem Experiment erhielten 2 Stunden lang gestresste (S) und ungestresste (K) Mäuse eine subkutane Injektion mit Reserpin 1μg/g Körpergewicht (Res) bzw. Kochsalz (NaCl). Direkt nach Stressende wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und die Anzahl der Lymphozyten im Blut mittels Hämocounter bestimmt. jeweils n= 12/ Gruppe, Summe aus 2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen; ***p<0,001; Bonferroni's test nach one-way ANOVA

5.2.3 Einfluss von Reserpin auf die stressinduzierte Darmbarrierestörung

Vorherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass bereits 6 Stunden nach einer 2-stündigen Stresssitzung im terminalen Ileum von weiblichen BALB/c Mäusen deutliche Apoptosen nachweisbar sind, die mit einem erhöhten Aufkommen von Darmkommensalen in Leber und mesenterialen Lymphknoten assoziiert waren. Über direkte nervale Innervation der Plexus myentericus und submucosus als auch indirekt über freies NA und Adrenalin nimmt der Sympathikus wie bereits in der Einleitung dargestellt u.a. Einfluss auf die Hämodynamik und immunkompetente Zellen des Darmes. Deshalb sollte überprüft werden, ob durch Sympathikolyse die stressinduzierte Darmbarrierestörung verhindert werden kann.

5.2.3.1 Einfluss von Reserpin auf die stressinduzierte Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des Ileums

Als Surrogat für die stressinduzierte bakterielle Translokation wurde die Permeabilitätserhöhung des Dünndarmepithels gegenüber Makromolekülen anhand der Transsudation von Evans Blue untersucht.

Bei ungestressten, NaCl-behandelten Kontrolltieren zeigte sich eine geringe bis gar keine Transsudation als Zeichen einer intakten, undurchlässigen Darmbarriere (Abb. 5.8). Auch die alleinige Gabe von Reserpin zeigte keinen signifikanten Effekt auf die Darmbarrierefunktion. Im Gegensatz dazu zeigten gestresste, NaCl-behandelte Tiere eine deutliche Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des terminalen Ileums. Die Behandlung mit Reserpin konnte diese vermehrte Transsudation nicht beeinflussen (Abb.5.8), d.h. die stressinduzierte Darmbarrierestörung konnte nicht verhindert werden.

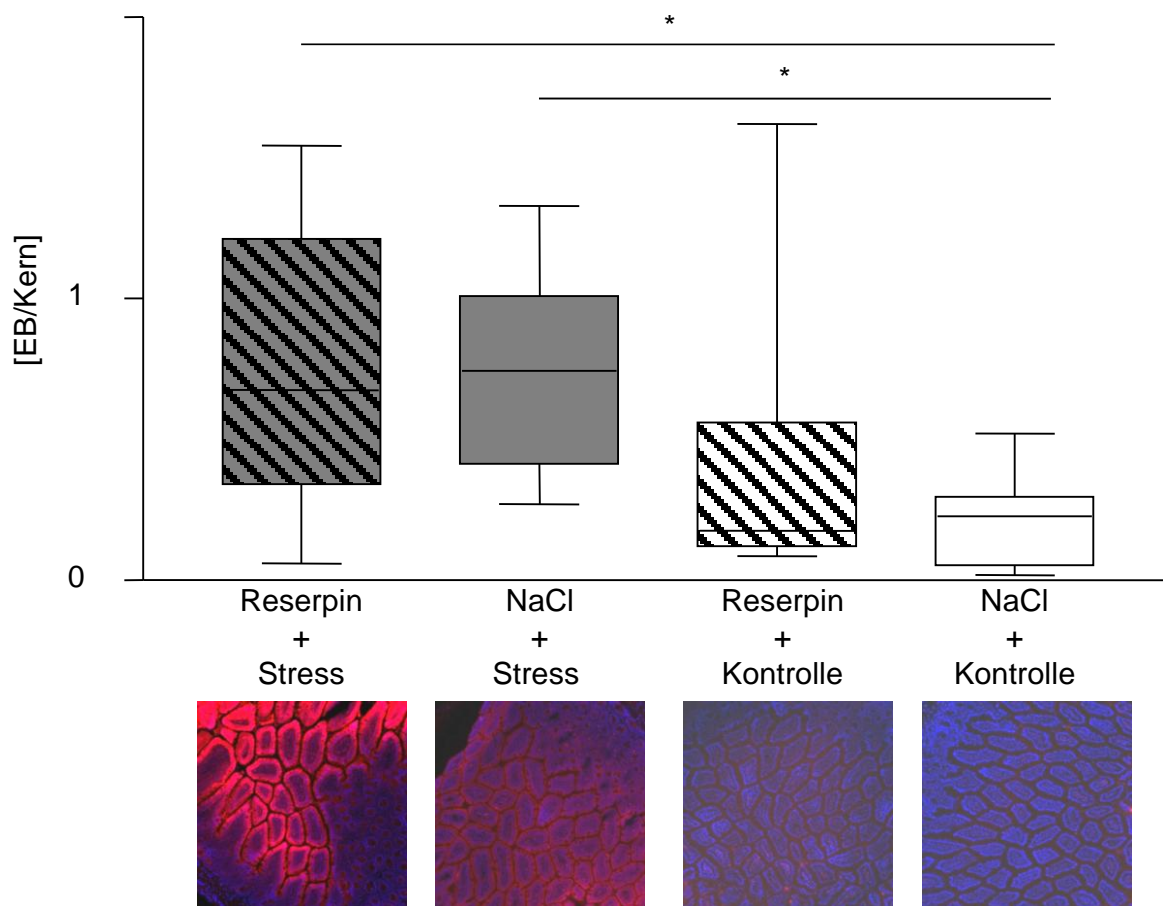


Abb. 5.8

Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des terminalen Ileums in gestressten und nicht gestressten, Reserpin- bzw. Kochsalz behandelten weiblichen BALB/c Mäusen direkt nach Stressende. 24 Stunden vor dem Experiment erhielten 2 Stunden lang gestresste (graue Boxplots) und ungestresste (weiße Boxplots) Kontrollmäuse eine subkutane Injektion mit Reserpin 1µg/g Körpergewicht (gestreifte Boxplots) bzw. Kochsalz (leere Boxplots). Direkt vor Stressbeginn wurden alle Tiere mit 20µl Evans Blue geschlündelt. Unmittelbar nach der Stressepisode wurde den Mäusen das terminale Ileum entnommen. Bestimmung der Evans Blue Transsudation in die Submukosa des terminalen Ileums: Pro Maus wurde 1 Bild des Ileums aufgenommen, pro Bild wurde an 5 Stellen die Fluoreszenzintensität sowohl der Hoechst gefärbten Kerne als auch des Evans Blue bestimmt und das Verhältnis der beiden zueinander errechnet. Pro Tier wurde ein Mittelwert der Messdaten gebildet; EB=Evans Blue; n=12 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, *p<0,5; Bonferroni's-test nach one-way ANOVA. Jeweils unter den entsprechenden Boxplots sind repräsentative Beispiele für histologische Bilder, die zur Bestimmung der Evans Blue/Kern Ratio verwendet wurden, gezeigt; blaue Fluoreszenz=Kernfärbung, rote Fluoreszenz=Evans Blue

5.2.3.2 Einfluss von Reserpin auf stressinduzierte Veränderungen des Indolaminstoffwechsels

In früheren Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde gefunden, dass es in verschiedenen Organen weiblicher BALB/c Mäuse nach akutem Stress zu einer signifikanten Hochregulation der IDO-mRNA Expression kommt: direkt nach Stressende in der Lunge, 6 Stunden später im Gehirn, 12 Stunden nach Stressende in der Milz. In der Folge kommt es unmittelbar nach akutem Stress zu einer transienten Erniedrigung von Plasmakonzentrationen des Tryptophan. Kynureninlevel hingegen steigen 12 Stunden nach Stressende an, um nach 24 Stunden wieder Kontrolllevel zu erreichen. Der Anstieg des Kynurenin-Tryptophan-Quotienten gilt als Zeichen erhöhter IDO-Aktivität.

Von bakteriellen Produkten wie LPS ist bekannt, dass sie zu einer Aktivierung von IDO führen, sodass vermutet werden kann, dass ursächlich an den Veränderungen des Tryptophanmetabolismus nach akutem Stress translozierende Bakterien aus dem Darm beteiligt sind. Deshalb sollte zusätzlich überprüft werden, inwiefern die im Stress beobachtbaren Veränderungen des Indolaminstoffwechsels durch Reserpinbehandlung beeinflusst werden.

Als erster Metabolit im IDO-abhängigen Tryptophanabbau entsteht Kynurenin. Die Plasmakynureninwerte zeigten in den beiden ungestressten Gruppen (Reserpin und NaCl) zum Zeitpunkt direkt nach Stressende keine signifikanten Veränderungen (Abb. 5.9). In gestressten, NaCl-behandelten Mäusen hingegen stieg der Plasmaspiegel von Kynurenin bereits direkt nach Stressende an. Durch die Gabe von Reserpin konnte dieser stressinduzierte Anstieg nicht verhindert werden (Abb. 5.9).

Bei der Quantifizierung der Konzentrationen des Tryptophan und weiterer Tryptophanmetaboliten - Kynureninsäure, Serotonin und Quinolinsäure – und der Errechnung des Kynurenin-Tryptophan-Quotienten konnten keine signifikanten Unterschiede bzw. keine eindeutig reproduzierbaren Ergebnisse gefunden werden (Daten nicht gezeigt).

Insgesamt ist somit kein Effekt der Sympathikolyse auf den Indolaminstoffwechsel gestresster und ungestresster Tiere erkennbar.

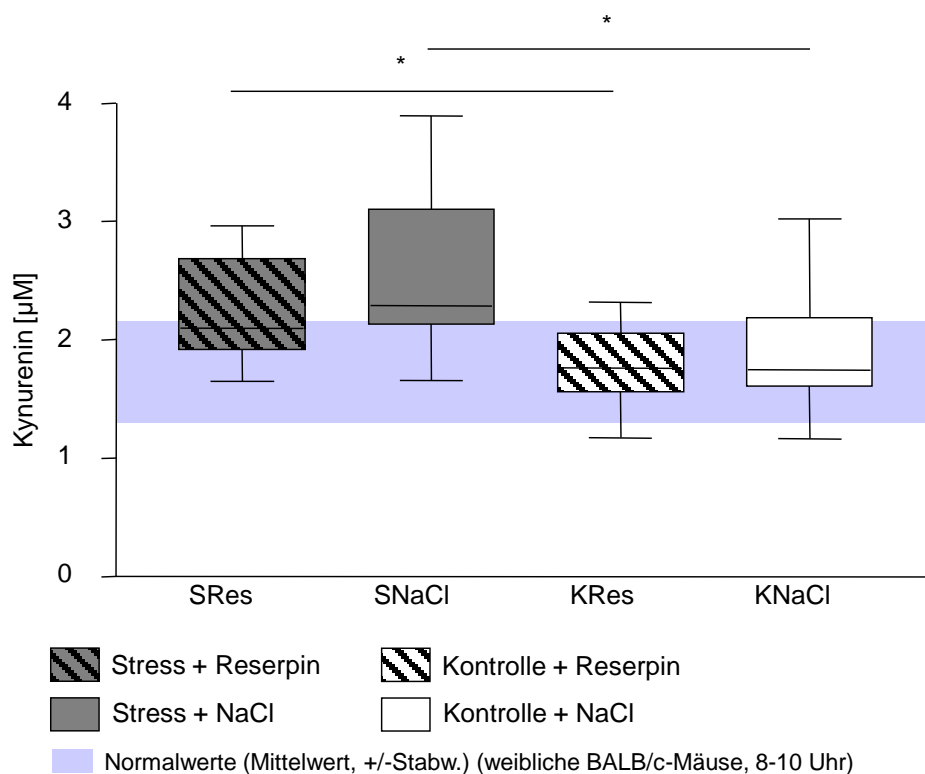


Abb. 5.9

Plasma-Kynureninkonzentrationen akut gestresster und nicht gestresster, Reserpin- bzw. Kochsalz-behandelter weiblicher BALB/c Mäuse direkt nach Stressende. 24 Stunden vor dem Experiment erhielten 2 Stunden lang gestresste (S) und ungestresste (K) Mäuse eine subkutane Injektion mit Reserpin $1\mu\text{g/g}$ Körpergewicht (Res) bzw. Kochsalz (NaCl). Direkt nach Stressende wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und darin mittels Tandem-Massenspektrometrie die Konzentration von Kynurenin bestimmt. jeweils $n= 12/$ Gruppe; Summe aus 2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen; $*p<0,5$; Bonferroni's test nach one-way ANOVA

5.3 Einfluss von Reserpin auf die durch Transportstress veränderte akute Stressantwort

Stressexposition kann Veränderungen neuroendokriner, metabolischer und immunologischer Funktionen bedingen, die noch Wochen später die Reaktion auf eine erneute Stressexposition beeinflussen können ⁽²⁶⁴⁾. Viele Routinemaßnahmen wie Schlündelung, Injektionen oder Transport von Tieren stellen einen Stressor dar ⁽²⁶⁵⁾, ⁽²⁶⁶⁾. Im Laboralltag kommt es oft vor, dass Experimente mit gekauften, und damit zwangsläufig transportierten, und selbstgezüchteten Tieren durchgeführt werden, ohne diesen Unterschied bei der Bewertung der Ergebnisse ins Kalkül zu ziehen. Deshalb sollte untersucht werden, inwiefern der Transport von Mäusen Einfluss auf die Ergebnisse unseres Stressmodells hat.

5.3.1 Einfluss von Transportstress auf das Gewicht und die HPA-Achsenaktivität über einen Beobachtungszeitraum von 3 Wochen

In unserer Arbeitsgruppe ist es etabliert, dass Versuchstiere über mehrere Wochen vor Beginn von Stressexperimenten an die Umgebungsbedingungen des Labors gewöhnt werden, um vermeintlich einheitliche Ausgangsbedingungen zu schaffen. Dabei wurden trotzdem unterschiedliche Stressphänotypen von weiblichen BALB/c Mäusen gleichen Alters gefunden, die scheinbar davon abhängig waren, ob die Tiere unserer eigenen Zucht entstammten oder gekauft/transportiert wurden. Um diese Hypothese zu prüfen, verglichen wir regelmäßig unsere selbstgezüchteten mit transportierten weiblichen BALB/c Mäusen hinsichtlich Gewicht, Corticosteron im Plasma und Anzahl der Leuko- und Lymphozyten im Blut vom Zeitpunkt der Lieferung bis zum Ende der Adaptationszeit 3 Wochen später. Hierbei sollten eventuelle Effekte des Transportstresses festgestellt werden und beurteilt werden, inwiefern nach Ablauf der Adaptationszeit tatsächlich vergleichbare Ausgangsbedingungen für Experimente herrschen.

Bei Betrachtung der Entwicklung des Gewichtes fiel auf, dass die transportierten Tiere direkt nach Lieferung, d.h. im Alter von 6 Wochen, im Verhältnis zu den selbstgezüchteten signifikant weniger wogen (Abb 5.10). Bereits eine Woche später

war dieser Effekt aufgehoben. In den folgenden Wochen kam es in beiden Gruppen zu Gewichtszunahmen. In der letzten Woche der Adaptationszeit stagnierte die Gewichtszunahme in den transportierten Mäusen, während die Tiere aus der hauseigenen Zucht weiter an Körpermasse gewannen. Dadurch entstand ein signifikanter Unterschied zu den selbstgezüchteten Mäusen, für den allerdings keine Ursache ausgemacht werden konnte.

Bei Betrachtung der Corticosteronwerte im Plasma zeigte sich, dass bereits der Raumwechsel von selbstgezüchteten Mäusen die HPA-Achse stimulierte. 2 Stunden nach dem Transfer und am folgenden Tag war eine Tendenz zu erhöhten GC-Werten messbar (Abb. 5.11a). Eine Woche später lagen die Werte wieder im Normalbereich. Bei den transportierten Tieren kam es einen Tag nach Ankunft zu einem signifikanten Anstieg der Plasma-Corticosteronspiegel. Danach dauerte es hingegen bis zur letzten Woche der Adaptationszeit, um in den Bereich „normaler“ Basalwerte von gesunden altersgleichen Tieren zu gelangen (Abb. 5.11a). Somit liegen in den beiden untersuchten Gruppen bezüglich der Corticosteronwerte im Plasma am Ende der Adaptationszeit ähnliche Ausgangsbedingungen vor, auch wenn es unterschiedlich lange dauert, diese zu erreichen.

Als weiterer Parameter wurde wiederum die Anzahl der Leuko- und Lymphozyten im Blut als sensibler Parameter zum Nachweis von Stress untersucht. Sowohl bei den transportierten als auch den selbstgezüchteten Tieren fielen nach Anstieg der GC sowohl die Lymphozyten (Abb. 5.11b) als auch die Leukozyten (Abb. 5.11c) ab. Bei den Lymphozyten konnte hierfür nur in den selbstgezüchteten, bei den Leukozyten nur bei den transportierten Tieren eine Signifikanz nachgewiesen werden, aber auch in den Gruppen, bei denen keine Signifikanzen nachgewiesen werden konnten, ist die Tendenz zu erkennen. Eine Woche nach Raumwechsel bzw. Lieferung hatte in beiden Gruppen die Anzahl der Leuko- und Lymphozyten einen ähnlichen Level erreicht, den sie bis zum Ende der Adaptationszeit beibehielten. Somit kann auch bezüglich dieses Parameters von ähnlichen Ausgangsbedingungen der beiden Gruppen am Ende der Adaptationszeit ausgegangen werden.

Demnach lässt sich zusammenfassen, dass der Transport von Tieren und deren Gewöhnung an die neue Umgebung sowie der „einfache“ Wechsel eines Raumes als Stressoren anzusehen sind, die die HPA-Achse unterschiedlich stark aktivieren. Dies zeigt sich an erhöhten GC-Basalwerten und einem Abfall der Leuko- und Lymphozyten im Blut. Am Ende einer 3-wöchigen Adaptationsphase befinden sich, bis

auf das Gewicht, die untersuchten Parameter aber auf einem Level, sodass augenscheinlich von vergleichbaren Ausgangsbedingungen auszugehen ist.

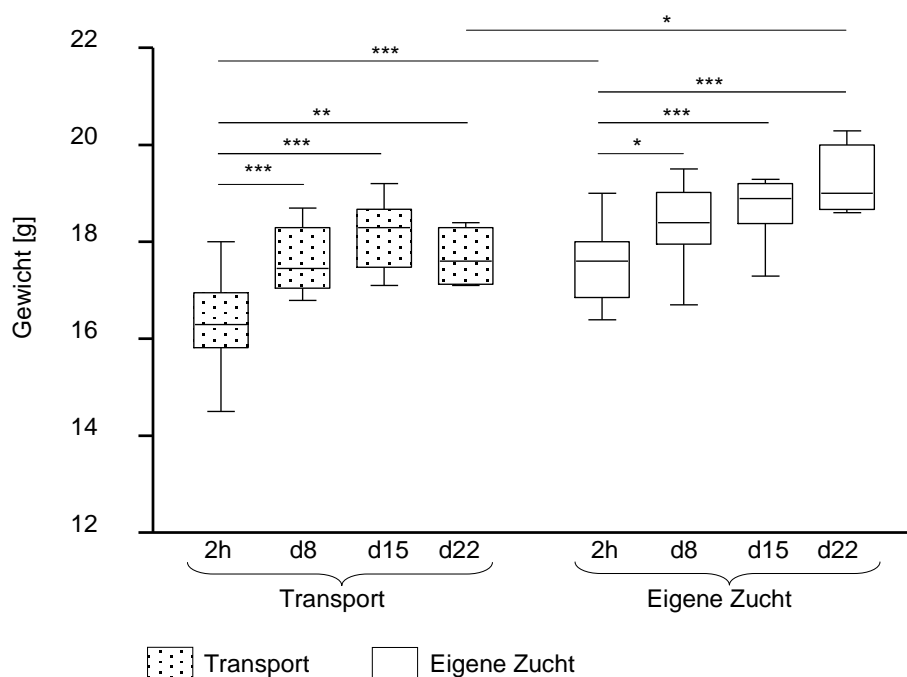


Abb. 5.10

Gewichtszunahme von transportierten oder selbstgezüchteten weiblichen BALB/c Mäusen über einen Zeitraum von 3 Wochen. Die 6 Wochen alten Tiere wurden entweder gekauft und 16 Stunden transportiert (gepunktete Boxplots) oder selbst gezüchtet und wechselten einmal den Raum (leere Boxplots). Danach wurden beide Gruppen unter gleichen Bedingungen gehalten. Das Wiegen der lebenden Tiere fand direkt nach Lieferung bzw. dem Raumwechsel (2h) und dann einmal pro Woche (d1, d8, d22) morgens um 10 Uhr statt. n= 4-20/ Gruppe; *p< 0,5, **p<0,01, ***p<0.001, Bonferroni's multiple comparison test nach two-way ANOVA

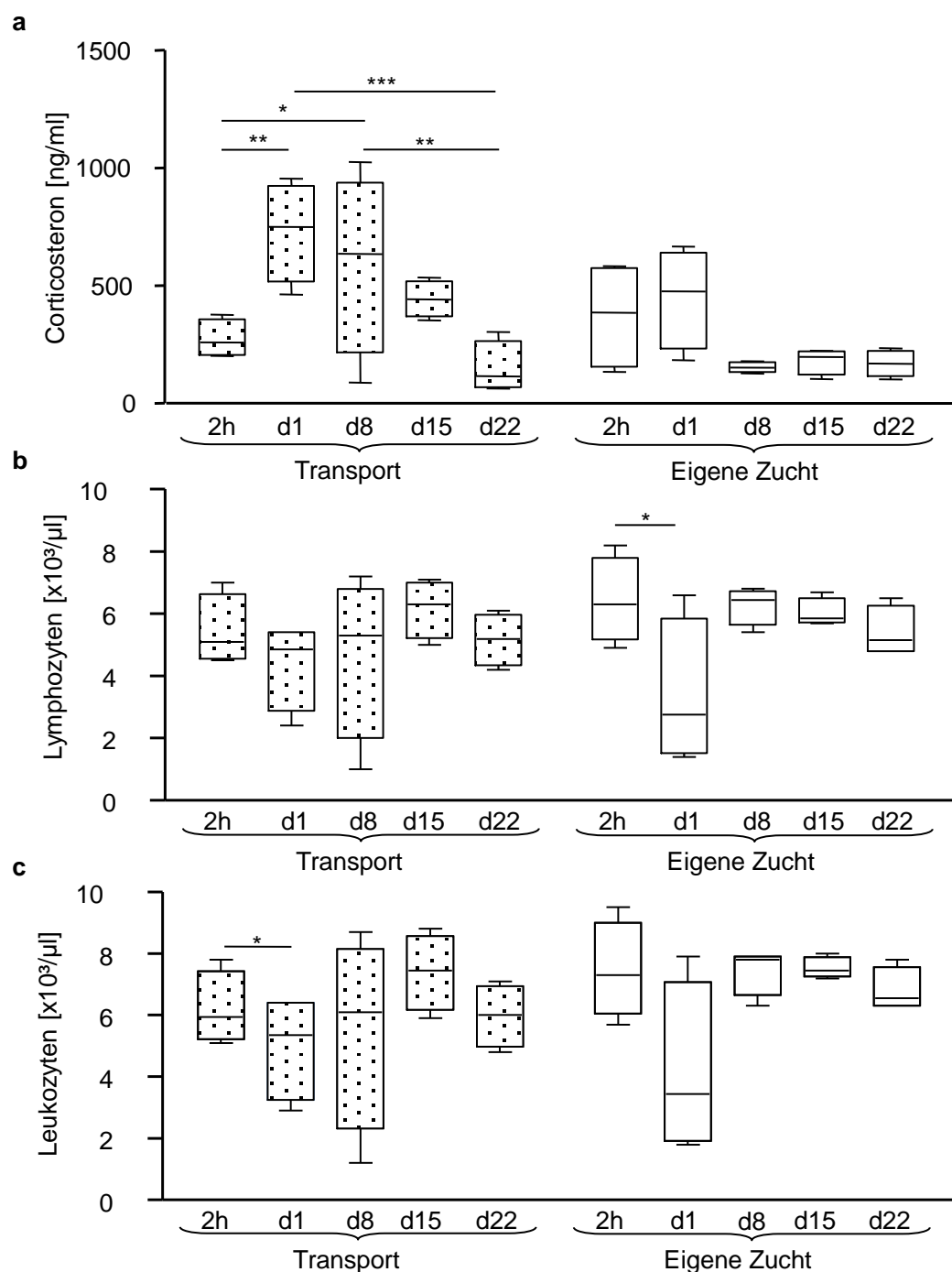


Abb. 5.11

Corticosteron im Plasma und Lympho- und Leukozyten im Blut von transportierten oder selbstgezüchteten weiblichen BALB/c Mäusen über einen Zeitraum von 3 Wochen. Die 6 Wochen alten Tiere wurden entweder gekauft und 16 Stunden transportiert (gepunktete Boxplots) oder selbst gezüchtet und wechselten einmal den Raum (leere Boxplots). Danach wurden beide Gruppen unter gleichen Bedingungen gehalten. Die Blutentnahme mittels retroorbitaler Punktion fand direkt nach Lieferung bzw. dem Raumwechsel (2h) und dann einmal pro Woche (d1, d8, d15, d22) morgens um 10 Uhr statt. Bestimmung der **(a)** Corticosteronwerte mittels ELISA und der **(b,c)** Lymphozyten und Leukozyten mittels Hämocounter. $n = 4$ / Gruppe; * $p < 0,5$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, Bonferroni's multiple comparison test nach two-way ANOVA

5.3.2 Einfluss von Transportstress auf die HPA-Achsenaktivierung im akuten Stress

Im vorherigen Experiment wurde gezeigt, dass sowohl transportierte als auch selbst gezüchtete Mäuse am Ende einer 3-wöchigen Adaptationsphase in den untersuchten Parametern nur noch geringfügige Unterschiede aufwiesen. Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass zuvor transportierte Mäuse im Vergleich mit Tieren aus eigener Zucht auf Stimulation mit ACTH einen stärkeren Anstieg der GC aufwiesen (Abb. 5.12). Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob transportierte Mäuse in unserem akuten psychischen Stressmodell auch unterschiedlich reagieren würden.

