

Aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Psychosomatik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Kinetik pulmonaler CD4+, CD8+, T-Zellen, Apoptose und
Proliferation unter dem Einfluss von Stress am murinen
Asthma-Modell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Isabel Masson

aus Saarbrücken

Datum der Promotion: 12.09.2014

Inhaltsverzeichnis

I	ZUSAMMENFASSUNG	IV
II	ABSTRACT	V
III	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VI
1	EINLEITUNG	1
1.1	Definition und Ätiologie des Asthma bronchiale	1
1.2	Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale	1
1.3	T-Zell-Klassifizierung und T-Zell-Rezeptor (TZR)	3
1.3.1	CD4+ T-Lymphozyten	4
1.3.2	CD8+ T-Lymphozyten	5
1.3.3	T-Lymphozyten	6
1.4	Stress	7
1.5	Stress und das Immunsystem	8
1.6	Zielsetzung	11
2	MATERIAL	13
2.1	Tiere	13
2.2	Arbeitsmaterialien und Geräte	13
2.3	Chemikalien und Reagenzien	14
2.4	Bioreagenzien	14
2.5	Antikörper	15
2.6	Puffer und Lösungen	16
2.7	Software	17
3	METHODEN	18
3.1	Tierhaltung	18
3.2	Versuchsaufbau	18
3.3	Induktion der Atemwegsentzündung	19
3.4	Stressexposition	19
3.5	Tötung und Präparation	19
3.6	Bronchoalveoläre Lavage	20
3.7	Zytospin	20
3.8	Gewebepräparation	20
3.9	Immunhistochemie	21
3.10	Immunhistochemische Fluoreszenz-Markierung	22

3.11	Zellauszählung-----	23
3.12	Datenanalyse -----	23
4	ERGEBNISSE-----	25
4.1	Modulation der zellulären Kinetik im pulmonalen Gewebe nach Stress-----	25
4.1.1	Stress reduziert peribronchiale CD4+ Zellen -----	27
4.1.2	Stress reduziert peribronchiale CD8+ Zellen -----	28
4.1.3	Stress steigert die peribronchiale CD4/CD8-Ratio -----	31
4.1.4	Keine signifikanten Stresseffekte auf T-Zellen -----	33
4.1.5	Stress fördert die Apoptose -----	35
4.1.6	Stress reduziert die Proliferation -----	36
4.2	Modulation der BAL-Leukozyten durch Stress -----	38
4.2.1	Stress mobilisiert eosinophile Granulozyten -----	41
4.2.2	Stress mobilisiert Lymphozyten -----	42
4.2.3	Stress mobilisiert neutrophile Granulozyten -----	43
4.2.4	Stress und Zeit sind keine Modulatoren für Monozyten und Makrophagen ---	44
5	DISKUSSION-----	45
5.1	Stress manifestiert sich in den Bronchien -----	45
5.2	Heterogene Kinetik der Zellsubpopulationen im pulmonalen Gewebe -----	46
5.2.1	Kinetik der CD4+ und CD8+ Zellen -----	46
5.2.2	Kinetik der T-Zellen-----	47
5.3	Die Stressreaktion der peribronchialen Zellsubpopulationen-----	49
5.3.1	Peribronchiale Zellpopulationen nach Stress im Kontext verschiedener Stressmodelle-----	49
5.3.2	Mechanismen der Zellmodulation durch Stress-----	53
5.4	Apoptosefördernde Effekte von Stress in der Atemwegsentzündung-----	56
5.5	Peribronchiale Proliferationshemmung und Regeneration nach Stress -----	58
5.6	Stress als Katalysator der Leukozytenmobilisation -----	59
5.7	Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf die Atemwegsentzündung-----	62
5.7.1	Gegenläufige Entwicklung von BAL Leukozyten und peribronchialen CD4+ Zellen nach Stress -----	62
5.7.2	CD8+ Zellreduktion nach Stress in der Atemwegsentzündung-----	64
5.7.3	Steigerung der CD4/CD8-Ratio nach Stress in der Atemwegsentzündung ---	67
5.7.4	Relevanz der relativen Stressresistenz von T-Lymphozyten für die Atemwegsentzündung -----	69
5.8	Methodenkritik -----	72

5.9	Das komplexe Zusammenspiel der Stressreaktion verschiedener immunologischer Parameter prägt die Atemwegsentzündung-----	73
6	LITERATURVERZEICHNIS -----	77
7	ANHANG -----	90
7.1	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis-----	90
7.2	Eidesstattliche Versicherung-----	91
7.3	Lebenslauf -----	91
7.4	Danksagung -----	92

I Zusammenfassung

Stress kann die Entzündung der Atemwege im Rahmen des Asthma bronchiale intensivieren und zu einer klinischen Verschlechterung der Erkrankung führen. Die stressbedingte Aktivierung verschiedener Systeme steigert die Konzentration neuroimmunologisch aktiver Botenstoffe. T-Zellen stellen zentrale Regulatoren des Asthmas dar und könnten einen Angriffspunkt für Stress repräsentieren. T-Zellen des entzündlichen Infiltrates bei allergischem Asthma exprimieren CD4 sowie CD8 und bestehen zu einem Teil aus TZR-tragenden Zellen.

Wir untersuchten an einem etablierten murinen Stress-Asthma-Modell im Lungengewebe immunhistochemisch CD4+, CD8+ und T-Zellen sowie über den Nachweis von Ki67 proliferierende und via TUNEL-Methode apoptotische Zellen mittels Immunfluoreszenz. Zudem wurden Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage (BAL) untersucht. Es wurden Balb/c-Mäuse mit und ohne Stressexposition (24 h Schallstress) über einen Zeitraum von 6 h bis 96 h nach aerogener Allergenprovokation miteinander verglichen.

Stress reduzierte peribronchial signifikant CD4+ Zellen 12 h und 24 h sowie CD8+ Zellen 96 h nach Allergenprovokation ohne signifikante Effekte auf T-Zellen. Stress steigerte apoptotische Zellen 6 h und reduzierte proliferierende Zellen 96 h nach Allergenprovokation signifikant in Bronchialepithelien und peribronchial angrenzenden Arealen. Stress beschleunigte die Mobilisierung der Leukozyten in das bronchoalveoläre Lumen, mit einer signifikanten Mengensteigerung eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten 24 h sowie neutrophiler Granulozyten 6 h und 24 h nach Allergenprovokation, ohne signifikante Effekte auf Monozyten oder Makrophagen.

Unsere Daten zeigen eine Suppression der zellulären Immunreaktion im peribronchialen Gewebe bei kurzzeitig gesteigerter leukozytärer Akkumulation im bronchoalveolären Lumen nach Stress. Vor dem Hintergrund der zeitlich kohärent erhöhten Anzahl nichtspezifizierter BAL-Lymphozyten nach Stress kann eine beschleunigte Abwanderung in das bronchoalveoläre Lumen als Ursache für die reduzierten peribronchialen CD4+ Zellen diskutiert werden, die die Entwicklung aber auch die Resolution der Entzündung beschleunigen könnte. Über die Reduktion der Proliferation und Steigerung der Apoptose könnte Stress langfristig die regenerative Kapazität und die Barrierefunktion des Epithels herabsetzen und so zu einer klinischen Verschlechterung der Erkrankung nach Stress beitragen.

II Abstract

Stress can enhance airway inflammation in asthma and thereby worsen severity of the disease. Stress activated response-systems enhance concentrations of neuroimmunologically active messengers. T cells are important keyplayers in the allergic cascade of asthma and therefore could represent an important target for stress. T cells of the inflammatory pulmonal infiltrate in the course of asthma express CD4 and CD8 and partially consist of TCR-bearing cells.

Based on an established murine stress-asthma-model we studied CD4+, CD8+ and T cells by immunohistochemistry. Via expression of ki67 proliferating cells and via TUNEL method apoptotic cells in lung tissue were detected by immunofluorescence. Moreover leucocytes in bronchoalveolar lavage (BAL) were examined. Balb/c mice with and without stress exposure (24 h soundstress) were compared to each other 6 h until 96 h after allergen challenge.

Stress significantly reduced peribronchial CD4+ cells 12 h and 24 h, and CD8+ cells 96 h after allergen challenge without significant effects on T cells. Stress significantly increased apoptotic cells 6 h and reduced proliferating cells 96 h after allergen challenge in bronchial epithelia und peribronchial adjacent areals. Stress accelerated leucocytic invasion of bronchoalveolar space by increasing the number of eosinophilic granulocytes and lymphocytes 24 h, and neutrophilic granulocytes 6 h and 24 h after allergen challenge significantly without any significant effects on monocytes or macrophages.

Our data demonstrate a suppression of cellular immune reaction in bronchial tissue guided by temporary enhanced leucocytic accumulation in bronchoalveolar space after stress. Against the background of the increased number of unspecified BAL-lymphocytes after stress an accelerated migration towards bronchoalveolar space can be discussed as a reason for temporally coherent reduced counts of CD4+ cells in peribronchial tissue, which could fasten development but also resolution of pulmonal inflammation. Via compromising proliferative capacity and increasing apoptotic processes in epithelial space, stress could affect regenerative capacity while cutting bronchoepithelial barrier function on a long-term basis and thereby contribute to clinical worsening of asthma.

III Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTH	adrenocorticotropic hormone
ABC	avidin-biotin-peroxidase complex
AD	Atopische Dermatitis
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
ALM	Allgemeines Lineares Modell
AP	Alkalische Phosphatase
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
Bg.VV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
BCL	B-cell lymphoma leukemia
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
CD	cluster of differentiation
COPD	chronic pulmonary obstructive disease
CRH	corticotropin-releasing hormone
CTLA-4	cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein 4
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
dB	Dezibel
DANN	deoxy ribonucleic acid
DTH	delayed type hyperreactivity
dUTP	2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat
EAR	early asthmatic reaction
FKS	fetales Kälberserum
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde
FITC	Fluoreszein Iso-Thiocyanat
FOXP3	forkhead box P3
G	Gramm
GM-CSF	granulocyte-macrophage colonie-stimulating-factor
H	hour (Stunde)
HHNR	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde
HNS	Hamsternormalserum
Hz	Hertz
ICAM	Intercellular cell adhesion molecule
IFN- γ	Interferon-gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

i.p.	intraperitoneal
KGF	keratinocyte-growth-factor
L	Liter
LAGetSi	Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin
LAR	late asthmatic reaction
MHC	major histocompatibility complex
Min	Minute
ml	Milliliter
MNS	Mausnormalserum
mRNA	messenger ribonucleic acid
NANC	nicht-adrenerges nicht-cholinerges System
NGF	nerve-growth-factor
NK	Neurokinin
NSAR	nichtsteroidale Antirheumatika
OVA	Ovalbumin
PBS	phosphat buffered saline
PMA	Phorbol Myristat Acetat
RNS	Rattennormalserum
RT	Raumtemperatur
SAS	sympathoadrenales System
SP	Substanz P
Tab.	Tabelle
TBS	tris buffered saline
Tc	T cytotoxic
TdT	terminal deoxynucleotidyl-transferase
TGF- β	transforming-growth-factor-beta
Th	T-helper
TNF-	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Iso-Thiocyanat
TSST	Trier social stress test
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl-transferase (TdT)-mediated 2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat (dUTP)-biotin-nick-end labeling
TZR	T-Zell-Rezeptor
UV	Ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion molecule
ZNS	Ziegennormalserum
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Definition und Ätiologie des Asthma bronchiale

Asthma bronchiale ist eine entzündliche Erkrankung der Atemwege mit chronischem Charakter, die mit einer Atemwegshyperreagibilität (AHR) einhergeht und durch eine anfallsweise auftretende, variable Atemwegsobstruktion gekennzeichnet ist. In Deutschland sind ca. 5% der Erwachsenen und ca. 10 % der Kinder von dieser Erkrankung betroffen.¹ Ursächlich für die Erkrankung sind verschiedene Faktoren. Nichtallergisches Asthma (Intrinsisches Asthma) kann durch verschiedene Faktoren wie respiratorische Infekte und Medikamente (Acetylsalicylsäure, nicht-steroidale Antirheumatika (NSAR)) provoziert werden. Allergisches Asthma (Extrinsisches Asthma) entsteht infolge in einer allergischen Reaktion nach Allergenexposition. Häufig leiden die Betroffenen an einer Mischform aus allergischem und nichtallergischem Asthma. Genetische Prädisposition, Infektionen der Atemwege, Umweltfaktoren und psychosoziale Faktoren können die Entwicklung und den Verlauf der Erkrankung beeinflussen.¹ Die Prävalenz von Angst- und Panikstörungen bei Asthmatikern ist im Vergleich zur Normalbevölkerung deutlich erhöht² und eine Assoziation des Schweregrads der klinischen Symptomatik der Erkrankung mit dem Vorliegen einer Angststörung oder Depression wurde beobachtet.³ Stress stellt eine inzwischen unumstrittene Komponente dar, die zur Exacerbation des Asthmas beiträgt.⁴

1.2 Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale

Ein Allergen ist ein an sich nicht pathogener Stoff der Umgebung, der über die Atemwege, die Haut oder den Verdauungstrakt aufgenommen werden kann. Der Kontakt mit dem Allergen zieht bei allergischem Asthma aufgrund einer überschießenden Immunantwort bei zugleich ungenügender Elimination des Antigens pathologische Veränderungen im Bereich der Atemwege nach sich.⁵

Beim ersten Kontakt mit dem Allergen über die Schleimhäute wird dieses über Antigen-präsentierende Zellen (APZ) prozessiert und so T-Lymphozyten präsentiert. Weitere kostimulatorische Signale (CD28 auf T-Zellen und B7 auf APZ) bewirken die Signaltransduktion mit einer gesteigerten Synthese verschiedener Zytokine, die wichtige immunologisch aktive Botenstoffe darstellen. Das Zytokin Interleukin (IL)-2 vermittelt die

EINLEITUNG

Proliferation der T-Lymphozyten und die Entwicklung zu T-Effektorzellen mit spezialisierter Funktion. IL-4 und IL-13 stimulieren B-Lymphozyten zur Entwicklung IgE-produzierender Plasmazellen. Das IgE-Molekül heftet sich an den IgE-Rezeptor (Fc RI) auf der Oberfläche von Mastzellen, eosinophilen und basophilen Granulozyten und bei erneutem Kontakt mit dem Antigen über das IgE-Molekül kommt es zur Degranulation dieser Zellen. Hierbei werden verschiedene Mediatoren freigesetzt (Histamin, Leukotriene, Prostaglandine, Zytokine), die eine erhöhte Gefäßpermeabilität und Kontraktion der glatten Muskulatur bewirken. Dies führt zu einer Bronchokonstriktion im Sinne einer AHR, die sich klinisch in einer Abnahme der maximalen Atemstromstärke äußert. Diese innerhalb weniger Minuten nach Allergenkontakt beginnenden Vorgänge werden als allergische Sofortreaktion nach Coombs Typ I bezeichnet (*early asthmatic reaction* (EAR)). Die AHR bildet sich im weiteren Verlauf zunächst wieder zurück und 6 bis 8 Stunden (h) nach Allergenexposition findet bei einem Teil der Asthmapatienten die asthmatische Spätreaktion (*late asthmatic reaction* (LAR)) mit einer weiteren Abnahme der maximalen Atemstromstärke statt. Diese Phase beinhaltet die zelluläre Immunreaktion, die mit der Einwanderung von eosinophilen Granulozyten, basophilen Granulozyten, T-Lymphozyten und anderen Immunzellen in die Atemwege verbunden ist. IL-5, IL-13 und GM-CSF sind für die Entwicklung und Migration eosinophiler Granulozyten, die einen wichtigen, für die Atemwegsepithelien schädlichen Bestandteil des entzündlichen Infiltrats darstellen, bedeutsam. Durch weitere Freisetzung von Zytokinen unterhalten die in die Atemwege migrierten Immunzellen die Entzündung der Atemwege.^{5,6}

Im weiteren Verlauf der Immunreaktion wird auf der Oberfläche der T-Lymphozyten *cytotoxic-T-lymphocyte-associated protein* (CTLA)-4 exprimiert. CTLA-4 bindet mit höherer Affinität an B7 auf der Oberfläche der APZ als CD28. Durch dieses Bremssignal werden weniger Zytokine und Rezeptoren gebildet und die Immunantwort kommt zum Erliegen.⁶ Das Absterben der involvierten Immunzellen wird über verschiedene Mechanismen vermittelt. Über das Fas-Fas-Ligand-System, in der *cluster of differentiation* (CD)-Nomenklatur auch als CD95-CD95L bezeichnet, wird die Apoptose induziert. Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet, die Zelle stirbt nach Defragmentation der *deoxyribonucleic acid* (DNA) in definierte Stücke ab. Der Zelluntergang im Rahmen der Zytolyse wird durch Perforine und Granzyme eingeleitet.

EINLEITUNG

Anschließend erfolgt die Phagozytose des verbliebenen Zellmaterials durch Makrophagen.⁶

Häufig besteht bei Asthma bronchiale durch die Einwanderung verschiedener Immunzellen ein gesteigerter Zellumsatz mit einer Dysregulation von Proliferation und Apoptose.^{7,8} Das Ausmaß des Zellumsatzes bei Asthmatikern korreliert mit dem Schweregrad der Klinik.⁷ Bei chronisch entzündlichen Erkrankungen ist der selbstlimitierende Prozess der Entzündung zumeist schwach ausgeprägt und die proinflammatorische Immunantwort kommt nur schwer zum Erliegen. Chronifiziert sich die Entzündung, kann es zu irreversiblen Schäden des Atemwegsepithels mit Basalmembranverdickung, muskulärer Hyperplasie und Apoptose von Epithelzellen kommen (Remodeling). Das geschädigte Atemwegsepithel wird durchlässiger für Elemente, die eigentlich nicht in den Organismus eindringen sollten und zieht so z. B. eine erhöhte Belastung durch Allergene, pathogene Keime und Umwelttoxine nach sich.^{5,6}

1.3 T-Zell-Klassifizierung und T-Zell-Rezeptor (TZR)

T-Lymphozyten sind ein zentraler Bestandteil des spezifischen zellulären Immunsystems. Ihre Rolle in der Pathogenese des allergischen Asthmas ist grundlegend, da durch sie das allergieauslösende Antigen erkannt wird und sie die Immunreaktion durch Zytokinproduktion steuern können.⁵

Es sind verschiedene T-Zellpopulationen bekannt, deren Rezeptoren und Oberflächenantigene sich unterscheiden. Ihre Klassifizierung basiert auf dem spezifischen Aufbau des TZR und verschiedenen charakteristischen CD-Oberflächenmolekülen. Auf ihrer Zellmembran exprimieren T-Lymphozyten charakteristischer Weise das CD3-Leukozytenantigen. CD3 und TZR bilden den funktionellen Rezeptor. Durch Interaktion des TZR mit CD3 wird der T-Zelle die Antigenerkennung signalisiert und diese aktiviert.

Der extrazelluläre Anteil des TZR setzt sich größtenteils aus *alpha* (α)- und *beta* (β)-Polypeptidketten und zu einem kleinerem Anteil aus *gamma* (γ)- und *delta* (δ)-Ketten zusammen.⁶ Der TZR wird von 65-75% der im Blut zirkulierenden Lymphozyten exprimiert.⁹ Zu Beginn der T-Zell-Differenzierung während der Thymuspassage sind T-Lymphozyten CD3+, CD4+ und CD8+, differenzieren sich im Verlauf zu

EINLEITUNG

CD3+CD4+ T-Zellen oder CD3+CD8+ T-Zellen und nur ein geringer Teil exprimiert beide Oberflächenmoleküle. T-Zellen erkennen fragmentierte Proteine durch Präsentation über *major histocompatibility complex* (MHC) -Moleküle (MHC-Restriktion).⁶

Die thymische und extrathymische Entwicklung der T-Zellen erfolgt zeitlich bereits vor der Entwicklung der T-Zellen. T-Zellen kommen in der Blutzirkulation eher selten vor, sie befinden sich vorwiegend in epithelialen und lymphatischen Geweben. Die Mehrzahl der T-Zellen exprimiert weder den CD4- noch den CD8-Korezeptor und die Antigenerkennung kann auch ohne Präsentation über MHC-Moleküle erfolgen.⁹

1.3.1 CD4+ T-Lymphozyten

Die Koexpression von CD4 ermöglicht das Erkennen des über MHC-Klasse-II-Moleküle auf APZ präsentierten Allergens durch T-Lymphozyten und löst die immunologische Abwehrreaktion aus.⁵ In Biopsien der Atemwege von Asthmatikern¹⁰ sowie in der bronchoalveolären Lavage (BAL) von Asthmapatienten und asthmainduzierten Balb/c-Mäusen¹¹ wurde nach Allergenstimulation ein deutlicher Anstieg der Anzahl von CD4+ T-Zellen demonstriert. Am murinen Asthma-Modell wurde nachgewiesen, dass nach Allergenprovokation ein Großteil der CD4-exprimierenden Zellen in der BAL aktivierten T-Zellen entspricht.¹² An murinen Modellen konnte gezeigt werden, dass wesentliche Charakteristika des allergischen Asthmas, wie die eosinophile Atemwegsentzündung und die AHR, durch CD4+ T-Zellen vermittelt werden.^{13,14} Es konnte eine Korrelation des Schweregrads der klinischen Symptome mit der Anzahl aktivierter CD4+ T-Zellen und eosinophiler Granulozyten in der BAL¹⁵ sowie den Prozentsätzen IL5-produzierender CD4+ T-Zellen und eosinophiler Granulozyten im Blut¹⁶ von Asthmatikern festgestellt werden.

CD4+ T-Zellen können die immunologische Reaktion durch Synthese von Zytokinen steuern und wurden zunächst entsprechend ihres Zytokinsekretionsmusters in T-*helper* (Th)1- und Th2-Zellen unterteilt. Dieses ursprünglich an murinen CD4+ T-Zellen beobachtete Phänomen¹⁷ ließ sich weitestgehend auf humane T-Zellen übertragen¹⁸ und kann auch zur Charakterisierung von CD8+¹⁹ und T-Lymphozyten²⁰ verwendet werden. Inzwischen wurde dieses Konzept um die Klasse der Th17-Zellen erweitert.²¹ Eine weitere Klasse stellen regulatorische CD4+ T-Zellen dar, die die Immunreaktion mit inhibitorischen Zytokinen bremsen können.⁶

EINLEITUNG

Th1-Zellen zeichnen sich durch die Sekretion der Zytokine IL-2, IL-12, Interferon-*gamma* (IFN- γ) und Tumor-Nekrose-Faktor-*alpha* (TNF- α) aus und können so die zelluläre Immunantwort regulieren. Th2-Zellen sezernieren unter anderem die Zytokine IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13.⁶ Einige Zytokine werden von beiden Th-Populationen gebildet, wie z. B. *granulocyte-macrophage colonie-stimulating-factor* (GM-CSF) und IL-3.⁶ In Zusammenhang mit Asthma bronchiale wird insbesondere Th2-Zellen ein hohes Maß an Pathogenität zugesprochen.⁵ Th2-Zytokine sind für die Induktion der humoralen allergischen Immunantwort wichtig und unterstützen im Verlauf die entzündliche, zelluläre Infiltration der Atemwege (Kap. 1.2).⁶ Neben einer gesteigerten Synthese von Th2-Zytokinen in humanen T-Zellen²² scheint jedoch auch eine gesteigerte Synthese von Th1-Zytokinen für die Exacerbation des allergischen Asthmas relevant zu sein.^{5,23} Am murinen Asthma-Modell wurden nach Induktion der Atemwegsentzündung mit Ovalbumin in der BAL sowohl Th1- als auch Th2-Zellen nachgewiesen. In diesem Kontext wurde auch für Th1-Zellen eine Förderung der Atemwegsentzündung beschrieben.²⁴ Die *in vitro* Untersuchung zeigte eine synergistische Wirkung von TNF- α und IL-4 auf die Bildung von Eotaxin in humanen bronchialen Epithelzellen²⁵ sowie auf die Expression von *vascular-cell-adhesion-molecule* (VCAM)-1 auf humanen Nabelschnurvenenzellen,²⁶ die migratorisch wichtige Moleküle für Immunzellen der Atemwegsinflammation darstellen.^{25,26}

Inzwischen gelten auch Th17-Zytokine als pathologisch relevant für das Asthma bronchiale. Am murinen Modell wurde nachgewiesen, dass in Anwesenheit von Th17-Zellen die durch Th2-Zellen vermittelte Atemwegsentzündung intensiviert wird.²⁷ Eine Studie an Asthmatikern zeigte, dass in der peripheren Blutzirkulation CD4+ T-Zellen, die sowohl Th2- als auch Th17-Zytokine bildeten, zahlreich nachweisbar waren und über IL-4 die Produktion von Th2-Zytokinen in Th17-Zellen angeregt wurde.²⁸

1.3.2 CD8+ T-Lymphozyten

T-Zellen mit Koexpression von CD8 können nach Antigenpräsentation über MHC-Klasse-I-Moleküle veränderte oder organismusfremde Zellen durch Perforin-induzierte Lyse oder Induktion der Apoptose beseitigen. Am murinen Modell konnte eine Präsentation von Ovalbumin über MHC-Klasse-I-Moleküle demonstriert werden, welches so auch für CD8+ T-Zellen erkennbar war und diese aktivierte.²⁹ Über die Synthese von Zytokinen

EINLEITUNG

des Th1- als auch des Th2-Profiles können CD8+ T-Zellen die Immunreaktion beeinflussen und werden entsprechend auch T-cytotoxic (Tc)1- oder Tc2-Zellen genannt (Kap. 1.3.1).

CD8+ T-Zellen wurden in der BAL von Asthmapatienten und asthmainduzierten Balb/c-Mäusen nach Allergenprovokation nachgewiesen.¹¹ An Balb/c-Mäusen wurde festgestellt, dass nach Sensibilisierung und Allergenprovokation mit Ovalbumin die Expression von CD8 in den Atemwegen fast ausschließlich auf T-Zellen erfolgt.³⁰ Die Bedeutung der CD8+ T-Zellen für den klinischen Verlauf des Asthmas wird kontrovers diskutiert. CD8+ T-Zellen wurden einerseits bei milder Ausprägung der Erkrankung zahlreicher in der BAL nachgewiesen, als bei stärker ausgeprägter Erkrankung im Hinblick auf die respiratorische Funktion.³¹ Es konnte allerdings auch eine positive Korrelation ihrer Anzahl in bronchialen Biopsien mit dem Grad der Einschränkung der Lungenfunktion im Sinne eines herabgesetzten forcierten expiratorischen Volumens in 1 Sekunde (FEV1) festgestellt werden.³² Die Relevanz der CD8+ T-Zellen scheint gegenüber CD4+ T-Zellen zurück zu stehen im Hinblick auf ihre am murinen Asthma-Modell¹² und an Asthmatikern³³ demonstrierte deutlich geringer ausgeprägtere Aktivierung im Vergleich zu CD4+ T-Zellen in den Atemwegen nach Allergenprovokation.

Am Ratten-Modell des Asthma bronchiale wurde gezeigt, dass CD8+ T-Zellen mit der Entwicklung einer Allergentoleranz im Sinne einer reduzierten IgE-Bildung in Verbindung stehen.³⁴ Auch eine Suppression der eosinophilen Atemwegsentszündung und der AHR durch CD8+ T-Zellen wurde bei Ratten anhand des Asthma-Modells beschrieben.^{35,36} An murinen Asthma-Modellen wurde jedoch auch eine Förderung der eosinophilen Atemwegsinfiltration und der AHR durch CD8+ T-Zellen demonstriert und eine Synthese von Th2-Zytokinen in pulmonalen CD8+ T-Zellen detektiert.^{37,38} Am murinen Asthma-Modell konnte nachgewiesen werden, dass CD8+ T-Zellen während der Initialisierung der Sensibilisierung die Entwicklung einer allergischen Reaktion hemmen können. In diesem Kontext wurde der Gegenwart von CD8+ T-Zellen eine Inhibition der eosinophilen Atemwegsinfiltration, eine herabgesetzte AHR und eine verminderte Synthese von IgE und IgG1 zugeschrieben.³⁰

1.3.3 T-Lymphozyten

T-Zellen kommen durch ihre epitheliale Ansiedlung ständig in Kontakt mit externen Antigenen und können aufgrund ihres engen räumlichen Kontaktes mit Makrophagen und dendritischen Zellen eine erste spezifische Immunabwehr leisten.³⁹ Über die Ausbildung

EINLEITUNG

von MHC-Klasse-II-Molekülen können sie auch direkt Antigene präsentieren.⁴⁰ Für T-Zellen werden zytotoxische ebenso wie immunregulative Effekte durch Sekretion verschiedener Zytokine beschrieben.⁴¹

Bei Asthmatikern wurden T-Zellen in der BAL⁴² und im Sputum⁴³ gegenüber gesunden Individuen in erhöhter Anzahl nachgewiesen. Die in der Literatur beschriebenen, zum Teil gegensätzlichen Effekte von T-Zellen im Rahmen der Atemwegsentzündung können teilweise durch die Existenz verschiedener -Subklassen erklärt werden.⁴¹ In der murinen Lunge herrschen die Vy4+ und die Vy6+ Subklasse vor, die Vy1+ Subklasse kommt vorwiegend in Milz, Lymphknoten und Blutzirkulation vor.⁹ Unter bestimmten Bedingungen konnte bei C57BL/6-Mäusen eine gesteigerte Einwanderung eosinophiler Granulozyten in das bronchoalveoläre Lumen und eine erhöhte Konzentration von Th2-Zytokinen nach Behandlung mit Ovalbumin auf die Anwesenheit von Vy1+ T-Zellen zurückgeführt werden. In diesem Kontext wurde auch eine Förderung der AHR durch Vy1+ T-Zellen beschrieben.⁴⁴ Diese Zellsubpopulation kann auch die Bildung von IgE im Rahmen der murinen Atemwegsentzündung nach Behandlung mit Ovalbumin fördern.⁴¹ Am murinen Modell konnte nach Applikation von Ovalbumin eine AHR-Suppression der pulmonal zahlreich vertretenen Vy4+ Subklasse zugeschrieben werden.⁴⁵ Die Vy6+ Klasse ist nach inflammatorischen Ereignissen vermehrt in verschiedenen Geweben nachzuweisen⁴¹ und spielt möglicherweise auch bei allergischem Asthma bronchiale eine Rolle.

