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

DISSERTATION

Die Rolle des genetischen Hintergrunds für die Ausprägung atopischer Erkrankungen: Vergleich der Mausstämme Balb/c und C57BL/6 im atopischen Dermatitis-Stress und Asthma-Stress Modell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tamara Coqui

aus München

Gutachter: 1. Herr Priv.-Doz. Dr. med. W. Harth

2. Herr Priv.-Doz. Dr. med. G. Burbach

3. Frau Priv.-Doz. Dr. K. Kotsch

Datum der Promotion: 3.9.2010

Inhaltsverzeichnis:

A	Abkürzungsverzeichnis5			
1	1 Einleitung7			
	1.1 Erkrankungen des atopischen Formenkreises7			
	1.2 1.2.1 1.2.2	Immunologische Grundlagen von atopischer Dermatitis und Asthma bronchiale Die Rolle der Mastzellen in AD und A. bronchiale Die Rolle der eosinophilen Granulozyten in AD und A. bronchiale	9 11 12	
	1.3	Psyche und allergische Erkrankungen	13	
	1.3.1	Der Einfluss psychischer Faktoren auf AD und A. bronchiale	13	
	1.3.2	2 Die Stressreaktion	14	
	1.3.3	Substanz P in AD und A. bronchiale und die neuronale Entzündung	15 16	
	1.4	Zielsetzung und Vorstellung der Mausmodelle	17	
2	Ma	terial und Methoden		
-	2.1			
	2.1	Das allergische Dermatitis-Stress Modell	21	
	2.2.1	Behandlungsgruppen	21	
	2.2.2	2 Versuchsablauf	22	
	2.3	Das Asthma-Stress Modell	24	
	2.3.1	Behandlungsgruppen	24	
	2.3.2	2 Versuchsablauf	26	
	2.3.3	Zellzählung mittels Neubauer-Kammer	27	
	2.3.5	Zytospin und Diff-Quik Paroung Zytokinbestimmung in der bronchoalveolären Lavage mittels ELISA	28	
	2.4	Immunhistochemie	32	
	2.4.1	Herstellung von Schnitten	32	
	2.4.2	2 Giemsa Färbung und Bewertungsparameter im AD-Stress Modell	32	
	2.4.3	B Hematoxylin-Eosin Färbung und Bewertungsparameter im Asthma-Stress Modell	33	
	2.5	Statistische Analyse	33	
3	Erg	ebnisse	35	
	3.1	Das atopische Dermatitis-Stress Modell	35	
	3.1.1	Die Auswirkung von AD und Stress auf die epidermale Dicke	35	
	3.1.2	Die Auswirkung von AD und Stress auf die Mastzelldegranulation	39	
	3.1.3	Die Auswirkung von AD und Stress auf das Eosinophileninfiltrat in AD-Läsionen	43	
	3.2	Das Asthma-Stress Modell	47	
	3.2.1	Die Auswirkung von Allergenprovokation und Stress auf die Gesamtzellzahl in der BAL	47	
	3.2.2	Die Auswirkung von Allergenprovokation und Stress auf die Zytokinkonzentration in der BAL	50	
	3.2.3	Die Auswirkung von Allergenprovokation und Stress auf das Bronchialenithel	33	
	3.2.5	Der Vergleich des Balb/c- und C57BL/6-Stamms im AD-Stress und Asthma-Stress Modell	57	
4	Dis	kussion	58	
	4.1 Der Vergleich von nicht sensibilisierten und sensibilisierten Tieren im AD-Stress und Asthma-Stress Modell		d 58	
	4.2	Die Auswirkungen von Stress auf AD und Asthma bronchiale	62	
	4.3	Die Rolle von Substanz P im AD-Stress und Asthma-Stress Modell	66	

	4.4	Einfluss von Stress auf das Bronchialepithel und die Epidermis	
	4.5	Ausblick	71
5	Zı	usammenfassung	73
6	Li	iteraturverzeichnis	75
7	A	nhang	86

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotrophes Hormon
AD	Allergische Dermatitis
Ag	Antigen
AHR	Atemwegshyperreagibilität
AK	Antikörper
APZ	Antigen-präsentierende Zellen
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
CD	Cluster of Differentiation
CRH	Corticotropin-Releasing Hormone
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Essay
EOS	Eosinophile Granulozyten
HPA-Achse	Hypothalam us-Hypophysen-Nebennie renrinden-Achse
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IFNγ	Interferon-gamma
IL	Interleukin
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MZ	Mastzellen
NGF	Nerve-Growth-Factor
NK	Natürliche Killerzellen
NK1	Neurokinin 1
NK1-RA	Neurokinin 1-Rezeptorantagonist
OVA	Ovalbumin
S. C.	Subkutan
Sf	Standardfehler
SNS	Sympathisches Nervensystem
SP	Substanz P
RT	Raumtemperatur
Th	T-Helferzelle

TGF	Transforming-Growth-Factor
ΤΝFα	Tumor-Nekrose-Faktor-alpha
VEGF	Vascular-Endothelial-Growth-Factor
VCAM-1	Vascular-Cell-Adhesion-Molecule
VLA-4	Very-Late-Antigen 4

1 Einleitung

Formulierungen wie "aus der Haut fahren", "sich in seiner Haut wohl fühlen", "vor Schreck den Atem anhalten", "an Sorgen ersticken" und "sich Luft verschaffen" lassen ein allgemeines Wissen um die wechselseitige Beziehung von Körper und Psyche erkennen und haben Eintritt in unseren täglichen Sprachgebrauch gefunden. In den letzten Jahrzehnten ist mit der Entdeckung neurogener Botenstoffe ein neuer Forschungszweig - die Psychoneuroimmunologie – entstanden, der versucht, das psychische Erleben und die physische Stressreaktion in ein umfassendes psychovegetatives Modell zu integrieren. Die der Außenwelt ausgesetzten Organe Lunge und Haut eignen sich durch ihren hohen Grad der Innervation und wegen der großen Anzahl an gewebsständigen Immunzellen besonders dafür, die intensive wechselseitige Beziehung zwischen Körper und Seele zu erforschen, da hier eine breite neuro-immunologische Interaktionsfläche besteht, an der psychische in physische Stressreaktionen übersetzt werden können und *vice versa*. In der hier vorgelegten Arbeit wird konkret anhand von Mausmodellen untersucht, inwieweit eine 24stündige Stressexposition mittels Lärm (Maulwurfsvertreiber) verschiedene Parameter der Krankheitsaktivität von atopischer Dermatitis und allergischem Asthma bronchiale beeinflusst.

1.1 Erkrankungen des atopischen Formenkreises

Atopische Dermatitis und allergisches Asthma bronchiale (im folgendem nur A. bronchiale genannt) gehören zu den Erkrankungen des atopischen Formenkreises. Atopie bezeichnet die genetische Prädisposition zu allergischen Reaktionen vom Soforttyp (Typ I der Allergie), deren klinische Ausprägung als exogene atopische Dermatitis (AD), allergische Rhinitis oder allergisches Asthma bronchiale bekannt sind. Ursache dieser Erkrankungen ist eine Hypersensibilitätsreaktion mit einer überschießenden krankmachenden Immunantwort gegen exogene, normalerweise apathogene Substanzen. Dabei ist der Pathomechanismus von AD und A. bronchiale sehr ähnlich. Unterschiede in der Pathophysiologie beider Erkrankungen beruhen vor allem auf den immunologischen Gegebenheiten des involvierten Organs.

Allergisches Asthma bronchiale ist eine chronische Entzündung der Atemwege, charakterisiert durch bronchiale Hyperreagibilität auf Allergene und andere unspezifische Faktoren wie Kälte, Rauch etc. und Obstruktion der Luftwege durch vermehrte Schleimproduktion, Ödem, und reversible Bronchokonstriktion. AD ist eine chronisch rezidivierende Ekzemerkrankung auf trockener Haut, die mit starkem Juckreiz einhergeht und im fortgeschrittenen Stadium zu Lichenifizierung der betroffen Stellen führt.

Auch die Tatsache, dass A. bronchiale und AD ähnliche pathophysiologische Abläufe zugrunde liegen, spricht dafür, dass atopische Erkrankungen häufig ineinander übergehen und zu weiteren Sensibilisierungen führen [1]. So beginnt die Atopikerkarriere typischerweise mit der Ausbildung von AD und Nahrungsmittelallergie im Säuglings- und frühen Kleinkindesalter, gefolgt von allergischer Rhinokonjunktivitis und A. bronchiale im Schulkindalter. Es konnte gezeigt werden, dass AD einer der entscheidenden Risikofaktoren für die Entwicklung von A. bronchiale ist, so zum Beispiel entwickeln circa 40-50% aller an AD erkrankten Kinder im späteren Leben Asthma [2]. Zusätzlich neigen Kinder mit AD zur Entwicklung schwerwiegenderer Verläufe von A. bronchiale als Kinder ohne AD in der Vorgeschichte [3].

In der Entstehung von A. bronchiale und AD wirken genetische Faktoren, Umwelteinflüsse, virale und bakterielle Infekte, der moderne Lebensstil sowie psychische Faktoren zusammen (s. Abb.1). In den letzten Jahrzehnten lässt sich eine deutlich Zunahme der Prävalenz allergischer Erkrankungen in den westlichen Industrieländern beobachten [4, 5]. Abgesehen von dem Leidensdruck der Betroffenen stellt dies eine erhebliche Belastung für das Gesundheitssystem dar. So werden die direkten und indirekten Krankheitskosten von A. bronchiale und AD in Deutschland auf circa 6 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt [6, 7]. Das Interesse ist daher groß, die Ursachen und Aggravationsfaktoren dieser Erkrankungen zu erforschen, um effektivere Therapien anbieten zu können.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde mit Hilfe von etablierten Mausmodellen der Einfluss von Stress auf die Krankheitsentstehung und -ausprägung von AD und A. bronchiale untersucht. Zum Verständnis der Thematik sind Kenntnisse der fundamentalen Prozesse des Immunsystems und der Stressreaktion notwendig, die in den folgenden Absätzen dargestellt werden.



Abb.1: Gemeinsamkeiten von atopischer Dermatitis und allergischem Asthma bronchiale.

1.2 Immunologische Grundlagen von atopischer Dermatitis und Asthma bronchiale

Beobachtungen aus Mausmodellen und humanen Studien zeigen, dass atopische Erkrankungen die Folge einer fehlgeleiteten Immunantwort sind, die durch eine Dysbalance zwischen humoraler und zellulärer Abwehr gekennzeichnet ist.

Das Immunsystem ist fähig zu einer angeborenen Immunantwort, die eine erste unspezifische Reaktion gegen eindringende Keime darstellt, und zu einer adaptiven oder erworbenen Immunantwort, die modulierbar und durch ein Gedächtnis gekennzeichnet ist. Zu der adaptiven Immunität gehört die naive CD4+-Th0-Zelle (CD = *cluster of differentiation*), die von phagozytierenden Zellen (u. a. des angeborenen Immunsystems) präsentierte Antigene, und auf dem gleichen Weg auch potentielle Allergene, erkennt. Diese Zelle besitzt die Fähigkeit, sich abhängig vom Zytokinmilieu in eine T-Helferzelle Typ 1 (= Th1-Zelle) oder Typ 2 (= Th2-Zelle) zu entwickeln, die jeweils für die zelluläre bzw. humorale Abwehr typisch ist (s. Abb. 2.). Durch die Zytokine Interleukin (IL)-12 und Interferon- γ (IFN γ), produziert von aktivierten Makrophagen und anderen antigenpräsentierenden Zellen (APC), differenziert die naive CD4+Th0-Zelle in eine Th1-Zelle [8]. Diese stimuliert durch Produktion und Freisetzung von IFN γ und IL-2 (und anderen Mediatoren) zytotoxische T-Zellen, natürliche Killer (NK)-Zellen und besonders Makrophagen (s. Abb. 2). Es entsteht ein für die zelluläre Abwehr typisches inflammatorisches Milieu, das in der Spätphase der allergischen Reaktion maßgeblich für die Chronifizierung von AD verantwortlich ist [9].

Dahingegen differenziert die naive CD4+Th0-Zelle in eine Th2-Zelle, eine Effektorzelle der humoralen Abwehr, wenn sie durch IL-4 und IL-10 stimuliert wird [8]. Die Th2-Zelle und die Th2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 sind für viele klinische Manifestationen von AD und A. bronchiale verantwortlich. Th1-Zellen inhibieren Th2-Zellen genauso wie Th2-Zellen Th1-Zellen hemmen. Dabei sind Th1- und Th2-Zellen nicht komplett unterschiedliche CD4+-Zellunterarten sondern eher Formen einer hoch polarisierten CD4+-Zelle vermittelten Immunantwort. Im Mausmodell ist diese Trennung in Th1- und Th2-Antwort deutlicher ausgeprägt als beim Menschen [10].

Auch konnte anhand von Zytokinbestimmungen in Läsionen von AD gezeigt werden, dass es im Krankheitsverlauf von AD zu einem Wechsel des dominierenden Zytokinprofils kommt. So dominiert in der Frühphase ein Th2-Profil, während bei der Chronifizierung (48 Stunden nach einer ersten Hautläsion) der Erkrankung das Th1-Profil vorherrscht [9].

AD und A. bronchiale sind gekennzeichnet durch eine überschießende Immunantwort gegen ein Allergen, einhergehend mit gesteigerter IgE-Produktion durch B-Zellen, Degranulation von Mastzellen, Eosinophilie und einem Ungleichgewicht in der Th1 und Th2 vermittelten Immunantwort. Bei diesem komplexen Vorgehen wird sich hier auf die Rolle von T-Zellen, eosinophilen Granulozyten (= EOS) und Mastzellen im allergischen Geschehen konzentriert.



Abb. 2: **Differenzierung der CD4+Th0-Zelle.** APC = Antigenpräsentierende Zelle, IFN γ = Interferon γ , IL = Interleukin, NK-Zelle = Natürliche Killerzelle, Th-Zelle = T-Helfer Zelle.

1.2.1 Die Rolle der Mastzellen in AD und A. bronchiale

Mastzellen befinden sich vor allem in Schleimhaut, im Epithelgewebe und im subendothelialen Bindegewebe. Sie spielen sowohl in der akuten als auch in der chronischen Entzündungsreaktion bei AD und A. bronchiale eine wichtige Rolle [11]. Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 fördern den Klassenwechsel der B-Zellen zu antigenspezifischen IgE-Produktion fähigen B-Zellen [8]. Das von den B-Zellen sezernierte IgE bindet an den hochaffinen Fcc1c-Rezeptor auf Mastzellen sowie an den niedrigaffinen Fcc2c-Rezeptor auf aktivierten Lymphozyten, Monozyten, alveolären Makrophagen und eosinophilen Granulozyten, wodurch diese Zellen allergenspezifisch sensibilisiert werden. Bei erneuter Exposition kommt es zur Kreuzvernetzung der an den Rezeptor gebundenen IgE-Moleküle mit dem Allergen. Dies führt zur Degranulation der Mastzelle mit Freisetzung einer Vielzahl unterschiedlicher Mediatoren wie Leukotrienen, Chemokinen, Enzymen und Zytokinen. Mastzellen können jedoch auch unabhängig von IgE durch Neuropeptide und Produkte der eosinophilen Granulozyten aktiviert werden und degranulieren [12].

Der Tumornekrosefaktor alpha (= $TNF\alpha$) wird nach Aktivierung in großen Mengen ausgeschüttet und vermittelt die Aktivierung von Endothelzellen, wodurch das Eindringen von inflammatorischen Leukozyten und Lymphozyten in betroffenes Gewebe gefördert wird. Mastzellen selbst sezernieren darüber hinaus IL-4, IL-5 und IL-13, die eine von Th2-dominierten Zytokinen getragene Immunreaktion weiter fördern. Histamin, das 10% ihre Granulae ausmacht, bindet an H1-Rezeptoren, was zu Konstriktion der glatten Bronchialmuskulatur, erhöhter Leukozytenmigration in betroffenes Gewebe, erhöhter Permeabilität der Gefäße und zu dem für AD typischen Juckreiz führt. Durch Bindung an den H2-Rezeptor fördert Histamin die Schleimsekretion in den Bronchien mit resultierender Zunahme der Atemwegsobstruktion [11, 13].

Histamin aktiviert nicht nur Immunzellen, sondern auch afferente Nervenfasern. Es konnte gezeigt werden, dass in der Haut Mastzellen in enger Nachbarschaft zu Substanz P immunoreaktiven Nervenfasern zu finden sind. Die durch Histamin oder Tryptase stimulierte Freisetzung von Neurotrophinen aus Nervenfasern haben eine weitere Mastzelldegranulation zur Folge [14, 15]. Auf diesen Vorgang wird später im Rahmen der neurogenen Entzündung genauer eingegangen.

1.2.2 Die Rolle der eosinophilen Granulozyten in AD und A. bronchiale

Im Mausmodell und beim Menschen findet sich in Läsionen von AD und in der bronchoalveolären Lavage (BAL) sowie in Biopsien der Bronchien von Asthmatikern eine deutliche erhöhte Anzahl von EOS [16-19]. Eosinophilie in betroffenem Gewebe ist eines der Hauptmerkmale der allergischen Erkrankung. Die Mehrzahl der im Blut von allergischen Patienten gefundenen Allergen spezifischen T-Zell-Klone produzieren IL-4, IL-5, IL-13 und Granulozyten-Makrophagen kostimulierenden Faktor (GM-CSF). Diese Mediatoren aktivieren unter anderem EOS, erhöhen deren Reaktivität gegenüber weiteren Mediatoren der allergischen Entzündung und fördern deren Degranulation [20]. IL-5 vermittelt die terminale Differenzierung und Proliferation von EOS [21] und fördert deren Eintritt in den Blutkreislauf aus dem Knochenmark. So finden sich bei allergischen Erkrankungen, die mit erhöhtem IL-5 einhergehen, vermehrt EOS in der Blutbahn, während im Normalzustand nur circa 1-2% aller im Körper vorhandenen EOS im Blut zirkulieren [22]. Daneben verlängert IL-5 durch Inhibition der Apoptose die Überlebenszeit von EOS im Gewebe [23].

Die spezifische Rekrutierung von EOS an den Ort der Entzündung wird durch das Th2-Zytokin IL-4 und Eotaxin vermittelt. Eotaxin, produziert von Endothelzellen, Epithelzellen, Makrophagen, EOS und weiteren Immunzellen (und stimuliert durch IL-4) und IL-4 selbst führen zur Induktion von Adhäsionsmolekülen wie dem *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) auf Endothelzellen [24]. Bei atopischen Erkrankungen binden EOS mit *very late antigen 4* (VLA-4) an VCAM-1 und wandern verstärkt in betroffenes Gewebe ein [20].

EOS erfüllen zwei Arten von Effektorfunktionen. Zum einen schütten sie nach Aktivierung toxische Granulaproteine und freie Radikale aus, die im Rahmen allergischer Erkrankungen direkt beträchtliche Schäden im Gewebe verursachen können. Zum anderen synthetisieren sie chemische Mediatoren wie z. B. die Zytokine IL-4 und IL-5, die Entzündungreaktion verstärken und weitere EOS und Leukozyten aktivieren [25, 26]. Weitere von EOS sezernierte Mediatoren, wie das *eosinophil cationic protein* (ECB) und das *major basic protein* (MBP) fördern eine weitere Mastzelldegranulation und wirken lokal zytotoxisch [27].

Es wird diskutiert, inwieweit EOS an dem für AD typischen Wechsel im Krankheitsverlauf von Th2-dominiertem in ein Th1-dominiertes Zytokinprofil beteiligt sind. Stimulierte EOS bilden und sezernieren IL-12, ein Zytokin, das die Th1-Zellen aktiviert und folglich ein Th1-Profil fördert [28].

1.3 Psyche und allergische Erkrankungen

1.3.1 Der Einfluss psychischer Faktoren auf AD und A. bronchiale

Zahlreich sind die Beispiele, die belegen, dass psychische Faktoren eine wichtige Rolle in der Entstehung und Erhaltung von A. bronchiale und AD spielen. 50-70% der an AD erkrankten Patienten erleben ein erhebliches Trauma oder Stress vor dem Ausbruch von AD [29]. Bei Kindern führt ein emotional stressgeladenes soziales Umfeld zur Verstärkung der Asthmasymptome [30, 31]. Es wird berichtet, dass der täglich erlebte Stresslevel mit dem Schweregrad von AD [32] und von A. bronchiale [16, 33, 34] korreliert, sowie psychologisches Training und Entspannungsverfahren zur einer deutlichen Linderung der Symptomatik führen [35, 36]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Kinder mit AD aufgrund einer hyporesponsiven Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Achse, die die normale Fähigkeit des Körpers Cortisol zu produzieren abschwächt, anfälliger sind unter Stress Hauteruptionen zu entwickeln [37, 38]. Wie jedoch beeinflusst Stress den menschlichen Organismus?

1.3.2 Die Stressreaktion

Stress kann als ein Zusammentreffen von Ereignissen psychischer oder physischer Natur angesehen werden, das beginnend mit einem Stimulus (= Stressor), der zunächst im Gehirn eine Stressreaktion auslöst, die es dem Körper ermöglicht, eine adaptive Antwort auf den Stressor zu entwickeln. Bedeutend für das Stresserleben eines Individuums ist, inwieweit eine Möglichkeit der persönlichen Beeinflussung des Stressors wahrgenommen wird [39]. Die Hypothalamus-Hypophysenvorderlappen-Achse (HPA) und das sympathische Nervensystem (SNS) sind die beiden klassischen Stressachsen. Aktivierung dieser Stresssysteme führt zu typischen körperlichen und psychischen Veränderungen. Unter anderem kommt es zu einer Steigerung der Wachsamkeit und der Konzentration, zur Senkung des Schmerzempfinden und auf körperlicher Ebene zu einer Zunahme der Herz- und Atemfrequenz, der Gluconeogenese und Lipolyse.

Diese und weitere Veränderungen im Rahmen der Stressreaktion werden durch zentrale und periphere Freisetzung endokriner und neurogener Botenstoffe vermittelt. Minuten bis wenige Stunden dauernder Stress aktiviert vor allem das SNS und führt zur Freisetzung von Noradrenalin und IFN γ . Subakuter und chronischer Stress hingegen aktiviert vor allem die HPA-Achse [40]. Dabei führt die Stimulation höherer kortikaler Zentren durch den Stressor über das limbische System zur Freisetzung von Noradrenalin und Serotonin, die im paraventriculären Nucleus des Thalamus die Freisetzung des Cortiocoptropin-Releasing-Hormon (CRH) bewirkt. Letztendliches Resultat ist die vermehrte Ausschüttung von Adrenocorticotrophen Hormon (ACTH) und Cortisol. CRH selbst wird auch peripher von sympathischen und postganglionären Nervenfasern nach Aktivierung freigesetzt. Einige Immunzellen, darunter auch Mastzellen, besitzen Rezeptoren für CRH und werden durch CRH zur vermehrten Degranulation stimuliert [41].