Wie in Experimenten unserer Arbeitsgruppe zuvor gezeigt, war nach 2-stündigem, akutem Stress ein signifikanter Anstieg der GC im Plasma gegenüber ungestressten Kontrollen messbar, wenn die Tiere aus der hauseigenen Zucht entstammten (Abb. 5.13b). In Gegensatz dazu blieb dieser stressinduzierte Anstieg bei transportierten Tieren aus (Abb. 5.13a).

Mäuse aus eigener Zucht zeigten nach Stressexposition die bekannte Leuko- (Daten nicht gezeigt) und Lymphozytopenie (Abb. 5.14b). Obwohl die Corticosteronwerte in den zuvor transportierten Tieren nicht angestiegen waren, fielen auch hier die Leuko- und Lymphozytenzahlen im Blut nach Stress deutlich ab (Abb. 5.14a).

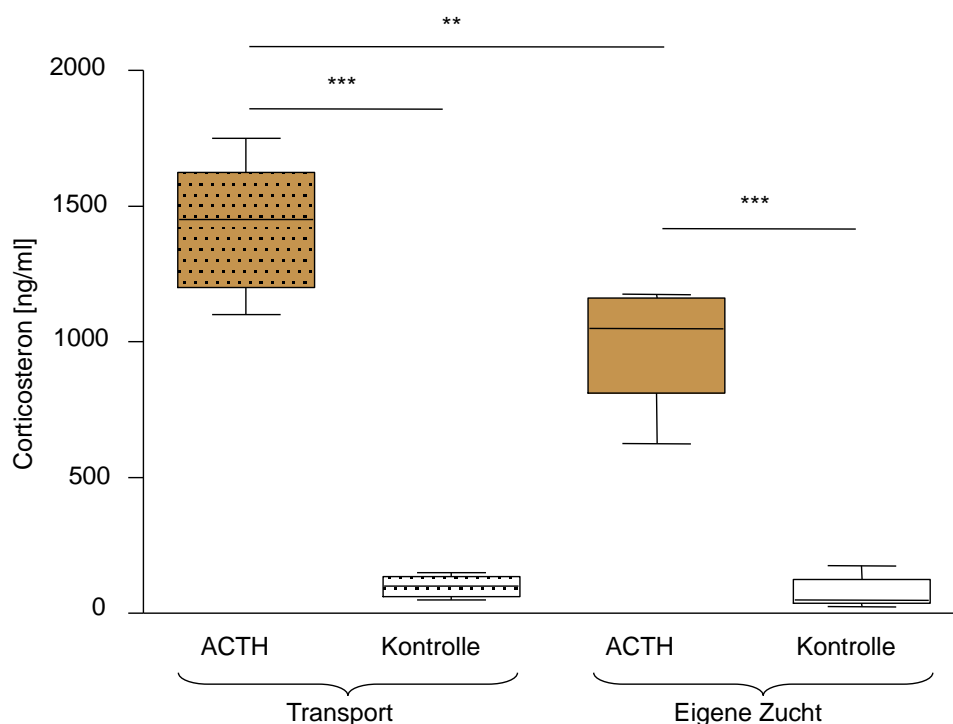


Abb. 5.12

Corticosteron im Plasma nach ACTH-Test in transportierten bzw. selbstgezüchteten weiblichen BALB/c Mäusen. 4 Wochen vor den Experimenten wurden Mäuse entweder gekauft und 16 Stunden transportiert (gepunktete Boxplots) oder selbst gezüchtet und wechselten einmal den Raum (leere Boxplots). Danach wurden die Mäuse entweder mit 1 µg ACTH(1-24) pro Maus in PBS/BSA-Lösung (braune Boxplots) oder nur mit der PBS/BSA-Lösung behandelt (weiße Boxplots). Nach 45 min wurde durch retroorbitale Punktion Blut gewonnen und die Plasma-Kortikosteronkonzentration mit Hilfe eines ELISAs bestimmt. n= 5/ Gruppe; **p<0,01, ***p<0.001, Bonferroni's multiple comparison test nach one-way ANOVA, Daten zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Cornelia Kiank

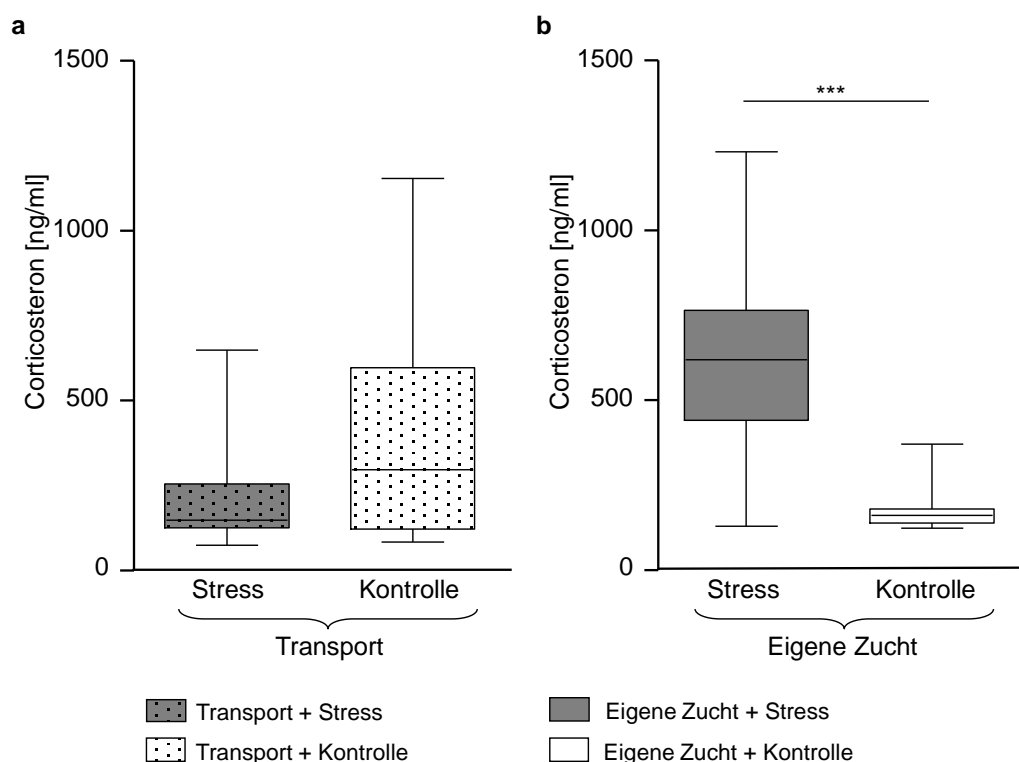


Abb. 5.13

Corticosteron im Plasma gestresster und nicht gestresster, transportierter bzw. selbstgezüchteter weiblicher BALB/c Mäuse. 4 Wochen vor den Experimenten wurden gestresste (graue Boxplots) und ungestresste (weiße Boxplots) Mäuse entweder **(a)** gekauft und 16 Stunden transportiert (gepunktete Boxplots) oder **(b)** selbst gezüchtet und wechselten einmal den Raum (leere Boxplots). Direkt nach Stressende wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und der Corticosterongehalt im Plasma mittels ELISA bestimmt. $n = 12$ / Gruppe; $***p < 0,001$, Mann-Whitney-Test

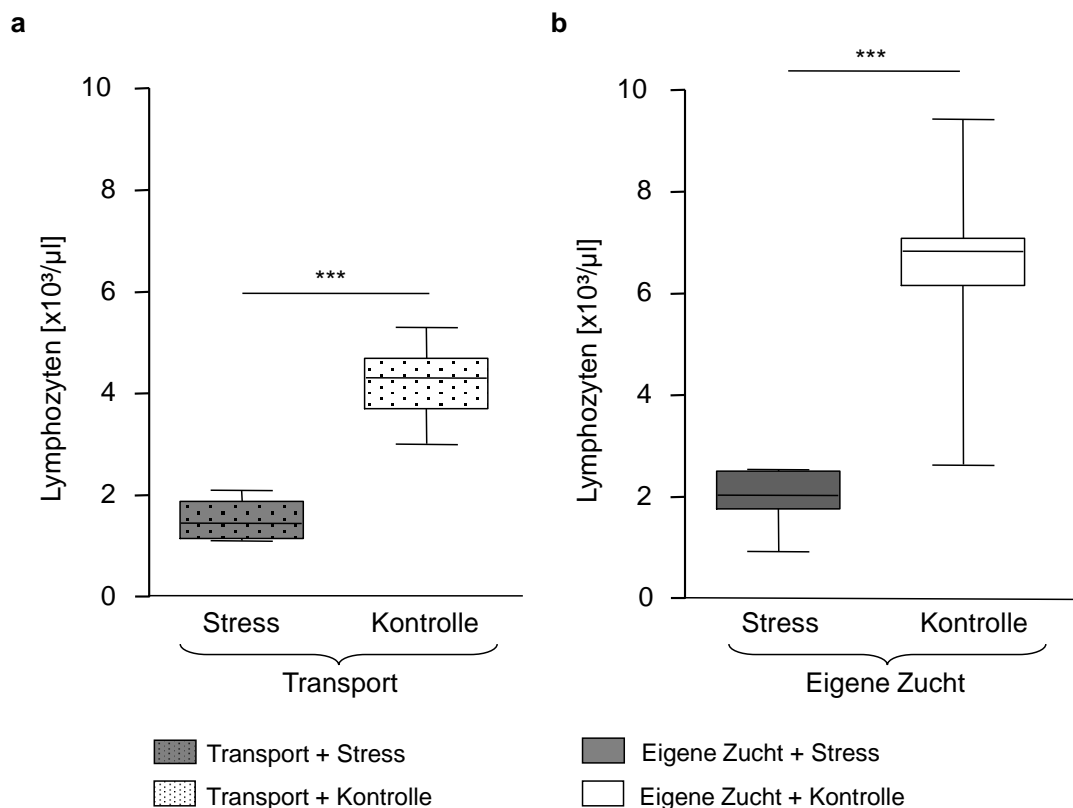


Abb. 5.14

Lymphozyten im Blut gestresster und nicht gestresster, transportierter bzw. selbstgezüchteter weiblicher BALB/c Mäuse direkt nach Stressende. 4 Wochen vor den Experimenten wurden gestresste (graue Boxplots) und ungestresste (weiße Boxplots) Mäuse entweder **(a)** gekauft und 16 Stunden transportiert (gepunktete Boxplots) oder **(b)** selbst gezüchtet und wechselten einmal den Raum (leere Boxplots). Direkt nach Stressende wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und die Anzahl der Lymphozyten im Blut mittels Hämocounter bestimmt. $n = 12/$ Gruppe; *** $p < 0,001$, Mann-Whitney-Test

5.3.3 Einfluss von Transportstress auf die durch akuten Stress induzierte Darmbarrierestörung

In der Literatur finden sich zunehmend Hinweise darauf, dass es einen Zusammenhang zwischen CRF und der Permeabilität der Darmbarriere gibt ⁽²⁶⁷⁾. Da es nach Transportstress zu einer verminderten Aktivierung der HPA-Achse zu kommen scheint, interessierte uns nun, ob dies in der Folge auch positive Auswirkungen auf die durch Stress beeinträchtigte Integrität der Darmbarriere habe.

Wie zuvor in Abschnitt 5.2.3 beschrieben, kam es bei akut gestressten Mäusen aus der eigenen Zucht direkt nach Stressende zu einer Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des terminalen Ileums im Gegensatz zu nicht gestressten

Kontrolltieren, die keine Transsudation aufwiesen (Abb. 5.15b). Dem gegenüber gestellt, zeigten in der Gruppe der transportierten Tiere weder gestresste noch ungestresste Mäuse eine nachweisbare Transsudation von Evans Blue (Abb. 5.15a). Dies bedeutet, dass eine durch Transportstress hervorgerufene, verminderte Aktivierbarkeit der HPA-Achse auf einen erneuten Stressor mit einer fehlenden stressinduzierten Darmbarrierestörung assoziiert ist.

Betrachtet man die Veränderungen im Indolaminmetabolismus, fiel folgendes auf:

Bei selbstgezüchteten Mäusen konnte, wie bereits zuvor berichtet, ein stressinduzierter Anstieg von Kynurenin (Abb. 5.16b) im Plasma gezeigt werden. In den zuvor transportierten Tieren hingegen zeigte sich direkt nach 2 Stunden Stressexposition kein Anstieg des Kynurenin (Abb. 5.16a) im Plasma. Bei Messung der Konzentrationen des Tryptophan und den weiteren Metaboliten Kynureninsäure, Serotonin und Quinolinsäure konnten wiederum keine eindeutig reproduzierbaren Werte gemessen werden (Daten nicht gezeigt).

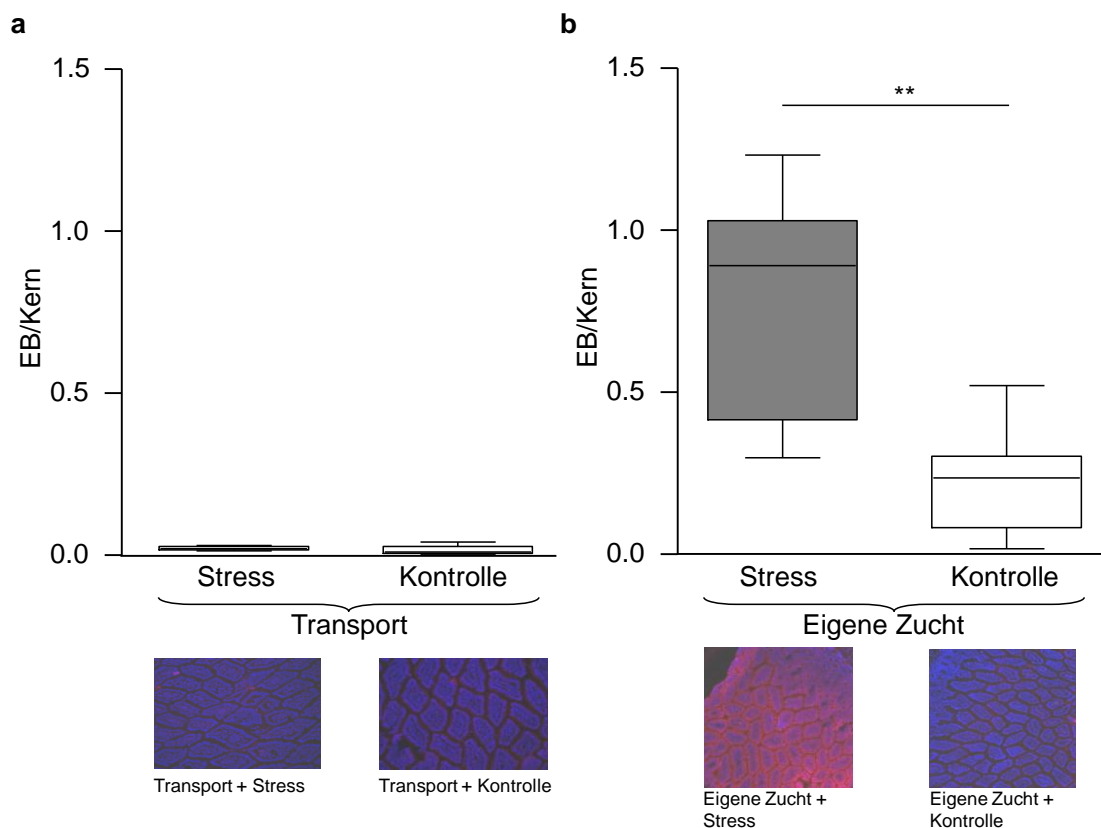


Abb. 5.15

Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des terminalen Ileums in gestressten und nicht gestressten, zuvor transportierten bzw. selbst gezüchteten weiblichen BALB/c Mäusen direkt nach Stressende.

4 Wochen vor den Experimenten wurden gestresste (Stress, graue Boxplots) und ungestresste (Kontrolle, weiße Boxplots) Mäuse entweder **(a)** gekauft und 16 Stunden transportiert (Transport) oder **(b)** selbst gezüchtet und wechselten nur einmal den Raum (Eigene Zucht). Direkt vor Stressbeginn wurden alle Tiere mit 20µl Evans Blue geschlündelt. Unmittelbar nach der Stressepisode wurde den Mäusen das terminale Ileum entnommen. **(a,b)** Bestimmung der Evans Blue Transsudation in die Submukosa des terminalen Ileums: Pro Maus wurde 1 Bild des Ileums aufgenommen, pro Bild wurde an 5 Stellen die Fluoreszenzintensität sowohl der Hoechst gefärbten Kerne als auch des Evans Blue bestimmt und das Verhältnis der beiden zueinander errechnet. Pro Tier wurde ein Mittelwert der Messdaten gebildet; EB=Evans Blue; n=12 Mäuse pro Gruppe, gezeigt sind aufsummierte Daten von 2 Experimenten, **p<0,01, Mann-Whitney-Test. Jeweils unter den entsprechenden Boxplots sind repräsentative Beispiele für histologische Bilder, die zur Bestimmung der Evans Blue/Kern Ratio verwendet wurden, gezeigt; blaue Fluoreszenz=Hoechst-Kernfärbung, rote Fluoreszenz=Evans Blue

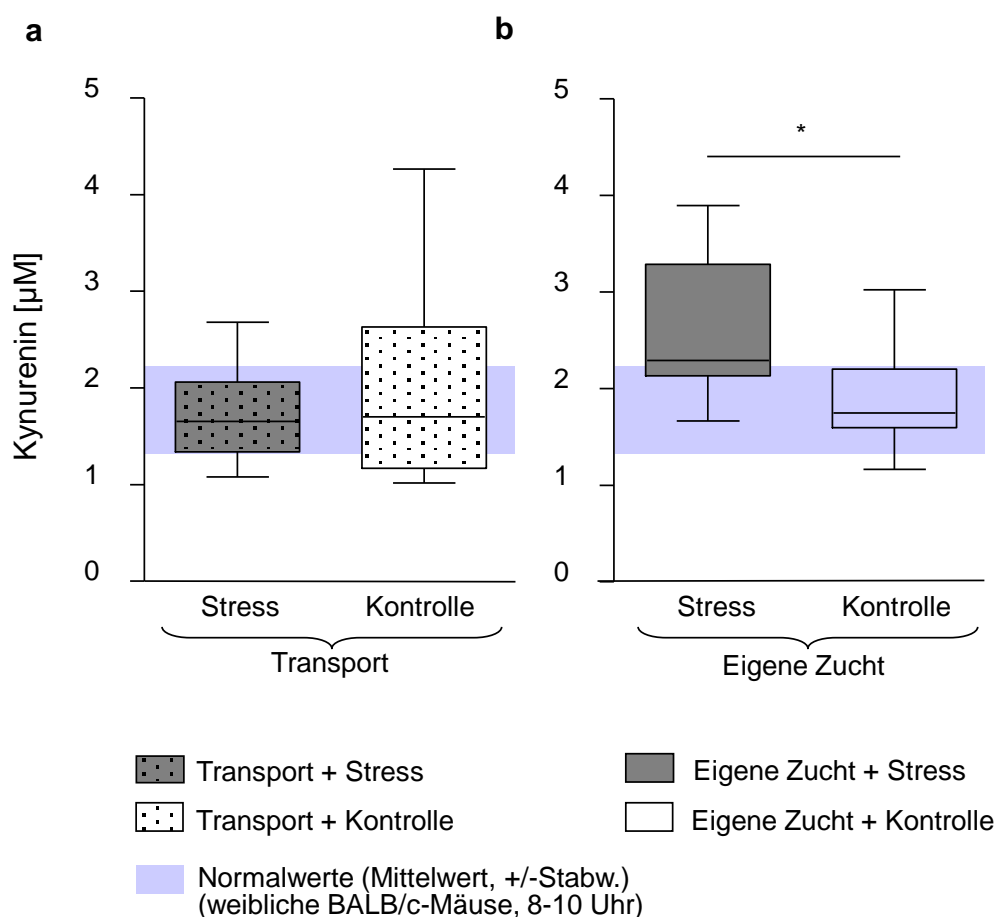


Abb. 5.16

Plasma-Kynureninkonzentration akut gestresster und nicht gestresster, zuvor transportierter bzw. selbst gezüchteter weiblicher BALB/c Mäuse. 4 Wochen vor den Experimenten wurden gestresste (Stress, graue Boxplots) und ungestresste (Kontrolle, weiße Boxplots) Mäuse entweder **(a)** gekauft und 16 Stunden transportiert (Transport, gepunktete Boxplots) oder **(b)** selbst gezüchtet und wechselten nur einmal den Raum (Eigene Zucht, leere Boxplots). Nach Stressende wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und darin mittels Tandem-Massen-Spektrometrie die Konzentration von Kynurenin gemessen. jeweils $n = 12$ / Gruppe; jeweils Summe aus 2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen; $*p < 0,5$; Mann-Whitney-Test

5.3.4 Einfluss von Reserpin auf die durch Transportstress verminderte HPA-Achsenaktivität und Darmbarrierestörung

Das sympathische Nervensystem und die HPA-Achse gelten in Bezug auf metabolische, neuroendokrine und kardiovaskuläre Anpassungen grundsätzlich als synergistisch agierende Systeme in ihrer Reaktion auf Stress. Im vorherigen Abschnitt wurde vermutet, dass durch einen früheren Stressor die erneute stressinduzierte Aktivierbarkeit der HPA-Achse und die Darmbarrierestörung vermindert werden.

Im folgenden Experiment sollte nun untersucht werden, ob es nach Ausschaltung des Sympathikus in zuvor transportierten Mäusen zur Aktivierung der HPA-Achse und damit assoziiert zur Beeinträchtigung der Darmbarriere kommt.

Wie zuvor beschrieben, kam es in transportierten Mäusen nach 2 Stunden akuter Stressexposition nicht zum erwarteten Anstieg der GC im Plasma (Abb 5.17). Auch Reserpin-behandelte, nicht gestresste Tiere zeigten keinen Anstieg der GC, d.h. Reserpin an sich führte nicht zu einer Ausschüttung der GC. Die Reserpin-behandelten, gestressten Mäuse hingegen zeigten signifikant höhere GC-Werte als die drei anderen Gruppen. Dies spräche für eine Aktivierung der HPA-Achse nach Ausschaltung des Sympathikus.