Nachdem T-Zellen in frühen Immunreaktionsstadien einen wichtigen Promotor darstellen, können sie auch einer prolongierten immunologischen Reaktion hemmend entgegenwirken.⁴⁶ Dies wird unter anderem durch die Vy1+Subklasse vermittelt, die über den TZR in Kontakt mit Makrophagen treten und nach ausreichender Antigenelimination im Verlauf der Immunantwort die mit Erregern beladenen Makrophagen abtöten kann.⁴⁷ Eine wichtige Rolle kommt T-Zellen letztlich bei der Regeneration von geschädigtem Lungengewebe zu⁴⁸ und im Bereich des Darmepithels wurde die Regeneration durch Sekretion von *keratinocyte-growth-factor* (KGF) aus T-Zellen nachgewiesen.⁴⁹

1.4 Stress

Die phasenhaft ablaufende Reaktion des Organismus auf verschiedene unspezifische Reize, die eine Anpassungsreaktion provozieren, wurde von Hans Selye 1936 als „generelles Adaptionssyndrom“ bezeichnet und führte zur Entwicklung des Begriffes

EINLEITUNG

„Stress“.⁵⁰ Diese Reize können physikalischer Art (Lärm, Kälte, Hitze) als auch psychischer Natur (Versagensängste, Befürchtungen, Erwartungshaltungen) sein. Dabei unterscheiden sich Individuen hinsichtlich der subjektiven Wahrnehmung der jeweiligen Situation und ihrer *coping* (Stressbewältigungs)-Strategien. Lazarus prägte den Begriff des transaktionalen Stressmodells, in welchem kognitiven Prozessen bei der Bewertung und Bewältigung einer Stress-Situation eine große Bedeutung zukommt.⁵¹

Im Zuge der stressbedingten Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (HHNR)-Achse und des sympathiko-adrenergen Systems (SAS) steigt die Konzentration von *corticotropin-releasing hormone* (CRH), *adrenocorticotrophic hormone* (ACTH), Corticosteroiden und Katecholaminen im Organismus. Die Syntheseprodukte dieser Achsen können sich gegenseitig im Sinne eines positiven Feedbacks beeinflussen und stehen in reziproker Verbindung mit verschiedenen durch Stress aktivierbaren neuronalen Systemen des nicht-adrenergen nicht-cholinergen Systems (NANC) (cholinerge Neuronen, serotoninerge Neuronen, Opioid Peptid System).⁵² Zum NANC lässt sich auch die durch Stress aktivierbare Neurotrophin-Neuropeptid-Achse zählen, die ebenfalls in positiver reziproker Verbindung mit der HHNR-Achse und dem SAS steht. In diesem Zusammenhang wurde nach Stress am murinen Modell eine erhöhte Konzentration von Substanz P (SP) in stressverarbeitenden Regionen des zentralen Nervensystems⁵³ und in sensiblen Neuronen der vagalen Ganglien der Atemwege beschrieben.⁵⁴ Beim Menschen wurde nach Stress eine erhöhte Konzentration von *nerve-growth-factor* (NGF)⁵⁵ und SP⁵⁶ im Blut beobachtet. Die Induktion von SP-positiven kutanen sensiblen Nervenfasern konnte am murinen Modell durch Stress oder Applikation von NGF provoziert werden.⁵⁷

1.5 Stress und das Immunsystem

Die enge Verbindung zwischen Nerven- und Immunsystem unterstützt die Funktionalität des Immunsystems. Aktivierte Immunzellen kommunizieren über die Sekretion von Botenstoffen mit dem Nervensystem. Zentrales und peripheres Nervensystem wiederum beeinflussen den Aktivitätszustand der verschiedenen Bestandteile des Immunsystems und regulieren die immunologische Reaktion.⁵⁸ Der Begriff der neurogenen Entzündung besagt, dass entzündliche Vorgänge durch Substanzen, die aus sensorischen Nervenfasern freigesetzt werden, wie z.B. SP, über die Aktivierung von Mastzellen und

EINLEITUNG

anderen Entzündungszellen gefördert werden können. Stress kann diese Prozesse begünstigen.⁵⁹

Eine Vielzahl von Neuromediatoren wie Noradrenalin, Acetylcholin und verschiedene Stoffe des NANC, wie z.B. das Neuropeptid SP konnten in menschlichen Atemwegen nachgewiesen werden. Nach Allergenprovokation wurde in den menschlichen Atemwegen das Neurotrophin NGF in erhöhter Konzentration gemessen. An verschiedenen Tiermodellen konnte die Beteiligung von Neuropeptiden im Rahmen der allergischen Atemwegsentzündung demonstriert werden.⁶⁰ Bei Asthmatikern wurden SP-haltige Fasern in den Atemwegen nachgewiesen.⁶¹

Zur Untersuchung der pathophysiologischen Auswirkungen von psychologischem Stress wurden Situationen geschaffen, wie z. B. der *Trier social stress test* (TSST), der als psychosoziale Komponente eine freie Rede vor Zuhörerschaft und als mentale Komponente das Lösen von Kopfrechenaufgaben beinhaltet. Auch natürliche Stress-Situationen, wie z. B. Examina oder das Erleben schwieriger Situationen (z.B. Pflege oder Verlust einer ernsthaft erkrankten, nahe stehenden Person) wurden häufig herangezogen.⁶²

Mit der stressbedingten Aktivierung verschiedener Systeme steigt die Konzentration neuroaktiver Stoffe, die die Immunreaktion modulieren können. Immunzellen wie z. B. T-Zellen, Mastzellen, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen können durch diese „Stressbotenstoffe“, die den Zielort über die Blutbahn, die Innervation lymphatischer Organe oder direkte Zellkontakte erreichen, beeinflusst werden.^{52,63,64} Im Rahmen tierexperimenteller Untersuchungen wurde eine Verdichtung der katecholaminergen Innervation der Lymphknoten insbesondere im T-Zell-reichen Paracortex durch Anregung der Produktion von NGF nach Stressexposition nachgewiesen und in Verbindung mit einer reduzierten Virusabwehr gesehen.⁶⁵ Auch Veränderungen der kutanen Innervation im Sinne einer gesteigerten Dichte SP-haltiger Fasern wurden am murinen Modell nach Stress festgestellt.⁶⁶ Im Rahmen der kutanen Entzündung wurde am murinen Modell eine erhöhte Expression von NGF nach Stress in der Haut beobachtet.⁶⁷

Die Wirkung der Stressmediatoren auf die Immunantwort hängt vom Aktivitätsgrad der Immunzellen, dem Grad der Ausbildung von Rezeptoren für Stressmediatoren,⁶³ ihrer Einwirkdauer im Sinne akuter oder chronischer Stressexposition⁶² und dem relativen Zusammenspiel der verschiedenen Stressmediatoren ab.⁶⁸

EINLEITUNG

Während von Black die These vertreten wurde, entzündliche Vorgänge können gänzlich durch Stress verursacht werden,⁵⁹ wurde von Chen und Miller in Bezug auf das Asthma bronchiale Stress mehr eine die Immunantwort modulierende Rolle zugeschrieben.⁴ So manifestiert sich Stress bei bereits bestehendem Asthma bronchiale hinsichtlich der Modulation immunologischer Parameter anders als bei gesunden Individuen.⁶⁹ Veränderungen auf der Ebene der stressverarbeitenden Systeme im Rahmen des Asthmas werden auch in Zusammenhang mit einer Disposition bezüglich der Entwicklung allergischer Erkrankungen gesehen.^{70,71}

In Verbindung mit Stress wurde häufig eine Intensivierung von Allergien beobachtet, basierend auf einer stressbedingten Verschiebung der Th1/Th2-Balance zugunsten der Th2-Immunantwort.^{62,72} Im Falle des Asthma bronchiale ist die Verschlechterung der klinischen Symptomatik bei Stressbelastung vielfach beobachtet worden.^{4,73} In einer Übersichtsarbeit von Chen und Miller wird der stressbedingten Exacerbation der Erkrankung eine intensiverte Entzündung der Atemwege als morphologisches Korrelat zugrunde gelegt. Verschiedene Möglichkeiten der Manifestation von Stress werden diskutiert und für diverse immunologische Parameter eine Stressempfindlichkeit postuliert. Einige von Chen und Miller dargestellte Arbeiten, deren Gegenstand die Untersuchung von Zellen der peripheren Blutzirkulation bzw. des Sputums von Asthmatikern ist, legen eine gesteigerte entzündliche Reaktion im Sinne einer vermehrten Anzahl eosinophiler Granulozyten und einer erhöhten Konzentration von Th2-Zytokinen unter dem Einfluss von Stress nahe.⁴ Am murinen Asthma-Modell konnte bisher neben einer intensivierten Entzündung der Atemwege mit einer gesteigerten Anzahl eosinophiler Granulozyten in der bronchoalveolären Lavage ebenso eine Verstärkung der AHR nach Stressexposition demonstriert werden.⁷⁴

Für einige T-Zell-vermittelte Erkrankungen wurde in Zusammenhang mit einer klinischen Verschlechterung nach Stress auch eine Stressreagibilität verschiedener immunologischer Parameter beschrieben. Bei Patienten, die an Psoriasis erkrankt waren, konnten nach Stressexposition in Form des TSST vermehrt CD4+ T-Zellen und Monozyten im Blut nachgewiesen werden.⁷⁵ Eine erhöhte Stressreaktivität von CD8+ T-Zellen in der Blutzirkulation wurde im Rahmen der Atopischen Dermatitis (AD) und der Psoriasis im Vergleich zu gesunden Probanden festgestellt.⁷⁶ Im Kontext der rheumatoiden Arthritis kann Stress den proinflammatorischen Charakter des Zytokinmilieus mit einer erhöhten Serumkonzentration von TNF- betonen.⁷⁷

EINLEITUNG

T-Zellen werden als zentrale Regulatoren der allergischen Reaktion im Rahmen des Asthmas betrachtet und könnten somit einen wichtigen pathophysiologischen Angriffspunkt für Stress repräsentieren. Ob Stress die Entzündung der Atemwege über eine Modulation der zeitlichen Entwicklung von T-Zellinfiltraten im pulmonalen Gewebe fördert, bleibt nach dem Kenntnisstand während der experimentellen Untersuchung im Rahmen dieser Arbeit offen.

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Stress auf den phasenhaften Verlauf, bzw. die Kinetik von verschiedenen Zellpopulationen, proliferierenden und apoptotischen Zellen im pulmonalen Gewebe anhand des murinen Asthma-Modells zu erfassen und auf seine pathogenetische Relevanz zu überprüfen.

Für die Umsetzung dieses Ziels wählten wir ein bereits etabliertes, murines Asthma-Modell auf Basis einer intraperitonealen (i.p.) Sensibilisierung mit Ovalbumin und anschließender Provokation über die Atemwege.⁷⁸ Auf dieser Grundlage wurde ein murines Stress-Asthma-Modell weiterentwickelt. Als Stressor wurde in diesem Modell hochfrequenter Schall eingesetzt, da dieser experimentell relativ gut anwendbar, effizient und bereits gut untersucht worden ist. Mehrfach wurde unter den hier gewählten Versuchsbedingungen mit i.p. Sensibilisierung und Allergenprovokation über die Atemwege an verschiedenen murinen Genotypen, der CBA/J-⁷⁴ und Balb/c-Mausgenotyp⁷⁹ eingeschlossen, bereits eine Intensivierung der AHR und der Entzündung der Atemwege nach Stressexposition in Form von Schall festgestellt. Aufgrund des hohen invasiven Charakters der Untersuchung der tieferen Atemwege mittels BAL oder Gewebeuntersuchungen sind Studien am Tiermodell einfacher realisierbar. Die für die LAR des allergischen Asthmas typische Einwanderung von Entzündungszellen in die Atemwege ist am murinen Modell gut zu untersuchen und erlaubt einen, wenn auch bedingten, Vergleich mit den pathophysiologischen Veränderungen beim Menschen.⁸⁰

Im Einzelnen wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Mittels histopathologischer Untersuchung wurde die im Rahmen der murinen pulmonalen Inflammation vorwiegend auf T-Zellen vorhandene Expression von CD4 und CD8 (Kap. 1.3.1, Kap. 1.3.2, Kap. 5.8) sowie die Expression des T-Zellrezeptors in bronchialem und alveolärem Gewebes untersucht und so der Grad der Entzündung in

EINLEITUNG

Stress- und Kontrollgruppen miteinander verglichen. Für die untersuchten Parameter wurden Unterschiede bezüglich der Stressreaktion insbesondere peribronchial vermutet, da hier ein dichtes neuronales Netzwerk besteht.⁶⁰

- Für CD4+ Zellen wurde eine vermehrte Anzahl nach Stress vermutet.
- Für T-Zellen und CD8+ Zellen wurde untersucht, ob Unterschiede hinsichtlich ihrer Anzahl zwischen Stress- und Kontrollgruppen bestehen.
- Um die Anzahl von CD4+ Zellen und CD8+ Zellen in Relation zu bringen, wurde die CD4/CD8-Ratio ermittelt. Es wurde untersucht, ob Stress die CD4/CD8-Ratio verändert.

2. Es wurde untersucht, ob Stress die Anzahl proliferierender und apoptotischer Zellen im Lungengewebe verändert.

3. Die Untersuchung der BAL diente dem Nachweis der Entzündung der Atemwege nach Sensibilisierung und Allergenprovokation auf der Basis eines etablierten Modells.⁷⁸ Die Reproduzierbarkeit einer bereits beobachteten erhöhten Anzahl eosinophiler Granulozyten nach Stress⁷⁴ und die Stressreaktivität der übrigen Leukozytenpopulationen (Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen) in der BAL wurde ebenfalls untersucht.

4. Hat Stress Auswirkungen auf die zeitliche Entwicklung (Kinetik) von CD4+ Zellen, CD8+ Zellen, T-Zellen, CD4/CD8-Ratio, Apoptose und Proliferation im Lungengewebe sowie auf die Kinetik der Leukozyten in der BAL?

Der Beobachtungszeitraum ab 6 h bis 96 h nach Allergenexposition über die Atemwege erscheint für die Untersuchung eventueller Effekte von Stress auf den Verlauf der entzündlichen Atemwegsinfektion im Rahmen der LAR angemessen.

MATERIAL

2 Material

2.1 Tiere

6-8 Wochen alte, weibliche Balb/c Mäuse (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (Bg.VV), Berlin).

2.2 Arbeitsmaterialien und Geräte

Deckgläser	Menzel, Braunschweig
Deckplättchen (Immunfluoreszenz)	Intergen, New York, USA
Deckplättchen (Immunhistochemie)	Hypersil, Aschaffenburg
Dreiwegehahn	Braun, Melsungen
Düsenvernebler	Pariboy, Pari, Starnberg
Einbettmedium Tissue Tek	Sakura Finetek, Torrance, CA, USA
Eindeckmedium Vecta Shield	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Eppendorf-Röhrchen	Eppendorf, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Jena
Injektionsnadeln (0,40 x 20 mm)	Braun, Melsungen
Lichtmikroskop Axiophot	Zeiss, Jena
Kamera Axio Cam HRc	Zeiss, Jena
Kaisers Glyceringelatine	Merck, Darmstadt
Kanüle (0,55 x 25 mm)	Terumo, Leuven, Belgien
Kryostat	HM 500 OM, Microm, Walldorf
Objektträger Superfrost	Menzel, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Plastikkammer (20 x 20 x 15 cm ³)	Eigenanfertigung
Schallgerät	Conrad Elektronik, Berlin
Spritzen (1 ml)	Braun, Melsungen
Zellzähler	Beckmann Coulter, Krefeld
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg

MATERIAL

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Aceton	Merck, Darmstadt
Aluminiumkaliumsulfat-dodecahydrat	Merck, Darmstadt
3-Aminopropyltriethoxysilan	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Aqua destillata	Merck, Darmstadt
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Roche, Mannheim
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Formalin 10%	Merck, Darmstadt
Hämatoxylin	Merck, Darmstadt
HCL 0,2 N	Sigma-Aldrich, Steinheim
KCL	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
Levamisol	Merck, Darmstadt
Naphtol AS-BI Phosphat	Merck, Darmstadt
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt
NaCl	Merck, Darmstadt
NaIO ₃	Merck, Darmstadt
NaNO ₂	Merck, Darmstadt
Neufuchsin	Merck, Darmstadt
Propandiol	Merck, Darmstadt
Tris Base	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris HCL	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zitronensäure	Merck, Darmstadt

2.4 Bioreagenzien

Steriler Dulbecco- <i>phosphat-buffer-saline</i> (PBS)	Biochrom, Berlin
Hühner-Ovalbumin Grad IV	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

MATERIAL

Hühner-Ovalbumin Grad V	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Al(OH) ₃	Alum Imjet Pierce, Rockford, Illinois, USA
Fetales Kälberserum (FKS)	DAKO, Hamburg
Hamsternormalserum (HNS)	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Mausnormalserum (MNS)	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Rattennormalserum (RNS)	DAKO, Hamburg
Ziegennormalserum (ZNS)	Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, USA
Proteinblock	DAKO, Hamburg
Avidin Lösung	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
Biotin Lösung	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA
<i>Avidin-biotin-peroxidase complex</i> (ABC-A/ABC-B)	Vector laboratories, Burlingame, CA, USA

Terminal deoxynucleotidyl-transferase (TdT)-mediated

2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat (dUTP)-nick end labeling (TUNEL)-kit:

Equilibrationspuffer	Intergen, New York, USA
Reaktionspuffer	Intergen, New York, USA
10 µl <i>terminal deoxynucleotidyl-transferase</i> (TdT)	Intergen, New York, USA
Stop/Wasch-Puffer	Intergen, New York, USA

2.5 Antikörper

Primäre Antikörper:

CD8- <i>rat-anti-mouse</i>	BD Pharmingen, Heidelberg
CD4- <i>rat-anti-mouse</i>	BD Pharmingen, Heidelberg
Y -TZR- <i>hamster-anti-mouse</i>	BD Pharmingen, Heidelberg
Ki67- <i>rat-anti-mouse</i>	Monotec GmbH, Hamburg
<i>anti-digoxigenin-fluoresceine</i>	Intergen, New York, USA (in TUNEL-kit enthalten)

MATERIAL

Sekundäre Antikörper:

<i>biotinylated goat-anti-rat</i>	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
<i>biotinylated goat-anti-hamster</i>	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA
<i>goat-anti-rat-rhodamine</i>	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA

2.6 Puffer und Lösungen

Alkalische Phosphatase (AP)- Entwickler (300 ml):

- Tris-Base 1,030 g
- Tris-HCL 0,316 g
- NaCl 1,830 g
- Aqua destillata 210 ml
- Propandiol 75 ml
- Levamisol 0,120 mg
- Naphtol AS-BI Phosphat 0,150 g
- Dimethylformamid 1800 µl
- NaNO₂ 0,060 g
- Aqua destillata 1500 µl
- 0,2 N HCL zur Titration des pH-Wertes auf 8,8
- Neufuchsin 600 µl

Hämalaun (1 L):

- Hämatoxylin 1 g
- NaIO₃ 0,2 g
- Aluminiumkaliumsulfat-dodecahydrat 50 g
- Zitronensäure 1 g
- mit Aqua destillata auf 1 L auffüllen

Phosphat buffered saline (PBS), pH 7,4 (2 L):

- NaCl 16 g
- KCL 0,4 g
- Na₂HPO₄ 2,88 g
- KH₂PO₄ 0,48 g
- mit Aqua destillata auf 2 L auffüllen

MATERIAL

Tris buffered saline (TBS) (1 L):

- Tris Base 0,9 g
- Tris-HCL 6,85 g
- NaCl 8,78 g
- mit Aqua destillata auf 1 L auffüllen

Diff-Quick Färbelösung:

Dade Behring, Marburg

2.7 Software

Digitales Bildsystem (Fluoreszenzmikroskop)	Spot advanced software, Version 3.5.2, Visitron Systems, Puchheim
Digitales Bildsystem (Lichtmikroskop)	AxioVision 4.6, Zeiss, Göttingen
SPSS Statistics Version 12.0	SPSS Inc., IBM, Chicago, USA

3 Methoden

3.1 Tierhaltung

Während des Versuchs wurden die Balb/c-Mäuse in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Campus Virchow in Berlin gehalten. Im Rahmen der Arbeit wurden 60 Mäuse untersucht, die in 10 Gruppen à 6 Tiere nach dem Zufallsprinzip eingeteilt wurden. Die Tiere wurden in Gruppen von je 6 Tieren in einem Käfig gehalten. Ein Tag-Nacht-Rhythmus fand mittels dem Tageslichtspektrum angepasster Beleuchtung mit ultraviolettem (UV) Anteil in 12-stündigem Takt statt. Die Tiere erhielten Ovalbumin-freies Futter und Wasser ad libitum. Die Genehmigung für die Tierversuche wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGetSi) erteilt.

3.2 Versuchsaufbau

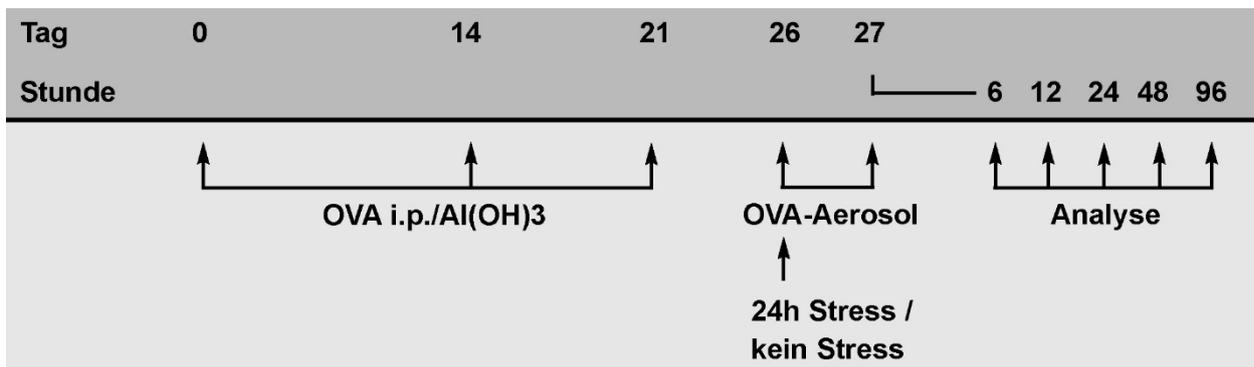


Abb. 1: Versuchsprotokoll. Im Anschluss an die intraperitoneale (i.p.) Sensibilisierung mit Ovalbumin (OVA) an den Tagen 0, 14 und 21 erfolgte die Allergenprovokation über die Atemwege an den Tagen 26 und 27 bei allen Tieren. Ab Tag 26, zeitgleich mit der ersten Allergenprovokation, wurde die Hälfte der Tiere (n = 30) über 24 h Stress in Form von Schall ausgesetzt, während bei der anderen Hälfte der Tiere keine Schallexposition erfolgte. Zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der 2. Allergenprovokation wurden die Tiere getötet und im Anschluss Analysen von Lungengewebe und BAL durchgeführt.

Alle 60 Tiere wurden zunächst mit Ovalbumin (OVA) intraperitoneal (i.p.) sensibilisiert und anschließend erfolgte die Zuordnung der bereits aus je 6 Tieren gebildeten 10 Gruppen zu Stress- bzw. Kontrollgruppen nach dem Zufallsprinzip. 5 Gruppen wurden mit Stress in Form von Schallwellen behandelt (Kap. 3.4) und werden im Folgenden als Stressgruppen bezeichnet. Die übrigen 5 Gruppen wurden keiner Schallexposition unterzogen und werden im Folgenden als Kontrollgruppen bezeichnet. Allen Tieren wurde OVA-Aerosol über die Atemwege an Tag 26 und 27 appliziert. Zu den Zeitpunkten

METHODEN

6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der 2. Allergenexposition über die Atemwege wurde jeweils eine Stress- und eine Kontrollgruppe getötet und Lungengewebe und BAL untersucht.

3.3 Induktion der Atemwegsentzündung

100 µl OVA-Lösung (10 µg OVA Grad IV) wurden mit 100 µl einer Lösung aus Adjuvans (Al(OH)₃ 45 mg/ml) und sterilem PBS (1:3) über einen Dreiwegehahn für 15 Minuten zu einer Suspension gemischt. Unmittelbar danach wurden alle Versuchstiere durch intraperitoneale Injektion von 200 µl der Suspension an den Tagen 0, 14 und 21 des Protokolls sensibilisiert, entsprechend einer etablierten Vorgehensweise.⁷⁸

Die zweimalige Allergenprovokation über die Atemwege an den Tagen 26 und 27 erfolgte mit 5 ml einer Lösung von OVA (Grad V) in PBS (1:100), die den Tieren über 20 min mithilfe eines Verneblers appliziert wurde und so mit einer Tröpfchengröße von 1-2 µm die tiefen Atemwege erreichen konnte.

3.4 Stressexposition

Zeitgleich mit der ersten Allergenprovokation über die Atemwege an Tag 26 wurden 5 Gruppen mit je 6 Tieren, die als Stressgruppen bezeichnet wurden, über 24 h Schallwellen der Frequenz 300 Hz bei 75-80 dB in 4-mal pro min unregelmäßig erfolgenden Pulsen von jeweils 1 Sekunde ausgesetzt. Das Schallgerät befand sich im Käfig der Tiere und die Tiere konnten der Schallquelle nicht ausweichen. Die den Kontrollgruppen zugeordneten Tiere wurden ohne Stressexposition in einem anderen Raum untergebracht. Der Einsatz von Stress in Form von Schallwellen ist ein etabliertes Verfahren.^{79,81,82}

3.5 Tötung und Präparation

Die Tötung der Tiere erfolgte durch zervikale Dislokation. Nach Tötung der Tiere wurden die Lunge und die Trachea freipräpariert. Zunächst erfolgte die Gewinnung der bronchoalveolären Lavage (Kap. 3.6), anschließend wurden die Lungen zur weiteren Untersuchung aufbereitet. Es erfolgte die Aufblähung der Lungen mittels intrabronchialer Einspritzung von 800 µl Einbettmedium (Tissue Tek) im Verhältnis 1:5 in PBS gelöst und die Abbindung der Tracheen zur Entnahme der Lungen. Anschließend wurden die

METHODEN

Lungen in flüssigem Stickstoff schockgefroren (-196 °C), in Einbettmedium aufgebracht und bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung (Kap. 3.9) aufbewahrt.

3.6 Bronchoalveoläre Lavage

Mithilfe der bronchoalveolären Lavage (BAL) können Zellen und lösliche Bestandteile aus dem Respirationstrakt gewonnen werden. Die BAL wurde nach Tötung der Tiere zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 24 h, 48 h und 96 h nach der 2. Allergenprovokation über die Atemwege durchgeführt. Zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten wurden jeweils eine Gruppe mit Stressexposition und eine Gruppe ohne Stressexposition untersucht. Nach Präparation von Lunge und Trachea wurden 2 x 800 µl PBS (4 °C) mit einer Kanüle (0,55 x 25 mm) über die Trachea injiziert und die Atemwege 2-fach gespült. Der dabei aspirierte Inhalt wurde in Eppendorf-Röhrchen überführt, auf Eis gelagert und später bei -80 °C aufbewahrt.

3.7 Zytospin

Zunächst wurden die Objektträger mit 50 µl PBS durch Zentrifugierung (900 g, 1 min) bedeckt. Nach diesem Procedere erfolgte die Zentrifugierung von 50 µl BAL Flüssigkeit auf Objektträger (900 g, 1 min). Die Objektträger wurden nach Zentrifugierung über 24 h luftgetrocknet und im Anschluss mit Diff-Quick nach den Angaben des Herstellers gefärbt.

Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch bei 500-facher Vergrößerung anhand morphologischer Kriterien und berücksichtigte eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen. Mithilfe eines Zellzählers erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl in der BAL.

3.8 Gewebepräparation

Die präparierten Lungen wurden bei -20 bis -25 °C in 8 µm dünne Scheiben mittels Kryostat gefriergeschnitten und auf Objektträger (Superfrost) faltenfrei aufgebracht. Anschließend wurden sie beschriftet, 10 min in Aceton fixiert, luftgetrocknet und bei -20 °C eingefroren.

Die für die nach der *terminal deoxynucleotidyl-transferase* (TdT)-mediated 2'-Deoxyuridin 5'-Triphosphat (dUTP)-nick end labeling (TUNEL)-Methode und für die

METHODEN

Immunfluoreszenzfärbung Ki67-positiver Zellen vorgesehenen Schnitte wurden gesondert weiterbehandelt, sie wurden auf zuvor silanisierte Objektträger aufgebracht.

3.9 Immunhistochemie

Die immunhistochemische Färbung wurde zur Darstellung von CD4+, CD8+ und T- Zellen eingesetzt.

Alle verwendeten Antikörper wurden bei 4 °C aufbewahrt und jeweils kurz vor Anwendung entsprechend gelöst. Die auf Objektträger aufgebrachten Schnitte wurden zunächst aufgetaut und in TBS gewaschen. Danach wurde jeder Objektträger zunächst mit 3 Tropfen Avidinlösung für 15 min bei Raumtemperatur (RT) behandelt, anschließend in TBS gewaschen und die gleiche Prozedur mit 3 Tropfen Biotinlösung durchgeführt. Nach Waschung in TBS wurde ein Proteinblock aufgetragen, um unspezifische Bindungen des Antikörpers mit dem Gewebe zu unterbinden. Dieser wirkte für 20 min bei RT ein. Anschließend wurde der entsprechende primäre Antikörper in TBS und FKS 1% gelöst (CD4- und CD8-*rat-anti-mouse*: 1:100, TZR-*hamster-anti-mouse*: 1:70) und für 1 h bei RT inkubiert. Danach wurden die Schnitte in TBS gewaschen. Daraufhin erfolgte die Zugabe der sekundären, biotinylierten Antikörper, die in TBS, MNS 4% und ZNS 2% gelöst wurden (CD4-, CD8-*goat-anti-rat*: 1:200, TZR-*goat-anti-hamster* 1:70) und die Inkubation für 30 min bei RT. Danach wurde mit TBS gespült. Der *avidin-biotin-peroxidase complex* (ABC) mit den Komponenten ABC-A und ABC-B wurde jeweils im Verhältnis 1:100 in TBS gelöst und reifte über 30 min vor, wurde dann aufgebracht und wirkte für 30 min bei RT ein, danach wurden die Schnitte in TBS gewaschen. Anschließend erfolgte ein Bad der Schnitte für 20 min im kurz zuvor angesetzten AP-Entwickler mit anschließender Spülung in TBS. Zur Färbung wurde ein Bad in Hämalaun für 3 min durchgeführt, dann wurden die Objektträger in Leitungswasser gewaschen.

Zur Negativkontrolle wurde statt der primären Antikörper, die zum Nachweis von CD4 und CD8 eingesetzt wurden, RNS 1:500 in TBS, anstelle des -Antikörpers wurde Hamsternormalserum (HNS) 1:700 in TBS, entsprechend der Konzentration der primären Antikörperlösungen, verwendet. Die Eindeckelung der Schnitte erfolgte in Glyceringelatine.

METHODEN

3.10 Immunhistochemische Fluoreszenz-Markierung

Zum Nachweis apoptotischer und proliferierender Zellen erfolgte eine Doppelfärbung. Die apoptotischen Zellen wurden mittels TUNEL-Färbung, die dem Nachweis freier 3-OH-Gruppen der fragmentierten DNA dient, detektiert. Dies erfolgte in der direkten Fluoreszenzfärbung, bei der die Antikörper direkt mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind. Der Nachweis proliferierender Zellen wurde mithilfe der indirekten Fluoreszenzfärbung über den Nachweis des Proliferationsmarkers Ki67 durchgeführt, indem die Visualisierung Ki67-positiver Zellen durch einen sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper erfolgte.

Alle verwendeten Antikörper wurden bei 4 °C aufbewahrt und jeweils kurz vor Anwendung entsprechend gelöst. Je 20 Objektträger wurden 136 ml Aqua destillata mit 4 ml Stop/Wasch-Puffer angesetzt und bei 37 °C inkubiert. Die Kryoschnitte wurden 10 min in Formalin fixiert, in PBS gewaschen und in Ethanol-Essigsäure (2:1) bei -20 °C über 10 min postfixiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Equilibrationspuffer für 5 min inkubiert, dann mit einer Lösung aus TdT und Reaktionspuffer behandelt und für 60 min bei 37 °C inkubiert, sodass die Katalyse der Bindung der im Reaktionspuffer enthaltenen, Digoxigenin-gekoppelten Nucleotid-Triphosphate an die freien 3-OH-Enden der fragmentierten DNA durch TdT erfolgen konnte. Danach wurden die Objektträger im zuvor vorbereiteten Stop/Wasch-Puffer für 30 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte mit Blocklösung (ZNS 10%) für 20 min behandelt, dann wurde ein primärer Antikörper gegen Ki67, der in TBS und ZNS 2% gelöst wurde (1:100, *rat-anti-mouse*), aufgetragen und über Nacht bei RT inkubiert. Nach dieser Prozedur erfolgte die Waschung mit PBS.

Zur Visualisierung der apoptotischen Zellen wurden die Objektträger mit Anti-Digoxigenin-Fluoreszein, einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper, der mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszein Iso-Thiocyanat (FITC)) konjugiert wurde, für 30 min bei Lichtschutz und RT inkubiert und im Anschluss mit PBS gewaschen.

Zur Visualisierung der proliferierenden Zellen erfolgte die Inkubation der Objektträger mit einem sekundären Rhodamin (Tetramethyl Rhodamin Iso-Thiocyanat (TRITC))-gekoppeltem *goat-anti-rat*-Antikörper, der im Verhältnis 1:200 in PBS mit MNS 4% und ZNS 2% gelöst wurde, für 30 min lichtgeschützt bei RT. Im Anschluss erfolgte die erneute Spülung in PBS. Mittels Inkubation der Schnitte mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol-

METHODEN

dihydrochlorid (DAPI) über 5 min bei RT und Lichtschutz wurde die Kerngegenfärbung durchgeführt. In der Folge wurden die Objektträger mit PBS gespült.

Die Negativkontrolle der TUNEL-Färbung erfolgte durch Auslassen von TdT in der Prozedur, anstelle des Ki67-Antikörpers wurde RNS im Verhältnis 1:500 in PBS verwendet.

Anschließend wurde in einem abgedunkelten Raum ein fluoreszenzprotektives Einbettmedium (Vecta Shield) aufgetragen und die Eindeckelung durchgeführt. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger bei -80 °C eingefroren und innerhalb von 2 Wochen ausgewertet. Mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axioplan) wurden die Fluorochrome angeregt und mit speziellen Filtern für die Emissionsspektren von DAPI (Kernfärbung), FITC (TUNEL) und TRITC (Ki67) detektiert. Apoptotische, FITC-markierte Zellen wurden grün, proliferierende, TRITC-markierte Zellen wurden rot, und die Zellkerne mit DAPI blau dargestellt.

3.11 Zellauszählung

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden mit einem Lichtmikroskop ausgewertet. Die mit der Immunfluoreszenzmethode gefärbten Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in einem abgedunkelten Raum untersucht. Die Fotodokumentation wurde mit integrierter Kamera und digitalem Bildsystem unter Verwendung der üblichen Filter zur Bildoptimierung durchgeführt.

Die Zuteilung der Mäuse zu den einzelnen Gruppen, deren Nummerierung eingeschlossen, sowie das Auszählen der Zellen auf dem Objektträger wurde von zwei unterschiedlichen Personen durchgeführt, sodass ohne Wissen um die Gruppenzuteilung ausgezählt und ausgewertet wurde. Alle Zählungen erfolgten durch dieselbe Person. Bei der Auszählung wurden jeweils Bronchien oder Alveolen betrachtet. Pro Tier/Objektträger wurden je 10 aufeinander folgende Ausschnitte bei 400-facher Vergrößerung auf 1 mm² standardisiert, ausgezählt und die Mittelwerte zur statistischen Berechnung weiterverwendet.

3.12 Datenanalyse

Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Daten wurde die Software SPSS verwendet. Für alle verwendeten statistischen Verfahren wurde das Signifikanzniveau mit

METHODEN

$p < 0,05$ und Tendenzen mit $p < 0,1$ festgesetzt. Die graphische Darstellung der Auszählergebnisse erfolgte in Boxplots mit Darstellung der Gruppenmediane (Q2, mittlerer Balken in der Box), der Quartilen Q1 (untere Begrenzung der Box) und Q3 (obere Begrenzung der Box) sowie als T-förmige Ausläufer der Box die Minimal- und Maximalwerte.