Neben der HPA-Achse gewinnt eine neue Stressachse via Nerve Growth Faktor (NGF) und Substanz P (SP) zunehmende Bedeutung in der Stressforschung. Diese Achse, bei der Mastzellen und sensorische Nervenfasern eine wichtige Rolle spielen, ist mitverantwortlich für die morphologischen Veränderungen in Haut und Lunge im Rahmen der neuronalen Plastizität. Das unter Stress vermehrt ausgeschüttete SP, das sowohl im Nervensystem als auch im Immunsystem gebildet und sezerniert wird, ermöglicht neben anderen Botenstoffen die Kommunikation zwischen diesen beiden Systemen. NGF ist ein trophischer Faktor, der die Aussprossung von peptidergen und sympathischen Nervenfasern fördert und in der Kommunikation zwischen Neuronen, Glia-Zellen und Immunzellen eine bedeutende Rolle spielt. NGF regelt die Synthese von SP in sensorischen Neuronen herauf [42], reguliert die Dichte der SP-Innervation in Lunge und Haut und führt zur direkten Freisetzung von SP aus peripheren Nervenfasern, den myelinisierten A δ - und den unmyelinisierten C-Fasern [43, 44]. Wie CRH treten auch SP und NGF über spezifische Rezeptoren mit Langerhans-Zellen, Lymphozyten, Keratinozyten, Endothelzellen, Mastzellen und Fibroblasten in Haut bzw. Lunge in Kontakt und modulieren dort die örtliche Homöostase [45, 46].

1.3.3 Die Kommunikation zwischen Nervensystem und Immunsystem

Es besteht eine intensive Kommunikation und wechselseitige Beeinflussung zwischen Nervensystem und Immunsystem. Einerseits beeinflussen die in der Stressreaktion gebildeten Neurotransmitter und Neurotrophine über den Blutweg – aber auch über direkte Innervation primärer und sekundärer lymphatischer Organe durch sympathische Nervenfasern - eine Immunantwort maßgeblich. Anderseits besitzen verschiedene Zellen des Immunsystems die Fähigkeit, diese Botenstoffe zu bilden und somit sowohl peripher auf Nervenfasern als auch zentral Einfluss auf das Nervensystem zu nehmen. Stress hat dabei nicht wie früher angenommen den Effekt einer reinen Immunosuppression, sondern führt eher zu einer Dysregulation des Immunsystems und greift über vielfältige Einflusswege ins Krankheitsgeschehen von A. bronchiale und AD ein.

Stress wird als potenter Vermittler der Verschiebung eines Zytokinprofils in Richtung Th2 diskutiert. Dafür verantwortlich sind in erster Linie die durch Aktivierung der HPA-Achse freigesetzten Glukokortikoide. Sie fördern durch Inhibition der Produktion von IL-12, IFN γ und TNF α durch Th1-Zellen und durch Steigerung der Produktion von IL-4, IL-10 und IL-13 durch Th2-Zellen die humorale Immunität [41, 47]. Es wird angenommen, dass Stress, im Rahmen einer physiologischen Antwort des Körpers auf eine Gefahr, durch Induktion eines Th2-Zytokinprofils Gewebe vor einer potentiell gewebezerstörenden Th1-Antwort schützen soll [52]. Bei AD und A. bronchiale kann dies jedoch zu einer erneuten Exazerbation der schon etablierten Erkrankung führen.

Bei Patienten mit A. bronchiale oder AD wird eine hyporeaktive HPA-Achse beobachtet und als Aggravationsfaktor allergischer Erkrankungen diskutiert. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine hyporesponsive HPA-Achse die Entwicklung inflammatorischer Erkrankungen begünstigt [53]. Außerdem kommt es bei Atopikern, als Folge der hyporesponsiven HPA-Achse auf Stimuli wie Stress, zu einer deutlich abgeschwächten Cortisolund ACTH-Freisetzung im Vergleich zu Nicht-Atopikern, die mit einer Verschlechterung des klinischen Zustandes einhergeht. Ob dabei die allergische Erkrankung Folge einer (genetisch bedingten) hyporesponsiven HPA-Achse oder Ursache dieser ist, ist noch nicht abschließend geklärt [37, 38].

1.3.4 Substanz P in AD und A. bronchiale und die neuronale Entzündung

Substanz P gehört zu der Familie der Tachykinine. Im Zellkörper von sensorischen Neuronen gebildet, wird SP via axonalen Transport an die Nervenendigung befördert. Auf Reize vielfältiger Art folgt eine Calciumionen-abhängige Membrandepolarisation mit Ausschüttung von SP in den Synapsenspalt oder die Blutbahn. Seine Wirkung entfaltet SP durch Bindung mit hoher Affinität an den Neurokinin 1 (NK1)-Rezeptor und mit niedriger Affinität an den NK2-Rezeptor [54]. Sowie neben Nervenfasern auch eine Reihe von Immunzellen – wie EOS, Lymphozyten, Makrophagen und dendritische Zellen – SP bilden und sezernieren, so wird auch sein Rezeptor nicht nur auf unmyelinisierten Nervenfasern sondern auch auf Mastzellen, Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert [43, 48]. SP gilt als Vermittler des Th1- und Th2-Zytokinprofils [48-50]. Es wurde gezeigt, dass SP in vitro zu einer verstärkten Expression von Th1- (IFN γ) und Th2- (IL-4) Zytokinen durch Th1- und Th2-Zellen führt und dabei die strikte Trennung beider Subpopulationen der T-Zelle hinsichtlich der Expression eines bestimmten Zytokinprofils abschwächt [51].

SP-immunoreaktive Nervenfasern finden sich in allen Hautschichten und in der Lunge in der glatten Muskelzellschicht, im Epithel der Luftwege, und in der Submukosa. Es ist bekannt, dass sich die Innervation im Rahmen von Entzündung und Stress verändert. Dieses Phänomen der neuronalen Plastizität mit Zunahme SP-immunoreaktiver Nervenfasern und vermehrter Expression von NGF unter Stress wurde im Mausmodell in Haut und Lunge beobachtet [55-57].

Der Begriff der neurogenen Entzündung beschreibt eine lokale Entzündungsreaktion, die durch ein rasch einsetzendes Erythem, Vasodilatation, gesteigerte Permeabilität der Gefäße mit Ödembildung sowie durch Zunahme der Schmerz- und Juckreizwahrnehmung gekennzeichnet ist. CRH und vor allem SP sind weit reichend an den Veränderungen im Rahmen der neurogenen Entzündung beteiligt [45]. In Haut und Lunge finden sich Mastzellen in enger Nachbarschaft zu SP-immunoreaktiven Nervenfasern. Freisetzung von SP und CRH aus diesen führt zu einer Zunahme an degranulierten Mastzellen [55, 58, 59]. Durch Histamin und andere Bestandteile der Mastzellgranulae werden weitere Mastzellen zur Degranulation stimuliert, und führen an Nervenendigungen zu Sekretion von SP (und CRH), wodurch der Teufelskreis der neurogenen Entzündung im Rahmen der AD mit Aggravation des Entzündungsprozess und Juckreizes aufrechterhalten wird [45]. Außerdem stimuliert SP die Induktion von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1, *intracellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und E-Selectin auf humanen Endothelzellen, das zu einer vermehrten Einwanderung von EOS und neutrophilen Granulozyten in betroffenes Gewebe führt [60, 61]. Bei vorgeschädigter Haut oder Lunge kann die erhöhte Freisetzung von SP mit Überproduktion von Zytokinen zu einer schlecht kontrollierbaren Überaktivität führen, die eher schadet als nützt, und zu einer Aggravation der Erkrankung, in unserem Beispiel AD und A. bronchiale, beiträgt [45, 62].

1.4 Zielsetzung und Vorstellung der Mausmodelle

In dieser Arbeit stand die Frage im Vordergrund, inwieweit der genetische Hintergrund eines Mausstamms eine Rolle in der Ausprägung atopischer Erkrankungen spielt. Allergische Entzündung wie die atopische Dermatitis und das A. bronchiale werden durch eine Th2-dominierte Zytokinimbalance gefördert. Allergiemausmodelle verwenden daher häufig den Inzuchtmausstamm Balb/c, da dieser stark zu einer Th2-dominierten Immunantwort tendiert und als *high responder* gegenüber Allergenprovokation beschrieben wird [18]. Ein weiterer in der Forschung häufig verwendeter Mausstamm, der C57BL/6-Stamm, tendiert dagegen zu einer Th1-dominierten Immunantwort und reagiert wesentlich schwächer auf Allergenprovokation. Es ist jedoch zu beachten, dass in zahlreichen Veröffentlichungen eine präferierte Ausbildung einer Th1-dominierten Immunantwort seitens des C57BL/6-Stamms bzw. einer Th2-dominierten Immunantwort seitens Der Schung von Orginalarbeiten zu diesem Thema angenommen wird und diese Annahme nur auf einigen wenigen Studien basiert [61-63].

Neben den genannten Unterschieden in der Ausprägung einer Immunantwort sind die beiden Mausstämme auch hinsichtlich der Aktivierbarkeit der HPA-Achse gegenüber Stress auf der Basis einer genetischen Prädisposition verschieden [64, 65]. Ob auch Unterschiede in SP-abhängigen neuronalen und immunologischen Reaktionen oder Unterschiede in der SP-Ausschüttung auf Stress vor dem Hintergrund der oben erwähnten unterschiedlichen Stress-reaktivität zwischen den beiden Mausstämmen bestehen, ist nicht bekannt.

Diese Arbeit fokussiert auf folgende Fragestellungen:

- Beeinflusst der genetische Hintergrund die Ausprägung von AD und A. bronchiale? Dazu wurden verschiedene Parameter der Krankheitsaktivität von AD und A. bronchiale mit Hilfe von Mausmodellen für allergische Dermatitis und allergische Atemwegsinflammation (= AD-Stress bzw. Asthma-Stress Modell) zwischen dem Balb/c- und C57BL/6-Stamm verglichen.
- Führt Stress zu einer Veränderung der Krankheitsaktivität von AD und A. bronchiale und sind unterschiedliche Reaktionen bei den Mausstämmen zu beobachten? Dazu wurde der Einfluss von 24stündiger Stressexposition mittels Mauslwurfvertreibers auf die Parameter der Krankheitsaktivität von AD und A. bronchiale untersucht und die Reaktionen der beiden Stämme verglichen.
- Welche Rolle spielt SP in den unter Stress beobachteten Veränderungen der Krankheitsaktivität von AD und A. bronchiale und welche Unterschiede sind zwischen den beiden Mausstämmen zu beobachten? Um diese Frage zu untersuchen, wurde ein NK1-Rezeptorantagonist vor und nach Stressexposition eingesetzt.
- Beeinflusst der Zeitpunkt der Stressexposition die Krankheitsaktivität von AD? Dazu wurde innerhalb des C57BL/6-Stamms die Auswirkung unterschiedlicher Zeitpunkte einer Stressexposition verglichen.

Im AD-Stress Modell wurden als Vergleichsgrundlage die Epidermisdicke, die Anzahl an degranulierten Mastzellen und die Anzahl an EOS in AD-Läsionen herangezogen. Im Modell der allergischen Atemwegsinflammation (im folgenden Asthma-Stress Modell genannt) dienten die Bronchialepitheldicke, die Zellverteilung in der BAL und die Zytokinbestimmung mittels ELISA von IL-4, IL-5, TNF α und INF γ in der BAL als Vergleichsparameter zwischen den einzelnen Gruppen und den beiden Stämmen.

Es wird ersichtlich, dass in diesen Modellen vielfältige Variablen auf die Ergebnisse Einfluss nehmen. Diese Modelle dienen als Basis, um in weiteren Experimenten die komplexe Beziehung zwischen Nervensystem und Immunsystem unter dem Einfluss von Stress bei atopischen Erkrankungen zu erforschen.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

Alle hier beschriebenen in vivo Experimente sind gemäß der Richtlinien für tierexperimentelle Forschung an der Charité Berlin, Campus Virchow Klinikum, angemeldet und genehmigt worden (Projektnummer G 0075/03, G 0033/01). Für die vorliegende Arbeit wurden weibliche Tiere der Mausstämme Balb/c und C57BL/6 (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere waren bei ihrer Ankunft in der tierexperimentellen Einrichtung des Campus Virchow Klinikums 6 Wochen alt. Ihr durchschnittliches Gewicht betrug 18-20 g. Aufgrund des Alters waren alle Haare der Rückenhaut der Balb/c- und C57BL/6 Mäuse in der Telogenphase des Haarzyklus. Dies ist für die spätere Analyse von Bedeutung, da sich die Blutversorgung, die epidermale Dicke und Innervation der Haut während des Haarzyklus dramatisch verändert und bei Wechsel der Haarfollikel wärend des Versuchs in z.B. das Wachstumsstadium (Anagen) experimentelle Ergebnisse verzerren kann [68]. Während der gesamten Dauer des Experiments wurden die Tiere unter speziellen keimarmen Bedingungen, in einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus und bei freiem Futter- und Wasserzugang gehalten. Vor einer Eingewöhnungszeit von 7 Tagen wurden die Tiere beider Stämme in die Behandlungsgruppen für das atopische Dermatitis-Stress-Modell und das Asthma-Stress-Modell eingeteilt. Die Aufteilung der Tiere innerhalb eines Mausstamms in die fünf verschiedenen Gruppen erfolgte zufällig.

Material für die Tierversuche

Reagenzien:	
Aluminiumhydroxyd (AlumImuject®)	Pierce Chemical (Rockfort, IL, USA)
Aquadest	Merck (Darmstadt, D)
Hexan	Merck (Darmstadt, D)
Ketaminhydrochlorid (Ketanest®)	Parke-Davis (Freiburg, D)
Longasteril-Lösung (Longasteril®)	Fresenius Kabi (Bad Homburg, D)
NatriumChlorid 0,9% für Injektionszwecke	Merck (Darmstadt, D)
NK1-Rezeptorantagonist RP 67580	Rhone-Poulenc (Vitry-sur-Seine, France)
OCT Gewebeeinbettmedium	Jung (Heidelberg, D)
Ovalbumin Grad V	Sigma Biochemica (Deisenhofen, D)
Ovalbumin Grad IV	Sigma Biochemica (Deisenhofen, D)
Paraformalaldehyd	Merck (Darmstadt, D)

PBS steril	Merck (Darmstadt, D)
Pikrinsäure	Sigma Biochemica (Deisenhofen, D)
Saccharose	Merck (Darmstadt, D)
Xylazinhydrochlorid (Rompun®)	Bayer (Bayer Leverkusen, D)

Lösungen:

LANA-Lösung:	
Lösung A:	
Paraformalaldehyd	Merck (Darmstadt, D)
in 125 ml Aquadest bei 58° lösen	Merck (Darmstadt, D)
NaOH zugeben bis Lösung klar ist	Merck (Darmstadt, D)
70 ml Prikrinsäure hinzugeben	Sigma Biochemica (Deisenhofen, D)
mit Aquadest auf 250ml auffüllen	
Lösung B:	
10, 23 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck (Darmstadt, D)
2,99 g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck (Darmstadt, D)
mit Aquadest auf 250ml auffüllen	
Lösung A und B im Verhältnis 1:1 mischen	
Narkoselösung:	
1 Teil (50mg/ml) Ketaminhydrochlorid	Parke-Davis (Freiburg, D)
1 Teil Xylazinhydrochlorid 2%	Bayer (Bayer Leverkusen, D)
8 Teile 0,9% NaCl für Injektionszwecke	Merck, (Darmstadt, D)
Saccharose-Puffer:	
50g Saccharose	Jung (Heidelberg, D)
6,22g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Merck (Darmstadt, D)
2,06g NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	Merck (Darmstadt, D)
Apparaturen und Verbrauchsmaterialien:	

anatomische PinzetteCarl Rothe GmbH (Karlsruhe, D)Auslaufhahn HDPECarl Roth GmbH (Karlsruhe, D)Butterfly-NadelnBraun (Melsungen, D)Eppendorfgefäße (1,5 und 2 ml)Eppendorf (Hamburg, D)EppendorfzentrifugeEppendorf (Hamburg, D)

Instrumentenschale	Carl Rothe GmbH (Karlsruhe, D)
Maulwurfsvertreiber	Conrad Electronics (Hirschau, D)
Pinzette	Carl Rothe GmbH (Karlsruhe, D)
Rasiergerät	Braun (Kronberg, D)
Düsen-Vernebler	PariMaster (Starnberg, D)

2.2 Das allergische Dermatitis-Stress Modell

2.2.1 Behandlungsgruppen

Die einzelnen Behandlungsgruppen für das atopischen Dermatitis-Stress-Modell setzten sich wie folgt für den Balb/c- und C57BL/6-Stamm zusammen (s. Abb. 3 und Tab. 1.):

- Kontroll-Gruppe: unbehandelte Tiere, Präparation 23 Tage nach Versuchsbeginn.
- <u>Stress-Gruppe 20-21</u>: akustischer Stress am Tag 20 bis Tag 21 f
 ür 24 Stunden; Pr
 äparation 48 Stunden nach Stressende.
- <u>Atopische Dermatitis-Gruppe (AD)</u>: Sensibilisierung am Tag 0 und 14 mit OVA VI, Provokation am Tag 21 mittels OVA V; Präparation 48 Stunden nach Provokation.
- <u>Stress+AD-Gruppe (S+AD)</u>: Sensibilisierung und Provokation wie bei der AD-Gruppe, zusätzlich akustischer Stress von Tag 20 auf Tag 21 bis unmittelbar vor Provokation; Präparation 48 Stunden nach Provokation.
- <u>Stress+AD+NK1-Rezeptorantagonist-Gruppe (S+AD+NK1)</u>: Sensibilisierung, Provokation und Stress wie bei S+AD-Gruppe, zusätzlich Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten vor und nach der Stressapplikation; Präparation 48 Stunden nach Provokation.

Zusätzlich wurden noch folgende zwei Behandlungsgruppen innerhalb des C57BL/6-Stammes gebildet:

- <u>Stress-Gruppe 21-22</u>: keine Sensibilisierung, keine Provokation; 24stündige Stressexposition an Versuchstag 21 auf 22, entsprechend der Stressexposition der AD+Stress-Gruppe. Präparation 24 Stunden nach Stressende.
- <u>AD+Stress-Gruppe (AD+S)</u>: Sensibilisierung und Provokation wie bei der AD-Gruppe,
 24stündiger akustischer Stress von Tag 21 auf 22 beginnend <u>nach</u> der Provokation;
 Präparation 48 Stunden nach Provokation.

Tab.1: Gruppenverteilung im atopischen Dermatitis-Stress Modell.

Behandlungsgruppen in beiden Stämmen: Kontroll-Gruppe: unbehandelte Tiere, Präparation 23 Tage nach Versuchsbeginn; Stress-Gruppe 20-21: 24stündige Stressexposition von Tag 20 auf Tag 21, Präparation 48 Stunden nach Stressende; Atopische Dermatitis-Gruppe (AD): Sensibilisierung am Tag 0 und 14 mit OVA VI, Provokation am Tag 21 mittels OVA V, Präparation 48 Stunden nach Provokation; Stress+AD-Gruppe (S+AD): Sensibilisierung und Provokation wie bei AD-Gruppe, Stressexposition von Tag 20 auf Tag 21; Präparation 48 Stunden nach Provokation; Stress+AD+NK1-Rezeptorantagonist-Gruppe (S + AD + NK1): Sensibilisierung, Provokation und Stress wie bei S+AD-Gruppe, zusätzlich Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten vor und nach der Stressexposition; Präparation 48 Stunden nach Provokation; stress-Gruppe folgende Gruppen gebildet: Stress-Gruppe 21-22: keine Sensibilisierung, keine Provokation; 24stündige Stressexposition von Tag 21 auf 22; AD+Stress-Gruppe (AD+S): Sensibilisierung und Provokation wie bei AD-Gruppe, Stress von Tag 21 auf 22 beginnend nach der Provokation; Präparation 48 Stunden nach Provokation.

Mausstamm	Gruppe	n Total
Balb/c	Kontrolle	4
	Stress 20-21	5
	AD	4
	Stress+AD	8
	Stress+AD+NK1	5
C57BL/6	Kontrolle	4
	Stress 20-21	4
	AD	4
	Stress+AD	8
	Stress+AD+NK1	8
	Stress 21-22	5
	AD+Stress	4

2.2.2 Versuchsablauf

Am Tag 0 des Versuchs wurden die Tiere der Gruppen AD, Stress+AD, AD+S und S+AD+NK1 mit 20 μ g Ovalbumin Grad VI und 2.25 mg Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) gelöst in 100 μ l sterilem PBS *intraperitoneal* sensibilisiert. Eine zweite Sensibilisierung erfolgte am Tag 14. Die Tiere der Stress- und Kontrollgruppen erhielten keine Sensibilisierung und keine Allergenprovokation.

Um die Ausbildung von AD-Läsionen zu provozieren, erhielten am Tag 21 die Tiere der AD-, der Stress+AD, der Stress+AD+NK1- und der AD+Stress Gruppen die Allergenprovokation. Dazu wurden die Tiere durch intraperitoneale Injektion von 200 µl der Narkoselösung (s. Lösungen) ruhig gestellt und die Haare der Rückenhaut rechtsseitig mit einem elektrischen Rasierer vorsichtig und untraumatisch entfernt. Alle Tiere befanden sich in der Telogenphase des Haarzyklus (erkennbar an rosafarbener, leicht faltenwerfender Haut). Zur Provokation wurde den Tieren 50 µg Ovalbumin Grad V gelöst in 200 µl sterilem PBS in die rasierte Rückenhaut intradermal injiziert. Dieses Protokoll hat im Gegensatz zu epikutaner Sensibilisierung den Vorteil, dass der Zeitpunkt der Ausbildung von AD-Läsionen genau geplant und so mit der Stressexposition abgestimmt werden kann. Am Tag 20 wurden die Tiere der Gruppen Stress 20->21-, Stress+AD und Stress+AD+NK1 für 24 Stunden durch einen akustischen Stressor mittels eines Maulwurfsvertreiber vor der Allergenprovokation gestresst. Die Stressexposition fand in einem separierten Raum statt. Der Maulswurfsvertreiber sandte auf einer Frequenz von 300 Herz 4-mal in der Minute in unregelmäßigen Abständen Schallwellen aus, denen die Tiere in ihren Käfigen nicht ausweichen konnten. Die Emittierung der Schallwellen in einer für die Tiere nicht vorhersehbaren Zeitabfolge ist ein etabliertes Akustikstress-Modell in der Forschung [69-71]. Jeweils vor und nach der Stressexposition wurde den Tieren der Stress+AD+NK1-Gruppe 200 μg NK1-Rezeptor-Antagonist in 200 μl (0,9% NaCl+0,05% CO₃CCOH) gelöst intraperitoneal injiziert. Die Tiere der Stress 21->22 und der AD+Stress Gruppe wurden am Tag 21 auf 22 der 24stündigen Stressexposition (= \underline{nach} der Provokation) ausgesetzt (s. Abb.3).