Bei Betrachtung der Darmbarriere war zuvor beobachtet worden, dass transportierte Tiere nicht die durch akuten Stress induzierte Transsudation von Evans Blue aufwiesen (Abb. 5.18).

Auch die Gabe von Reserpin führte in ungestressten Tieren nicht zur Transsudation (Abb. 5.18). Nur bei gestressten, zuvor Reserpin-behandelten Mäusen kam es zu einer erhöhten Permeabilität für Evans Blue. Somit ist, wenn vor akuter Stressexposition eine Sympathikolyse durchgeführt wurde, eine verstärkte Darmbarrierestörung zu beobachten.

Als weiteren Parameter betrachteten wir erneut den Indolaminstoffwechsel:

In den beiden nicht gestressten Gruppen (Reserpin, NaCl) zeigten sich keine Veränderungen der Kynureninkonzentration im Plasma (Abb. 5.19). Wie bereits erwähnt, stieg der Kynureninspiegel in zuvor transportierten, akut gestressten, NaCl-behandelten Mäusen nicht an. Bekamen die Mäuse vor Stressexposition Reserpin appliziert, konnte, wie in gestressten Tieren aus eigener Zucht (Abb.5.16b), der Kynureninanstieg wieder beobachtet werden (Abb. 5.19).

Somit weist die Summe dieser Ergebnisse darauf hin, dass die Gabe von Reserpin vor einer akuten Stressexposition in zuvor Transportstress ausgesetzten Mäusen zu einer Aktivierung der HPA-Achse, einer damit assoziierten Beeinträchtigung der Darmbarriere und Veränderungen im Indolaminstoffwechsel, die auf eine Aktivierung von IDO hinweisen, führt. Inwiefern diese drei Beobachtungen in kausalem Zusammenhang zueinander stehen, gilt es zu diskutieren.

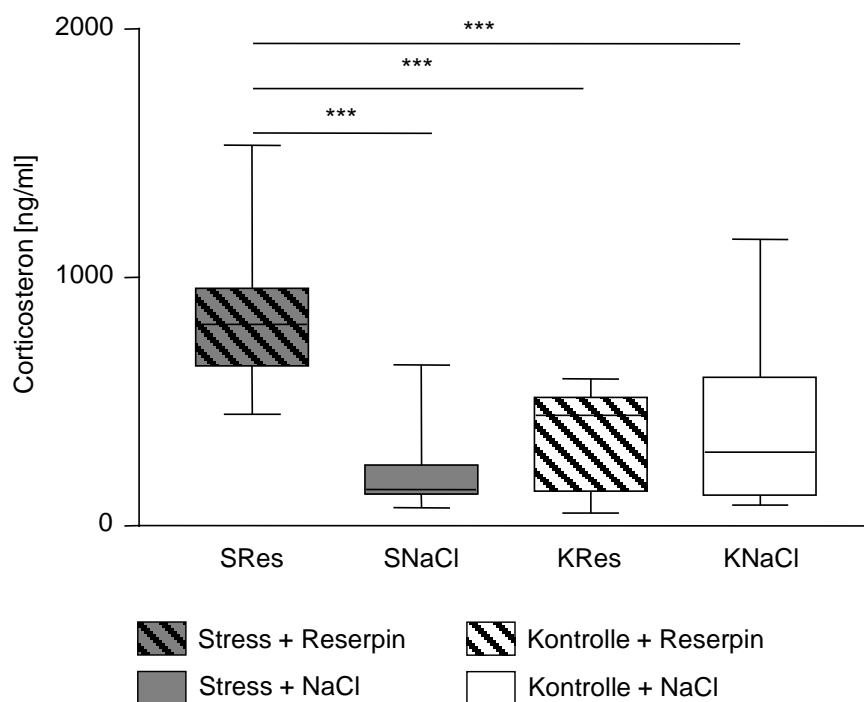


Abb. 5.17

Corticosteronwerte im Plasma akut gestresster und nicht gestresster, Reserpin- bzw. Kochsalz-behandelter, 4 Wochen zuvor transportierter weiblicher BALB/c Mäuse. 4 Wochen vor dem Experiment wurden die Tiere 16 Stunden transportiert. 24 Stunden vor der akuten Stressexposition erhielten gestresste (S, graue Boxplots) und ungestresste (K, weiße Boxplots) Mäuse eine subkutane Injektion mit Reserpin $1\mu\text{g/g}$ Körpergewicht (Res, gestreifte Boxplots) bzw. Kochsalz (NaCl, leere Boxplots). Direkt nach Stressende wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und der Corticosterongehalt im Plasma mittels ELISA bestimmt. jeweils $n=12/\text{Gruppe}$, Summe aus 2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen;*** $p<0,001$ Bonferroni's test nach one-way ANOVA

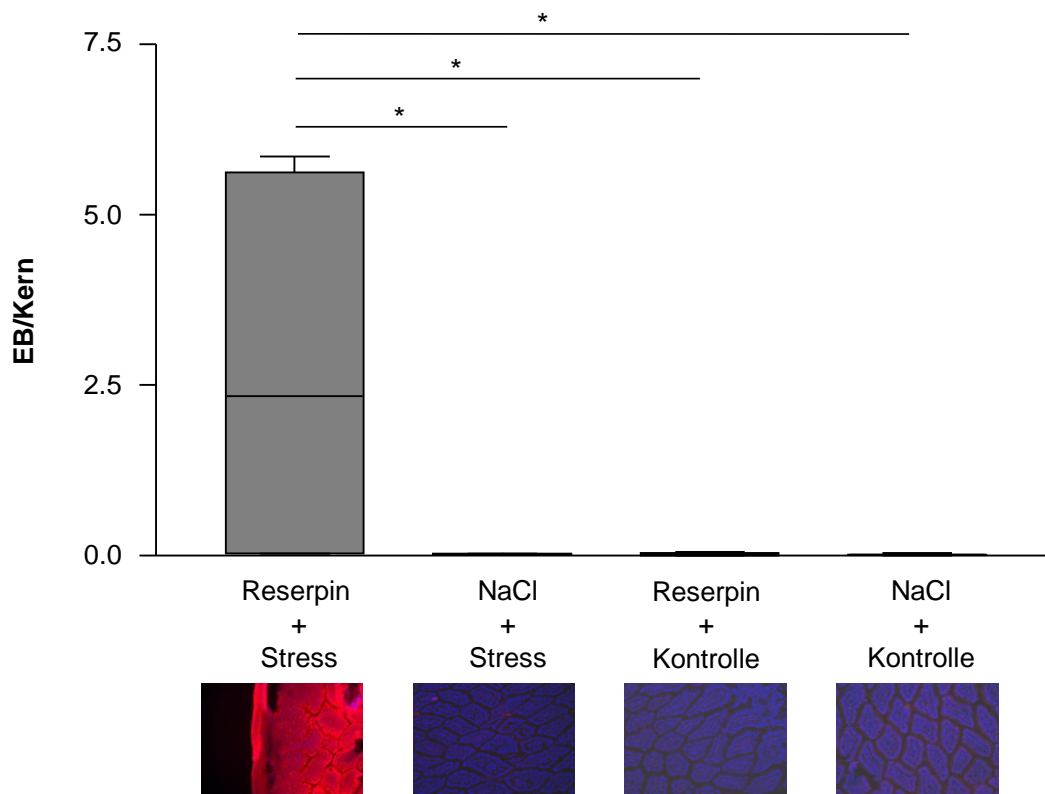


Abb. 5.18

Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des terminalen Ileums in gestressten und nicht gestressten, Reserpin- bzw. NaCl-behandelten, 4 Wochen zuvor transportierten weiblichen BALB/c Mäusen. 4 Wochen vor dem Experiment wurden die Tiere 16 Stunden transportiert. 24 Stunden vor der akuten Stressexposition erhielten gestresste (Stress) und ungestresste (Kontrolle) Mäuse eine subkutane Injektion mit Reserpin 1µg/g Körpergewicht (Reserpin) bzw. Kochsalz (NaCl). Direkt vor Stressbeginn wurden alle Tiere mit 20µl Evans Blue geschlündelt. Unmittelbar nach der Stressepisode wurde den Mäusen das terminale Ileum entnommen. Bestimmung der Evans Blue Transsudation in die Submukosa des terminalen Ileums: Pro Maus wurde 1 Bild des Ileums aufgenommen, pro Bild wurde an 5 Stellen die Fluoreszenzintensität sowohl der Hoechst gefärbten Kerne als auch des Evans Blue bestimmt und das Verhältnis der beiden zueinander errechnet. Pro Tier wurde ein Mittelwert der Messdaten gebildet; EB=Evans Blue; n=12 Mäuse pro Gruppe; *p<0,5, Bonferroni's test nach one-way ANOVA. Jeweils unter den entsprechenden Boxplots sind repräsentative Beispiele für histologische Bilder, die zur Bestimmung der Evans Blue/Kern Ratio verwendet wurden, gezeigt. blaue Fluoreszenz=Hoechst-Kernfärbung, rote Fluoreszenz=Evans Blue

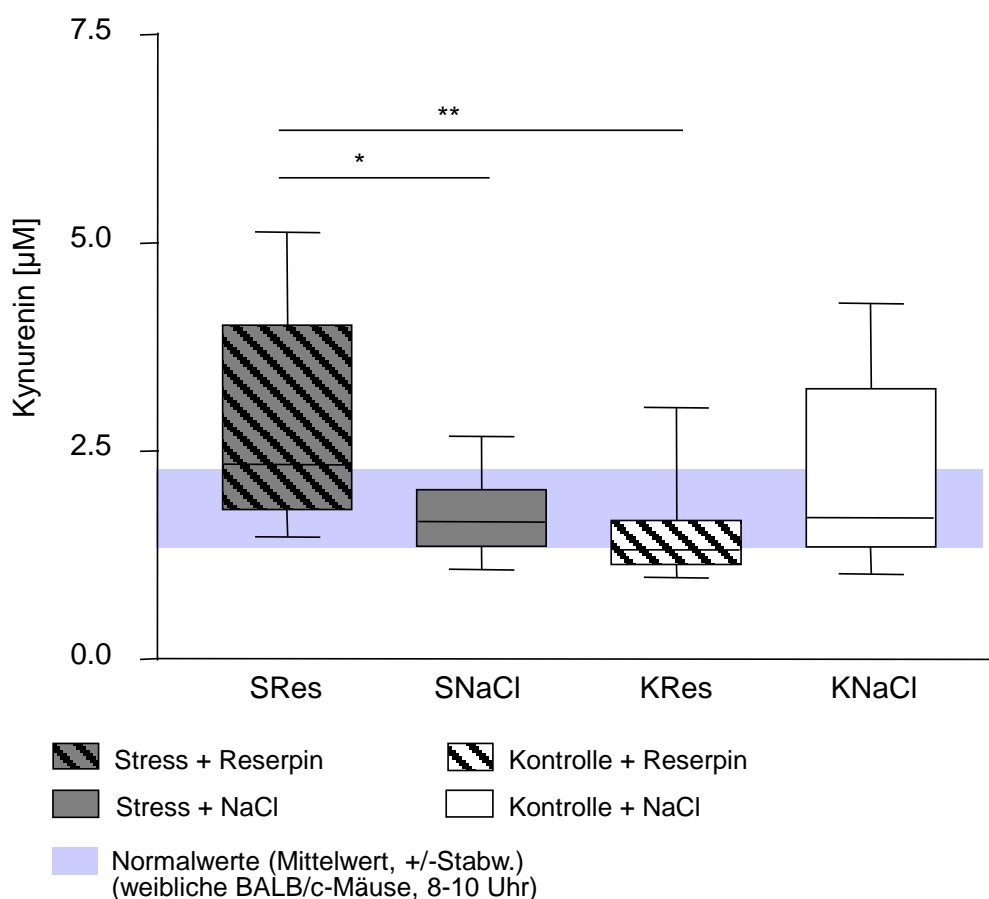


Abb. 5.19

Plasma-Kynureninkonzentration akut gestresster und nicht gestresster, Reserpin- bzw. NaCl-behandelter, 4 Wochen zuvor transportierter weiblicher BALB/c Mäuse. 4 Wochen vor dem Experiment wurden die Tiere 16 Stunden lang transportiert. 24 Stunden vor der akuten Stressexposition erhielten gestresste (S, graue Boxplots) und ungestresste (K, weiße Boxplots) Mäuse eine subkutane Injektion mit Reserpin 1µg/g Körpergewicht (Res, gestreifte Boxplots) bzw. Kochsalz (NaCl, leere Boxplots). Direkt nach Stressende wurde den Mäusen durch retroorbitale Punktion Blut entnommen und darin mittels Tandem-Massen-Spektrometrie die Konzentration von Kynurenin gemessen. jeweils n=12/Gruppe; Summe aus 2 unabhängigen Experimenten mit ähnlichen Ergebnissen; *p<0,5; **p<0,01; Bonferroni's test nach one-way ANOVA

6. Diskussion

Es ist bekannt, dass Stress über das sympathische Nervensystem (SNS) und die HPA-Achse Einfluss auf die Psyche, das Immunsystem und den Magen-Darm-Trakt nimmt (3), (21), (65), (204). Bei akuter Stressexposition wird hierdurch unter anderem das Immunsystem aktiviert und damit in die Lage versetzt, auf das potentielle Eindringen von Keimen, z.B. über eine Zellmigration von Leukozyten an einen Ort der Immunaktivierung wie Haut oder Darm, adäquat zu reagieren (66), (145), (268). Hält der Stress länger an und wird chronisch, dekomensieren die adaptiven „Stresssysteme“ u.a. mit der Folge einer Immunsuppression und geschwächten Infektabwehr (33), (36). Zusätzlich wird bereits durch akute Stressexposition die Integrität der Darmbarriere eingeschränkt und es kommt zur Translokation von Bakterien in die Blutbahn.

In der Pathogenese der Sepsis, in der es ohnehin schon zu schweren Störungen des Immunsystems kommt, stellt der Übertritt von Bakterien aus dem Darm in die Blutbahn einen weiter komplizierenden Faktor dar (201), (202), (203). Bei der Therapie des septischen Schocks werden gängigerweise Katecholamine zur Aufrechterhaltung des Blutdruckes eingesetzt und dabei in Kauf genommen, dass durch die vasokonstriktive Wirkung des NA eine Minderversorgung des Darmes entsteht. Ob auch im Stress, bei dem sich normalerweise als Zeichen der Sympathikuswirkung erhöhte Katecholaminwerte zeigen, die Vasokonstriktion eine Rolle in der Darmbarrierestörung spielt, ist nicht geklärt. Um die Wirkung des Sympathikus auf die Integrität der Darmbarriere im Stress zu untersuchen, sollte in der vorliegenden Arbeit mithilfe von Reserpin eine chemische Sympathikolyse hergestellt werden.

Um den genauen Verlauf der Katecholaminwerte im Plasma von gestressten BALB/c Weibchen zu ermitteln, wurde in einem Zeitraum von 15 Minuten nach Stressbeginn bis 2 Stunden nach Stressende eine Kinetik erstellt. Anders als erwartet, zeigte sich dabei in dem Beobachtungszeitraum weder ein Abfall noch ein Anstieg der Katecholaminwerte. In der Literatur wird meistens von erhöhten NA- und Adrenalinwerten nach Stressexposition berichtet (172), (263), (269), (270). In unserer Arbeitsgruppe wurden zuletzt erniedrigte NA Werte am Ende einer 2-stündigen Stresssitzung beobachtet, sodass wir einen NA-Anstieg während der akuten Stressexposition erwarteten. Als Ursache für die fehlenden Veränderungen der Katecholaminwerte in der vorliegenden Arbeit konnte ein Problem bei der Messung der Proben ausgeschlossen werden, da die Ergebnisse bei erneuter Messung mit

einem anderen ELISA-Kit-Hersteller identisch waren. Eine Ursache für den fehlenden Nachweis eines Katecholaminanstieges könnte in der Organisation der Entnahmezeitpunkte liegen. So liegt der erste Blutentnahmezeitpunkt erst 15 Minuten nach Stressbeginn. Bekanntermaßen reagiert der Organismus sehr schnell, innerhalb von Sekunden bis Minuten, mit der Aktivierung des SNS ⁽²⁶³⁾, sodass die Möglichkeit besteht, dass der Peak bereits vor der ersten Blutentnahme liegt. Bei unserem Versuchsaufbau vergingen pro Maus von der Herausnahme der Tiere aus der Stresssitzung bis zur Beendigung der Blutentnahme etwa zwei bis drei Minuten (Abb. 6.1). Die Möglichkeit des Nachweises solcher früher Veränderungen ist somit mit den gewählten Methoden eingeschränkt.

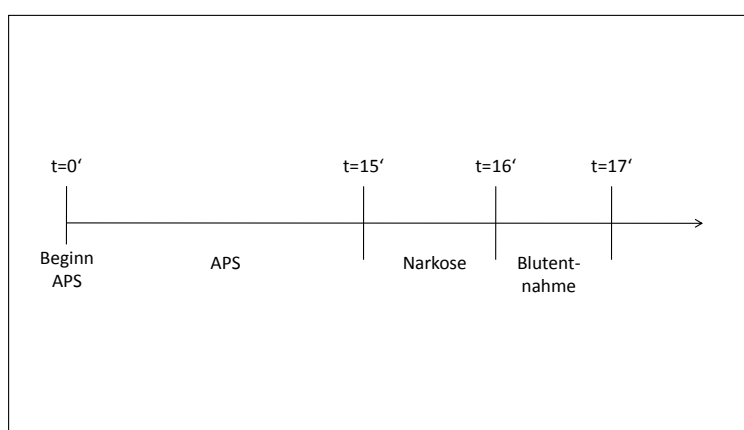


Abb. 6.1

Zeitkinetik der Narkose und Blutentnahme nach Herausnahme der Mäuse aus der Stresssitzung.

Nach Herausnahme der Tiere aus der Stresssitzung zu den gegebenen Zeitpunkten erfolgte unmittelbar die Narkose durch intraperitoneale Gabe von Ketamin. Nach Wirkeintritt ca. 1 Minute später erfolgte die retroorbitale Blutgewinnung. t= Minuten nach Beginn der Stresssitzung, APS= akuter psychischer Stress

Die Zentrifugation, Aliquotierung und das Einfrieren aller Proben einer Kinetik erfolgte zum selben Zeitpunkt direkt nach Beendigung der 2-stündigen Stresssitzung. Die Zeitspanne zwischen Entnahme bis zum Einfrieren war somit bei Proben aus frühen Gruppen länger als bei späten Entnahmezeitpunkten. Da in anderen Experimenten dieser Arbeit trotzdem signifikante Unterschiede in den Plasmakatecholaminwerten gemessen werden konnten, scheint dieser Unterschied in der Präanalytik vernachlässigbar zu sein.

Stresseffekte, die die Blutentnahme an sich bereits in den Mäusen hervorruft, können zusätzlich die durch den akuten Stress bedingten Veränderungen der Katecholaminspiegel überlagern. Besch et al. beschrieben bereits 1971 die physiologische Reaktion von Ratten auf Blutentnahmen (271), die wie andere gängige Laborprozeduren eine Stressantwort in den Tieren hervorruft (265), (266), (272). Laut Grouzmann et al. stellt die Blutprobengewinnung mittels arteriellem Katheter die genaueste Methode zum Nachweis von Katecholaminen dar (273). Allerdings können durch retroorbitale Blutgewinnung ähnlich genaue Katecholaminwerte erreicht werden (273). Durch den kurzen zeitlichen Abstand von ca. 1 Minute zwischen vorheriger Anästhesie und Blutentnahme sollten die Stresseffekte, die auch diese Methode erzeugt, auf ein möglichst geringes Maß reduziert werden. Deshalb entschieden wir uns für die Probengewinnung mittels retroorbitaler Blutentnahme.

Die vor der Blutentnahme durchgeführte Narkose stellt einen weiteren maßgeblichen Faktor dar, der die Katecholaminkonzentration beeinflusst. Das verwendete Ketamin hemmt die Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt und führt zu einer Erhöhung der Katecholamine im Plasma (274), (275), (276). Demnach liegt die Vermutung nahe, dass es durch die Narkose zu einer Überlagerung potentieller Stressveränderungen kommt, und die gemessenen Werte nicht den real existierenden entsprechen. Gäbe es tatsächlich keine Veränderung in den Katecholaminwerten, wäre die Überprüfung von Sympathikuseffekten im Stress nicht sinnvoll. Da die Literatur aber eindeutige Hinweise für ein Ansteigen der NA- und Adrenalinwerte während Stress bereithält (172), (263), (269), (270), und die Aktivierung des SNS im Stress als gesichert gilt, führten wir die Sympathikolyse dennoch durch. Die Tatsache, dass die Gabe von Reserpin in der vorliegenden Arbeit zu einem signifikanten Abfall der Katecholaminwerte im Plasma führte, macht zusätzlich deutlich, dass es möglich ist, die Aktivität des Sympathikus zu vermindern und dies auch messbar ist.

Inwiefern die im Plasma gemessenen Werte denen in den relevanten Organen (Darm, Gehirn, Nebenniere etc.) entsprechen, wurde nicht überprüft. Allerdings zeigen Stewart et al., dass 16 Stunden nach subkutaner Applikation von Reserpin im Darm und Gehirn von Ratten die NA-Werte auf 5 bzw. 10% von Kontrollen abgefallen sind (102). Auch in der Nebenniere, dem Herz, braunem Fettgewebe und portalvenösem Blut können die NA-Werte durch Reserpingabe signifikant gesenkt werden (277). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die im peripheren Blut gemessenen

Katecholaminwerte repräsentativ für die Organe stehen, auch wenn der eindeutige Beweis dafür in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht wird.

Neben dem SNS kommt es im Stress zusätzlich zu einer Aktivierung der HPA- Achse. Sowohl untereinander als auch auf den Darm nehmen diese beiden Systeme Einfluss (20), (29), (188), (267). Um den Einfluss der Sympathikolyse auf die HPA-Achse zu ermitteln, wurden die Corticosteronwerte im Plasma bestimmt. In der zuerst durchgeführten Kinetik zeigte sich, wie erwartet und schon vielfach zuvor beschrieben, ein kurz nach Stressbeginn einsetzender und bis zum Ende des Stresses weiter ansteigender GC-Plasmaspiegel. In Anlehnung an Mohn et al. gehen wir davon aus, dass dieser Corticosteronanstieg am Ende der Stressexposition durch direkte zentrale Stimulation der HPA-Achse hervorgerufen wird (278). Über CRF und ACTH kommt es über direkte Stimulation in der Nebenniere zu einem Ausschütten des Corticosterons aus den Speichervesikeln. Dafür spricht das direkte Ansprechen auf den Stressreiz zu Beginn des Experimentes als auch der schnelle Abfall nach Beendigung des Stresses.

Ein eng mit diesem Anstieg der HPA-Achsenaktivität zusammenhängender Stressparameter ist die Anzahl der im peripheren Blut gemessenen Leuko- und Lymphozyten. Die durch Stress hervorgerufene Erhöhung der GC fällt ziemlich schnell nach Beendigung der Stressexposition wieder ab. Der kurz darauf folgende Abfall der weißen Blutkörperchen hingegen ist auch noch nach einigen Stunden nachweisbar (143). Deshalb wird dieser Parameter gerne in der Forschung mit wilden Tieren, und, da er positiv mit der Stärke des erlebten Stressors zusammenhängt, auch zur Abschätzung von Transportstress in Schlachttieren herangezogen (143).

Anders als im chronischen Stress, bei dem in unserer Arbeitsgruppe durch Blockade von GC-Rezeptoren mittels RU486 die stressinduzierte Leuko- und Lymphozytopenie in weiblichen BALB/c Mäusen vermindert werden konnte, zeigte sich dieser Effekt nicht nach akuter Stressexposition. Im chronischen Stress werden für den Verlust der Leuko- und Lymphozyten GC-induzierte Apoptosen verantwortlich gemacht (33), (34), (142), (279). Im akuten Stress hingegen treten die Leuko- und Lymphopenie zu schnell ein, als dass sie durch apoptotische Mechanismen erklärt werden könnten. Vielmehr stellen Dhabar et al. die Hypothese auf, dass es zu einer stressbedingten Zellmigration an einen Ort der Immunaktivierung kommt, insbesondere in die Haut, Lymphknoten und den Darm um, evolutionär betrachtet, im Kampf oder auf der Flucht potentiell eintretende Erreger unmittelbar zu bekämpfen (146). Wir vermuteten, dass im

akuten Stress eher Sympathikus-vermittelte Effekte am Verlust der Leuko- und Lymphozyten beteiligt sind. So zeigen Engler et al., dass die nach einer 24-stündigen Stressexposition bei Ratten auftretende Lymphopenie durch Blockade von α -AR vermindert werden kann ⁽²⁸⁰⁾.