Für den Vergleich von Stress- und Kontrollgruppen wurde der nicht parametrische Mann-Whitney-U-Test für unabhängige Stichproben verwandt. Jede Gruppe hatte die Gruppenstärke $n = 6$. Aus Tierschutzgründen wurden in jeder Gruppe nur 6 Tiere verwendet. Aufgrund der geringen Tieranzahl pro Gruppe konnte nicht von einer Normalverteilung der gemessenen Parameter ausgegangen werden. Als statistische Kenngröße wurde daher der Median gewählt. Im Hinblick auf die geringe Gruppenstärke von $n = 6$ Tiere wurden bei Verwendung des Mann-Whitney Tests Tendenzen vernachlässigt.

Zur Untersuchung des Einflusses der beiden festgelegten Faktoren Stress und Zeit auf die untersuchten Parameter wurde die Varianzanalyse mithilfe des allgemeinen linearen Modells (ALM) durchgeführt (Stress: $n = 30$, Zeit: $n = 12$). Zur Beurteilung der Güte der Anpassung der Modelle wird das Bestimmtheitsmaß r^2 angegeben. Anschließend wurde der zweiseitige post-hoc Dunnett-T-Test durchgeführt, indem die Werte zum ersten Zeitpunkt (6 h nach Allergenprovokation) mit allen darauf folgenden verglichen wurde, da kein Nullwert bestimmt wurde (Stress- und Kontrollgruppe als Einheit mit $n = 12$).

4 Ergebnisse

4.1 Modulation der zellulären Kinetik im pulmonalen Gewebe nach Stress

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgte immunhistochemische Untersuchung des Lungengewebes zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum nach der 2. Allergenprovokation über die Atemwege hinweg eine vorwiegend peribronchiale Ansiedlung aller untersuchten Zellpopulationen (CD4+, CD8+ und T-Zellen) in Stress- und Kontrollgruppen. Die untersuchten Zellpopulationen waren zudem auch in der Nähe von Blutgefäßen und im Bereich der Alveolen auffindbar. CD4+ und CD8+ Zellen waren häufig in Form von Clustern entlang der größeren und kleineren Bronchien nachweisbar (**Abb. 2b, Abb. 3b**) und zeigten mit ihrem gehäuften Vorkommen im Verlauf (**Tab. 2, Abb. 2a, Abb. 3a**) eine Entzündung der Atemwege nach Provokation mit Ovalbumin. Apoptotische (**Abb. 6b**) und proliferierende Zellen (**Abb. 7b**) waren zumeist peribronchial und epithelial angesiedelt.

Um den Einfluss von Stress über den gesamten Beobachtungszeitraum zu erfassen und einen Einfluss des Faktors Zeit zu detektieren, wurde die Varianzanalyse nach dem allgemeinen linearen Modell (ALM) durchgeführt (**Tab. 1**). Mit dem Bestimmtheitsmaß (r^2) wird der Erklärungswert des ALM ausgedrückt. Stress und Zeit waren in diesem Modell insbesondere für CD4+ Zellen signifikante Einflussgrößen mit einem guten Erklärungswert (**Tab. 1**).

Tab. 1: Einfluss von Stress und Zeit auf CD4+, CD8+, T-, apoptotische und proliferierende Zellen im pulmonalen Gewebe.

Parameter	CD4		CD8		CD4/CD8			Apo.		Prol.
	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
Stress	0,003 *	0,003 *	0,005 *	0,122	0,053 t	0,815	0,753	0,313	0,394	0,910
Zeit	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,029 *	0,001 *	0,000 *	0,000 *	0,002*	0,003 *
r²	0,85	0,81	0,48	0,59	0,23	0,37	0,72	0,67	0,27	0,25

Anmerkungen: Angegeben sind nach dem ALM errechnete p-Werte, die das Maß des Einflusses der Faktoren Stress und Zeitpunkt auf die Zellverteilung während des gesamten Beobachtungsraums widerspiegeln. Stress: n = 30, Zeit: n = 12. *: Signifikanz mit $p < 0,05$; t: Tendenz mit $p < 0,1$; r^2 : Bestimmtheitsmaß. A: Alveolen, B: Bronchien, Apo.: Apoptose, Prol.: Proliferation.

Zur weiteren Einschätzung, in welcher Weise sich der Faktor Zeit auf Stress- und Kontrollgruppen zusammengefasst auswirkt, wurde der zweiseitige post-hoc Dunnett-T-Test im Anschluss an die Varianzanalyse im ALM angewendet. So wurde der Verlauf der

ERGEBNISSE

Verteilung der verschiedenen zellulären Subpopulationen im Vergleich zur Zellmenge 6 h nach Allergenprovokation ermittelt (**Tab. 2**). Die weitere Erläuterung der Ergebnisse erfolgt im Folgenden (Kap. 4.1.2-4.1.7).

Tab. 2: Zeitlicher Verlauf der Verteilung von CD4+, CD8+, T-, apoptotischen und proliferierenden Zellen im pulmonalen Gewebe.

Parameter	CD4		CD8		CD4/CD8			Apo.		Prol.
	B	A	B	A	B	A	B	A		
12 h	0,968	0,708	0,424	0,954	0,277	0,989	0,934	1,000	0,922	0,097 t
24 h	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,847	0,675	0,000 *	0,000 *	0,222	0,152
48 h	0,000 *	0,000 *	0,056 t	0,000 *	0,434	0,187	0,000 *	0,000 *	0,121	0,020 *
96 h	0,000 *	0,000 *	0,034 *	0,154	0,007 *	0,000 *	0,000 *	0,000 *	0,253	0,001 *

Anmerkungen: Anhand des zweiseitigen post-hoc Dunnnett-T-Tests wurden die Zellzahlen oben angegebener Parameter in Bronchien und Alveolen von Stress- und Kontrollgruppen zusammengefasst zu den angegebenen Zeitpunkten mit dem frühesten Zeitpunkt nach Allergenprovokation (6 h) verglichen (n = 12 Tiere pro Zeitpunkt). Angegeben sind nach dem post-hoc Dunnnett-T-Test errechnete p-Werte. *: Signifikanz mit $p < 0,05$; t: Tendenz mit $p < 0,1$. B: Bronchien, A: Alveolen, Apo.: Apoptose, Prol.: Proliferation. Erhöhung () oder Reduktion () in Stress- und Kontrollgruppe gegenüber 6 h nach Allergenprovokation.

Der Mann-Whitney Test für unabhängige Stichproben wurde zur Auswertung von Unterschieden zwischen gestressten und nichtgestressten Tieren zu den jeweiligen Zeitpunkten herangezogen (**Tab. 3**). Signifikante Unterschiede der untersuchten Parameter waren ausschließlich in den Bronchien der Tiere festzustellen. Tendenzen wurden bei der niedrigen Gruppenstärke mit $n = 6$ bezüglich der Interpretation der Ergebnisse des Mann-Whitney Tests vernachlässigt.

Tab. 3: Einfluss von Stress auf die Verteilung von CD4+, CD8+, T-, apoptotischen und proliferierenden Zellen im pulmonalen Gewebe

Parameter	CD4		CD8		CD4/CD8			Apo.		Prol.
	B	A	B	A	B	A	B	A		
6 h	0,810	0,748	0,630	0,572	0,631	0,470	0,334	0,808	0,006 *	0,200
12 h	0,025 *	0,688	0,748	0,466	0,337	0,262	0,063 t	0,107	0,297	0,336
24 h	0,025 *	0,078 t	0,872	0,520	0,423	0,337	0,511	0,118	0,199	0,127
48 h	0,065 t	0,521	0,065 t	0,377	0,262	0,873	0,490	0,176	0,293	0,470
96 h	0,229	0,065 t	0,010 *	0,089 t	0,004 *	0,818	0,847	1,000	0,228	0,006 *

Anmerkungen: Anhand des Mann-Whitney Tests für unabhängige Stichproben wurden Stress- und Kontrollgruppen zu jedem Zeitpunkt bezüglich oben angegebener Parameter miteinander verglichen. Angegeben sind nach dem Mann-Whitney Test errechnete p-Werte. Kontroll-/Stressgruppe: $n = 6$. B: Bronchien, A: Alveolen, Apo.: Apoptose, Prol.: Proliferation. *: Signifikanz mit $p < 0,05$. t: Tendenz mit $p < 0,1$. Erhöhung () oder Reduktion () in Stress- gegenüber Kontrollgruppen.

ERGEBNISSE

4.1.1 Stress reduziert peribronchiale CD4+ Zellen

CD4+ Zellen waren in Bronchien und Alveolen der Tiere zahlreicher als CD8+ und T-Zellen. Der überwiegende Anteil der CD4+ Zellen fand sich unabhängig der Gruppenzugehörigkeit und des Zeitpunktes in den Bronchien, überwiegend in Form von Clustern (**Abb. 2b**). Eine signifikante Steigerung der CD4+ Zelldichte im Vergleich zu 6 h nach Allergenprovokation anhand des post-hoc Dunnett-T-Tests war 24 h nach Allergenprovokation in den Bronchien und Alveolen der Stress- und Kontrollgruppen zu sehen und zeigte bis 96 h einen plateauförmigen Verlauf (**Tab. 2, Abb. 2a, Abb. 2b**).

Stress und Zeit zeigten sich in der Varianzanalyse mittels ALM als signifikant einflussreiche Faktoren im Hinblick auf die Verteilung der CD4+ Zellen in Bronchien und Alveolen (**Tab. 1**). In der direkten Gegenüberstellung von Stress- und Kontrollgruppen mittels des Mann-Whitney Tests stellten sich Unterschiede nur peribronchial signifikant dar. Entgegen der zuvor aufgestellten Hypothese einer erhöhten Anzahl von CD4+ Zellen nach Stress war peribronchial die Anzahl von CD4+ Zellen in der Stressgruppe 12 h und 24 h nach Allergenprovokation gegenüber der Kontrollgruppe signifikant reduziert (**Tab. 3, Abb. 2a**). Auf die Verteilung der CD4+ Zellen in den Alveolen hatte Stress nach diesem Modell keinen bedeutenden Einfluss (**Tab. 3, Abb. 2a**).

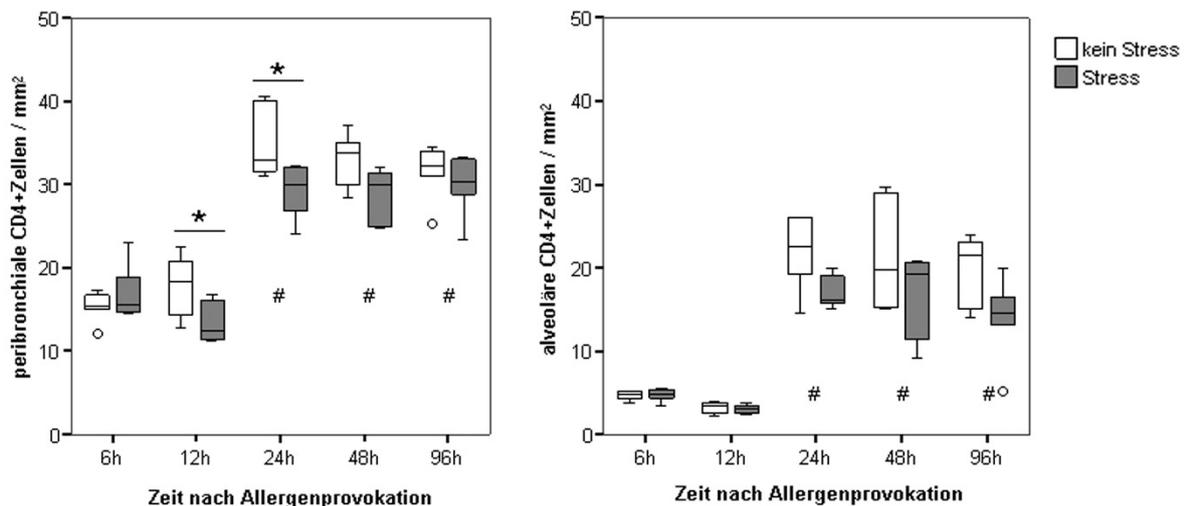


Abb. 2a: CD4+ Zellen in Bronchien und Alveolen. Boxplots mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test, Stress vs. Kontrolle), #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h), °: Ausreißerwert.

CD4

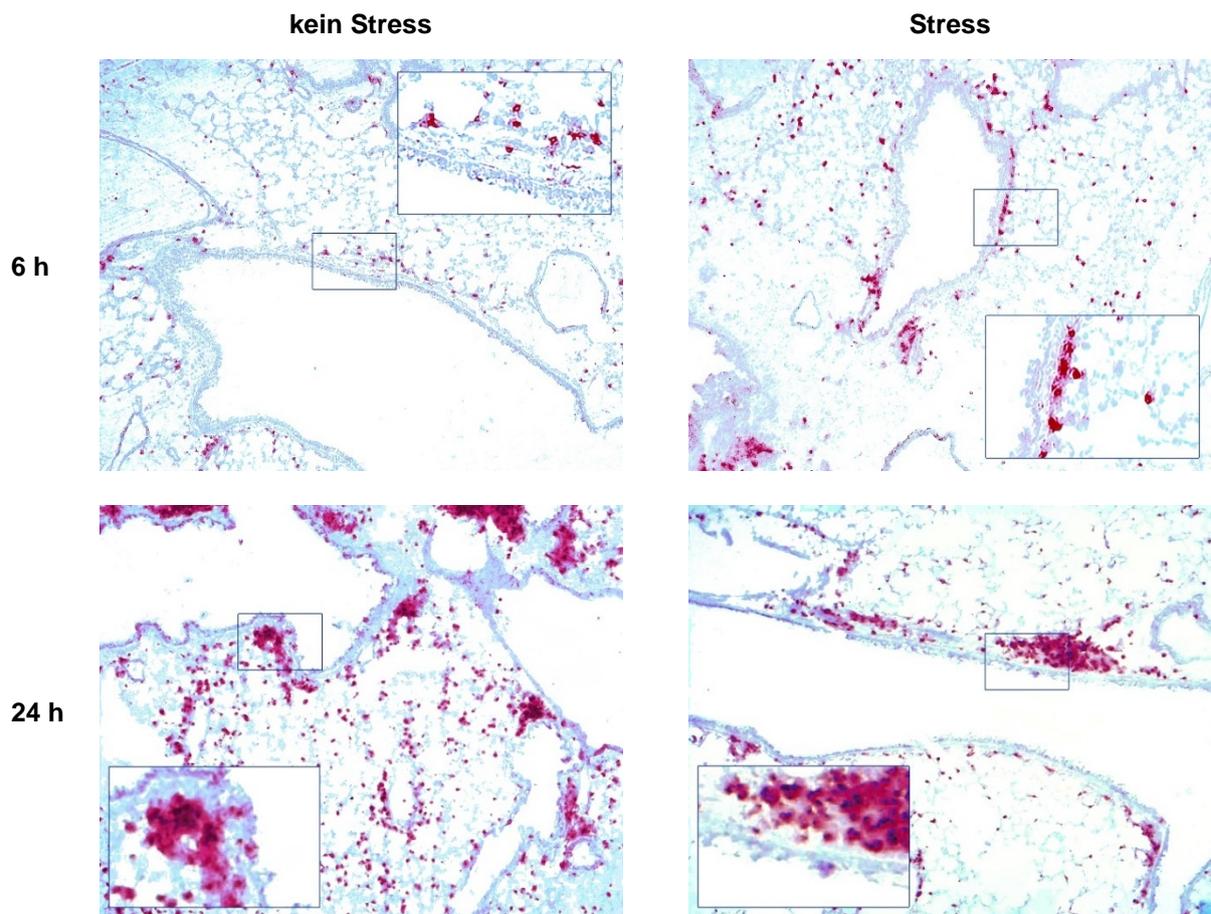


Abb. 2b: Immunohistochemische Färbung von CD4+ Zellen. Zellverteilungen in Kontroll- und Stressgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 24 h) nach Allergenprovokation in pulmonalem Gewebe (50-fache Vergrößerung, markierte Bildausschnitte korrespondieren mit Detailansicht).

4.1.2 Stress reduziert peribronchiale CD8+ Zellen

CD8+ Zellen waren weder in den Bronchien noch in den Alveolen so zahlreich vertreten wie CD4+ T-Zellen. Die Verteilung der CD8+ Zellen in gestressten und nichtgestressten Tieren war durchgängig bronchialbetont und häufig in kleineren und größeren Clustern organisiert (**Abb. 3b**), wie auch bei CD4+ Zellen beobachtet. 24 h nach Allergenprovokation war ein gegenüber 6 h nach Allergenprovokation im Rahmen des post-hoc Dunnett-T-Tests signifikanter Zuwachs von CD8+ Zellen in Stress- und Kontrollgruppen peribronchial und alveolär zu verzeichnen (**Tab. 2, Abb. 3a, Abb. 3b**).

Peribronchial zeigten sich Stress und Zeit im ALM als signifikant auf die Verteilung der CD8+ Zellen einwirkende Faktoren, während alveolär nur der Faktor Zeit signifikanten Einfluss hatte (**Tab. 1**). Stress hatte keinen so deutlichen Einfluss auf die Verteilung der

ERGEBNISSE

CD8+ Zellen in Bronchien und Alveolen verglichen mit CD4+ Zellen, was sich in einem niedrigeren Bestimmtheitsmaß widerspiegelte (**Tab. 1**, ALM).

In den Bronchien der Stressgruppe war im direkten Vergleich mit der Kontrollgruppe anhand des Mann-Whitney Tests die Anzahl der CD8+ Zellen 96 h nach Allergenprovokation signifikant reduziert (**Tab. 3**, **Abb. 3a**). Stress hatte nach diesem Modell auf die Verteilung der CD8+ Zellen in den Alveolen keinen bedeutenden Einfluss (**Tab. 3**, **Abb. 3a**).

Zunächst war 24 h gegenüber 6 h nach Allergenprovokation im Rahmen des post-hoc Dunnett-T-Tests in Stress- und Kontrollgruppe die peribronchiale CD8+ Zelldichte signifikant erhöht (**Tab. 2**, **Abb. 3a**). Während peribronchial 48 h im Vergleich zu 6 h nach Allergenprovokation in der Kontrollgruppe der Median der CD8+ Zellzahl nicht wesentlich variierte, war in der Stressgruppe eine Abnahme zu verzeichnen, mit infolge ausbleibender signifikanter Veränderung in Kontroll- und Stressgruppen gemeinsam im post-hoc Dunnett-T-Test (**Tab. 2**, **Abb. 3a**). Dieser Trend setzte sich fort, mit einer 96 h nach Allergenprovokation signifikant reduzierten CD8+ Zellzahl, während in der Kontrollgruppe der Median weiter anstieg. Der im post-hoc Dunnett-T-Test für Kontroll- und Stressgruppen zusammen errechnete Unterschied peribronchial zum Zeitpunkt 96 h gegenüber 6 h nach Allergenprovokation geht auf eine erhöhte Anzahl von CD8+ Zellen in der Kontrollgruppe zurück (**Tab. 2**, **Abb. 3a**).

Alveolär verlief die Kinetik der CD8+ Zellen in Stress- und Kontrollgruppen konkordant. 24 h und 48 h nach Allergenprovokation war die Anzahl der CD8+ Zellen in Kontroll- und Stressgruppen gegenüber 6 h deutlich erhöht und 96 h nach Allergenprovokation war bei wieder reduzierter Zellzahl in Kontroll- und Stressgruppen kein signifikantes Ergebnis mehr hinsichtlich einer Differenz beider Gruppen zum Ausgangszeitpunkt 6 h nach Allergenprovokation im post-hoc Dunnett-T-Test feststellbar (**Tab. 2**, **Abb. 3a**).

ERGEBNISSE

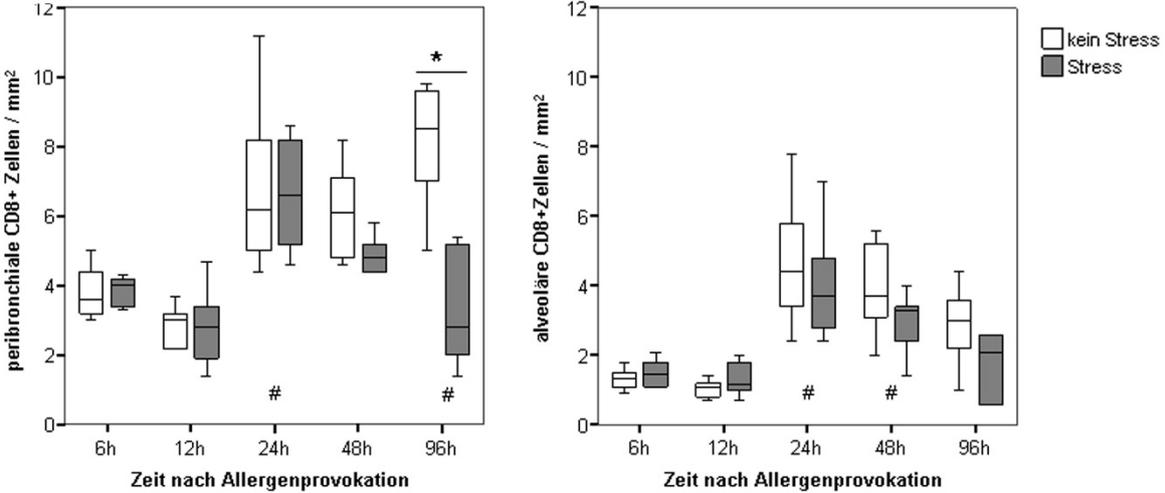


Abb. 3a: CD8+ Zellen in Bronchien und Alveolen. Boxplots mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test, Stress vs. Kontrolle), #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h).

ERGEBNISSE

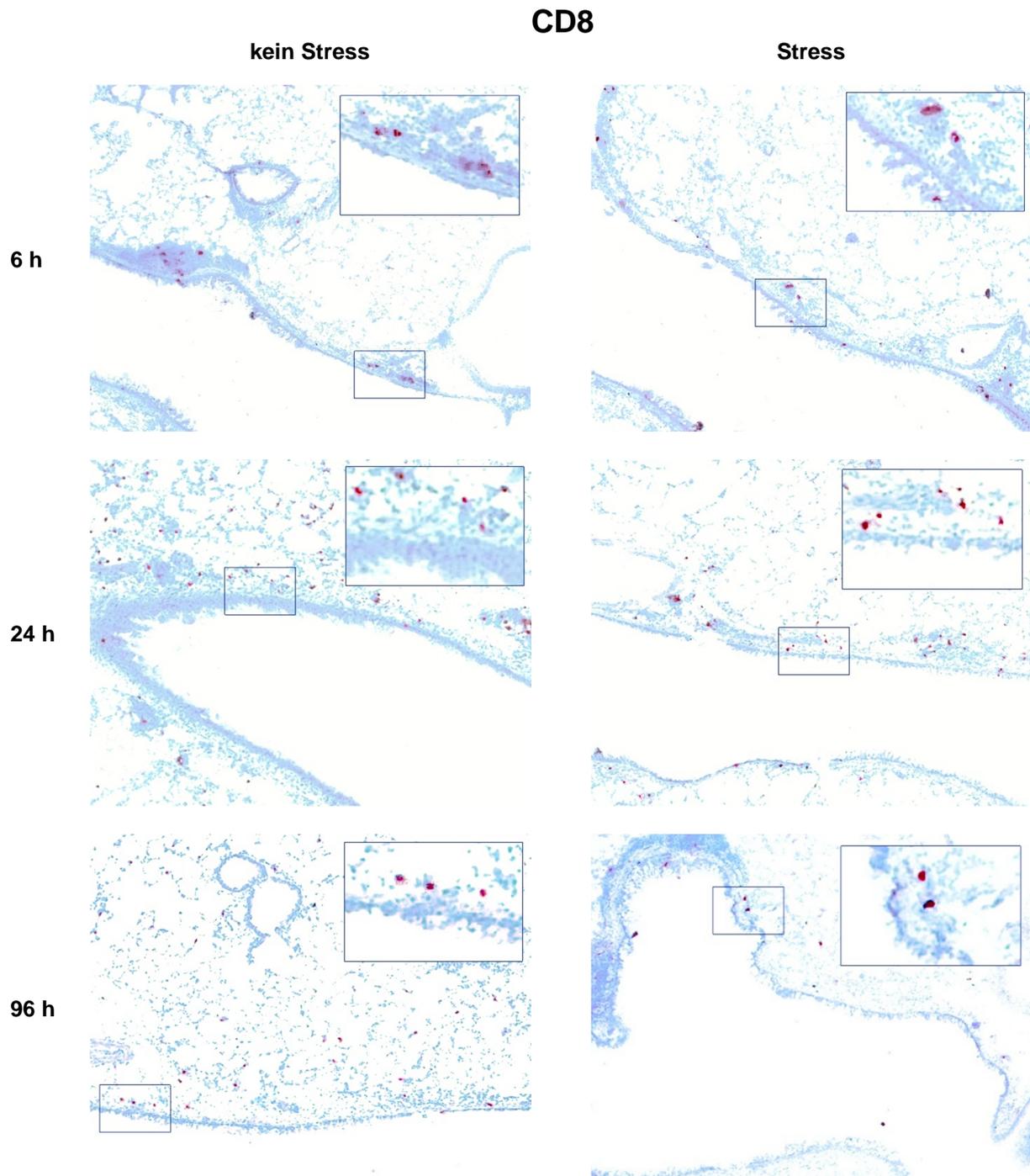


Abb. 3b: Immunohistochemische Färbung von CD8+ Zellen. Zellverteilungen in Kontroll- und Stressgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 24 h, 96 h) nach Allergenprovokation in pulmonalem Gewebe (50-fache Vergrößerung, markierte Bildausschnitte korrespondieren mit Detailansicht).

4.1.3 Stress steigert die peribronchiale CD4/CD8-Ratio

Um die Verhältnismäßigkeit von CD4+ und CD8+ Zellen zu ermitteln, wurde die CD4/CD8-Ratio zu den beobachteten Zeitpunkten in Stress- und Kontrollgruppen

ERGEBNISSE

bestimmt. Die in der grafischen Darstellung angegebenen Werte basieren auf der Berechnung der Quotienten der Mittelwerte für jedes einzelne Tier in der Gruppe.

Das ALM zeigte peribronchial und alveolär eine signifikante Veränderung der CD4/CD8-Ratio im Verlauf der Zeit und einen Einfluss von Stress lediglich im Sinne einer Tendenz im peribronchialen Bereich (**Tab. 1**). Im Vergleich von Stress- und Kontrollgruppen anhand des Mann-Whitney Tests stellte sich peribronchial 96 h nach Allergenprovokation eine in der Stressgruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte CD4/CD8-Ratio in den Bronchien dar (**Tab. 3, Abb. 4**). Dies beruhte vorwiegend auf der 96 h nach Allergenprovokation in der Stressgruppe reduzierten Anzahl peribronchialer CD8+ Zellen (**Abb. 3a**). Die CD4/CD8-Ratio in den Alveolen wurde durch Stress nicht signifikant beeinflusst (**Tab. 3, Abb. 4**).

Peribronchial impliziert die bis 48 h nach Allergenprovokation weitestgehend konstante Entwicklung des CD4/CD8-Quotienten einen überwiegend proportionalen Zuwachs von CD4+ und CD8+ Zellen. 96 h im Vergleich zu 6 h nach Allergenprovokation errechnete sich im post-hoc Dunnett-T-Test eine peribronchial signifikant erhöhte CD4/CD8-Ratio (**Tab. 2, Abb. 4**). Wie in **Abb. 4** veranschaulicht, geht dies auf die Werte der Stressgruppe zurück und erreicht so im ALM, nur ein niedriges Bestimmtheitsmaß ($r^2 = 0,23$; **Tab. 1**).

Alveolär hatten die Werte der CD4/CD8-Ratio in Stress- und Kontrollgruppen ab 12 h bis 96 h nach Allergenprovokation einen kontinuierlich ansteigenden Charakter. 96 h nach Allergenexposition waren die Quotienten in beiden Gruppen zusammen bewertet signifikant gegenüber dem Wert nach 6 h im Rahmen des post-hoc Dunnett-T-Tests erhöht (**Tab. 2**). Da in Stress- und Kontrollgruppen die Anzahl der alveolären CD4+ Zellen ab 24 h bis 96 h nach Allergenprovokation konstant erhöht war (**Abb. 2a**), während sich die Anzahl der alveolären CD8+ Zellen in beiden Gruppen 96 h nach Allergenprovokation rückgängig zeigte (**Abb. 3a**), war der Quotient 96 h im Vergleich zu 6 h nach Allergenprovokation in den Alveolen von Stress- und Kontrollgruppen signifikant erhöht (**Tab. 2, Abb. 4**).

ERGEBNISSE

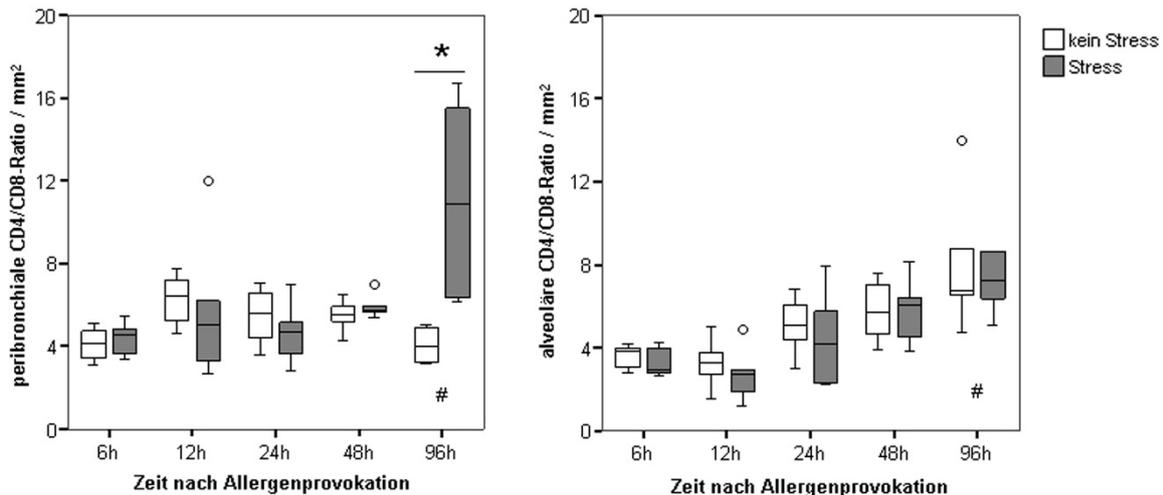


Abb. 4: CD4/CD8-Ratio in Bronchien und Alveolen. Boxplots mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test, Stress vs. Kontrolle), #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h), °: Ausreißerwert.

4.1.4 Keine signifikanten Stresseffekte auf T-Zellen

T-Zellen waren in geringerer Anzahl als CD4+ und CD8+ Zellen nachweisbar und peribronchial zahlreicher als alveolär.

Die Untersuchung der Ergebnisse mittels ALM erbrachte keinen wesentlichen Einfluss des Faktors Stress auf die Verteilung der T-Zellen in Bronchien und Alveolen, zeigte aber eine signifikante Veränderung der Verteilung mit der Zeit (**Tab. 1**). T-Zellen waren vorwiegend in frühen Stadien (6-12 h nach Allergenprovokation) aufzufinden. Ab 24 h im Vergleich zu 6 h nach Allergenprovokation waren sie in Stress- und Kontrollgruppen bronchial und alveolär in signifikant verringerter Anzahl, wie die Ergebnisse des post-hoc Dunnett-T-Tests zeigten, nachzuweisen (**Tab. 2, Abb. 5a, Abb. 5b**).

Die Hypothese bezüglich bestehender signifikanter Unterschiede der T-Zellverteilung in Bronchien und Alveolen zwischen Stress- und Kontrollgruppen im gewählten Beobachtungszeitraum musste verworfen werden. Peribronchial stellte sich 12 h nach Allergenprovokation in der Stressgruppe lediglich eine reduzierte Anzahl von T-Zellen im Sinne einer Tendenz im Vergleich zur Kontrollgruppe dar ($p = 0,063$), die jedoch aufgrund der niedrigen Fallzahl ($n = 6$) kein aussagekräftiges Ergebnis darstellt (**Tab. 3, Abb. 5a**). Es muss demnach angenommen werden, dass Stress im Untersuchungszeitraum von 6 h bis 96 h nach Allergenprovokation keine wesentlichen Auswirkungen auf die Gesamtpopulation der pulmonalen T-Zellen hat.

ERGEBNISSE

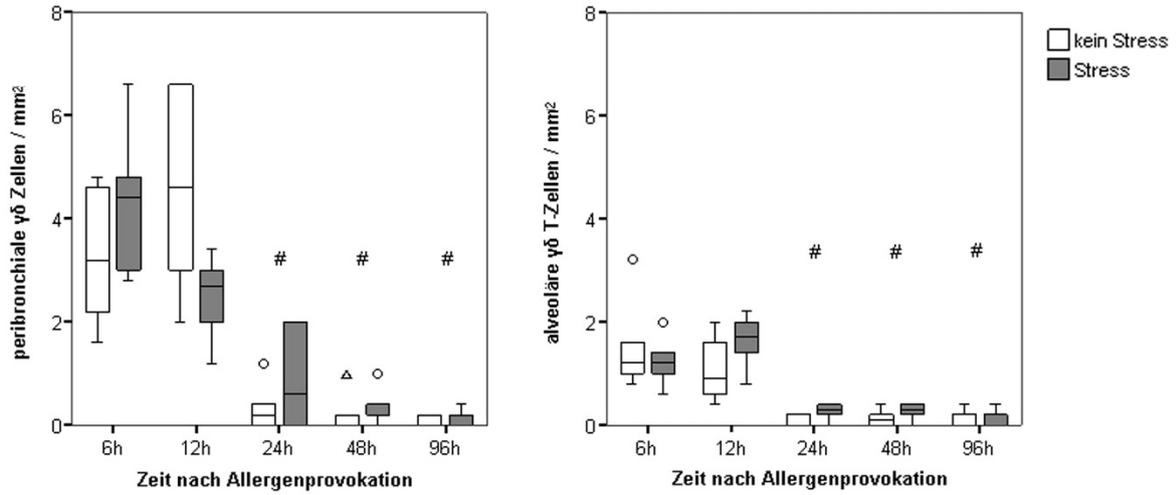


Abb. 5a: T-Zellen in Bronchien und Alveolen. Boxplots mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. (*): $p < 0,1$ (Mann-Whitney Test) Stress vs. Kontrolle, #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h), °: Ausreißerwert, ◊: Extremwert.