Die Tiere aller Gruppen wurden am Tag 23 des Versuchs mit der Narkoselösung (s. Lösungen) ruhig gestellt, die rechtsseitige Rückenhaut rasiert und durch eine letale Dosis (ca. 50 µl, *intraperitoneal*) einer Lösung aus Ketaminhydrochlorid mit 1 µl Xylazinhydrochlorid getötet. Allen Versuchstieren wurde nach der Thoraxeröffnung über den linken Ventrikel mit einer Butterfly-Kanüle 20 ml Longasteril® injiziert, welches über den eröffneten rechten Vorhof frei abfliesen konnte. Nach Erreichen der Blutleere wurde über den gleichen Zugang eine Lösung aus 4%igem Paraformaldehyd und 14%iger gesättigter Pikrinsäure injiziert. Dieses Protokoll für die Perfusionsfixierung wird standardmäßig für die Gewinnung von Geweben für den Nachweis kleinster Peptide, wie sie z.B. die Neuropeptide darstellen, in der Immunhistochemie angewandt. Nach der Perfusionsfixierung wurde die gesamte Rückenhaut mit anatomischer Pinzette und Schere in der Subkutis stumpf frei präpariert. Die sorgfältig abgetrennte Rückenhaut wurde faltenfrei auf Karton aufgespannt, um unerwünschte Schrumpfung zu vermeiden. Das Gewebe wurde 2 Stunden bei 4 °C in LANA-Lösung (s. Lösungen) fixiert und über Nacht in 10% Saccharose-Puffer (s. Lösungen) bei 4 °C belassen. Am nächsten Tag wurde die Haut in OCT-

Einbettmedium eingebettet, und in flüssigen Stickstoff gekühlt. Alles entnommene Gewebe wurde bei -80 °C gelagert.



Abb. 3. Versuchsablauf des atopischen Dermatitis-Stress Modells.

Die Gruppen AD+Stress und Stress 21->22 wurden nur innerhalb des C57BL/6-Stamms gebildet. Die bei Ankunft 6 Wochen alten Tiere wurden zufällig in die Behandlungsgruppen aufgeteilt. Sensibilisierung der Gruppen AD, Stress+AD, Stress+AD+NK1 und AD+Stress mit 20 μ g OVA VI/AL(OH)₃ i. p erfolgte an Tag 0 und 14, gefolgt von der Provokation mit 50 μ g OVA V intradermal am Tag 21. Die Gruppen Stress+AD- und Stress+AD+NK1 wurden <u>vor</u> Provokation mittels eines Maulwurfvertreibers für 24 Stunden gestresst, die Gruppe AD+Stress <u>nach</u> Provokation. Die Gruppe Stress-20->21 wurden analog zur Stress+AD-Gruppe von Tag 20 auf 21 gestresst; die Gruppe Stress 21->22 analog der AD+Stress-Gruppe von Tag 21 auf 22. Den Tieren der Stress+AD+NK1-Gruppe wurde vor und nach der Stressexposition 200 μ g NK1-Rezeptor-Antagonist in 200 μ l (0,9% NaCl+0,05% CO₃CCOH) gelöst i. p. injiziert. Präparation aller Tiere am Tag 23 des Versuchs.

2.3 Das Asthma-Stress Modell

2.3.1 Behandlungsgruppen

Dieses Modell der allergischen Atemwegsinflammation zeigt die Hauptmerkmale des allergischen Asthma bronchiale (erhöhte Atemwegsreaktivität und allergische Atemwegsinflammation) und ist ein etabliertes Modell in der Asthmaforschung [18, 72, 73]. Im Folgenden wird es Asthma-Stress Modell genannt. Die Verteilung der bei Ankunft 6-8 Wochen alten Balb/c- und C57BL/6-Mäuse in die einzelnen Behandlungsgruppen erfolgte zufällig (s. Abb. 4 und Tab. 2):

- Kontroll-Gruppe: unbehandelte Tiere
- <u>Stress-Gruppe</u>: Injektion von 200 µl/ Maus sterilem PBS *intraperitoneal* an Tag 0, 14 und 21; *challenge* in PBS-Box mit Vernebelung von sterilem PBS an Tag 26 und 27 und 24-stündige Stressexposition an Tag 26 bis 27
- <u>Asthma-Gruppe</u>: Sensibilisierung mit OVA VI, zweimaliger *challenge* mit OVA V an Tag 26 und 27
- <u>Asthma+Stress-Gruppe (A+S)</u>: Sensibilisierung und challenge wie bei der Asthma-Gruppe, zwischen den *challenges* 24stündige Stressexposition
- <u>Asthma+Stress+NK1-Rezeptorantagonist-Gruppe (A+S+NK1)</u>: Ablauf wie bei A+S-Gruppe, zusätzlich vor und nach jeder *challenge* Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten

Tab. 2: Gruppenverteilung im Asthma-Stress Modell.

Gezeigt ist die maximale Gesamtgröße (= n Total) der einzelnen Gruppen pro Mausstamm. Für die spätere Ergebnisdarstellung wurden Tiere gleichen Mausstamms aber verschiedener Tierversuche in einer einzigen Gruppe zusammengefasst.

Mausstamm	Gruppe	n Total
C57BL/6	Kontrolle	7
	Stress	8
	Asthma	6
	Asthma+Stress	7
	Asthma+Stress+NK1	6
Balb/c	Kontrolle	6
	Stress	8
	Asthma	11
	Asthma+Stress	12
	Asthma+Stress+NK1	11

2.3.2 Versuchsablauf

Am Tag 0, 14 und 21 wurde den Tieren der Gruppen Asthma, Asthma+Stress und Asthma+Stress+NK1 zur Sensibilisierung 20 μ g Ovalbumin Grad VI und 2.25 mg Aluminiumhydroxid (Al(OH)₃) gelöst in 200 μ l sterilem PBS *intraperitoneal* injiziert. Den Tieren der Stressgruppe wurde an den gleichen Tagen 200 μ l steriles PBS intraperitoneal injiziert. Tiere der Kontrollgruppe blieben bis zur Präparation unbehandelt.

Am Tag 26 und 27 des Versuchs wurden bei den Tieren der Asthma-, Asthma+Stress- und Asthma+Stress+NK1-Gruppen eine lokale Allergenprovokation (= *challenge*) durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse in einer 20 x 20 x 15 cm großen Plastikkammer über eine Dauer von 20 Minuten einer aerolisierten OVA V-Lösung (50 µg gelöst in 5 ml sterilem PBS) ausgesetzt, die durch einen Düsenvernebler erzeugt wurde. Die durch die Verneblung erzeugte Tröpfchengröße beträgt 1-2µm und erreicht somit die kleinen Atemwege. Entsprechend wurde die Stressgruppe einer challenge mit 5 ml sterilem PBS für 20 Minuten an den gleichen Tagen unterzogen. Jeweils vor und nach der *challenge* wurde den Tieren der Asthma+Stress+NK1-Gruppe 20 µg NK1-Rezeptorantagonist gelöst in 200 µl (0,9% NaCl+0,05% CO3CCOH) intraperitoneal injiziert. Zwischen den beiden challenges wurden die Tiere der Asthma+Stress- und Asthma+Stress+NK1-Gruppen für 24 Stunden durch einen akustischen Stressor mittels eines Maulwurfsvertreiber gestresst. Wie auch beim atopischen Dermatitis Stress-Modell fand die Stressexposition in einem separierten Raum statt. Der Maulswurfsvertreiber sandte auf einer Frequenz von 300 Hz 4-mal in der Minute in unregelmäßigen Abständen Schallwellen aus, denen die Tiere in ihren Käfigen nicht ausweichen konnten. Die Emittierung der Schallwellen in einer für die Tiere nicht vorhersehbaren Weise.

Alle Tiere wurden am Tag 28 des Versuchs präpariert. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und der Thorax eröffnet. Für die bronchoalveoläre Lavage (BAL) wurde nach Punktion der Trachea die Lunge zweimal mit 0,8 ml eiskaltem PBS gewaschen und die BAL in Eppendorfröhrchen gesammelt. Die pro Maus generierte BAL hatte ein durch-schnittliches Volumen von 1,2 ml und ein Gewicht von 2,3 g. 150 µl der gewonnenen BAL wurde für die Zellzählung in der Neubauer-Kammer und die Generierung der Zytospins abgenommen, die verbleibende BAL zur Gewinnung zellfreier Überstände zentrifugiert. Die Überstände wurden in Aliquots á 300 µl bis zur Zytokin-Bestimmung bei -80 °C eingefroren. Zur Entnahme der Lungenflügel wurde die rechte Herzkammer punktiert, die Lunge mit PBS gespült und anschließend mit ca 0,8 ml OCT-Einbettmedium gefüllt. Das Lungengewebe wurde

entnommen, in OCT-Einbettmedium eingelegt und in Hexan gefolgt von Stickstoff kryofixiert, und bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.



Abb. 4: Versuchsablauf des Asthma-Stress Modells.

Die bei Ankunft 6 Wochen alten Mäuse des Balb/c und C57BL/6 Stamms wurden zufällig in die einzelnen Behandlungsgruppen aufgeteilt. Die Tiere der Gruppen Asthma, Asthma+Stress und Asthma+Stress+NK1 wurden am Tag 0, 14 und 21 des Versuches mit 20 μ g OVA V/AL(OH)₃ i. p. sensibilisiert; die Tiere der Stressgruppe analog dazu mit 200 μ l sterilem PBS injiziert. Die mit OVA sensibilisierten Tiere wurden an Tag 26 und 27 für 20 Minuten einer Allergenprovokation (= challenge) mit OVA VI ausgesetzt. Die Stress-Gruppe wurde mit sterilem PBS gechallengt. Vor und nach den challenges wurde den Tieren der Asthma+Stress+NK1-Gruppe 200 μ g NK1-Rezeptor-Antagonist in 200 μ l (0,9% NaCl+0,05% CO₃CCOH) gelöst i. p. injiziert. Zwischen den challenges wurden die Tiere der Stress-, Asthma+Stress- und Asthma+Stress+NK1-Gruppen mittels eines akustischen Stressors für 24 Stunden gestresst. Präparation aller Tiere am Tag 28.

2.3.3 Zellzählung mittels Neubauer-Kammer

Material:

Neubauer-Zählkammer improved

Zeiss Axioscope 2 Mikroskop

Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D) Carl Zeiss (Göttingen, D) Zur Bestimmung der Gesamtzahl an Zellen in der BAL wurden 10 µl der BAL eines jeden Tieres in eine Neubauer-Kammer pipettiert und ausgezählt.

2.3.4 Zytospin und Diff-Quik Färbung

Material:	
Diff-Quik®-Färbung	Dade Behring (Marburg, D)
Objektträger Super Frost	Menzel Gläser (Braunschweig, D)
Shandon Cytospin® 4 Cytocentrifuge	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Zeiss Axioscope 2 Mikroskop	Carl Zeiss (Göttingen, D)

Zytospins wurden aus 100 µl BAL pro Tier durch Zentrifugierung (100xg, 5min) auf Objektträger im Shandon Cytospin® generiert. Die Zytopspins wurden mittels Diff-Quik®-Färbung gefärbt. Es wurde mit der Diff-Quik® Färbelösung 1 (2 min) eine eosinophile (rote) Färbung und anschließend mit der Diff-Quik® Färbelösung 2 (5 min) eine basophile (blaue) Färbung durchgeführt.

Je hundert Zellen pro Objektträger bzw. Tier wurden in 400facher Vergrößerung unter dem AxioVision Zeiss Mikroskop ausgezählt. Die Zellen wurden nach gängigen morphologischen Kriterien klassifiziert als Lymphozyten, Makrophagen bzw. Monozyten, eosinophile Granulozyten und neutrophile Granulozyten und als Prozentwerte notiert. Die mittels der Neubauer-Kammer bestimmte Gesamtzahl (= Leukozyten) an Zellen in der BAL jedes Tieres wurde mit der Prozentzahl multipliziert, und anschließend durch 100 geteilt, um die absoluten Werte der einzelnen Zellpopulationen pro Tier zu erhalten.

2.3.5 Zytokinbestimmung in der bronchoalveolären Lavage mittels ELISA

Material

Reagenzien:	
Blockpuffer, pH 7 für IL-4, IL-5 und INF	γ-ELISA:
PBS	(siehe unten)
3% Bovines Serum Albumin	Sigma Biochemica (Deisenhofen, D)
Blockpuffer, pH 7 für TNF-α-ELISA:	
PBS	(siehe unten)
10% Fetales Kälber Serum	Sigma Biochemica (Deisenhofen, D)
GALLATI-Puffer:	

8,4 g Zitronensäure-Monohydrat	Merck (Darmstadt, D)
60 ml Aqua dest.	Merck (Darmstadt, D)
pH-Einstellung auf 3,95 mit 4N KOH	
Auffüllung auf 200 ml mit Aqua dest.	
68 µl 30%tiges H ₂ O ₂ dazugeben	Merck (Darmstadt, D)
Natriumbicarbonat (coating puffer), pH 8,2:	Serva, (Heidelberg, Deutschland)
Phosphat-puffered-saline (PBS), pH 7,0:	
8 g Natriumchlorid NaCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
16 g Dinatriumhydrogenphosphat Na ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt, Deutschland
0,2 g Kaliumchlorid KCl	Merck (Darmstadt, Deutschland)
0,2 g Dikaliumhydrogenphosphat K ₂ HPO ₄	Merck (Darmstadt, Deutschland)
auf 11 Aquadest	
Schwefelsäure H ₂ SO ₄ M2	Merck (Darmstadt, D)
Streptavidin-Meeretich-Peroxidase (SMP)	Calbiochem (Bad Soden, D)
TMB-Lösung:	
Tetramethylbenzidin (TMB)	Merck (Darmstadt, D
1:100 in Gallati-Puffer	
Verdünnungspuffer für die Standardreihe und bi	iotinylierten Antikörper (TNF-alpha):
PBS	
10% Fetales Kälber Serum	Sigma Biochemica (Deisenhofen, D)
Verdünnungspuffer für die Standardreihen (I	L-4, IL-5, INF-γ) und für den biotinylierten
Antikörper (IL-4, IL-5, INF-γ):	
PBS	
3 % Bovines Serum Albumin	Sigma Biochemica (Deisenhofen, D
Verdünnungspuffer, pH 7 für SMP:	
PBS	
0,1% Tween 20	Sigma Chemie (Deisenhofen, D)
Waschpuffer, pH 7:	
PBS	
0,1% Tween 20	Sigma Chemie (Deisenhofen, D)
Verbrauchsmaterial und Apparaturen:	
96well-Rundbodenplatten	Greiner GmbH (Frickenhausen, D)

96 Well Immunop MaxiSorp Platten Microtiter Plate Reader MR 7000 OPTIMA Software für ELISA

ELISA-Kits:

Mouse IFNγ ELISAspot Kit Mouse IL-4-ELISA Kit ,optEIA Mouse IL-5-ELISA Kit, optEIA Mouse TNF-α-ELISA Kit, optEIA-Kit NUNC GmbH (Wiesbaden, D) Dynatech Lab. (Alexandria, USA) BMG Labtech (Offenburg, D)

R&D Systems (Minneapolis, USA) BD Biosciences Pharmingen (Hamburg, D) BD Biosciences Pharmingen (Hamburg, D) BD Biosciences Pharmingen (Hamburg, D)

verwendete Konzentratione	n der Antikörper:	
Primäre Antikörper:	anti-Maus IL-4	1 μg/ml
	anti-Maus IL-5	2 μg/ml
	anti-Maus-IFNγ	3 μg/ml
	anti-Maus TNF α	4 μg/ml
Sekundäre Antikörper:	anti-Maus IL-4	0,25 μg/ml
(biotiniliert)	anti-Maus IL-5	1 μg/ml
	anti-Maus-IFNγ	100 ng/ml
	anti-Maus TNF α	1 μg/ml
Standards:	rekombiniertes IL-4	5,2 - 2000 pg/ml
	rekombiniertes IL-5	20 - 4000 pg/ml
	rekombiniertes IFNy	55 - 20000 pg/ml
	rekombiniertes TNFa	10,4 - 1000 pg/ml
Detektionslimits:	rekombiniertes IL-4	22 pg/ml
	rekombiniertes IL-5	22 pg/ml
	rekombiniertes IFNy	40 pg/ml
	rekombiniertes TNF-α	18 pg/ml

Ablauf

Der Enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) basiert auf dem Prinzip der kompetitiven Bindung. Die Vertiefungen der ELISA-Platte sind mit einem Antikörper gegen die zu bestimmende Substanz beschichtet. Es werden eine Probe mit unbekannter Konzentration und eine definierte Menge Enzymkonjugatlösung in die Vertiefung gegeben, die um die freien Bindungsstellen des an die Platte gebundenen Antikörpers konkurrieren. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats kommt es zu einem Farbumschlag, der photometrisch gemessen wird. Die Menge an gebundenem Enzymkonjugat ist proportional zur Konzentration in der Probe, die durch Vergleich mit Standards mit bekannten Konzentrationen bestimmt werden kann.

96well-Rundbodenplatten (für den IL-4, IL-5 und INF-y-ELISA) und 96 Well Immunop MaxiSorp Platten (für den TNFa-ELISA) wurden mit dem jeweiligen primären Antikörper beschichtet (gelöst in Carbonatpuffer, 50 µl/well) und bei 4° über Nacht inkubiert. Mit dem Waschpuffer wurden die Platten dreimalig ausgewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch den Blockpuffer gesättigt (2h bei RT, 200 µl/well). Nach erneutem dreimaligen Auswaschen wurden im Anschluss die Proben und die Standardreihe (je 50 µl/well) in Doppelbestimmung auf die Platten aufgetragen. Die Standardreihe wurde in 10maligen 1:2 Verdünnungsschritten erstellt, ausgehend von der jeweiligen höchsten Standardkonzentration für jeden Zytokin-ELISA. Während der Inkubation bei 4°C über Nacht konnten die gebundenen Antikörper somit ihre spezifischen Antigene binden und mit diesen Immunkomplexen bilden. Nichtgebundene Antigene wurden am folgenden Tag durch fünfmaliges Waschen aus den Vertiefungen entfernt. Durch Zugabe des biotinilierten sekundären Antikörpers (50 µl/well, 2h bei RT) wurde das durch den Primärantikörper immobilisierte Zytokin detektiert. An das Biotin des Sekundärantikörpers band der Streptavidin-Meerechtich-Peroxidase (SMP) Enzymkomplex (1:10 000 in Verdünnungslösung für SMP, 50 µl/well) während der Inkubationszeit von 2 Stunden bei RT. Nach achtmaligem Waschen wurde durch Zugabe der 3,3;5,5-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung (150µl/well) eine Redoxreaktion ausgelöst, welche nach etwa 30-45 Minuten mittels 2M Schwefelsäure (50 µl/well) gestoppt wurde. Durch Protonierung des TMB erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb. Die Extinktion der Proben wurden innerhalb von 20 Minuten im Dynatech MR-7000-Photometer mit Testfilter 450 nm und Referenzfilter 490 nm bestimmt und anhand der Standardkurve die Probenkonzentration an IL-4, IL-5, IFN γ und TNF α unter zu Hilfenahme der Software von BMG Labtech bestimmt. Aus den so für jede Probe zwei erhaltenen Werten, wurde der Mittelwert gebildet und dieser als Wert der jeweiligen Zytokinkonzentration in der bronchoalveolären Lavage eines Tieres genommen.

2.4 Immunhistochemie

Material.

2.4.1 Herstellung von Schnitten

Material:	
Aceton	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Kryostat 1720	Leica (Bensheim, D)
Objektträger Super Frost	Menzel Gläser (Braunschweig, D)

Für die immunhistologische Färbung wurden 8 μ m (Asthma-Stress Modell) der Lunge bzw. 10 μ m dicke Schnitte (AD-Stress Modell) der Haut mit einem Kryostat gefertigt und auf Objektträger Super Frost aufgetragen. Die Hautschnitte wurden luftgetrocknet und bei -20° bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Lungenschnitte wurden in Aceton (10min, -20° C) fixiert, luftgetrocknet und ebenfalls bei -20° gelagert.

2.4.2 Giemsa Färbung und Bewertungsparameter im AD-Stress Modell

<u>iviateriui</u> :	
Deckgläschen	Menzel Gläser (Braunschweig, D)
Essigsäure 0,02%	Merck (Darmstadt, D)
Ethanol (85%, 90%, 100%)	Herbeta Arzneimittel (Berlin, D)
Giemsa-Lösung	Merck (Darmstadt, D)
Sodium-Borat-Lösung	Sigma Biochemica (Deisenhofen, D)
Vitramecid (Vitroclud®)	Langenbrinck (Emmendigen, D)
Xylol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
<u>Apparate</u> :	
Axio Cam HR Fotoaufsatzkamera	Carl Zeiss (Jena, D)
AxioVision Programm	Carl Zeiss (Jena, D)
Zeiss Axioscope 2 Mikroskop	Carl Zeiss (Jena, D)

Die Färbung nach Giemsa dient der spezifischen Anfärbung von Granula in Mastzellen.

Die Objektträger mit aufgezogenen Hautschnitten wurden getrocknet, in PBS gewaschen und 30 Minuten in Giemsalösung mit 1:10 verdünnter Sodium-Borat-Lösung gefärbt. Nach einer Spülung in *Aqua dest*. und mikroskopischer Kontrolle und Differenzierung mit 0,2% Essigsäure

wurde erneut in *Aqua dest.* gewaschen. Die Entwässerung mittels aufsteigender Alkoholreihe, Fixierung in Xylol und Eindeckelung mit Vitracemid beendeten die Färbung.