In den hier gezeigten Experimenten kam es wie erwartet nach Anstieg der GC zum Abfall der Leuko- und Lymphozyten. Jedoch konnte durch Gabe von Reserpin der Abfall nicht verhindert werden, sodass in diesem Fall ein sympathikusvermittelter Effekt bei der akuten stressinduzierten Leuko- und Lymphopenie nicht nachweisbar ist. Allerdings fällt auf, dass auch der stressinduzierte Anstieg der GC durch Gabe von Reserpin nicht beeinflussbar ist. Somit stellt sich die Frage, ob die zu beobachtende Lymphopenie tatsächlich als direkt Sympathikus-vermittelt oder als Folge des GC-Anstiegs zu betrachten ist. In diesem Zusammenhang kann auf die bereits oben erwähnten Ergebnisse verwiesen werden, die keinen Effekt einer GC-Rezeptorblockade im akuten Stress zeigen konnten. Zusätzlich zeigen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass zuvor transportierte Mäuse, die im akuten Stress keinen GC-Anstieg zeigen, trotzdem unverändert niedrige Leuko- und Lymphozytenzahlen aufweisen. Somit erscheinen GC-vermittelte Effekte im akuten Stress untergeordnet zu sein.

Eine Ursache für den fehlenden Nachweis einer Sympathikuswirkung auf den Abfall der Leuko- und Lymphozyten könnte in der Rezeptorspezifität der Reserpin-vermittelten Sympathikolyse liegen, die sowohl die Wirkung α - als auch β -adrenerger Rezeptoren einschränkt. So berichten verschiedene Autoren, dass die Injektion von Adrenalin einen Anstieg der peripheren Leukozyten induziert ⁽²⁸¹⁾ bzw. der mit physischer Aktivität verbundene Anstieg der Katecholamine zu einer Leukozytose führt ^{(282), (283)}. Tønnesen et al. beobachteten, dass unter Adrenalingabe eine Cortisol-induzierte Lymphopenie reversibel sei ⁽²⁸⁴⁾. Vermittelt werden sollen diese Effekte hauptsächlich über β -AR ^{(285), (286), (287), (288)}. Engler et al. hatten gezeigt, dass die Verminderung der Lymphopenie α -adrenerg vermittelt wird. Folglich könnten sich bei gleichzeitiger Wirkung von Reserpin auf α - und β -Rezeptoren die Effekte der Sympathikolyse gegenseitig aufheben.

Zusätzlich ist bekannt, dass neben den Katecholaminen und GC weitere Faktoren regulativen Einfluss auf die Verteilung von Leukozyten haben. So sind für *growth hormone*, Schilddrüsenhormone, *beta-endorphin*, *vasoactive intestinal peptide* und Neuropeptid-Y Effekte auf stressinduzierte Veränderungen peripher zirkulierender

Leukozyten gezeigt worden ^{(263), (289), (290), (291)}. Dies bedeutet, dass die stressinduzierte Leukozytenmigration einer komplexeren als nur durch das SNS und die HPA-Achse beeinflussten Regulation unterliegt und die unselektive Sympathikolyse mittels Reserpin eine stressinduzierte Leuko- und Lymphopenie nicht verhindern kann.

Zusätzlich zu dem während Stress zu beobachtenden Anstiegs der GC zeigte sich in der durchgeführten Kinetik ein zweiter, als solcher zuvor nicht beschriebener, GC-Anstieg 8 Stunden nach Stressbeginn.

Eine Vermutung für die Ursache dieses zweiten GC-Anstiegs sind physiologisch auftretende Hormonschwankungen im Rahmen des zirkadianen Rhythmus. Der betroffene Zeitpunkt 6 Stunden nach Stressende ist um 16 Uhr. Im Rahmen des 12 Stunden Hell-Dunkel-Zyklus wird im Inkubator um 18 Uhr das Licht ausgeschaltet, womit sich 16 Uhr am Ende der Tagphase befindet. Als Nager sind Mäuse nachtaktive Tiere. Demnach kommt es, anders als beim Menschen, der morgens die höchsten GC Werte aufweist ⁽²⁹²⁾, bei Mäusen zu Beginn der Dunkelphase zum Anstieg der GC ^{(293), (292)}. Somit liegt der entsprechende Entnahmezeitpunkt vor der Phase des zu erwartenden GC-Anstiegs im Rahmen des zirkadianen Rhythmus bei Nagern. Zusätzlich spricht gegen diese Theorie, dass alle Kontrollwerte, die zum gleichen Zeitpunkt abgenommen wurden, unterhalb des niedrigsten Wertes von gestressten Tieren liegen. Allerdings muss bedacht werden, dass es durch Stressexposition zu einer Störung verschiedener zirkadianer Rhythmen kommen kann ⁽²⁹⁴⁾. So berichten Dalm et. al, dass C57BL/6J Mäuse, die wiederholt gegenüber Ratten exponiert werden, Veränderungen in zirkadianen Aktivitätsmustern aufweisen ⁽²⁹⁵⁾, die stark von GC abhängen. Meerlo et al. berichten von der Beeinflussung der tageszeitabhängigen Körpertemperatur und Herzfrequenz durch sozialen Stress ^{(296), (297)}. Inwieweit unsere Ergebnisse durch zirkadiane Rhythmusstörungen beeinflusst sind, wurde nicht überprüft.

Wahrscheinlicher erscheint als Ursache für den zweiten GC-Peak die stressinduzierte bakterielle Translokation aus dem Darm in die Blutbahn. In unserer Arbeitsgruppe konnte zuvor gezeigt werden, dass 6 Stunden nach Beendigung einer 2-stündigen Stresssitzung deutliche Apoptosen im terminalen Ileum nachweisbar sind und es zu einer Dissemination von Bakterien der Darmflora in die Leber und mesenteriale Lymphknoten kommt. Desweiteren ist bekannt, dass LPS eine Aktivierung der HPA-

Achse induzieren kann. So zeigen Lenczowski et al., dass 90 Minuten nach intraperitonealer Injektion von LPS in Ratten eine Erhöhung von IL-6, ACTH und Corticosteron im Plasma gemessen werden kann ⁽²⁹⁸⁾. Zusätzlich zeigten in dieser Arbeit Tiere, in denen kein Endotoxin gemessen werden konnte, auch keinen Anstieg des Corticosterons. Auch andere Autoren berichten von einer LPS-induzierten HPA-Achsenaktivierung über proinflammatorische Zytokine ⁽¹³²⁾, ⁽¹³³⁾, ⁽²⁹⁹⁾, sodass es möglich erscheint, dass translozierende Bakterien zu einem Anstieg der GC führen können. Da durch die Behandlung mit Reserpin die stressinduzierte Permeabilitätserhöhung im Darm nicht verhindert werden konnte, ist es nachvollziehbar, dass auch der GC-Anstieg nicht zu beeinflussen ist. Der Nachweis für einen kausalen Zusammenhang zwischen bakterieller Translokation und dem Ansteigen der GC-Konzentration kann somit nicht erbracht werden. Um diesen Zusammenhang potentiell zu belegen, bliebe zu untersuchen, inwiefern z.B. eine Behandlung der Mäuse mit Endotoxin-freiem Anti-TNF α -AK, die erwiesenermaßen die bakterielle Translokation einschränkt, das Potential hätte, den beschriebenen Anstieg der GC zu vermindern. Ein Problem dabei besteht in der Tatsache, dass bereits geringe Mengen an LPS eine fast maximale GC-Antwort generieren ⁽²⁹⁸⁾, sodass nur eine komplette Hemmung der bakteriellen Translokation einen GC-Anstieg verhindern würde. Da bei den meisten Berichten in der Literatur nur eine Verminderung, nicht aber eine Verhinderung der Darmbarrierestörung erreicht wird, erscheint die Durchführbarkeit dieses Nachweises kompliziert.

Als einen Parameter zur genaueren Untersuchung der Permeabilität der Darmbarriere wurde die Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des terminalen Ileums untersucht.

Bei Evans Blue (T-1824) handelt es sich um einen Azofarbstoff, der unter fluoreszierendem Licht stark rot leuchtet und somit sehr leicht mikroskopisch und spektrophotometrisch nachweisbar ist ⁽³⁰⁰⁾. Über viele Jahre wurde Evans Blue zur Beurteilung der Permeabilität von Kapillaren verwendet ⁽³⁰¹⁾, ⁽³⁰²⁾, ⁽³⁰³⁾. Aber auch für die Beurteilung der Durchlässigkeit von Makromolekülen vom Darmlumen aus erwies sich dieser Farbstoff als gut geeignet ⁽³⁰⁰⁾, ⁽³⁰⁴⁾. Im Dünndarm konnte gezeigt werden, dass die Permeabilität für Evans Blue über aller Abschnitte homogen verteilt ist und von energieverbrauchenden Mechanismen unabhängig ⁽³⁰⁴⁾. Mit einem Molekulargewicht von 960,83g/mol ⁽³⁰⁴⁾ fällt Evans Blue in die Klasse der Makromoleküle und ist somit ein guter Marker für den parazellulären Transport im

Darm ⁽³⁰⁵⁾, ⁽³⁰⁶⁾. Diese parazelluläre Permeabilität wird besonders durch interzelluläre *tight junctions* beeinflusst. Bei entzündlichen Darmerkrankungen kann die parazelluläre Permeabilität bereits beeinträchtigt sein, obwohl sich das Epithel morphologisch noch intakt darstellt ⁽³⁰⁷⁾. In früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe nutzen wir den Nachweis von Apoptosen im Darmepithel mittels TUNEL-Assay als Zeichen einer gestörten Darmbarriere. Um bereits frühere und vor allem funktionelle Veränderungen des Darmepithels nachzuweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Transsudation von Evans Blue als Nachweis einer beeinträchtigten parazellulären Permeabilität herangezogen.

Dabei zeigte sich, dass eine stressinduzierte Erhöhung der Transsudation gegenüber ungestressten Tieren durch Sympathikolyse nicht verhindert wird. In vorherigen Experimenten unserer Arbeitsgruppe wurde die bakterielle Translokation in Zusammenhang mit dem apoptotischen Verlust intestinaler Epithelzellen nach Stressexposition gebracht. Eine Hypothese für die Ursache dieses stressinduzierten programmierten Zelltods ist, dass es durch erhöhte Katecholamine im Stress zu einer Vasokonstriktion mit folgender Sauerstoffminderversorgung im Splanchnikusgebiet kommt. Dass es im Stress zu einer Aktivierung des SNS und Ausschüttung von Katecholaminen kommt, und diese über α -AR auf den Gefäßen eine Vasokonstriktion vermitteln, kann als erwiesen angesehen werden. Ob die dabei erreichten Katecholaminkonzentrationen ausreichen, eine derart massive Sauerstoffminderversorgung zu induzieren, dass es zu apoptotischem Zellverlust kommt, ist nicht nachgewiesen.

Die Erkenntnisse, die wir über die vasokonstriktive Wirkung von Katecholaminen haben, stammen zu größten Teilen aus der Sepsistherapieforschung. In der Therapie der Sepsis werden häufig große Mengen an NA angewandt, um den Blutdruck aufrecht zu erhalten ⁽³⁰⁸⁾, ⁽³⁰⁹⁾, ⁽³¹⁰⁾. Anders als zu erwarten wäre, ist in der Sepsis, die oft mit deutlicher Hypotension einhergeht, die Gefahr durch die Gabe von hohen Dosen NA eine Minderversorgung einzelner Organe (Leber, Niere, Darm) mit der Folge von Multi-Organ-Versagen zu induzieren relativ gering ⁽³¹¹⁾. Als Ursache dafür wird ein vermindertes Ansprechen der Gefäße auf Katecholamine aufgrund einer *down-regulation* von α -AR vermutet ⁽³¹²⁾. In nicht septischen Patienten tritt diese *down-regulation* nicht auf, sodass die Gefahr einer Minderversorgung eindeutig gegeben ist. Inwiefern akut gestresste Mäuse eine veränderte Reaktivität der Gewebe auf Katecholamine aufweisen, wurde nicht untersucht. Edgar et al. berichten, dass

chronisch gestresste Mäuse sogar eine erhöhte Reaktivität der β -AR auf Lymphozyten aufweisen ⁽⁴⁵⁾. Sollte dies auch bei α -AR auf Gefäßen zutreffen, würde dies die Wahrscheinlichkeit, dass die durch Stress erhöhten Katecholaminwerte tatsächlich eine Minderversorgung des Darmes bedingen, deutlich erhöhen. Allerdings ist fraglich, ob es bereits in der kurzen Phase einer akuten Stressexposition zu Veränderungen der Rezeptorexpression kommt.

Venkatesh et al. beschreiben, dass ein Abfall des PO_2 auf Werte unter 30 mmHg im Darm signifikant mit der Entstehung von Apoptosen assoziiert sind ⁽²⁵²⁾. Somit bliebe zu testen, wie der Sauerstoffpartialdruck im Darm während Stress tatsächlich ausfällt, um die Theorie der Hypoxie-bedingten Darmbarrierestörung im Stress zu untermauern.

Desweiteren kann der direkte Beweis, dass die Gabe von Reserpin das Sauerstoffangebot im Darm verbessert und somit die Hypoxie verhindert, nicht erbracht werden. Allerdings berichten Kisin und Yuzhakov, dass nach langfristiger Gabe von Reserpin der Anteil der Darmdurchblutung in Ratten um 17% des Herzminutenvolumens gesteigert werden kann ⁽¹¹³⁾. Duranteau et al. hingegen fanden, dass in Patienten mit Sepsis besonders die Kombination eines positiv inotropen Medikamentes (NA) mit einem im Magen-Darm-Trakt wirkenden Vasodilatator (Dobutamin) die beste Durchblutung der gastralen Mukosa erzeugte ⁽³⁰⁹⁾. Allerdings wurde in dieser Arbeit nicht die Wirkung von Reserpin untersucht.

In den meisten Arbeiten zur Hypoxie-bedingten Apoptoseinduktion wird von einer Hypotonie-bedingten Hypoxie, vornehmlich bei schwerem Trauma und in der Sepsis, ausgegangen. Auch die Therapie mit Reserpin führt zu einer deutlichen Hypotonie, sodass angenommen werden könnte, dass allein die Gabe von Reserpin zur Induktion von Apoptosen führe. Da die ungestressten, Reserpin-behandelten Tiere in der vorliegenden Arbeit keine vermehrte Transsudation von Evans Blue aufweisen, scheint dies nicht der Fall zu sein. In diesem Zusammenhang sollte die Wirkung der Sympathikolyse eher als ein Wiederherstellen „normaler“ Katecholaminwerte gesehen werden, als ein komplettes Ausschalten des Sympathikus. Die Tatsache, dass durch einmalige Reserpingabe nur eine partielle Sympathikolyse herzustellen ist, scheint somit in diesem Fall von Vorteil zu sein. Trotzdem muss letztendlich offen bleiben, ob die Behandlung mit Reserpin tatsächlich die Durchblutung des Magen-Darm-Traktes verbessert und in der Lage ist, eine vermutete Hypoxie zu verhindern. Da die vorliegenden Ergebnisse keinen protektiven Effekt der Sympathikolyse auf die

stressinduzierte Darmbarrierestörung zeigen konnten, erscheint es unwahrscheinlich, dass die Hypoxie verhindert werden kann.

Eine weitere Ursache für die fehlende protektive Wirksamkeit der Reserpin-vermittelten Sympathikolyse auf die Darmbarriere könnte weniger in einem hämodynamischen als vielmehr in einem neuroendokrin-immunologischen Mechanismus gesehen werden.

Wie bereits vielfach erwähnt, konnte in Experimenten unserer Arbeitsgruppe durch Behandlung von Mäusen mit Anti-TNF α -AK die nach Stressexposition zu beobachtende bakterielle Dissimination von Bakterien und der apoptotische Verlust von intestinalen Epithelzellen vermindert werden. Auch andere Autoren zeigen den Einfluss von TNF auf die Darmbarriere. So können durch Inkubation mit TNF *in vitro* Apoptosen in Darmzellen induziert ^{(243), (244)} und der interzelluläre Zusammenhalt von Darmepithelzellen durch *tight junctions* beeinträchtigt werden ⁽²⁴⁵⁾. Die genauen Quellen von TNF α im Darm sind nicht genau bekannt, aber von Mastzellen weiß man, dass ihre Speichergranulae TNF α enthalten. Mastzellen sitzen direkt unterhalb des Darmepithels und können nach Stimulation verschiedene Mediatoren wie Histamin, Tryptase, Prostaglandin-D2 ⁽³¹³⁾ und eben auch TNF ^{(247), (248)} sezernieren. Die Stimulation der Mastzellen ist über verschiedene Mechanismen möglich. Die klassische Aktivierung im Rahmen der allergischen Sofortreaktion findet über Quervernetzung zellgebundener IgE-AK durch Antigene statt ⁽³¹⁴⁾. Oft werden Mastzellen in der Nähe von Nervenendigungen gefunden. Und auch wenn die genauen Signalwege und Mediatoren noch nicht vollständig bekannt sind, gilt es als sicher, dass Mastzellen auch durch Neurotransmitter des Nervensystems aktiviert werden können ^{(248), (249), (250)}.

So nimmt die Behandlung mit Reserpin vermutlich über zwei verschiedene Wege Einfluss auf Mastzellen. Einerseits ist bekannt, dass β -AR-Agonisten einen stabilisierenden Effekt auf Mastzellen haben ^{(249), (250)}. Parasympathische Neurotransmitter hingegen sind in der Lage, eine Mastzelldegranulierung zu stimulieren ⁽²⁵⁰⁾. Dies spielt besonders in der Therapie von Asthma eine Rolle. Durch die Depletion der Katecholamine mittels Reserpin könnte somit durch das relative Überwiegen des Parasympathikus eine „Destabilisierung“ von Mastzellen induziert werden, die zu einer Ausschüttung von TNF führt und die Integrität der Darmbarriere stört. Da ungestresste, Reserpin-behandelte Mäuse aber offensichtlich keine vermehrte Transsudation von Evans Blue aufweisen, kann dieser Effekt alleine keine

Zerstörung der Darmbarriere induzieren, aber, wie beschrieben, auch nicht die stressinduzierte Permeabilitätserhöhung verhindern.

Andererseits führt die Gabe von Reserpin auch zu einem Ausschütten von Serotonin. Von Serotonin wiederum ist bekannt, dass es über die Bindung an 5-HT_{1A}-Rezeptoren an der Adhäsion und Migration von Mastzellen beteiligt ist ⁽³¹⁵⁾. Durch die Reserpin-vermittelte Serotonindepletion könnte es somit zu einer verminderten Mastzellmigration in die *Lamina propria* des Darmes kommen, sodass die Wirkung der „Mastzell-Destabilisierung“ aufgrund des Katecholaminmangels deutlich abgeschwächt würde.

Auch durch Stress kommt es zu einer Degranulation von Mastzellen ⁽³¹⁶⁾. Als einer der zentralen Transmitter dafür konnte CRF identifiziert werden ⁽³¹⁷⁾, ⁽³¹⁸⁾. So können bei Ratten durch kurz- bzw. langfristige, periphere Gabe von CRF die gleichen Effekte in Bezug auf Muzinproduktion und Darmpermeabilität hervorgerufen werden, wie sie auch im akuten bzw. chronischen Stress zu sehen sind ⁽²⁴¹⁾, ⁽²¹¹⁾. Sind die Tiere allerdings Mastzell-defizient bzw. bekommen einen Mastzellstabilisator (Iodoxamid) gespritzt, zeigen sich diese Effekte nicht ⁽²⁰⁷⁾, ⁽³¹⁹⁾. Durch Gabe eines CRF-Antagonisten (Antisauvagine) vor CRF-Applikation können der vermehrte transzelluläre Ionentransport und die erhöhte Permeabilität für Makromoleküle vermindert werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass CRF eine zentrale Rolle in der Regulation der stressinduzierten Permeabilitätsstörung spielt. Inwiefern dies in Zusammenhang mit der HPA-Achse steht, ist nicht abschließend geklärt.

Auf den ersten Blick lassen die vorliegenden Ergebnisse vermuten, dass es einen direkten Zusammenhang zwischen HPA-Achse und der Integrität der Darmbarriere gibt. So zeigen zuvor transportierte Mäuse nach akuter Stressexposition nicht den zu erwartenden Anstieg der GC und in der Folge eine intakte Darmbarriere, gezeigt durch eine fehlende Transsudation von Evans Blue. Kommt es in diesen Mäusen allerdings nach Reserpingabe zum Anstieg der GC, kann auch wieder eine erhöhte Permeabilität für Evans Blue nachgewiesen werden.

Auch Meddings und Swain postulieren einen direkten Zusammenhang zwischen GC-Plasmakonzentration und einer Darmbarrierestörung, da eine stressinduzierte Permeabilitätserhöhung durch Adrenektomie bzw. GC-Rezeptorblockade verhindert werden konnte und die Gabe von Dexamethason zu einer Erhöhung der Permeabilität führte ⁽³²⁰⁾. Dies würde bedeuten, dass die HPA-Achse direkt Einfluss auf die

Darmbarriere hat. Laut der Arbeitsgruppe um Spitz und Yuhan kommt es demnach durch Dexamethasongabe zu einer vermehrten Adhäsion von Bakterien an mukosale Epithelzellen, die mit einer Auflockerung von *tight junctions* und erhöhter Permeabilität assoziiert ist ^{(321), (322)}.

Andererseits berichten Santos et al. und Castagliuolo et al. als Erstbeschreiber des Zusammenhangs von CRF und einer Permeabilitätsstörung im Darm, dass bei ihren Untersuchungen GC keinen Einfluss auf die CRF-induzierten Veränderungen hätten ^{(241), (267), (323)}. Und auch in unserer Arbeitsgruppe konnte zuvor die bakterielle Dissimination durch GC-Rezeptorblockade nicht vermieden werden. Die Blockade von CRF-Rezeptor 1 und 2 hingegen führte zu einer signifikanten Verminderung der Transsudation von Evans Blue (unveröffentlichte Daten). Demnach vermuten wir, dass die CRF-abhängigen Effekte auf die Darmbarriere unabhängig von der HPA-Achse funktionieren.

In diesem Zusammenhang erscheint es interessant zu erwähnen, dass Leukozyten unabhängig von der HPA-Achse in der Lage sind, CRF zu produzieren und über auto- und parakrine Sezernierung Einfluss auf die lokale Immunität z.B. im Darm nehmen können ^{(242), (324), (325)}.

Ob nun letztendlich die fehlende protektive Wirkung der Sympathikolyse auf die Darmbarriere an einer nicht verhinderten Hypoxie oder der Destabilisierung von Mastzellen mit folgender TNF-Sekretion liegt oder aber grundsätzlich ein CRF-abhängiger Mechanismus zugrunde zu legen ist, kann hier nicht abschließend geklärt werden. Weitere Experimente zur Aufklärung der genauen Mechanismen in diesem komplexen Zusammenspiel laufen derzeit in unserer Arbeitsgruppe.

Als weiterer Parameter zur Untersuchung der bakteriellen Translokation werden in dieser Arbeit die Veränderungen des Indolaminstoffwechsels angeführt.

In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass bakterielle Produkte wie LPS oder CpG-Motive ^{(213), (214)}, aber auch proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IFN γ ⁽³²⁶⁾ zur Aktivierung eines der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme des Tryptophanabbaus, der Indolamin-2,3-dioxygenase (IDO), führen.