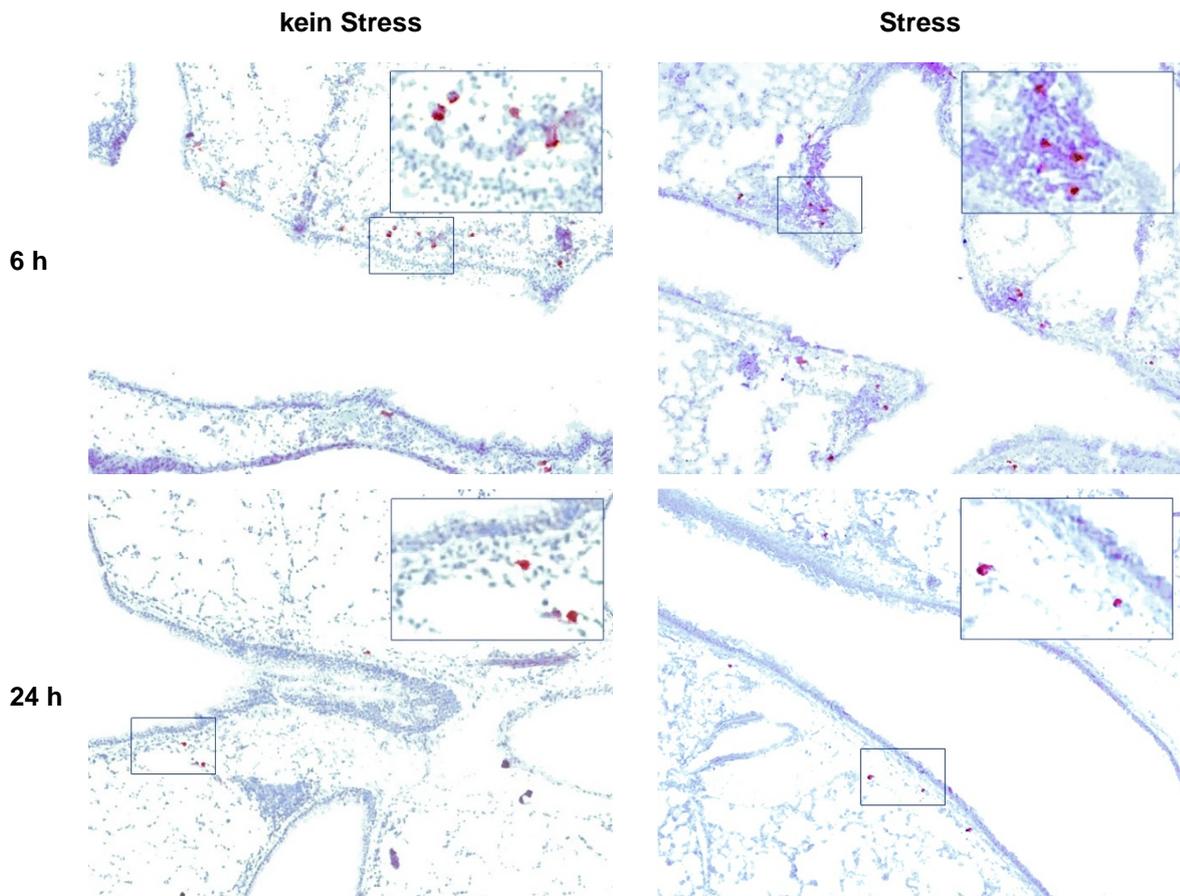


Abb. 5b: Immunhistochemische Färbung von T-Zellen. Zellverteilungen in Kontroll- und Stressgruppen zu verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 12 h) nach Allergenprovokation in pulmonalem Gewebe (50-fache Vergrößerung, markierte Bildausschnitte korrespondieren mit Detailansicht).

4.1.5 Stress fördert die Apoptose

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren apoptotische Zellen, die anhand der TUNEL-Methode detektiert wurden, vorwiegend peribronchial, epithelial sowie vereinzelt perivaskulär zu sehen (**Abb. 6b**). In den Alveolen waren apoptotische Zellen kaum nachweisbar und wurden somit, ebenso wie perivaskulär nachgewiesene apoptotische Zellen, nicht in die statistische Analyse miteinbezogen.

Nach der Varianzanalyse im ALM hatte Stress keinen signifikanten Einfluss auf die Verteilung der apoptotischen Zellen, während die Zeitpunkte nach diesem Modell signifikanten Einfluss zeigten (**Tab. 1**). Das ALM scheint jedoch wegen des niedrigen Bestimmtheitsmaßes von 27% (**Tab. 1**) den Sachverhalt nicht adäquat zu beschreiben.

Anhand des Mann-Whitney Tests zeigte sich eine signifikante Dominanz apoptotischer Zellen in den Bronchien der Stress- gegenüber der Kontrollgruppe 6 h nach Allergenprovokation (**Tab. 3**). Es könnten Immunzellen der frühen Antigenauseinandersetzung (Mastzellen, eosinophile Granulozyten, T-Zellen) ebenso wie geschädigte Epithelzellen betroffen sein. Aufgrund der Heterogenität von Stress- und Kontrollgruppe bezüglich der Zahl apoptotischer Zellen zu diesem Zeitpunkt war im post-hoc Dunnett-T-Test keine signifikante Veränderung im Vergleich mit den übrigen Zeitpunkten detektierbar (**Tab. 2**). Der im ALM signifikante Einfluss des Faktors Zeit (**Tab. 1**) gründet sich auf signifikante Unterschiede gegen 96 h nach Allergenprovokation im Sinne einer Reduktion apoptotischer Zellen 24 h und 48 h nach Allergenprovokation (24 h: $p = 0,003$; 48 h: $p = 0,001$; post-hoc Dunnett-T-Test beim Vergleich der 96 h nach Allergenprovokation beobachteten Werte mit den Werten zu allen übrigen Zeitpunkten, **Abb. 6a**). Diese Daten weisen auf eine Zunahme der Anzahl apoptotischer Zellen nach stattgehabter Antigenauseinandersetzung in Stress- und Kontrollgruppen gegen Ende des Beobachtungszeitraums hin. Es könnten Immunzellen der Atemwegsentszündung und in der Folge geschädigte Epithelzellen erfasst worden sein (Kap.5.4).

ERGEBNISSE

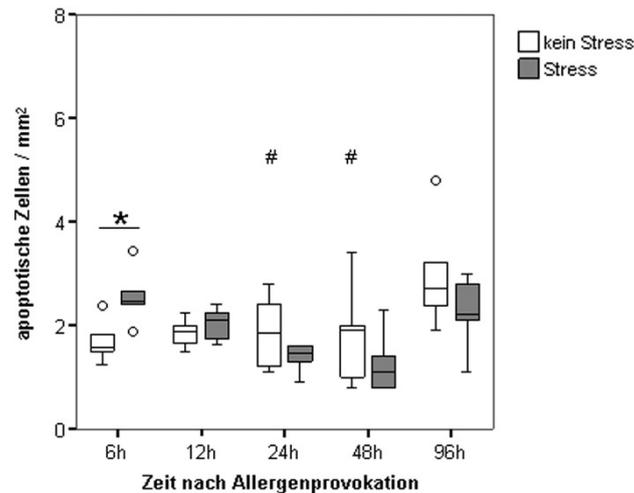


Abb. 6a: Apoptotische Zellen in den Bronchien. Boxplot mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test) Stress vs. Kontrolle, #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 96 h), °: Ausreißerwert.

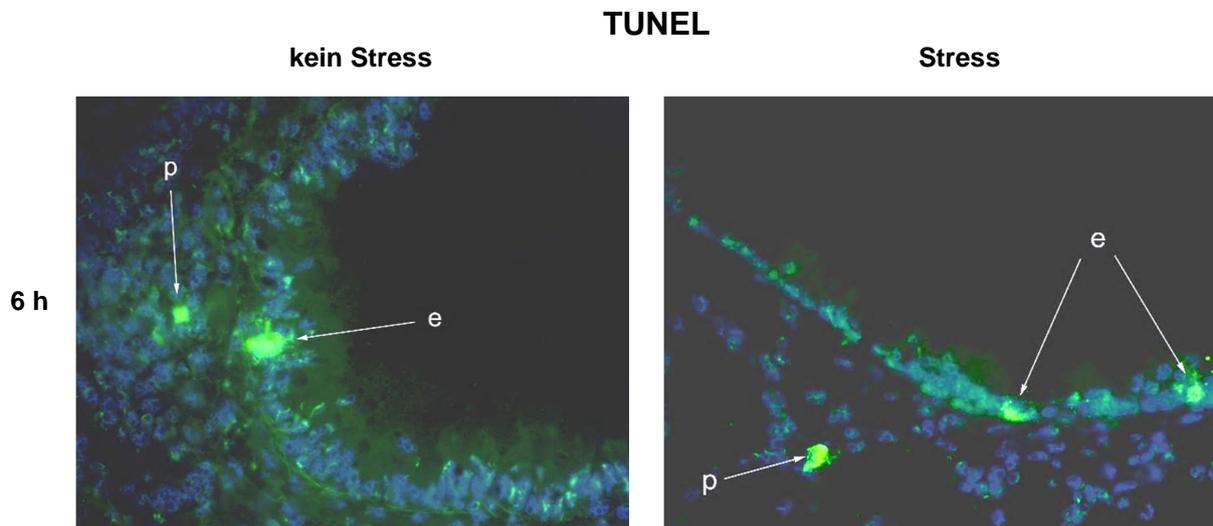


Abb. 6b: Immunfluoreszenzfärbung apoptotischer Zellen. Apoptotische Zellen wurden zunächst mittels TUNEL-Färbung (grün) sichtbar gemacht und im Anschluss wurde eine Kerngegenfärbung (DAPI) durchgeführt (blau). Nach Ansicht mit verschiedenen Filtern in identischen Ausschnitten wurden Zellen, die sowohl positiv in der TUNEL- als auch in der DAPI-Färbung waren, als apoptotische Zellen gewertet. Apoptotische Zellen waren in Stress- und Kontrollgruppen vorwiegend peribronchial (p) und epithelial (e) zu sehen. In der Darstellung wurden FITC- (TUNEL) und DAPI-Filter zusammengeführt. Ausschnitte aus Stress- und Kontrollgruppe 6 h nach Allergenprovokation in pulmonalem Gewebe (400-fache Vergrößerung).

4.1.6 Stress reduziert die Proliferation

Proliferierende, Ki67-positive Zellen waren insbesondere peribronchial und epithelial angesiedelt (**Abb. 7b**). Proliferierende Zellen waren alveolär kaum nachweisbar und wurden in diesem Kompartiment bei der statistischen Auswertung vernachlässigt.

Stress hatte nach dem ALM keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation im Gegensatz zum Faktor Zeit. Der Erklärungswert dieses Modells war mit 25% allerdings gering (**Tab. 1**). 6 h nach Allergenprovokation war die Zahl proliferierender Zellen in den

ERGEBNISSE

Bronchien der Stress- und Kontrollgruppen signifikant höher als 48 h und 96 h nach Allergenprovokation (**Tab. 2, Abb. 7a**). Dies könnte eine initial gesteigerte Proliferation von Immunzellen im Rahmen der Atemwegsentzündung implizieren, auf die Stress keinen Einfluss hatte (Kap. 5.5). 96 h nach Allergenprovokation zeigte sich in der Stressgruppe eine signifikant gegenüber der Kontrollgruppe reduzierte Anzahl proliferierender Zellen (**Tab. 3, Mann-Whitney Test**). Im Hinblick auf die im Bereich des Bronchialepithels miterfassten proliferierenden Zellen, die möglicherweise Epithelzellen beinhalten, könnte sich die Reduktion der Proliferation nach Stress negativ auf regenerative Vorgänge in fortgeschrittenen Stadien der Atemwegsentzündung auswirken (Kap. 5.5).

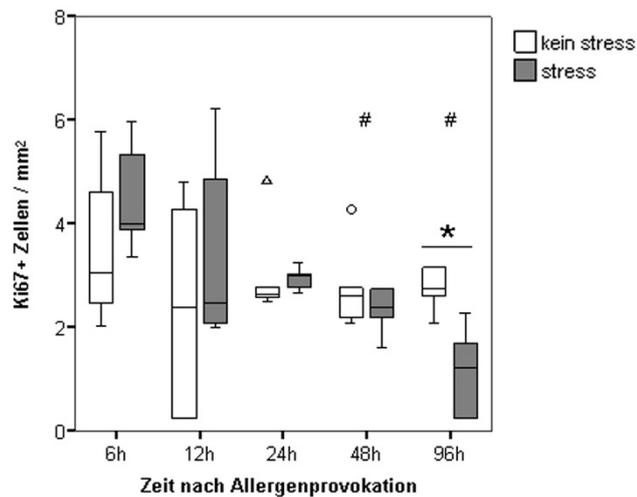


Abb. 7a: Proliferierende Zellen in den Bronchien. Boxplot mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test) Stress vs. Kontrolle, #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h), °: Ausreißerwert, : Extremwert.

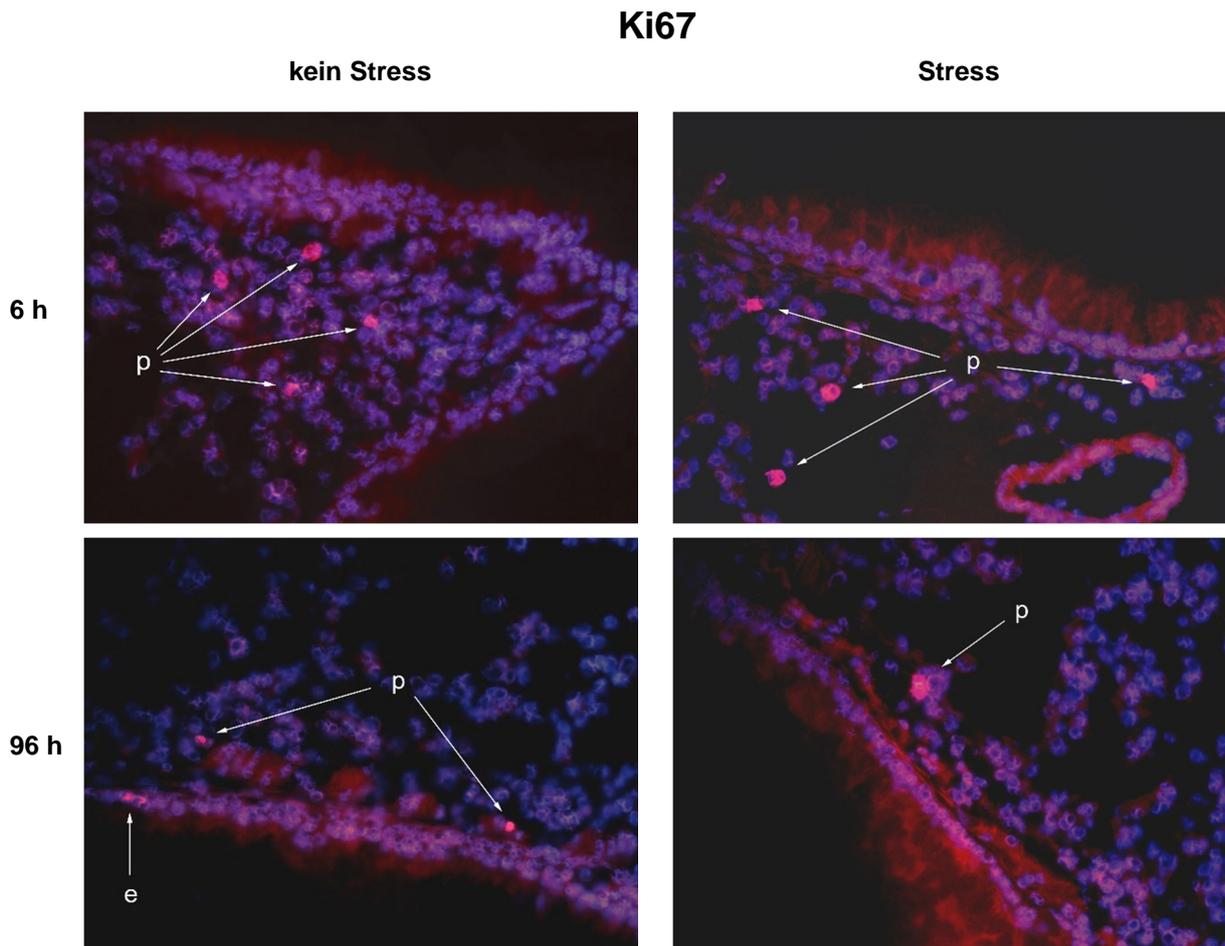


Abb. 7b: Immunfluoreszenzfärbung proliferierender Zellen. Proliferierende Zellen (Ki67+) wurden zunächst mit Antikörpergekoppeltem Rhodamin (rot) sichtbar gemacht und im Anschluss wurde eine Kerngegenfärbung (DAPI) durchgeführt (blau). Nach Ansicht mit verschiedenen Filtern in identischen Ausschnitten wurden Zellen, die sowohl positiv in der Ki67- als auch in der DAPI-Färbung waren, als proliferierende Zellen gewertet. Proliferierende Zellen waren in Stress- und Kontrollgruppen vorwiegend peribronchial (p) und epithelial (e) zu sehen. In der Darstellung wurden TRITC- (Ki67) und DAPI-Filter zusammengeführt. Ausschnitte aus Stress- und Kontrollgruppen 6 h und 96 h nach Allergenprovokation in pulmonalem Gewebe (400-fache Vergrößerung).

4.2 Modulation der BAL-Leukozyten durch Stress

Alle untersuchten Tiere entwickelten nach intraperitonealer Sensibilisierung und Atemwegsprovokation mit Ovalbumin eine Entzündung der Atemwege, manifestiert durch die im Verlauf zunehmende Menge der Leukozyten in der BAL. Der Anteil der eosinophilen Granulozyten (37,5-69,6%) überwog in Kontroll- und Stressgruppen über den gesamten Zeitraum die Anteile der anderen Leukozyten-Subpopulationen (Lymphozyten: 1,2-9%, neutrophile Granulozyten: 0,7-7,1%, Monozyten/Makrophagen: 21-53%). Die Darstellung der Einzelergebnisse erfolgt im Folgenden (Kap. 4.2.1-4.2.4).

In der Varianzanalyse mittels ALM war der Einfluss von Stress auf die Anzahl der Gesamtpopulation der BAL-Leukozyten über den gesamten Beobachtungsraum hinweg nicht signifikant, der Einfluss des Faktors Zeit wirkte sich hingegen deutlicher aus

ERGEBNISSE

(**Tab. 4**). Insgesamt hatte die Aussage des ALM bei der Beurteilung der Zellverteilungen in der BAL jedoch keinen sehr hohen Erklärungswert ($r^2 = 0,14-0,42$) aufgrund der breiten Streuung der Parameter. Der Einfluss von Stress war nach dem ALM nur für die Verteilung der neutrophilen Granulozyten von signifikanter Bedeutung, die Zeitpunkte der Messungen waren für alle Subpopulationen, abgesehen von Monozyten und Makrophagen, von signifikanter Bedeutung (**Tab. 4**).

Tab. 4: Einfluss der Faktoren Stress und Zeit auf Zellen in der BAL.

Parameter	Leukozyten	Lymphozyten	Eosinophile Granulozyten	Neutrophile Granulozyten	Monozyten/Makrophagen
Stress	0,054 t	0,734	0,096 t	0,029 *	0,145
Zeit	0,001 *	0,000 *	0,000 *	0,002 *	0,224
r²	0,34	0,42	0,41	0,32	0,14

Anmerkungen: Angegeben sind nach dem ALM errechnete p-Werte, die das Maß des Einflusses der Faktoren Stress und Zeitpunkt auf die Zellverteilung während des gesamten Beobachtungsraums widerspiegeln. Stress: n = 30, Zeit: n = 12. *: Signifikanz mit $p < 0,05$; t: Tendenz mit $p < 0,1$; r^2 : Bestimmtheitsmaß (Erklärungswert der Varianz).

Mithilfe des zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Tests in der Folge der Varianzanalyse im ALM wurde die Art der Unterschiede von BAL-Zellverteilungen zu den verschiedenen Zeitpunkten im Vergleich zum Zeitpunkt 6 h nach Allergenprovokation ermittelt. Es stellte sich eine signifikante Zellzahlsteigerung der Leukozyten 48 h und 96 h nach Allergenprovokation in Stress- und Kontrollgruppen dar (**Tab. 5**).

Tab. 5: Zeitlicher Verlauf der Zellverteilungen in der BAL.

Parameter	Leukozyten	Lymphozyten	Eosinophile Granulozyten	Neutrophile Granulozyten	Monozyten/Makrophagen
12 h	0,995	0,709	0,997	0,369	0,997
24 h	0,720	0,731	0,179	0,069 t	0,409
48 h	0,002 *	0,097 t	0,000 *	0,890	0,907
96 h	0,049 *	0,000 *	0,004 *	0,015 *	0,607

Anmerkungen: Anhand des zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Tests wurden Zellzahlen oben angegebener Parameter in der BAL von Stress- und Kontrollgruppen zusammengefasst zu den angegebenen Zeitpunkten mit dem frühesten Zeitpunkt nach Allergenprovokation (6 h) verglichen (n = 12 Tiere pro Zeitpunkt). Angegeben sind nach dem post-hoc Dunnett-T-Test errechnete p-Werte. *: Signifikanz mit $p < 0,05$; t: Tendenz mit $p < 0,1$. Erhöhung () oder Reduktion () in Stress- und Kontrollgruppe gegenüber 6 h nach Allergenprovokation.

Der Einfluss von Stress zu den jeweiligen Zeitpunkten wurde mithilfe des Mann-Whitney Tests ermittelt. Signifikante Unterschiede der Leukozyten-Subpopulationen zwischen gestressten und nichtgestressten Tieren waren überwiegend 24 h nach

ERGEBNISSE

Allergenprovokation festzustellen. Dies mündete in einer erhöhten Anzahl von Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und neutrophilen Granulozyten in der BAL der Tiere der Stressgruppe 24 h nach Allergenprovokation (**Tab. 6**). Die nähere Erläuterung der Ergebnisse erfolgt im Folgenden. Aufgrund der geringen Gruppenstärke von $n = 6$ wurden Tendenzen bei der Interpretation der Ergebnisse des Mann-Whitney Tests vernachlässigt.

Tab. 6: Einfluss von Stress auf die Zellverteilungen in der BAL.

Parameter	Leukozyten	Lymphozyten	eosinophile Granulozyten	Neutrophile Granulozyten	Monozyten/Makrophagen
6 h	0,100	0,566	0,068 t	0,018 *	0,200
12 h	0,092 t	0,522	0,109	0,522	0,109
24 h	0,030 *	0,045 *	0,025 *	0,020 *	0,631
48 h	0,754	0,047 *	0,754	0,602	0,917
96 h	0,936	0,873	0,873	0,166	0,937

Anmerkungen: Anhand des Mann-Whitney Tests für unabhängige Stichproben wurden Stress- und Kontrollgruppen zu jedem Zeitpunkt bezüglich oben angegebener Parameter miteinander verglichen. Angegeben sind nach dem Mann-Whitney Test errechnete p-Werte. Kontroll-/Stressgruppe: $n = 6$. *: Signifikanz mit $p < 0,05$. t: Tendenz mit $p < 0,1$. Erhöhung () oder Reduktion () in der Stress- gegenüber der Kontrollgruppe.

Die Anzahl der Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage der stressexponierten Tiere war frühzeitiger erhöht, als in der BAL der Tiere ohne Stressexposition. Bereits ab 6 h bis 24 h nach Allergenprovokation waren die Mediane der Leukozyten in den Stressgruppen gegenüber den Kontrollgruppen erhöht, dies stellte sich 24 h nach Allergenprovokation signifikant dar (**Tab. 6, Abb. 8**). Die zu diesem Zeitpunkt nach Stress erhöhte Anzahl der Leukozyten in der BAL basierte auf einer signifikant erhöhten absoluten Anzahl von Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten nach Stress. Die Anzahl der Leukozyten in der Kontrollgruppe war erst ab 48 h gegenüber dem Ausgangswert 6 h nach Allergenprovokation deutlich erhöht und so prägte sich erst zu diesem Zeitpunkt im post-hoc Dunnett-T-Test, der mit $n = 12$ Stress- und Kontrollgruppen zusammen berücksichtigt, eine signifikante Steigerung der Zellzahl aus (**Tab. 5, Abb. 8**).

ERGEBNISSE

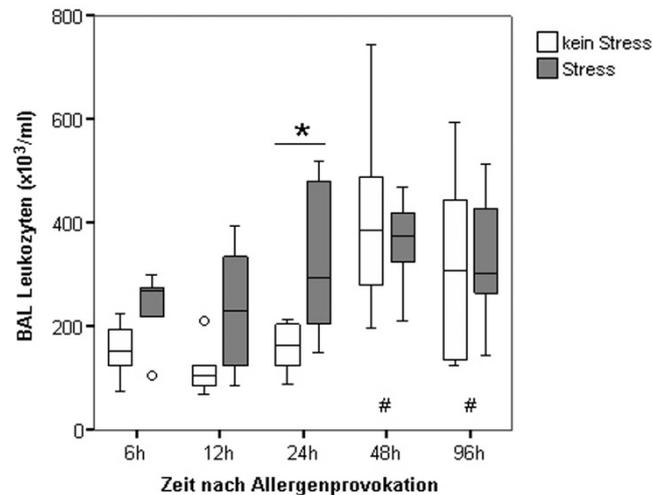


Abb. 8: Leukozyten der BAL. Boxplot mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test) Stress vs. Kontrolle, #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h), °: Ausreißerwert.

4.2.1 Stress mobilisiert eosinophile Granulozyten

In der Analyse der Verteilung der eosinophilen Granulozyten mithilfe des ALM stellte sich in der vorliegenden Arbeit nur der Einfluss der Untersuchungszeitpunkte signifikant dar, Stress machte sich lediglich im Sinne einer Tendenz bemerkbar (**Tab. 4**). Im direkten Vergleich der Stressgruppen mit den Kontrollgruppen anhand des Mann-Whitney Tests stellte sich 24 h nach Allergenprovokation eine durch Stress signifikant gesteigerte Anzahl eosinophiler Granulozyten dar (**Tab. 6, Abb. 9**). Diese Beobachtung verweist in Zusammenhang mit den Ergebnissen des post-hoc Dunnett-T-Tests (**Tab. 5**) auf eine nach Stress beschleunigte Mobilisierung der eosinophilen Granulozyten in das bronchoalveoläre Lumen. Die Ergebnisse des post-hoc Dunnett-T-Tests, die die Zellzahlveränderungen zu den verschiedenen Untersuchungszeitpunkten im Vergleich zu 6 h nach Allergenprovokation in Stress- und Kontrollgruppen zusammengefasst widerspiegeln, zeigten erst ab 48 h nach Allergenprovokation eine signifikant erhöhte Anzahl von eosinophilen Granulozyten in der BAL, da erst ab diesem Zeitpunkt auch eine stärkere Mobilisierung dieser Zellpopulation in das bronchoalveoläre Lumen der Tiere der Kontrollgruppen zu verzeichnen war (**Tab. 5, Abb. 9**).

ERGEBNISSE

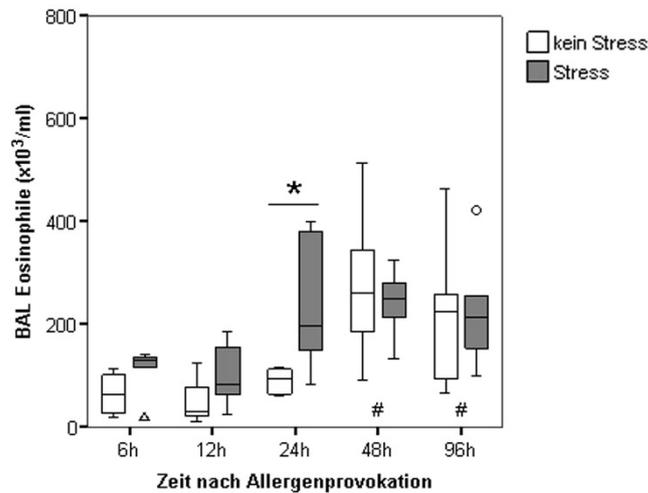


Abb. 9: Eosinophile Granulozyten der BAL. Boxplot mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test) Stress vs. Kontrolle, #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h), °: Ausreißerwert, ◊: Extremwert.

4.2.2 Stress mobilisiert Lymphozyten

Nach dem ALM hatte der Faktor Zeit im Gegensatz zum Faktor Stress signifikante Bedeutung für die Anzahl der BAL-Lymphozyten im Rahmen der vorliegenden Arbeit (**Tab. 4**). Den Berechnungen mittels des im Anschluss an das ALM erfolgten post-hoc Dunnett-T-Tests nach war dies mit einer 96 h gegenüber 6 h nach Allergenprovokation in Stress- und Kontrollgruppe deutlich erhöhten Lymphozytenzahl augenscheinlich (**Tab. 5, Abb. 10**).

Der Einfluss von Stress hatte bezüglich der Untersuchungsergebnisse 24 h und 48 h nach Allergenprovokation in der Berechnung nach dem Mann-Whitney Test heterogenen Charakter. In den Tieren der Stressgruppe war die Anzahl der BAL-Lymphozyten gegenüber der Kontrollgruppe 24 h nach Allergenapplikation signifikant erhöht. Nach 48 h kehrte sich das Verhältnis um und signifikant mehr Lymphozyten waren in der BAL der Tiere der Kontrollgruppe zu sehen. 96 h nach Allergenprovokation bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen mehr (**Tab. 6, Abb. 10**). Diesen Beobachtungen nach erscheint es plausibel, dass sich die Effekte von Stress nicht in einer generellen Steigerung der Anzahl der Lymphozyten in der BAL im Rahmen des hier verwendeten murinen Asthma-Modells manifestieren, sondern vielmehr durch die beschleunigte Mobilisation dieser Zellen in das bronchoalveoläre Lumen.

ERGEBNISSE

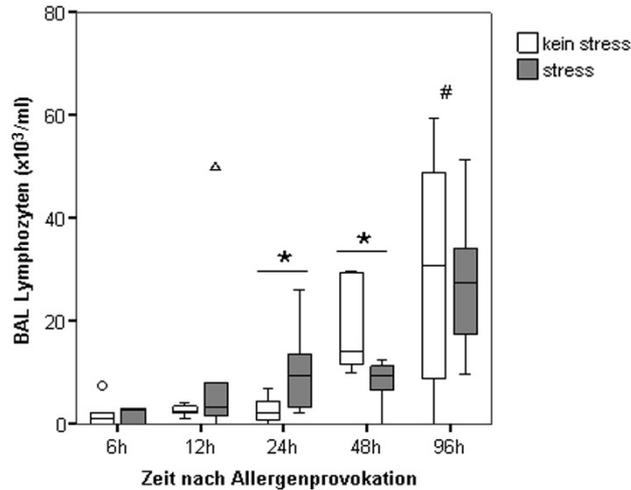


Abb. 10: Lymphozyten der BAL. Boxplot mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test) Stress vs. Kontrolle, #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h). °: Ausreißerwert, : Extremwert.

4.2.3 Stress mobilisiert neutrophile Granulozyten

Stress und Zeit zeigten sich in der vorliegenden Arbeit als signifikant auf die Verteilung der neutrophilen Granulozyten in der BAL einwirkende Faktoren (**Tab. 4**, ALM). Der an das ALM anschließende post-hoc Dunnett-T-Test zeigte eine signifikante Reduktion der Anzahl neutrophiler Granulozyten in Stress- und Kontrollgruppen 96 h gegenüber 6 h nach Allergenprovokation (**Tab. 5**, **Abb. 11**).

Stress hatte eine Erhöhung der Anzahl der neutrophilen Granulozyten in der BAL zur Folge. Dies zeigte sich im Rahmen des Mann-Whitney Tests signifikant bereits frühzeitig 6 h und im weiteren Verlauf 24 h nach Allergenprovokation (**Tab. 6**, **Abb. 11**).

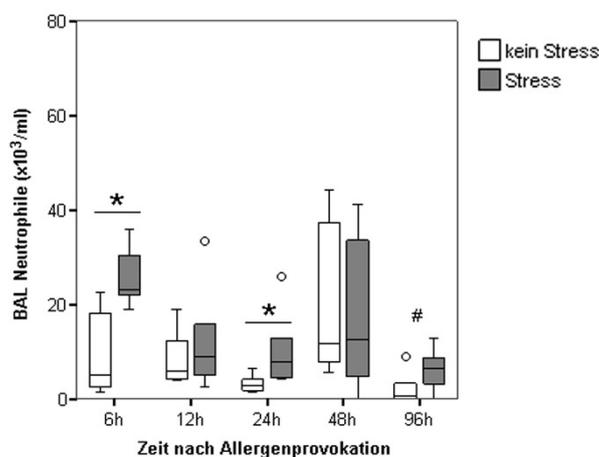


Abb. 11: Neutrophile Granulozyten der BAL. Boxplot mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test) Stress vs. Kontrolle, #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h), °: Ausreißerwert.