Pro Tier wurden in 5 Gesichtsfeldern je 2 Messungen der epithelialen Dicke unter 100facher Vergrößerung mit dem AxioZeiss Mikroskop unter Hilfenahme des AxioVision Programms gemacht. Zur photographischen Dokumentation wurde die AxioCam-Aufsatzkamera benutzt. Für die Ermittlung des Eosinophileninfiltrats und dem Prozentsatz an degranulierten Mastzellen wurde pro Tier in Dermis und Subkutis je 10 Gesichtsfelder in 400facher Vergrößerung ausgezählt. Als degranuliert zählte eine Mastzelle mit mind. 7 außerhalb der Zellmembran sichtbaren Granulae. Berechnet wurde die Anzahl an degranulierten Mastzellen von insgesamt

2.4.3 Hematoxylin-Eosin Färbung und Bewertungsparameter im Asthma-Stress Modell

Eosin	Waldeck GmbH (Münster, D)
Ethanol (85%, 90%, 100%)	Herbeta Arzneimittel (Berlin, D)
Hämalaun-Lösung nach Mayers	Dr. K. Hollborn & Söhne (Leipzig, D)
Vitracemid (Vitroclud®)	Langenbrinck (Emmendingen, D)
Xylol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)

Für die Bestimmung der Dicke des Bronchialepithels wurden die in Aceton fixierten Schnitte des Lungengewebes mit einer Hematoxylin-Eosin-Färbung gefärbt. Die Objektträger wurden getrocknet, in PBS gewaschen und Hämalaun-Lösung nach Mayers (7 min, RT) gefärbt. Nach Bläuung in Leitungswasser und 1-minütiger Gegenfärbung in Eosin folgte die aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung. Nach Fixierung in Xylol wurden die Objektträger mit Vitracemid (Vitroglut®) eingedeckelt.

Pro Tier wurden in je 2 Bronchen 5 Messungen der Bronchialepitheldicke unter 200facher Vergrößerung mit dem AxioZeiss Mikroskop unter Zuhilfenahme des AxioVision Programms vorgenommen.

2.5 Statistische Analyse

gezählten Mastzellen als Prozentwert.

M - 4 - 1 - 1.

Alle durchgeführten statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms "SPSS" angefertigt. Die Mittelwerte aller verschiedenen Gruppen eines bestimmten Paramters wurden mit dem H-Test nach Kruskal und Wallis für mehrere unabhängige Stichproben verglichen. Wenn dieser Test signifikant (= p < 0,001) war, wurde der U-Test nach Mann und Whitney für zwei unabhängige Stichproben angewandt. Für die Korrelationsanalyse wurde die Rangkorrelation nach Sperman berechnet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit / *probability value* p < 0,05 wurde als signifikant und p <0,01 bzw. 0,001 als hochsignifikant angesehen. In den Abbildungen wurde für jede Gruppe der Mittelwert plus Standardfehler dargestellt und die Signifikanz mit einem Sternchen* (= p < 0,05) oder ** (= p < 0,01) markiert.

Beim atopischen Dermatitis-Stress Modell wurden nur Tiere in die Auswertung aufgenommen, deren Rückenhaar sich in der Telogenphase des Haarzyklus befand. Beim Asthma-Stress Modell wurden alle Tiere der Kontroll- und Stress-Gruppen in die Auswertung einbezogen. Als Nonresponder galten Tiere der Asthma-, Asthma+Stress- und Asthma+Stress+NK1-Gruppen, deren prozentualer Anteil an eosinophilen Granulozyten in der BAL nach Sensibilisierung und Provokation unter 20% betrug. Diese Tiere wurden aus der Auswertung herausgenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Das atopische Dermatitis-Stress Modell

3.1.1 Die Auswirkung von AD und Stress auf die epidermale Dicke

Zunahme der epidermalen Dicke durch Provokation von AD bei beiden Stämmen

Die durchschnittliche epidermale Dicke der unbehandelten Tiere des Balb/c-Stamms war mit 16,01 µm signifikant dünner als die der Kontrollgruppe des C57BL/6-Stamms mit12,42 µm. Nach Sensibilisierung und Provokation kam es zu einer signifikanten Zunahme der epidermalen Dicke auf 25,53 µm beim Balb/c-Stamm bzw. 23,26 µm beim C57BL/6-Stamm im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Wie auch in AD-Läsionen menschlicher Haut war in beiden Stämmen die Zunahme der epidermalen Dicke durch eine endotheliale Hyperplasie, Spongiose und Akanthose gekennzeichnet (s. Abb. 5 und 6).

Abnahme der epidermalen Dicke bei nicht sensibilisierten Tieren durch Stress

Interessanterweise führte bei beiden Stämmen die 24stündige Stressexposition nicht sensibilisierter Tiere zu einer signifikanten Abnahme der epidermalen Dicke (Balb/c _{Stress} = 13,55 μ m; C57BL/6 _{Stress 20 -> 21} = 10,92 μ m) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe.

Zunahme der epidermalen Dicke bei sensibilisierten Tieren durch Stress

Durch Stressexposition <u>vor</u> Provokation kam es bei beiden Stämmen zu einer signifikanten Zunahme der epidermalen Dicke im Vergleich zu sensibilisierten Tieren ohne Stressexposition (Balb/c _{Stress+AD} = 28,15 µm; C57BL/6 _{Stress+AD} = 29,11 µm). Auch die nur beim C57BL/6-Stamm durchgeführte Stressexposition sensibilisierter Tiere <u>nach</u> Provokation bewirkte eine signifikante Zunahme der epidermalen Dicke (C57BL/6 _{Stress+AD} = 29,58 µm)

Verhinderung der Zunahme der epidermalen Dicke unter Stress durch den NK1-RA

Bei beiden Stämmen verhinderte die Administration des NK1-Rezeptorantagonisten die unter Stressexposition beobachtete Zunahme der epidermalen Dicke bei sensibilisierten und gestressten Tieren (Balb/c _{Stress+AD+NK1} = 22,93 μ m; C57BL/6 _{Stress+AD+NK1} = 24,26 μ m).



Zu Kontrolle und Stress alle restlichen Gruppen signifikant


Zu Kontrolle und Stress 20->21 / 21->22 alle restlichen Gruppen signifikant

Abb. 5: Die epidermale Dicke der einzelnen Behandlungsgruppen im AD-Stress Modell.

Angegeben ist der Mittelwert mit Standardfehler. Pro Maus wurden in je 5 Gesichtsfelder 2 Messungen an den dicksten Stellen der Epidermis durchgeführt. Repräsentative Ausschnitte der jeweiligen Gruppen sind rechts dargestellt. Epi = Epidermis, D = Dermis, Hf = Haarfollikel.

Behandlungsgruppen: Kontrolle ($n_{Balb/c} = 4$, $n_{C57BL/6} = 3$): unbehandelte Tiere; Stress 20->21-Gruppe ($n_{Balb/c} = 5$, $n_{C57BL/6} = 4$): 24stündige Stressexposition mittels Maulwurfvertreibers; Atopische-Dermatitis (= AD)-Gruppe ($n_{Balb/c} = 4$, $n_{C57BL/6} = 4$): Sensibilisierung mit OVA V und Provokation mit OVA VI; Stress+AD (=S+AD)-Gruppe ($n_{Balb/c} = 7$, $n_{C57BL/6} = 8$): Behandlung wie bei der AD-Gruppe, zusätzlich vor Provokation 24stündige Stressexposition; Stress+AD+NK1-Rezeptorantagonist (=S+AD+NK1)-Gruppe ($n_{Balb/c} = 5$, $n_{C57BL/6} = 8$): Behandlung wie bei der S+AD-Gruppe, zusätzlich direkt vor und nach Stressexposition Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten

Zusätzliche Behandlungsgruppen beim C57BL/6-Stamm: Stress 21->22-Gruppe ($n_{C57BL/6} = 5$): 24stündige Stressexposition von Tag 21 bis 22 des Versuchs; AD+Stress-Gruppe ($n_{C57BL/6} = 4$): Behandlung wie bei der AD-Gruppe, zusätzlich <u>nach</u> Provokation 24stündige Stressexposition. Zur Kontroll- und Stress-Gruppe sind innerhalb beider Stämme alle anderen Gruppen jeweils signifikant (p < 0,01), außer die Stress 21->22-Gruppe des C57BL/6-Stamms.



Abb. 6: Vergleich der Epidermisdicke des Balb/c- und C57BL/6-Stamms im AD-Stress Modell.

Gruppenverteilung und Messung s. Abb. 5.

3.1.2 Die Auswirkung von AD und Stress auf die Mastzelldegranulation

Zunahme der Mastzelldegranulation durch Provokation von AD

Nach Sensibilisierung und Provokation kam es zu einer signifikanten Zunahme der Mastzelldegranulation im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe von 16,01% auf 33,92% beim Balb/c-Stamm bzw. von 6,76 % auf 21,97 % beim C57BL/6-Stamm (s. Abb. 7 und 8).

Zunahme der Mastzelldegranulation bei nicht sensibilisierten Tieren durch Stress

Bei beiden Stämmen führte die Stressexposition nicht sensibilisierter Tiere zu einer signifikanten Zunahme der Mastzelldegranulation im Vergleich zur Kontrollgruppe des jeweiligen Stamms (Balb/c _{Stress} = 24,3 %; C57BL/6 _{Stress} = 13,05 %).

Zunahme der Mastzelldegranulation bei sensibilisierten Tieren durch Stress

Die Stressexposition sensibilisierter Tiere <u>vor</u> Provokation führte bei beiden Stämmen zu einer signifikanten Zunahme der Mastzelldegranulation im Vergleich zu den sensibilisierten Tieren ohne Stressexposition des jeweiligen Stamms (Balb/c _{Stress+AD} = 42,36 %; C57BL/6 _{Stress+AD} = 34,43 %). Auch die nur beim C57BL/6-Stamm durchgeführte Stressexposition <u>nach</u> Provokation führte zu einer signifikanten Zunahme der Mastzelldegranulation im Vergleich zur AD-Gruppe (C57BL/6 _{AD+Stress} = 32,66 %).

Verhinderung der Zunahme der Mastzelldegranulation unter Stress durch NK1-RA

Bei beiden Stämmen führte die Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten zu einem signifikanten Rückgang der unter Stress beobachteten Zunahme der Mastzelldegranulation in AD-Läsionen sensibilisierter Tiere (Balb/c _{Stress+AD+NK1} = 24,97%; C57BL/6 _{Stress+AD+NK1} = 19,22%).

Stärkere Mastzelldegranulation beim Balb/c-Stamm

Beim Balb/c-Stamm fanden sich in der AD-, Stress+AD- und Stress+AD+NK1-Gruppe ein signifikant höherer Anteil an degranulierten Mastzellen als in den entsprechenden Gruppen des C57BL/6-Stamms.



Zur Kontrolle alle restlichen Gruppen signifikant



Zu Kontrolle und Stress 20->21 / 21->22 alle restlichen Gruppen signifikant

Abb. 7: Prozentsatz an degranulierten Mastzellen in den einzelnen Behandlungsgruppen im AD-Stress Modell.

Als degranuliert zählte eine Mastzelle mit mind. 7 außerhalb der Zellmembran sichtbaren Granulae, dargestellt als Prozentwert von insgesamt gezählten Mastzellen. Pro Maus wurden 10 Gesichtsfelder in Dermis und Subkutis ausgezählt. Behandlungsgruppen s. Abb. 5.

Repräsentative Ausschnitte jeder Gruppen mit nicht degranulierten oder degranulierten Mastzellen in der Subkutis sind rechts dargestellt. Pfeile zeigen auf Mastzelle (= Mz, dunkellila) oder Granulae (= Gr., helllila Punkte außerhalb der Mastzelle).



Abb. 8: Vergleich des Prozentsatz an degranulierten Mastzellen des Balb/c- und C57BL/6 Stamms im AD-Stress Modell.
Gruppenverteilung und Messung s. Abb. 7.

3.1.3 Die Auswirkung von AD und Stress auf das Eosinophileninfiltrat in AD-Läsionen

Geringe Anzahl an eosinophilen Granulozyten in der Haut nicht sensibilisierter Tiere Beim C57BL/6- und beim Balb/c-Stamm fanden sich nur vereinzelt eosinophile Granulozyten (= EOS) in der Haut nicht sensibilisierter Tiere (Balb/c _{Kontrolle} = 3,1 EOS/Gesichtsfeld (= EOS/Gf); C57BL/6 _{Kontrolle} = 1,6 EOS/Gf). Stressexposition nicht sensibilisierter Tiere hatte bei beiden Stämmen keinen Einfluss auf die Anzahl an in der Haut vorgefundenen EOS (Balb/c _{Stress} = 2,9 EOS/Gf; C57BL/6 _{Stress} = 0,6 EOS/Gf) im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe (s. Abb. 9 und 10).

Zunahme des Eosinophileninfiltrats in AD-Läsionen durch Provokation von AD

Durch Provokation von AD kam es bei beiden Stämmen zu einer hochsignifikanten Zunahme der Anzahl an EOS in den AD-Läsionen (Balb/c _{AD} = 11,6 EOS/Gf; C57BL/6 _{AD} = 43,0 EOS/Gf) im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Eine allergische Dermatitis konnte also in beiden Stämmen effektiv ausgelöst werden. Interessanterweise fanden sich dabei signifikant mehr EOS in den AD-Läsionen sensibilisierter Tiere des C57BL/6-Stamms als in denen sensibilisierter Tiere des Balb/c-Stamms. Ein verstärktes Eosinophileninfiltrat fand sich v. a. in der Subkutis am Übergang zur Dermis und zur Lamina muscularis.

Zunahme des Eosinophileninfiltrats in AD-Läsionen durch Stress

Bei beiden Stämmen nahm durch Stressexposition <u>vor</u> Provokation die Anzahl an EOS in den AD-Läsionen signifikant im Vergleich zu den entsprechenden AD-Gruppen zu (Balb/c _{Stress+AD} = 19,7 EOS/Gf; C57BL/6 _{Stress+AD} = 53,3 EOS/Gf). Auch hier fanden sich signifikant mehr EOS in den AD-Läsionen sensibilisierter und gestresster Tiere des C57BL/6-Stamms als in denen sensibilisierter und gestresster Tiere des Balb/c-Stamms. Interessanterweise führte die beim C57BL/6-Stamm durchgeführte Stressexposition <u>nach</u> Provokation zu einer signifikanten Abnahme der EOS in den AD-Läsionen (C57BL/6_{AD+Stress} = 17,7 EOS/Gf).

Verhinderung der unter Stress beobachteten Zunahme des Eosinophileninfiltrats durch den NK1-RA

Bei beiden Stämmen bewirkte die Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten die unter Stressexposition beobachtete Zunahme an EOS in AD-Läsionen bei sensibilisierten Tieren zu verhindern (Balb/c _{Stress+AD+NK1} = 12,3 EOS/Gf; C57BL/6 _{Stress+AD+NK1} = 5,7 EOS/Gf), beim C57BL/6-Stamm sogar noch deutlich unter den bei der AD-Gruppe gefunden Wert von 42,96 EOS/Gf.













Zu Kontrolle und Stress alle restlichen Gruppen signifikant



Zu Kontrolle und Stress 20->21 / 21->22 alle restlichen Gruppen signifikant

Abb. 9: Anzahl an eosinophilen Granulozyten der einzelnen Behandlungsgruppen im AD-Stress Modell.

Pro Maus wurden je 10 Gesichtsfelder in Dermis und Subkutis ausgewertet. Behandlungsgruppen s. Abb. 5. Repräsentative Ausschnitte der jeweiligen Gruppen sind rechts dargestellt. Epi = Epidermis, D = Dermis, Sc = Subkutis, Hf = Haarfollikel; Pfeile in den rechten vergrößerten Ansichten zeigen auf Mastzellen (= Mz, dunkellila) oder auf ein Infiltrat von eosinophilen Granulozyten (= Eo., kleine hellrosa und lila Zellen).



Abb. 10: Vergleich der Anzahl an eosinophilen Granulozyten des Balb/c- und C57BL/6-Stamms im AD-Stress Modell.

Gruppenverteilung und Messung s. Abb. 9.

3.2 Das Asthma-Stress Modell

3.2.1 Die Auswirkung von Allergenprovokation und Stress auf die Gesamtzellzahl in der BAL

Zunahme der Gesamtzellzahl in der BAL durch Allergenprovokation

In den BALs der nicht sensibilisierten Tiere des Balb/c- und C57BL/6-Stamms fanden sich jeweils nur eine geringe Anzahl an Zellen (Balb/c _{Leuko} = 38 ± 9 ; C57BL/6 _{Leuko} = 37 ± 8), darunter vor allem Makrophagen bzw. Monozyten (s. Abb. 11 und 12).

Bei beiden Mausstämmen führte die Sensibilisierung und Allergenprovokation zu einer hochsignifikanten Zunahme der Anzahl an Leukozyten in der BAL. Dabei machten EOS den größten Teil der in die BAL eingewanderten Zellen aus. Beim C57BL/6-Stamm fand sich eine deutlich höhere Gesamtzellzahl und eine deutlich höhere Zahl an EOS in der BAL der Asthma-Gruppe als beim Balb/c-Stamm (Balb/c _{Leuko} = 176 ± 23 ; C57BL/6 _{Leuko} = 314 ± 70 ; Balb/c _{EOS} = 99 ± 16 ; C57BL/6 _{EOS} = 223 ± 65). Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu einer Arbeit, die zeigte, dass C57BL/6-Mäuse auf Allergenprovokation mit einer schwächeren Zunahme der Leukozyten in der BAL reagieren im Vergleich zu Balb/c-Mäusen [18].

Keine Zunahme der Gesamtzellzahl durch Stress bei nicht sensibilisierten Tieren

Bei beiden Stämmen hatte die Stressexposition nicht sensibilisierter Tiere keine Auswirkung auf die Höhe der Gesamtzellzahl in der BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe des jeweiligen Stamms. Gleiches gilt für die einzelnen Zellgruppen, lediglich beim C57BL/6-Stamm führte die Stressexposition zu einer signifikanten Abnahme der neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Divergierende Auswirkung von Stress auf die Gesamtzellzahl bei sensibilisierten und allergenexponierten Balb/c- und C57BL/6-Mäusen

Interessanterweise hatten gestresste und sensibilisierte Tiere des C57BL/6-Stamm deutlich weniger Leukozyten und EOS in der BAL als nicht gestresste sensibilisierte Tiere (Leukos _{Asthma} = 314 ± 70 , Leukos _{Asthma+Stress} = 208 ± 60 , EOS _{Asthma} = 223 ± 65 , EOS_{Asthma+Stress} = 109 ± 49). Beim Balb/c-Stamm hingegen führte Stressexposition zu einer signifikanten Zunahme der Leukozyten und EOS in der BAL (Leukos _{Asthma} = 176 ± 23 , Leukos _{Asthma+Stress} 319 ± 42 , EOS _{Asthma} = 99 ± 16 , EOS _{Asthma+Stress} = 173 ± 32).

Abnahme der Gesamtzellzahl durch den NK1-RA beim Balb/c-Stamm

Beim C57BL/6-Stamm hatte die Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten vor und nach Stressexposition keinen signifikanten Einfluss auf die Gesamtzellzahl noch die einzelner

Zellgruppen in der BAL im Vergleich zur Asthma+Stress-Gruppe (Leuko $_{A+S} = 208 \pm 60$, Leuko $_{A+S+NK1} = 162 \pm 31$). Beim Balb/c-Stamm hingegen hatten gestresste und sensibilisierte Tiere mit NK1-RA deutlich weniger Leukozyten und EOS in der BAL als gestresste und sensibilisierte Tiere ohne NK1-RA (Leuko $_{A+S} = 319 \pm 42$, Leuko $_{A+S+NK1} = 195 \pm 43$).



Abb. 11: Gesamtzellverteilung in der BAL beim Balb/c- und C57BL/6-Stamms.

Gesamtzahl aller gezählten Zellen (Leukozyten = Leuko.). Zelldifferenzierung: Lymphozyten (= Lympho.), eosinophile Granulozyten (= Eos.), neutrophile Granulozyten (= Neutro.), Makrophagen/ Monozyten (= Makro.). Repräsentative Ausschnitte der Zytospins jeder Gruppe des C57BL/6-Stamms sind rechts in 100facher Vergrößerung mit einem vergrößerten Ausschnitt des jeweils vorherrschenden Zelltyps abgebildet.

Behandlungsgruppen: Kontroll-Gruppe (n $_{Balb/c} = 6$, n $_{C57BL/6} = 7$), Stress-Gruppe (n $_{Balb/c} = 8$, n $_{C57BL/6} = 8$), Asthma-Gruppe (n $_{Balb/c} = 10$, n $_{C57BL/6} = 6$), Asthma+Stress (= A+S)-Gruppe (n $_{Balb/c} = 12$, n $_{C57BL/6} = 7$), Asthma+Stress+NK1-Rezeptorantagonist (= A+S+NK1)-Gruppe (n $_{Balb/c} = 11$, n $_{C57BL/6} = 6$).



Abb. 12: Zellverteilung in der BAL nach Zellart, Behandlungsgruppe und Stamm.

3.2.2 Die Auswirkung von Allergenprovokation und Stress auf die Zytokinkonzentration in der BAL

Die Konzentration der im Rahmen des Krankheitsgeschehens von Asthma bronchiale wichtigen Zytokine IL-4, IL-5, IFN γ und TNF α wurden in der bronchoalveolären Lavage der Mäuse des Balb/c- und des C57BL/6-Stamms mittels ELISA bestimmt. Dazu einige Anmerkungen:

Die IL-4 Konzentrationen in der BALs aller Tiere aller Gruppen beider Stämme waren unter dem Detektionslimit des verwendeten ELISAs. Auch die TNF α - und INF γ - Konzentration in der BAL aller Gruppen des Balb/c-Stamms waren unter dem Detektionslimit von 18 pg/ml bzw. 22 pg/ml.

Zunahme der IL-5-Konzentration in der BAL durch Allergenprovokation

Beim Balb/c-Stamm waren die Werte der IL-5-Konzentration in der BAL der Kontroll- und Stress-Gruppe unter dem Detektionslimit von 22 pg/ml. Allergenprovokation führte bei beiden Stämmen zu einer hochsignifikanten Zunahme der IL-5 Konzentration in der BAL (Balb/c _{Asthma} = 173 ± 69 pg/ml; C57BL/6 _{Kontrolle} = 89 ± 15 pg/ml; C57BL/6 _{Asthma} = 452 ± 96 pg/ml). Es fand sich signifikant mehr IL-5 in den BALs der sensibilisierten Tiere des C57BL/6-Stamms als in denen des Balb/c-Stamms (Abb. 13).

Abnahme der IL-5-Konzentration in der BAL durch Stress beim C57BL/6-Stamm

Stressexposition nicht sensibilisierter und sensibilisierter Tiere des C57BL/6-Stamms führte zu einer signifikanten Abnahme der IL-5-Konzentration in der BAL im Vergleich zur Kontrollbzw. Asthma-Gruppe (C57BL/6_{Stress} = 359 ± 5 pg/ml; C57BL/6_{Asthma+Stress} = 152 ± 37 pg/ml). Beim Balb/c-Stamm hatte Stressexposition sensibilisierter Tiere ohne oder mit Administration des NK1-RA keinen Einfluss auf die IL-5-Konzentrationen in der BAL im Vergleich zur Asthma-Gruppe.

Beim C57BL/6-Stamm verhinderte die Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten die unter Stressexposition beobachtete Abnahme der IL-5 Konzentration in der BAL und führte zu einer deutlichen (p < 0.09) Zunahme der IL-5 Konzentration in der BAL auf 336 ± 75 pg/ml.