Aufgrund der Fähigkeit von Reserpin, Serotonin zu depletieren, liegt die Vermutung nahe, dass die alleinige Gabe von Reserpin bereits Veränderungen des Indolaminstoffwechsels induzieren und potentiell stressinduzierte Veränderungen beeinflussen könnte. Serotonin entsteht über einen zweiten, IDO-unabhängigen

Abbauweg aus Tryptophan (Abb. 2.1), sodass Tryptophan kompensatorisch vermehrt über diesen Abbauweg metabolisiert werden könnte und dadurch weniger Substrat für den Kynurenin-Abbauweg bereitstünde. Da die Konzentration von Kynurenin im Plasma aber deutlich nach Stressexposition ansteigt, scheint ausreichend Substrat für einen Abbau über den IDO-abhängigen Weg vorhanden zu sein. Zusätzlich zeigen ungestresste, Reserpin-behandelte Mäuse nur unwesentliche Abweichung in den Plasmakonzentrationen von Tryptophan und seinen Metaboliten, sodass eine direkte Wirkung der Reserpinbehandlung auf die Aktivität von IDO als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Da die Literatur keinerlei Ergebnisse zum Einfluss des SNS auf die Aktivität von IDO bereithält, ist eine kritische Beurteilung der sympathikolytischen Wirkung von Reserpin in diesem Zusammenhang schwer.

Nach Stressexposition konnten in vorherigen Arbeiten unserer Gruppe im Plasma von BALB/c Mäusen Veränderungen in den Konzentrationen von Tryptophan und seinen Metaboliten gezeigt werden. Damit assoziiert war eine Induktion der IDO-mRNA in Gehirn, Lunge und Milz. In den hier gezeigten Ergebnissen wird ein stressinduzierter, transientser Anstieg des Kynurenin im Plasma gezeigt, der durch Reserpingabe nicht beeinflusst werden kann. Da, wie zuvor beschreiben, die Transsudation von Evans Blue durch Reserpin ebenfalls nicht verhindert werden konnte und wir davon ausgehen, dass die zu beobachtenden Veränderungen im Indolaminstoffwechsel bakteriell induziert sind, ist dieses Ergebnis gut nachvollziehbar.

Anders als in vorherigen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe stieg die Konzentration von Kynurenin im Plasma hier bereits direkt nach Stressende an. Stressinduzierte Apoptosen im Darmepithel konnten zuvor bereits direkt nach Stressende nachgewiesen werden. Die translozierten Bakterien hingegen sind erst 6 Stunden nach Stressende in Leber und mesenterialen Lymphknoten nachweisbar, sodass sich die Frage stellt, ob direkt nach Stressende zu beobachtende Indolaminstoffwechseleränderungen tatsächlich bakteriell induziert sind. Auffallend in diesem Zusammenhang ist die Korrelation zwischen den im Plasma gemessenen GC-Konzentrationen und den Veränderungen der Indolamine. So zeigen zuvor transportierte Tiere nach Stressexposition keinen Anstieg der GC und gleichzeitig keinen Kynureninanstieg. Bekommen die Tiere jedoch vor der Stresssitzung Reserpin gespritzt, sind sowohl GC-Anstieg als auch die gesteigerte IDO-Aktivität wieder nachweisbar, sodass die Vermutung nahe liegt, dass die zu beobachtenden

Veränderungen im Indolaminstoffwechsel rein GC abhängig seien und nicht durch translozierende Bakterien induziert.

Dazu ist bekannt, dass GC dieIDO-Induktion verstärken können, jedoch nicht in der Lage sind sie selber auszulösen. Türck et al. beobachteten eine erhöhteIDO-Aktivität im Überstand einer Zellkultur, wenn zusätzlich zuIFN γ auch Dexamethason zugeführt wurde. Dexamethason alleine konnteIDO nicht induzieren⁽³²⁷⁾.IFN γ ist einer der Hauptinduktoren vonIDO⁽³²⁷⁾ und spielt ebenfalls eine Rolle bei der stressinduzierten Darmbarriererstörung, indem es die interzellulären *tight junction* Verbindungen beeinträchtigt⁽²⁴⁶⁾. Auch Grohmann et al. berichten, dassIFN γ nötig ist, um über einen reversen Signalweg über den Glukokortikoid-induzierten Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor (GITR) *in vitro* in dendritischen Zellen dieIDO-Expression zu starten⁽³²⁸⁾. Insgesamt müssen neben GC also auch andere Faktoren vorliegen, um eineIDO-Aktivierung zu induzieren. Von TNF und LPS ist bekannt, dass sie synergistisch auf dieIDO-Induktion wirken^{(213), (329), (330), (331)}. Auch Mastzellen können, da sie *Toll-like* Rezeptoren in hoher Dichte exprimieren, über die Bindung von LPS zur Degranulation stimuliert werden^{(332), (333)}.

Es existiert jedoch noch ein zweites Enzym, das ebenfalls am Tryptophanmetabolismus über den Kynureninstoffwechselweg beteiligt ist. Die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) ist hauptsächlich für die Kontrolle des basalen Tryptophanlevel im Plasma zuständig^{(334), (335)}. Sie wird konstitutiv in der Leber exprimiert, kann aber nicht über LPS oder Zytokine induziert werden^{(336), (337), (338)}. Allerdings können chronisch erhöhte GC die TDO-Aktivität und somit den hepatischen Tryptophanmetabolismus erhöhen^{(338), (339)}. Da die in dieser Arbeit beobachteten Veränderungen im Tryptophanmetabolismus am Ende der Stressexposition akut eintreten, erscheint eine Beteiligung der TDO an diesen Effekten eher unwahrscheinlich. Um die Effekte vonIDO und TDO genau voneinander differenzieren zu können, müsste eine spezifische Hemmung derIDO mittels 1-Methyltryptophan durchgeführt werden.

Abschließend vermuten wir, dass es in einer frühen Phase der Darmbarriererstörung zum Übertritt von LPS kommt, welches zur Ausschüttung von TNF aus Mastzellen führt und zusammen mit GC undIFN γ eine Induktion vonIDO bedingt. Die genauen Kausalitätsketten in diesem komplexen Zusammenspiel sind noch nicht abschließend aufgeklärt und Objekt intensiver Forschung.

Wie bereits mehrfach erwähnt, reagierten gekaufte, transportierte Mäuse in unserem Stressmodell anders als selbstgezüchtete Tiere.

Seit langem ist bekannt, dass bereits grundlegende Prozeduren wie Blutabnahmen, oro-gastrale Schlünderung, aber auch nicht invasive Routine-Tätigkeiten wie das Wiegen von Tieren, Käfig reinigen und Transport eine messbare Stressantwort in Labortieren generieren ^{(265), (266), (271), (272), (340)}. In unseren Experimenten zeigte sich, dass der 18-stündige Transport zu unserem Labor bei gekauften Mäusen eine langanhaltende Aktivierung der HPA-Achse auslöste, die sich in erhöhten GC-Basalwerten zeigte, und einen Abfall der Anzahl der Leuko- und Lymphozyten hervorrief. Bereits Tiere aus eigener Zucht, die nur den Raum wechselten, zeigten einen Anstieg der GC-Konzentration im Plasma. Demnach kann auch der Transport von Tieren als Stressor angesehen werden, der zu einer signifikanten und langanhaltenden Aktivierung der HPA-Achse führt.

Um vermeintlich einheitliche Voraussetzungen für Stressexperimente zu schaffen, werden Labortiere idealerweise über mehrere Wochen unter gleichbleibenden Bedingungen gehalten und regelmäßig von höchstens 2 Personen betreut, um sie an die Umgebung des Labors zu gewöhnen. Am Ende einer 3-wöchigen Adaptationsphase hatten sich in unseren Experimenten in beiden Gruppen (Transport und Eigene Zucht) die GC-Konzentrationen im Plasma und die Leuko- und Lymphozytenzahlen im Blut auf Level ungestresster Tiere normalisiert, sodass von vergleichbaren Ausgangsbedingungen hinsichtlich der HPA-Achse auszugehen ist. Trotzdem zeigten zuvor transportierte Tiere nach akuter Stressexposition nicht den erwarteten Anstieg der GC als Zeichen der HPA-Achsenaktivierung, keine Transsudation von Evans Blue und keine Veränderungen des Indolaminstoffwechsels. Somit hat der Stress, den die Tiere in ihrer juvenilen Phase erlebt haben, noch Wochen später, trotz augenscheinlich gleicher Stressbasalparameter, Auswirkungen auf die akute Stressantwort in adulten Tieren.

Als eine Ursache für diese Dysregulation der stressinduzierten GC-Antwort nach Transport könnte eine abgeschwächte Nebennierenantwort vermutet werden. Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten allerdings, dass im Vergleich zu selbstgezüchteten Mäusen zuvor transportierte Tiere nach Durchführung eines ACTH-Testes eine verstärkte Nebennierenantwort generierten, die sich in erhöhten Plasma-GC-Werten darstellte. Diese Daten deuten darauf hin, dass die fehlende

stressinduzierte GC-Antwort in transportierten Tieren nicht auf einer Unfähigkeit der Nebenniere, GC auszuschütten bzw. zu produzieren, beruht. Eher sind als alternative Ursachen eine zentrale Herunterregulation der HPA-Achse oder eine Steigerung der peripheren ACTH-Sensitivität in Erwägung zu ziehen, deren genaue Mechanismen allerdings bis dato unbekannt sind.

Auch andere Autoren beschreiben das Phänomen, dass durch eine einmalige Stressexposition die Aktivität der HPA-Achse langanhaltend modifiziert wird.

Einmaliger Immobilisationsstress oder Exposition gegenüber elektrischen Stromstößen während des Fressens führte in Ratten noch 2 Wochen später zu einem signifikant höheren Anstieg der ACTH-Antwort, wenn die Tiere einer unbekannteren Umgebung ausgesetzt wurden, als in nicht exponierten Kontrolltieren ^{(26), (341)}. Eine solche Sensibilisierung der HPA-Achse konnte ebenfalls durch die einmalige Gabe von IL-1 β induziert werden ^{(341), (342)}. Sowohl die Elektroschock-induzierte als auch die IL-1 β vermittelte, verstärkte HPA-Achsenaktivität wurde durch die Ausschüttung des Neuropeptids Arginin-Vasopressin (AVP) aus der äußeren Schicht der medianen Eminenz hervorgerufen, welches zu einer CRF-induzierten Ausschüttung von ACTH führte ^{(131), (341)}. Jansen und Mitarbeiter konnten zeigen, dass noch 3 Wochen nach einer einmaligen Gabe von IL-1 β oder Amphetamin in Ratten die Dichte von Dopamin- β -Hydroxylase positiven Neuronen, als Zeichen der adrenergen Innervation, besonders in CRF-Neuronen vermindert war ⁽³⁴³⁾. Zusätzlich beobachteten Schmidt et al. in Ratten nach Gabe von IL-1 β einen Anstieg von CRF und der CRF mRNA-Expression im paraventriculären Nucleus (PVN). Diese Veränderungen traten erst eine Woche nach Administration von IL-1 β auf und führten zu einer verstärkten Ausschüttung von ACTH und einer langanhaltenden Sensibilisierung der HPA-Achse ⁽³⁴¹⁾. In eine ähnliche Richtung weisen Ergebnisse von Johnson et al., die zeigen, dass eine einmalige Elektroschockexposition nicht nur die HPA-Antwort auf eine neue Umgebung, sondern auch auf einen immunologischen Stressor, in diesem Fall Endotoxin (10ng/g Körpergewicht), verstärkt ⁽⁶⁰⁾. Diese Sensibilisierung trat allerdings bereits am ersten Tag nach Elektroschock auf, verschwand aber erst 21 Tage nach Exposition. Interessanterweise entsprechen diese 21 Tage dem gleichen Zeitraum, den wir für die Normalisierung der GC-Werte nach Transportstress beobachteten.

Jedoch erklären all diese Ergebnisse nicht, warum transportierte Mäuse nicht mit einem GC-Anstieg auf einen erneuten akuten Stressor reagieren, obwohl ihre Sensitivität gegenüber ACTH erhöht ist.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine einzelne Stressexposition in der Lage war, die GC-Werte im Plasma für 2-3 Tage zu erhöhen. Danach folgte eine 4-wöchige Phase mit signifikant verminderter HPA-Achsensensibilität ⁽²⁶⁾, ⁽¹⁴⁹⁾. Diese Ergebnisse weisen Ähnlichkeiten mit unseren auf, dahingehend, dass auch wir nach Transportstress eine Phase erhöhter GC-Werte beobachten, die sich über die Zeit normalisieren und anschließend eine reduzierte HPA-Achsenantwort nach akutem Stress zu beobachten ist. In den oben erwähnten Experimenten von Belda et al. wird die verminderte HPA-Achsenreaktivität einer reduzierten CRF-mRNA Expression zugeschrieben. Diese Verminderung der CRF-mRNA Expression trat jedoch nur auf, wenn die Ratten 4 Wochen nach der ersten Stressexposition reexponiert wurden; nicht aber bei früheren Reexpositionszeitpunkten ⁽²⁶⁾.

In Anlehnung an diese Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass der Transport von Tieren ebenfalls zu einer erhöhten Aktivität der HPA-Achse für etwa 3 Wochen aufgrund einer zentralen Sensibilisierung von CRF-Neuronen im PVN führt, gefolgt von einer Phase reduzierter CRF-Ausschüttung 4 Wochen nach Transportstress, während ein akut stress-induzierter Anstieg der GC verhindert wird.

Auch von monoaminergen Signalwegen ist bekannt, dass sie in der Lage sind, die Aktivität der HPA-Achse besonders im Gehirn zu modifizieren. So sind z.B. Katecholamine in der Lage, die HPA-Achse durch vermehrte Ausschüttung von CRF und ACTH zu aktivieren ⁽³⁴⁴⁾, ⁽³⁴⁵⁾, ⁽³⁴⁶⁾, ⁽³⁴⁷⁾.

In unseren Experimenten zeigte sich, wie oben beschrieben, dass eine Reserpin-induzierte Depletion von Katecholaminen bei Mäusen aus der eigenen Zucht keinen Einfluss auf den akut stressinduzierten GC-Anstieg hatte. Transportierte Mäuse hingegen, die nicht in der Lage waren, eine adäquate GC-Antwort auf akuten Stress zu generieren, zeigten nach Gabe von Reserpin die erwartete Aktivierung der HPA-Achse mit Anstieg der GC im Plasma. Dies scheint darauf hinzudeuten, dass 4 Wochen nach Transportstress Monoamine die Aktivität der HPA-Achse inhibieren und somit an ihrer zentralen Desensibilisierung beteiligt sind.

Andere Autoren berichten hingegen von einer Stresssensibilisierung nach vermehrter Noradrenalinausschüttung ⁽³⁴²⁾. So kann als gesichert gelten, dass Katecholamine aus dem Nucleus tractus solitarius-PVN-Signalweg die Expression von CRF mRNA befördern, CRF ausschüttende Neurone aktivieren und somit zu einer verstärkten Ausschüttung von CRF in das hypophysäre, portalvenöse System führen ⁽³⁴⁸⁾. Schmidt

et al. wiederum beobachteten die bereits zuvor erwähnte morphologische Plastizität der noradrenergen Innervation des pPVN während der Sensibilisierung der HPA-Achse durch Stress oder IL-1 β (342). Dabei kam es zu einer herabgesetzten Dichte von DBH-positiven Neuronen, assoziiert mit einer verstärkten elektrisch-evozierten Ausschüttung von NA aus dem PVN.

Letztlich gibt es auch Daten, die einen inhibitorischen Effekt von Katecholaminen auf die Aktivität der HPA-Achse herausstellen. Verschiedene Autoren zeigen, dass es zu einer verminderten HPA-Achsenantwort kommt, wenn der noradrenerge Einfluss des Nucleus interstitialis (sog. „Bett-Kern“) der Stria terminalis (BNST) erhöht ist bzw. andersherum eine verstärkte HPA-Achsenaktivität bei verminderter noradrenerger Aktivität des BNST (346), (349). Dies zeigt, dass Katecholamine die stressinduzierte Aktivität der HPA-Achse auch hemmen können. Diese Hypothese wird weiter untermauert durch Ergebnisse von Radley et al., die zeigen konnten, dass durch die Läsion von noradrenergen Projektionen vom Nucleus coeruleus zum medialen präfrontalen Kortex in Ratten eine durch emotionalen Stress hervorgerufene ACTH-Ausschüttung verstärkt wird, die dann eine GC-Ausschüttung nach Immobilisationsstress stimuliert (350). In diesem Fall vermuten die Autoren, dass Noradrenalin nicht zu einer Aktivierung der HPA-Achse führt, sondern vielmehr eine Adaptation der Stressantwort bedingt, indem es die HPA-Achse herunter reguliert.

Zusätzlich konnte noch gezeigt werden, dass Noradrenalin in höheren Dosen im Gehirn, dosisabhängig in der Lage ist die CRF-Ausschüttung zu hemmen (347).

Trotz alledem sind weitere Studien nötig, um die genauen Effekte von Monoaminen auf den PVN und andere Kerne im Gehirn zu analysieren, um die Interaktion des SNS und der HPA-Achse im Stress besser zu verstehen.

Bei den hier gezeigten Ergebnissen vermuten wir, dass nach Transportstress inhibitorische noradrenerge Signalwege die akute stressinduzierte HPA-Achsenantwort beeinflussen, und dass die Depletion von Monoaminen durch Reserpin diese Blockade durchbricht und wieder eine „normale“ stressinduzierte GC-Ausschüttung erlaubt.

Abschließend können wir nicht vollständig abschätzen, in welchem Ausmaß die genetischen Variationen und das Aufwachsen in zwei völlig verschiedenen Umgebungen in den ersten 6 Lebenswochen die beobachteten Unterschiede zwischen den Tieren aus eigener Zucht und gekauften Tieren beeinflusst. Crabbe et al. beschrieben 1999, dass es keinen Unterschied macht, ob Mäuse verschiedener

Stämme selbst gezüchtet oder gekauft würden. Stattdessen zeigten sie, dass laborspezifische Unterschiede und Abweichungen in den verschiedenen Experimentalprotokollen Daten beeinflussen, genetische Unterschiede hingegen keinen signifikanten Einfluss auf den Phänotyp hätten ⁽³⁵¹⁾. Da unsere Experimente im selben Labor unter exakt gleichen Bedingungen stattfanden, nehmen wir an, dass eher der Transport als genetische oder laborspezifische Bedingungen ursächlich für die beobachteten Unterschiede in den zwei Gruppen ist.

Nach der kritischen Bewertung der präsentierten Ergebnisse wird deutlich, dass durch die Blockade des sympathischen Nervensystems mittels Reserpin kaum Einfluss auf akute Stresseffekte zu nehmen ist. Weder die bekannte Leuko- und Lymphozytopenie noch die erhöhte Darmpermeabilität sind verhinderbar. Infolgedessen bleiben auch der vermutlich durch translozierende Bakterien hervorgerufenen Anstieg der GC 6 Stunden nach Stressende und der Anstieg des Kynurenin als Zeichen einer erhöhtenIDO-Aktivität unbeeinflusst.

Desweiteren zeigen kommerziell erworbene, transportierte Mäuse keinen GC-Anstieg während akutem Stress als Zeichen einer veränderten zentralen HPA-Achsen-Sensibilität, da die Nebenniere in der Lage ist, auf exogen zugeführtes ACTH zu reagieren. Dieser verminderte GC-Anstieg ist mit einer erhöhten monoaminergen Aktivität vermutlich über inhibitorische, zentrale noradrenerge Signalwege assoziiert, da bei fehlender Sympathikusaktivierung die HPA-Achsenaktivierung zu beobachten ist.

Als Ursache für den Zusammenhang zwischen HPA-Achsenaktivierung und der frühen Zerstörung der Darmbarriere scheint, nach neueren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, ein CRF- und Mastzell-vermittelter Mechanismus verantwortlich zu sein.

Bereits Routinetätigkeiten wie der Transport von Mäusen haben also trotz Adaptionphase langfristig Einfluss auf Stressparameter.

Deshalb sollten Experimente mit Labortieren ausführlich geplant werden, um eventuelle Effekte einer veränderten HPA-Achsenaktivität zu vermeiden, die im schlimmsten Fall zu nicht vergleichbaren Ergebnissen führen.

7. Zusammenfassung

1. Akuter kombinierter akustischer und Immobilisationsstress führt im Mausmodell zu einer HPA-Achsenaktivierung mit Anstieg von Corticosteron im Plasma und transienter Leuko- und Lymphozytopenie, zur Aktivierung des sympathischen Nervensystems und zu Apoptosen des Epithels im terminalen Abschnitt des Ileums, mit vermutlich konsekutiver, bakterieller Translokation in die Blutbahn, die zu Veränderungen im Tryptophanmetabolismus, im Sinne einer Aktivierung der Indolamin-2,3-Dioxygenase führt.
2. Der Sympathikus interagiert bei der Reaktion des Organismus auf Stress eng mit der HPA-Achse und dem Magen-Darm-Trakt. Die HPA-Achse wiederum hat über CRF Einfluss auf die Integrität der Darmbarriere. Zusätzlich reguliert der Sympathikus direkt die Durchblutung und den Tonus des Darmes und hat Einfluss auf die lokale Immunität des Darmes.
3. Mit Hilfe des Ergotaminderivates Reserpin, das 24 Stunden nach subkutaner Applikation zu einem signifikanten und langanhaltenden Abfall des Noradrenalinspiegels im Plasma von sowohl gestressten als auch ungestressten BALB/c Mäusen führte, wurde der Einfluss des Sympathikus auf die stressinduzierten Veränderungen der HPA-Achse und Darmbarriere bewertet.
4. Ein Einfluss der Sympathikolyse auf die HPA-Achse konnte hierbei nicht gezeigt werden, da weder der stressinduzierte Anstieg des Corticosterons noch die Leuko- und Lymphozytopenie durch Reserpin verhindert werden konnten.
5. Einen weiteren, so vorher nicht bekannten, Corticosteron-Anstieg 8 Stunden nach Stressbeginn deuteten wir als durch bakterielle Translokation hervorgerufen. Da sich dieser Peak durch Reserpinbehandlung nicht aufheben ließ, scheint die stressinduzierte bakterielle Translokation durch Sympathikolyse nicht verhinderbar zu sein.

Bei genauerer Untersuchung der stressinduzierten Darmbarrierestörung anhand der fluoreszenzmikroskopischen Darstellung der Transsudation von Evans Blue in die Submukosa des Ileums und der durch mikrobielle Produkte hervorgerufenen systemischen Aktivierung der Indolamin-2,3-Dioxygenase, zeigte sich ebenfalls kein protektiver Effekt der Sympathikolyse.

- 6) Durch einen Zufallsbefund zeigte sich, dass weibliche BALB/c Mäuse, die 4 Wochen zuvor Transportstress ausgesetzt wurden, auf die akute Stresssituation mit

einer verminderten HPA-Achsenantwort und damit assoziierten fehlenden Darmbarrierestörung reagierten, obwohl sie am Ende der Adaptationsphase nur unwesentliche Unterschiede in den untersuchten Stressparametern Gewicht, Plasmacorticosteronkonzentration und Leuko- und Lymphozytenzahl aufwiesen. Diese langanhaltende, zentrale Abschwächung der HPA-Achsensensibilität wird vermutlich über adaptive, inhibitorische monoaminerge Signalwege reguliert, da bei fehlender Sympathikusaktivierung eine HPA-Achsenantwort zu beobachten ist.

7. Zusätzlich lassen die Ergebnisse einen Zusammenhang zwischen HPA-Achsenaktivierung und Darmbarrierestörung vermuten. Als Ursache hierfür erscheint ein CRF- und Mastzell-vermittelter Mechanismus wahrscheinlich.
8. Bereits Routinetätigkeiten wie der Transport von Labortieren beeinflussen basale Stressparameter langfristig und können dadurch die Vergleichbarkeit von Experimentalergebnissen kommerziell erworbener und selbst gezüchteter Mäuse stark einschränken.