ERGEBNISSE

4.2.4 Stress und Zeit sind keine Modulatoren für Monozyten und Makrophagen

Die Anzahl der Monozyten und Makrophagen in der BAL wurde durch Stress und Zeit in der vorliegenden Arbeit nicht signifikant beeinflusst (**Tab. 4**, ALM). Es zeigten sich nach dem post-hoc Dunnett-T-Test keine wesentlichen Unterschiede ihrer Verteilung über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg im Vergleich zu 6 h nach Allergenprovokation (**Tab. 5**, **Abb. 12**). Die direkte Gegenüberstellung von Stress- und Kontrollgruppen ergab in der Berechnung nach dem Mann-Whitney Test keine signifikanten Differenzen (**Tab. 6**, **Abb. 12**).

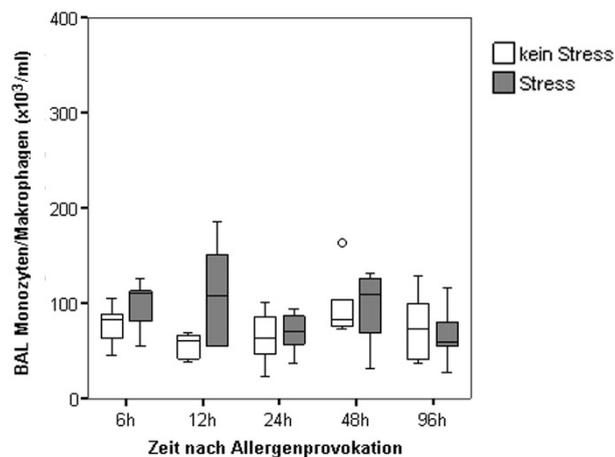


Abb. 12: Monozyten/Makrophagen der BAL. Boxplot mit Darstellung von Q1, Q2, Q3 sowie Minimal- und Maximalwerten. *: $p < 0,05$ (Mann-Whitney Test) Stress vs. Kontrolle, #: $p < 0,05$ (ALM mit nachfolgendem zweiseitigen post-hoc Dunnett-T-Test im Vgl. zu 6 h), °: Ausreißerwert.

5 Diskussion

Den Hintergrund für diese Arbeit bildet die Beobachtung, dass Stress über die Intensivierung der Atemwegsentzündung zu einer Verschlechterung der Klinik des Asthma bronchiale beitragen kann.⁴ Vor diesem Hintergrund können wir anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hier beschreiben, dass Stress im Rahmen des murinen Asthma-Modells peribronchial die Zellzahl bestimmter Zellsubpopulationen modifiziert. Dabei beeinflusst Stress zudem den zeitlichen Verlauf und die Zusammensetzung des allergischen Infiltrates im bronchoalveolären Lumen.

Konkret konnten wir nach Stress anhand der signifikanten Reduktion von CD4+ Zellen 12 h und 24 h nach Allergenprovokation sowie von CD8+ Zellen 96 h nach Allergenprovokation im peribronchialen Gewebe Anzeichen einer zellulären Immunsuppression nachweisen. Auf die Verteilung der T-Zellen hatte Stress keinen signifikanten Einfluss. Die Reduktion proliferierender Zellen 96 h in Verbindung mit der Verdichtung apoptotischer Zellen 6 h nach Allergenprovokation in den Tieren der Stressgruppen weist auf ein beeinträchtigt peribronchiales Regenerationsverhalten am murinen Asthma-Modell nach Stress hin. Innerhalb des bronchoalveolären Lumens zog Stress eine beschleunigte leukozytäre Invasion nach sich, die sich in der nach Stress frühzeitiger (24 h nach Allergenprovokation) gesteigerten Anzahl eosinophiler Granulozyten, Lymphozyten und neutrophiler Granulozyten in der BAL manifestierte.

5.1 Stress manifestiert sich in den Bronchien

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren zu jedem Untersuchungszeitpunkt Zellen aller untersuchten Subpopulationen in Stress- und Kontrollgruppen peribronchial zahlreicher als alveolär. Stress involvierte innerhalb des 96 h andauernden Beobachtungszeitraums die bronchiale Ebene, in den Alveolen stellten sich dagegen keine signifikanten Effekte von Stress dar.

Einige Beobachtungen sprechen dafür, dass sich Stress über die Aktivierung verschiedener neuronaler Systeme (Kap. 1.4) insbesondere auf bronchialer Ebene auswirken kann. Die Architektur der Bronchien lässt eine Begleitung von neuronalen Fasern und Blutgefäßen zu. Sensible Fasern, die SP enthalten, wurden beim Menschen, beim Meerschweinchen, bei Ratte und Katze vorwiegend im oder um das Bronchialepithel, um Blutgefäße, in der glatten Bronchialmuskulatur und in

DISKUSSION

tracheobronchialen Ganglienzellen nachgewiesen.⁸³ Das SAS bildet entlang der Bronchien ein dichtes Nervengeflecht (*Plexus pulmonalis*) und innerviert insbesondere tracheobronchiale Gefäße sowie die glatte Muskulatur von Trachea und Bronchien des Menschen, des Meerschweinchens, der Ratte, der Maus und des Affen in unterschiedlichem Ausmaß.⁶⁰ Im Bereich der Bronchien kann durch Regulation des regionalen Blutflusses via glatter Gefäßmuskulatur das Zellangebot verändert werden. Die Alveolen werden nicht durch zu- oder abführende Gefäße versorgt, sie regeln ihren oxidativen Stoffwechsel direkt über die Atemluft. Die dichte Innervation der Bronchien hat auf Immunzellen direkte und indirekte chemotaktische Effekte (Kap. 5.3.1), z. B. über ein bereits bestehendes Zellangebot von T-Zellen, Mastzellen und Granulozyten, die chemotaktisch effektive Botenstoffe freisetzen.^{58,60,84}

5.2 Heterogene Kinetik der Zellsubpopulationen im pulmonalen Gewebe

Während in der vorliegenden Arbeit in Stress- und Kontrollgruppen peribronchiale und alveoläre CD4+ und CD8+ Zellen im Verlauf zahlreicher wurden, nahm die Anzahl der T-Zellen ab.

5.2.1 Kinetik der CD4+ und CD8+ Zellen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen eine deutliche Steigerung der Anzahl peribronchialer und alveolärer CD4+ und CD8+ Zellen in Stress- und Kontrollgruppen ab 24 h nach Allergenprovokation, entsprechend anderer Beobachtungen am murinen Modell.^{12,30,85} In der vorliegenden Arbeit verlief der Zuwachs von CD4+ und CD8+ Zellen proportional bis 48 h nach Allergenprovokation in Stress- und Kontrollgruppen, wie die bis zu diesem Zeitpunkt relativ konstante CD4/CD8-Ratio zeigte (Mediane: 4,2-6,4). Während CD4+ Zellen in allen Gruppen peribronchial und alveolär 96 h nach Allergenprovokation zahlreich blieben, waren CD8+ Zellen zu diesem Zeitpunkt in den Bronchien der Stressgruppen und in den Alveolen von Stress- und Kontrollgruppen rückläufig.

Ähnliche Tendenzen in Bezug auf eine stärkere und länger andauernde Präsenz der CD4+ im Vergleich zu CD8+ Zellen in der vorliegenden Arbeit zeichneten sich in einer vergleichenden Studie von Asthmatikern mit dem murinen Asthma-Modell ab. Lymphozyten waren im bronchoalveolären Lumen sowohl beim Menschen als auch bei

DISKUSSION

Balb/c-Mäusen hauptsächlich von CD4+ T-Zellen dominiert und bei beiden Spezies nahm die Anzahl der CD4+ T-Zellen bis 7 Tage nach Allergenprovokation weiter zu, während sich die Anzahl der CD8+ T-Zellen im Verlauf der Studie frühzeitiger wieder verringerte.¹¹

CD4+ und CD8+ Zellen waren in der vorliegenden Arbeit vorwiegend peribronchial in kleineren Zellgruppen, bzw. in Clustern formiert. Entsprechende Ergebnisse zeigte eine Studie an C57BL/6-Mäusen. Nach Allergenprovokation waren 6 h später bereits einige CD4+ T-Zellen in kleineren Foci organisiert und 18-24 h später war insbesondere peribronchial und perivaskulär ein deutlicher Zuwachs aktivierter, antigenspezifischer CD4+ T-Zellen sichtbar. Ab 21 h nach Allergenprovokation war keine weitere Migration von Zellen mehr messbar.⁸⁶ Entsprechend gab es auch nach den Daten der vorliegenden Arbeit ab 24 h nach Allergenprovokation keinen wesentlichen Zuwachs von CD4+ und CD8+ Zellen mehr. In Zusammenhang mit der in der vorliegenden Arbeit verhältnismäßig niedrigen Anzahl proliferierender Zellen im pulmonalen Gewebe scheint die im Verlauf deutliche Verdichtung von CD4+ und CD8+ Zellinfiltraten in Stress- und Kontrollgruppen vorwiegend auf die Migration dieser Zellen in die Atemwege zurückgehen.

5.2.2 Kinetik der T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit waren T-Zellen im Lungengewebe der Tiere der Stress- und Kontrollgruppen insbesondere zu frühen Beobachtungszeitpunkten (6 h und 12 h nach Allergenprovokation) zahlreich. Dies erscheint plausibel vor dem Hintergrund der bevorzugt intraepithelialen Lage dieser Zellen (Kap. 1.3.3). Ein Nullwert vor aerogener Provokation wurde nicht bestimmt, somit könnte sich die Menge der pulmonalen T-Zellen neben gewebeständigen Zellen auch aus nach aerogener Provokation rekrutierten Zellen zusammensetzen. Die Veränderung der Anzahl der T-Zellen in Bronchien und Alveolen über den Beobachtungszeitraum hinweg wurde durch Stress im Rahmen des in der vorliegenden Arbeit verwendeten murinen Modells nicht signifikant beeinflusst.

In den in der vorliegenden Arbeit ab 24 h nach Allergenprovokation untersuchten Tieren aus Kontroll- und Stressgruppen waren T-Zellen peribronchial und alveolär signifikant reduziert gegenüber 6 h nachzuweisen. Da jedoch in diesem Rahmen kein Vergleichswert vor aerogener Provokation erhoben wurde, ist ein Vergleich mit Versuchsmodellen, deren Untersuchungsgegenstand die Anzahl von T-Zellen vor und nach Allergenprovokation ist, nur bedingt aussagekräftig. Verschiedene murine Asthma-

DISKUSSION

Modelle dieser Art liefern keine Hinweise auf eine reduzierte Anzahl von T-Zellen in den Atemwegen 24 h und 48 h nach Allergenprovokation gegenüber Werten, die an nicht aerogen provozierten Tieren erhoben wurden. Eine murine Studie an mit Ovalbumin sensibilisierten C57BL/6-Mäusen zeigte 24 h nach aerogener Allergenprovokation eine nahezu unveränderte Menge von T-Zellen im Lungengewebe,⁴⁵ während in anderen Studien dieses murinen Genotyps mit intensiveren Sensibilisierungsprotokollen 24 h nach Allergenprovokation ein Zuwachs dieser Zellen im Lungengewebe dargestellt wurde.^{87,88} An Balb/c-Mäusen wurde 48 h nach Allergenprovokation eine erhöhte Menge von T-Zellen gegenüber nicht mit einem Allergen provozierten Tieren in der BAL demonstriert.⁸⁹

Die Intensität der Allergenprovokation über die Atemwege könnte mit der Menge von T-Zellen in BAL und Lungengewebe in Zusammenhang stehen. In den beschriebenen murinen Studien wurde 3- bis 10-fach über die Atemwege mit Ovalbumin provoziert, während dies in der vorliegenden Arbeit lediglich 2-fach durchgeführt wurde und somit eine weniger intensive Provokation der lokal vorhandenen T-Zellen stattfand. Im Rahmen einer experimentell provozierten Infektion der murinen Lunge mit *Streptococcus pneumoniae* fand ein Zuwachs verschiedener T-Zellpopulationen vorwiegend aufgrund einer lokalen Expansion statt und weniger aufgrund einer gesteigerten Migration dieser Zellen in die Lunge.⁹⁰ Nach den Daten der vorliegenden Arbeit waren proliferierende Zellen insgesamt selten nachweisbar. Eventuell konnte die in der vorliegenden Arbeit erfolgte Frequenz und Dosis der Allergenapplikation über die Atemwege insbesondere eine lokale Proliferation oder auch die Einwanderung von T-Zellen in die Atemwege nicht ausreichend provozieren.

Vor dieser Annahme erscheint die in der vorliegenden Arbeit ab 24 h gegenüber 6 h nach Allergenprovokation reduzierte T-Zellzahl in Stress- und Kontrollgruppen bei spekulativ angenommener Abwanderung dieser Zellen in das bronchoalveoläre Lumen aufgrund einer frühzeitigen Aktivierung durch das Allergen plausibel. Die Durchwanderung des Atemwegsepithels von Immunzellen trägt bedeutend zur Erkennung des Antigens und der anschließenden Immunreaktion bei.⁹¹ Einige Beobachtungen sprechen für eine lumenwärts gerichtete Migration von T-Zellen in frühen Stadien der Atemwegsentzündung nach Allergenkontakt. Da T-Zellen Antigene auch ohne Präsentation über MHC-Moleküle erkennen können und wichtige Funktionen in der Frühphase der Immunreaktion haben (Kap. 1.3, Kap. 1.3.3), passieren diese im

DISKUSSION

Rahmen der allergischen Reaktion möglicherweise frühzeitiger als andere T-Zellsubpopulation das Atemwegsepithel, um in das bronchoalveoläre Lumen zu migrieren. Unmittelbar während einer akuten Asthmaexacerbation wurden T-Zellen anteilmäßig erhöht im Sputum von Asthmatikern nachgewiesen. Unter den T-Zellen war eine höhere Anzahl aktivierter Zellen im Vergleich zu T-Zellen. Von den Untersuchern wurden divergente Ergebnisse bezüglich der T-Zellen in den Atemwegen von Asthmatikern diskutiert und eine besondere Rolle für T-Zellen insbesondere in frühen Reaktionsstadien in Erwägung gezogen mit eventuell ausbleibendem Nachweis eines gesteigerten Anteils dieser Zellen in den Atemwegen in späteren Reaktionsstadien, wie in anderen Studien gesehen.⁴³

5.3 Die Stressreaktion der peribronchialen Zellsubpopulationen

5.3.1 Peribronchiale Zellpopulationen nach Stress im Kontext verschiedener Stressmodelle

In der vorliegenden Arbeit reduzierte Stress CD4+ Zellen 12 h und 24 h nach Allergenprovokation sowie CD8+ Zellen 96 h nach Allergenprovokation im peribronchialen Gewebe. Die grundsätzliche Entwicklung der Zellmenge in den Bronchien der Stressgruppen mit einer deutlichen Steigerung der Zelldichte ab 24 h nach Allergenprovokation lief ähnlich im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppen ab (Kap. 5.2.1). Innerhalb des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zeitraumes von 6 h bis 96 h nach Allergenprovokation zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Verteilung der T-Zellen zwischen Stress- und Kontrollgruppen, 12 h nach Allergenprovokation war in den stressexponierten Tieren lediglich der Trend einer verringerten Anzahl von T-Zellen im peribronchialen Gewebe ohne zuverlässige Aussagekraft nachweisbar ($p = 0,063$; Mann-Whitney Test).

In verschiedenen Tiermodellen wurde häufig nach länger andauernden Stressintervallen eine Reduktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen in Zusammenhang mit einer dysfunktionalen Immunantwort beobachtet. Nach chronischer Stressexposition in Form von instabilen sozialen Bedingungen zeigte sich bei mit *simian immunodeficiency virus* infizierten Affen eine reduzierte Anzahl von CD4+ T-Zellen in der Blutzirkulation im Vergleich zu weniger stressexponierten Tieren.⁶⁵ Die Induktion eines bösartigen Hauttumors via Bestrahlung mit UV-Licht hatte nach chronischer Stressexposition

DISKUSSION

(Immobilisation 6 h täglich über 21 Tage) am murinen Modell eine größere Tumorprogression bei signifikant reduzierter Anzahl von CD4+ Zellen in diesem Gebiet gegenüber Tieren ohne Stressexposition zur Folge.⁹² Ähnliche Tendenzen wurden nach chronischer Stressexposition (Immobilisation 6 h täglich über 21 Tage) im Sinne einer reduzierten Anzahl von CD4+ T-Zellen in den Lymphknoten von Balb/c-Mäusen nach Induktion eines T-Zell-Lymphoms beobachtet, welches nach Stress stärker progredient war.⁹³ Am murinen Modell konnte die verringerte Immunabwehr gegen Herpes simplex Viren unter chronischem Stress (12 h Immobilisation über 4 Nächte) auf eine reduzierte CD8+ T-Zellzahl an den Infektionsorten (neuronale Ganglien des *Nervus Trigemini*) zurückgeführt werden.⁹⁴ Eine Reduktion von T-Zellen im Bereich muriner Haarfollikel wurde 7 Tage nach Stress in Form von Schall über 24 h auf eine erhöhte Konzentration von Substanz P zurückgeführt.⁸² Nach Stress durch Immobilisation über 1 h oder 4 h täglich an 4 Tagen wurde eine Reduktion von CD4+, CD8+ und T-Zellen im Bereich des murinen Darmepithels demonstriert. In der weiterführenden Untersuchung wurde eine unterschiedlich ausgeprägte Sensibilität der verschiedenen Zellsubpopulationen auf Katecholamine und Glucocorticoide demonstriert.⁹⁵

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Reduktion der peribronchialen CD4+ und CD8+ Zellen nach einer 24-stündigen Stressexposition in Form von Schall entspricht den Beobachtungen der oben genannten Studienergebnisse, die vorwiegend im Rahmen länger andauernder Stressintervalle am Tiermodell erhoben wurden und eine reduzierte Immunantwort implizieren. In der Zusammenschau der zitierten Studienergebnisse kann im peribronchialen Gewebe der im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersuchten Tiere nach Stress eine reduzierte Immunantwort vermutet werden.

Die Untersuchungsergebnisse diverser Studien sind abhängig von der Kinetik der Mobilisation, dem Ort der Untersuchung und der Dauer der Stresseinwirkung.⁶⁸ Auch Studien an murinen Modellen mit kürzer andauernden Stressintervallen liefern Erklärungen für reduzierte T-Zellzahlen nach Stress in verschiedenen Kompartimenten. Diese sind zum Teil auf die Aktivierung von Immunprozessen zurückführbar. Die unmittelbaren Auswirkungen von akutem Stress auf immunologische Prozesse werden entscheidend von der Migrationskapazität der Immunzellen geprägt. Akuter Stress kann eine kurzfristige Mobilisierung immunkompetenter Zellen in verschiedene Kompartimente bewirken, während länger andauernder Stress im Verlauf die zelluläre Immunantwort herunterregulieren kann. Akuter Stress wurde von Dhabhar et al. als Minuten bis Stunden

DISKUSSION

andauernd, chronischer Stress als mehrere Stunden täglich über Wochen bis Monate andauernd charakterisiert.⁶⁸ In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen einer 24 h andauernden Stressperiode untersucht. Im Hinblick auf die reduzierte Anzahl von CD4+ und CD8+ Zellen im peribronchialen Gewebe kann eine chronische Komponente des verwendeten Stressprotokolls diskutiert werden. Gleichzeitig zeigen aber auch Studien am Tiermodell mit kürzer andauernden Stressprotokollen eine Reduktion von T-Zellen in bestimmten Kompartimenten. Somit spielt für die Diskussion der Zellreduktion nach Stress in der vorliegenden Arbeit auch die akute Komponente des verwendeten Stressprotokolls eine Rolle.

Im unmittelbaren Anschluss (6 min) an akuten Stress (2-120 min Immobilisierung) konnte am murinen Modell eine signifikant gesteigerte Anzahl von CD4+ T-Zellen in der Blutzirkulation festgestellt werden, während dieser Effekt bereits 15 min später nicht mehr nachweisbar war. Es wurde eine im Anschluss an die Mobilisation ins Blut folgende Mobilisation ins Gewebe postuliert.⁶⁸ Nach kürzeren Stressintervallen in Form von Immobilisation konnten bei gesunden Balb/c-Mäusen reduzierte CD4+ und CD8+ T-Zellzahlen im Blut beobachtet werden.⁹⁶ In der Blutzirkulation und im Lungenparenchym gesunder C57BL/6-Mäuse konnte unmittelbar nach akutem Stress eine Reduktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen demonstriert werden, die sich nach einigen Stunden wieder zurückbildete.⁹⁷ Die Mobilisation immunkompetenter Zellen nach Stress kann insbesondere in Gebiete mit bereits initiierten Immunreaktionen erfolgen.⁶⁸ Stressexposition über 2,5 h in Form von Immobilisation jeweils vor 9 Hautbestrahlungen an verschiedenen Tagen steigerte die Infiltration von CD4+ und CD8+ T-Zellen in murine Hautareale, wo per UV-Strahlung ein bösartiger Hauttumor provoziert wurde. Nach Stress traten in der frühen Tumorinduktionsphase weniger häufig Hauttumore auf.⁹⁸

Die oben beschriebenen Beobachtungen zur stressbedingten Migration immunkompetenter Zellen könnten auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit möglicherweise im Hinblick auf eine gesteigerte Abwanderung peribronchialer CD4+ Zellen nach Stress in das bronchoalveoläre Lumen aufgrund einer Aktivierung nach Allergenprovokation über die Atemwege übertragbar sein.

Am menschlichen Organismus erhobene Daten zeigen ähnliche Tendenzen der Stressreaktion von T-Zellen im Vergleich zum Tiermodell. Unter diesem Aspekt erscheint es plausibel, dass das murine Modell bezüglich der Stressreaktion von T-Zellen eine Aussagekraft für den Hergang der Stressreaktion im menschlichen Organismus hat.

DISKUSSION

In einer Übersichtsarbeit analysierte Daten zeigten, dass eine Reduktion von CD4+ und CD8+ T-Zellen in der Blutzirkulation bei chronisch stressexponierten Personen häufig vorkommt, während in Zusammenhang mit kürzer andauernden Stressintervallen insbesondere die Anzahl von CD8+ T-Zellen gesteigert sein kann.⁶² Beim Menschen war unmittelbar nach akutem Stress in Form von *bungee jumping* die Anzahl von CD4+ und CD8+Lymphozyten in der Blutzirkulation bis 2 h nach dem Sprung erhöht im Vergleich zum Ausgangswert 2 h vor dem Sprung.⁹⁹ Einige Patienten mit der Diagnose einer stressbedingten transienten Lymphozytose wurden im Zustand nach Auftreten verschiedenartiger stressbelasteter Ereignisse untersucht. Im Blut stellte sich ein erhöhter Anteil ausdifferenzierter CD4+ und CD8+ T-Zellen dar, während die Anzahl von T-Zellen unverändert war im Vergleich zum Zeitintervall der Remission der Lymphozytose.¹⁰⁰ Nach akutem Stress in Form einer öffentlichen Rede wurde im Blut gesunder Probanden eine gesteigerte Anzahl von T-Zellen festgestellt. Eine Mobilisation von T-Zellen in die Blutzirkulation konnte ebenso via Infusion eines Beta-Rezeptoragonisten (Isoproterenol) erreicht werden.¹⁰¹ Eine weiterführende Studie zeigte eine vorwiegende Mobilisierung von -Effektor-Gedächtniszellen mit zytotoxischer Kapazität und hoher Gewebegängigkeit in die Blutzirkulation im Vergleich zum Status vor Stresseinwirkung bei gesunden Studienteilnehmern.¹⁰²

Untersuchungen T-Zell-vermittelter Erkrankungen am Menschen bilden eine Aktivierung des spezifischen Immunsystems unter kurz andauernden Stressperioden ab. Nach kurzzeitiger Stressexposition in Form einer öffentlichen Rede wurden Personen mit atopischer Dermatitis (AD) oder Psoriasis untersucht und mit gesunden Probanden verglichen. Die Ausgangswerte der im Blut zirkulierenden CD8+ T-Zellen waren bei den erkrankten Personen geringer. CD8+ T-Zellen zeigten jedoch bei an AD als auch bei an Psoriasis leidenden Patienten nach Stress eine höhere Stressreaktivität im Sinne einer Zellzahlsteigerung mit einem hohen Anteil zytolytischer CD8+/CD11b+T-Lymphozyten im Blut. Für CD8+ T-Zellen wurde eine Krankheitsrelevanz aufgrund eines hohen Anteils dieser Zellen in AD-Läsionen diskutiert.⁷⁶ Die Analyse des Blutes von an Psoriasis leidenden Patienten zeigte kurz nach akuter Stresseinwirkung in Form des *Trier social stress tests* (TSST) eine erhöhte Anzahl von CD4+ T-Zellen. Nach 60 min war dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Bei gesunden Probanden konnte keine Stress-Sensitivität dieses Parameters festgestellt werden.⁷⁵

5.3.2 Mechanismen der Zellmodulation durch Stress

Die wesentlichen Mechanismen, über die Stress die Anzahl von Lymphozyten in verschiedenen Kompartimenten modulieren kann, bestehen in einer Umverteilung des Lymphozytenpools und der Regulation von Proliferation und Apoptose.

Die Umverteilung von Immunzellen in verschiedene Kompartimente ist ein wichtiger und unmittelbarer Mechanismus, über den Stress Immunzellen beeinflussen kann.⁶⁸ Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kann für die reduzierte Anzahl peribronchialer CD4+ Zellen in Verbindung mit der zeitlich kohärent erhöhten BAL-Lymphozytenzahl nach Stress eine vermehrte Abwanderung von CD4+ Zellen aus dem peribronchialen Gewebe in das bronchoalveoläre Lumen bei ausbleibender adäquater Rekrutierung dieser Zellen aus Blut und lymphatischen Organen in das pulmonale Gewebe diskutiert werden.

In der BAL von Balb/c-Mäusen konnten nach Ovalbuminbehandlung, die in ähnlicher Weise wie in der vorliegenden Arbeit erfolgte, unter den BAL-Lymphozyten vorwiegend T-Zellen mit einer Prädominanz von CD4+ T-Zellen nachgewiesen werden.¹¹ Vor diesem Hintergrund könnte die Anzahl der BAL-Lymphozyten in der vorliegenden Arbeit eine hohe Aussagekraft in Bezug auf die nach Stress reduzierten peribronchialen CD4+ Zellen haben, die mit einer weiteren Spezifizierung der BAL-Lymphozyten abgeklärt werden könnte. Nach den Daten der vorliegenden Arbeit könnte auch die nach Stress in den Alveolen tendenziell reduzierte Anzahl von CD4+ Zellen 24 h nach Allergenprovokation ($p = 0,078$; Mann-Whitney Test) zu einer Steigerung der Menge von BAL-Lymphozyten aufgrund einer lumenwärts gerichteten Migration nach Stress beitragen. Die Verschiebung der Lymphozyten in das bronchoalveoläre Lumen nach Stress im Rahmen der vorliegenden Arbeit könnte also einen nicht unerheblichen Anteil von CD4+ T-Zellen am murinen Asthma-Modell beinhalten.

Reife Effektorzellen und Effektor-Gedächtniszellen besitzen spezielle migratorische Kompetenzen. Am Tiermodell wurde demonstriert, dass insbesondere reife T-Helfer Effektorzellen mit hoher Gewebemigrationskapazität durch Stress schneller mobilisiert werden.⁶⁸ Auch für humane CD4+ und CD8+ Effektorzellen konnte nach akutem Stress eine schnelle Mobilisation in die Blutbahn nachgewiesen werden.¹⁰³ Eventuell sind diese Vorgänge auch auf Rekrutierungsvorgänge in das bronchoalveoläre Lumen am murinen Asthma-Modell übertragbar und könnten die Reduktion von peribronchialen CD4+ und CD8+ Zellen in der vorliegenden Arbeit erklären. Einige Beobachtungen sprechen für ein

DISKUSSION

vorwiegendes Vorkommen antigenspezifisch aktivierter T-Zellen, insbesondere von CD4⁺ T-Zellen, in den murinen Atemwegen nach Behandlung mit Ovalbumin. Im pulmonalen Gewebe von C57BL/6-Mäusen wurden nach aerogener Provokation mit Ovalbumin fast ausschließlich antigenspezifische aktivierte Zellen mit migratorischer Kompetenz unter den CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen.⁸⁶ Verschiedene murine Modelle liefern Hinweise auf höher spezialisierte Zellen in der BAL nach Ovalbuminbehandlung. Am murinen Asthma-Modell wurden nach Sensibilisierung und Provokation mit Ovalbumin über die Atemwege ein höherer Differenzierungsgrad von T-Zellen¹⁰⁴ und eine ausgeprägtere Zytokinsynthesekapazität von CD4⁺ T-Zellen in der BAL verglichen mit T-Zellen bzw. CD4⁺ T-Zellen des pulmonalen Gewebes festgestellt.²⁴ Die zuletzt zitierte Studie wurde an Balb/c-Mäusen durchgeführt.

Die Bedeutung der Stressachsen für die Umverteilung von Lymphozyten wurde von Dhabhar et al. in diversen Arbeiten beschrieben. So werden Lymphozyten zunächst in die Blutbahn und daraufhin ins Gewebe mobilisiert. Norephinedrin und Epinephrin spielen für die Mobilisation aus Milz, Lymphknoten und Knochenmark in das Blut eine Rolle, Cortisol bewirkt eine Abwanderung der Lymphozyten aus der Blutbahn. Eine unter erhöhten Cortisolserumspiegeln auftretende Lymphopenie im Blut kann z.B. durch eine Abwanderung von Lymphozyten in lymphoide Gewebe verursacht werden.⁶⁸ Cortisol kann über die Induktion von Chemokinrezeptoren in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu einer gesteigerten Chemotaxis führen.¹⁰⁵ Für SP wurde *in vitro* eine direkte chemotaktische Wirkung auf humane T-Lymphozyten über NK-1 und NK-2-Rezeptoren nachgewiesen.¹⁰⁶

Neben direkten chemotaktischen Wechselwirkungen zwischen Immunzellen und Neuromediatoren kann eine stressbedingte Umverteilung auch über die Modulation migratorisch relevanter Adhäsions- und chemotaktischer Moleküle gebahnt werden. Über die Expression von *vascular cell adhesion molecule* (VCAM-1), *intercellular cell adhesion molecule* (ICAM)-1 und ICAM-2 erfolgt die Bindung von T-Zellen an das Bronchialepithel¹⁰⁷ und an humanen T-Zellen wurde nachgewiesen, dass ICAM-1 und ICAM-2 maßgeblich am Übertritt in das bronchoalveoläre Lumen beteiligt sind.¹⁰⁸ Die Expression von VCAM-1- und ICAM-1 auf endothelialen Zellen kann durch SP gesteigert werden und so die Migration von Lymphozyten bahnen.¹⁰⁹ Im Lungengewebe nicht vorbehandelter C57BL/6-Mäuse bestand nach Stress in Form sozialer Konfrontation eine Heraufregulierung von mRNA für ICAM-1 mit konsekutiv gesteigerter leukozytärer Invasion.¹¹⁰ Während nach Stress in Form einer 24-stündigen Schallperiode eine

DISKUSSION

verstärkte lokale Expression von VCAM-1 am murinen Modell der atopischen Dermatitis festgestellt werden konnte,¹¹¹ blieb ein solcher Nachweis 6 h und 24 h nach Allergenprovokation am murinen Asthma-Modell in den Bronchialepithelien nach derartiger Stressexposition aus. Allerdings wurde nach Stress eine vermehrte Konzentration von Eotaxin in der BAL beobachtet.¹¹² Die Expression von CCR3, einem wichtigen Liganden für Eotaxin, wurde auf Th2-Zellen nachgewiesen¹¹³ und könnte somit im Rahmen der Stressreaktion zu einer gesteigerten Akkumulation dieser Zellen im bronchoalveolären Lumen beitragen. Möglicherweise hat im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine stressbedingte Steigerung der Expression von Adhäsions- und chemotaktischen Molekülen eine Relevanz für die lumenwärts gerichtete Passage des Bronchialepithels der CD4+ und CD8+ Zellen.

Für die in der vorliegenden Arbeit nach Stress reduzierte Menge von CD4+ und CD8+ Zellen im peribronchialen Gewebe kann auch eine gesteigerte Apoptoseneigung diskutiert werden. Aufgrund der in der vorliegenden Arbeit generell sehr niedrigen Anzahl apoptotischer Zellen im peribronchialen Gewebe ist die Apoptose als alleiniger, erklärender Faktor für die peribronchiale Zellreduktion jedoch nicht hinreichend. Stresshormone können apoptotische Prozesse in Lymphozyten bahnen und so zu einer reduzierten T-Zellzahl beitragen. Eine an Ratten erhobene Studie stellte eine gesteigerte Apoptose von Zellen in verschiedenen lymphoiden Organen bei reduzierter Anzahl von Lymphozyten unter Einwirkung adrenerger Hormone dar.¹¹⁴ Am murinen Modell wurde nach Verabreichung von Epinephrin eine Steigerung der Apoptose von Splenozyten festgestellt.¹¹⁵ Eine Steigerung der Anzahl apoptotischer Splenozyten nach chronischer Stressexposition wurde am murinen Modell einer erhöhten Konzentration endogener Opiode zugeschrieben.¹¹⁶ Glucocorticoide können bei Asthmatikern die Induktion der Apoptose in peribronchialen T-Zellen bewirken.¹¹⁷

Die in der vorliegenden Arbeit nach Stressexposition reduzierte Menge von peribronchialen CD4+ und CD8+ Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten könnte auch durch eine stressbedingt reduzierte Proliferation in peribronchialen Gewebe oder drainierenden Lymphknoten mitbedingt sein. Die aus der vorliegenden Arbeit hervorgehenden Daten der Proliferation im pulmonalen Gewebe können jedoch die Reduktion der CD4+ und CD8+ Zellen nach Stress nur unzureichend erklären. Stress reduzierte peribronchiale, proliferierende Zellen erst 96 h nach Allergenprovokation und könnte damit allenfalls auf eine durch verminderte Zellproliferation nach Stress reduzierte

DISKUSSION

Anzahl von CD8+ Zellen im peribronchialen Gewebe zu diesem Zeitpunkt hin deuten. Zur weiteren Interpretation der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wäre eine Untersuchung der proliferierenden Zellen in den drainierenden Lymphknoten relevant.