Abb. 13 a,b und c: IL-5-Konzentration in der BAL des Balb/c- und C57BL/6-Stamms.

Vergleich der beiden Stämme in Abb. 13a. Punkte markieren in Abb. 13b für den Balb/c bzw. in Abb. 13c für den C57BL/6-Stamm die mittels ELISA in der BAL eines einzelnen Tieres vorgefundene IL-5-Konzentration, Querstriche markieren den Mittelwert der in jeder Gruppen gefunden IL-5-Konzentrationen. Die Werte in der Kontroll- und Stress-Gruppe des Balb/c-Stamms waren unter dem Detektionslimit (° = 22 pg/ml).

Behandlungsgruppen: Kontroll-Gruppe: unbehandelte Tiere (n $_{C57BL/6} = 5$); Stress-Gruppe: Sensibilisierung und zweimaliger challenge mit sterilem PBS und 24stündige Stressexposition mittels Maulwurfsvertreibers (n $_{C57BL/6} = 7$); Asthma-Gruppe: Sensibilisierung mit OVA VI und zweimaliger challenge mit OVA V (n $_{Balb/c} = 7$, n $_{C57BL/6} = 7$); Asthma+Stress (=A+S)-Gruppe: Sensibilisierung wie Asthma-Gruppe, vor und nach der 24stündige Stressexposition challenge (n $_{Balb/c} = 7$, n $_{C57BL/6} = 6$); Asthma+Stress+NK1-Rezeptorantagonist (=A+S+NK1)-Gruppe: wie A+S-Gruppe, vor und nach jedem challenge Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten (n $_{Balb/c} = 11$, n $_{C57BL/6} = 6$).

Keine Veränderung der IFNy-Konzentration in der BAL durch Allergenprovokation

In allen Gruppen des Balb/c-Stamms wurden keine Werte über dem Detektionslimit von 40 pg/ml gefunden.

Beim C57BL/6-Stamm führte Allergenprovokation ohne oder mit Stressexposition zu keiner Veränderung der IFN γ -Konzentration in der BAL im Vergleich zur Kontrollgruppe (C57BL/6 _{Kontrolle} 136 ± 19 pg/ml; C57BL/6 _{Asthma} 174 ± 28 pg/ml; C57BL/6 _{Asthma+Stress} 149 ± 29pg/ml).

Zunahme der IFNy-Konzentration bei nicht sensibilisierten Tieren durch Stress

Stressexposition nicht sensibilisierter Tiere des C57BL/6-Stamms bewirkte eine signifikante Zunahme der INF γ -Konzentration in der BAL (C57BL/6 _{Stress} 257 ± 42 pg/ml). Interessanterweise wiesen die Tiere der Asthma+Stress+NK1-RA-Gruppe mit 302 ± 44 pg/ml IFN γ die höchste INF γ -Konzentration aller Gruppen auf (s. Abb. 14).



Abb. 14: IFNy-Konzentration in der bronchoalveolären Lavage des C57BL/6 Stamms.

Punkte markieren die mittels ELISA in der BAL eines einzelnen Tieres vorgefundene IFN γ -Konzentration, Querstriche markieren den Mittelwert der in jeder Gruppe gefunden IFN γ -Konzentration.

Behandlungsgruppen: Kontroll-Gruppe (n = 8): unbehandelte Tiere; Stress-Gruppe (n = 8): Sensibilisierung und zweimaliger challenge mit sterilem PBS und 24stündige Stressexposition; Asthma-Gruppe (n = 7): Sensibilisierung mit OVA VI und zweimaliger challenge mit OVA V; Asthma+Stress (= A+S)-Gruppe (n = 7): Sensibilisierung wie Asthma-Gruppe, vor und nach der 24stündige Stressexposition challenge; Asthma+Stress+NK1-Rezeptorantagonist-(= A+S+NK1) Gruppe (n = 6): Behandlung wie bei der A+S-Gruppe, vor und nach jedem challenge Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten.

Geringe Konzentration an TNFa in der BAL aller Gruppen

In allen Gruppen des Balb/c-Stamms wurden keine Werte über dem Detektionslimit von 22 pg/ml gefunden.

Beim C57BL/6-Stamm fanden sich sehr niedrige TNF α -Konzentration bei allen Gruppen (s. Abb. 15) mit keinen signifikanten Unterschieden zwischen den einzelnen Gruppen (C57BL/6 _{Kontrolle} = 36 ± 6 pg/ml; C57BL/6 _{Stress+} = 20 ± 1 pg/ml; C57BL/6 _{Asthma} = 41 ± 13 pg/ml; C57BL/6 _{Asthma+Stress} = 32 ± 12 pg/ml; C57BL/6 _{Asthma+Stress+NK1} = 35 pg/ml). Interessanterweise wurde nur bei einem Tier der Asthma+Stress+NK1-Gruppe eine TNF α -Konzentration in der BAL über dem Detektionslimit gefunden.



Abb. 15: **TNF** α -**Konzentration in der bronchoalveolären Lavage des C57BL/6-Stamms.** Punkte markieren die mittels ELISA in der BAL eines einzelnen Tieres vorgefundene TNF α -Konzentration, Querstriche markieren den Mittelwert der in jeder Gruppe gefunden TNF α -Konzentration.

Behandlungsgruppen: Kontroll-Gruppe (n = 4): unbehandelte Tiere; Stress-Gruppe (n = 2): Sensibilisierung und zweimaliger challenge mit sterilem PBS und 24stündige Stressexposition; Asthma-Gruppe (n = 5): Sensibilisierung mit OVA VI und zweimaliger challenge mit OVA V; Asthma+Stress (= A+S)-Gruppe (n = 5): Sensibilisierung wie Asthma-Gruppe, vor und nach der 24stündige Stressexposition challenge; Asthma+Stress+NK1-Rezeptorantagonist- (= A+S+NK1) Gruppe (n = 1): Behandlung wie bei der A+S-Gruppe, vor und nach jedem challenge Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten.

3.2.3 Die Korrelation zwischen der IL-5-Konzentration und der Anzahl an EOS in der BAL

Beim Balb/c-Stamm korrelierte die in der BAL bestimmten IL-5 Konzentration nicht mit der in der BAL gefunden Zahl an eosinophilen Granulozyten (s. Abb. 16). Beim C57BL/6-Stamm

hingegen wurde eine hohe Korrelation zwischen diesen gefunden (Korrelationskoeffizient = 0,88, $r_s = 0,7$, p < 0,01).



Abb. 16: Korrelation zwischen der IL-5-Konzentration und der Anzahl an EOS in der BAL beim Balb/c- und C57BL/6-Stamm.

Beim Balb/c-Stamm wurde keine Korrelation, beim C57BL/6-Stamm wurde eine Korrelation festgestellt (Korrelationskoeffizient = 0,88, $r_s = 0,7$, p < 0,01).

Behandlungsgruppen: Kontroll-Gruppe: unbehandelte Tiere ($n_{C57BL/6} = 4$); Stress-Gruppe: Sensibilisierung und zweimaliger challenge mit sterilem PBS und 24stündige Stressexposition mittels Maulwurfsvertreibers ($n_{C57BL/6} = 7$); Asthma-Gruppe: Sensibilisierung mit OVA VI und zweimaliger challenge mit OVA V ($n_{Balb/c} = 7$, $n_{C57BL/6} = 6$); Asthma+Stress (=A+S)-Gruppe: Sensibilisierung wie Asthma-Gruppe, vor und nach der 24stündige Stressexposition challenge ($n_{Balb/c} = 6$, $n_{C57BL/6} = 5$); Asthma+Stress+NK1-Rezeptorantagonist (=A+S+NK1)-Gruppe: wie A+S-Gruppe, vor und nach jedem challenge Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten ($n_{Balb/c} = 10$, $n_{C57BL/6} = 6$).

3.2.4 Die Auswirkung von Allergenprovokation und Stress auf das Bronchialepithel

Zunahme der Dicke des Bronchialepithels durch Allergenprovokation

Durch Allergenprovokation kam es beim C57BL/6-Stamm zu einer hochsignifikanten Zunahme des Bronchialepithels von 13,6 µm auf 24,38 µm. Die Dicke des Bronchialepithels der Kontrolltiere des Balb/c-Stamms wurde nicht bestimmt. Jedoch hatten die Tiere der Asthma-Gruppe des Balb/c-Stamms mit 34,48 µm ein signifikant dickeres Bronchialepithel im Vergleich zur Asthma-Gruppe des C57BL/6-Stamms (s. Abb. 17).

Morphologische Veränderungen des Bronchialepithels durch Allergenprovokation

Im Rahmen der subakuten Entzündungsreaktion der Atemwege bei allergischem Asthma bronchiale werden charakteristische Veränderungen des Bronchialepithels beobachtet. Typischerweise kommt es zu einem Ödem des Bronchialepithels begleitet von einer Infiltration von EOS, neutrophilen Granulozyten und Lymphozyten. Auch in dem hier vorgestellten Modell der allergischen Atemwegsinflammation kam es zu einer deutlichen Infiltration der Bronchien mit eosinophile Granulozyten bei allergenprovozierten Tieren beider Stämme.

Wirkung der Stressexposition auf die Bronchialepitheldicke sensibilisierter Tiere Interessanterweise hatte die Stressexposition bei den Stämmen gegensätzliche Wirkungen. Beim Balb/c-Stamm kam es durch Stress zu einer signifikanten Abnahme des Bronchialepithels im Vergleich zur nicht gestressten Tieren (Balb/c _{Asthma} = 34,48 µm; Balb/c _{Asthma+Stress} = 28,95 µm) während es beim C57BL/6-Stamm zu einer hochsignifikanten Zunahme des Bronchialepithels durch Stress kam (C57BL/6 _{Asthma} = 24,38 µm; C57BL/6 _{Asthma+Stress} = 31,1 µm).

Bei beiden Stämmen führte die Administration des NK1-Rezeptorantagonisten vor und nach Allergenprovokation zu einer signifikanten Abnahme im Vergleich zu den allergensensibilisierten und gestressten Tieren des jeweiligen Stamms (Balb/c _{Asthma+Stress+NK1} = 21,87 μ m; Balb/c _{Asthma+Stress} = 20,19 μ m).



Abb.17: Dicke des Bronchialepithels beim Balb/c- und C57BL/6-Stamm.

Vergleich der beiden Stämme in Abb. 16a, Darstellung der Bronchialepitheldicke des Balb/c-Stamms in Abb. 16b bzw. des C57BL/6-Stamms in Abb. 16c.

Ausgewertet wurden 5 Messungen (μ m) in je 2 Bronchien pro Maus, gemessen von der Basallamina bis zum entsprechenden höchsten Punkt des Epithels. Die Dicke des Bronchialepithels in der Kontrollgruppe des C57BL/6-Stamms betrug 13,6 μ m (nicht gezeigt). Behandlungsgruppen: Asthma-Gruppe (n _{Balb/c} = 6, n_{C57BL/6} = 6): Sensibilisierung mit OVA VI und challenge (OVA V Aerosol an Tag 26 und 27); Asthma+Stress (=A+S)-Gruppe (n _{Balb/c} = 6, n_{C57BL/6} = 7): Behandlung wie bei Asthma-Gruppe und 24stündige Stressexposition mittels Maulwurfsvertreibers zwischen den zwei challenge; Asthma+Stress+NK1 (A+S+NK1)-Gruppe (n _{Balb/c} = 3, n_{C57BL/6} = 6): Behandlung wie bei Asthma-Stress-Gruppe, zusätzlich vor und nach jedem challenge Injektion des NK1-Rezeptorantagonisten.

3.2.5 Der Vergleich des Balb/c- und C57BL/6-Stamms im AD-Stress und Asthma-Stress Modell

Die Krankheitsaktivität von AD wurde durch das Ausmaß der epidermalen Schädigung, der Mastzelldegranulation und der Stärke des Eosinophileninfiltrats im AD-Stress Modell bestimmt und zwischen dem Balb/c- und C57BL/6-Stamm verglichen. Im Asthma-Stress Modell wurde bei beiden Stämmen für das Ausmaß der allergischen Atemwegsinflammation u. a. die Anzahl an Leukozyten in der BAL, die IL-5-Konzentration in der BAL und die Dicke des Bronchialepithels gemessen. Gesucht wurde nach Parallelen zwischen diesen beiden Erkrankungen in der Art der Entzündung und des vorherrschenden Zelltyps bei Allergenprovokation der Tiere, nach Veränderungen dieser Parameter der Krankheitsaktivität unter Stress sowie der Rolle von Substanz P bei den unter Stress beobachteten Veränderungen (s. Tab. 3).

Tab. 3: Vergleich von ausgesuchten Parametern der Krankheitsaktivität im AD-Stress und Asthma-Stress Modell.

Abkürzungen: " \uparrow " = Zunahme, " \uparrow \uparrow " = signifikante Zunahme, " \downarrow " = Abnahme, " \downarrow \downarrow " = signifikante Abnahme, "=" = kein Unterschied, "-" = nicht bestimmt.

	Epidermis-	Mastzell-	EOS in AD-	Leukozyten	IL-5-Konz.	Bronchial-
	dicke	degranulation	Läsionen	in der BAL	i. d. BAL	epitheldicke
Balb/c	$\uparrow \uparrow$	↑↑	↑	$\uparrow \uparrow$	↑	-
C57BL/6	$\uparrow\uparrow$	↑	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow \uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow \uparrow$

A. Sensibilisierte versus nicht sensibilisierte Tiere

B. Sensibilisierte gestresste Tiere versus sensibilisierte Tiere ohne Stressexposition

	Epidermis-	Mastzell-	EOS in AD-	Leukozyten	IL-5-Konz.	Bronchial-
	dicke	degranulation	Läsionen	i. d. BAL	i. d. BAL	epitheldicke
Balb/c	1	$\uparrow\uparrow$	1	$\uparrow\uparrow$	=	$\downarrow\downarrow$
C57BL/6	1	↑	$\uparrow \uparrow$	\downarrow	$\downarrow\downarrow$	$\uparrow \uparrow$

C. Sensibilisierte gestresste Tiere mit NK1-RA versus sensibilisierte Tiere ohne NK1-RA

	Epidermis-	Mastzell-	EOS in AD-	Leukozyten	IL-5-Konz.	Bronchial-
	dicke	degranulation	Läsionen	i. d. BAL	i. d. BAL	epitheldicke
Balb/c	\downarrow	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	\downarrow	=	$\downarrow\downarrow$
C57BL/6	\downarrow	$\downarrow\downarrow$	$\downarrow\downarrow$	=	=	$\downarrow\downarrow$

4 Diskussion

Umweltantigene und eine genetische Prädisposition beeinflussen die Entwicklung einer Immunantwort, die allergische Reaktionen begünstigt [1]. Vor diesem Hintergrund wird Stress als ein entscheidender Faktor für die Aggravation von atopischen Erkrankungen diskutiert. In dieser Arbeit wurde im Mausmodell der Einfluss von Stress auf die Krankheitsaktivität von atopischer Dermatitis und allergischem Asthma bronchiale in Abhängigkeit der genetischen Prädisposition untersucht. Zu diesem Zweck wurden zwei in der Forschung häufig verwendete Mausstämme verglichen, der Balb/c-Stamm – ein als stressreaktiv geltender und zu einem Th2-dominierten Zytokinprofil neigender Stamm – und der C57BL/6-Stamm – ein eher stressresistenter und zu einem Th1-Zytokinprofil neigender Stamm. Als Krankheitsmodelle dienten ein sog. atopisches Dermatitis hervorgerufen wird, sowie ein Asthma-Stress Modell, das ein Modell für die bei allergischem Asthma bronchiale beobachtete Atemwegsinflammation darstellt. In beiden Modellen wurde der Stress duch eine 24 stündige Lärm-Exposition erzeugt.

4.1 Der Vergleich von nicht sensibilisierten und sensibilisierten Tieren im AD-Stress und Asthma-Stress Modell

Um eine Sensibilisierung gegenüber einem Allergen im Mausmodell zu induzieren, stellt die intraperitoneale Injektion von Ovalbumin mit dem Adjuvans Al(OH)₃ zur Verstärkung der Immunantwort eine anerkannte Methode dar. Die Sensibilisierung und Provokation der Tiere führte bei beiden Stämmen zu einer Einwanderung von eosinophilen Granulozyten (EOS) in AD-Läsionen bzw. in Mukosa und Interstitium in der Lunge mit dem Resultat einer Zunahme der Gesamtzellzahl in der bronchoalveolären Lavage (BAL). Gleichzeitig kam es bei sensibilisierten Tieren zu einer Zunahme der Mastzelldegranulation in AD-Läsionen im Vergleich zu nicht sensibilisierten Tieren. Aus Mastzellen freigesetzte Leukotriene und Histamin verursachen u. a. eine Erhöhung der perivaskulären Permeabilität, eine Kontraktion von glatten Muskelzellen, verstärken die Mukusproduktion und vermitteln den für AD typischen Juckreiz [74]. Im Mausmodell sind die Bestimmung der Mastzelldegranulation sowie des Eosinophileninfiltrats in AD-Läsionen und in der BAL etablierte Parameter zur Beurteilung der Krankheitsaktivität von AD sowie der allergischen Atemwegsinflammation von A. bronchiale [18, 55, 75]. Im AD-Stress Modell zeigte der Balb/c-Stamm eine signifikant höhere Neigung zur Degranulation von Mastzellen als der C57BL/6-Stamm, sogar das Ausgangsniveau an degranulierten Mastzellen war bei der Kontroll-Gruppe des Balb/c-Stamms deutlich höher als in der des C57BL/6-Stamms. Es ist bekannt, dass C57BL/6-Mäuse einen Defekt im *mast cell protease gene* 7 haben, was allerdings die Fähigkeit zur Degranulation nicht beeinflussen sollte [76]. In AD-Läsionen von sensibilisierten Mäusen des C57BL/6-Stamm fanden sich weniger degranulierte Mastzellen, jedoch ein deutlich stärkeres Eosinophileninfiltrat als in Läsionen von sensibilisierten Mäusen des Balb/c-Stamm fanden sich weniger degranulierte Mastzellen, jedoch ein deutlich stärkeres Eosinophileninfiltrat als in Läsionen von sensibilisierten Mäusen des Balb/c-Stamms. Auch in der BAL sensibilisierter C57BL/6-Mäuse fanden sich deutlich mehr eosinophile Granulozyten als in der BAL sensibilisierter Balb/c-Mäuse, eine Beobachtung, die auch Takeda et al. machte [77]. Es ist anzunehmen, dass in der Entwicklung von AD-Läsionen und von allergischer Atemwegsinflammation beim Balb/c-Stamm eher die Aktivierung und Förderung der Einwanderung von EOS in betroffenes Gewebe zur Krankheitsentstehung von AD und A bronchiale beiträgt.

TNFα wird nach Aktivierung der Mastzelle in großen Mengen ausgeschüttet, vermittelt die Aktivierung von Endothelzellen und Makrophagen und stimuliert die Bildung von Zytokinen in vielen Zelltypen. Interessanterweise war beim Balb/c-Stamm die TNFα-Konzentration in der BAL unter dem Detektionslimit, während beim C57BL/6-Stamm zwar keine signifikanten Unterschiede in der TNFα-Konzentration in der BAL zwischen den einzelnen Gruppen zu finden war, sie jedoch in allen Gruppen über dem Detektionslimit lag. Diese Beobachtung aus dem Asthma+Stress Modell kann nicht ohne weiteres auf das AD+Stress Modell übertragen werden. Es bleibt zu untersuchen, ob die bei der Balb/c-Maus im Vergleich zur C57BL/6-Maus stärkere Mastzelldegranulation auch von einer höheren TNFα-Expression in AD-Läsionen begleitet wird.

Die in der Literatur beschriebene Neigung des C57BL/6-Stamms zur Ausbildung eines Immunprofils vom Typ Th1 und des Balb/c-Stamms vom Typ Th2 beruht u. a. auf folgenden Beobachtungen: Infektion mit Leishmania major, einem intrazellulären Parasit, stimuliert C57BL/6-Lymphozyten zur Produktion von IFNγ mit folgender Aktivierung von Makrophagen, das zu einer Eliminierung des Erregers führt. Beim Balb/c-Stamm hingegen kommt es durch vermehrte IL-4-Produktion zur Hemmung von Makrophagen und einer persistierenden Infektion ohne Eliminierung des Erregers [64]. Zudem zeigen Con A stimulierte Milzzellen von C57BL/6-Mäusen eine Th1-typische Immunantwort mit hoher IFNγ und niedriger IL-4 Produktion, während Balb/c-Milzzellen nach Stimulierung weniger IFNγ und vermehrt IL-4 produzieren [63]. In Einklang mit diesen Beobachtungen führte im Asthma-Stress Modell die Allergenprovokation zu einer signifikanten Zunahme der IFNγ-Konzentration in der BAL beim C57BL/6-Stamm, während bei allen Gruppen des Balb/c-Stamms die IFNγ-Konzentration in der BAL unter dem Detektionslimit lag.

In einem Mausmodell für A. bronchiale mit identischen Protokoll wurde gezeigt, dass C57BL/6-Mäuse nach Sensibilisierung mit OVA um 75% niedrigere Anti-OVA IgE1- und Anti-OVA IgG1-Titer im Serum zeigen als sensibilisierte Balb/c-Mäuse, während der Anti-OVA IgG2 Titer der C57BL/6-Maus doppelt so hoch war wie der der Balb/c-Maus [18]. Da die IgE- und IgG1-Produktion durch IL-4 und die IgG2-Produktion durch IFNγ geregelt wird, bestätigt auch diese Beobachtung die Annahme der präferierten Ausbildung eines Th1- bzw. Th2-dominierten Zytokinprofils der C57BL/6- bzw. Balb/c-Maus.

Im Asthma-Stress Modell wurden Anti-OVA Titer nicht bestimmt. Es ist interessant, dass sich in den AD-Läsionen und der BAL der sensibilisierten C57BL/6-Mäuse eine signifikant höhere Zahl an EOS fand als in den Läsionen und der BAL der sensibilisierten Balb/c-Mäuse, da dies von Th2-Zytokinen geförderte Prozesse sind. Die Th2-Zytokine IL-4 und IL-5 sind die dominierenden Zytokine im akuten Stadium von AD und A. bronchiale. IL-5 vermittelt die terminale Differenzierung und Proliferation von EOS, verlängert deren Überlebenszeit durch verspätete Apoptoseinduktion und stimuliert EOS zur Degranulation [27]. IL-4 fördert den Klassenwechsel der B-Zellen zu antigenspezifischen IgE-Produktion fähigen B-Zelle und fördert die Einwanderung von EOS ins Gewebe u. a. über Stimulierung der VCAM-1 Expression auf Endothelzellen [27]. In einer Studie von Whitehead et al. mit ähnlichem Sensibilisierungsprotokoll wurden wie in dieser Arbeit eine höhere Zahl an EOS in der BAL sensibilisierter C57BL/6-Mäuse beobachtet als in der BAL sensibilisierter Balb/c-Mäuse [78]. Vor dem Hintergrund der oben postulierten Präferenz der Ausbildung eines Th1-dominierten Zytokinprofils seitens des C57BL/6-Stamms sind diese Beobachtungen überraschend und kontrastieren mit den Ergebnissen aus der vorher erwähnten Studie von Herz et al., die den C57BL/6-Stamm aufgrund niedrigerer Anti-OVA IgE1- und Anti-OVA IgG1-Titer im Serum als sog. low-responder gegenüber Sensibilisierung beschreibt und signifikant weniger Leukozyten bzw. EOS in der BAL des C57BL/6-Stamms als in der BAL der Balb/c-Stamms findet [18].