8. Literaturverzeichnis

1. "Chrousos GP, "Loriaux LD, "Gold PW: The concept stress and its historical development. 1988, 3-7.
2. Korte SM KJ, Wingfield JC, McEwan BS: The darwian concept of stress:Benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Beh Rev* 2005, 29:3-38.
3. McEwen BS: Protection and damage from acute and chronic stress - allostasis and allostatic overload and relevance to the pathophysiology of psychiatric disorders. *Biobehavioral Stress Response: Protective and Damaging Effects* 2004, 1032:1-7.
4. "de Kloet ER: Hormones, brain and stress. *Endoc Reg* 2003(37):51-68.
5. Eskandari FE SE: Neural-immune interactions in health and disease. *Ann N Y Acad Sci* 2002, 966:20-27.
6. Berczi I: Neuroimmune biology- an introduction. *Neuroimmun Biol* 2001, 1:345-365.
7. Dowing JEG MJ: Neural immunoregulation: Emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immun Today* 2000, 21:281-289.
8. Johnson EO, Kamilaris TC, Chrousos GP, Gold PW: Mechanisms of stress - a dynamic overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neurosci Biobehav Rev* 1992, 16(2):115-130.
9. Selye H: A syndrome produced by diverse nocuous agents. . *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1936, 10(2):230-231.
10. "De Wied D: Pituitary-adrenal system hormones and behaviour. In: *Selye's guide to stress research*. Edited by H. S, vol. 1. New York: Van Nostrand Reinhold; 1980: 252-279.
11. Ader R, Cohen N: Psychoneuroimmunology - conditioning and stress. *Annu Rev Psychol* 1993, 44:53-85.
12. Suresh PS, Doureradjou P, Nandakumar DN, Koner BC: Effect of restraint stress duration on humoral immune response in albino rats: Modulation by chlordiazepoxide. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2008, 30(4):701-709.
13. "Cannon W, "Newton H, "Bright E, "Menkin V, "Moore R: Some aspects of the physiology of animals surviving complete exclusion of sympathetic nerve impulses". *Am J Physiol* 1929:84-107.
14. "Levine S: Maternal and enviromental influences an the adrenocortical response to stress in weaning rats. *Science* 1967(156):258-260.

15. Mason JW: A review of psychoendocrine research on sympathetic-adrenal medullary system. *Psychosomatic Medicine* 1968, 30(5P2):631-&.
16. Dhabhar FS, McEwen BS: Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: A potential role for leukocyte trafficking. *Brain Behav Immun* 1997, 11(4):286-306.
17. Dhabhar FS, McEwen BS: Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, 96(3):1059-1064.
18. Milan S G-QM, Giordano M, Soto I; Martin AI, Lopez-Calderon A: Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions *Life Sci* 1996, 59:1431-1442.
19. "Selye H: The general adaptation syndrome and the disease of adaptation. *Practitioner* 1949, 163:393-405.
20. Wrona D: Neural-immune interactions: An integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *Journal of Neuroimmunology* 2006, 172(1-2):38-58.
21. McEwen BS: Glucocorticoids, depression, and mood disorders: Structural remodeling in the brain. *Metab-Clin Exp* 2005, 54(5):20-23.
22. Heim C, Newport DJ, Mletzko T, Miller AH, Hemeroff CB: The link between childhood trauma and depression: Insights from hpa axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 2008, 33(6):693-710.
23. Rosenblum LA: A mothers work is never done - foraging demands and mother-infant relations in primates. *American Journal of Primatology* 1986, 10(4):426-426.
24. Rosenblum LA, Coplan JD, Friedman S, Bassoff T, Gorman JM, Andrews MW: Adverse early experiences affect noradrenergic and serotonergic functioning in adult primates. *Biological Psychiatry* 1994, 35(4):221-227.
25. Smith ELP, Coplan JD, Trost RC, Scharf BA, Rosenblum LA: Neurobiological alterations in adult nonhuman primates exposed to unpredictable early rearing - relevance to posttraumatic stress disorder. *Psychobiology of Posttraumatic Stress Disorder* 1997, 821:545-548.
26. Belda X, Fuentes S, Nadal R, Armario A: A single exposure to immobilization causes long-lasting pituitary-adrenal and behavioral sensitization to mild stressors. *Horm Behav* 2008, 54(5):654-661.
27. Valles A, Marti O, Armario A: Long-term effects of a single exposure to immobilization stress on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Transcriptional evidence for a progressive desensitization process. *European Journal of Neuroscience* 2003, 18(6):1353-1361.

28. Edwards KM, Burns VE, Reynolds T, Carroll D, Drayson M, Ring C: Acute stress exposure prior to influenza vaccination enhances antibody response in women. *Brain Behav Immun* 2006, 20(2):159-168.
29. Kemeny ME, Schedlowski M: Understanding the interaction between psychosocial stress and immune-related diseases: A stepwise progression. *Brain Behav Immun* 2007, 21(8):1009-1018.
30. "Bohus B, "DeKloet E, "Veldhuis H: Adrenalsteroids and behavioral adaptation: Relationship to brain corticoid receptors. *Progress in Neuroendocrinology* 1983, 2.
31. Teague CR, Dhabhar FS, Barton RH, Beckwith-Hall B, Powell J, Cobain M, Singer B, McEwen BS, Lindon JC, Nicholson JK *et al*: Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in sprague-dawley rats. *J Proteome Res* 2007, 6(6):2080-2093.
32. Silberman DM, Wald MR, Genaro AM: Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of t-lymphocyte reactivity. *Journal of Neuroimmunology* 2003, 144(1-2):53-60.
33. Kiank C, Holtfreter B, Starke A, Mundt A, Wilke C, Schutt C: Stress susceptibility predicts the severity of immune depression and the failure to combat bacterial infections in chronically stressed mice. *Brain Behav Immun* 2006, 20(4):359-368.
34. Kiank C, Entleutner M, Furll B, Westerholt A, Heidecke CD, Schutt C: Stress-induced immune conditioning affects the course of experimental peritonitis. *Shock* 2007, 27(3):305-311.
35. Kiank C, Koerner P, Kessler W, Traeger T, Maier S, Heidecke CD, Schuett C: Seasonal variations in inflammatory responses to sepsis and stress in mice. *Critical Care Medicine* 2007, 35:2352-2358.
36. Kiank C, Daeschlein G, Schuett C: Pneumonia as a long-term consequence of chronic psychological stress in balb/c mice. *Brain Behav Immun* 2008, 22(8):1173-1177.
37. Freeman ML, Sheridan BS, Bonneau RH, Hendricks RL: Psychological stress compromises cd8(+) t cell control of latent herpes simplex virus type 1 infections. *Journal of Immunology* 2007, 179(1):322-328.
38. Christian LM, Graham JE, Padgett DA, Glaser R, Kiecolt-Glaser JK: Stress and wound healing. *Neuroimmunomodulation* 2006, 13(5-6):337-346.
39. Glaser R, Kiecolt-Glaser JK: Science and society - stress-induced immune dysfunction: Implications for health. *Nat Rev Immunol* 2005, 5(3):243-251.

40. Rhen T, Cidlowski JA: Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs. *New England Journal of Medicine* 2005, 353(16):1711-1723.
41. Miller GE, Cohen S, Ritchey AK: Chronic psychological stress and the regulation of pro-inflammatory cytokines: A glucocorticoid-resistance model. *Health Psychology* 2002, 21(6):531-541.
42. Kovalovsky D, Refojo D, Holsboer F, Arzt E: Molecular mechanisms and th1/th2 pathways in corticosteroid regulation of cytokine production. *Journal of Neuroimmunology* 2000, 109(1):23-29.
43. Amsterdam A, Sasson R: The anti-inflammatory action of glucocorticoids is mediated by cell type specific regulation of apoptosis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002, 189(1-2):PII S0303-7207(0301)00722-00725.
44. Amsterdam A, Tajima K, Sasson R: Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: Implication to their anti-inflammatory action. *Biochemical Pharmacology* 2002, 64(5-6):PII S0006-2952(0002)01147-01144.
45. Edgar VA, Silberman DM, Cremaschi GA, Zieher LM, Genaro AM: Altered lymphocyte catecholamine reactivity in mice subjected to chronic mild stress. *Biochemical Pharmacology* 2003, 65(1):PII S0006-2952(0002)01457-01450.
46. Prass K, Meisel C, Hoflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U *et al*: Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke t helper cell type 1-like immunostimulation. *Journal of Experimental Medicine* 2003, 198(5):725-736.
47. Lundberg U: Stress hormones in health and illness: The roles of work and gender. In: *Meeting on Somatisation, Sensitisation and Psychosomatic Medicine held in honor of Holger Ursin: Jun 02-04 2004; Bergen, NORWAY*: Pergamon-Elsevier Science Ltd; 2004: 1017-1021.
48. Brunner EJ, Hemingway H, Walker BR, Page M, Clarke P, Juneja M, Shipley MJ, Kumari M, Andrew R, Seckl JR *et al*: Adrenocortical, autonomic, and inflammatory causes of the metabolic syndrome - nested case-control study. *Circulation* 2002, 106(21):2659-2665.
49. Hess WR, Akert K: Experimental data on role of hypothalamus in mechanism of emotional behavior. *Archives of Neurology and Psychiatry* 1955, 73(FEB):127-129.
50. Johnson SA, Fournier NM, Kalynchuk LE: Effect of different doses of corticosterone on depression-like behavior and hpa axis responses to a novel stressor. *Behav Brain Res* 2006, 168(2):280-288.
51. Coplan JD, Pine D, Papp L, Martinez J, Cooper T, Rosenblum LA, Gorman JM: Uncoupling of the noradrenergic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis in panic disorder patients. *Neuropsychopharmacology* 1995, 13(1):65-73.

52. WHO: Work, organisation and stress. In.; 2004.
53. Eskandari FE WJ, Sternberg EM, : Neuronal immune pathways and their connection to inflammatory disease. *Arthritis Res Ter* 2003, 5:251-265.
54. Roozendaal B, Williams CL, McGaugh JL: Glucocorticoid receptor activation in the rat nucleus of the solitary tract facilitates memory consolidation: Involvement of the basolateral amygdala. *European Journal of Neuroscience* 1999, 11(4):1317-1323.
55. Rowe JW, Troen BR: Sympathetic nervous system and aging in man. *Endocr Rev* 1980, 1(2):167-179.
56. "Siegel G, "Agranoff B, "Albers R, "Fisher S, "Uhler M: Basic neurochemistry. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins; 1999.
57. Perlman RL, Chalfie M: Catecholamine release from adrenal-medulla. *Clinics in Endocrinology and Metabolism* 1977, 6(3):551-576.
58. Sanders VM: Adrenergic receptors on t and b lymphocytes: Evidence, function, and clinical implications. *Clinical Neuroscience Research* 2006, 6(1-2):34-41.
59. Ramer-Quinn DS, Swanson MA, Lee WT, Sanders VM: Cytokine production by naive and primary effector cd4(+) t cells exposed to norepinephrine. *Brain Behav Immun* 2000, 14(4):239-255.
60. Johnson JD, O'Connor KA, Deak T, Spencer RL, Watkins LR, Maier SF: Prior stressor exposure primes the hpa axis. *Psychoneuroendocrinology* 2002, 27(3):353-365.
61. Sanders VM, Straub RH: Norepinephrine, the beta-adrenergic receptor, and immunity. *Brain Behav Immun* 2002, 16(4):290-332.
62. Schauenstein K, Felsner P, Rinner I, Liebmann PM, Stevenson JR, Westermann J, Haas HS, Cohen RL, Chambers DA: In vivo immunomodulation by peripheral adrenergic and cholinergic agonists/antagonists in rat and mouse models. *Neuroimmunomodulation* 2000, 917:618-627.
63. Stevenson JR, Westermann J, Liebmann PM, Hortner M, Rinner I, Felsner P, Wolfler A, Schauenstein K: Prolonged alpha-adrenergic stimulation causes changes in leukocyte distribution and lymphocyte apoptosis in the rat. *Journal of Neuroimmunology* 2001, 120(1-2):50-57.
64. Mignini F, Streccioni V, Amenta F: Autonomic innervation of immune organs and neuroimmune modulation. *Autonomic & Autacoid Pharmacology* 2003, 23(1):1-25.
65. Ader R, Cohen N, Felten D: Psychoneuroimmunology - interactions between the nervous-system and the immune-system. *Lancet* 1995, 345(8942):99-103.

66. Dhabhar FS: Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann N Y Acad Sci* 2000, 917:876-893.
67. Jarillo-Luna A, Rivera-Aguilar V, Martinez-Carrillo BE, Barbosa-Cabrera E, Garfias HR, Campos-Rodriguez R: Effect of restraint stress on the population of intestinal intraepithelial lymphocytes in mice. *Brain Behav Immun* 2008, 22(2):265-275.
68. Salicru AN, Sams CF, Marshall GD: Cooperative effects of corticosteroids and catecholamines upon immune deviation of the type-1/type-2 cytokine balance in favor of type-2 expression in human peripheral blood mononuclear cells. *Brain Behav Immun* 2007, 21(7):913-920.
69. Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang M, Sarma JV, Ward PA: Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? *Mol Med* 2008, 14(3-4):195-204.
70. Besedovsky H, Delrey A, Sorkin E, Dinarello CA: Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science* 1986, 233(4764):652-654.
71. Ando T, Dunn AJ: Mouse tumor necrosis factor-alpha increases brain tryptophan concentrations and norepinephrine metabolism while activating the hpa axis in mice. *Neuroimmunomodulation* 1999, 6(5):319-329.
72. Ramer-Quinn DS, Baker RA, Sanders VM: Activated t helper 1 and t helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor - a mechanism for selective modulation of t helper 1 cell cytokine production. *Journal of Immunology* 1997, 159(10):4857-4867.
73. Gage JR, Fonarow G, Hamilton M, Widawski M, Martinez-Maza O, Vredevoe DL: Beta blocker and angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy is associated with decreased th1/th2 cytokine ratios and inflammatory cytokine production in patients with chronic heart failure. *Neuroimmunomodulation* 2004, 11(3):173-180.
74. Exton MS, Gierse C, Meier B, Mosen M, Xie YF, Frede S, Goebel MU, Limmroth V, Schedlowski M: Behaviorally conditioned immunosuppression in the rat is regulated via noradrenaline and beta-adrenoceptors. *Journal of Neuroimmunology* 2002, 131(1-2):PII S0165-5728(0102)00249-00247.
75. Kees MG, Pongratz G, Kees F, Scholmerich R, Straub RH: Via beta-adrenoceptors, stimulation of extrasplenic sympathetic nerve fibers inhibits lipopolysaccharide-induced tnf secretion in perfused rat spleen. *Journal of Neuroimmunology* 2003, 145(1-2):77-85.
76. Blalock JE, Bost KL, Smith EM: Neuro-endocrine peptide-hormones and their receptors in the immune-system - production, processing and action. *Journal of Neuroimmunology* 1985, 10(1):31-40.

77. Wang H, Yu M, Ochani M, Amella CA, Tanovic M, Susarla S, Li JH, Wang HC, Yang H, Ulloa L *et al*: Nicotinic acetylcholine receptor alpha 7 subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature* 2003, 421(6921):384-388.
78. Tracey KJ: The inflammatory reflex. *Nature* 2002, 420(6917):853-859.
79. Mutschler G, Kroemer, Ruth, Schäfer-Korting: Mutschler arzneimittelwirkungen. In. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 2008: 357.
80. Brunton LL LJ, Parker KL: Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 11 edn: McGraw-Hill Professional; 2005.
81. Dhein S, Van Koppen CJ, Brodde OE: Muscarinic receptors in the mammalian heart. *Pharmacol Res* 2001, 44(3):161-182.
82. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang MH, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang HC, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ: Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 2000, 405(6785):458-462.
83. Saeed RW, Varma S, Peng-Nemeroff T, Sherry B, Balakhaneh D, Huston J, Tracey KJ, Al-Abed Y, Metz CN: Cholinergic stimulation blocks endothelial cell activation and leukocyte recruitment during inflammation. *Journal of Experimental Medicine* 2005, 201(7):1113-1123.
84. Cohen S: Purification of a nerve-growth promoting protein from the mouse salivary gland and its neuro-cytotoxic antiserum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960, 46(3):302-311.
85. Levimontalcini R, Booker B: Destruction of the sympathetic ganglia in mammals by an antiserum to a nerve-growth protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1960, 46(3):384-391.
86. "Steiner G, "Schonbaum E: Immunosympathectomy. Amsterdam: Elsevier; 1972.
87. "Wiley R, "Lappi D: Preparation of anti-neuronal immunotoxins for selective neural immunolesioning. Amsterdam: Elsevier; 1994.
88. Wiley RG: Targeting toxins to neural antigens and receptors. *Semin Cancer Biol* 1996, 7(2):71-77.
89. Rossner S P-PJ, Wiley RG, Schliebs R, Bigl V.: Differential expression of immediate early genes in distinct layers of rat cerebral cortex after selective immunolesion of the forebrain cholinergic system. *J Neurosci Res* 1994, 38(3):282-293.
90. Waite JJ WM, Chen AC, Lappi DA, Wiley RG, Thal LJ.: Time course of cholinergic and monoaminergic changes in rat brain after immunolesioning with 192 igg-saporin. *Neurosci Lett* 1994, 169(1-2):154-158.

91. Picklo MJ, Wiley RG, Lappi DA, Robertson D: Noradrenergic lesioning with an anti-dopamine beta-hydroxylase immunotoxin. *Brain Res* 1994, 666(2):195-200.
92. Wrenn CC, Picklo MJ, Lappi DA, Robertson D, Wiley RG: Central noradrenergic lesioning using anti-dbh-saporin: Anatomical findings. *Brain Res* 1996, 740(1-2):175-184.
93. Johnson EM Jr OBF, Werbitt R.: Modification and characterization of the permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats. *Eur J Pharmacol* 1976, 37(1):45-54.
94. Schmidt RE, Summerfield AL, Hickey WF: Ultrastructural and immunohistologic characterization of guanethidine-induced destruction of peripheral sympathetic neurons. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1990, 49(2):150-167.
95. Krukoff TL FM, Vincent DH.: Effects of neonatal sympathectomy with 6-hydroxydopamine or guanethidine on survival of neurons in the intermediolateral cell column of rat spinal cord. *J Auton Nerv Syst* 1990, 31(2):119-126.
96. Eranko O, Hopsu V: Effect of reserpine on the histochemistry and content of adrenaline and noradrenaline in the adrenal medulla of the rat and the mouse. *Endocrinology* 1958, 62(1):15-23.
97. Stitzel RE: Biological fate of reserpine. *Pharmacological Reviews* 1976, 28(3):179-205.
98. Pinon M, Racotta IS, Ortiz-Butron R, Racotta R: Catecholamines in paraganglia associated with the hepatic branch of the vagus nerve: Effects of 6-hydroxydopamine and reserpine. *J Auton Nerv Syst* 1999, 75(2-3):131-135.
99. Iversen LL, Glowinsk.J, Axelrod J: Uptake and storage of h3-norepinephrine in reserpine-pretreated rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 1965, 150(2):173-&.
100. Iversen LL, Dechampl.J, Glowinsk.J, Axelrod J: Uptake storage and metabolism of norepinephrine in tissues of developing rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1967, 157(3):509-&.
101. Taki N, Tanaka T, Zhang L, Suzuki F, Israilova M, Taniguchi T, Hiraizumi-Hiraoka Y, Shinozuka K, Kunitomo M, Muramatsu I: Alpha-1d adrenoceptors are involved in reserpine-induced supersensitivity of rat tail artery. *Br J Pharmacol* 2004, 142(4):647-656.
102. Stewart JJ, Jobe PC: Effects of reserpine on monoamines and intestinal transit in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1981, 217(2):357-362.
103. Ponzio F, Achilli G, Calderini G, Ferretti P, Perego C, Toffano G, Algeri S: Depletion and recovery of neuronal monoamine storage in rats of different ages treated with reserpine. *Neurobiology of Aging* 1984, 5(2):101-104.

104. Tang F: Effect of reserpine on catecholamine contents and met-enkephalin and beta-endorphin levels in the hypothalamus and the pituitary. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1991, 18(6):425-429.
105. Yamaguchi M, Yoshitake T, Fujino K, Kawano K, Kehr J, Ishida J: Determination of norepinephrine in microdialysis samples by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. *Analytical Biochemistry* 1999, 270(2):296-302.
106. Kannari K, Tanaka H, Maeda T, Tomiyama M, Suda T, Matsunaga M: Reserpine pretreatment prevents increases in extracellular striatal dopamine following l-dopa administration in rats with nigrostriatal denervation. *Journal of Neurochemistry* 2000, 74(1):263-269.
107. Mutschler E GG, Kroemer H.K, Ruth P, Schäfer-Korting M: Arzneimittelwirkungen kompakt. In., vol. 1. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH; 2005: 168.
108. Sreemantula S, Boini KM, Nammi S: Reserpine methonitrate, a novel quaternary analogue of reserpine augments urinary excretion of vma and 5-hiaa without affecting hva in rats. *BMC Pharmacol* 2004, 4:30.
109. Moffat, Osselton, Widdop: Clarke's analysis of drugs and poisons. In. Bath: Galichet; 2004: 1531-1532.
110. Carlsson A, Hillarp NA, Waldeck B: Analysis of mg -atp dependent storage mechanism in amine granules of adrenal medulla. *Acta Physiologica Scandinavica* 1963, 59:5-&.
111. Haggenda.J, Dahlstro.A: Recovery of noradrenaline in adrenergic nerve terminals of rat after reserpine treatment. *J Pharm Pharmacol* 1971, 23(2):81-&.
112. Verspohl: Neuroleptika. In: *Arzneimittelneben- und wechselwirkungen*. Edited by Ammon. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft; 1991: 255.
113. Kisin I, Yuzhakov S: Effects of reserpine, guanethidine and methyldopa on cardiac-output and its distribution. *Eur J Pharmacol* 1976, 35(2):253-260.
114. Szelenyi J, Vizi ES: The catecholamine cytokine balance: Interaction between the brain and the immune system. *Ann N Y Acad Sci* 2007, 1113:311-324.
115. Asanami S, Shimono K: Hypothermia induces micronuclei in mouse bone marrow cells. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 1997, 393(1-2):91-98.
116. Bao S, Fei J, Shen J, Gong S, Fang H, Husband A: Reserpine-induced model of stress suppresses mucosal immunity. *Immunol Cell Biol* 2006, 84(6):537-542.

117. Carvalho R, Patti C, Takatsu-Coleman A, Kameda S, Souza C, Garcez-do-Carmo L, Abílio V, Frussa-Filho R, Silva R: Effects of reserpine on the plus-maze discriminative avoidance task: Dissociation between memory and motor impairments. *Brain Res* 2006, 1122(1):179-183.
118. Chesswilliams RG, Grassby PF, Broadley KJ, Sheridan DJ: Cardiac alpha-adrenoceptor and beta-adrenoceptor sensitivity and binding characteristics after chronic reserpine pretreatment. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1987, 336(6):646-651.
119. LaBuda CJ, Fuchs PN: Catecholamine depletion by reserpine blocks the anxiolytic actions of ethanol in the rat. *Alcohol* 2002, 26(1):55-59.
120. Neisewander J, Castañeda E, Davis D: Dose-dependent differences in the development of reserpine-induced oral dyskinesia in rats: Support for a model of tardive dyskinesia. *Psychopharmacology (Berl)* 1994, 116(1):79-84.
121. O'leary O, Bechtholt A, Crowley J, Hill T, Page M, Lucki I: Depletion of serotonin and catecholamines block the acute behavioral response to different classes of antidepressant drugs in the mouse tail suspension test. *Psychopharmacology (Berl)* 2007.
122. Silva R, Abílio V, Torres-Leite D, Bergamo M, Chinen C, Claro F, Carvalho RC, Frussa-Filho R: Concomitant development of oral dyskinesia and memory deficits in reserpine-treated male and female mice. *Behav Brain Res* 2002, 132(2):171-177.
123. Van Craenenbroeck K, De Bosscher K, Vanden Berghe W, Vanhoenacker P, Haegeman G: Role of glucocorticoids in dopamine-related neuropsychiatric disorders. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2005, 245(1-2):10-22.
124. De Bosscher K, Van Craenenbroeck K, Meijer OC, Haegeman G: Selective transrepression versus transactivation mechanisms by glucocorticoid receptor modulators in stress and immune systems. *Eur J Pharmacol* 2008, 583(2-3):290-302.
125. Gupta S, Aslakson E, Gurbaxani BM, Vernon SD: Inclusion of the glucocorticoid receptor in a hypothalamic pituitary adrenal axis model reveals bistability. *Theor Biol Med Model* 2007, 4:8.
126. Palme R, Rettenbacher S, Touma C, El-Bahr SM, Mostl E: Stress hormones in mammals and birds - comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Trends in Comparative Endocrinology and Neurobiology* 2005, 1040:162-171.
127. Leonard BE: The hpa and immune axes in stress: The involvement of the serotonergic system. *European Psychiatry* 2005, 20:S302-S306.
128. Turnbull AV, Rivier C: Regulation of the hpa axis by cytokines. *Brain Behav Immun* 1995, 9(4):253-275.

129. Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander MM, Choi DC, Cullinan WE: Central mechanisms of stress integration: Hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Frontiers in Neuroendocrinology* 2003, 24(3):151-180.
130. Takao T, Culp SG, Desouza EB: Reciprocal modulation of interleukin-1-beta (il-1-beta) and il-1 receptors by lipopolysaccharide (endotoxin) treatment in the mouse brain-endocrine-immune axis. *Endocrinology* 1993, 132(4):1497-1504.
131. Turnbull AV, Lee S, Rivier C: Mechanisms of hypothalamic-pituitary-adrenal axis stimulation by immune signals in the adult rat. *Ann N Y Acad Sci* 1998, 840:434-443.
132. Spathschwalbe E, Born J, Schrezenmeier H, Borstein SR, Stromeyer P, Drechsler S, Fehm HL, Porzsolt F: Interleukin-6 stimulates the hypothalamus-pituitary-adrenocortical axis in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1994, 79(4):1212-1214.
133. Mastorakos G, Chrousos GP, Weber JS: Recombinant interleukin-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. *J Clin Endocrinol Metab* 1993, 77(6):1690-1694.
134. Yu S, Holsboer F, Almeida OFX: Neuronal actions of glucocorticoids: Focus on depression. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 2008, 108(3-5):300-309.
135. Maletic V, Robinson M, Oakes T, Iyengar S, Ball SG, Russell J: Neurobiology of depression: An integrated view of key findings. *International Journal of Clinical Practice* 2007, 61:2030-2040.
136. Brandon DD, Markwick AJ, Chrousos GP, Loriaux DL: Glucocorticoid resistance in humans and nonhuman-primates. *Cancer Research* 1989, 49(8):S2203-S2213.
137. Lowy MT, Reder AT, Antel JP, Meltzer HY: Glucocorticoid resistance in depression - the dexamethasone suppression test and lymphocyte sensitivity to dexamethasone. *American Journal of Psychiatry* 1984, 141(11):1365-1370.
138. McKay LI, Cidlowski JA: Cross-talk between nuclear factor-kappa b and the steroid hormone receptors: Mechanisms of mutual antagonism. *Molecular Endocrinology* 1998, 12(1):45-56.
139. Pavlides C, McEwen BS: Effects of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors on long-term potentiation in the ca3 hippocampal field. *Brain Res* 1999, 851(1-2):204-214.
140. Buttgereit F, Scheffold A: Rapid glucocorticoid effects on immune cells. In: *2nd International Meeting on Rapid Responses to Steroid Hormones: Jun 16-18 2001; Denver, Colorado: Elsevier Science Inc; 2001: 529-534.*

141. Herold MJ, McPherson KG, Reichardt HM: Glucocorticoids in t cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 2006, 63(1):60-72.
142. Engler H, Stefanski V: Social stress and t cell maturation in male rats: Transient and persistent alterations in thymic function. *Psychoneuroendocrinology* 2003, 28(8):951-969.
143. Davis AK, Maney DL, Maerz JC: The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: A review for ecologists. *Funct Ecol* 2008, 22(5):760-772.
144. Zhang DL, Kishihara K, Wang B, Mizobe K, Kubo C, Nomoto K: Restraint stress-induced immunosuppression by inhibiting leukocyte migration and th1 cytokine expression during the intraperitoneal infection of listeria monocytogenes. *Journal of Neuroimmunology* 1998, 92(1-2):139-151.
145. Viswanathan K, Dhabhar FS: Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(16):5808-5813.
146. Dhabhar FS: Stress-induced augmentation of immune function--the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. *Brain Behav Immun* 2002, 16(6):785-798.
147. Lightman SL: The neuroendocrinology of stress: A never ending story. *Journal of Neuroendocrinology* 2008, 20(6):880-884.
148. Droste SK, de Groote L, Lightman SL, Reul JM, Linthorst ACE: The ultradian and circadian rhythms of free corticosterone in the brain are not affected by gender: An in vivo microdialysis study in wistar rats. *J Neuroendocrinol* 2009, 21(2):132-140.
149. Armario A, Escorihuela RM, Nadal R: Long-term neuroendocrine and behavioural effects of a single exposure to stress in adult animals. *Neurosci Biobehav Rev* 2008, 32(6):1121-1135.
150. Belda X, Rotllant D, Fuentes S, Delgado R, Nadal R, Armario A: Exposure to severe stressors causes long-lasting dysregulation of resting and stress-induced activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Ann N Y Acad Sci* 2008, 1148:165-173.
151. Marti O, Garcia A, Velles A, Harbuz MS, Armario A: Evidence that a single exposure to aversive stimuli triggers long-lasting effects in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis that consolidate with time. *European Journal of Neuroscience* 2001, 13(1):129-136.
152. Belda X, Marquez C, Armario A: Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: Comparison of two outbred rat strains. *Behav Brain Res* 2004, 154(2):399-408.

153. Vandijken HH, Degoeij DCE, Sutanto W, Mos J, Dekloet E, Tilders FJH: Short inescapable stress produces long-lasting changes in the brain-pituitary-adrenal axis of adult male-rats. *Neuroendocrinology* 1993, 58(1):57-64.
154. Crochemore C, Lu J, Wu Y, Liposits Z, Sousa N, Holsboer F, Almeida OFX: Direct targeting of hippocampal neurons for apoptosis by glucocorticoids is reversible by mineralocorticoid receptor activation. *Molecular Psychiatry* 2005, 10(8):790-798.
155. Pavlides C, Kimura A, Magarinos AM, McEwen BS: Hippocampal homosynaptic long-term depression depotentiation induced by adrenal-steroids. *Neuroscience* 1995, 68(2):379-385.
156. Roy M, Sapolsky RM: The exacerbation of hippocampal excitotoxicity by glucocorticoids is not mediated by apoptosis. *Neuroendocrinology* 2003, 77(1):24-31.
157. Wolf OT: The influence of stress hormones on emotional memory: Relevance for psychopathology. *Acta Psychol* 2008, 127(3):513-531.
158. Radley JJ, Morrison JH: Repeated stress and structural plasticity in the brain. *Ageing Res Rev* 2005, 4(2):271-287.
159. Harvey BH, Naciti C, Brand L, Stein DJ: Endocrine, cognitive and hippocampal/cortical 5ht(1a/2a) receptor changes evoked by a time-dependent sensitisation (tds) stress model in rats. *Brain Res* 2003, 983(1-2):97-107.
160. Saphier D: Electrophysiology and neuropharmacology of noradrenergic projections to rat pvn magnocellular neurons. *American Journal of Physiology* 1993, 264(5):R891-R902.
161. Valentino RJ, Foote SL, Astonjones G: Corticotropin-releasing factor activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res* 1983, 270(2):363-367.
162. Valentino RJ, Foote SL, Page ME: The locus-coeruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. *Corticotropin-Releasing Factor and Cytokines: Role in the Stress Response* 1993, 697:173-188.
163. Liposits Z: Ultrastructure of hypothalamic paraventricular neurons. *Critical Reviews in Neurobiology* 1993, 7(2):89-162.
164. Pacak K, Kvetnansky R, Palkovits M, Fukuhara K, Yadid G, Kopin IJ, Goldstein DS: Adrenalectomy augments in-vivo release of norepinephrine in the paraventricular nucleus during immobilization stress. *Endocrinology* 1993, 133(3):1404-1410.
165. Sawchenko PE, Swanson LW: The organization of noradrenergic pathways from the brain-stem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Research Reviews* 1982, 4(3):275-325.

166. Swanson LW, Sawchenko PE, Berod A, Hartman BK, Helle KB, Vanorden DE: An immunohistochemical study of the organization of catecholaminergic cells and terminal fields in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus. *Journal of Comparative Neurology* 1981, 196(2):271-285.
167. Chrousos GP, Gold PW: The concepts of stress and stress system disorders - overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1992, 267(9):1244-1252.
168. Valentino RJ, Page M, Vanbockstaele E, Astonjones G: Corticotropin-releasing factor innervation of the locus-coeruleus region - distribution of fibers and sources of input. *Neuroscience* 1992, 48(3):689-705.
169. Van Bockstaele EJ, Colago EEO, Valentino RJ: Amygdaloid corticotropin-releasing factor targets locus coeruleus dendrites: Substrate for the coordination of emotional and cognitive limbs of the stress response. *Journal of Neuroendocrinology* 1998, 10(10):743-757.
170. Van Bockstaele EJ, Bajic D, Proudfit H, Valentino RJ: Topographic architecture of stress-related pathways targeting the noradrenergic locus coeruleus. *Physiology & Behavior* 2001, 73(3):273-283.
171. Ma S, Morilak DA: Norepinephrine release in medial amygdala facilitates activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to acute immobilisation stress. *Journal of Neuroendocrinology* 2005, 17(1):22-28.
172. Dunn AJ, Swiergiel AH: The role of corticotropin-releasing factor and noradrenaline in stress-related responses, and the inter-relationships between the two systems. *Eur J Pharmacol* 2008, 583(2-3):186-193.
173. Kalavantavanich K, Schramm CM: Dexamethasone potentiates high-affinity beta-agonist binding and g(s)alpha protein expression in airway smooth muscle. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 2000, 278(5):L1101-L1106.
174. Aksoy MO, Mardini IA, Yang Y, Bin W, Zhou SW, Kelsen SG: Glucocorticoid effects on the beta-adrenergic receptor-adenylyl cyclase system of human airway epithelium. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2002, 109(3):491-497.
175. Mak JCW, Nishikawa M, Shirasaki H, Miyayasu K, Barnes PJ: Protective effects of a glucocorticoid on down-regulation of pulmonary beta(2)-adrenergic receptors in-vivo. *Journal of Clinical Investigation* 1995, 96(1):99-106.
176. Baus E, Van Laethem F, Andris F, Rolin S, Urbain J, Leo O: Dexamethasone increases intracellular cyclic amp concentration in murine t lymphocyte cell lines. *Steroids* 2001, 66(1):39-47.
177. Straub RH, Gunzler C, Miller LE, Cutolo M, Scholmerich J, Schill S: Anti-inflammatory cooperativity of corticosteroids and norepinephrine in rheumatoid arthritis synovial tissue in vivo and in vitro. *Faseb J* 2002, 16(9):993-1000.

178. Jarillo-Luna A, Rivera-Aguilar V, Garfias HR, Lara-Padilla E, Kormanovsky A, Campos-Rodriguez R: Effect of repeated restraint stress on the levels of intestinal iga in mice. *Psychoneuroendocrinology* 2007, 32(6):681-692.
179. Bueno L: Neuroimmune alterations of ens functioning. *Gut* 2000, 47:63-65.
180. Tache Y, Brunnhuber S: From hans selye's discovery of biological stress to the identification of corticotropin-releasing factor signaling pathways. In: *9th Symposium on Catecholamines and Other Neurotransmittere in Stress: Jun 16-21 2007; Bethesda, MD*: Blackwell Publishing; 2007: 29-41.
181. Tache Y, Perdue MH: Role of peripheral crf signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterology and Motility* 2004, 16:137-142.
182. Tache Y, Yuan P, Gourceral G: Stress related regulation of gastric motility by corticotropin releasing factor (crf) receptor: Sites and mechanisms of action. *Neurogastroenterology and Motility* 2007, 19:10-10.
183. Maunder RG: Evidence that stress contributes to inflammatory bowel disease: Evaluation, synthesis, and future directions. *Inflammatory Bowel Diseases* 2005, 11(6):600-608.
184. Mawdsley JE, Rampton DS: Psychological stress in ibd: New insights into pathogenic and therapeutic implications. *Gut* 2005, 54(10):1481-1491.
185. Iijima H, Takahashi I, Kiyono H: Mucosal immune network in the gut for the control of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology* 2001, 11(2):117-133.
186. Wittig BM, Zeitz M: The gut as an organ of immunology. *International Journal of Colorectal Disease* 2003, 18(3):181-187.
187. McGuckin MA, Eri R, Simms LA, Florin THJ, Radford-Smith G: Intestinal barrier dysfunction in inflammatory bowel diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* 2009, 15(1):100-113.
188. Hollander D: Inflammatory bowel diseases and brain-gut axis. *J Physiol Pharmacol* 2003, 54 Suppl 4:183-190.
189. Lundgren O: Sympathetic input into the enteric nervous system. *Gut* 2000, 47 Suppl 4:iv33-35; discussion iv36.
190. Kraehenbuhl JP, Corbet M: Keeping the gut microflora at bay. *Science* 2004, 303(5664):1624-1625.
191. Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM: A primitive t cell-independent mechanism of intestinal mucosal iga responses to commensal bacteria. *Science* 2000, 288(5474):2222-+.

192. Brandtzaeg P, Johansen FE: Mucosal b cells: Phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunol Rev* 2005, 206:32-63.
193. Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M: Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nature Immunology* 2005, 6(5):507-514.
194. Kelsall BL, Rescigno M: Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation. *Nat Immunol* 2004, 5(11):1091-1095.
195. Neurath MF, Finotto S, Glimcher LH: The role of th1/th2 polarization in mucosal immunity. *Nat Med* 2002, 8(6):567-573.
196. Meddings JB: Intestinal permeability in crohn's disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 1997, 11:47-53.
197. Soderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzen LE, Westrom B, Magnusson KE, Sjodahl R: Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of crohn's disease? *Gastroenterology* 1999, 117(1):65-72.
198. Qiu BS, Vallance BA, Blennerhassett PA, Collins SM: The role of cd4(+) lymphocytes in the susceptibility of mice to stress-induced reactivation of experimental colitis. *Nat Med* 1999, 5(10):1178-1182.
199. Bjarnason I, Macpherson A, Hollander D: Intestinal permeability - an overview. *Gastroenterology* 1995, 108(5):1566-1581.
200. Crowe SE, Perdue MH: Gastrointestinal food hypersensitivity - basic mechanisms of pathophysiology. *Gastroenterology* 1992, 103(3):1075-1095.
201. Cohen J: The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002, 420(6917):885-891.
202. Gosain A, Gamelli RL: Role of the gastrointestinal tract in burn sepsis. *Journal of Burn Care & Rehabilitation* 2005, 26(1):85-91.
203. MacFie J, O'Boyle C, Mitchell CJ, Buckley PM, Johnstone D, Sudworth P: Gut origin of sepsis: A prospective study investigating associations between bacterial translocation, gastric microflora, and septic morbidity. *Gut* 1999, 45(2):223-228.
204. Soderholm JD, Perdue MH: Stress and the gastrointestinal tract ii. Stress and intestinal barrier function. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2001, 280(1):G7-G13.
205. Boudry G, Jury J, Yang PC, Perdue MH: Chronic psychological stress alters epithelial cell turn-over in rat ileum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007, 292(5):G1228-G1232.

206. Cameron HL, Perdue MH: Stress impairs murine intestinal barrier function: Improvement by glucagon-like peptide-2. *J Pharmacol Exp Ther* 2005, 314(1):214-220.
207. Santos J, Yang PC, Soderholm JD, Benjamin M, Perdue MH: Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut* 2001, 48(5):630-636.
208. Kiliaan AJ, Saunders PR, Bijlsma PB, Berin MC, Taminiou JA, Groot JA, Perdue MH: Stress stimulates transepithelial macromolecular uptake in rat jejunum. *American Journal of Physiology* 1998, 275(5 PART 1):G1037-G1044.
209. Saunders PR, Kosecka U, McKay DM, Perdue MH: Acute stressors stimulate ion secretion and increase epithelial permeability in rat intestine. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1994, 267(5):G794-G799.
210. Santos J, Yates D, Guilarte M, Vicario M, Alonso C, Perdue MH: Stress neuropeptides evoke epithelial responses via mast cell activation in the rat colon. *Psychoneuroendocrinology* 2008, 33(9):1248-1256.
211. Teitelbaum AA, Gareau MG, Jury J, Yang PC, Perdue MH: Chronic peripheral administration of corticotropin-releasing factor causes colonic barrier dysfunction similar to psychological stress. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2008, 295(3):G452-G459.
212. Depke M, Fusch G, Domanska G, Geffers R, Volker U, Schuett C, Kiank C: Hypermetabolic syndrome as a consequence of repeated psychological stress in mice. *Endocrinology* 2008, 149(6):2714-2723.
213. Schrocksnadel K, Wirleitner B, Winkler C, Fuchs D: Monitoring tryptophan metabolism in chronic immune activation. *Clinica Chimica Acta* 2006, 364(1-2):82-90.
214. Takikawa O: Biochemical and medical aspects of the indoleamine 2,3-dioxygenase-initiated l-tryptophan metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005, 338(1):12-19.
215. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P: Tolerance, dcs and tryptophan: Much ado about ido. *Trends in Immunology* 2003, 24(5):242-248.
216. Moffett JR, Namboodiri MA: Tryptophan and the immune response. *Immunology and Cell Biology* 2003, 81(4):247-265.
217. Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, Chandler P, Munn DH: Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit t cell responses. *Journal of Immunology* 2002, 168(8):3771-3776.

218. Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R *et al*: Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002, 297(5588):1867-1870.
219. Porter RJ, Gallagher P, Watson S, Young AH: Corticosteroid-serotonin interactions in depression: A review of the human evidence. *Psychopharmacology* 2004, 173(1-2):1-17.
220. Porter RJ, Mulder RT, Joyce PR, Luty SE: Tryptophan and tyrosine availability and response to antidepressant treatment in major depression. *Journal of Affective Disorders* 2005, 86(2-3):129-134.
221. Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL: Tryptophan deprivation sensitizes activated t cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002, 107(4):452-460.
222. Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P: T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death and Differentiation* 2002, 9(10):1069-1077.
223. Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB: Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of t and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Journal of Experimental Medicine* 2002, 196(4):459-468.
224. Terness P, Bauer TM, Rose L, Duffer C, Watzlik A, Simon H, Opelz G: Inhibition of allogeneic t cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: Mediation of suppression by tryptophan metabolites. *Journal of Experimental Medicine* 2002, 196(4):447-457.
225. Grohmann U, Puccetti P: The immunosuppressive activity of proinflammatory cytokines in experimental models: Potential for therapeutic intervention in autoimmunity. *Current Drug Targets - Inflammation and Allergy* 2002, 1(1):77-87.
226. Myint AM, Kim YK, Verkerk R, Scharpe S, Steinbusch H, Leonard B: Kynurenine pathway in major depression: Evidence of impaired neuroprotection. *Journal of Affective Disorders* 2007, 98(1-2):143-151.
227. Wichers MC, Koek GH, Robaey G, Verkerk R, Scharpe S, Maes M: Ido and interferon-alpha-induced depressive symptoms: A shift in hypothesis from tryptophan depletion to neurotoxicity. *Molecular Psychiatry* 2005, 10(6):538-544.
228. Alexander AM, Crawford M, Bertera S, Rudert WA, Takikawa O, Robbins PD, Trucco M: Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in trans-planted nod islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 2002, 51(2):356-365.

229. Kai S, Goto S, Tahara K, Sasaki A, Kawano K, Kitano S: Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses nk cell activity and accelerates tumor growth. *J Exp Ther Oncol* 2003, 3(6):336-345.
230. Miki T, Sun H, Lee YH, Tandin A, Kavscek AM, Subbotin V, Fung JJ, Valdivia LA: Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplantation Proceedings* 2001, 33(1-2):129-130.
231. Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ: Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 2003, 9(10):1269-1274.
232. Dohrman A, Miyata S, Gallup M, Li JD, Chapelin C, Coste A, Escudier E, Nadel J, Basbaum C: Mucin gene (muc 2 and muc 5ac) upregulation by gram-positive and gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta-Mol Basis Dis* 1998, 1406(3):251-259.
233. Li JD, Dohrman AF, Gallup M, Miyata S, Gum JR, Kim YS, Nadel JA, Prince A, Basbaum CB: Transcriptional activation of mucin by pseudomonas aeruginosa lipopolysaccharide in the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997, 94(3):967-972.
234. Levine SJ, Larivee P, Logun C, Angus CW, Ognibene FP, Shelhamer JH: Tumor-necrosis-factor-alpha induces mucin hypersecretion and muc-2 gene-expression by human airway epithelial-cells. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 1995, 12(2):196-204.
235. Enss ML, Cornberg M, Wagner S, Gebert A, Henrichs M, Eisenblatter R, Beil W, Kownatzki R, Hedrich HJ: Proinflammatory cytokines trigger muc gene expression and mucin release in the intestinal cancer cell line Is180. *Inflamm Res* 2000, 49(4):162-169.
236. Louahed J, Toda M, Jen J, Hamid Q, Renauld JC, Levitt RC, Nicolaidis NC: Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 2000, 22(6):649-656.
237. El Homsy M, Ducroc R, Claustre J, Jourdan G, Gertler A, Estienne M, Bado A, Scoazec JY, Plaisancie P: Leptin modulates the expression of secreted and membrane-associated mucins in colonic epithelial cells by targeting pkc, pi3k, and mapk pathways. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2007, 293(1):G365-G373.
238. Hokari R, Lee H, Crawley SC, Yang SC, Gum JR, Miura S, Kim YS: Vasoactive intestinal peptide upregulates muc2 intestinal mucin via creb/atf1. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2005, 289(5):G949-G959.
239. Florey HW: Secretion and function of intestinal mucus. *Gastroenterology* 1962, 43(3):326-&.

240. McCool DJ, Forstner JF, Forstner GG: Regulated and unregulated pathways for muc2 mucin secretion in human colonic Is180 adenocarcinoma cells are distinct. *Molecular Biology of the Cell* 1995, 6:1088-1088.
241. Castagliuolo I, LaMont JT, Qiu BS, Fleming SM, Bhaskar KR, Nikulasson ST, Kornetsky C, Pothoulakis C: Acute stress causes mucin release from rat colon: Role of corticotropin releasing factor and mast cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 1996, 271(5):G884-G892.
242. Smith EM: Neuropeptides as signal molecules in common with leukocytes and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Behav Immun* 2008, 22(1):3-14.
243. Diebel LN, Liberati DM, Baylor AE, Brown WJ, Diglio CA: The pivotal role of tumor necrosis factor-alpha in signaling apoptosis in intestinal epithelial cells under shock conditions. *J Trauma-Injury Infect Crit Care* 2005, 58(5):995-1001.
244. Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M: Leaks in the epithelial barrier caused by spontaneous and tnf-alpha-induced single-cell apoptosis. *Faseb J* 2000, 14(12):1749-1753.
245. Ma TY, Iwamoto GK, Hoa NT, Akotia V, Pedram A, Boivin MA, Said HM: Tnf-alpha-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability requires nf-kappa b activation. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2004, 286(3):G367-G376.
246. Adams RB, Planchon SM, Roche JK: Ifn-gamma modulation of epithelial barrier function - time course, reversibility, and site of cytokine binding. *Journal of Immunology* 1993, 150(6):2356-2363.
247. Bischoff SC, Lorentz A, Schwengberg S, Weier G, Raab R, Manns MP: Mast cells are an important cellular source of tumour necrosis factor alpha in human intestinal tissue. *Gut* 1999, 44(5):643-652.
248. Farhadi A, Fields JZ, Keshavarzian A: Mucosal mast cells are pivotal elements in inflammatory bowel disease that connect the dots: Stress, intestinal hyperpermeability and inflammation. *World J Gastroenterol* 2007, 13(22):3027-3030.
249. Peachell P: Regulation of mast cells by beta-agonists. *Clin Rev Allergy Immunol* 2006, 31(2-3):131-141.
250. ReynierRebuffel AM, Callebert J, Launay JM, Seylaz J, Aubineau P: Ne inhibits cerebrovascular mast cell exocytosis induced by cholinergic and peptidergic agonists. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 1997, 273(3):R845-R850.
251. Spengler RN, Allen RM, Remick DG, Strieter RM, Kunkel SL: Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor-necrosis-factor. *Journal of Immunology* 1990, 145(5):1430-1434.