Einige tierexperimentelle Studien zeigten proliferationshemmende Effekte von Stress auf T-Zellen in verschiedenen Kompartimenten. T-Zellen aus Lymphknoten und Milz von Balb/c-Mäusen, die nach einem chronischen Stressprotokoll behandelt wurden, zeigten eine reduzierte Proliferation nach *in vitro* Stimulation mit Concanavalin A.⁹³ Murine CD8+Splenozyten proliferierten deutlich weniger nach Infektion mit lymphozytischer Choriomeningitis, wenn die Tiere über längere Zeit Stress exponiert wurden.¹¹⁸ Proliferationshemmende Effekte von Glucocorticoiden auf Lymphozyten via Reduzierung von IL-2 sind ein bekanntes Phänomen⁵² und auch für Katecholamine wurden proliferationshemmende Effekte beschrieben. Auf murinen CD4+Th1-Zellen konnten β -adrenerge Rezeptoren nachgewiesen werden, über die Katecholamine eine Verringerung der Proliferation aufgrund einer reduzierten Bildung von IL-2 bewirkten.¹¹⁹ Humane CD4+ und CD8+ T-Zellen wurden *in vitro* mit dem β -adrenergen Rezeptoragonisten Isoproterenol inkubiert mit in der Folge reduzierter Proliferation.¹²⁰ Stress könnte über die Aktivierung der Sympathiko-adrenergen Achse bei Asthmatikern zu einer reduzierten Proliferation in Th2-Zellen führen. Die Untersuchung humaner CD4+ und CD8+ T-Zellen aus der peripheren Blutzirkulation, die *in vitro* zur Differenzierung in Th1- oder Th2-Zellen angeregt wurden, zeigte eine Regulierbarkeit von Th1- und Th2-Zellen über β 2-Adrenorezeptoren mittels Isoproterenol, die in einer verminderten Synthese von proliferationsförderndem IL-2 in aktivierten Th2-Zellen mündete.¹²¹

5.4 Apoptosefördernde Effekte von Stress in der Atemwegsentzündung

Die mithilfe des TUNEL-Systems detektierten apoptotischen Zellen waren insbesondere peribronchial und epithelial nachweisbar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit steigerte Stress die Anzahl apoptotischer Zellen 6 h nach Allergenexposition signifikant. Stress könnte möglicherweise am murinen Modell die Vulnerabilität von Epithelzellen und verschiedenen immunkompetenten Zellen, die in frühen Reaktionsstadien nach Allergenkontakt aktiviert werden (Makrophagen, eosinophile Granulozyten, Mastzellen, T-Zellen), für die Apoptose steigern. Im weiteren Verlauf zeigten sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Stresseffekte.

DISKUSSION

Stress kann apoptotische Prozesse in diversen Zellpopulationen durch Aktivierung verschiedener Systeme begünstigen. Eine Förderung der Apoptose durch Katecholamine in Lymphozyten der Ratte¹¹⁴ und Maus,¹¹⁵ die Opioid-induzierte Apoptose muriner Lymphozyten¹¹⁶ und die Apoptose in Zusammenhang mit Glucocorticoiden in humanen T-Zellen der Bronchien¹¹⁷ wurden bereits in Kap. 5.3.1 beschrieben. An eosinophilen Granulozyten des Sputums von Asthmatikern konnte nach inhalativer Cortisontherapie die Induktion der Apoptose nachgewiesen werden.¹²² Am murinen Modell wurde nach Verabreichung von Dexamethason eine gesteigerte Rate apoptotischer Zellen im Bereich des Darms provoziert, wobei sich insbesondere eine gesteigerte Menge apoptotischer Epithelzellen darstellte, während auf intraepitheliale Lymphozyten keine apoptosefördernden Effekte ausgeübt wurden. Die Gabe des Sympathomimetikums Epinephrin hatte keine Effekte auf die Apoptose dieser Zellen.⁹⁵ Im murinen Haarfollikel wurde nach Stress in Form von Schall über 24 h, ebenso wie nach Applikation von SP, eine erhöhte Rate apoptotischer Keratinozyten nachgewiesen.⁸²

In der vorliegenden Arbeit war 96 h nach Allergenprovokation die Anzahl apoptotischer Zellen in Stress- und Kontrollgruppen insgesamt gegenüber 24 h und 48 h nach Allergenprovokation signifikant erhöht. Stress hatte zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Effekte auf die Anzahl apoptotischer Zellen. In fortgeschrittenen Stadien der Immunreaktion sind apoptotische Prozesse nach stattgehabter Zellaktivierung im Rahmen der Antigenabwehr für die Beendigung der Immunantwort von Bedeutung. Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit erscheint es plausibel, dass diese Prozesse am murinen Modell keiner wesentlichen Modulation durch Stress unterliegen.

In einer Studie an mit Ovalbumin sensibilisierten Balb/c Mäusen wurde eine gesteigerte Anzahl apoptotischer Zellen im Lungengewebe ab 3 Tage im Vergleich zu 24 h nach Allergenprovokation nachgewiesen. Die apoptotischen Zellen waren in der beschriebenen Untersuchung vorwiegend im subepithelialen Gewebe der Bronchien lokalisiert, wo auch präferenziell Eosinophile angesiedelt waren. In diesem Zusammenhang wurden apoptotische Zellen vorwiegend als Eosinophile beschrieben.¹²³

Die Apoptose von Immunzellen hat positive Effekte auf die Resolution der Atemwegsentzündung. Die häufig an Asthmatikern beobachtete Resistenz von Immunzellen gegenüber der Apoptose trägt zur Progredienz der Atemwegsentzündung bei. Lymphozyten, die aus der BAL von Asthmatikern nach Allergenprovokation gewonnen wurden, zeigten *in vitro* eine erhöhte Apoptoseresistenz.¹²⁴ An Asthmatikern

DISKUSSION

wurde beobachtet, dass eine reduzierte Apoptose immunkompetenter Zellen mit einer Verschlechterung der Klinik einhergeht. Es wurde eine negative Korrelation der Anzahl apoptotischer eosinophiler Granulozyten in den Atemwegen von Asthmatikern und dem Schweregrad der Klinik festgestellt. Es konnte zudem eine erhöhte Anzahl von Zellen, die das anti-apoptotische Protein *B-cell lymphoma leukemia-* (BCL)-2 exprimieren in positiver Korrelation mit der Anzahl von T-Zellen und der Schwere der Klinik demonstriert werden.⁸

Unter dem Aspekt der immunregulativen Funktion der Apoptose für immunkompetente Zellen spricht die in der vorliegenden Arbeit nach Stress gesteigerte Anzahl apoptotischer Zellen zu Beginn des Beobachtungszeitraums nicht für eine intensivierete Entzündungsreaktion im Gewebe der Atemwege nach Stressexposition im Rahmen des murinen Asthma-Modells.

Die gesteigerte Apoptose von Epithelzellen im Verlauf der chronischen Entzündung der Atemwege trägt zum pathologischen Umbau der Atemwege bei (Remodeling) (Kap. 1.2).⁶ In Biopsien der Atemwege von Asthmatikern stellte sich ohne experimentell veranlasste Allergenexposition eine gesteigerte Anzahl apoptotischer Zellen in Epithelien und Submukosa gegenüber gesunden Probanden dar.⁷ Somit könnte Stress nach den Daten der vorliegenden Arbeit mit der erhöhten Anzahl apoptotischer Zellen, die auch epithelial angesiedelt waren, am murinen Asthma-Modell die pathologischen Umbauvorgänge der Atemwege begünstigen.

5.5 Peribronchiale Proliferationshemmung und Regeneration nach Stress

In der vorliegenden Arbeit waren proliferierende, Ki67-positive Zellen vorwiegend in peribronchialen Gewebe und Bronchialepithel der untersuchten Mäuse nachweisbar. Unmittelbar nach Allergenprovokation stehen Mechanismen der Antigenabwehr im Vordergrund, die z.B. die Proliferation immunkompetenter Zellen einschließen. Die grundsätzliche Kinetik der proliferierenden Zellen verlief in Stress- und Kontrollgruppen im Rahmen der vorliegenden Arbeit ähnlich. Zu Beginn des Beobachtungszeitraums waren in der vorliegenden Arbeit Ki67-exprimierende Zellen in Kontroll- und Stressgruppen gleichermaßen erhöht und verringerten sich ab dem Zeitpunkt 48 h nach Allergenprovokation. Stress zeigte in der vorliegenden Arbeit erst 96 h nach Allergenprovokation seine Auswirkungen im Sinne einer signifikant reduzierten Anzahl proliferierender Zellen.

DISKUSSION

In späteren Stadien der allergischen Reaktion spielt nach der ersten Abwehrreaktion gegen das Allergen die Regeneration des Gewebes eine größere Rolle. Im Rahmen einer Studie an mit Ovalbumin sensibilisierten Balb/c-Mäusen wurde ab 3 bis 21 Tage nach Allergenprovokation über die Atemwege eine erhöhte Anzahl proliferierender Zellen im Bereich des Bronchialepithels detektiert.¹²⁵ Vielfach wurde die Proliferation von Epithelzellen im Kontext der Geweberestitution bei Mensch¹⁰ und Tier^{126,127} nach Allergenexposition beschrieben. Diese Prozesse sind für eine funktionierende Gewebefunktion zunächst essentiell, führen aber nach ständigen Reizen mit chronischen Umbauvorgängen zu einer pathologischen Umwandlung der Atemwege. Die Chronizität der Atemwegsentzündung beeinträchtigt letztlich die funktionale Proliferation des Atemwegsepithels und führt zu einer eingeschränkten Regeneration mit herabgesetzter Barrierefunktion.⁵ Dieser Entwicklung könnte Stress vorgreifen. Proliferierende Zellen konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Bereich des Bronchialepithels nachgewiesen werden und könnten somit Epithelzellen darstellen. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete stressbedingte Reduktion der proliferativen Vorgänge 96 h nach Allergenprovokation könnte in Zusammenhang mit einer reduzierten regenerativen Kapazität im Rahmen des murinen Asthma-Modells stehen und so zu einer Dysfunktionalität der Atemwegsepithelien führen. Negative Effekte von Stress auf die Geweberegeneration sind ein bekanntes Phänomen¹²⁸ und eine Reduktion proliferierender Keratinozyten nach Lärmstress über 24 h konnte 7 Tage später im Bereich muriner Haarfollikel in Zusammenhang mit einer erhöhten Konzentration von SP nach Stress nachgewiesen werden.⁸²

5.6 Stress als Katalysator der Leukozytenmobilisation

In der vorliegenden Arbeit nahm in der BAL der Tiere der Stress und Kontrollgruppen die Anzahl der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten im Verlauf signifikant zu. Stress beschleunigte diese Dynamik mit einer 24 h nach Allergenprovokation signifikant gegenüber der Kontrollgruppe gesteigerten Anzahl von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten.

Im Rahmen einer vergleichenden Studie zwischen Asthmatikern und asthmainduzierten Balb/c-Mäusen zeigten sich am murinen Modell ähnliche Tendenzen der Kinetik der Leukozytenmobilisation in das bronchoalveoläre Lumen nach Allergenprovokation. Im Vergleich mit Asthmatikern war der zeitliche Verlauf der Zellzahlentwicklung von

DISKUSSION

eosinophilen Granulozyten in der BAL relativ ähnlich am murinen Modell. Die Anzahl der Lymphozyten in der BAL war ab 18 h nach Allergenprovokation beim Menschen und am murinen Modell gegenüber den Ausgangswerten erhöht. Innerhalb dieses Zeitraums erscheint das murine Modell die Entwicklung der Entzündung der Atemwege bei Asthma bronchiale zumindest teilweise abzubilden. Im weiteren Verlauf bestanden in der zitierten Untersuchung größere Diskrepanzen zwischen den Spezies. Während beim Menschen die Lymphozytenmenge bereits 3 Tage nach Allergenprovokation reduziert war, war dies am murinen Modell erst 21 Tage nach Allergenapplikation der Fall.¹¹ In der vorliegenden Arbeit war die Zahl der Lymphozyten in der BAL erst 96 h nach Allergenprovokation deutlich gegenüber den Ausgangswerten erhöht und damit in Bezug auf die Richtung des Zellzuwachses am murinen Modell konform mit der zitierten Studie.

Den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nach hatte Stress die stärksten Effekte 24 h nach Allergenprovokation auf die leukozytäre Mobilisation. Eine erhöhte Anzahl von Leukozyten, insbesondere von eosinophilen Granulozyten, 24 h nach Allergenexposition über die Atemwege wurde bereits in diversen Studien des murinen Asthma-Modells nach Stressexposition in Form eines 24 h andauernden Schallintervalls in der BAL festgestellt^{54,74,79} und in Zusammenhang mit einer beschleunigten Mobilisierung dieser Zellen in das bronchoalveoläre Lumen gesehen.¹¹² Vor dem Hintergrund einer am murinen Asthma-Modell nach Stress beobachteten Steigerung der AHR in Verbindung mit einer erhöhten Leukozytenzahl in der BAL^{74,79} lässt die nach Stress beschleunigte Mobilisation der eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten in der vorliegenden Arbeit auf eine zumindest kurzzeitige Intensivierung der Atemwegsentzündung am murinen Asthma-Modell schließen.

Auch im humanen Organismus konnte eine Stressreaktivität eosinophiler Granulozyten festgestellt werden. Nach Allergenexposition während einer Prüfungsstressphase zeigte sich bei der Untersuchung von an allergischem Asthma bronchiale erkrankten Schülern in Sputum und Serum eine höhere Anzahl eosinophiler Granulozyten und eine erhöhte Konzentration von IL-5 gegenüber Schülern mit Asthma, die nicht unter Stresseinfluss standen.⁶⁹

Am Tiermodell variieren die Effekte von Stress auf die entzündliche Infiltration der Atemwege mit den experimentellen Bedingungen hinsichtlich der Dauer und der Art der Stresseinwirkung, die in unterschiedlichem Ausmaß die verschiedenen Stressachsen aktivieren können. Im Kontext einer nach Stressexposition (24 h Schall) intensivierten

DISKUSSION

Eosinophilie der Atemwege wurde am murinen Asthma-Modell nach Stress eine erhöhte Expression von SP in den in sensiblen Neuronen der vagalen Ganglien der Atemwege⁵⁴ und die Vermittlung von NK-1-Rezeptoren beobachtet.⁷⁹ Der Einsatz von NK-1-Rezeptorantagonisten bei Meerschweinchen mit Atemwegsentzündung hatte einen verringerten Einstrom von eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in das bronchoalveoläre Lumen zur Folge.¹²⁹ Am murinen Asthma-Modell wurde nach Stress in Form der Zerstörung einer bestehenden sozialen Ordnung durch einen Eindringling über jeweils 2 h an 6 aufeinander folgenden Tagen nach Allergenprovokation eine erhöhte Anzahl eosinophiler Granulozyten und Lymphozyten in der BAL gegenüber nicht stressexponierten Tieren beobachtet. Diese Tiere litten im Gegensatz zu den nicht stressexponierten Tieren an einer protrahierten Entzündung und zeigten bei deutlich erhöhten Plasmacorticosteronspiegeln eine erhöhte Corticoidresistenz.¹³⁰ In der BAL von Balb/c-Mäusen mit experimentellem Asthma wurde nach Stress akuter Art (Immobilisation über 6 h während der Allergenprovokation über die Atemwege) eine reduzierte Anzahl von eosinophilen Granulozyten und Lymphozyten beobachtet, wohingegen Stress chronischer Art (6 Tage andauernde tägliche Immobilisation über 6 h während und nach der Allergenprovokation über die Atemwege) die Anzahl dieser Zellpopulationen steigerte. Diese Veränderungen wurden in Zusammenhang mit der Aktivierung von Opioid-Rezeptoren gesehen.¹³¹

Lymphozyten und eosinophile Granulozyten können über Mitwirkung von VCAM-1 in das bronchoalveoläre Lumen,¹³² bzw. in tracheales Gewebe¹³³ einwandern. Die Relevanz einer Stressmodulation von VCAM-1 und ICAM-1 für die lumenwärts gerichtete Leukozytenmigration wurde in Kap. 5.3.1 dargelegt. ICAM-1 wurde erhöht in den Atemwegen gesunder, stressexponierter Mäuse beobachtet¹¹⁰ und im Rahmen des murinen Modells der atopischen Dermatitis wurde VCAM-1 nach Stress vermehrt lokal exprimiert in Verbindung mit einer gesteigerten eosinophilen kutanen Akkumulation und einer Verdichtung SP-positiver Nervenfasern.¹¹¹ Am murinen Asthma-Modell konnte keine Stressmodulation dieses Moleküls festgestellt werden und die stressbedingte Steigerung der leukozytären Invasion des bronchoalveolären Lumens wurde im Kontext einer erhöhten Eotaxinkonzentration gesehen (Kap. 5.3.1).¹¹²

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war die Anzahl der neutrophilen Granulozyten 6 h und 24 h nach Allergenprovokation in den Tieren der Stressgruppe signifikant erhöht. Die Mobilisierung neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten in verschiedene

DISKUSSION

Kompartimente unter dem Einfluss von Glucocorticoiden und Katecholaminen ist ein bekanntes Phänomen.⁶⁸ An gesunden Balb/c-Mäusen bewirkte akuter Stress in Form einer Immobilisation bei 4 °C über 1 h eine ausgeprägte Mobilisierung neutrophiler Granulozyten 2 h und 6 h nach Stressapplikation aus dem Knochenmark in die Blutbahn, die über β 1-Rezeptoren vermittelt wurde.⁹⁶ Stress in Form sozialer Konfrontation konnte bei C57BL/6-Mäusen ohne Vorbehandlung mit allergenen Substanzen eine gesteigerte Anzahl neutrophiler Granulozyten im Lungengewebe provozieren, die mit einer erhöhten Expression von mRNA für ICAM-1 einherging.¹¹⁰

5.7 Interpretation der Ergebnisse im Hinblick auf die Atemwegsentzündung

5.7.1 Gegenläufige Entwicklung von BAL Leukozyten und peribronchialen CD4+ Zellen nach Stress

In zahlreichen Studien wurden nach Stress entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit reduzierte CD4+ und CD8+ T-Zellen in verschiedenen Kompartimenten beobachtet und häufig in Zusammenhang mit einer reduzierten Immunantwort gesehen (Kap. 5.3.1). Da der in der vorliegenden Arbeit untersuchte murine Balb/c-Genotyp durch eine ausgeprägte Abhängigkeit der eosinophilen Atemwegsinfektion¹³⁴ und der AHR¹³⁵ von der Anwesenheit der CD4+ T-Zellen in den Atemwegen charakterisiert ist, erscheint die CD4+ Zellreduktion im peribronchialen Gewebe nach Stress in der vorliegenden Arbeit zunächst überraschend. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten der BAL-Untersuchung sprechen dagegen auch für eine zumindest kurzzeitige Intensivierung der Atemwegsentzündung und sind konkordant mit anderen Untersuchungen an Balb/c-Mäusen, die nach Stress neben einer gesteigerten Leukozytenzahl in der BAL^{112,136} auch eine gesteigerte AHR zeigten (Kap. 1.5, Kap. 5.6).⁷⁹ Eine möglicherweise im Rahmen der vorliegenden Arbeit stattgehabte gesteigerte Abwanderung von CD4+ Zellen nach Stress aus peribronchialen Gewebe in das bronchoalveoläre Lumen (Kap. 5.3.1) könnte auf eine verstärkte Aktivität dieser Zellen nach Stress hin deuten und so die eosinophile Atemwegsentzündung und die AHR intensivieren.

Am murinen Modell zum Migrationsverhalten antigenspezifischer CD4+ T-Zellen akkumulierten diese Zellen nach Allergenprovokation über die Atemwege frühzeitiger in den Atemwegen als eosinophile Granulozyten mit ähnlicher lokaler Präferenz und es

DISKUSSION

wurde eine Effektorfunktion von CD4+ T-Zellen für die eosinophile Infiltration vermutet.⁸⁶ Verschiedene murine Asthma-Modelle bestätigen die herausragende Rolle von CD4+ T-Zellen für die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in die Atemwege und die Ausbildung der AHR nach kurzzeitiger aerogener Allergenapplikation (Kap. 1.3.1).^{13,14}

Die Synthese von IL-5 ist bedeutend für die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten in das murine pulmonale Gewebe, die Durchwanderung des Atemwegsepithels in das bronchoalveoläre Lumen scheint von anderen CD4+ T-Zellabhängigen Faktoren beeinflusst zu werden.¹³⁷ Möglicherweise trägt hierzu die Synthese von IL-4 in CD4+ T-Zellen bei, denn nach Neutralisierung von IL-4 am murinen Asthma-Modell fand zwar keine reduzierte Einwanderung eosinophiler Granulozyten in das Lungengewebe, wohl aber eine reduzierte Rekrutierung dieser Zellen in das bronchoalveoläre Lumen nach Allergenprovokation statt.¹³⁸ Auch für die Ausbildung der AHR ist IL-4 bei Balb/c-Mäusen essentiell.⁸⁵ Da beim Balb/c-Mausgenotyp mit seiner Tendenz zu Th2-Reaktionen der CD4+ T-Zellen die Menge von IL-4 nicht durch Mehrproduktion pro Zelle, sondern vielmehr durch eine vermehrte Anzahl IL-4 produzierender CD4+ T-Zellen erreicht wird,¹³⁹ wurde in Zusammenhang mit der weiter oben beschriebenen, nach Stress intensivierten AHR und eosinophilen Entzündung umso mehr für die vorliegende Arbeit ein Anstieg dieser Population im Gewebe der Atemwege erwartet.

Verschiedene Studien weisen auf diskrepante Ergebnisse bezüglich der Zellakkumulation in pulmonalen Gewebe und Lumen hin. Am murinen Asthma-Modell war nach Stress die Menge der BAL-Leukozyten 24 h nach Allergenprovokation erhöht, während diese im pulmonalen Gewebe 6 h und 24 h nach Allergenprovokation reduziert war.¹¹² In einer Übersichtsarbeit von Persson und Uller wurde das Phänomen diskrepanter Ergebnisse bezüglich der Anzahl immunkompetenter Zellen in BAL und Bronchialgewebe von Asthmatikern aus verschiedenen Quellen zitiert und auf die lumenwärts gerichtete Zellmigration zurückgeführt. Persson und Uller beschreiben eine Förderung der Antigenerkennung und der Immunreaktion durch immunkompetente Zellen, die das Bronchialepithel in Richtung des bronchoalveolären Lumens passieren.⁹¹

Die Autoren der oben zitierten Übersichtsarbeit diskutieren für die lumenwärts gerichtete Zellmigration aus pulmonalem Gewebe auch eine die Entzündung auflösende Wirkung, zumal bei verminderter transepithelialer Migration eine Intensivierung der Entzündung der Atemwege festgestellt wurde.⁹¹ Unter diesem Aspekt kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch eine nach Stress beschleunigte Resolution der Immunreaktion

DISKUSSION

im pulmonalen Gewebe nach kurzzeitiger Intensivierung durch den beschleunigten Übertritt von CD4⁺ Zellen in das bronchoalveoläre Lumen am murinen Asthma-Modell erwogen werden. Die nach Stress reduzierte peribronchiale CD4⁺-Zellzahl spricht nicht für eine vermehrte Proliferation oder weitere Rekrutierung dieser Zellen aus Blut und lymphatischen Organen in das peribronchiale Gewebe, sondern kann eher als Zeichen der Immunsuppression nach Stress am murinen Asthma-Modell gedeutet werden. So erscheint es auch plausibel, dass neben der nach Stress beschleunigten Mobilisation der Lymphozyten in das bronchoalveoläre Lumen 24 h nach Allergenprovokation in der vorliegenden Arbeit keine Hinweise auf eine absolute Mengensteigerung der Lymphozyten über den gesamten Beobachtungszeitraum durch Stress bestehen. Dies zeigte sich in der ab 48 h nach Allergenprovokation signifikanten Steigerung der Lymphozytenzahl in der Kontrollgruppe verglichen mit der Stressgruppe sowie in einer im weiteren Verlauf zunehmenden Zellzahlsteigerung der Lymphozyten in Stress- und Kontrollgruppen, die durch Stress nicht signifikant moduliert wurde.

Im Rahmen der AD und des Asthma bronchiale wurden nach Stress Zeichen der Immunregulierung am Tiermodell und beim Menschen beobachtet. Am murinen Modell der AD konnte nach Stress in Form von Schall über 24 h jeweils vor 2-maliger Sensibilisierung eine reduzierte Immunreaktion beobachtet werden, die mit einer reduzierten Anzahl kutaner eosinophiler Granulozyten einherging. Gleichzeitig war ein Zuwachs *forkhead box P3* (FOXP3)-positiver regulatorischer kutaner T-Zellen, die als allergoprotektiv beschrieben wurden, nachweisbar.¹⁴⁰ Nach Stress im Rahmen einer länger andauernden Prüfungssituation konnten bei atopisch reagierenden Individuen, die zu einem großen Teil an Asthma bronchiale litten, Zeichen der Immunsuppression nachgewiesen werden. In der Blutzirkulation konnte zwar eine Dominanz von Th2-Zytokinen in Verbindung mit einer erhöhten CD4/CD8-Ratio beobachtet werden, aber Stress reduzierte generell die Zytokinsynthese einschließlich von Th1- (IFN- γ , IL-2) und Th2-Zytokinen (IL-4, IL-5), und die erhöhte CD4/CD8-Ratio begründete sich zu einem nicht unerheblichen Anteil auf einen signifikanten Anstieg regulatorischer CD4⁺CD45RO⁺CD25 T-Zellen, der auch bei gesunden Individuen nachweisbar war.¹⁴¹

5.7.2 CD8⁺ Zellreduktion nach Stress in der Atemwegsentzündung

Für die 96 h nach Allergenapplikation über die Atemwege nach Stress reduzierten peribronchialen CD8⁺ Zellen im Rahmen der vorliegenden Arbeit könnten eine reduzierte

DISKUSSION

Proliferation in Lunge oder Lymphknoten, eine gesteigerte Apoptose oder ein Übertritt in das bronchoalveoläre Lumen ursächlich sein (Kap. 5.3.1).

Die Konsequenzen einer reduzierten CD8+ Zellzahl in peribronchialen Gewebe nach Stress müssen differenziert betrachtet werden, da die Bedeutung dieser Zellen für den klinischen Verlauf des Asthmas widersprüchlich beschrieben wird. Es wurde eine Suppression der eosinophilen Atemwegsentzündung und der AHR durch CD8+ T-Zellen, aber auch eine Förderung dieser Phänomene beobachtet und eine gegenüber CD4+ T-Zellen verminderte pathogenetische Relevanz dieser Zellen im Rahmen der Atemwegsentzündung diskutiert (Kap. 1.3.2).^{5,12,33}

Für die Interpretation der nach Stress reduzierten peribronchialen CD8+ Zellzahl im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist der heterogene Charakter dieser Zellen in verschiedenen Kompartimenten zu verschiedenen Zeitpunkten von Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Stressprozedur nach abgeschlossener i.p. Sensibilisierung mit Beginn der ersten Provokation über die Atemwege und hatte somit keinen Einfluss mehr auf die Antigenprägung im Rahmen der i.p. Sensibilisierung. So erscheint insbesondere die Beschreibung der Funktion pulmonaler CD8+ T-Zellen von Interesse für die vorliegende Arbeit zu sein.

An Balb/c-Mäusen wurde im Rahmen des Asthma-Modells demonstriert, dass die Depletierung von CD8+ T-Zellen vor oder während der intraperitonealen Sensibilisierung mit Ovalbumin die eosinophile Atemwegsentzündung und die IgE-Bildung förderte, während diese nach abgeschlossener Sensibilisierung und vor aerogener Provokation keine Effekte hatte. Dies wurde mit der ausgeprägten Heterogenität des Zytokinsynthesemusters von antigenspezifischen CD8+ T-Zellen in verschiedenen Kompartimenten in Zusammenhang gebracht. Aus Milz und peribronchialen Lymphknoten isolierte CD8+ T-Zellen synthetisierten im Gegensatz zu pulmonalen CD8+ T-Zellen vorwiegend Th1-Zytokine und hatten eine größere Zytolysekapazität als pulmonale CD8+ T-Zellen, in denen neben der Synthese einer größeren Menge IL-10 auch die Synthese von IL-4, IL-5 nach aerogener Provokation festgestellt wurde. Für die Unterschiede hinsichtlich der Zytokinsynthese wurden eine lokale Prägung dieser Zellen und ein verändertes migratorisches Verhalten spezialisierter Zellen diskutiert.³⁰

Auch durch andere Untersucher wurde eine Synthese von Th2-Zytokinen in murinen, pulmonalen CD8+ T-Zellen nach Behandlung mit Ovalbumin detektiert. An C57BL/6-Mäusen wurde mRNA für IL-4, IL-5 und IL-13 in pulmonalen CD8+ T-Zellen

DISKUSSION

nachgewiesen. Nach Sensibilisierung und aerogener Provokation mit Ovalbumin wurde die Menge der für diese Zytokine positiven Zellen gesteigert.³⁷ Nach unspezifischer Stimulation von *in vitro* kultivierten CD8+ T-Zellen der zervikalen Lymphknoten wurde bei Ratten nach Sensibilisierung mit Ovalbumin eine erhöhte Produktion von IL-4 in CD8+ T-Zellen im Vergleich zu CD8+ T-Zellen nicht sensibilisierter Tiere festgestellt. In diesem Kontext wurde CD8+ T-Zellen eine Förderung der entzündlichen Reaktion und der AHR zugeschrieben.¹⁴²

Untersuchungen der BAL von Asthmatikern zeigten eine in CD4+ und CD8+ T-Zellen gleichwertige Synthese von IL-4, IL-5 und IL-13 nach Allergenprovokation bei unspezifischer Stimulation der angelegten Kultur mit Phorbol Myristat Acetat (PMA) und Ionomycin, es stellten sich allerdings auch keine Unterschiede gegenüber gesunden Probanden dar.¹⁴³ In der bronchialen Mukosa atopischer und nicht atopischer Asthmatischer konnte mRNA für IL-4 und IL-5 in CD8+ T-Zellen in weitaus geringerem Ausmaß als in CD4+ T-Zellen festgestellt werden.¹⁴⁴ Im Blut von Asthmatikern zirkulierende CD8+ T-Zellen zeigten eine generell geringe Zytokinproduktion im Vergleich zu CD4+ T-Zellen und insbesondere keine erhöhte Th2-Zytokinsynthese gegenüber Gesunden.¹⁶ Vor diesem Hintergrund könnte die Synthese von Th2-Zytokinen in CD8+ T-Zellen bei Asthmatikern von untergeordneter Bedeutung sein.

Während die Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 sich positiv auf die eosinophile Entwicklung, Migration und Überlebenszeit auswirken (Kap. 1.2),^{5,6} hat die Synthese von IL-10 einen supprimierenden Einfluss auf die eosinophile Atemwegsentzündung und die AHR bei Balb/c-Mäusen nach Ovalbuminbehandlung.¹⁴⁵ In Gegenwart IL-10-synthetisierender CD8+ T-Zellen wurde an Mäusen nach Ovalbuminbehandlung *in vivo* eine verminderte IgE-Synthese und *in vitro* eine reduzierte Aktivierung naiver T-Zellen und Effektor-T-Zellen beobachtet.¹⁴⁶ IL-10 ist bedeutsam für die Limitierung entzündlicher Prozesse im Rahmen Th1-, Th2- und Th17-betonter Immunreaktionen. Im Hinblick auf allergische Prozesse spielt die Verminderung von Th2-Zytokinen durch IL-10 eine bedeutende Rolle. Über diverse kostimulatorische Signale kann IL-10 auch die T-Zellproliferation hemmen.¹⁴⁷

Im Hinblick auf die in Synthese von IL-4, IL-5 und IL-13 in pulmonalen CD8+ T-Zellen könnte Stress über die reduzierte Anzahl von CD8+ Zellen zu einer abgeschwächten Entzündung im Gewebe der Atemwege zu späteren Zeitpunkten führen. Die Beobachtung, dass IL-10 insbesondere in späteren Stadien nach Antigenaktivierung in

DISKUSSION

CD8+ Zellen und anderen Immunzellen nachweisbar ist,¹⁴⁸ spricht für eine große Bedeutung dieses Zytokins bei der Interpretation der Reduktion der peribronchialen CD8+ Zellen nach Stress im Rahmen der vorliegenden Arbeit 96 h nach Allergenprovokation. Angesichts der Synthesekapazität von IL-10 in pulmonalen CD8+ T-Zellen könnte Stress über die Reduktion dieser Zellen im peribronchialen Gewebe im Rahmen der vorliegenden Arbeit die entzündliche Reaktion im peribronchialen Raum am murinen Asthma-Modell protrahieren. Möglicherweise kommen aber die beschriebenen immunregulativen Eigenschaften der CD8+ T-Zellen auch erst mit ihrem Übertritt in das bronchoalveoläre Lumen zum Tragen und dienen so der Resolution der Atemwegsentzündung. Der Übertritt von Immunzellen des pulmonalen Gewebes in das bronchoalveoläre Lumen ist ein wichtiger Mechanismus für die Resolution der Atemwegsentzündung.⁹¹ In fortgeschrittenen Stadien der Atemwegsentzündung wurde im Rahmen der Resolution am murinen Asthma-Modell und bei Asthmatikern eine relative Reduktion von CD8+ T-Zellen im Verhältnis zu CD4+ T-Zellen in den Atemwegen beobachtet (Kap. 5.7.3).¹¹ Unter diesem Aspekt könnte die nach Stress am Ende des Beobachtungszeitraums reduzierte Anzahl peribronchialer CD8+ Zellen zu einer schnelleren Resolution der Atemwegsentzündung am murinen Modell beitragen.