Bei A. bronchiale wird ein Th2-dominiertes Zytokinprofil in der BAL beobachtet [79]. Auch in dem hier vorgestellten Modell der allergischen Atemwegsinflammation führte die

Allergenprovokation bei beiden Stämmen zu einer hochsignifikanten Zunahme der IL-5 Konzentration in der BAL. Nicht sensibilisierte und sensibilisierte C57BL/6-Mäuse hatten signifikant höhere IL-5 Spiegel in der BAL als die des Balb/c-Stamms, was von einer deutlich höheren Zahl an EOS in der BAL begleitet war. Whitehead et al. [78] beobachtete höhere IL-4- und IL-5-Spiegel in der BAL von Balb/c-Mäusen 24 Stunden nach *challenge*, 72 Stunden nach *challenge* jedoch fanden sich auch dort deutlich höhere IL-4- und IL-5-Spiegel in der BAL des C57BL/6-Stamms als in der des Balb/c-Stamms, wobei keine Korrelation zwischen dem IL-4- oder dem IL-5-Spiegel und der Anzahl an EOS in der BAL gefunden wurde. Im Gegensatz zu den von Whitehead und den hier vorgestellten Ergebnissen beobachtete Herz et al. signifikant höhere IL-4 und IL-5 Levels in der BAL sensibilisierter Balb/c-Mäuse als in der sensibilisierter C57BL/6-Mäuse 48 Stunden nach dem ersten *challenge* (was dem Zeitpunkt der Messung im Asthma-Stress Modell entspricht).

Im AD-Stress Modell wurde ein stärkeres Eosinophileninfiltrat in AD-Läsionen bei sensibilisierten C57BL/6-Mäusen beobachtet als bei sensibilisierten Balb/c-Mäusen, und auch im Asthma-Stress Modell wies der C57BL/6-Stamm in der BAL von sensibilisierten Tieren eine deutlichere Th2-Dominanz (gemessen durch IL-5 und EOS in der BAL) auf als in der BAL von sensibilisierten Balb/c-Mäusen. Basierend auf diesen Ergebnissen und der Studie von Whitehead et al. [78] scheint die im Rahmen von Infektion beobachtete präferierte Ausbildung eines Th1bzw. Th2-Immunprofils des C57BL/6 bzw. Balb/c-Stamms bei der Neigung zur Ausbildung von AD-Läsionen und allergischer Atemwegsinflammation beim Mausmodell keine tragende Rolle zu spielen bzw. weitere Ursachen erheblich Einfluss auf die Ausbildung eines während des allergischen Geschehen dominierenden Zytokinprofils zu nehmen, unabhängig der genetischen Prädisposition des verwendeten Mausstamms. Um diese Aussagen zu verifizieren, müssten in einem zukünftigen Versuch die Zytokinspiegel in der Haut beider Mausstämme während der Ausbildung von AD-Läsionen bestimmt werden, um etwaige Parallelen mit den hier gefundenen Zytokinspiegeln in der BAL zu finden. Aus der hohen Variabilität der in den verschiedenen Versuchen gefundenen Auswirkungen der Sensibilisierung auf die einzelnen Parameter der Krankheitsaktivität von A. bronchiale bei beiden Mausstämme lässt sich schließen, dass diese erheblich vom Zeitpunkt der Messung, dem verwendeten Protokoll, dem verwendeten Mausstamm, dem Alter und Geschlecht der Tiere und weiteren im Moment noch nicht geklärten Variablen beeinflusst werden, was die Ergebnisbeurteilung und den Vergleich der einzelnen Studien untereinander einschränkt.

4.2 Die Auswirkungen von Stress auf AD und Asthma bronchiale

Die Ergebnisse aus dem AD-Stress Modell belegen, dass Stress, unabhängig vom verwendeten Mausstamm, die einzelnen Parameter der Krankheitsaktivität von AD deutlich steigert. Im Asthma-Stress Modell führte Stress beim Balb/c-Stamm zu einer signifikanten Zunahme der Leukozytenzahl in der BAL, hatte jedoch keinen Einfluss auf die IL-5 Konzentration in der BAL und führte sogar zu einer Abnahme der Bronchialepitheldicke. Interessanterweise verursachte Stressexposition beim C57BL/6-Stamm hingegen eine (nicht signifikante) Abnahme der Leukozytenzahl und IL-5 Konzentration in der BAL und eine signifikante Zunahme der Bronchialepitheldicke. Die Ergebnisse aus dem Asthma-Stress Modell sind somit zwar weniger eindeutig, jedoch finden sich auch dort zahlreiche Beispiele für die Aggravation von A. bronchiale durch Stress.

Obwohl Stress direkt zu einer vagal vermittelten Bronchokonstriktion führen kann [80] und in einem Mausmodell Ursache für die Ausbildung von AD-Läsionen bei NC/Nga-Mäusen in keimfreier Umgebung ist, die in einer solchen Umgebung normalerweise keine Läsionen ausbilden [81], wird Stress meist nicht als ursächlicher Auslöser einer AD oder eines A. bronchiales angesehen. Seine Bedeutung im Rahmen allergischer Erkrankungen wird eher in der Verstärkung potentiell schädlicher Immunreaktionen auf Allergene diskutiert. So belegen zahlreiche humane Studien, dass Stress zu einer Aggravation atopischer Erkrankungen wie AD und A. bronchiale führt [16, 32-34, 80] und psychologisches Training und Entspannungsverfahren zur einer deutlichen Linderung der Symptomatik führen können [35].

Im Mausmodell wurde eine genetische Prädisposition für die Reaktivität der HPA-Achse, einem der zentralen Vermittler der Stressreaktion, gegenüber Stress beobachtet. Durch Verhaltensbeobachtung und Messung der Immunreaktivität des CRH-Rezeptors und der mRNA-Expression im orbitalen frontalen Kortex vor und nach Anwendung unterschiedlichster Stressprotokolle wurde gezeigt, dass ausgeprägte Differenzen in der Stressreaktivität verschiedener Mausstämme zu beobachten sind. So gilt der Balb/c-Stamm als ein im Allgemeinen ängstlicher und stressreaktiver Stamm, der mitunter unter Stress Merkmale einer Depression ausbildet, während der C57BL/6-Stamm deutlich stressresistenter ist [66, 67, 82]. Im AD-Stress Modell führte die 24stündige Stressexposition mittels Maulwurfsvertreibers, eine etablierte Stressmethode in der Forschung [55, 70, 83], bei beiden Mausstämmen zu einer deutlichen Zunahme der Krankheitsaktivität. Die unterschiedliche Stressreaktivität des Balb/c- und C57BL/6-Stamms scheint daher in dem hier vorgestellten AD-Stress und Asthma-Stress Modell von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Der Einfluss eines Stressors auf das Immunsystem hängt unter anderem von der Dauer der Stressexposition ab. Akuter Stress verstärkt Immunantworten und resultiert in einer Nebennierenrindenhormon abhängigen Umverteilung von Immunzellen ins Knochenmark, Lymphknoten und Haut, während chronischer Stress die Umverteilung von Immunzellen aus dem Blut inhibiert [84]. Dies korreliert mit Beobachtungen aus verschiedenen Mausmodellen für A. bronchiale, in denen gezeigt wurde, dass akute Stressbelastung zu einer Abnahme der Leukozyten und Eosinophilenzahl in der BAL führt, während chronische Stressbelastung zu einer Zunahme der Leukozytenzahl in der BAL führte [85-87]. In Tiermodellen wird als akuter Stressor meist eine einmalig mehrere Minuten dauernde Stressexposition angesehen. Zur Untersuchung der Wirkungen chronischer Stressoren werden meist Protokolle verwendet, in denen die Tiere mehrmals über einige Tage hinweg Minuten bis Stunden dauernden Stressoren ausgesetzt werden. Es ist zu beachten, dass in der vorliegenden Untersuchung die 24stündige Stressexposition mittels Maulwurfvertreibers weder ein akuter noch ein rein chronischer Stressor ist, sondern ein einmalig lang andauernder Stressor für die Tiere darstellt.

Stress ändert die Aktivität der HPA-Achse und des SNS, so dass diese Systeme auf einem anderen Niveau als im Zustand der Homöostase arbeiten. Die durch das Stresssystem ausgelösten immunologischen, metabolischen und neuronalen Verteidigungsmechanismen können ohne Kontrollmechanismen und ihre eventuelle Beendigung langfristige Schäden verursachen [88]. Dass chronischer Stress über Aktivierung der HPA-Achse mit resultierender vermehrter Ausschüttung von Glukokortikoiden zu einer Zunahme der Beschwerdesymptomatik von A. bronchiale und AD führt, ist ein in der Stressforschung häufig diskutiertes Paradox mit mehreren Erklärungsansätzen. Zum einen wird unter chronischem Stress eine Hyporesponsivität der HPA-Achse gegenüber Stimuli mit resultierender verringerter Ausschüttung von Glukokortikoiden beobachtet [37, 38]. Zum anderen wird angenommen, dass durch anhaltenden Stress die Expression von Glukokortikoidrezeptoren herunterreguliert wird, was zu einer Glukokortikoidresistenz beitragen kann [89]. Diese unter chronischem Stress beobachteten Veränderungen führen neben dem Verlust der immunsupprimierenden Effekte der Glukokortikoide zum Wegfall des negativen Feedbackmechanismus auf die hypothalamische und hypophysäre Sekretion von CRH und ACTH und anderen Hormonen wie Katecholaminen, die selbst proinflammatorische und immunpotenzierende Wirkungen entfalten können. Eine der Hauptwirkungen von CRH liegt in der Mastzellaktivierung mit resultierender Degranulation [50, 90]. Zudem wird unter chronischem Stress eine vermehrte Produktion von Th2-Zytokinen und darauf folgender Rekrutierung von EOS ins Gewebe beobacht, teilweise einhergehend mit einer verminderten Expression von Th1 Zytokinen [16, 91-93].

Stress aktiviert auch das sympathische Nervensystem. T- und B-Zellen (und eine Reihe weiterer Immunzellen) exprimieren β -Adrenorezeptoren. An diese binden Adrenalin und Noradrenalin, die an der Förderung der humoralen Immunantwort im Rahmen allergischer Erkrankungen durch Inhibierung der IL-5 Expression nach Allergenexposition, Inhibierung der Freisetzung von Histamin durch Mastzellen und an der Inhibierung der Rekrutierung und Aktivierung von EOS in den Luftwege erheblich beteiligt sind (nach Marshall [94]). Es wurde gezeigt, dass chronischer Stress zu einer Herunterregulierung der β-Adrenorezeptoren führt, belegt durch vermindertes Vorfinden von mRNA des β-Adrenorezeptors in Leukozyten von Asthmatikern mit erhöhtem Stress [95]. Die Auswirkungen der Aktivierung des SNS durch Stress auf Haut und Lunge sind nicht ausreichend erforscht. Vor allem in der Pathophysiologie von A. bronchiale spielt das SNS eine wichtige Rolle. Der Atemwegswiderstand wird erheblich vom SNS beeinflusst und als Ursache für deutliche Unterschiede in der Ausprägung dieses Parameters der Asthmaaktivität zwischen unterschiedlichen Mausstämmen diskutiert [78, 96]. Auch hier könnte eine mögliche unterschiedlich starke Aktivierung des SNS durch Stress Auswirkung auf die Ausprägung der Parameter der Asthmaaktivität haben und an einigen der zwischen dem Balb/cund C57BL/6-Stamm gefundenen Unterschiede im Rahmen des Asthma-Stress Modells beteiligt sein.

Im AD-Stress Modell führte Stress bei beiden Stämmen zu einer deutlichen Zunahme der Mastzelldegranulation und einer verstärkten Einwanderung von EOS in die Haut, während im Asthma-Stress Modell nur bei sensibilisierten Balb/c-Mäusen aber nicht bei sensibilisierten C57BL/6-Mäusen eine Zunahme der Gesamtzellzahl in der BAL unter Stress zu beobachten war. Parallel zu der Abnahme der Gesamtzellzahl in der BAL bei sensibilisierten und gestressten Tieren des C57BL/6-Stamms nahm auch die IL-5-Konzentration in der BAL ab. Okuyama et al. [86] beobachteten, dass beim C57BL/6- und Balb/c-Stamm an 7 Tagen wiederholte Stressexposition mittels *Restrainer* zu einer Zunahme der Gesamtzellzahl führte, während akuter Stress (zweimalige Stressexposition mittels *Restrainer*) keinen Effekt auf die Gesamtzellzahl in der BAL beim C57BL/6-Stamm hatte, jedoch beim Balb/c-Stamm zu einer signifikanten Abnahme der Gesamtzellzahl in der BAL führte. Auch Forsythe et al. [85] zeigte, dass beim

C57BL/6-Stamm an 7 Tagen wiederholte Stressexposition mittels *Restrainer* zu einer signifikanten Zunahme der Gesamtzellzahl in der BAL führt. Da in den Studien von Okuyama et al. und Forsythe et al. deutlich andere Stress- und Sensibilisierungsprotokolle verwendet wurden, sind diese Ergebnisse mit den hier vorgelegten nur eingeschränkt vergleichbar. Dies zeigt jedoch, dass vor allem in Mausmodellen für A. bronchiale die Dauer (akut versus chronisch) und Art des Stressors erheblich Einfluss auf die Ergebnisse nehmen.

Humane Studien und Beobachtungen aus Mausmodellen zeigen, dass chronischer Stress zu einer erhöhten Expression von IL-4 und IL-5 in der BAL führt [16, 70]. Interessanterweise konnte im Asthma-Stress Modell beim Balb/c-Stamm eine Zunahme der IL-5 Konzentration in der BAL sensibilisierter Tiere unter Stress beobachtet werden, während es beim C57BL/6-Stamm zu einer hochsignifikanten Abnahme des IL-5 Spiegels durch Stressexposition kam. Die IFNγ-Konzentration in der BAL des C57BL/6-Stamms änderte sich durch Stressexposition nicht, eine Beobachtung, die auch von Forsythe et al. gemacht wurde [85]. Bei allen Gruppen des Balb/c-Stamms war die IFNγ-Konzentration in der BAL unter dem Detektionslimit. Aus diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassen, dass im Asthma-Stress Modell Stress beim Balb/c-Stamm zu einer Förderung des Th2-Zytokinprofils führte, während beim C57BL/6-Stamm unter Stress eher eine verminderte Th2-Zytokin Expression in der BAL beobachtet wurde.

Okuyama et al. [86] hingegen beobachtete bei sensibilisierten und gestressten C57BL/6- und Balb/c-Mäusen eine deutliche Zunahme der IL-4 und IL-5 Konzentration in der BAL bei chronischer Stressexposition. Es ist jedoch zu beachten, dass in dieser Studie bei beiden Stämmen hohe interindividuelle Differenzen innerhalb der einzelnen Gruppen beobachtet wurden, so dass es zu keiner signifikanten Verschiebung des Immunprofils in Richtung Th2 unter Stress beim Zusammenfassen aller Tiere einer Gruppe kam. Die Verwendung verschiedener Stressoren, unterschiedlicher Stressprotokolle oder sogar methodische Fehler könnten möglicherweise Ursache sein für die in den Studien beobachteten divergierenden Auswirkungen von chronischem Stress auf die Zytokinkonzentration in der BAL. Ferner könnte die C57BL/6 Maus aufgrund einer genetischen Prädisposition und gemäß ihrer postulierten Präferenz einer Ausbildung eines Th1-Zytokinprofils auf Stress eher mit Förderung des Th1-Immunprofils reagieren, während die Balb/c-Maus durch Stress eher ein Th2-dominiertes Zytokinprofil ausbildet. Durch die in der vorliegenden Studie durchgeführten Zytokinbestimmungen in der BAL kann diese Frage nicht beantwortet werden. Bei weiteren Versuchen sollten auch die Schwankungen der einzelnen Zytokine im zeitlichen Verlauf berücksichtigt werden. Die Präferenz einer Ausbildung eines Th1- oder Th2-dominierten Zytokinprofils unter Stress in Abhängigkeit der genetischen Prädisposition ist ein zu empfehlender Ansatzpunkt für weitere Forschungsbemühungen mit eventuellen weit reichenden Konsequenzen für die Therapie von atopischen Erkrankungen.

Zeitpunkt der Stressexposition im AD-Stress Modell

Stress beeinflusst die Antigenpräsentation durch Antigen-präsentierende Zellen, was weit reichende Konsequenzen für die Etablierung einer Immunantwort gegen ein potentielles Antigen bei A. bronchiale und AD hat [41, 97]. Dendritische Zellen, die zu den antigenpräsentierenden Zellen gehören, haben eine Wächterfunktion im peripheren Gewebe und wandern nach Allergenkontakt in Lymphknoten zur Antigenpräsentation mit folgender T-Zell Aktivierung. Im Rahmen des AD-Stress Modells wurde untersucht, ob der Zeitpunkt der Stressexposition, vor oder nach Provokation, Einfluss auf die Ausprägung der Krankheitsparameter nimmt. Die epidermale Dicke und Mastzelldegranulation wurde durch den Zeitpunkt der Stressexposition nicht beeinflusst. Jedoch fanden sich hochsignifkant weniger EOS in den Läsionen der Mäuse, die nach Provokation gestresst wurden als in denen, die vor Provokation gestresst wurden. Die Einwanderung von EOS in Gewebe ist ein komplexer Prozess mit vielfältigen Regulationsmechanismen. die durch Stress weit reichend und auf verschiedenen Ebenen (Zytokinkonzentration, Rezeptorexpression, Rezeptorsensitivität) beeinflussen werden können, auch wenn Einzelheiten noch nicht erforscht sind. Ferner zeigt dies, dass neben dem Sensibilisierungsprotokoll der Zeitpunkt der Stressexposition erheblich Einfluss auf die Ergebnisse nimmt und beim Vergleich von Studien berücksichtigt werden muss.

4.3 Die Rolle von Substanz P im AD-Stress und Asthma-Stress Modell

Hier konnte gezeigt werden, dass neben den bei der Aktivierung der HPA-Achse und des SNS freigesetzten Neurotransmittern auch Substanz P bei der Beeinflussung der Krankheitsaktivität von AD und A. bronchiale durch Stress eine herausragende Rolle spielt. Seine Wirkung entfaltet SP über Bindung mit hoher Affinität an den Neurokinin 1 (NK1)-Rezeptor und mit niedriger Affinität an den NK2-Rezeptor [98, 99]. Administration des NK1-Rezeptorantagonisten bei gestressten Tieren führte im AD-Stress Modell bei beiden Stämmen zu einer signifikanten Abnahme der epidermalen Dicke, der Mastzelldegranulation und des Eosinophileninfiltrats in AD-Läsionen. Im Asthma-Stress Modell wurde bei beiden Stämmen eine Abnahme der Leukozytenzahl in der BAL bei Administration des NK1-Rezeptors beobachtet.

Der Begriff neurogene Entzündung beschreibt eine lokale Entzündungsreaktion, die durch ein rasch einsetzendes Erythem, Vasodilatation, gesteigerte Permeabilität der Gefäße mit Ödembildung sowie durch Zunahme der Schmerz- und Juckreizwahrnehmung [100] gekennzeichnet ist. Es ist bekannt, dass SP weit reichend an den Veränderungen im Rahmen der neurogenen Entzündung beteiligt ist, unter anderem ist aus Mastzellen freigesetztes Substanz P und Histamin für erhöhte Plasmaextravasation aus postkapillären Venolen verantwortlich [101]. In beiden Organen kommt es durch Entzündung im Rahmen von Erkrankungen und Stress zu nervalen Umbauprozessen. Dieses als neuronale Plastizität beschriebene Phänomen ist gekennzeichnet durch Stressabhängige Zunahme von SP-immunoreaktiven Nervenfasern in Haut und Lunge und erhöhter SP-Expression in AD-Läsionen im Mausmodell und im Bronchialepithel von Asthmatikern [55, 57, 102-104]. In Haut und Lunge finden sich Mastzellen in enger Nachbarschaft zu SP-immunoreaktiven Nervenfasern [55, 105-107]. Freisetzung von SP (und CRH) aus diesen führt zu einer Zunahme an degranulierten Mastzellen. Das in den Granulae der Mastzellen enthaltene Histamin stimuliert weitere Mastzellen zur Degranulation und gleichzeitig afferente Nervenfasern zur Freisetzung von SP, das zu weiterer Mastzelldegranulation führt [14, 15]. Es entsteht ein Teufelskreis, der entscheidend zur Beschwerdezunahme und Chronifizierung der Erkrankung beiträgt. Dabei wurde gezeigt, dass in der Haut Substanz P zu einer dosisabhängigen Ausschüttung von TNFα und Histamin führt [108] und die unter Stress beobachtete Degranulation der Mastzellen von SP-Nervenfasern abhängig ist [58]. Die Beobachtung im AD-Stress Modell, dass der NK1-Rezeptorantagonist die unter Stress beobachtete Zunahme der Mastzelldegranulation verhindert, lässt annehmen, dass Substanz P durch Förderung der neurogenen Entzündung bei der unter chronischen Stress beobachteten Zunahme der Krankheitsaktivität von AD weit reichend beteiligt ist.

Die unter Stress beobachtete Zunahme der Gesamtzellzahl bzw. von EOS in der BAL des Balb/c-Stamms und EOS in AD-Läsionen beider Stämme wurde hier wie auch in anderen Arbeiten durch einen NK1-RA verhindert bzw. bei NK1 Rezeptor *knock out* Mäusen nicht beobachtet [17, 109]. Die unter Stress beobachtete verstärkte Einwanderung von EOS in betroffene Haut ist von einer erhöhten Expression von VCAM-1 auf kutanen Blutgefäßen begleitet, einem der Adhäsionsmoleküle, das die Einwanderung von EOS ins Gewebe ermöglicht [17]. Zudem führt SP und einige Produkte der Mastzellgranulae in vitro zu einer erhöhten VCAM-1 und ICAM-1 Expression auf dermalen Epithelzellen [61, 110]. Es ist daher anzunehmen, dass im AD-Stress Modell Stress durch Stimulierung der SP-Freisetzung aus peripheren Nervenfasern und resultierender erhöhter VCAM-1 Expression auf kutanen

Blutgefäßen die Einwanderung von EOS in betroffenes Gewebe förderte. Somit ist Substanz P im Rahmen der unter Stress beobachteten Aggravation von AD nicht nur für die klassischen Kennzeichen der neurogenen Entzündung wie Rötung, Schwellung und Juckreiz verantwortlich, sondern trägt auch entscheidend zu der für Atopie und Allergie typischen Infiltration des Gewebes durch EOS u. a. Zellen bei.