252. Venkatesh B, Gobe G, Morgan TJ, Beindorf A, Hall J, Jones M: Relationship between tissue hypoxia and apoptosis: A preliminary observational study. *Crit Care Resusc* 2007, 9(2):129-136.
253. Riddington DW, Venkatesh B, Boivin CM, Bonser RS, Elliot TSJ, Marshall T, Mountford PJ, Bion JF: Intestinal permeability, gastric intramucosal ph, and systemic endotoxemia in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1996, 275(13):1007-1012.
254. Guo K, Searfoss G, Krolikowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K, Yu KT, Jaye M, Ivashchenko Y: Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene bnip3. *Cell Death and Differentiation* 2001, 8(4):367-376.
255. Hotchkiss RS, Schmiege RE, Swanson PE, Freeman BD, Tinsley KW, Cobb JP, Karl IE, Buchman TG: Rapid onset of intestinal epithelial and lymphocyte apoptotic cell death in patients with trauma and shock. *Critical Care Medicine* 2000, 28(9):3207-3217.
256. Brosch H: Report on the experiences with akineton in the treatment of reserpine-caused parkinsonianism. *Med Welt* 1963, 18:1035-1037.
257. Grundig E, Raheem KA, Salvenmoser F, Schedl R, Weiss J: Drug-induced parkinsonism in rat - model for biochemical investigation of parkinson-syndrome .3. Incorporation of d-glucose c-14(u) in amino-acids of brain and liver from rats pretreated with reserpine or with phenothiazines. *Psychopharmacology* 1976, 47(1):111-118.
258. Mullerca.H, Sommer S: Reserpine-parkinsonoid in chimpanzees and management with fencamphamine. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv Fur Pharmakologie* 1968, 260(2-3):177-&.
259. van Andel A: Investigations into the so-called reserpine parkinsonoid in chronic schizophrenics and its treatment with orphenadrine (disipal). *Folia Psychiatr Neurol Neurochir Neerl* 1959, 62:476-488.
260. Sato M, Kitaura K, Minami T, Matsumoto S, Fukuda M: Hypothermia-related testicular toxicity of reserpine in mice. *Experimental and Toxicologic Pathology* 2007, 59(3-4):187-195.
261. Masuo Y, Noguchi J, Morita S, Matsumoto Y: Effects of intracerebroventricular administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (pacap) on the motor-activity and reserpine-induced hypothermia in murines. *Brain Res* 1995, 700(1-2):219-226.
262. Hale KD, Weigent DA, Gauthier DK, Hiramoto RN, Ghanta VK: Cytokine and hormone profiles in mice subjected to handling combined with rectal temperature measurement stress and handling only stress. *Life Sci* 2003, 72(13):1495-1508.

263. Brenner I, Shek PN, Zamecnik J, Shephard RJ: Stress hormones and the immunological responses to heat and exercise. *Int J Sports Med* 1998, 19(2):130-143.
264. Valles A, Marti O, Armario A: Long-term effects of a single exposure to immobilization: A c-fos mRNA study of the response to the homotypic stressor in the rat brain. *J Neurobiol* 2006, 66(6):591-602.
265. Balcombe JP, Barnard ND, Sandusky C: Laboratory routines cause animal stress. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004, 43(6):42-51.
266. Gartner K, Buttner D, Dohler K, Friedel R, Lindena J, Trautschold I: Stress response of rats to handling and experimental procedures. *Laboratory Animals* 1980, 14(3):267-274.
267. Santos J, Perdue MH: Stress and neuroimmune regulation of gut mucosal function. *Gut* 2000, 47:49-51.
268. Dhabhar FS, Viswanathan K: Short-term stress experienced at time of immunization induces a long-lasting increase in immunologic memory. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005, 289(3):R738-744.
269. Schedlowski M, Fluge T, Richter S, Tewes U, Schmidt RE, Wagner TO: Beta-endorphin, but not substance-p, is increased by acute stress in humans. *Psychoneuroendocrinology* 1995, 20(1):103-110.
270. Pacak K, Palkovits M, Kvetnansky R, Yadid G, Kopin IJ, Goldstein DS: Effects of various stressors on in vivo norepinephrine release in the hypothalamic paraventricular nucleus and on the pituitary-adrenocortical axis. *Ann N Y Acad Sci* 1995, 771:115-130.
271. Besch EL, Chou BJ: Physiological responses to blood collection methods in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1971, 138(3):1019-&.
272. Brown AP, Dinger N, Levine BS: Stress produced by gavage administration in the rat. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2000, 39(1):17-21.
273. Grouzmann E, Cavadas C, Grand D, Moratel M, Aubert JF, Brunner HR, Mazzolai L: Blood sampling methodology is crucial for precise measurement of plasma catecholamines concentrations in mice. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology* 2003, 447(2):254-258.
274. Hara K, Yanagihara N, Minami K, Ueno S, Toyohira Y, Sata T, Kawamura M, Bruss M, Bonisch H, Shigematsu A *et al*: Ketamine interacts with the noradrenaline transporter at a site partly overlapping the desipramine binding site (vol 358, pg 328, 1998). *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998, 358(5):600-600.
275. Kitagawa H, Yamazaki T, Akiyama T, Mori H, Sunagawa K: Effects of ketamine on exocytotic and non-exocytotic noradrenaline release. *Neurochem Int* 2003, 42(3):261-267.

276. Carruba MO, Bondiolotti G, Picotti GB, Catteruccia N, Daprada M: Effects of diethyl-ether, halothane, ketamine and urethane on sympathetic activity in the rat. *Eur J Pharmacol* 1987, 134(1):15-24.
277. Martinez-Olivares R, Villanueva I, Racotta R, Pinon M: Depletion and recovery of catecholamines in several organs of rats treated with reserpine. *Auton Neurosci-Basic Clin* 2006, 128(1-2):64-69.
278. Mohn CE, Fernandez-Solari J, De Laurentiis A, Prestifilippo JP, de la Cal C, Funk R, Bornstein SR, McCann SM, Rettori V: The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by acth is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin e-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005, 102(17):6213-6218.
279. Millan S, GonzalezQuijano MI, Giordano M, Soto L, Martin AI, LopezCalderon A: Short and long restraint differentially affect humoral and cellular immune functions. *Life Sci* 1996, 59(17):1431-1442.
280. Engler H, Dawils L, Hoves S, Kurth S, Stevenson JR, Schauenstein K, Stefanski V: Effects of social stress on blood leukocyte distribution: The role of alpha- and beta-adrenergic mechanisms. *Journal of Neuroimmunology* 2004, 156(1-2):153-162.
281. Maisel AS, Harris T, Rearden CA, Michel MC: Beta-adrenergic receptors in lymphocyte subsets after exercise - alterations in normal individuals and patients with congestive-heart-failure. *Circulation* 1990, 82(6):2003-2010.
282. Eriksson B, Hedfors E: Effect of adrenaline, insulin and hydrocortisone on human peripheral-blood lymphocytes studied by cell-surface markers. *Scandinavian Journal of Haematology* 1977, 18(2):121-128.
283. Gray AB, Telford RD, Collins M, Weidemann MJ: The response of leukocyte subsets and plasma hormones to interval exercise. *Medicine and Science in Sports and Exercise* 1993, 25(11):1252-1258.
284. Tonnesen E, Christensen NJ, Brinklov MM: Natural-killer cell-activity during cortisol and adrenaline infusion in healthy-volunteers. *European Journal of Clinical Investigation* 1987, 17(6):497-503.
285. Ahlborg B, Ahlborg G: Exercise leukocytosis with and without beta-adrenergic blockade. *Acta Medica Scandinavica* 1970, 187(4):241-&.
286. Murray DR, Irwin M, Rearden CA, Ziegler M, Motulsky H, Maisel AS: Sympathetic and immune interactions during dynamic exercise - mediation via a beta(2)-adrenergic-dependent mechanism. *Circulation* 1992, 86(1):203-213.
287. Klokke M, Secher NH, Madsen P, Pedersen M, Pedersen BK: Adrenergic beta(1)- and beta(1+2)-receptor blockade suppress the natural killer cell response to head-up tilt in humans. *Journal of Applied Physiology* 1997, 83(5):1492-1498.

288. Benschop RJ, Nieuwenhuis EES, Tromp EAM, Godaert GLR, Ballieux RE, Vandoornen LJP: Effects of beta-adrenergic-blockade on immunological and cardiovascular changes induced by mental stress. *Circulation* 1994, 89(2):762-769.
289. Ottaway CA, Husband AJ: Central-nervous-system influences on lymphocyte migration. *Brain Behav Immun* 1992, 6(2):97-116.
290. Ottaway CA, Husband AJ: The influence of neuroendocrine pathways on lymphocyte migration. *Immunol Today* 1994, 15(11):511-517.
291. Pernow J, Lundberg JM, Kaijser L, Hjemdahl P, Theodorssonorheim E, Martinsson A, Pernow B: Plasma neuropeptide y-like immunoreactivity and catecholamines during various degrees of sympathetic activation in man. *Clinical Physiology* 1986, 6(6):561-578.
292. Kerdelhue B, Brown S, Lenoir V, Queenan JT, Jones GS, Scholler R, Jones HW: Timing of initiation of the preovulatory luteinizing hormone surge and its relationship with the circadian cortisol rhythm in the human. *Neuroendocrinology* 2002, 75(3):158-163.
293. Kelliher P, Connor TJ, Harkin A, Sanchez C, Kelly JP, Leonard BE: Varying responses to the rat forced-swim test under diurnal and nocturnal conditions. *Physiology & Behavior* 2000, 69(4-5):531-539.
294. Sephton S, Spiegel D: Circadian disruption in cancer: A neuroendocrine-immune pathway from stress to disease? *Brain Behav Immun* 2003, 17(5):321-328.
295. Dalm S, de Visser L, Spruijt BM, Oitzl MS: Repeated rat exposure inhibits the circadian activity patterns of c57bl/6j mice in the home cage. *Behav Brain Res* 2009, 196(1):84-92.
296. Meerlo P, DeBoer SF, Koolhaas JM, Daan S, VandenHoofdakker RH: Changes in daily rhythms of body temperature and activity after a single social defeat in rats. *Physiology & Behavior* 1996, 59(4-5):735-739.
297. Meerlo P, Sgoifo A, De Boer SF, Koolhaas JM: Long-lasting consequences of a social conflict in rats: Behavior during the interaction predicts subsequent changes in daily rhythms of heart rate, temperature, and activity. *Behavioral Neuroscience* 1999, 113(6):1283-1290.
298. Lenczowski MJP, Van Dam AM, Poole S, Larrick JW, Tilders FJH: Role of circulating endotoxin and interleukin-6 in the acth and corticosterone response to intraperitoneal lps. *Am J Physiol-Regul Integr Comp Physiol* 1997, 273(6):R1870-R1877.
299. Brown SL, Smith LR, Blalock JE: Interleukin-1 and interleukin-2 enhance proopiomelanocortin gene-expression in pituitary-cells. *Journal of Immunology* 1987, 139(10):3181-3183.

300. Lange S, Delbro DS, Jennische E: Evans blue permeation of intestinal-mucosa in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1994, 29(1):38-46.
301. Le VH, Fishman WH: Combination of evans blue with plasma protein; its significance in capillary permeability studies, blood dye disappearance curves, and its use as a protein tag. *Am J Physiol* 1947, 151(1):26-33.
302. Cohen S: Use of the dye t1824 (evans blue) for the study of variations in capillary permeation during the menstrual cycle of the baboon (*papio ursinus*). *S Afr J Med Sci* 1953, 18(1):35-36.
303. Yao J, Maslov K, Hu S, Wang LV: Evans blue dye-enhanced capillary-resolution photoacoustic microscopy in vivo. *J Biomed Opt* 2009, 14(5):054049.
304. Lange S, Delbro DS: Adrenoceptor-mediated modulation of evans blue dye permeation of rat small intestine. *Dig Dis Sci* 1995, 40(12):2623-2629.
305. Hollander D: The intestinal permeability barrier. A hypothesis as to its regulation and involvement in crohn's disease. *Scand J Gastroenterol* 1992, 27(9):721-726.
306. Peeters M, Ghoois Y, Maes B, Hiele M, Geboes K, Vantrappen G, Rutgeerts P: Increased permeability of macroscopically normal small bowel in crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1994, 39(10):2170-2176.
307. Madara JL: Tight junction dynamics: Is paracellular transport regulated? *Cell* 1988, 53(4):497-498.
308. Theilmeier G, Booke M: Norepinephrine in septic patients - friend or foe? *J Clin Anesth* 2003, 15(2):154-158.
309. Duranteau J, Sitbon P, Teboul JL, Vicaut E, Anguel N, Richard C, Samii K: Effects of epinephrine, norepinephrine, or the combination of norepinephrine and dobutamine on gastric mucosa in septic shock. *Critical Care Medicine* 1999, 27(5):893-900.
310. Smulyan H, Eich RH, Cuddy RP: Hemodynamic effects of pressor agents in septic + myocardial infarction shock. *Jama-Journal of the American Medical Association* 1964, 190(3):188-&.
311. Chernow B, Roth BL: Pharmacological manipulation of the peripheral vasculature in shock - clinical and experimental approaches. *Circulatory Shock* 1986, 18(2):141-155.
312. Pleiner J, Heere-Ress E, Langenberger H, Sieder AE, Bayerle-Eder M, Mittermayer F, Fuchsjager-Mayrl G, Bohm J, Jansen B, Wolzt M: Adrenoceptor hyporeactivity is responsible for escherichia coli endotoxin-induced acute vascular dysfunction in humans. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2002, 22(1):95-100.

313. Santos J, Saperas E, Nogueiras C, Mourelle M, Antolin M, Cadahia A, Malagelada JR: Release of mast cell mediators into the jejunum by cold pain stress in humans. In: *97th Annual Meeting of the American-Gastroenterological-Association, Digestive Disease Week: May 10-16 1997; Washington, D.C.*: W B Saunders Co; 1997: 640-648.
314. Janeway CA TP, Walport M, Shlomchik M, Beginnen K, Haußer-Siller I, Seidler L: Immunologie. In., vol. 5. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag; 2002: 515.
315. Kushnir-Sukhov NM, Gilfillan AM, Coleman JW, Brown JM, Bruening S, Toth M, Metcalfe DD: 5-hydroxytryptamine induces mast cell adhesion and migration. *J Immunol* 2006, 177(9):6422-6432.
316. Baldwin AL: Mast cell activation by stress. *Methods Mol Biol* 2006, 315:349-360.
317. Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, Pang XZ, Letourneau R, Webster E, Chrousos G: Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. *Endocrinology* 1998, 139(1):403-413.
318. Kiank C, Tache Y, Larauche M: Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: Role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun*, 24(1):41-48.
319. Wallon C, Yang PC, Keita AV, Ericson AC, McKay M, Sherman PM, Perdue MH, Soderholm JD: Corticotropin-releasing hormone (crh) regulates macromolecular permeability via mast cells in normal human colonic biopsies in vitro. *Gut* 2008, 57(1):50-58.
320. Meddings JB, Swain MG: Environmental stress-induced gastrointestinal permeability is mediated by endogenous glucocorticoids in the rat. *Gastroenterology* 2000, 119(4):1019-1028.
321. Spitz J, Hecht G, Taveras M, Aoys E, Alverdy J: The effect of dexamethasone administration on rat intestinal permeability - the role of bacterial adherence. *Gastroenterology* 1994, 106(1):35-41.
322. Yuhan RM, Spitz J, Koutsouris A, Hecht G: Adherence of enteropathogenic escherichia-coli disrupts barrier function of cultured intestinal epithelia. *Clinical Research* 1994, 42(3):A403-A403.
323. Santos J, Benjamin M, Yang PC, Prior T, Perdue MH: Chronic stress impairs rat growth and jejunal epithelial barrier function: Role of mast cells. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology* 2000, 278(6):G847-G854.

324. Karalis K, Sano H, Redwine J, Listwak S, Wilder RL, Chrousos GP: Autocrine or paracrine inflammatory actions of corticotropin-releasing hormone in vivo. *Science* 1991, 254(5030):421-423.
325. Liu S, Gao N, Hu HZ, Wang X, Wang GD, Fang X, Gao X, Xia Y, Wood JD: Distribution and chemical coding of corticotropin-releasing factor-immunoreactive neurons in the guinea pig enteric nervous system. *J Comp Neurol* 2006, 494(1):63-74.
326. Mellor AL, Munn DH:IDO expression by dendritic cells: Tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004, 4(10):762-774.
327. Turck J, Oberdorfer C, Vogel T, MacKenzie CR, Daubener W: Enhancement of antimicrobial effects by glucocorticoids. *Med Microbiol Immunol* 2005, 194(1-2):47-53.
328. Grohmann U, Volpi C, Fallarino F, Bozza S, Bianchi R, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Ayroldi E, Nocentini G *et al*: Reverse signaling through gitr ligand enables dexamethasone to activate ido in allergy. *Nat Med* 2007, 13(5):579-586.
329. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA: Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of t cell proliferation. *Journal of Immunology* 2000, 164(7):3596-3599.
330. Knox WE: The regulation of tryptophan pyrrolase activity by tryptophan. *Adv Enzyme Regul* 1966, 4:287-297.
331. Currier AR, Ziegler MH, Riley MM, Babcock TA, Telbis VP, Carlin JM: Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide enhance interferon-induced antichlamydial indoleamine dioxygenase activity independently. *Journal of Interferon and Cytokine Research* 2000, 20(4):369-376.
332. Supajatura V, Ushio H, Nakao A, Okumura K, Ra C, Ogawa H: Protective roles of mast cells against enterobacterial infection are mediated by toll-like receptor 4. *Journal of Immunology* 2001, 167(4):2250-2256.
333. McCurdy JD, Lin TJ, Marshall JS: Toll-like receptor 4-mediated activation of murine mast cells. *J Leukoc Biol* 2001, 70(6):977-984.
334. Schwarcz R PR: Manipulation of brain kynurenines: Glial targets, neuronal effects and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther* 2002, 303:1-10.
335. Stone TW AJ: The pharmacological manipulation of glutamate receptors and neuroprotection. *Eur J Pharmacol* 2002, 447:285-296.
336. Saito KN, J. Ohta, J. Sasaki, E. Ishiguro, I. : Characterisation of the l-tryptophan transport system in the liver of growing rats. *Life Sci* 1991, 49(7):527-534.

337. Schimke RTS, E.W. Berlin, C.M.: The roles of synthesis and degradation in the control of rat liver tryptophan pyrolase. *J Biol Chem* 1965, 240:322-331.
338. Ren S, Correia MA: Heme: A regulator of rat hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase? *Arch Biochem Biophys* 2000, 377(1):195-203.
339. Li JSH, Q. Fang, J. Rizzi, M. James, A.A. Li, J.: Biochemical mechanisms leading to tryptophan 2,3-dioxygenase activation. *Arch Insect Biochem Physiol* 2007, 64(2):74-87.
340. Tabata H, Kitamura T, Nagamatsu N: Comparison of effects of restraint, cage transportation, anaesthesia and repeated bleeding on plasma glucose levels between mice and rats. *Laboratory Animals* 1998, 32(2):143-148.
341. Schmidt ED, Janszen AW, Wouterlood FG, Tilders FJ: Interleukin-1-induced long-lasting changes in hypothalamic corticotropin-releasing hormone (crh)--neurons and hyperresponsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J Neurosci* 1995, 15(11):7417-7426.
342. Schmidt ED, Schoffemeer AN, De Vries TJ, Wardeh G, Dogterom G, Bol JG, Binnekade R, Tilders FJ: A single administration of interleukin-1 or amphetamine induces long-lasting increases in evoked noradrenaline release in the hypothalamus and sensitization of acth and corticosterone responses in rats. *Eur J Neurosci* 2001, 13(10):1923-1930.
343. Jansen AS, Schmidt ED, Voorn P, Tilders FJ: Substance induced plasticity in noradrenergic innervation of the paraventricular hypothalamic nucleus. *Eur J Neurosci* 2003, 17(2):298-306.
344. Feldman S, Conforti N, Itzik A, Weidenfeld J: The role of limbic structures in the modulation of acth responses following adrenalectomy. *Ann N Y Acad Sci* 1995, 771:73-81.
345. Feldman S, Conforti N, Weidenfeld J: Limbic pathways and hypothalamic neurotransmitters mediating adrenocortical responses to neural stimuli. *Neurosci Biobehav Rev* 1995, 19(2):235-240.
346. Forray MI, Gysling K: Role of noradrenergic projections to the bed nucleus of the stria terminalis in the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Brain Res Brain Res Rev* 2004, 47(1-3):145-160.
347. Plotsky PM: Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinology* 1987, 121(3):924-930.
348. Sawchenko PE, Brown ER, Chan RK, Ericsson A, Li HY, Roland BL, Kovacs KJ: The paraventricular nucleus of the hypothalamus and the functional neuroanatomy of visceromotor responses to stress. *Prog Brain Res* 1996, 107:201-222.

349. Dong HW, Swanson LW: Organization of axonal projections from the anterolateral area of the bed nuclei of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 2004, 468(2):277-298.
350. Radley JJ, Williams B, Sawchenko PE: Noradrenergic innervation of the dorsal medial prefrontal cortex modulates hypothalamo-pituitary-adrenal responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 2008, 28(22):5806-5816.
351. Crabbe JC, Wahlsten D, Dudek BC: Genetics of mouse behavior: Interactions with laboratory environment. *Science* 1999, 284(5420):1670-1672.

9. Publikationsverzeichnis

Publikationen:

1. Different stress-related phenotypes of BALB/c mice from in-house or vendor: alterations of the sympathetic and HPA axis responsiveness
J. Olfe, G. Domanska, C. Schuett, C. Kiank; BMC Physiol. 2010 Mar 9;10:2
2. Brain-to-ileum signals during psychological stress in mice: CRF receptor activation, IFN γ and TNF α -mediated loss of ileal barrier function
C. Kiank, S. Voss, A. Starke, J. Olfe, G. Domanska, C. Schuett;
eingereicht

Abstracts:

1. Modulation of HPA-axis responsiveness by laboratory stress or shipment of mice alters experimental data
S. Drude, J. Olfe, A. Geissler, G. Domanska, C. Schuett, C. Kiank; Brain Behav Immun, 2009, 23: S33-S34

10. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Datum: 21.09.2011

Unterschrift: J.Olfe

11. Tabellarischer Lebenslauf

Name:	Jakob Justus Olfe
Geburtsdatum:	10.05.1983
Geburtsort:	Berlin
Ausbildung:	
1989-1993	Clemens-Brentano-Grundschule, Berlin
1993-1995	Grundschule am Ritterfeld, Berlin
1995- 2002	Lily-Braun-Gymnasium, Berlin
2002	Abitur
1999-2000	Orewa College, Orewa, Neuseeland
2003-2010	Humanmedizinstudium, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
10/2005	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
07/2006-03/2007	Humanmedizinstudium, Universidade Nova de Lisboa, Lissabon, Portugal
2007-2010	Doktorand am Institut für Immunologie der Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald
11/2010	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

Unterschrift: J.Olfe

12. Danksagung:

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich bedanken.

Bei Frau Professor Schütt für die Aufnahme in ihre spannende und nette Arbeitsgruppe, die stete, konstruktive Kritik und eine rundum hervorragende, intensive Betreuung, wie sie sich jeder Doktorand nur wünschen kann.

Bei Frau Professor Bröker für die unkomplizierte und spontane Übernahme des Erstgutachtens.

Bei Frau Doktor Cornelia Kiank für die Idee zu dieser Arbeit, die Einarbeitung in alle Methoden, die ständige Hilfe in theoretischen und praktischen Fragestellungen zu jeder Tag- und Nachtzeit, das wiederholte Korrekturlesen etc. Kurz: ohne sie würde diese Dissertation nicht existieren.

Bei Frau Dipl.-Biochemikerin Grazyna Domanska für die Durchführung der Messungen der Indolaminkonzentrationen und den immerwährenden professionellen und vor allem auch persönlichen Rat bei den wiederkehrenden Problemen des Laboralltags.

Bei Herrn Dr. Gerhard Fusch für die Messungen der Indolaminkonzentrationen im Tandem-Massenspektrometer.

Bei Anne Baumgart, Annett Geißler, Dominique Mutschler, Felix Schwentheit, Solveig Drude und Sylvia Voß für die vielen gemeinsamen, lustigen Stunden innerhalb und ausserhalb des Labors.

Bei meiner Freundin Theresa Bernard dafür, dass sie immer für mich da ist.

Bei meinen Eltern dafür, dass sie mir all die letzten Jahre ermöglicht haben und ohne die ich nicht da wäre, wo ich jetzt bin.