Zur Abklärung der These einer vermehrten transepithelialen Migration der CD8+ Zellen wäre die Untersuchung der BAL mit einer Spezifizierung der Lymphozyten relevant. Zur Beschreibung der Effekte der CD8+ Zellreduktion nach Stress auf die murine Atemwegsentzündung wäre eine Untersuchung ihres Zytokinprofils und die Entwicklung entzündlicher Infiltrate zu späteren Untersuchungszeitpunkten sinnvoll.

5.7.3 Steigerung der CD4/CD8-Ratio nach Stress in der Atemwegsentzündung

96 h nach Allergenprovokation war die CD4/CD8-Ratio im Bereich des peribronchialen Gewebes nach Stress signifikant erhöht (Kontrolle:4,0 *versus* Stress:10,9; $p < 0,05$; Mann-Whitney Test). Dieses Ergebnis beruht vorwiegend auf einer reduzierten CD8+ Zellzahl nach Stress zu diesem Zeitpunkt.

Am murinen Asthma-Modell wurde eine niedrigwertige CD4/CD8-Ratio in der BAL mit einer gesteigerten Allergentoleranz in Verbindung gebracht.⁸⁷ Ein Anstieg des Quotienten im Rahmen der vorliegenden Arbeit könnte unter diesen Gesichtspunkten eine

DISKUSSION

protrahierte entzündliche Reaktion im peribronchialen Gewebe der untersuchten Tiere implizieren.

Fakt ist aber auch, dass Stress nach den Daten der vorliegenden Arbeit am Ende des Beobachtungsraums mit einer erhöhten CD4/CD8-Ratio der Dynamik des zellulären CD8+Infiltrates im Rahmen des Asthma bronchiale vorgreift. Bei Asthmatikern und asthmainduzierten Balb/c-Mäusen wurde in der BAL eine prozentuale Reduktion von CD8+ T-Zellen 7 Tage nach Allergenprovokation bei weiterhin erhöhtem Anteil von CD4+ T-Zellen im Rahmen der Resolution der Immunreaktion beobachtet, die mit einer erhöhten CD4/CD8-Ratio einherging.¹¹

Warum aber waren die Effekte von Stress auf CD4+ Zellen zu früheren Zeitpunkten (12 h und 24 h nach Allergenprovokation) als auf CD8+ Zellen (96 h nach Allergenprovokation) detektierbar? In der Literatur werden verschiedene Faktoren für die Empfindlichkeit von Zellen gegenüber Stress erwähnt und das Ausmaß der Aktivierung sowie der Grad der Differenzierung spielen offenbar eine große Rolle (Kap. 5.3.1).¹⁹ Im Rahmen der Atemwegsentzündung wurde eine deutlich höhergradige Aktivierung von CD4+ Zellen gegenüber CD8+ Zellen in den Atemwegen von B6D2F1-Mäusen¹² und in der BAL von Asthmatikern beschrieben.³³ Diesbezüglich könnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit Unterschiede zwischen CD4+ und CD8+ Zellen bestehen und eine vornehmlich in früheren Stadien ausgeprägtere Aktivierung von CD4+ Zellen, bzw. ein höherer Anteil ausdifferenzierter CD4+ Effektorzellen im Vergleich zur Population der CD8+ Zellen könnten ursächlich sein. Dies könnte zumindest im Hinblick auf eine mögliche gesteigerte transepitheliale Migration der CD4+ Zellen nach Stress relevant sein (Kap. 5.3.1). Auf welche Mechanismen die Reduktion der CD8+ Zellen nach Stress gegründet ist, bleibt ebenso hypothetisch, aber möglicherweise stehen hier andere Mechanismen im Vordergrund, wie zum Beispiel eine nach Stress gesteigerte Apoptose dieser Zellen. Die generell sehr niedrige Anzahl apoptotischer Zellen ohne messbaren Einfluss von Stress am Ende des Beobachtungszeitraums in der vorliegenden Arbeit erlaubt allerdings diesbezüglich keine aussagekräftigen Rückschlüsse in Bezug auf das murine Asthma-Modell (Kap. 5.3.1).

DISKUSSION

5.7.4 Relevanz der relativen Stressresistenz von T-Lymphozyten für die Atemwegsentzündung

In der vorliegenden Arbeit hatte Stress innerhalb des Untersuchungszeitraums von 6 h bis 96 h nach Allergenprovokation keine signifikanten Auswirkungen auf die Gesamtpopulation der pulmonalen T-Zellen.

Die Relevanz des Einflusses von Stress auf die Gesamtheit der T-Lymphozyten kann sicherlich in Frage gestellt werden, bedenkt man die Präsenz verschiedener Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen. Die Anteiligkeit der verschiedenen Subklassen in der murinen Lunge an der Gesamtpopulation der T-Zellen wird vom Genotyp mitgeprägt. Bei unbehandelten C57BL/6-Mäusen tragen residente pulmonale T-Zellen zu 45% V 4, zu 15% V 1 und zu einem Teil V 6 als Rezeptorbestandteil.³⁹ In anderen Studien dieses unbehandelten murinen Genotyps wurde der Anteil von V 4+ T-Zellen auf 30%⁴⁵ oder auch 20%⁸⁸ der pulmonalen T-Zellen beziffert. Im Vergleich verschiedener muriner Genotypen fiel ein 4-fach erhöhter Anteil pulmonaler T-Zellen in C57BL/6 Mäusen gegenüber Balb/c Mäusen auf. Balb/c-Mäuse hatten einen erhöhten Anteil der V 4+ Fraktion an der Gesamtpopulation der T-Zellen (50%). In beiden Genotypen waren 48 h im Anschluss an die Allergenprovokation über die Atemwege nach i.p. Sensibilisierung insbesondere pulmonale V 4+ T-Zellen vermehrt nachweisbar.⁸⁸

Die Anteilmäßigkeit der V 4+ und V 6+ Subklassen ist zudem altersabhängig. Nach der Geburt dominiert in der Lunge von unbehandelten Balb/c-Mäusen bis ca. 9-10 Wochen die V 6+ Klasse, die mit zunehmendem Alter durch die V 4+ Klasse ersetzt wird.¹⁴⁹ Die verschiedenen Subklassen scheinen auch lokale Präferenzen aufzuweisen, in den Lungen 8-12 Wochen alter C57BL/6-Mäuse wurden V 4+ und V 1+ Zellen vorwiegend parenchymal, V 6+ Zellen dagegen eher peribronchial lokalisiert.³⁹

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren T-Zellen der 6-8 Wochen alten Balb/c-Mäuse zumeist peribronchial lokalisiert und könnten somit einen Anteil von V 6+Zellen enthalten, respektive von Änderungen der pulmonalen Zellzusammensetzung nach Ovalbuminbehandlung, die wie oben erwähnt eine zahlenmäßige Dominanz von V 4+ Zellen provoziert. Demnach könnte ein entscheidender Anteil der im Rahmen der vorliegenden Arbeit im pulmonalen Gewebe der Balb/c-Mäuse untersuchten T-Zellen V 4 exprimieren.

DISKUSSION

In einer Übersichtsarbeit wurden V 6V 1+ T-Zellen vorwiegend antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. In dort zitierten Studien am Tiermodell wurden diese Effekte bei einer Reihe infektiöser Erreger in verschiedenen Geweben beobachtet und in einigen Fällen mit der Sekretion von immunregulativem *transforming-growth-factor-beta* (TGF- β) in diesen Zellen in Verbindung gebracht.⁴¹ Vy6+ T-Zellen wurden am murinen Modell hemmende Einflüsse auf die pulmonale Fibrosierung und die pulmonale Infiltration von CD4+ und CD8+ T-Zellen zugeschrieben.¹⁵⁰

Die V 4+ Klasse wird vorwiegend mit einer die AHR supprimierenden Wirkung in Verbindung gebracht (Kap. 1.3.3). Untersuchungen an IFN- γ -defizienten Mäusen legen eine Abhängigkeit der AHR-Suppression von IFN- γ in V 4+ T-Zellen nahe. Nach unspezifischer Stimulation von V 4+ T-Zellen unbehandelter Mäuse mit PMA und Ionomycin *in vitro* wurde in dieser Subklasse eine erhöhte Synthese von IFN-festgestellt.⁴⁵

V 1+ T-Zellen spielen beim murinen experimentellen Asthma-Modell im Zuge der i.p. Sensibilisierung eine Rolle. Für diese Effekte wurde unter anderem ein erhöhtes Vorkommen in der Milz im Vergleich zur Lunge, wo Vy4+ Zellen zahlreicher sind, diskutiert.⁴⁴ Dabei sind genetische Unterschiede relevant. Bei C57BL/6-Mäusen wurde für Vy1+ Zellen eine Förderung von AHR und Atemwegsentzündung demonstriert, während bei Balb/c-Mäusen in diesem Zusammenhang lediglich eine gesteigerte AHR beobachtet wurde.⁴⁴ In weiterführenden Untersuchungen konnten AHR-fördernde Effekte von V 1+ T-Zellen nicht in Zusammenhang mit einer Synthese von IL-4 oder IL-13 in diesen Zellen gebracht werden. Von den Untersuchern wurde ein Einfluss von T-Zellen auf Zellen mit Th2-Zytokinsynthesekapazität für diese Effekte in Erwägung gezogen.¹⁵¹

Im Rahmen des chronischen Asthma bronchiale unterscheidet sich die Zellzusammensetzung bezüglich der T-Zellsubklassen in den menschlichen Atemwegen deutlich vom murinen Asthma-Modell. Unter diesem Aspekt erscheint ein Vergleich der Stressreaktion von T-Zellen in den Atemwegen anhand des murinen Asthma-Modells, wie in der vorliegenden Arbeit erfolgt, nur bedingte Aussagekraft für die Pathologien im Rahmen der Atemwegsentzündung bei Asthmatikern zu haben.

Eine Studie an Asthmatikern zeigte ein gehäuftes Vorkommen von V 1+ und V 1+ T-Zellen, bzw. IL-4 synthetisierender T-Zellen in der BAL nach intrazellulärer Zytokinfärbung im Vergleich zu Personen, die nicht an Asthma erkrankt waren. Im Rahmen dieser Untersuchung wurde bei Asthmatikern auch ein erhöhtes Vorkommen

DISKUSSION

von CD4⁺ T-Zellen beschrieben, die vorwiegend den V_β1-Rezeptoranteil exprimierten.⁴² Während einer akuten Asthmaexacerbation konnten erhöhte Mengen von V_β1⁺ T-Zellen im Sputum gegenüber gesunden Probanden nachgewiesen werden. Nach *in vitro* Stimulation produzierten diese insbesondere IL-4, IL-10 und TNF- α .⁴³

In der Zusammenschau der oben beschriebenen Studien ist von einem erhöhten Anteil V_β4 und V_β6 tragender T-Zellen in den Lungen der innerhalb der vorliegenden Arbeit untersuchten Balb/c-Mäuse auszugehen, die sich protektiv auf die AHR und die pulmonale Entzündung auswirken und innerhalb des gewählten Beobachtungszeitraums keiner wesentlichen Modulation durch Stress unterliegen.

Der überwiegende Anteil der T-Zellen ist negativ für CD4 und CD8.⁹ Anhand muriner Splenozyten konnte eine Assoziation der CD4-Expression auf T-Zellen mit der Synthese von Th2-Zytokinen (IL-4, IL-5, IL-10) in diesen Zellen demonstriert werden.²⁰ An mit Ovalbumin sensibilisierten C57BL/6-Mäusen wurde nach Allergenprovokation über die Atemwege insbesondere eine Expansion von pulmonalen V_β4⁺ Zellen festgestellt, die CD8 koexprimieren und Antigene MHC-Klasse-I-abhängig erkennen. Die CD8-Koexpression der T-Zellen wurde hier in Verbindung mit einer Synthese von IFN- γ nach *in vitro* Stimulation gebracht.⁴⁵

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Bestimmung der Expression von CD4 und CD8 ohne weitere Charakterisierung als - oder TZR-tragende Zellen durchgeführt. (Kap. 5.8). Die stressbedingte Reduktion der Expression von CD4 und CD8 erscheint jedoch nicht wesentlich durch eine Veränderung von T-Zellen mitbedingt zu sein, da Stress im gewählten Beobachtungszeitraum keine signifikanten Effekte auf die Population der T-Zellen hatte.

Da T-Zellen bereits unmittelbar nach Allergenprovokation in die Regulation der Atemwegsentzündung im Rahmen des Asthmas involviert sind (Kap. 1.3.3), wäre die Untersuchung ihrer Stressreaktivität zu noch früheren Zeitpunkten als in der vorliegenden Arbeit untersucht, interessant. Gegenüber verschiedenen bakteriellen Antigenen zeichnete sich am murinen Modell *in vitro* und *in vivo* sowie *in vitro* an humanen Zellen ab, dass T-Zellen im Vergleich zu T-Zellen frühzeitiger nach Antigenkontakt aktivierbar sind. *In vivo* wurde dies anhand der Expression von CD69 2 h nach Antigeninjektion konstatiert, während 6 h nach Antigenapplikation keine Differenzen diesbezüglich zwischen T-Zellen und T-Zellen mehr bestanden. Die frühzeitige Aktivierung der T-Zellen kann durch TNF- α vermittelt werden. Auch ohne

DISKUSSION

Antigenkontakt sind T-Zellen im Gegensatz zu T-Zellen durch TNF- stimulierbar. Sind T-Zellen in Kontakt mit Antigenen, wird ihre Empfindlichkeit gegenüber TNF- erhöht und ihre Aktivität gesteigert.¹⁵² Diese Eigenschaft könnte eine erhöhte Stress-Sensibilität im Rahmen des Antigenkontaktes implizieren, da Stress die Menge von TNF- steigern kann.^{77,128} Die am Tiermodell bezüglich der Zellaktivierung erhobenen Ergebnisse spiegeln sich auch in der Untersuchung von Asthmatikern im Stadium der akuten Exacerbation wider, die einen erhöhten Anteil aktivierter T-Zellen gegenüber T-Zellen darlegt.⁴³ Somit könnte eine Stressreagibilität der T-Zellen am murinen Asthma-Modell hinsichtlich einer veränderten Zellzahl im pulmonalen Gewebe oder in der BAL unmittelbar nach Allergenkonfrontation auch von Bedeutung für die Entwicklung des Asthma bronchiale in Zusammenhang mit Stress beim Menschen sein.

5.8 Methodenkritik

Um der Beurteilung der Zellverteilungen im pulmonalen Gewebe gerecht zu werden, wurde in der vorliegenden Arbeit eine immunhistochemische Vorgehensweise gewählt. Wir entschieden uns für die Zuordnung der CD4- und CD8-Expression zur Population der T-Zellen. In der immunhistochemischen Darstellung der T-Zellen im Gewebe ist eine Doppelfärbung des CD3-Antigens bei lichtmikroskopischer Interpretation nicht valide durchführbar und eine separate Färbung von CD3 zur Abschätzung der Gesamt-T-Zellzahl wäre nicht vollständig aussagekräftig in Anbetracht der vielen T-Zellsubpopulationen, zumal nicht immer exakt die gleichen Gewebepartien für alle Färbungen dienen könnten.

Im Rahmen muriner Studien wurde mit der solitären Färbung von CD4 und CD8 von für diese Moleküle positiven T-Zellen ausgegangen.^{95,98} Da diverse Untersuchungen am murinen Asthma-Modell eine ausgeprägte Infiltration der Lunge mit T-Zellen zeigten^{11,30,85,104} erscheint diese Vorgehensweise im Rahmen der vorliegenden Arbeit gerechtfertigt zu sein.

Weitere Beobachtungen sprechen für die in der vorliegenden Arbeit gewählte Vorgehensweise. CD4- und CD8-Moleküle fungieren beim Menschen, der Ratte und der Maus vorwiegend als Korezeptoren auf T-Zellen, die Antigene so über MHC-Moleküle erkennen können. Nur ein geringer Teil von CD4- und CD8-Molekülen wird auch auf anderen Immunzellen exprimiert. Bei der Maus betrifft dies zu einem Anteil auch dendritische Zellen in Milz und Thymus.¹⁵³ Dendritische Zellen lassen sich anhand

DISKUSSION

morphologischer Kriterien von T-Lymphozyten unterscheiden. Eine morphologische Zelldifferenzierung war in der vorliegenden Arbeit möglich, insofern keine dichten Zellcluster vorlagen. An Balb/c Mäusen, die einem der vorliegenden Arbeit ähnlichem Sensibilisierungsprotokoll zur Provokation einer Atemwegsentzündung unterzogen wurden, konnte die CD8-Expression der infiltrierenden Zellen mittels Färbung des β -Rezeptorbestandteils eindeutig T-Zellen zugeordnet werden, eine bedeutende Expression von CD8 auf dendritischen Zellen wurde durch quantitativen Vergleich der α - und β -Rezeptoruntereinheiten des CD8- Moleküls ausgeschlossen.³⁰

Zumeist besteht bei $\gamma\delta$ T-Zellen keine Koexpression von CD4 und CD8 (Kap. 5.7.4).⁹ CD4 wird nur selten auf murinen $\gamma\delta$ T-Zellen exprimiert, während dies für CD8 häufiger beobachtet wurde.¹⁵³ Auf murinen Monozyten und Makrophagen, die in Leber, Milz und Peritoneum untersucht wurden, ist CD4 und CD8 in der Regel nicht vorhanden.¹⁵³

Unter den genannten Aspekten wurde in der vorliegenden Arbeit von einem überwiegenden Vorkommen der CD4- und CD8-Moleküle auf $\gamma\delta$ T-Zellen ausgegangen.

5.9 Das komplexe Zusammenspiel der Stressreaktion verschiedener immunologischer Parameter prägt die Atemwegsentzündung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass nach Stress unter den hier angewendeten Konditionen eine schnellere Mobilisierung der Leukozyten in das bronchoalveoläre Lumen von Zeichen der Immunsuppression im peribronchialen Gewebe begleitet wird. Einige in Kap. 5.3.1 und Kap. 5.7.1 diskutierte Faktoren sprechen für eine nach Stress intensivierete Rekrutierung peribronchialer CD4+ Zellen in das bronchoalveoläre Lumen. Dies könnte den unmittelbaren Kontakt mit dem Allergen fördern und so zu einer Intensivierung der Atemwegsentzündung im Rahmen des murinen Asthma-Modells führen.

Die nach Stress reduzierte Zahl proliferierender Zellen und gesteigerte Zahl apoptotischer Zellen weisen auf negative Effekte von Stress auf die Regeneration im Bereich des Atemwegsepithels und des angrenzenden peribronchialen Areal hin. Bei Chronizität der Atemwegsentzündung spielen diese Vorgänge, die eine gestörte Epithelfunktion mit eingeschränkter Barrierefunktion nach sich ziehen, eine große Rolle hinsichtlich einer erhöhten Belastung durch Allergene, Viren und andere Umwelttoxene.⁵

DISKUSSION

Es ist sehr plausibel, dass Stress auch auf diesem Wege zu einer Verschlechterung der Atemwegsentzündung und der klinischen Symptomatik führen kann.

Weitere Studien sind notwendig, um die genauen Mechanismen der Reduktion von CD4+ und CD8+ Zellen im peribronchialen Gewebe abzuklären, insbesondere eine Subtypisierung der BAL-Lymphozyten, und so die Konsequenzen für die Entzündung der Atemwege besser abschätzen zu können. Mithilfe der Bestimmung einer Koexpression von Molekülen, die im Kontext immunregulativer Vorgänge vermehrt auftreten (z. B. FOXP3^{140,148}) könnte die These einer schnelleren Resolution der Entzündung nach Stress im peribronchialen Gewebe nach Stress weiter untersucht werden.

Für die nach Stress beobachtete intensivierete AHR und Eosinophilie der murinen Atemwege⁷⁴ sowie die Verschlechterung der Klinik bei Asthmatikern^{4,73} (Kap. 1.5) können noch weitere Stress-empfindliche Faktoren diskutiert werden.

Die Zytokinsyntheseleistung kann durch neuroaktive Stoffe gesteigert werden. *In vitro* wurde an murinen splenischen mononukleären Zellen, die mit Ovalbumin behandelten Tieren entnommen wurden, nach Applikation von NGF eine dosisabhängig gesteigerte Syntheseleistung für IL-4 und IL-5 demonstriert.¹⁵⁴ Die *in vitro* nachgewiesene Expression von NGF und NGF-Rezeptortranskripten in murinen Th2-CD4+ T-Zellen⁶⁴ könnte somit einen Angriffspunkt für eine Steigerung der Zytokinsynthese dieser Zellen unabhängig ihrer Anzahl im Rahmen der Stressreaktion darstellen. In pulmonalen Lymphknoten von Balb/c-Mäusen wurde nach Stress (24 h Schall) eine gesteigerte Anzahl TNF-synthetisierender T-Zellen demonstriert und durch Applikation von SP reproduziert.¹³⁶ Bei Asthmatikern korrelierte ein hohes Stressempfinden positiv mit erhöhten Prozentsätzen TNF-produzierender T-Lymphozyten in der Blutzirkulation und erhöhten *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF)-Plasmaspiegeln. Ein derartiger Zusammenhang konnte bei gesunden Personen nicht beobachtet werden. Zudem bestand eine Korrelation der Einschränkung der respiratorischen Funktion mit der Konzentration von BDNF im Plasma.¹⁵⁵

Während T-Zellen im Rahmen der Initiierung des Asthma bronchiale eine außerordentlich wichtige Rolle zukommt,⁵ kann bei bereits länger bestehender Erkrankung mit chronisch entzündlichen Zellinfiltraten die Stressreaktion von T-Zellen weniger relevant sein. Neben T-Zellen sind verschiedene Immunzellen eine Quelle für Zytokine, die die Entzündung der Atemwege und die AHR unterhalten und stellen damit einen weiteren Angriffspunkt für Stress dar. T-Zellen haben einen vergleichsweise hohen Anteil an der mRNA-

DISKUSSION

Synthese für IL-4 und IL-5 im pulmonalen Gewebe von Asthmatikern. Bei der quantitativen Analyse des pulmonalen Gewebes wurde der Großteil von IL-4 und IL-5 dagegen in eosinophilen Granulozyten und Mastzellen detektiert.¹⁴⁴ Mit der Speicherung der Zytokine in Granula können diese bei Degranulation unmittelbar freigesetzt werden und damit deutlich zur Unterhaltung der Atemwegsentzündung und der AHR beitragen. Die Degranulation von Mastzellen und Granulozyten kann durch verschiedene Mediatoren der Stressantwort, wie z. B. CRH,¹⁵⁶ Katecholamine⁶³ und SP^{82,84} induziert werden und spielt so in der Stressreaktion des Organismus eine bedeutende Rolle.

Effekte von Neuromediatoren auf Immunzellen, die am Tiermodell oder *in vitro* an humanen Zellen erhoben wurden (Kap. 5.3.1) müssen in Bezug auf den menschlichen Organismus relativiert werden. Die unter dem Einfluss des Stresshormons Cortisol beschriebene zelluläre Immunsuppression scheint bei Allergikern eine geringe Relevanz zu haben. Zytokine, die im Rahmen chronischer allergischer Erkrankungen ständig erhöht sind und die HHNR-Achse aktivieren können, tragen zu einer reduzierten Funktionalität der Stressantwort der HHNR-Achse bei. Bei an Asthma erkrankten Kindern wurde eine verringerte Expression der Gene, die für den Glucocorticoidrezeptor und β 2-adrenerge Rezeptoren kodieren, beschrieben.⁷¹ Eine stressbedingte Exacerbation des Asthma bronchiale wurde auch mit einer eingeschränkten Funktionalität des Glucocorticoidrezeptors aufgrund der Habituation an andauernd erhöhte Cortisolspiegel in Verbindung gebracht, mit in der Folge bestehendem Verlust der antiinflammatorischen Glucocorticoidwirkungen.⁷⁰

Übergeordnete Systeme bestimmen den Ausgang der Stressreaktion. Die kognitive Verarbeitung innerhalb derer ein physiologischer Stimulus auftritt, hat eine wichtige Rolle für die endgültige Wirkung dieses Stimulus. Inzwischen werden verschiedene Neurophenotypen im Rahmen des Asthmas mit unterschiedlicher Disposition beschrieben. Die kognitive Verarbeitung verschiedener asthmaassoziierter Stimuli unterscheidet sich entsprechend der Tendenz, nur eine EAR oder auch eine LAR zu entwickeln. Asthmatiker, die zu einer eosinophilen Atemwegsentzündung neigen, zeigten nach Allergenprovokation eine stärkere magnetresonanztomografisch nachgewiesene Aktivierung der Insularinde während der Präsentation Asthma-assoziiierter Stimuli, als Asthmatiker mit singulärer EAR. Es bestand eine Korrelation der Aktivität in diesem Bereich mit dem Ausmaß der eosinophilen Atemwegsentzündung und einer eingeschränkten respiratorischen Funktion.¹⁵⁷

DISKUSSION

Diese Beobachtungen spiegeln die hohe Komplexität der individuell und interindividuell unterschiedlich ablaufenden Verarbeitungsmuster externer Einflüsse wider und zeigen zusammen mit dem vielschichtigen Zusammenspiel der an der immunologischen Reaktion beteiligten Elemente die breiten Variationsmöglichkeiten der Effekte von Stress auf.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Bundesärztekammer (BÄK), Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). Nationale Versorgungsleitlinie Asthma, 2. Auflage. 2009. (Accessed August 7, 2013, at: http://www.versorgungsleitlinien.de//themen/asthma/index_html.)
- 2 Deshmukh VM, Toelle BG, Usherwood T, O'Grady B, Jenkins CR. Anxiety, panic and adult asthma: a cognitive-behavioral perspective. *Respir Med* 2007;101(2):194-202.
- 3 Richardson LP, Lozano P, Russo J, McCauley E, Bush T, Katon W. Asthma symptom burden: relationship to asthma severity and anxiety and depression symptoms. *Pediatrics* 2006;118(3):104-51.
- 4 Chen E, Miller GE. Stress and inflammation in exacerbations of asthma. *Brain Behav Immun* 2007;21(8):993-9.
- 5 Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008;38(6):872-97.
- 6 Janeway CA, Travers P, Walport M. Immunologie. 7. Auflage. Heidelberg, Germany: Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- 7 Benayoun L, Letuve S, Druilhe A, Boczkowski J, Dombret MC, Mechighel P, Megret J, Leseche G, Aubier M, Pretolani M. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human asthmatic airways. Relationship with proliferation, apoptosis and airway remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;164:1487-94.
- 8 Vignola AM, Chanez P, Chiappara G, Siena L, Merendino A, Reina C, Gagliardo R, Profita M, Bousquet J, Bonsignore G. Evaluation of apoptosis of eosinophils, macrophages, and T lymphocytes in mucosal biopsy specimens of patients with asthma and chronic bronchitis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103(4):563-73.
- 9 Carding SR, Egan PJ. Gamma delta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002;2(5):336-45.
- 10 Ricciardolo FL, Di Stefano A, van Krieken JH, Sont JK, van Schadewijk A, Rabe KF, Donner CF, Hiemstra PS, Sterk PJ, Mauad T. Proliferation and inflammation in bronchial epithelium after allergen in atopic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2003;33(7):905-11.
- 11 Lommatzsch M, Julius P, Kuepper M, Garn H, Bratke K, Irmscher S, Luttmann W, Renz H, Braun A, Virchow JC. The course of allergen-induced leukocyte infiltration in human and experimental asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2006;118(1):91-7.
- 12 Garlisi CG, Falcone A, Hey JA, Paster TM, Fernandez X, Rizzo CA, Minnicozzi M, Jones H, Billah MM, Egan RW, Umland SP. Airway eosinophils, T cells, Th2-type cytokine mRNA, and hyperreactivity in response to aerosol challenge of allergic mice with previously established pulmonary inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17(5):642-51.

LITERATURVERZEICHNIS

- 13 Hogan SP, Koskinen A, Matthaehi KI, Young IG, Foster PS. Interleukin-5-producing CD4+T cells play a pivotal role in aeroallergen-induced eosinophilia, bronchial hyperreactivity, and lung damage in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;157(1):210-18.
- 14 Corry DB, Grünig G, Hadeiba H, Kurup VP, Warnock ML, Sheppard D, Rennick DM, Locksley RM. Requirements for allergen-induced airway hyperreactivity in T and B cell-deficient mice. *Mol Med* 1998;4(5):344-55.
- 15 Walker C, Kaegi MK, Braun P, Blaser K. Activated T cells and eosinophilia in bronchoalveolar lavages from subjects with asthma correlated with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 1991;88(6):935-42.
- 16 Corrigan CJ, Hamid Q, North J, Barkans J, Moqbel R, Durham S, Gemou-Engesaeth V, Kay AB. Peripheral blood CD4 but not CD8 T-lymphocytes in patients with exacerbation of asthma transcribe and translate messenger RNA encoding cytokines which prolong eosinophil survival in the context of a Th2-type pattern: effect of glucocorticoid therapy. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1995;12(5):567-78.
- 17 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T-cell clone. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136(7):2348-57.
- 18 Romagnani S, Maggi E, Del Prete GF, Parronchi P, De Carli M, Piccini MP, Manetti R. T cell subtypes in allergy. In: Jolles G, Karlsson JA, Taylor J. *T-Lymphocyte and inflammatory cell research in asthma*. London, England: Academic Press, 1993:32-42.
- 19 Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995;2(3):271-9.
- 20 Wen L, Barber DF, Pao W, Wong FS, Owen MJ, Hayday A. Primary gamma delta cell clones can be defined phenotypically and functionally as Th1/Th2 cells and illustrate the association of CD4 with Th2 differentiation. *J Immunol* 1998;160(4):1965-74.
- 21 Steinman L. A brief history of Th17, the first major revision in the Th1/Th2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage. *Nat Med* 2007;13(2):139-45.
- 22 Bodey KJ, Semper AE, Redington AE, Madden J, Teran LM, Holgate ST, Frew AJ. Cytokine profiles of BAL T cells and T-cell clones obtained from human asthmatic airways after local allergen challenge. *Allergy* 1999;54(10):1083-93.
- 23 Yoshida M, Watson RM, Rerecich T, O'Byrne PM. Different profiles of T-cell IFN-gamma and IL-12 in allergen-induced early and dual responders with asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(5):1004-9.
- 24 Randolph DA, Carruthers CJ, Szabo SJ, Murphy KM, Chaplin DD. Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *J Immunol* 1999;162(4):2375-83.

LITERATURVERZEICHNIS

- 25 Atasoy U, Curry SL, Lopez de Silanes I, Shyu AB, Casolaro V, Gorospe M, Stellato C. Regulation of eotaxin gene expression by TNF-alpha and IL-4 through mRNA stabilization: involvement of the RNA-binding protein HuR. *J Immunol* 2003;171(8):4369-78.
- 26 Iademarco MF, Barks JL, Dean DC. Regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression by IL-4 and TNF-alpha in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95(1):264-71.
- 27 Wakashin H, Hirose K, Maezawa Y, Kagami S, Suto A, Watanabe N, Saito Y, Hatano M, Tokuhisa T, Iwakura Y, Puccetti P, Iwamoto I, Nakajima H. IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178(10):1023-32.
- 28 Broide DH, Finkelman F, Bochner BS, Rothenberg ME. Advances in mechanisms of asthma, allergy, and immunology in 2010. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127(3):689-95.
- 29 MacAry PA, Holmes BJ, Kemeny DM. Ovalbumin-specific, MHC class I-restricted, alpha beta-positive, Tc1 and Tc0 CD8+ T cell clones mediate the in vivo inhibition of rat IgE. *J Immunol* 1998;160(2):580-7.
- 30 Stock P, Kallinich T, Akbari O, Quarcoo D, Gerhold K, Wahn U, Umetsu DT, Hamelmann E. CD8+ T cells regulate immune responses in a murine model of allergen-induced sensitization and airway inflammation. *Eur J Immunol* 2004;34(7):1817-27.
- 31 Kelly C, Stenton S, Ward C, Bird G, Hendrick D, Walters E. Lymphocyte subsets in bronchoalveolar lavage fluid obtained from stable asthmatics, and their correlations with bronchial responsiveness. *Clin Exp Allergy* 1989;19(2):169-75.
- 32 Van Rensen ELJ, Sont JK, Evertse CE, Willems LNA, Mauad T, Hiemstra PS, Sterk PJ, AMPUL Study Group. Bronchial CD8 cell infiltrate and lung function decline in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(7):837-41.
- 33 Robinson DS, Hamid Q, Bentley A, Ying S, Kay AB, Durham SR. Activation of CD4+ T cells, increased Th2-type cytokine mRNA expression, and eosinophil recruitment in bronchoalveolar lavage after allergen inhalation challenge in patients with atopic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1993;92(2):313-24.
- 34 McMenamin C, Holt PG. The natural immune response to inhaled soluble protein antigens involves major histocompatibility complex (MHC) class I-restricted CD8+ T cell-mediated but MHC class II-restricted CD4+ T cell-dependent immune deviation resulting in selective suppression of immunoglobulin E production. *J Exp Med* 1993;178(3):889-99.
- 35 Isogai S, Jedrzkiewicz S, Taha R, Hamid Q, Martin JG. Resident CD8+ T cells suppress CD4+ T cell-dependent late allergic airway responses. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115(3):521-6.
- 36 Allakhverdi Z, Lamkjioued B, Olivenstein R, Hamid Q, Renzi PM. CD8 depletion-induced late airway response is characterized by eosinophilia, increased eotaxin, and decreased IFN-gamma expression in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(3 Pt 1):1123-31.