Diese Beobachtung lässt sich nicht ohne weiteres auf das Asthma-Stress Modell übertragen. Einerseits wurde in einer Studie trotz erhöhter Eosinophilenzahl in der BAL keine erhöhte VCAM-1 Expression in der BAL gestresster Balb/c-Mäuse gefunden, jedoch eine deutlich höhere Eotaxin-Expression, die zu der erhöhten Anzahl an EOS in der BAL beitragen könnte [111]. Anderseits zeigte Baluk et al., dass in der Lunge der Ratte die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten und EOS an Blutgefäße der Mukosa durch SP gefördert wird und dieser Effekt durch den NK1-Rezeptor vermittelt wird [112]. Im Asthma-Stress Modell deuten die beim Balb/c-Stamm gefunden Ergebnisse darauf hin, dass SP eine wichtige Rolle bei der unter Stress beobachteten Aggravation von A. bronchiale spielt. Jedoch sind diese Zusammenhänge noch nicht aureichend erforscht und müssen in zukünfitgen Versuchen weiter beleuchtet werden.

Humane Studien und Beobachtungen aus Mausmodellen für A. bronchiale zeigen, dass chronischer Stress zu einer erhöhten Expression von IL-4 und IL-5 in der BAL führt und ein Zytokinprofil in Richtung Th2 verschiebt [16, 70]. Gleichzeitig ist bekannt, dass SP die Expression eines Th2-Zytokinprofils [113, 114] fördert, obwohl SP auch als Vermittler beider Zytokinprofile – des Th1- und Th2-Zytokinprofils – diskutiert wird [48-50, 52, 115]. So wurde gezeigt, dass SP in vitro zu einer verstärkten Expression von Th1- (IFNy) und Th2- (IL-4) Zytokinen durch Th1- und Th2-Zellen führt, und dabei die strikte Trennung beider Subpopulationen der T-Zelle hinsichtlich der Expression eines bestimmten Zytokinprofils abschwächt [51]. Andere Studien zeigen, dass SP die Ratio der IL-4/IFNy-Produktion durch periphere Monozyten von Atopikern zu Gunsten von IFNy verschiebt [116] bzw. gleichermaßen die Produktion von IL-4 und IFNy in diesen induziert [117]. Interessanterweise konnte beim Balb/c-Stamm eine Zunahme der IL-5 Konzentration in der BAL sensibilisierter Tiere unter Stress beobachtet werden, während es beim C57BL/6-Stamm zu einer hochsignifikanten Abnahme des IL-5 Spiegels durch Stressexposition kam. Im Gegensatz zur Beobachtung, dass Substanz P an der unter Stress beobachteten Zunahme an EOS in AD-Läsionen und BAL erheblich beteiligt ist und eventuell auch an der Zytokinverschiebung in Richtung Th2 [17], verhinderte im Asthma-Stress Modell die Administration des NK1-Rezeptorantagonist die unter Stress beobachteten Veränderungen im Zytokinprofil nicht. Daher scheint in diesem Asthma-Stress Modell Substanz P nicht Hauptvermittler der Verschiebung des Zytokinprofils in der BAL bei chronischem Stress zu sein, sondern müssen andere Stresshormone an diesen Veränderungen ursächlich beteiligt sein.

4.4 Einfluss von Stress auf das Bronchialepithel und die Epidermis

Im Rahmen von AD kommt es zu Umbauprozessen in der Haut, die durch eine Spongiose, Hyperkeratose und Akanthose gekennzeichnet sind. Auch in dem hier verwendeten Mausmodell wurden diese Veränderungen bei mit OVA sensibilisierten und provozierten Tieren beobachtet. Die Messung der epidermalen Dicke, die durch diese Prozesse verändert wird, ist ein etablierter Parameter für die Krankheitsaktivität von AD im Mausmodell [17, 118]. Im AD-Stress Modell führte Stress beim Balb/c- und C57BL/6-Stamm zu einer signifikanten Zunahme der epithelialen Dicke. Diese Beobachtung zeigt, dass dieses Merkmal von AD in beiden Mausstämmen etabliert werden kann und unabhängig des genetischen Hintergrunds ist.

Parallel dazu wurde im Asthma-Stress Modell die Dicke des Bronchialepithels bestimmt, um den Einfluss von Provokation von A. bronchiale und Stress auf diesen Parameter zu untersuchen. In der menschlichen Lunge befinden sich SP-immunoreaktive Nervenfasern um Blutgefäße, in der glatten Muskelzellschicht, im Epithel der Luftwege und in der Submukosa [119]. Diese werden dort bei Asthmatikern im Vergleich zu Nichtasthmatikern vermehrt gefunden [120]. Auch ist der NK2-Rezeptor auf glatten Muskelzellen bei Asthmatikern im Vergleich zu Nichtasthmatikern heraufreguliert, während die Expression des NK1-Rezeptor auf Epithelzellen, Becherzellen und in submukösen Drüsen sich nur wenig zwischen Asthmatikern und Nichtasthmatikern unterscheidet [54, 121]. Im Rahmen der unter anderem durch SP vermittelten neurogenen Entzündung nimmt die Permeabilität des Endothels zu. Es bildet sich ein Ödem, das im akuten Geschehen zur Erhöhung der Atemwegsobstruktion beiträgt. Dies wurde im Asthma-Stress Modell beobachtet. Hier wurde zum ersten Mal gezeigt, dass Allergenprovokation zu einer signifikanten Zunahme der Bronchialepitheldicke beim C57BL/6-Stamm und Balb/c-Stamm führt. Da die unter Stress beobachtete Zunahme der Dicke des Bronchialepithels durch Administration des NK1-RA verhindert wurde, kann vermutet werden, dass beim C57BL/6-Stamm Stress über SP in der akuten Phase des A. bronchiales die Ödembildung in der Bronchialschleimhaut fördert. Beim Balb/c-Stamm führte Stress zu einer Abnahme des Bronchialepithels, wobei methodische Fehler (unzureichendes Probenmaterial) die Interpretation dieses Ergebnisses

erschweren. Aufgrund des Versuchsaufbaus dient dieses Asthma-Stress Modell der Untersuchung akuter Prozesse im Rahmen von A. bronchiale. Strukturelle Umbauprozesse im Verlauf der chronischen Entzündung der Atemwege bei A. bronchiale, das sog. Remodelling, können anhand dieses Modells nicht untersucht werden. Es ist bekannt, dass SP durch Stimulierung von Fibroblasten [122] und NK1-vermittelter Förderung der Mukusproduktion durch submukösen Drüsen [123, 124] im Mausmodell an einer Reihe der im Remodelling beobachteten Umbauprozesse mitwirkt. Remodelling ist gekennzeichnet durch vermehrte Ablagerung extrazellulärer Matrixproteine in der retikulären Basalmembran und bronchialen Submukosa, Zunahme der glatten Muskelzellmasse, Hypertrophie der Becherzellen und Gefäßneubildung. Es wird u. a. durch die von EOS produzierten Mediatoren IL-13, TGF- α , TGF- β und VEGF gefördert [125]. Die proinflammatorischen Zytokine IL-9 und IL-13, die in der BAL gestresster Mäuse erhöht sind [85], verursachen Schäden am Bronchialepithel und fördern die Hyperplasie der Becherzellen mit Hypersekretion von Mukus [126-128]. Hier wurde gezeigt, dass Stress über SP das akute Entzündungsgeschehen u. a. durch Förderung der Ödembildung beeinflusst. Es ist zu untersuchen, ob Stress über Substanz P oder andere Mediatoren auch chronische Umbauprozesse im Rahmen einer allergischen Atemwegsinflammation beeinflusst.

Die Erhöhung des Atemwegswiderstands ist eines der Hauptmerkmale von A. bronchiale. Im Mausmodell führt Stress zu einer Zunahme des Atemwegswiderstandes gemessen mittels elektrischer Feldstimulation, die durch einen NK1-RA verhindert wurde [109]. Es sind erhebliche Unterschiede in der bronchialen Hyperreagibilität gegenüber Allergenen zwischen einzelnen Mausstämmen beobachtet worden, die einerseits auf Unterschieden in Sensibilisierungsprotokollen und Messungsmethoden beruhen, andererseits eine genetische Prädisposition für die Entwicklung dieses Merkmals wahrscheinlich machen [78, 96]. Die im Asthma-Stress Modell erhobenen Parameter lassen keine direkten Rückschlüsse auf den Grad des Atemwegswiderstands zu, jedoch sind einige Beobachtungen zum AHR im Tiermodell für das hier vorgestellte Thema interessant. Im Asthma-Stress Modell wurde eine hohe Korrelation zwischen der IL-5 Konzentration in der BAL und der Anzahl an EOS in der BAL beim C57BL/6-Stamm gefunden, nicht jedoch beim Balb/c-Stamm. Es bestehen widersprüchliche Antworten auf die Frage, ob die Anzahl der EOS bzw. Leukozyten in der BAL, der IL-4 und IL-5 Spiegel und der Atemwegswiderstand miteinander korrelieren. Einige Studien deuten auf eine Korrelation hin [129, 130], während andere Studien keine Korrelation finden [16, 77, 78, 92]. Es ist bekannt, dass AHR zumindest im Tiermodell durch zwei voneinander unabhängig agierende Mechanismen – einem Mastzell-abhängigem sowie einem EOS-abhängigem Mechanismus –

induziert wird [130, 131]. Auf beide, Mastzelle und EOS, übt Stress über SP, wie hier immer wieder gezeigt, erheblichen Einfluss aus. Somit bestehen vielfältige potentielle Angriffspunkte für SP, in den Krankheitsprozess von A. bronchiale einzugreifen. Auch wenn im Asthma-Stress Modell nicht immer eindeutige Ergebnisse gefunden wurden und Einzelheiten der Wirkungen von SP und/oder Stress auf die Krankheitsaktivität von A. bronchiale noch nicht ausreichend geklärt sind, kommt Substanz P in der unter Stress beobachteten Aggravation von A. bronchiale eine wichtige Bedeutung zu.

4.5 Ausblick

Neuropeptide und ihre Rezeptoren sind ein interessantes Ziel für die pharmakologische Forschung in einer Vielzahl von Erkrankungen [132]. Bei leichter und schwerer Depression wurde eine signifikante Verbesserung der Symptomatik durch Therapie mit einem NK1-RA erreicht, die nur von wenigen Nebenwirkungen begleitet war [133]. Erste registrierte klinische Anwendung findet der NK1-RA bei der Übelkeit im Rahmen einer Chemotherapie. Dort kann er das Auftreten der Übelkeit erfolgreich senken [134]. Bei der Behandlung von A. bronchiale wurde bisher keine überzeugende Verbesserung der Symptomatik durch Anwendung eines NK1-RA erzielt. In humanen Studien und im Mausmodell hatte ein NK1-RA nur schwache Auswirkung auf die Verhinderung der Bronchokonstriktion auf Allergenexposition [135-137]. In Tiermodellen wurde zwar eine Abnahme der Migration von EOS in die Lunge durch den NK1-RA erreicht, die die reversible Bronchokonstriktion auf Allergene jedoch nicht verhinderte [75, 136, 138, 139].

Der für AD typische starke Juckreiz wurde im Mausmodell durch einen NK1-RA deutlich vermindert [140]. Auch Entspannungstechniken wie die Muskelrelaxation nach Jacobsens mit dem Ziel der Reduktion des Stress- und Angstempfindens führen zu einer Verminderung des Juckreizes und einer Abnahme der Beschwerden bei Patienten mit AD [35, 141]. Dabei ist bekannt, dass der NK1-Rezeptor für Substanz P ein zentraler Vermittler der Angstreaktion ist [142]. Die Ergebnisse aus dem Asthma-Stress und AD-Stress Modell bestätigen eine wichtige Rolle für Substanz P und seinen NK1-Rezeptor bei der unter Stress beobachteten Aggravation dieser Erkrankungen durch Förderung der neurogenen Entzündung. Psychopharmokologische Forschungsansätze mit einem NK1-RA das Angstempfinden auf zentralem Niveau zu senken und die Förderung der neurogenen Entzündung durch Stress zu verhindern, stellen ein neues und

attraktives Ziel für die Forschung von AD und A. bronchiale dar, um die Behandlung dieser weit verbreiteten Krankheiten zu optimieren.
5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, im Mausmodell den Einfluss von Stress auf die Krankheitsaktivität von atopischer Dermatitis (AD) und Asthma bronchiale in Abhängigkeit der genetischen Prädisposition zu untersuchen. Zahlreiche Studien zeigen, dass Stress den Verlauf allergischer Erkrankungen durch Verschiebung des Zytokinprofils und Förderung der neurogenen Entzündung beeinflusst. Das Neurotrophin Substanz P, das im Nervensystem und im Immunsystem gebildet und sezerniert wird und dessen NK1-Rezeptor auf Nervenfasern und Immunzellen exprimiert wird, wird als einer der Vermittler der unter Stress beobachteten Aggravation von AD und A. bronchiale diskutiert.

In einem sog. AD-Stress und in einem Asthma-Stress Modell (einem Modell der allergischen Atemwegsinflammation) wurden zwei in der Forschung häufig eingesetzte Mausstämme,

- der Balb/c-Stamm, ein als stressreaktiv geltender und zu einem Th2-dominierten Zytokinprofil neigender Stamm und
- der C57BL/6-Stamm, ein eher stressresistenter und zu einem Th1-Zytokinprofil neigender Stamm

hinsichtlich verschiedener Parameter der Krankheitsaktivität von AD und A. bronchiale miteinander verglichen. Um die Rolle von Substanz P bei den unter Stress auftretenden Veränderungen bestimmen zu können, wurde zusätzlich einer Gruppe jedes Mausstamms in jedem Modell vor und nach 24stündiger Stressexposition mittels Maulwurfsvertreibers ein NK1-Rezeptorantagonist injiziert. Als zusätzliche Fragestellung wurde im AD-Stress Modell des C57BL/6-Stamms untersucht, inwieweit der Zeitpunkt der Stressexposition, vor oder nach Provokation, die Krankheitsaktivität beeinflusst.

Im AD-Stress Modell führte Stress bei beiden Mausstämmen zu einer deutlichen Zunahme der epidermalen Dicke, der Mastzelldegranulation und des Eosinophileninfiltrats in Läsionen von AD, die durch Administration des NK1-Rezeptorantagonisten verhindert werden konnte.

In AD-Läsionen von sensibilisierten Mäusen des C57BL/6-Stamm fanden sich signifikant weniger degranulierte Mastzellen, jedoch ein signifikant stärkeres Eosinophileninfiltrat als in AD-Läsionen von sensibilisierten Mäusen des Balb/c-Stamm. Es ist anzunehmen, dass in der Entwicklung von AD-Läsionen beim Balb/c-Stamm die Aktivierung der Mastzelle eine zentrale Rolle spielt, während beim C57BL/6-Stamm eher die Aktivierung und Förderung der Einwanderung von EOS in betroffenes Gewebe zur Krankheitsentstehung von AD beiträgt.

Es fanden sich hochsignifkant weniger eosinophile Granulozyten in den AD-Läsionen der Mäuse, die nach Provokation gestresst wurden als in denen, die vor Provokation gestresst wurden. Wie Stress die Migration der EOS ins Gewebe beeinflusst, ist nicht bekannt, jedoch zeigt dieses Ergebnis, dass neben dem Sensibilisierungsprotokoll auch der Zeitpunkt der Stressexposition einen erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse hat und dies beim Vergleich von Studien zu berücksichtigen ist.

Im Asthma-Stress Modell wurde beim Balb/c-Stamm unter Stress eine Zunahme der Gesamtzellzahl, der Anzahl eosinophiler Granulozyten und der IL-5 Konzentration in der bronchoalveolären Lavage beobachtet, während beim C57BL/6-Stamm Stress zu einer Abnahme dieser drei Parameter führte. Gemäß der in der Literatur postulierten Präferenz der C57BL/6 Maus zur Ausbildung eines Th1- dominierten Zytokinprofils bzw. der Balb/c-Maus zur Ausbildung eines Th2- dominierten Zytokinprofils, war somit bei der C57BL/6-Maus unter Stress eine Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung Th1 und bei der Balb/c-Maus in Richtung Th2 zu beobachten. Die Ausbildung eines Th1- oder Th2-dominierten Zytokinprofils unter Stress in Abhängigkeit von der genetischen Prädisposition ist ein zu empfehlender Ansatzpunkt für weitere Forschungsbemühungen.

Im Rahmen der neurogenen Entzündung nimmt die Permeabilität des Endothels zu. Es bildet sich ein Ödem, das im akuten Geschehen zur Erhöhung der Atemwegsobstruktion beiträgt. Im Asthma-Stress Modell führte Stressexposition sensibilisierter C57BL/6-Mäuse zu einer signifikanten Zunahme der Bronchialepitheldicke, die durch Administration des NK1-RA verhindert wurde. Es kann angenommen werden, dass beim C57BL/6-Stamm Stress über SP in der akuten Phase von A. bronchiale die Ödembildung in der Bronchialschleimhaut fördert.

Die Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit belegen eine wichtige Rolle von Substanz P und seinem NK1-Rezeptor bei der unter Stress beobachteten Aggravation von AD und A. bronchiale. Psychopharmokologische Forschungsansätze mit einem NK1-Rezeptorantagonisten das Angstempfinden auf zentralem Niveau zu senken und die Förderung der neurogenen Entzündung durch Stress zu verhindern, stellen ein neues und attraktives Ziel für die Forschung von AD und A. bronchiale dar, um die Behandlung dieser weit verbreiteten Krankheiten zu optimieren.

6 Literaturverzeichnis

- 1. Holgate ST, The epidemic of allergy and asthma. Nature 1999;402: B2-4.
- 2. Wuthrich B, Clinical aspects, epidemiology, and prognosis of atopic dermatitis. Ann Allergy Asthma Immunol 1999;83: 464-470.
- 3. Buffum WP, Settipane GA, Prognosis of asthma in childhood. Am J Dis Child 1966;112: 214-217.
- 4. Latvala J, von Hertzen L, Lindholm H, et al., Trends in prevalence of asthma and allergy in Finnish young men: nationwide study, 1966-2003. Bmj 2005;330: 1186-1187.
- Asher MI, Weiland SK, The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). ISAAC Steering Committee. Clin Exp Allergy 1998;28 Suppl 5: 52-66; discussion 90-51.
- Stock S, Redaelli M, Luengen M, et al., Asthma: prevalence and cost of illness. Eur Respir J 2005;25: 47-53.
- 7. Weinmann S, Kamtsiuris P, Henke KD, et al., The costs of atopy and asthma in children: assessment of direct costs and their determinants in a birth cohort. Pediatr Allergy Immunol 2003;14: 18-26.
- Romagnani S, T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann Allergy Asthma Immunol 2000;85: 9-18; quiz 18, 21.
- 9. Grewe M, Gyufko K, Schopf E, et al., Lesional expression of interferon-gamma in atopic eczema. Lancet 1994;343: 25-26.
- 10. Romagnani S, The Th1/Th2 paradigm and allergic disorders. Allergy 1998;53: 12-15.
- 11. Brightling CE, Bradding P, Pavord ID, et al., New insights into the role of the mast cell in asthma. Clin Exp Allergy 2003;33: 550-556.
- 12. Machado DC, Horton D, Harrop R, et al., Potential allergens stimulate the release of mediators of the allergic response from cells of mast cell lineage in the absence of sensitization with antigen-specific IgE. Eur J Immunol 1996;26: 2972-2980.
- Nsouli TM, Nsouli SM, Bellanti JA, Neuroimmunoallergic inflammation: new pathogenetic concepts and future perspectives of immediate and late allergic reactions. Part II. Ann Allergy 1988;60: 483-492.
- 14. McKay DM, Bienenstock J, The interaction between mast cells and nerves in the gastrointestinal tract. Immunol Today 1994;15: 533-538.

- Meggs WJ, Neurogenic switching: a hypothesis for a mechanism for shifting the site of inflammation in allergy and chemical sensitivity. Environ Health Perspect 1995;103: 54-56.
- Liu LY, Coe CL, Swenson CA, et al., School examinations enhance airway inflammation to antigen challenge. Am J Respir Crit Care Med 2002;165: 1062-1067.
- Pavlovic S, Daniltchenko M, Tobin DJ, et al., Further Exploring the Brain-Skin Connection: Stress Worsens Dermatitis via Substance P-dependent Neurogenic Inflammation in Mice. J Invest Dermatol 2007.
- 18. Herz U, Braun A, Ruckert R, et al., Various immunological phenotypes are associated with increased airway responsiveness. Clin Exp Allergy 1998;28: 625-634.
- 19. Bruijnzeel-Koomen C, Storz E, Menz G, et al., Skin eosinophilia in patients with allergic and nonallergic asthma and atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 1992;89: 52-59.
- 20. Takafuji S, Tadokoro K, Ito K, Effects of interleukin (IL)-3 and IL-5 on human eosinophil degranulation induced by complement components C3a and C5a. Allergy 1996;51: 563-568.
- 21. Spergel JM, Mizoguchi E, Oettgen H, et al., Roles of TH1 and TH2 cytokines in a murine model of allergic dermatitis. J Clin Invest 1999;103: 1103-1111.
- 22. Palframan RT, Collins PD, Severs NJ, et al., Mechanisms of acute eosinophil mobilization from the bone marrow stimulated by interleukin 5: the role of specific adhesion molecules and phosphatidylinositol 3-kinase. J Exp Med 1998;188: 1621-1632.
- Wedi B, Raap U, Lewrick H, et al., Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 1997;100: 536-543.
- 24. Moser R, Fehr J, Bruijnzeel PL, IL-4 controls the selective endothelium-driven transmigration of eosinophils from allergic individuals. J Immunol 1992;149: 1432-1438.
- 25. Moqbel R, Ying S, Barkans J, et al., Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. J Immunol 1995;155: 4939-4947.
- 26. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, et al., Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. J Exp Med 1994;179: 703-708.
- 27. Kay AB, Barata L, Meng Q, et al., Eosinophils and eosinophil-associated cytokines in allergic inflammation. Int Arch Allergy Immunol 1997;113: 196-199.

- 28. Grewe M, Czech W, Morita A, et al., Human eosinophils produce biologically active IL-12: implications for control of T cell responses. J Immunol 1998;161: 415-420.
- 29. Brown DG, Stress as a precipitant factor of eczema. J Psychosom Res 1972;16: 321-327.
- Wood BL, Lim J, Miller BD, et al., Family emotional climate, depression, emotional triggering of asthma, and disease severity in pediatric asthma: examination of pathways of effect. J Pediatr Psychol 2007;32: 542-551.
- 31. Sandel M, Wright RJ, When home is where the stress is: expanding the dimensions of housing that influence asthma morbidity. Arch Dis Child 2006;91: 942-948.
- 32. King RM, Wilson GV, Use of a diary technique to investigate psychosomatic relations in atopic dermatitis. J Psychosom Res 1991;35: 697-706.
- 33. Sandberg S, Paton JY, Ahola S, et al., The role of acute and chronic stress in asthma attacks in children. Lancet 2000;356: 982-987.
- 34. Kilpelainen M, Koskenvuo M, Helenius H, et al., Stressful life events promote the manifestation of asthma and atopic diseases. Clin Exp Allergy 2002;32: 256-263.
- Ehlers A, Stangier U, Gieler U, Treatment of atopic dermatitis: a comparison of psychological and dermatological approaches to relapse prevention. J Consult Clin Psychol 1995;63: 624-635.
- 36. Lehrer PM, Sargunaraj D, Hochron S, Psychological approaches to the treatment of asthma. J Consult Clin Psychol 1992;60: 639-643.
- 37. Buske-Kirschbaum A, Geiben A, Hollig H, et al., Altered responsiveness of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the sympathetic adrenomedullary system to stress in patients with atopic dermatitis. J Clin Endocrinol Metab 2002;87: 4245-4251.
- Buske-Kirschbaum A, von Auer K, Krieger S, et al., Blunted cortisol responses to psychosocial stress in asthmatic children: a general feature of atopic disease? Psychosom Med 2003;65: 806-810.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, et al., Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. Front Neuroendocrinol 2003;24: 151-180.
- Elenkov IJ, Webster EL, Torpy DJ, et al., Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. Ann N Y Acad Sci 1999;876: 1-11; discussion 11-13.
- 41. Elenkov IJ, Chrousos GP, Stress system--organization, physiology and immunoregulation. Neuroimmunomodulation 2006;13: 257-267.

- 42. Lindsay RM, Harmar AJ, Nerve growth factor regulates expression of neuropeptide genes in adult sensory neurons. Nature 1989;337: 362-364.
- 43. Scholzen T, Armstrong CA, Bunnett NW, et al., Neuropeptides in the skin: interactions between the neuroendocrine and the skin immune systems. Exp Dermatol 1998;7: 81-96.
- 44. Frieri M, Neuroimmunology and inflammation: implications for therapy of allergic and autoimmune diseases. Ann Allergy Asthma Immunol 2003;90: 34-40.
- 45. Steinhoff M, Stander S, Seeliger S, et al., Modern aspects of cutaneous neurogenic inflammation. Arch Dermatol 2003;139: 1479-1488.
- 46. Braun A, Renz H, Neuro-Immune Interaction in Allergy and Asthma. In: Ring J, Behrendt H eds. New Trends in Allergy. Berlin, Heidelberg, New York, Hong Kong, London, Milan, Paris, Tokyo: Springer, 2002.
- 47. Raap U, Werfel T, Jaeger B, et al., [Atopic dermatitis and psychological stress]. Hautarzt 2003;54: 925-929.
- 48. Baluk P, Neurogenic inflammation in skin and airways. J Investig Dermatol Symp Proc 1997;2: 76-81.
- 49. Peters EM, Ericson ME, Hosoi J, et al., Neuropeptide control mechanisms in cutaneous biology: physiological and clinical significance. J Invest Dermatol 2006;126: 1937-1947.
- 50. Black PH, Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. Brain Behav Immun 2002;16: 622-653.
- 51. Levite M, Neuropeptides, by direct interaction with T cells, induce cytokine secretion and break the commitment to a distinct T helper phenotype. Proc Natl Acad Sci U S A 1998;95: 12544-12549.
- 52. Arck PC, Slominski A, Theoharides TC, et al., Neuroimmunology of stress: skin takes center stage. J Invest Dermatol 2006;126: 1697-1704.
- 53. Sternberg EM, Chrousos GP, Wilder RL, et al., The stress response and the regulation of inflammatory disease. Ann Intern Med 1992;117: 854-866.
- 54. De Swert KO, Joos GF, Extending the understanding of sensory neuropeptides. Eur J Pharmacol 2006;533: 171-181.
- 55. Peters EM, Kuhlmei A, Tobin DJ, et al., Stress exposure modulates peptidergic innervation and degranulates mast cells in murine skin. Brain Behav Immun 2005;19: 252-262.
- 56. Undem BJ, Hunter DD, Liu M, et al., Allergen-induced sensory neuroplasticity in airways. Int Arch Allergy Immunol 1999;118: 150-153.

- 57. Joachim RA, Kuhlmei A, Dinh QT, et al., 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 2007.
- 58. Singh LK, Pang X, Alexacos N, et al., Acute immobilization stress triggers skin mast cell degranulation via corticotropin releasing hormone, neurotensin, and substance P: A link to neurogenic skin disorders. Brain Behav Immun 1999;13: 225-239.
- 59. Theoharides TC, Singh LK, Boucher W, et al., Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. Endocrinology 1998;139: 403-413.
- 60. Lindsey KQ, Caughman SW, Olerud JE, et al., Neural regulation of endothelial cellmediated inflammation. J Investig Dermatol Symp Proc 2000;5: 74-78.
- 61. Quinlan KL, Song IS, Naik SM, et al., VCAM-1 expression on human dermal microvascular endothelial cells is directly and specifically up-regulated by substance P. J Immunol 1999;162: 1656-1661.
- 62. Peters EM, Raap U, Welker P, et al., Neurotrophins act as neuroendocrine regulators of skin homeostasis in health and disease. Horm Metab Res 2007;39: 110-124.
- 63. Mills CD, Kincaid K, Alt JM, et al., M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol 2000;164: 6166-6173.
- 64. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, et al., Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. The Journal of experimental medicine 1989;169: 59-72.
- 65. Scott JP, Higenbottam TW, Adverse reactions and interactions of cyclosporin. Medical toxicology and adverse drug experience 1988;3: 107-127.
- 66. Anisman H, Lacosta S, Kent P, et al., Stressor-induced corticotropin-releasing hormone, bombesin, ACTH and corticosterone variations in strains of mice differentially responsive to stressors. Stress 1998;2: 209-220.
- 67. Anisman H, Prakash P, Merali Z, et al., Corticotropin releasing hormone receptor alterations elicited by acute and chronic unpredictable stressor challenges in stressor-susceptible and resilient strains of mice. Behav Brain Res 2007;181: 180-190.
- 68. Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, et al., A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. J Invest Dermatol 2001;117: 3-15.

- 69. Blois SM, Joachim R, Kandil J, et al., Depletion of CD8+ cells abolishes the pregnancy protective effect of progesterone substitution with dydrogesterone in mice by altering the TH1/TH2 cytokine profile. J Immunol 2004;172: 5893-5899.
- Joachim RA, Quarcoo D, Arck PC, et al., Stress enhances airway reactivity and airway inflammation in an animal model of allergic bronchial asthma. Psychosom Med 2003;65: 811-815.
- 71. Clark DA, Banwatt D, Chaouat G, Stress-triggered abortion in mice prevented by alloimmunization. Am J Reprod Immunol 1993;29: 141-147.
- 72. Arck PC, Stress and pregnancy loss: role of immune mediators, hormones and neurotransmitters. Am J Reprod Immunol 2001;46: 117-123.
- 73. Joachim RA, Hildebrandt M, Oder J, et al., Murine stress-triggered abortion is mediated by increase of CD8+ TNF-alpha+ decidual cells via substance P. Am J Reprod Immunol 2001;45: 303-309.
- 74. Akdis CA, Blaser K, Histamine in the immune regulation of allergic inflammation. J Allergy Clin Immunol 2003;112: 15-22.
- 75. Costello RW, Fryer AD, Belmonte KE, et al., Effects of tachykinin NK1 receptor antagonists on vagal hyperreactivity and neuronal M2 muscarinic receptor function in antigen challenged guinea-pigs. Br J Pharmacol 1998;124: 267-276.
- 76. Hunt JE, Stevens RL, Austen KF, et al., Natural disruption of the mouse mast cell protease 7 gene in the C57BL/6 mouse. J Biol Chem 1996;271: 2851-2855.
- 77. Takeda K, Haczku A, Lee JJ, et al., Strain dependence of airway hyperresponsiveness reflects differences in eosinophil localization in the lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2001;281: L394-402.
- 78. Whitehead GS, Walker JK, Berman KG, et al., Allergen-induced airway disease is mouse strain dependent. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003;285: L32-42.
- 79. Chen E, Miller GE, Stress and inflammation in exacerbations of asthma. Brain Behav Immun 2007;21: 993-999.
- 80. Wright RJ, Cohen RT, Cohen S, The impact of stress on the development and expression of atopy. Current opinion in allergy and clinical immunology 2005;5: 23-29.
- Amano H, Negishi I, Akiyama H, et al., Psychological Stress can Trigger Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice: An Inhibitory Effect of Corticotropin-Releasing Factor. Neuropsychopharmacology 2007.
- 82. Tannenbaum B, Anisman H, Impact of chronic intermittent challenges in stressorsusceptible and resilient strains of mice. Biol Psychiatry 2003;53: 292-303.

- 83. Arck PC, Merali FS, Manuel J, et al., Stress-triggered abortion: inhibition of protective suppression and promotion of tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) release as a mechanism triggering resorptions in mice. Am J Reprod Immunol 1995;33: 74-80.
- Dhabhar FS, McEwen BS, Acute stress enhances while chronic stress suppresses cellmediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. Brain Behav Immun 1997;11: 286-306.
- 85. Forsythe P, Ebeling C, Gordon JR, et al., Opposing effects of short- and long-term stress on airway inflammation. American journal of respiratory and critical care medicine 2004;169: 220-226.
- Okuyama K, Ohwada K, Sakurada S, et al., The distinctive effects of acute and chronic psychological stress on airway inflammation in a murine model of allergic asthma. Allergol Int 2007;56: 29-35.
- Portela CP, Leick-Maldonado EA, Kasahara DI, et al., Effects of stress and neuropeptides on airway responses in ovalbumin-sensitized rats. Neuroimmunomodulation 2007;14: 105-111.
- 88. McEwen BS, Protective and damaging effects of stress mediators. N Engl J Med 1998;338: 171-179.
- Miller GE, Cohen S, Ritchey AK, Chronic psychological stress and the regulation of proinflammatory cytokines: a glucocorticoid-resistance model. Health Psychol 2002;21: 531-541.
- Theoharides TC, Donelan JM, Papadopoulou N, et al., Mast cells as targets of corticotropin-releasing factor and related peptides. Trends Pharmacol Sci 2004;25: 563-568.
- 91. Kang DH, Fox C, Th1 and Th2 cytokine responses to academic stress. Res Nurs Health 2001;24: 245-257.
- 92. Kang DH, Coe CL, McCarthy DO, et al., Cytokine profiles of stimulated blood lymphocytes in asthmatic and healthy adolescents across the school year. J Interferon Cytokine Res 1997;17: 481-487.
- 93. Chen E, Hanson MD, Paterson LQ, et al., Socioeconomic status and inflammatory processes in childhood asthma: the role of psychological stress. J Allergy Clin Immunol 2006;117: 1014-1020.
- 94. Marshall GD, Jr., Agarwal SK, Stress, immune regulation, and immunity: applications for asthma. Allergy Asthma Proc 2000;21: 241-246.

- 95. Miller GE, Chen E, Life stress and diminished expression of genes encoding glucocorticoid receptor and beta2-adrenergic receptor in children with asthma. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2006;103: 5496-5501.
- 96. Duguet A, Biyah K, Minshall E, et al., Bronchial responsiveness among inbred mouse strains. Role of airway smooth-muscle shortening velocity. Am J Respir Crit Care Med 2000;161: 839-848.
- 97. Truckenmiller ME, Bonneau RH, Norbury CC, Stress presents a problem for dendritic cells: corticosterone and the fate of MHC class I antigen processing and presentation. Brain Behav Immun 2006;20: 210-218.
- 98. Quartara L, Maggi CA, The tachykinin NK1 receptor. Part I: ligands and mechanisms of cellular activation. Neuropeptides 1997;31: 537-563.
- 99. Maggi CA, Patacchini R, Rovero P, et al., Tachykinin receptors and tachykinin receptor antagonists. J Auton Pharmacol 1993;13: 23-93.
- 100. Andoh T, Nagasawa T, Satoh M, et al., Substance P induction of itch-associated response mediated by cutaneous NK1 tachykinin receptors in mice. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics 1998;286: 1140-1145.
- Erjavec F, Lembeck F, Florjanc-Irman T, et al., Release of histamine by substance P. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 1981;317: 67-70.
- 102. Katsuno M, Aihara M, Kojima M, et al., Neuropeptides concentrations in the skin of a murine (NC/Nga mice) model of atopic dermatitis. J Derm Sci 2003;33: 55-65.
- 103. Ohmura T, Tsunenari I, Hayashi T, et al., Role of Substance P in an NC/Nga Mouse Model of Atopic Dermatitis-Like Disease. Int Arch Allergy Immunol 2004;133: 389-397.
- 104. Chu HW, Kraft M, Krause JE, et al., Substance P and its receptor neurokinin 1 expression in asthmatic airways. J Allergy Clin Immunol 2000;106: 713-722.
- 105. Jarvikallio A, Harvima IT, Naukkarinen A, Mast cells, nerves and neuropeptides in atopic dermatitis and nummular eczema. Arch Dermatol Res 2003;295: 2-7.
- 106. Sugiura H, Maeda T, Uehara M, Mast cell invasion of peripheral nerve in skin lesions of atopic dermatitis. Acta Derm Venereol Suppl 1992;176: 74-76.
- 107. Bienenstock J, Perdue M, Blennerhassett M, et al., Inflammatory cells and the epithelium. Mast cell/nerve interactions in the lung in vitro and in vivo. Am Rev Respir Dis 1988;138: S31-34.

- Okabe T, Hide M, Koro O, et al., Substance P induces tumor necrosis factor-alpha release from human skin via mitogen-activated protein kinase. Eur J Pharmacol 2000;398: 309-315.
- 109. Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D, et al., Neurokinin-1 receptor mediates stressexacerbated allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice. Psychosom Med 2004;66: 564-571.
- Quinlan KL, Song IS, Bunnett NW, et al., Neuropeptide regulation of human dermal microvascular endothelial cell ICAM-1 expression and function. Am J Physiol 1998;275: C1580-1590.
- 111. Joachim RA, Sagach V, Quarcoo D, et al., Effect of stress on eotaxin and expression of adhesion molecules in a murine model of allergic airway inflammation. Journal of neuroimmunology 2007;182: 55-62.
- 112. Baluk P, Bowden JJ, Lefevre PM, et al., Upregulation of substance P receptors in angiogenesis associated with chronic airway inflammation in rats. Am J Physiol 1997;273: L565-571.
- Botchkarev VA, Yaar M, Peters EM, et al., Neurotrophins in skin biology and pathology. J Invest Dermatol 2006;126: 1719-1727.
- 114. Braun A, Appel E, Baruch R, et al., Role of nerve growth factor in a mouse model of allergic airway inflammation and asthma. Eur J Immunol 1998;28: 3240-3251.
- 115. Peters EM, Arck PC, Paus R, Hair growth inhibition by psychoemotional stress: a mouse model for neural mechanisms in hair growth control. Exp Dermatol 2006;15: 1-13.
- 116. Kang H, Byun DG, Kim JW, Effects of substance P and vasoactive intestinal peptide on interferon-gamma and interleukin-4 production in severe atopic dermatitis. Ann Allergy Asthma Immunol 2000;85: 227-232.
- 117. Gordon DJ, Ostlere LS, Holden CA, Neuropeptide modulation of Th1 and Th2 cytokines in peripheral blood mononuclear leucocytes in atopic dermatitis and non-atopic controls. Br J Dermatol 1997;137: 921-927.
- 118. Peters EMJ, Tobin DJ, Hagen E, et al., Stress induced neurogenic inflammation exacerbates allergic dermatitis in mice. J Clin Invest 2004: (*submitted*).
- 119. Mapp CE, Miotto D, Braccioni F, et al., The distribution of neurokinin-1 and neurokinin-2 receptors in human central airways. Am J Respir Crit Care Med 2000;161: 207-215.
- 120. Ollerenshaw SL, Jarvis D, Sullivan CE, et al., Substance P immunoreactive nerves in airways from asthmatics and nonasthmatics. Eur Respir J 1991;4: 673-682.

- 121. Bai TR, Zhou D, Weir T, et al., Substance P (NK1)- and neurokinin A (NK2)-receptor gene expression in inflammatory airway diseases. Am J Physiol 1995;269: L309-317.
- 122. Harrison NK, Dawes KE, Kwon OJ, et al., Effects of neuropeptides on human lung fibroblast proliferation and chemotaxis. Am J Physiol 1995;268: L278-283.
- 123. Rogers DF, Aursudkij B, Barnes PJ, Effects of tachykinins on mucus secretion in human bronchi in vitro. Eur J Pharmacol 1989;174: 283-286.
- 124. Lotvall JO, Lemen RJ, Hui KP, et al., Airflow obstruction after substance P aerosol: contribution of airway and pulmonary edema. J Appl Physiol 1990;69: 1473-1478.
- 125. Williams TJ, The eosinophil enigma. J Clin Invest 2004;113: 507-509.
- 126. Kuperman DA, Huang X, Koth LL, et al., Direct effects of interleukin-13 on epithelial cells cause airway hyperreactivity and mucus overproduction in asthma. Nat Med 2002;8: 885-889.
- 127. Louahed J, Toda M, Jen J, et al., Interleukin-9 upregulates mucus expression in the airways. Am J Respir Cell Mol Biol 2000;22: 649-656.
- 128. Vermeer PD, Harson R, Einwalter LA, et al., Interleukin-9 induces goblet cell hyperplasia during repair of human airway epithelia. Am J Respir Cell Mol Biol 2003;28: 286-295.
- 129. Tomkinson A, Cieslewicz G, Duez C, et al., Temporal association between airway hyperresponsiveness and airway eosinophilia in ovalbumin-sensitized mice. Am J Respir Crit Care Med 2001;163: 721-730.
- 130. Hamelmann E, Cieslewicz G, Schwarze J, et al., Anti-interleukin 5 but not anti-IgE prevents airway inflammation and airway hyperresponsiveness. Am J Respir Crit Care Med 1999;160: 934-941.
- 131. Takeda K, Hamelmann E, Joetham A, et al., Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mast cell-deficient mice. J Exp Med 1997;186: 449-454.
- 132. Brain SD, Cox HM, Neuropeptides and their receptors: innovative science providing novel therapeutic targets. Br J Pharmacol 2006;147 Suppl 1: S202-211.
- 133. Kramer MS, Winokur A, Kelsey J, et al., Demonstration of the efficacy and safety of a novel substance P (NK1) receptor antagonist in major depression. Neuropsychopharmacology 2004;29: 385-392.
- 134. Chawla SP, Grunberg SM, Gralla RJ, et al., Establishing the dose of the oral NK1 antagonist aprepitant for the prevention of chemotherapy-induced nausea and vomiting. Cancer 2003;97: 2290-2300.

- 135. Ichinose M, Miura M, Yamauchi H, et al., A neurokinin 1-receptor antagonist improves exercise-induced airway narrowing in asthmatic patients. American journal of respiratory and critical care medicine 1996;153: 936-941.
- 136. De Swert KO, Tournoy KG, Joos GF, et al., The role of the tachykinin NK1 receptor in airway changes in a mouse model of allergic asthma. J Allergy Clin Immunol 2004;113: 1093-1099.
- 137. Fahy JV, Wong HH, Geppetti P, et al., Effect of an NK1 receptor antagonist (CP-99,994) on hypertonic saline-induced bronchoconstriction and cough in male asthmatic subjects. American journal of respiratory and critical care medicine 1995;152: 879-884.
- Advenier C, Lagente V, Boichot E, The role of tachykinin receptor antagonists in the prevention of bronchial hyperresponsiveness, airway inflammation and cough. Eur Respir J 1997;10: 1892-1906.
- Schuiling M, Zuidhof AB, Zaagsma J, et al., Role of tachykinin NK1 and NK2 receptors in allergen-induced early and late asthmatic reactions, airway hyperresponsiveness, and airway inflammation in conscious, unrestrained guinea pigs. Clin Exp Allergy 1999;2: 48-52.
- 140. Ohmura T, Hayashi T, Satoh Y, et al., Involvement of substance P in scratching behaviour in an atopic dermatitis model. Eur J Pharmacol 2004;491: 191-194.
- 141. Hashizume H, Horibe T, Ohshima A, et al., Anxiety accelerates T-helper 2-tilted immune responses in patients with atopic dermatitis. Br J Dermatol 2005;152: 1161-1164.
- 142. Czeh B, Fuchs E, Simon M, NK1 receptor antagonists under investigation for the treatment of affective disorders. Expert Opin Investig Drugs 2006;15: 479-486.

7 Anhang

Lebenslauf

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

Danksagung

Diese Arbeit wurde unter Leitung von PD Dr. Eva Peters und Dr. Ricarda Joachim angefertigt, denen für die Überlassung dieses interessanten Dissertationsthemas, ihre unablässige Unterstützung und kompetente Betreuung mein allergrößter Dank gilt.

Christiane Liezmann möchte ich für zahlreiche hilfreiche Tipps und die praktische und moralische Unterstützung während dieser Arbeit danken.

Besonderen Dank auch an Maria Daniltchenko, die mir vor allem beim tierexperimentellen Teil mit großem Engagement zur Seite stand.

Ein besonders herzlicher Dank geht an die Mitarbeiter des PNI-Labors, vor allem Evi Hagen, Petra Busse und Petra Moschanksy, die auf unzählige Fragen meinerseits mit viel Geduld eingegangen sind und mich stets tatkräftig unterstützt haben.

Nicht zuletzt geht mein Dank an meine Eltern, Hiltrud und Helmuth Coqui, die mir während dieser Arbeit und meinem Studium immer zur Seite standen. Auch CM Susy und Mestre Rosalvo, die mich außerhalb des Studiums auf vielfältige Weise fördern, möchte ich herzlich danken.

Erklärung an Eides statt

"Ich, Tamara Coqui, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: "Die Rolle des genetischen Hintergrunds für die Ausprägung atopischer Erkrankungen: Vergleich der Mausstämme Balb/c- und C57BL/6 im Atopischen Dermatitis-Stress und Asthma-Stress Modell" selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe."

Datum

Unterschrift