LITERATURVERZEICHNIS

- 37 Miyahara N, Takeda K, Kodama T, Joetham A, Taube C, Park JW, Miyahara S, Balhorn A, Dakhama A, Gelfand EW. Contribution of antigen-primed CD8+ T cells to the development of airway hyperresponsiveness and inflammation is associated with IL-13. *J Immunol* 2004;172(4):2549-58.
- 38 Hamelmann E, Oshiba A, Paluh J, Bradley K, Loader J, Potter TA, Larsen GL, Gelfand EW. Requirement for CD8+ T cells in the development of airway hyperresponsiveness in a murine model of airway sensitization. *J Exp Med* 1996;183(4):1719-29.
- 39 Wands JM, Roark CL, Aydintug MK, Jin N, Hahn YS, Cook L, Yin X, Dal Porto J, Lahn M, Hyde DM, Gelfand EW, Mason RJ, O'Brien RL, Born WK. Distribution and leucocyte contacts of gamma delta T cells in the lung. *J Leuc Biol* 2005;78(5):1086-96.
- 40 Cheng L, Cui Y, Shao H, Han G, Zhu L, Huang Y, O'Brien RL, Born WK, Kaplan HJ, Sun D. Mouse gamma delta T cells are capable of expressing MHC class II molecules, and of functioning as antigen-presenting cells. *J Neuroimmunol* 2008;203(1):3-11.
- 41 O'Brien RL, Born WK. Gamma delta T cell subsets: a link between TCR and function? *Semin Immunol* 2010;22(4):193-8.
- 42 Spinozzi F, Agea E, Bistoni O, Forenza N, Monaco A, Falini B, Bassotti G, De Benedictis F, Grignani AF, Bertottot A. Local expansion of allergen-specific CD30+Th2-type gamma delta T cells in bronchial asthma. *Mol Med* 1995;1(7):821-6.
- 43 Hamzaoui A, Kahan A, Ayed K, Hamzaoui K. T cells expressing the gamma delta receptor are essential for Th2-mediated inflammation in patients with acute exacerbation of asthma. *Mediators Inflamm* 2002;11(2):113-9.
- 44 Hahn YS, Taube C, Jin N, Sharp L, Wands JM, Aydintug MK, Lahn M, Huber SA, O'Brien RL, Gelfand EW, Born WK. Different potentials of gamma delta T cell subsets in regulating airway responsiveness: V gamma 1+ cells, but not V gamma 4+ cells, promote airway hyperreactivity, Th2 cytokines, and airway inflammation. *J Immunol* 2004;172(5):2894-902.
- 45 Lahn M, Kanehiro A, Takeda K, Terry J, Hahn YS, Aydintug MK, Konowal A, Ikuta K, O'Brien RL, Gelfand EW, Born WK. MHC class I-dependent V gamma 4+ pulmonary T cells regulate alpha beta T cell-independent airway responsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(13):8850-5.
- 46 Skeen JM, Rix EP, Freeman MM, Ziegler HK. Exaggerated proinflammatory and Th1 responses in the absence of gamma delta T cells after infection with listeria monocytogenes. *Infect Immun* 2001;69(12):7213-23.
- 47 Dalton JE, Pearson J, Scott P. The interaction of gamma delta T cells with activated macrophages is a property of the V gamma 1 subset. *J Immunol* 2003;171(2):6488-94.
- 48 King DP, Hyde DM, Jackson KA, Novosad DM, Ellis TN, Putney L, Stovall MY, Van Winkle LS, Beaman BL, Ferrick DA. Cutting edge: protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 1999;162(9):5033-6.

LITERATURVERZEICHNIS

- 49 Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(22):14338-43.
- 50 Selye H. A syndrome produced by diverse noxious agents. 1936. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 1998;10(2):230-1.
- 51 Lazarus RS, Alfert E. Short-circuiting of threat by experimentally altering cognitive appraisal. *J Abnorm Psychol* 1964;69:195-205.
- 52 O'Connor TM, O'Halloran DJ, Shanahan F. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM* 2000;93(6):323-33.
- 53 Ebner K, Singewald N. The role of substance P in stress and anxiety responses. *Amino Acids* 2006;31(3):251-272.
- 54 Joachim RA, Cifuentes LB, Sagach V, Quarcoo D, Hagen E, Arck PC, Fischer A, Klapp BF, Dinh QT. Stress induces substance P in vagal sensory neurons innervating the mouse airways. *Clin Exp Allergy* 2006;36(8):1001-10.
- 55 Aloe L, Bracci-Laudiero L, Allevat E, Lambiase A, Micera A, Tirassa P. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(22):10440-4.
- 56 Fehder WP, Sachs J, Uvaydova M, Douglas SD. Substance P as an immune modulator of anxiety. *Neuroimmunomodulation* 1997;4(1):42-8.
- 57 Joachim RA, Kuhlmei A, Dinh QT, Handjiski B, Fischer T, Peters EM, Klapp BF, Paus R, Arck PC. Neuronal plasticity of the "brain-skin connection": stress-triggered up-regulation of neuropeptides in dorsal root ganglia and skin via nerve growth factor-dependent pathways. *J Mol Med (Berl)* 2007;85(12):1369-78.
- 58 Shepherd AJ, Downing JEG, Miyan JA. Without nerves, immunology remains incomplete – in vivo veritas. *Immunology* 2005;116(2):145-63.
- 59 Black PH. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun* 2002;16(6):622-53.
- 60 Dinh QT, Suhling H, Fischer A, Braun A, Welte T. Innervation of the airways in asthma bronchiale and chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Pneumologie* 2011;65(5):283-92. doi: 10.1055/s-0030-1256123.
- 61 Lamb JP, Sparrow MP. Three-dimensional mapping of sensory innervation with substance P in porcine bronchial mucosa: comparison with human airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;166(9):1269-81.
- 62 Segerstrom SC, Miller GE. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. *Psychol Bull* 2004;130(4):601-30.
- 63 Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve - an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rew* 2000;52(4):595-638.

LITERATURVERZEICHNIS

- 64 Ehrhard PB, Erb P, Graumann U, Otten U. Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase Trk in activated CD4-positive T-cell clones. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(23):10984-8.
- 65 Sloan EK, Capitanio JP, Cole SW. Stress-induced remodeling of lymphoid innervation. *Brain Behav Immun* 2008;22(1):15-21.
- 66 Peters EM, Kuhlmei A, Tobin DJ, Müller-Röver S, Klapp BF, Arck PC. Stress exposure modulates peptidergic innervation and degranulates mast cells in murine skin. *Brain Behav Immun* 2005;19(3):252-62.
- 67 Peters EMJ, Liezmann C, Spatz K, Daniltschenko M, Joachim R, Gimenez-Rivera A, Hendrix S, Botchkarev VA, Brandner JM, Klapp BF. Nerve growth factor partially recovers inflamed skin from stress-induced worsening in allergic inflammation. *J Invest Dermatol* 2011;131(3):735-43.
- 68 Dhabhar FS, Malarkey WB, Neri E, McEwen BS. Stress-induced redistribution of immune cells--from barracks to boulevards to battlefields: a tale of three hormones--Curt Richter Award winner. *Psychoneuroendocrinology* 2012;37(9):1345-68.
- 69 Liu LY, Coe CL, Swenson CA, Kelly EA, Kita H, Busse WW. School examinations enhance airway inflammation to antigen challenge. *Am J Respir Crit Care Med* 2002;165(8):1062-7.
- 70 Haczku A, Panettieri RA. Social stress and asthma: the role of corticosteroid insensitivity. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(3):550-8.
- 71 Priftis KN, Papadimitriou A, Nicolaidou P, Chrousos GP. Dysregulation of the stress response in asthmatic children. *Allergy* 2009;64(1):18-31.
- 72 Montoro J, Mullol J, Jáuregui I, Dávila I, Ferrer M, Bartra J, del Cuvillo A, Sastre J, Valero A. Stress and allergy. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2009;19 Suppl 1:40-7.
- 73 Sandberg S, Järvenpään S, Penttinen A, Paton JY, McCann DC. Asthma exacerbations in children immediately following stressful life events: a Cox's hierarchical regression. *Thorax* 2004;59(12):1046-51.
- 74 Joachim RA, Quarcoo D, Arck PC, Herz U, Renz H, Klapp BF. Stress enhances airway reactivity and airway inflammation in an animal model of allergic bronchial asthma. *Psychosom Med* 2003;65(5):811-5.
- 75 Buske-Kirschbaum A, Kern S, Ebrecht M, Hellhammer DH. Altered distribution of leukocyte subsets and cytokine production in response to acute psychosocial stress in patients with psoriasis vulgaris. *Brain Behav Immun* 2007;21(1):92-9.
- 76 Schmid-Ott G, Jaeger B, Adamek C, Koch H, Lamprecht F, Kapp A, Werfel T. Levels of circulating CD8+ T lymphocytes, natural killer cells, and eosinophils increase upon acute psychosocial stress in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(1):171-7.
- 77 Straub RH, Kalden JR. Stress of different types increases the proinflammatory load in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2009;11(3):114. doi: 10.1186/ar2712.
- 78 Herz U, Braun A, Rückert R, Renz H. Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. *Clin Exp Allergy* 1998;28(5):625-34.

LITERATURVERZEICHNIS

- 79 Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D, Dinh QT, Arck PC, Klapp BF. Neurokinin-1 receptor mediates stress-exacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. *Psychosom Med* 2004;66(4):564-71.
- 80 Wenzel S, Holgate ST. The mouse trap: it still yields few answers in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(11):1173-8.
- 81 Arck PC, Merali FS, Stanisz AM, Stead RH, Chaouat G, Manuel J, Clark DA. Stress-induced murine abortion associated with substance P-dependent alteration in cytokines in maternal uterine decidua. *Biol Reprod* 1995;53(4):814-9.
- 82 Arck PC, Handjiski B, Hagen E, Joachim R, Klapp BF, Paus R. Indications for a brain-hair follicle axis: inhibition of keratinocyte proliferation and up-regulation of keratinocyte apoptosis in telogen hair follicles by stress and substance P. *FASEB J* 2001;15(13):2536-8.
- 83 Lundberg JM, Hökfelt T, Martling CR, Saria A, Cuello C. Substance P-immunoreactive sensory nerves in the lower respiratory tract of various mammals including man. *Cell Tissue Res* 1984;235(2):251-61.
- 84 Kulka M, Sheen CH, Tancowny BP, Grammer LC, Schleimer RP. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology* 2008;123(3):398-410.
- 85 Corry DB, Folkesson HG, Warnock ML, Erle DJ, Matthay MA, Wiener-Kronish JP, Locksley RM. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. *J Exp Med* 1996;183(1):109-17.
- 86 Hasegawa A, Hayashi K, Kishimoto H, Yang M, Tofukuji S, Suzuki K, Nakajima H, Hoffman RM, Shirai M, Nakayama T. Color-coded real-time cellular imaging of lung T-lymphocyte accumulation and focus formation in a mouse asthma model. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125(2):461-8.
- 87 Yiamouyiannis CA, Schramm CM, Puddington L, Stengel P, Baradaran-Hosseini E, Wolyniec WW, Whiteley HE, Thrall RS. Shifts in lung lymphocyte profiles correlate with the sequential development of acute allergic and chronic tolerant stages in a murine asthma model. *Am J Pathol* 1999;154(6):1911-21.
- 88 Hahn YS, Taube C, Jin N, Takeda K, Park JW, Wands JM, Aydintug MK, Roark CL, Lahn M, O'Brien RL, Gelfand EW, Born WK. V gamma 4+gamma delta T cells regulate airway hyperreactivity to methacholine in ovalbumin-sensitized and challenged mice. *J Immunol* 2003;171(6):3170-8.
- 89 Cui ZH, Joetham A, Aydintug MK, Born WK, Gelfand EW. Reversal of established allergic airway hyperreactivity by longterm allergen challenge depends on gamma delta T cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168(11):1324-32.
- 90 Kirby AC, Newton DJ, Carding SR, Kaye PM. Evidence for the involvement of lung-specific gamma delta T cell subsets in local responses to streptococcus pneumoniae infection. *Eur J Immunol* 2007;37(12):3404-13.
- 91 Persson CG, Uller L. Resolution of cell-mediated airways diseases. *Respir Res* 2010;11:75. doi: 10.1186/1465-9921-11-75.

LITERATURVERZEICHNIS

- 92 Saul AN, Oberyszyn TM, Daugherty C, Kusewitt D, Jones S, Jewell S, Malarkey WB, Lehman A, Lemeshow S, Dhabhar FS. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. *J Natl Cancer Inst* 2005;97(23):1760-7.
- 93 Frick LR, Arcos ML, Rapanelli M, Zappia MP, Brocco M, Mongini C, Genaro AM, Cremaschi GA. Chronic restraint stress impairs T-cell immunity and promotes tumor progression in mice. *Stress* 2009;12(2):134-43.
- 94 Freeman ML, Sheridan BS, Bonneau RH, Hendricks RL. Psychological stress compromises CD8+ T cell control of latent herpes simplex virus type 1 infections. *J Immunol* 2007;179(1):322-8.
- 95 Jarillo-Luna A, Rivera-Aguilar V, Martínez-Carrillo BE, Barbosa-Cabrera E, Garfias HR, Campos-Rodríguez R. Effect of restraint stress on the population of intestinal intraepithelial lymphocytes in mice. *Brain Behav Immun* 2008;22(2):265-75.
- 96 Zieziulewicz TJ, Mondal TK, Gao D, Lawrence DA. Stress-induced effects, which inhibit host defenses, alter leukocyte trafficking. *Cell Stress Chaperones* 2013;18(3):279-91.
- 97 Kanemi O, Zhang X, Sakamoto Y, Ebina M, Nagatomi R. Acute stress reduces intraparenchymal lung natural killer cells via beta-adrenergic stimulation. *Clin Exp Immunol* 2005;139(1):25-34.
- 98 Dhabhar FS, Saul AN, Daugherty C, Holmes TH, Bouley DM, Oberyszyn TM. Short-term stress enhances cellular immunity and increases early resistance to squamous cell carcinoma. *Brain Behav Immun* 2010;24(1):127-37.
- 99 Van Westerloo DJ, Choi G, Löwenberg EC, Truijien J, De Vos AF, Endert E, Meijers JCM, Zhou L, Pereira MPFL, Queiroz KCS, Diks SH, Levi M, Peppelenbosch MP, van der Poll T. Acute stress elicited by bungee jumping suppresses human innate immunity. *Mol Med* 2011;17(3-4):180-8.
- 100 Karandikar NJ, Hotchkiss EC, McKenna RW, Kroft SH. Transient stress lymphocytosis. An immunophenotypic characterization of the most common cause of newly identified adult lymphocytosis in a tertiary hospital. *Am J Clin Pathol* 2002;117(5):819-25.
- 101 Anane LH, Edwards KM, Burns VE, Drayson MT, Riddell NE, van Zanten JJ, Wallace GR, Mills PJ, Bosch JA. Mobilization of gamma delta T lymphocytes in response to psychological stress, exercise, and beta-agonist infusion. *Brain Behav Immun* 2009;23(6):823-9.
- 102 Anane LH, Edwards KM, Burns VE, Zanten JJ, Drayson MT, Bosch JA. Phenotypic characterization of gamma delta T cells mobilized in response to acute psychological stress. *Brain Behav Immun* 2010;24(4):608-14.
- 103 Atanackovic D, Schnee B, Schuch G, Faltz C, Schulze J, Weber CS, Schafhausen P, Bartels K, Bokemeyer C, Brunner-Weinzierl MC, Deter HC. Acute psychological stress alerts the adaptive immune response: stress-induced mobilization of effector T cells. *J Neuroimmunol* 2006;176(1-2):141-152.
- 104 Garlisi CG, Falcone A, Billah MM, Egan RW, Umland SP. T cells are the predominant source of interleukin-5 but not interleukin-4 mRNA expression in the lungs of antigen-challenged allergic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15(3):420-8.

LITERATURVERZEICHNIS

- 105 Okutsu M, Ishii K, Niu KJ, Nagatomi R. Cortisol-induced CXCR4 augmentation mobilizes T lymphocytes after acute physical stress. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 2005;288(3):591-9.
- 106 Hood VC, Cruwys SC, Urban L, Kidd BL. Differential role of neurokinin receptors in human lymphocyte and monocyte chemotaxis. *Regul Pept* 2000;96(1-2):17-21.
- 107 Ainslie MP, McNulty CA, Huynh T, Symon FA, Wardlaw AJ. Characterisation of adhesion receptors mediating lymphocyte adhesion to bronchial endothelium provides evidence for a distinct lung homing pathway. *Thorax* 2002;57(12):1054-9.
- 108 Porter JC, Hall A. Epithelial ICAM-1 and ICAM-2 regulate the egression of human T cells across the bronchial epithelium. *FASEB J* 2009;23(2):492-502.
- 109 Lindsey KQ, Caughman SW, Olerud JE, Bunnett NW, Armstrong CA, Ansel JC. Neural regulation of endothelial cell-mediated inflammation. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2000;5(1):74-8.
- 110 Curry JM, Hanke ML, Piper MG, Bailey MT, Bringardner BD, Sheridan JF, Marsh CB. Social disruption induces lung inflammation. *Brain Behav Immun* 2010;24(3):394-402.
- 111 Pavlovic S, Daniltchenko M, Tobin DJ, Hagen E, Hunt SP, Klapp BF, Arck PC, Peters EMJ. Further exploring the brain-skin connection: stress worsens dermatitis via substance P-dependent neurogenic inflammation in mice. *J Invest Dermatol* 2008;128(2):434-46.
- 112 Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D, Dinh QT, Arck PC, Klapp BF. Effect of stress on eotaxin and expression of adhesion molecules in a murine model of allergic airway inflammation. *J Neuroimmunol* 2007;182(1-2):55-62.
- 113 Bosnjak B, Stelzmueller B, Erb KJ, Epstein MM. Treatment of allergic asthma: modulation of Th2 cells and their responses. *Respir Res* 2011;12(1):114. doi: 10.1186/1465-9921-12-114.
- 114 Stevenson JR, Westermann J, Liebmann PM, Hörtnner M, Rinner I, Felsner P, Wölfler A, Schauenstein K. Prolonged alpha-adrenergic stimulation causes changes in leukocyte distribution and lymphocyte apoptosis in the rat. *J Neuroimmunol* 2001;120(1-2):50-7.
- 115 Oberbeck R, Schmitz D, Wilsenack K, Schuler M, Pehle B, Schedlowski M, Exton MS. Adrenergic modulation of survival and cellular immune functions during polymicrobial sepsis. *Neuroimmunomodulation* 2004;11(4):214-23.
- 116 Yin D, Tuthill D, Mufson RA, Shi Y. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J Exp Med* 2000;191(8):1423-8.
- 117 O'Sullivan S, Cormican L, Burke C, Poulter L. Fluticasone induces T cell apoptosis in the bronchial wall of mild to moderate asthmatics. *Thorax* 2004;59(8):657-661.
- 118 Sommershof A, Basler M, Riether C, Engler H, Groettrup M. Attenuation of the cytotoxic T lymphocyte response to lymphocytic choriomeningitis virus in mice subjected to chronic stress. *Brain Behav Immun* 2011;25(2):340-8.

LITERATURVERZEICHNIS

- 119 Kohm AP, Sanders VM. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. *Pharmacol Rev* 2001;53(4):487-525.
- 120 Bartik MM, Brooks WH, Roszman TL. Modulation of T cell proliferation by stimulation of the β -adrenergic receptor: lack of correlation between inhibition of T cell proliferation and cAMP accumulation. *Cell Immunol* 1993;148(2):408-21.
- 121 Loza MJ, Foster S, Peters SP, Penn RB. Beta-agonists modulate T-cell functions via direct actions on type 1 and type 2 cells. *Blood* 2006;107(5):2052-60.
- 122 Woolley KL, Gibson PG, Carty K, Wilson AJ, Twaddell SH, Woolley MJ. Eosinophil apoptosis and the resolution of airway inflammation in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154(1):237-43.
- 123 Kodama T, Matsuyama T, Miyata S, Nishimura H, Nishioka Y, Kitada O, Sugita M. Kinetics of apoptosis in the lung of mice with allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 1998;28(11):1435-43.
- 124 Müller M, Grunewald J, Höglund CO, Dahlén, Eklund A, Stridh H. Altered apoptosis in bronchoalveolar lavage lymphocytes after allergen exposure of atopic asthmatic subjects. *Eur Respir J* 2006; 28(3):513-22.
- 125 Trifilieff A, El-Hashim A, Bertrand C. Time course of inflammatory and remodeling events in a murine model of asthma: effect of steroid treatment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279(6):L1120-8.
- 126 Salmon M, Walsh DA, Koto H, Barnes PJ, Chung KF. Repeated allergen exposure of sensitized Brown-Norway rats induces airway cell DNA synthesis and remodeling. *Eur Respir J* 1999;14(3):633-41.
- 127 Panettieri RA Jr, Murray RK, Eszterhas AJ, Bilgen G, Martin JG. Repeated allergen inhalations induce DNA synthesis in airway smooth muscle and epithelial cells in vivo. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 1):L417-24.
- 128 Peters EM, Liezmann C, Klapp BF, Kruse J. The neuroimmune connection interferes with tissue regeneration and chronic inflammatory disease in the skin. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1262:118-26. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06647.x.
- 129 Schuiling M, Zuidhof AB, Zaagsma J, Meurs H. Involvement of tachykinin NK1 receptor in the development of allergen-induced airway hyperreactivity and airway inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159(2):423-30.
- 130 Bailey MT, Kierstein S, Sharma S, Spaits M, Kinsey SG, Tliba O, Amrani Y, Sheridan JF, Panettieri RA, Haczku A. Social stress enhances allergen-induced airway inflammation in mice and inhibits corticosteroid responsiveness of cytokine production. *J Immunol* 2009;182(12):7888-96.
- 131 Okuyama K, Ohwada K, Sakurada S, Sato N, Sora I, Tamura G, Takayanagi M, Ohno I. The distinctive effects of acute and chronic psychological stress on airway inflammation in a murine model of allergic asthma. *Allergol Int* 2007;56(1):29-35.

LITERATURVERZEICHNIS

- 132 Chin JE, Hatfield CA, Winterrowd GE, Brashler JR, Vonderfecht SL, Fidler SF, Griffin RL, Kolbasa KP, Krzesicki RF, Sly LM, Staite ND, Richards IM. Airway recruitment of leukocytes in mice is dependent on alpha 4-integrins and vascular cell adhesion molecule-1. *Am J Physiol* 1997;272(2 Pt 1):L219-29.
- 133 Nakajima H, Sano H, Nishimura T, Yoshida S, Iwamoto I. Role of vascular cell adhesion molecule 1/very late activation antigen 4 and intercellular adhesion molecule 1/lymphocyte function-associated antigen 1 interactions in antigen-induced eosinophil and T cell recruitment into the tissue. *J Exp Med* 1994;179(4):1145-54.
- 134 Nakata A, Kaminuma O, Ogawa K, Fujimura H, Fushimi K, Kikkawa H, Naito K, Ikezawa K, Egan RW, Mori A. Correlation between eosinophilia induced by CD4+ T cells and bronchial hyperresponsiveness. *Int Immunol* 2001;13(3):329-39.
- 135 Zosky GR, Larcombe AN, White OJ, Burchell JT, von Garnier C, Holt PG, Turner DJ, Wikstrom ME, Sly PD, Stumbles PA. Airway hyperresponsiveness is associated with activated CD4+ T cells in the airways. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297(2):L373-9.
- 136 Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D, Dinh T, Arck PC, Klapp BF. Upregulation of tumor necrosis factor-alpha by stress and substance P in a murine model of allergic airway inflammation. *Neuroimmunomodulation* 2006;13(1):43-50.
- 137 Crosby JR, Shen HH, Borchers MT, Justice JP, Ansay T, Lee JJ, Lee NA. Ectopic expression of IL-5 identifies an additional CD4+ T cell mechanism of airway eosinophil recruitment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;282(1):99-108.
- 138 Cohn L, Herrick C, Niu N, Homer RJ, Bottomly K. IL-4 promotes airway eosinophilia by suppressing IFN-gamma production: defining a novel role for IFN-gamma in the regulation of allergic airway inflammation. *J Immunol* 2001;166(4):2760-7.
- 139 Bix M, Wang ZE, Thiel B, Schork, Locksley RM. Genetic regulation of commitment to interleukin 4 production by a CD4+ T cell-intrinsic mechanism. *J Exp Med* 1998;188(12):2289-99.
- 140 Pavlovic S, Liezmann C, Blois SM, Joachim R, Kruse J, Romani N, Klapp BF, Peters EM. Substance P is a key mediator of stress-induced protection from allergic sensitization via modified antigen presentation. *J Immunol* 2011;186(2):848-55.
- 141 Höglund CO, Axén J, Kemi C, Jernelöv S, Grunewald J, Müller-Suur C, Smith Y, Grönneberg R, Eklund A, Stierna P, Lekander M. Changes in immune regulation in response to examination stress in atopic and healthy individuals. *Clin Exp Allergy* 2006;36(8):982-92.
- 142 Isogai S, Taha R, Tamaoka M, Yoshizawa Y, Hamid Q, Martin JG. CD8+ alpha beta T cells can mediate late airway responses and airway eosinophilia in rats. *J Allergy Clin Immunol* 2004;114(6):1345-52.
- 143 Krug N, Erpenbeck VJ, Balke K, Petschallies J, Tschernig T, Hohlfeld JM, Fabel H. Cytokine profile of bronchoalveolar lavage-derived CD4+, CD8+, and gamma delta T cells in people with asthma after segmental allergen challenge. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25(1):125-31.

LITERATURVERZEICHNIS

- 144 Ying S, Humbert M, Barkans J, Corrigan CJ, Pfister R, Menz G, Larché M, Robinson DS, Durham SR, Kay AB. Expression of IL-4 and IL-5 mRNA and protein product by CD4+ and CD8+ T cells, eosinophils, and mast cells in bronchial biopsies obtained from atopic and nonatopic (intrinsic) asthmatics. *J Immunol* 1997;158(7):3539-44.
- 145 Nakagome K, Dohi M, Okunishi K, Komagata Y, Nagatani K, Tanaka R, Miyazaki JI, Yamamoto K. In vivo IL-10 gene delivery suppresses airway eosinophilia and hyperreactivity by down-regulating APC functions and migration without impairing the antigen-specific systemic immune response in a mouse model of allergic airway inflammation. *J Immunol* 2005;174(11):6955-66.
- 146 Noble A, Giorgini A, Leggat JA. Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T cell lineage. *Blood* 2006;107(11):4475-83.
- 147 Ng STH, Britton GJ, Hill EV, Verhagen J, Burton BR, Wraith DC. Regulation of adaptive immunity; the role of interleukin-10. *Front Immunol* 2013;4:129. doi: 10.3389/fimmu.2013.00129.
- 148 Robinson DS. The role of the T cell in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126(6):1081-91.
- 149 Sim GK, Rajasekar R, Dessing M, Augustin A. Homing and in situ differentiation of resident pulmonary lymphocytes. *Int Immunol* 1994;6(9):1287-95.
- 150 Simonian PL, Roark CL, Diaz del Valle F, Palmer BE, Douglas IS, Ikuta K, Born WK, O'Brien RL, Fontenot AP. Regulatory role of gamma delta T cells in the recruitment of CD4+ and CD8+ T cells to lung and subsequent pulmonary fibrosis. *J Immunol* 2006;177(7):4436-43.
- 151 Jin N, Roark CL, Miyahara N, Taube C, Aydintug MK, Wands JM, Huang Y, Hahn YS, Gelfand EW, O'Brien RL, Born WK. Allergic airway hyperresponsiveness-enhancing gamma delta T cells develop in normal untreated mice and fail to produce IL-4/13, unlike Th2 and NKT cells. *J Immunol* 2009;182(4):2002-10.
- 152 Lahn M, Kalataradi H, Mittelstadt P, Pflum E, Vollmer M, Cady C, Mukasa A, Vella AT, Ikle D, Harbeck R, O'Brien R, Born W. Early preferential stimulation of gamma delta by TNF-alpha. *J Immunol* 1998;160(11):5221-30.
- 153 Gibbings D, Befus AD. CD4 and CD8: an inside-out coreceptor model for innate immune cells. *J Leukoc Biol* 2009;86(2):251-9.
- 154 Braun A, Appel E, Baruch R, Herz U, Botchkarev V, Paus R, Brodie C, Renz H. Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. *Eur J Immunol* 1998;28(10):3240-51.
- 155 Joachim RA, Noga O, Sagach V, Hanf G, Fliege H, Kocalevent RD, Peters EM, Klapp BF. Correlation between immune and neuronal parameters and stress perception in allergic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 2008;38(2):283-90.
- 156 Alysandratos KD, Asadi S, Angelidou A, Zhang B, Sismanopoulos N, Yang H, Critchfield A, Theoharides TC. Neurotensin and CRH interactions augment human mast cell activation. *PLoS One* 2012;7(11):e48934. doi: 10.1371/journal.pone.0048934.

LITERATURVERZEICHNIS

- 157 Rosenkranz MA, Busse WW, Sheridan JF, Crisafi GM, Davidson RJ. Are there neurophenotypes for asthma? Functional brain imaging of the interaction between emotion and inflammation in asthma. *PLoS One*. 2012;7(8):e40921. doi: 10.1371/journal.pone.0040921.

7 Anhang

7.1 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Versuchsprotokoll.....	18
Abb. 2a: CD4+ Zellen in Bronchien und Alveolen.....	27
Abb. 2b: Immunhistochemische Färbung von CD4+Zellen.....	28
Abb. 3a: CD8+ Zellen in Bronchien und Alveolen.....	30
Abb. 3b: Immunhistochemische Färbung von CD8+ Zellen.....	31
Abb. 4: CD4/CD8-Ratio in Bronchien und Alveolen.....	33
Abb. 5a: T-Zellen in Bronchien und Alveolen.....	34
Abb. 5b: Immunhistochemische Färbung von T-Zellen.....	34
Abb. 6a: Apoptotische Zellen in den Bronchien.....	36
Abb. 6b: Immunfluoreszenzfärbung apoptotischer Zellen.....	36
Abb. 7a: Proliferierende Zellen in den Bronchien.....	37
Abb. 7b: Immunfluoreszenzfärbung proliferierender Zellen.....	38
Abb. 8: Leukozyten der BAL.....	41
Abb. 9: Eosinophile Granulozyten der BAL.....	42
Abb. 10: Lymphozyten der BAL.....	43
Abb. 11: Neutrophile Granulozyten der BAL.....	43
Abb. 12: Monozyten/Makrophagen der BAL.....	44
Tab. 1: Einfluss von Stress und Zeit auf CD4+, CD8+, T-, apoptotische und proliferierende Zellen im pulmonalen Gewebe.....	25
Tab. 2: Zeitlicher Verlauf der Verteilung von CD4+, CD8+, T-, apoptotischen und proliferierenden Zellen im pulmonalen Gewebe.....	26
Tab. 3: Einfluss von Stress auf die Verteilung von CD4+, CD8+, T-, apoptotischen und proliferierenden Zellen im pulmonalen Gewebe.....	26

Tab. 4: Einfluss der Faktoren Stress und Zeit auf Zellen in der BAL..... 39

Tab. 5: Zeitlicher Verlauf der Zellverteilungen in der BAL. 39

Tab. 6: Einfluss von Stress auf die Zellverteilungen in der BAL..... 40

7.2 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Isabel Masson, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Kinetik pulmonaler CD4+, CD8+, T-Zellen, Apoptose und Proliferation unter dem Einfluss von Stress am murinen Asthma-Modell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

Datum

Unterschrift

7.3 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

7.4 Danksagung

Frau PD Dr. Eva M. J. Peters danke ich für die engagierte Betreuung und Unterstützung mit vielen guten Ratschlägen und Hilfestellungen.

Frau Dr. Ricarda A. Joachim möchte ich für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas und die anregenden Diskussionen im Rahmen der wissenschaftlichen Betreuung danken. Frau Prof. Dr. Petra C. Arck danke ich für die freundliche wissenschaftliche Betreuung zu Beginn der Promotion.

Eveline Hagen, Petra Busse und Petra Moschansky möchte ich für die freundliche und kompetente Hilfe bei der praktischen Laborarbeit danken.

Frau Christine Gericke danke ich für ihre kompetente Hilfestellung bei sämtlichen Belangen der Statistik.

Bei meiner Familie möchte ich mich ganz herzlich für die Geduld, die Unterstützung und die Momente der erfreulichen Zerstreuung bedanken.